

LASEROWA JONIZACJA PRÓBKII WSPOMAGANA MATRYCĄ MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION

Laserowa jonizacja próbki wspomagana matrycą (MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) jest nową metodą stosowaną w spektrometrii masowej od połowy lat osiemdziesiątych w badaniach ciężkich biomolekuł. Wykorzystuje ona stałą matrycę, która pełni kluczową rolę w ich procesach jonizacyjnych. Procesy te (desorpcja, jonizacja) inicjuje tutaj krótkotrwały (kilka nanosekund) impuls światła laserowego. Dzięki tzw. "miękkiej" jonizacji w metodzie MALDI znajduje ona zastosowanie w badaniach ciężkich biomolekuł takich jak peptydy, białka, kwasy karboksylowe i wiele innych. W artykule zawarte są podstawy dotyczące spektrometrii masowej związków biologicznych, a także informacje na temat procesu jonizacji za pomocą desorpcji laserowej. Ponadto zaprezentowane są wyniki najnowszych badań przeprowadzonych metodą MALDI w Zakładzie Fizyki Stosowanej Instytutu Fizyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization) is a quite new method used in the mass spectrometry since the middle of eighties in studies of heavy biomolecules. It uses a solid matrix that is crucial in the ionization processes of macromolecular substances. These processes (desorption and ionization) are initiated by a few nanoseconds laser pulse. Because of its "softness", MALDI has the application in the analysis of biomolecules such as peptides, proteins, carbohydrates, oligonucleotides and others. This article presents basics of the biomolecule mass spectrometry first of all, but also some general pieces of information about sample ionization processes by MALDI. Some of the results obtained by using TOF spectrometer, in the Division of Applied Physics, Institute of Physics, Marie Curie-Skłodowska University, are also presented.

1. Wstęp

Laserowa jonizacja próbki wspomagana matrycą (MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) jest nową metodą stosowaną w spektrometrii masowej od połowy lat osiemdziesiątych. W metodzie tej jony powstają w wyniku procesów oddziaływania pulsującej wiązki laserowej z tzw. matrycą, w której znajdują się molekuly badanej substancji [1,2]. Matryca - zwykle kwas aromatyczny - pochłania energię promieniowania lasera, a przez to zapewnia desorpcję i jonizację zawartych w niej molekuł. Wytworzone w tym procesie jony są następnie kierowane do analizatora mas, którym jest zwykle spektrometr mas działający na zasadzie pomiaru czasu przelotu jonów (TOF-MS - Time Of Flight Mass Spectrometer) [3,4].

1. Introduction

MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization) is a quite new method used in the mass spectrometry since the middle of eighties. It uses a solid matrix and the laser light. Ions are formed as a result of directing a pulsed laser beam onto a sample holder with a sample dissolved in a matrix [1,2]. The matrix - usually an aromatic acid - absorbs the laser light energy and causes desorption and ionization of sample molecules. Created in such a way ions are directed into the mass analyzer, usually Time Of Flight Mass Spectrometer (TOF-MS) [3,4].

Dzięki tzw. "miękkiej" jonizacji MALDI jest dobrą metodą do badań nad związkami "wielkocząsteczkowymi" takimi jak peptydy, białka, węglowodany i inne [5,6,7,8].

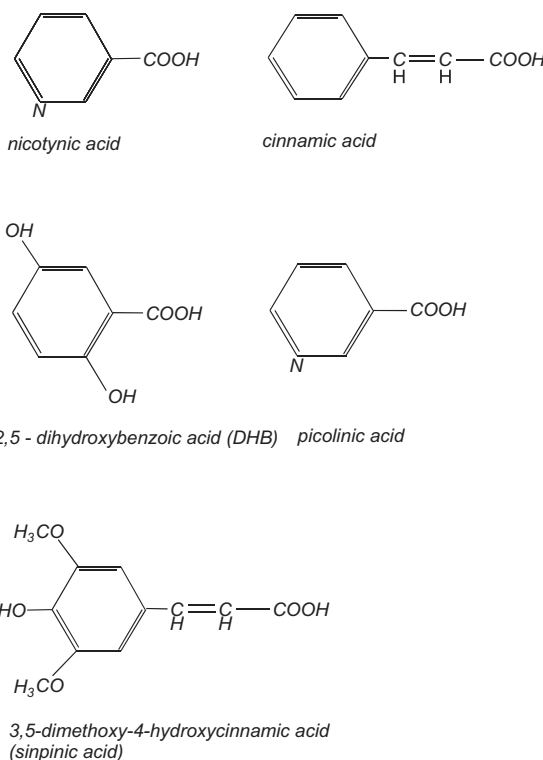
W artykule zawarte są przede wszystkim podstawy dotyczące spektrometrii masowej związków biologicznych, ale również informacje na temat procesu jonizacji za pomocą desorpcji laserowej. Ponadto zaprezentowane są wyniki najnowszych badań przeprowadzonych metodą MALDI w Zakładzie Fizyki Stosowanej Instytutu Fizyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

