

**Spektroskopische Untersuchung der
Lumineszenzerscheinungen
beim UV-MALDI-Desorptionsprozeß**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Christian-Albrechts-Universität Kiel

vorgelegt von

Carsten Zechmann

aus Goslar (Niedersachsen)

Kiel, März 2001

Kurze Zusammenfassung der Promotionsarbeit

Die elementaren Prozesse bei der Laser-Desorption und der -Ionisation polykristalliner organischer Substanzen sind, obwohl sich die *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization-Massenspektrometrie* (MALDI-MS) als analytische Methode vor allem auf dem Gebiet der Bioanalytik etabliert hat, nach wie vor in wesentlichen Zügen unverstanden. Als einer der Gründe für die Schwierigkeiten, sich dem Desorption-/Ionisationsprozeß experimentell zu nähern, können die hochdynamischen Vorgänge fern vom thermischen Gleichgewicht gelten, welche sowohl auf der Pico- und Nanosekundenzeitskala als auch im Microsekundenbereich ablaufen. Auch ist eine klare Trennlinie zwischen der unter Laserbeschuß desintegrierenden bzw. sublimierenden festen Phase und dem Desorptionsplume nur schwer festzumachen.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zu den Lumineszenzerscheinungen während des Desorptionsprozesses geschehen in der Absicht, durch Verknüpfung spektroskopischer mit massenspektrometrischen Daten einen Beitrag zum Verständnis der physikalisch-chemischen Vorgänge in der Matrix und in der Desorptionswolke zu liefern.

Die Festphasen-Fluoreszenzspektren bei UV-Laseranregung der vier verschiedenen Matrixsubstanzen zeigen breite Bandenstrukturen (Phononenstruktur). Die Fluoreszenz-maxima weisen gegenüber den Absorptionsmaxima in Lösung hohe Stokes-Shifts auf. Neben der Umwandlung der Anregungsenergie in die vibratorischen Freiheitsgrade, die den eigentlichen *onset* des Desorptionsprozesses ausmacht, tritt auch Energiedissipation in Form von Strahlung auf.

Aus den LIF(t)-Experimenten folgt, daß die Lebenszeiten der angeregten Zustände kurz sind und die Fluoreszenz erlischt, sobald der Laserpuls endet. Die Fluoreszenzintensitäten aller vier untersuchten Matrices klingen innerhalb der Zeitauflösung des schnellen Photomultipliers nicht nach Exponentialfunktionen ab, sondern zeigen allein das zeitliche Profil des Laseranregungspulses.

Gasphasenlumineszenz, verzögerte Fluoreszenz und Phosphoreszenzemission sind nicht detektiert worden. Die Abgabe der elektronischen Anregungsenergie durch Stöße im Desorptionsplume kann offensichtlich mit der Fluoreszenzlebensdauer konkurrieren.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die lichtschwachen Lumineszenzerscheinungen bei der MALDI-Desorption mit einem lichtstarken Objektiv auf dem Chip einer CCD-Camera photographisch abzubilden. Diese Abbildungen sind im Gegensatz zu in der Literatur dargestellten Untersuchungen unter für MALDI-Experimente typischen Bedingungen im Massenspektrometer akquiriert worden.

Aus Fluoreszenzabbildungen der Kristallisate von 2,5-Dihydroxybenzoesäure ist ersichtlich, daß sich die Emission in mehrere Bereiche untergliedert. Dies kann einem Beitrag der Laserlichtstreuung in Abhängigkeit des Laserwinkels zugeordnet werden. Dort, wo der Laserpuls auf ihm zugewandte Kristalloberflächen trifft, treten verstärkt Fluoreszenz und Streuung auf. Aus diesen Beobachtungen läßt sich zudem folgern, daß die Substanzfreisetzung in Richtung des Einfallswinkels des Lasers geneigt ist.

Mit Hilfe von Positionierungsexperimenten an der Matrixsubstanz Ferulasäure unter variablem Zeitunterschied zwischen Desorptionslaser und dem OPO-Laser sind erstmals die durch den Desorptionslaser ausgelösten Startgeschwindigkeiten von neutralen Ferulasäuremolekülen bestimmt worden. Die Neutralen zeigen eine breite Geschwindigkeitsverteilung zwischen 200 m/s und 1250 m/s mit einem Durchschnittswert bei 737 m/s.

Abstract of the thesis

The fundamental processes that imply the laser ablation and ionization of organic polycrystalline materials during the *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization* mass spectrometry (MALDI-MS) are not fully understood. Despite of this lack of knowledge MALDI-MS has been established mainly in biological and biochemical analysis. The reasons for the difficulties in investigating the desorption/ ionization process are the highly dynamic procedures far off the thermodynamical equilibrium that take place both on picosecond and nanosecond timescale and in microseconds. It is not obvious to distinguish between the desintegrating or sublimating solid phase and the desorption plume, respectively.

The thesis deals with investigations about luminescence phenomena during the desorption process. It is intended to combine spectroscopic data with mass spectrometric data in order to get insight into physical and chemical procedures in the solid matrix as well as in the expanding plume.

There are broad band phonon structures in the solid phase spectra of four different matrix substances if the matrix is excited with an ultraviolet laser line. The comparison of the maximums of the fluorescence emissions with the absorption spectra in solution shows that there are high stokes shifts. Beneath of the conversion of absorbed energy into the vibronic degrees of freedom which is responsible for the onset of the ablation process it is obvious that there is dissipation of energy by the way of radiation.

As a result of the time-dependant laser induced fluorescence experiments there is evidence that the excited electronic states are short and fluorescence extinguishes with the laser pulse. In consideration of the time-resolution of the fast photomultiplier the intensities of the four matrices show no exponential depletion but the profile in time of the exciting laser pulse.

It is not possible to detect neither luminescence emission by gas phase components nor delayed fluorescence or phosphorescence. This is why it is concluded that the dissipation of electronic energy through numerous collisions in the desorption plume is likely able to compete with fluorescence lifetime.

It has been possible to utilize the weak light emissions occurring during the laser shot in order to photograph the MALDI desorption process with an electronic charge coupled device camera system. In contrast to other publications the investigations have been carried out under typical MALDI conditions in a home built mass spectrometer.

The laser induced fluorescence images of the popular matrix substance 2,5-dihydroxy-benzoic acid show that emission is subdivided into a few ejection areas. This finding can be attributed to fluorescence emission and laser light dispersion at faces of the crystal that are attached to the incoming laser beam. It is deduced that substantial particle ejection originates from these illuminated areas.

In order to investigate the velocity spread of the ejected neutral matrix molecules of ferulic acid some postionization experiments have been done. An optical parametric oscillator (OPO) laser system has been used to ionize neutral ferulic acid molecules with a variable time delay between the OPO and the desorption laser. Neutrals propagate with a velocity spread among 200 m/s and 1250 m/s. The average velocity is 737 m/s.

1	Einleitung.....	1
1.1	Aufgabestellung.....	4
2	Massenspektrometrie.....	5
2.1	Kurze Einführung in die Massenspektrometrie.....	5
2.1.1	Ionisationsmethoden.....	6
2.1.2	Laserdesorption und –Ionisation.....	7
2.1.3	Matrix Assisted Laser Desorption.....	8
2.1.4	Multiphotonenionisation.....	10
2.2	Trennung und Nachweis unterschiedlicher Ionen.....	10
2.2.1	Sektorfeld-Massenspektrometer.....	10
2.2.2	Quadrupol-Massenspektrometer.....	13
2.2.3	Ion-Zyklotron-Resonanz-Massenspektrometer.....	14
2.3	Flugzeitmassenspektrometer.....	14
2.3.1	Grundlagen der MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie.....	15
3	Vorstellungen zum Ablauf der Desorption und der Ionengenerierung in der UV-MALDI-MS.....	25
3.1	Desorptionsmodelle.....	25
3.1.1	Der onset des Desorptionsvorganges.....	26
3.1.2	Die Desorptionswolke.....	32
3.2	Mechanismen der Ionenerzeugung.....	34
3.2.1	Primäre Ionen.....	34
3.2.1.1	Säure-Base-Eigenschaften primärer Ionen in der Gasphase.....	39
3.2.1.2	Thermische und mechanische Ionisationsprozesse.....	42
3.2.2	Sekundäre Ionen.....	43

3.3	Theorie der Lumineszenz.....	45
3.3.1	Festkörperlumineszenz.....	50
4	Experimentelles.....	53
4.1	MALDI-Probenpräparation.....	54
4.1.1	Die MALDI-Matrixsubstanzen.....	55
4.2	Aufbau und Beschreibung des Lin-ToF Massenspektrometers.....	58
4.2.1	Verbesserung der Massenauflösung mit dem PSPF-System.....	63
4.3	Beschreibung der zur Spektroskopie am Desorptionsprozeß verwendeten Geräte.....	68
4.3.1	LIF(t)-Experimente.....	68
4.3.1.1	Detektionssysteme.....	68
4.3.1.2	Versuchsaufbau.....	72
4.3.1.2.	Untersuchungen zur Zeitdomäne der die Desorption begleitenden	
1	Lumineszenz mit Photomultipliern.....	72
4.3.1.2.	Spektral aufgelöste Untersuchungen zur Zeitdomäne der	
2	Lumineszenz mit Photomultipliern als Detektoren.....	74
4.3.2	Spektral aufgelöste Untersuchungen der Laser-induzierten Fluoreszenz während der MALDI-Desorption.....	74
4.4	Photographische Abbildung der Lumineszenz.....	79
5	Ergebnisse der Untersuchung des MALDI- Desorptionsprozesses.....	81
5.1	Positionierungsexperimente in der Desorptionwolke.....	81

5.2	Optische Spektroskopie am Desorptionsprozeß.....	88
5.2.1	Zeitaufgelöste Lumineszenzspektroskopie am Desorptions- prozeß.....	89
5.2.1.1	Versuche mit einem hochverstärkten Photomultiplier.....	89
5.2.1.2	Versuche mit einem schnellen Photomultiplier.....	95
5.2.2	Wellenlängen-aufgelöste Lumineszenzspektroskopie am Desorptionsprozeß.....	99
5.3	Photographische Abbildung der MALDI-Desorption.....	110
5.3.1	Photographische Abbildung der Lumineszenz – Unterdrückung der UV-Laserlicht-Streuung durch Filter.....	111
5.3.2	Photographische Abbildung der Lumineszenz ohne UV-Filter.....	116
5.3.3	Nachanregung der Fluoreszenz in der Desorptionswolke.....	119
6	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse.....	121
6.1	Ausblick.....	124
7	Anhang.....	127
8	Literaturverzeichnis.....	132

1 Einleitung

Die Breite der Anwendungsmöglichkeiten massenspektrometrischer Analytik auf organische, anorganische sowie biologische Fragestellungen im weitesten Sinne scheint geradezu unbegrenzt und ist mit den oben genannten drei Disziplinen sicher nicht erschöpft.