2. Jonizacja próbki za pomocą metody MALDI

Jonizacja próbki za pomocą metody MALDI przebiega dzięki matrycy, która pośredniczy w procesach przenoszenia energii do badanej substancji i następnie jej jonizacji. Dzięki niej możliwe jest badanie związków nielotnych i "wielkocząsteczkowych". Właściwie wybrana matryca powinna:

- dobrze absorbować promieniowanie z zakresu długości fali użytego lasera,
- łatwo sublimować,
- po desorpcji dostarczać dużej ilości jonów niezbędnych do jonizacji molekuł próbki.

Rys. 1 przedstawia struktury chemiczne najczęściej stosowanych matryc.



Rys. 1. Struktury związków chemicznych najczęściej używanych jako matryce w metodzie MALDI

Fig. 1. Chemical structures of compounds often used as matrixes in MALDI method

Owing to its "softness" matrix-assisted laser desorption and ionization is a good method for the mass spectrometry of macromolecular compounds, mainly biomolecules such as peptides, proteins, carbohydrates, oligonucleodites and others [5,6,7,8].

This article presents basics of the biomolecule mass spectrometry first of all, but also some general pieces of information about sample ionization processes by MALDI. Some of the results obtained by using TOF spectrometer, in the Division of Applied Physics, Institute of Physics, Marie Curie-Skłodowska University, are also presented.

2. Sample ionization by MALDI method

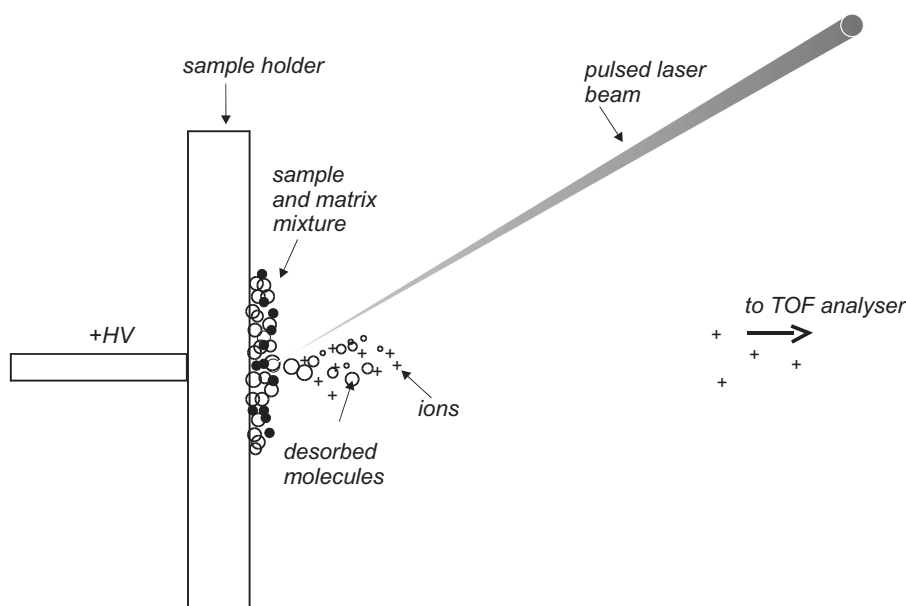
Sample ionization by MALDI proceeds with the help of the matrix that intermediates in energy transfer to the studied substance, makes the sample ionization easier and enables studies of nonvolatile and macromolecular substances. A proper choice of the matrix is very important. It should:

- absorb radiation from the wave length range of a used laser well,
- sublimate easily,
- after desorption, give large quantity of ions necessary to sample molecules ionization.

The structures of most often used matrixes are shown in Fig. 1

W pierwszym etapie rozpuszcza się badaną próbkę w lotnym rozpuszczalniku (woda, acetonitryle, metanol). Następnie roztwór ten miesza się z roztworem matrycy, tak aby zawartość próbki była dużo mniejsza (1:10000) w stosunku do matrycy. Około 1 μl tak sporządzonej mieszaniny umieszcza się na stoliku desorpcyjnym (rys. 2) i suszy strumieniem chłodnego powietrza aż do całkowitego wyparowania rozpuszczalnika. Wszystko to ma na celu uzyskanie jednorodnej warstwy zestalonej mieszaniny próbki i matrycy. Proces przygotowywania tej mieszaniny ma decydujący wpływ na desorpcję i jonizację molekuł próbki.