Massenspektrometrische Analytik findet in den Biowissenschaften, der Medizin und der Genetik bzw. den *life sciences* allgemein eine rasante Verbreitung, weil mit der *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*-MS (MALDI-MS) sowie *Electrospray Ionization*-Massenspektrometrie (ESI-MS) mindestens zwei äußerst sensitive und daher erfolgreiche Methoden existieren, aus biologischen Makromolekülen Ionen zu generieren und diese in femtomolaren Mengen nachzuweisen^{1,2}.

MALDI-MS und ESI-MS sind längst als benutzerfreundliche analytische Geräte kommerzialisiert und teilweise zum tragbaren Einsatz miniaturisiert. Sie werden in der Analytik von Peptiden, Proteinen, Sacchariden und synthetischen Polymeren genauso eingesetzt wie zur chemisch-physikalischen Untersuchung schwach gebundener Cluster und Addukte.

Lasermassenspektrometrie findet Anwendungen in der Spurenanalytik umweltrelevanter und industrieller Proben³, wie einerseits von Insektiziden, Pestiziden oder zu entsorgenden Kampfstoffen⁴ oder andererseits in Rauch- oder Abgasen jedweder Verbrennungsprozesse⁵.

Massenspektrometrische Nachweisverfahren lassen sich mit chromatographischen Trennmethode kombinieren, so daß aus einzelnen Probefractionen übersichtlichere Massenspektren gewonnen werden können⁶.

MALDI-MS und ESI-MS stellen beide sogenannte weiche Ionisationsverfahren dar, bei denen auch molekular fragile Substanzen in die Gasphase überführt und ionisiert werden können, ohne dabei zu fragmentieren. Die sanften Ionisationsprozesse nach dem Transfer aus dem festen oder flüssigen Aggregatzustand in die Gasphase bilden die Grundlage für die weite Verbreitung dieser beiden Techniken.

Vor dem Hintergrund der aktuellen bioanalytischen Trends finden allerdings immer noch erhebliche Bemühungen statt, die Massenauflösung, d.h. die Fähigkeit eines Massenspektrometers zur Trennung sehr dicht aufeinanderfolgender Signale, zu verbessern. Ion Zyclotron Resonanz-Massenspektrometer (ICR-MS) liefern aus konstruktiven Gründen

die bei weitem beste Massenauflösung, sind zumeist aber relativ aufwendige Geräte mit supraleitenden Magneten⁷.

Verglichen mit anderen Massenspektrometertypen weist ein Flugzeit-MS (*Time of Flight*-MS, ToF-MS) den Vorteil auf, daß das gesamte Massenspektrum in jedem einzelnen Meßzyklus aufgezeichnet wird. Gewöhnlich ist auch die Ionenmission größer als die anderer MS-Typen, weil die Ionen nur wenige ionenoptische Elemente zu passieren haben⁸.

Viele der bei der MALDI ablaufenden Prozesse sind in den 16 Jahren seit ihrer Entwicklung⁹ nicht vollständig aufgeklärt worden. Immer noch erfolgen die Matrixwahl und deren Kristallisationsmethode empirisch. Zwar ist bekannt, daß Hydroxyl-funktionalisierte aromatische Carbonsäuren meistens ausgezeichnete UV-MALDI-Matrices darstellen, weil sie bei der Laserwellenlänge absorbierend sind. Fraglich ist aber im selben Zusammenhang, warum beispielsweise 2,5-Dihydroxybenzoesäure eine sehr viel bessere Matrixsubstanz in der UV-MALDI darstellt als ihr 2,6-Hydroxy-substituiertes Pendant. Unklar ist nach wie vor, inwieweit die Einlagerung der Analytsubstanz in das Kristallgitter der Matrix eine Voraussetzung für eine hohe Signalintensität ist¹⁰.

Hinsichtlich der Ionisierungsprozesse scheint sich aufgrund vieler einzelner Forschungsergebnisse die Überzeugung durchzusetzen, daß Matrix-Analyt-Reaktionen in der Desorptionwolke ablaufen^{11,12,13,14}. Auf der anderen Hand gibt es aktuelle Untersuchungen, die mit Hilfe der Cokristallisierung von pH-Indikatoren im Matrixkristallgitter auf das Vorliegen protonierter Matrixmoleküle schießen lassen¹⁵.

In der MALDI-MS wird der Analyt zumeist über Protonentransferreaktionen von Matrixmolekülen ionisiert. Inwieweit an der Ionisation allerdings angeregte Matrixmoleküle bei einem Protonentransfer auf den Analyten in der Gasphase beteiligt sind, bleibt in Teilen spekulativ. Untersuchungen deuten auch darauf hin, daß nicht das Proton der Carboxylgruppe auf den Analyten übertragen wird, sondern ein Hydroxylproton¹⁶.

Neben Ionisation über Protonentransfer werden im Massenspektrum gewöhnlich Adduktionen infolge Verunreinigung mit Alkalimetallen detektiert. In einigen Fällen, z.B. zur Ionisation von unpolaren Polymeren, werden Schwermetallsalze zur Mischung aus Matrix und Analyt in kleinen Mengen hinzugegeben. Die generierten Adduktionen machen dann die Hauptionensignale im Massenspektrum aus und verdrängen nach bisher teilweise unbekanntem Mechanismen zum größten Teil die Ionisierung über Protonentransferreaktionen.

Die Heterogenität und der Dichtegradient der Teilchen in der Desorptionswolke bewirken, daß vielfältige Prozesse zur Bildung homogener und heterogener Cluster denkbar sind. Vielfach wird im Zusammenhang mit der MALDI-Desorption von einer jetartigen adiabatischen Expansion aus der festen Phase gesprochen, die eine gewisse Kühlung der internen Freiheitsgrade desorbierteter Teilchen mit sich führen soll. In der Tat zeigen Experimente¹⁷ und Simulationen¹⁸, daß trotz durch den Laserpuls hervorgerufener extrem hoher Heizraten in kurzen Zeitintervallen die „Durchschnittstemperatur“, d.h. die Besetzung interner und externer Freiheitsgrade, nicht besonders hoch ist. Dies bildet ja auch die Voraussetzung für ein weiches Desorptions/ Ionisationsverhalten.

Die Untersuchung der Molmassenverteilung synthetischer Polymere mit Hilfe der MALDI-MS birgt noch Erklärungsbedarf. So haben sowohl der pH-Wert der Matrixsubstanz¹⁹ als auch die Ladung und das Molgewicht der zur Ionisation über Adduktbildung beigemischten Alkaliionen²⁰ einen drastischen Einfluß auf die Polymerverteilung, so daß trotz hoher Massenauflösung der einzelnen Oligomere eine zweifelsfreie Bestimmung der Molmassenverteilung nicht immer möglich ist. In vergleichenden Untersuchungen mit Größenausschluß-chromatographischen Methoden wird festgestellt, daß die massenspektrometrisch bestimmten Verteilungen gegenüber den GPC-Daten meist zu kleine Werte für Zahlen- und Massenmittel aufweisen^{21,22}.

Nur mit einem grundlegenden Verständnis der Laser-Sublimation organischer Substanzen läßt sich über konstruktive Änderungen am MALDI-Massenspektrometer, wie z.B. der Anordnung der ionenoptischen Elemente, höhere Massenauflösung erzielen.

In der Zukunft sollten nicht-empirische Probenpräparationsvorschriften entwickelt werden, die aus der Art der Präparation auf die Qualität des Massenspektrums schließen lassen. Um die Ionenausbeute zu erhöhen und Fragmentierung zu vermeiden, gilt es, die Mechanismen der Ionengenerierung zu eruieren.

Vor dem Hintergrund der in den Biowissenschaften zunehmend Verbreitung findenden MALDI-massenspektrometrischen Analytik geben die nach wie vor nicht zufriedenstellend erklärten Phänomene bei der Desorption organischer Substanz und der Ionisation derselben Anlaß genug, im Rahmen dieser physikochemischen Forschungsarbeit einen Beitrag zum Verständnis der ablaufenden Prozesse zu leisten.

1.1 Aufgabestellung

Vor dem Hintergrund teilweise unverstandener physikalischer Phänomene bei der Freisetzung von Substanz durch kurze, ultraviolette Laserpulse bei der *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*-Massenspektrometrie einerseits und ihrer schnellen Verbreitung in der Bioanalytik andererseits, soll es Ziel der vorliegenden Arbeit sein, Beiträge zum grundlegenden Verständnis des Desorptionsprozesses in der MALDI zu liefern.

Für die Untersuchungen steht ein im Arbeitskreis konstruiertes Lin-ToF-Massenspektrometer mit einem frequenzvervielfachten Nd-YAG-Laser als Desorptionslaser zur Verfügung. Elektronische Nachanregung oder Postionisation können mit einem Optischen Parametrischen Oszillator-Festkörperlasersystem (OPO) durchgeführt werden.

Während des MALDI-Desorptionsprozesses treten infolge Laseranregung Lumineszenz-emissionen der Matixsubstanz auf. Diese sind spektral und zeitlich aufzubereiten, und aus den Ergebnissen sind Rückschlüsse auf den Desorptionsprozeß zu ziehen.

Weiterhin soll versucht werden, durch orts aufgelöste Untersuchungen der Lumineszenz in der Nähe der Festkörperoberfläche Informationen über das Verhalten der Matrix unter Laserbestrahlung zu gewinnen.

2 Massenspektrometrie

2.1 Kurze Einführung in die Massenspektrometrie

In der Geschichte der Massenspektrometrie sind im Laufe der Zeit viele physikalisch unterschiedliche Verfahren entwickelt worden, um aus neutralen Teilchen Ionen zu bilden.