In the beginning of measurements, the studied substance should be solved in any volatile solvent (distilled water, methanol, acetonitrile). Next the sample solution is mixed with the matrix solution. The amount of the first one should be smaller (1:10000) in comparison with the second one. Then, one should put about 1 μl of this mixture on the sample holder (Fig. 2) and let the solvent vaporize in the air stream. The aim of this is getting uniform crystallization of the studied substance and the matrix mixture. This is very important stage because the quality of the mass spectrum depends on the sample desorption and ionization in the matrix material.



Rys. 2. Stolik desorpcyjny w źródle MALDI

Fig. 2. Laser desorption sample holder in MALDI source

Po dokładnym osuszeniu stolik umieszczany jest wewnątrz komory analizatora, zwykle spektrometru masowego. W spektrometrach mas z pomiarem czasu przelotu jonów najczęściej używa się impulsowego lasera azotowego generującego promieniowanie o długości fali $\lambda = 337 \text{ nm}$. Zogniskowana na powierzchni stolika wiązka lasera oświetla obszar o średnicy około 100 μm . Impuls lasera o czasie trwania rzędu kilku nanosekund, wywołuje serię następujących procesów [9,10]:

- absorpcję promieniowania głównie przez materiał matrycy,
- odparowanie mieszaniny matrycy i próbki na głębokość około 0,5-1 μm ,
- termiczną dysocjację molekuł matrycy i ich jonizację,
- reakcję jonów matrycy z molekułami badanej substancji i ostatecznie wytworzenie jonów próbki (kationów bądź anionów).

After precise drying, the sample holder is put into the analyzer of the mass spectrometer usually. In the case of TOF-MS a pulsed nitrogen laser is used ($\lambda = 337 \text{ nm}$). A laser beam is directed onto the probe and focused on the area of diameter of about 100 μm . Laser pulse lasting several nanoseconds causes series of following processes [9,10]:

- absorption of radiation mainly by the matrix material,
- sample evaporation to a depth of 0,5-1 μm ,
- thermal dissociation of the matrix molecules and their ionization,
- matrix ions reactions with the studied substance and finally sample ions (cations or anions) formation.

Wytworzenie jonów z neutralnej cząsteczki może odbywać się na drodze: termicznej dysocjacji, której towarzyszy powstanie pary kation - anion, oderwania bądź przyłączenia elektronu, przyłączenia bądź oderwania protonu lub przyłączenia kationu.

Wskutek oderwania elektronu powstaje dodatnio naładowany jon M^+ (1), podczas gdy przyłączenie elektronu owocuje reakcją ujemnego jonu M^- (2)

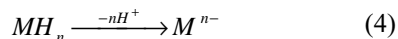


W rezultacie przyłączenia n - protonów utworzony zostaje dodatnio n -krotnie naładowany jon M^{n+} (3)



gdzie: n - liczba przyłączonych protonów.

W wyniku oderwania n protonów otrzymujemy n -krotnie naładowany ujemny jon M^{n-} (4)



gdzie: n - liczba oderwanych protonów.

Jony niektórych związków, powstałe na drodze przyłączenia protonu, mogą okazać się niestabilne ze względu na kowalentną naturę protonu, dlatego bardziej prawdopodobnym jest dla nich proces przyłączenia kationu (5)



Wytworzone jony są następnie przyspieszane w polu elektrycznym i kierowane poprzez analizator do detektora. Procesy prowadzące do ich formowania nie trwają dłużej niż kilka nanosekund, dlatego aby przebiegały efektywnie, wymagana jest duża jednorodność mieszaniny próbki z matrycą. Jej przygotowanie powinno uwzględniać: wybór właściwej matrycy i rozpuszczalnika, sposób ich mieszania oraz nakładania na stolik.

Bardzo krótkie impulsy laserowe o dużej gęstości energii, w warunkach wysokiej próżni (10^{-6} - 10^{-8} Tr), powodują raczej odparowanie molekuł aniżeli ich rozpad [10]. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku związków charakteryzujących się dużymi masami atomowymi np. białek, podczas gdy substancje o masach atomowych nie przekraczających 1000 Da ulegają często w tych samych warunkach fragmentacji. Wyjaśnienie tego procesu jest następujące. Zaabsorbowana przez dużą cząsteczkę energia ulega rozproszeniu na większą liczbę jej stopni swobody. W przypadku mniej złożonych cząsteczek proces absorpcji prowadzi do rozrywania wiązań chemicznych [11].