Sind Ionen erzeugt worden - bzw. bereits vorhanden -, stellt sich dem Analytiker die Aufgabe, Ionen verschiedener Massen voneinander zu separieren, um deren Massen getrennt bestimmen zu können.

Ionen lassen sich durch statische oder gepulste elektrische und magnetische Felder in ihren Translationsbewegungen beeinflussen. Eine solche äußere Einflußnahme ermöglicht es, unter Rückgriff auf physikalische Gesetzmäßigkeiten auf elegante Weise die molekulare bzw. atomare Masse von Ionen zu bestimmen.

Zu einer weiten Verbreitung der massenspektrometrischen Analytik hat auch die Entwicklung der Vakuumtechnik beigetragen, so daß sich Ionen im Hochvakuum über große Strecken bewegen können, ohne im Mittel auf Restgasmoleküle zu treffen und unerwünschte Reaktionen einzugehen.

Massenspektrometrie stellt also im weitesten Sinne eine Gasphasen-analytische Methode dar. In diesem Zusammenhang liegt es nahe, massenspektrometrische Untersuchungen auch auf die beiden kondensierten Aggregatzustände auszudehnen und flüssige sowie feste Proben in die Gasphase zu verdampfen bzw. zu sublimieren, um nach der Ionisation die Massenbestimmung durchführen zu können.

Typisches chemisches Merkmal fester Körper ist aber ein mit steigendem Molekulargewicht sinkender Dampfdruck. Zudem sind viele Substanzen von wissenschaftlichem und analytischem Interesse nicht einfach durch thermische Verdampfung unzerstört in die Gasphase zu befördern. Zu solchen Stoffen zählen viele Biomoleküle, z.B. Peptide, Proteine, Oligonukleotide, Phospholipide, Oligosaccharide genauso wie einige synthetische Polymerklassen.

Diese Problematik hat zur Entwicklung der „weichen“ Ionisationsmethoden geführt, bei welchen Ionen mit nur geringer Überschußenergie erzeugt werden und die Pyrolyse oder Fragmentierung des Analyten vermieden werden kann.

2.1.1 Ionisationsmethoden

Zu den weichen Ionisationsmethoden werden die Felddesorption (FD), die Chemische Ionisation (CI), die Plasmadesorption (PD), die Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS) und die Laserdesorption gerechnet²³.

Die Felddesorption²⁴ ist eine sehr sanfte Ionisationsmethode in der Massenspektrometrie. Diese früh entwickelte Methode hat erstmalig die Desorption mit der Ionisierung kombiniert. Felddesorption basiert auf der Feldionisation, bei der an einer dünnen Metallspitze (*field emitter*) durch ein elektrisches Potential von einigen Kilovolt eine hohe elektrische Felddichte erzeugt wird.

Bei der Chemischen Ionisation²⁵ wird ein Hilfsgas, das in hohem molaren Überschuss im Vergleich zum Analyten vorliegt, durch Beschuss mit Elektronen einer gewissen Energie (z.B. 70 eV) ionisiert. Das Hilfsgas ionisiert in der Folge den Analyten.

Die Plasmadesorption-Massenspektrometrie (PD-MS)²⁶ basiert auf dem Beschuss der Analytsubstanz mit den hochenergetischen Spaltprodukten des radioaktiven Zerfalls von ²⁵²Cf. Das Auftreffen des Spaltproduktes auf den kristallinen Analyten liefert genug Energie, um einen kleinen Plasmadruck zu erzeugen, d.h. um zu desorbieren und zu ionisieren.

In der Sekundärionenmassenspektrometrie²⁷ wird ein beschleunigter Primärionenstrahl aus z.B. O⁻, O₂⁺ oder Cs⁺ dazu genutzt, um aus der flüssigen oder festen Probesubstanz Ionen zu generieren.

Trotz ihrer Erfolge werden die genannten Desorptions/ Ionisationsmethoden durch einige Nachteile, wie geringen Ionenausbeuten (FD), langen Meßzeiten, Umgang mit radioaktivem Material (PD) und in einigen Fällen durch obere Massengrenzen für die zu untersuchenden Analyten von rund 10 kDa eingeschränkt.

Die Elektrospray-Ionisation (ESI)²⁸ ist eine ebenfalls weiche Ionisationsmethode, mit der aus flüssigen Lösungen gasförmige Ionen erzeugt werden. Sie hat sich in der biomedizinischen und biochemischen Routineanalytik von polaren Molekülen wie Peptiden sowie Oligonukleotiden und -sacchariden direkt aus der verdünnten Lösung durchgesetzt.

Bei der ESI wird ein feinverteiltes Spray aus mehrfach geladenen Tröpfchen erzeugt, indem die Analytlösung durch eine enge Kapillare gepumpt wird, die auf einem hohen elektrischen Potential liegt. Die Tröpfchen werden zu einer entgegengesetzt geladenen, 0,5 - 3 cm entfernten Elektrode beschleunigt und verlieren auf ihrem Weg zur Gegenelektrode infolge

eines Druckgradienten Lösungsmittelmoleküle, was zu einer Erhöhung der Oberflächenladung der Tröpfchen führt. Nach dem *ion evaporation model*^{29,30} stößt das Tröpfchen in der Folge hochgeladene Moleküle aus, um seine Oberflächenladung zu senken. Diese Ionen werden im Massenanalysator getrennt und nachgewiesen.

2.1.2 Laserdesorption und -Ionisation

Die durch kommerzielle Verfügbarkeit zunehmende Verbreitung von gepulsten Lasern hat gegen Ende der 70er Jahre mit der Entwicklung der Laserdesorption (LD bzw. LDI, *Laser Desorption Ionization*) sehr erfolgreich ihren Einzug in die Massenspektrometrie gefunden, bietet doch die Laserstrahlung gegenüber mit Hilfe von Monochromatoren erzeugter schmalbandiger elektromagnetischer Strahlung folgende gravierende Vorteile:

- Kohärenz der Laserstrahlung
- Polarisierung des Laserlichts
- Schmalbandigkeit
- hohe Leistungsdichte
- kurze Pulsdauer

Diese Vorzüge haben den Laser als Instrument zur Verdampfung flüssiger und fester Proben sowie zur Ionisation und in der Folge auch zur Ionen- und Neutralen-Spektroskopie im Massenspektrometer prädestiniert und unmittelbar zur Entwicklung der Laserdesorption (LD)³¹ geführt, die dann zur *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization* weiterentwickelt werden konnte.

So haben Kistemaker³² et al. bereits früh verschiedene Infrarotlaser erfolgreich eingesetzt, um Oligosaccharide, Glycoside und Nukleotide kleinerer Molmassen nur teilweise fragmentiert in die Gasphase zu überführen und durch Alkaliion-Adduktbildung zu ionisieren.

Bei der Laserdesorption fester Proben wird das vom Laser emittierte Licht mit einer Linse auf die zu untersuchende Substanz fokussiert. Durch die Fokussierung werden für die kurze Zeit des Laserpulses Energiedichten von einigen GW/cm^2 erzeugt, was zu einer schlagartigen Aufheizung der Probe im angeregten Volumen mit Heizraten in Höhe einiger Milliarden Kelvin pro Sekunde führen kann. Wenn unter diesen Bedingungen der Phasenübergang über

die thermische Fragmentierung dominiert, werden auch thermisch instabile Analyten explosionsartig in die Gasphase überführt und bleiben dabei unzerstört. Schon Verunreinigungen der Probe mit Alkalisalzen reichen aus, um ein merkliches Massensignal der Anionen- und Kationenaddukte zu detektieren.

2.1.3 Matrix Assisted Laser Desorption

Die Idee, bei der Laserdesorption eine bei der verwendeten Wellenlänge absorbierende Hilfssubstanz, die Matrix, zu verwenden und auf diese Weise Analyten höheren Molekulargewichts unzerlegt in die Gasphase zu sublimieren sowie gleichzeitig durch die Matrix zu ionisieren, hat 1985 den Ausgangspunkt der Entwicklung der heute analytisch wichtigen Methode der *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization* (MALDI) gebildet⁹.

Der zu desorbierende Analyt wird gemeinsam mit der Hilfssubstanz in der Absicht auf dem Probeträger auskristallisiert, daß er zusammen mit der Matrixsubstanz ein gemeinsames Kristallgitter bildet. Die in der kurzen Zeitspanne absorbierte Laserenergie zwingt die Matrixsubstanz im angeregten Volumen, sich explosionsartig in die Gasphase zu bewegen. Infolge der plötzlichen Desintegration des Kristallgitters, das auch den Analyten enthält, bewirkt der Phasenübergang der Matrix auch die Freisetzung des Analyten.

In der Desorptionswolke über der kristallinen Oberfläche laufen komplexe chemische Reaktionen ab. Analytmoleküle können durch Protonenübertragung von Matrixmolekülen ionisiert werden. Es bilden sich weiterhin homogene und heterogene ionische und nicht-ionische Cluster und Aggregate. Die erzeugten Massenspektren sind daher relativ komplex, doch lassen sie sich durch geeignete Wahl der Bedingungen beeinflussen.

Diese weichen Ionisierungsprozesse bilden die Voraussetzung dafür, daß sich die *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization* zur Analytik thermisch labiler, nichtflüchtiger hochmolekularer Substanzen durchgesetzt hat.

Eine schematische Darstellung der *Matrix Assisted Laser Desorption* (MALD) läßt sich der folgenden Abbildung 2.1 entnehmen.