During ions creation particularly the following processes may take place: thermal dissociation with creation of the cation-anion pair, electron ejection, electron capture, protonation or deprotonation, cationization.

As a result of the electron ejection a positive charge of M^+ is produced (1), on the contrary to the electron capture where a negative charge of M^- is achieved (2)

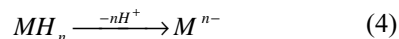


Protonation is the addition of n protons to a molecule to create a " n " charged, positive M^{n+} ion (3)



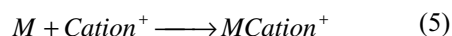
where n is a number of protons added to a molecule.

Deprotonation means the ejection of n protons and, as result of this, getting a " n " charged, negative M^{n-} ion (4)



where n is a number of protons ejected from a molecule.

Because many compounds do not form stable molecular ions when they are protonated, the other reaction is needed. Cationization results in creation of a charged complex and involves the noncovalent addition of a positively charged ion, different from a proton, to a neutral molecule (5). It produces a stable molecular cation on the contrary to protonation, where, because of the covalent nature of a proton, a cation achieved may undergo fragmentation



Ions created in this way are accelerated in an electrical field and directed through the analyzer to a detector. The total time of mentioned above processes does not exceed few nanoseconds. So, if we want them to proceed efficiently, it is necessary to have a very homogenous probe. That is why its preparation method before a measurement (choice of a proper matrix and a solvent, a way of mixing them and putting on a sample holder) is very important.

Very short laser pulses of the great energy density directed onto a sample, placed in high vacuum conditions (10^{-6} - 10^{-8} Tr), cause rather its evaporation than decomposition [10]. It is true in the case of such sensitive materials as proteins of great molecular masses, while substances of $M < 1000$ Da undergo fragmentation in the same conditions very often. Explanation of this process is, that big molecules have many steps of freedom, so that the absorbed energy is dispersed without tearing chemical bounds [11].

3. Niektóre aspekty metody MALDI

W metodzie MALDI istnieją pewne zasady, których należy przestrzegać aby prawidłowo przeprowadzić analizę badanej próbki [11]. Próbka powinna być analizowana zaraz po jej spreparowaniu, tak aby zminimalizować stopień jej zanieczyszczenia.

Sposób jonizacji cząsteczek zależy od tego, jaką grupę funkcjonalną reprezentuje badany związek. Łatwiej jest zjonizować aminy, kwasy czy amidy aniżeli grupy hydroksylowe, estry, ketony bądź aldehydy. Ponieważ peptydy zawierają grupy amidowe i aminowe, dlatego korzystniej jest jonizować je poprzez przyłączenie protonu lub też jego oderwanie - w przypadku gdy zawierają w swej strukturze wiązania kwasowe.

Kwasy karboksylowe zwykle formują jony na drodze przyłączenia dodatnich jonów Na^+ lub K^+ , co prowadzi do utworzenia kompleksów $\text{A}+\text{Na}^+$ lub $\text{A}+\text{K}^+$. Te, które zawierają grupy amidowe, ulegają jonizacji poprzez przyłączenie protonu.

Znaczący wpływ na jakość uzyskanego widma masowego ma ilość użytej próbki w stosunku do matrycy. Zbyt mała spowoduje niemożność jej wykrycia, natomiast nadmiar może doprowadzić do stłumienia sygnału pochodzącego od próbki sygnałem matrycy.

Otrzymanie właściwego widma masowego badanej substancji uwarunkowane jest także jej rozpuszczalnością w rozpuszczalniku matrycy. W przypadku złego dopasowania rozpuszczalnika nie zajdzie jej odparowanie i ostatecznie szanse na uzyskanie jakiegokolwiek sygnału będą znikomo małe.

Kolejnym ważnym czynnikiem jest czystość i jednorodność mieszaniny próbki z matrycą. Jakikolwiek zanieczyszczenia mogą spowodować "zaśmiecenie" widma masowego sygnałami pochodzącymi od tych zanieczyszczeń [12]. Z tego względu zalecane są pewne procedury oczyszczania, których należy przestrzegać aby widmo masowe było pozbawione zbędnych, a trudnych w interpretacji pików. Procedury te zostaną omówione po krótko w dalszej części artykułu.