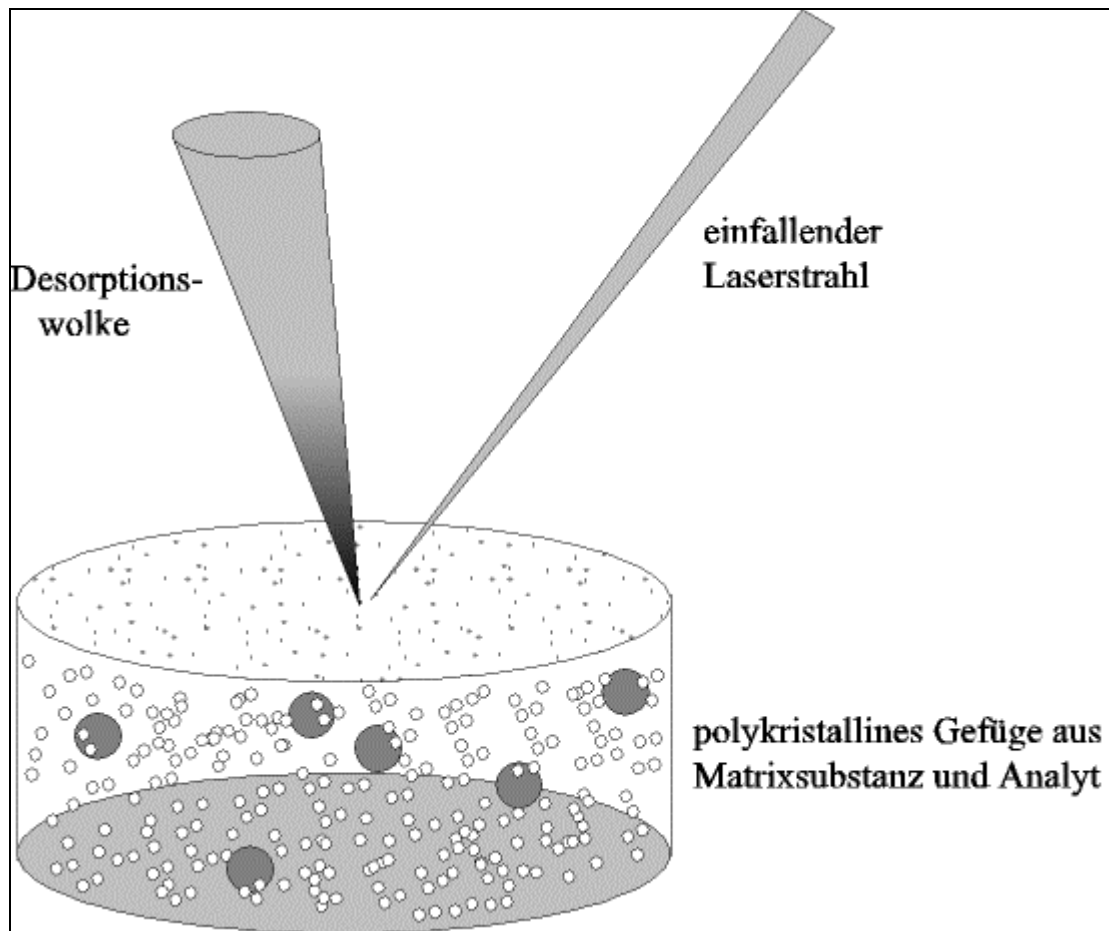


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Matrix Assisted Laser Desorption (MALD)

Als Matrixsubstanzen für die UV-MALDI eignen sich aufgrund ihrer Absorptionseigenschaften eine Reihe von Hydroxy-, Nitro-, Amino- und Azaderivate von aromatischen Carbonsäuren und ebenso funktionalisierte Heteroaromaten sowie anellierte Aromaten.

Typische in der UV-MALDI-MS eingesetzte Nanosekundenlaser sind der Stickstofflaser (337 nm), der frequenzverdreifachte sowie -vervierfachte Nd-YAG-Laser (355 nm bzw. 266 nm) und verschiedene im härteren Ultravioletten arbeitende Excimerlaser (XeCl 308 nm, KrF 248 nm, ArF 193 nm).

Weiche Desorption kann auch durch IR-MALDI mit Kohlendioxid- bei 10,6 μm oder Er-YAG-Lasern bei 2,94 μm erfolgen, auch weil deren Photonenenergie (CO_2 -Laser 0,12 eV) gegenüber den ultravioletten Lasern (z.B. Stickstofflaser 3,68 eV) deutlich geringer ist. Wegen der kleineren Absorptionskoeffizienten der IR-Matrices werden höhere

Energiedichten als bei der UV-MALDI benötigt, was erhöhten Probeverbrauch zur Folge hat³³.

2.1.4 Multiphotonenionisation

Die Verdampfung fester Proben mit Hilfe von Lasern wird zudem im Bereich der Multiphotonen-Ionisation (MUPI) eingesetzt, wenn ein Probeeinlaß in das Massenspektrometer über einen Flüssigeinlaß der gelösten Proben oder thermische Probensublimation nicht realisierbar oder nicht erwünscht sind.

Wenn die Desorption der Probesubstanz in einen durch adiabatische Expansion von Edelgas erzeugten Überschall-Molekularstrahl erfolgt, werden interne Schwingungs-, Rotations- und ein Teil der Translationsfreiheitsgrade stark gekühlt. Nach Einkopplung eines oder zweier weiterer Laser bietet sich die Möglichkeit, Spektroskopie an gekühlten Molekülen, Clustern und Addukten im Molekularstrahl mit massenspektrometrischer Detektion zu verknüpfen, wenn dabei Ionen erzeugt werden¹⁶.

2.2 Trennung und Nachweis unterschiedlicher Ionen

Thomson³⁴ und Aston³⁵ haben bereits 1913 bzw. 1919 erste Massenspektrometer mit magnetischen Sektorfeldern entwickelt und die räumlich getrennten Ionen mit Hilfe von Photoplatten nachgewiesen. Im Jahr 1935 hat Dempster³⁶ ein Instrument beschrieben, das bereits auf einer Kombination aus elektrischen und magnetischen Feldern zur Ionentrennung beruht hat und damit den Vorläufer der heutigen hochauflösenden doppelt-fokussierenden Instrumente darstellt.