Czasami otrzymanie właściwych danych może okazać się trudne nawet jeśli mieszanina próbki z matrycą jest czysta. Przyczyna może tkwić w miejscowym "wypaleniu" desorbowanej warstwy przez kolejne, zbyt częste impulsy lasera, lub w niejednorodności tej warstwy. W takiej sytuacji należy zmienić miejsce desorpcji lub przemieścić powierzchnię zestalonej mieszaniny próbki z matrycą za pomocą jonizującej wiązki laserowej.

Kluczową rolę w technice MALDI odgrywa matryca. Jej wybór i przygotowanie (patrz wyżej) bardzo często determinują jakość otrzymanego widma masowego [11].

Innym ważnym czynnikiem jest zawartość różnych soli w materiale próbki. Ogólnie, im mniej zawiera ich próbka tym lepsza jest jakość otrzymanego widma. Oczyszczanie z soli można przeprowadzić za pomocą metod chromatograficznych.

3. Some aspects of MALDI method

There are some rules, that one should follow in order to get good mass data [11]. Just after a sample is prepared it should be analyzed, so that the possibility of degradation is reduced.

Dependly on the type of a functional group on the studied molecule, different ionization mechanisms are preferable. It is easier to ionize amines, acids and amides than hydroxyl groups, esters, ketones and aldehydes. Because peptides contain amide and amine groups, it's readily to ionize them through protonation or deprotonation - when acid bonds are present in the peptides structure.

Usually carbohydrates form ions via cationization through the addition Na^+ or K^+ , forming $\text{A}+\text{Na}^+$ or $\text{A}+\text{K}^+$ ions. Some of them contain an amide bond. Then they are ionized through accepting a proton.

The amount of a used sample has a meaningful influence on the quality of a mass spectrum. Detection will not be possible if there is too little of it. On the other hand, too much may cause signal suppression.

Obtaining good mass data depends on sample's solubility in the solvent or matrix solution. Vaporization will not proceed if the compound is not soluble in the matrix or solvent. Finally, there would be a small chance of getting any signal from the sample.

The next thing one should remember about is purity and homogeneity of it. Any impurities may cause the spectrum to be full of "rubbish" - signals from substances that actually we are not interested in and that are quite difficult to interpret [12]. This is why there are some purification procedures one should follow if wants to obtain clean and accurate data. These techniques are closely associated with sample preparation techniques, which are going to be described in the next part of this article.

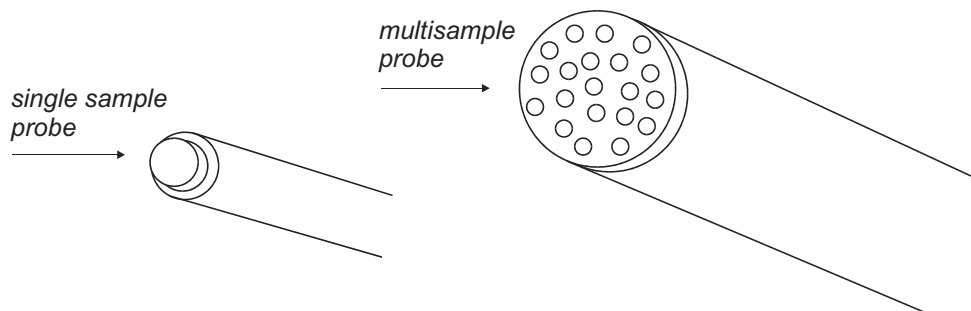
Sometimes it may be difficult to get good signal although the probe is clean. Quite often the reason of it is burning of desorbed layer by too often laser pulses or inhomogeneity of this layer. In such situation, moving of the laser beam around the probe helps. Also creation of the uniform matrix material coating onto the surface of the MALDI's probe makes it less necessary to hunt for the signal.

The matrix plays a key role in MALDI. The choice and preparation of it (see above) determines the quality of the mass data very often [11].

Istnieje wiele procedur przygotowywania mieszanin próbki z matrycą w oparciu o powyższe czynniki. Każdy badacz zajmujący się analizą substancji za pomocą MALDI ma swoją własną technologię, podobnie jak wiele jest sposobów nakładania tej mieszaniny na stolik desorpcyjny. Zawsze jednakże warto jest, przed przystąpieniem do pokrywania jego powierzchni roztworem badanego związku, przemyć ją roztworem matrycy w celu usunięcia ewentualnych nieczystości

4. Analiza biomolekuł za pomocą MALDI

Dzięki swoim zaletom MALDI jest bardzo przydatną metodą w analizie masowej ciężkich biomolekuł takich jak peptydy, białka, kwasy karboksylowe i wiele innych [5,6,7,8]. Metoda ta daje dobre rezultaty w połączeniu ze spektrometrem mas z pomiarem czasu przelotu jonów [1,2]. Stosuje się tutaj zarówno stoliki jedno jak i wielopróbkowe (rys. 3). Ten drugi sposób jest o tyle wygodny, że daje możliwość jednoczesnego założenia wielu próbek i tym samym umożliwia szybsze wykonanie pomiarów.



Rys. 3. Jedno i wielopróbkowy stolik desorpcyjny używany w metodzie MALDI

Fig. 3. The single and multisample probe used in MALDI

Przy badaniu peptydów metodą MALDI procesy jonizacyjne mogą zachodzić nawet w obecności soli. Powstają wówczas kompleksy: $A+H^+$, $A+Na^+$, $A+K^+$, ($A...$). Najlepszą matrycą dla peptydów jest kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy, który w porównaniu z innymi nie daje dużego tła w niskim zakresie mas (200-1000 Da). Przykład widma uzyskanego w oparciu o tę matrycę w Zakładzie Fizyki Stosowanej Instytutu Fizyki UMCS w Lublinie przedstawiony jest na rys. 4. Jest to widmo insuliny (Insulin From Bovine Pancreas, $M = 5734$ Da) otrzymane jako średnia z 256 strzałów lasera.

Jonizacja protein zachodzi na skutek przyłączenia jednego, dwóch lub trzech protonów. Ponieważ są to związki o bardzo dużych masach atomowych (przykładowo masa bovine serum wynosi 66431 Da), detekcja jest tutaj znacznie mniej wydajna niżeli w przypadku peptydów. Oprócz informacji strukturalnej

The less salts the sample contains, the higher sensitivity is and finally the better spectrum we obtain. It can be achieved via using some purification methods such as liquid chromatography.

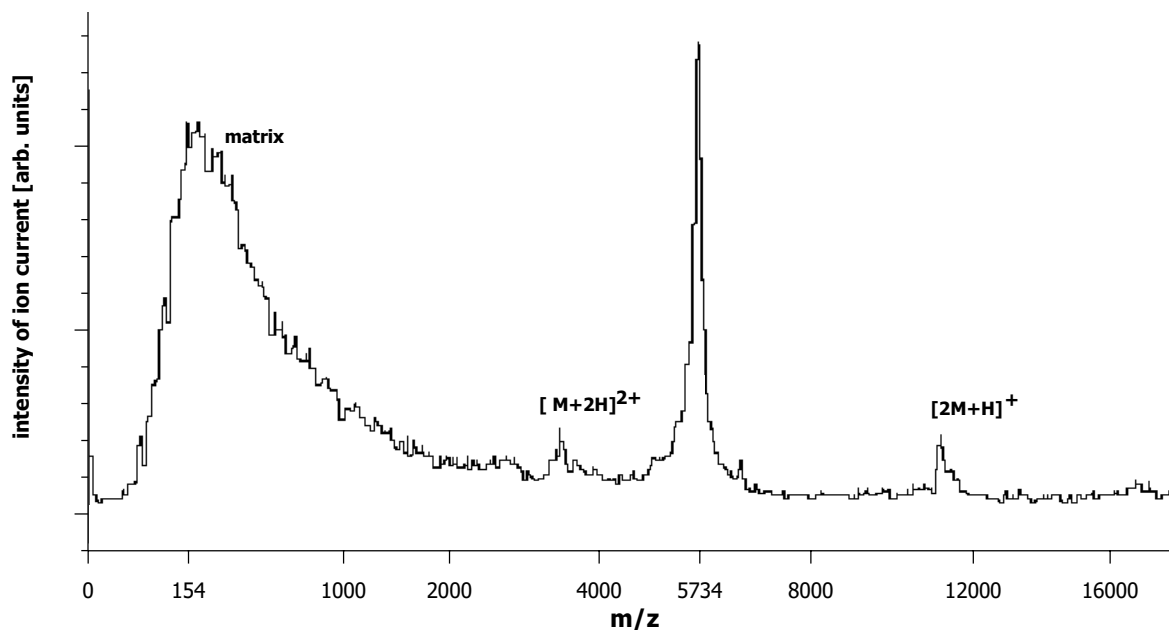
There are many recipes saying how to prepare good probe. Matrix and sample proportions are not fixed. Every one has got his own and such, there are many ways of putting the mixture onto the sample holder. It is worth washing its surface with the matrix solution to remove impurities.

4. Biomolecules analysis by MALDI

Thanks to its many advantages MALDI is very useful for the mass analysis of macromolecular substances such as peptides, proteins, carbohydrates and many others [5,6,7,8]. It gives good results in connection with time of flight mass spectrometer [1,2]. Sample holders may be single or multisample (Fig. 3). The second one is comfortable, because it ensures preparing many samples simultaneously.

As a result of peptide ionization there may be formed: a protonated molecular ion $A+H^+$ first of all or $A+Na^+$, $A+K^+$ adducts as well. Therefore MALDI may proceed here even in the presence of salts and is able to measure such complex mixtures as those adducts. The best matrix for peptides is 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB). Compared to others it doesn't give big background in low mass range (200-1000 Da). The example of a mass spectrum obtained owing to this matrix in the Division of Applied Physics, Institute of Physics, Marie Curie-Skłodowska University is presented in Fig.4. It is the spectrum of insulin ($M = 5734$ Da) received as the average of 256 laser shots.

Proteins ionization occurs owing to the addition of one, two or three protons. Because they have much greater masses than peptides (the mass of bovine serum albumin is 66 431 Da), the ion



Rys. 4. Widmo masowe jonów dodatnich, uzyskane za pomocą metody MALDI z mieszaniny kwasu 2,5-dihydroksybenzoowego (154 Da) oraz Insulin From Bovine Pancreas ($M=5734$ Da).

Fig. 4. Positive ion mass spectrum of insulin from bovine pancreas ($M=5734$ Da) with a matrix of 2,5-dihydroxybenzoic acid (154 Da).

ralnych badanych molekuł metoda MALDI daje również możliwość odtworzenia kolejności np. aminokwasów w łańcuchach białkowych [8].

Inne zastosowanie tej metody to badania kwasów karboksylowych (DNA, RNA) i innych odgrywających ważną rolę w procesach biologicznych [7]. Związki te najczęściej ulegają jonizacji poprzez odłączenie protonu bądź też przyłączenie kationu. Przyłączenie protonu prowadzi tutaj zazwyczaj do powstania niestabilnych jonów. Najczęściej stosowaną do analizy białek czy oligonukleotydów matrycą jest kwas nikotynowy. Najbardziej popularna matryca, jaką jest 2,5-dihydroksybenzoowy (DHB) daje znaczne lepsze efekty w przypadku związków tworzących aniony aniżeli kationy.

5. Wnioski

MALDI jest stosunkowo nową techniką znajdującą coraz szersze zastosowanie w masowo-spektrometrycznych badaniach ciężkich biomolekuł. Wykorzystuje ona stałą matrycę, która pełni kluczową rolę w ich procesach jonizacyjnych. Procesy te (desorpcja, jonizacja) inicjuje tutaj krótkotrwały (kilka nanosekund) impuls światła laserowego. W wyniku oddziaływania wzbudzonych molekuł matrycy i jej jonów z molekułami badanej substancji może dojść do: przyłączenia kationu, przyłączenia lub oderwania elektronu, przyłączenia bądź odłączenia protonu.

detection is less efficient than in the case of peptides. MALDI, except structural information, enables also determination of peptide or proteins sequence [8].

Except proteins and peptides, MALDI works well with carbohydrates (DNA, RNA) and oligonucleotides (cyclic glucans) that are extremely important in biological processes [7]. Ionization proceeds here through deprotonation and cationization, because while protonation unstable ions are formed usually. For the analysis of negative ions of oligonucleotides or proteins picolinic or 3-hydroxypicolinic acid is used quite often. Despite its many advantages, 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) is effective rather in a positive ionization mode.

5. Conclusion

MALDI is a new mass spectrometry technology that makes study of biomolecules routine. It uses a solid matrix that is crucial in the ionization processes of macromolecular substances. These processes (desorption and ionization) are initiated by lasting few nanoseconds laser pulse. Reactions of excited matrix molecules and its ions with sample molecules result in: protonation, cationization, electron ejection or electron capture. Achieved in such a way ions are analyzed via Time Of Flight Mass Spectrometer (TOF-MS).

Otrzymane w ten sposób (impulsowy) jony są analizowane zwykle przy użyciu spektrometru mas z pomiarem czasu ich przelotu (TOF-MS).

Uzyskanie prawidłowego widma masowego wymaga spełnienia pewnych warunków takich jak np. użycie odpowiedniej ilości próbki oraz zastosowanie właściwej matrycy i rozpuszczalników.

Metoda MALDI jest wykorzystywana między innymi do badań w następujących dziedzinach:

- biochemii - do pomiaru mas cząsteczkowych peptydów, białek, oligosacharydów, oligonukleotydów, lipidów i innych; MALDI daje możliwość prześledzenia procesu fragmentacji jonu molekularnego oraz odtworzenia sekwencji aminokwasów w łańcuchach DNA,
- chemii polimerów - do prześledzenia profilu rozkładu mas cząsteczkowych; dzięki MALDI możliwe jest wykonanie pełnej statystyki tworzywa między innymi wyznaczenie współczynnika polidispersji.

Dzięki tzw. "miękkiej" jonizacji w metodzie MALDI znajduje ona zastosowanie w badaniach ciężkich biomolekuł takich jak peptydy, białka, kwasy karboksylowe i wiele innych [5,6,7,8]. Jest to metoda, która może dostarczać danych zarówno o strukturze jak i masach badanych molekuł. Pozwala również na odtworzenie przebiegów reakcji zachodzących w łańcuchach np. białkowych.

Obtaining good mass data requires meeting of some preparative procedures such as right amount of the sample, proper choice of a matrix and solvents.

Domains, that MALDI finds the application in are:

- biochemistry - to measure molecular masses of peptides, proteins, oligosaccharides, oligonucleotides and lipids; MALDI serves the possibility of tracing molecular ion fragmentation process and learning about aminoacids sequences this is useful for the proteins structural research, especially concerning DNA sequence,
- polymers chemistry - to trace molecular masses decomposition; thanks to MALDI it is possible to make a complete materials statistic such as determining of polydispersion coefficient.

Because of its "softness", MALDI has the application in the biomolecules analysis such as peptides, proteins, carbohydrates, oligonucleotides and others [5,6,7,8]. It gives structural (qualitative) information as well as quantitative one. Besides, it provides with total sequence data.

References

- [1] L. Michalak, K. J. Fisher, D. S. Alderdice, D. R. Jardine: G. D. Willet, *C₆₀-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*, Organic Mass Spectrometry, 29 (1994) 512.
- [2] F. G. Hopwood, L. Michalak, D. S. Alderdice, K. J. Fisher, G. D. Willet: *C₆₀ - Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in the Analysis of Phosphotungstic Acid*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 8 (1994) 881.
- [3] B. A. Mamyrin: *Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry*, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 131 (1994) 1.
- [4] R. J. J. M. Steenvoorden, T. L. Weeding, P. G. Kistemaker, J. J. Boon: *Laser Desorption and Laser Post-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*, in Methods and Mechanisms for Producing Ions from Large Molecules, Edited by K. G. Standing and W. Ens, Plenum Press, New York, 1991.
- [5] I. K. Perera, S. Kantartzoglou, P. E. Dyer: *Some characteristics of matrix-assisted UV laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of large proteins*, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 156 (1996) 151.
- [6] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, F. Hillenkamp: *Matrix-assisted laser desorption / ionization with nitrogen lasers of different pulse widths*, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 154 (1996) 171.
- [7] D. J. Harvey, A. P. Hunter, R. H. Bateman, J. Brown, G. Critchley: *Relationship between in-source and post-source fragment ions in the matrix-assisted laser desorption (ionization) mass spectra of carbohydrates recorded with time-of-flight mass spectrometers*, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 188 (1999) 131.
- [8] P. A. Demirev, Yen-Peng Ho, V. Ryzkov, C. Fenselau: *Microorganism Identification by Mass Spectrometry and Protein Database Searches*, Anal. Chem., 71 (1999) 2732.
- [9] K. Riahi, G. Bolbach, A. Brunot, F. Breton, M. Spiro, J. C. Blais: *Influence of Laser Focusing in Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 8 (1994) 242.
- [10] P. Demirev, A. Westman, C. T. Reimann, P. Hakansson, D. Borofsky, B. U. R. Sundqvist: *Matrix-assisted*

- Laser Desorption with Ultra-shot Laser Pulses*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 6 (1992) 187.
- [11] G. Siuzdak: *Mass spectrometry for biotechnology*, Academic Press, San Diego, 1996.
- [12] T. A. Shaler, J. N. Wickham, K. A. Sannes, Kuang Jen Wu, C. H. Becker: *Effect of impurities on the Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectra of Single-Stranded Oligodeoxynucleotides*, Anal. Chem., 68 (1996) 576.

Mgr Anna Bajuk
Mgr Krzysztof Głuch
Prof. dr hab. Leszek Michalak

Zakład Fizyki Stosowanej
Instytut Fizyki UMCS
Pl. Marii Curie-Skłodowkiej 1
20-031 Lublin
e-mail: kgluch@tytan.umcs.lublin.pl