2.2.1 Sektorfeld-Massenspektrometer

Die Trennung von Ionen im Massenspektrometer erfolgt nach ihrem m/z -Verhältnis. Dabei beschreibt m die atomare Masseneinheit ($m = m_u = 1,6605 \cdot 10^{-27} \text{kg}$)ⁱ und z das Vielfache der Elementarladung e ($e = 1,6022 \cdot 10^{-19} \text{C}$).

In der Praxis wird für das m/z -Verhältnis oft das Symbol Da (Dalton, ohne Einheit) verwendet.

Im Massenspektrometer werden bewegte Ladungen voneinander getrennt, keine ruhenden. Ionen werden in elektrischen Feldern E durch die Coulombkraft in Bewegung gesetzt, d.h. beschleunigt.

Zu diesem Zweck wird das Ion zunächst in einem elektrostatischen Feld infolge seiner Ladung durch die Coulombkraft gezwungen, sich senkrecht zu den Äquipotentiallinien zwischen zwei Elektroden entlang des Potentialgradienten ΔU zu bewegen. Je höher der Potentialgradient zwischen den Elektroden und damit die Coulombkraft wird, desto höher wird die Beschleunigungswirkung und desto größer ist auch die Endgeschwindigkeit des Ions, wenn es das Beschleunigungsfeld verläßt.

Durch ein E -Feld können Ionen auch in ihren Translationsbewegungen beeinflusst werden. Im Magnetfeld B aber wirkt nur dann die Lorentzkraft auf ein Ion, wenn es sich bereits bewegt.

Mit Massenanalysatoren werden die Coulombkraft und die Lorentzkraft ausgenutzt, um Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis aufzutrennen.

Wenn Ionen einen magnetischen Sektorfeld-Massenanalysator teilkreisförmiger Geometrie³⁷ (vergl. Abbildung 2.2) passieren, werden sie infolge ihres Impulses $m \cdot v$ auf eine andere Flugbahn gelenkt. Der Radius R der Kreisbahn wird durch das Gleichgewicht zwischen der Ablenkungskraft K_{Abl} (Lorentzkraft) und der Zentripetalkraft K_{Zent} bestimmt:

$$K_{\text{Abl}} = K_{\text{Zent}} = Bev = \frac{mv^2}{R} \quad \Leftrightarrow \quad R = \frac{mv}{eB}$$

ⁱ Von IUPAC empfohlene atomare Masseneinheit, die auch als *atomic mass unit* (amu) bezeichnet wird.

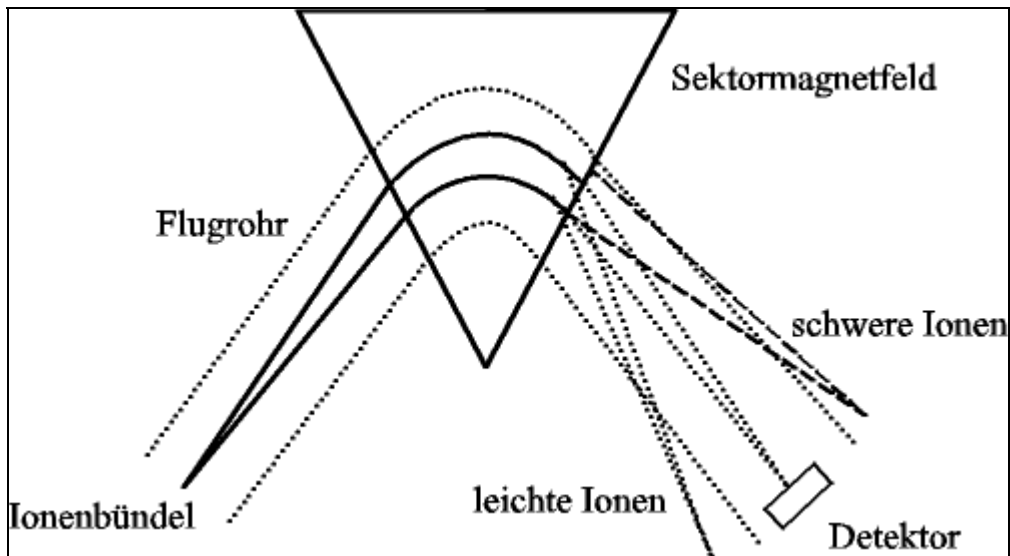


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines magnetischen Sektorfeldinstruments zur Massenseparation

Durchfliegen Ionen mit der kinetischen Energie $\Phi = \frac{1}{2} m v_{\parallel}^2$ ein elektrisches Feld konstanter Feldstärke E der Länge s senkrecht zu den Feldlinien, so erfahren sie eine Querbeschleunigung a , solange wie sie sich im Feld aufhalten (t_A) (vergl. Abbildung 2.3):

$$\Phi = \frac{1}{2} \cdot m v_{\parallel}^2$$

$$v_{\parallel} = \frac{s}{t_A} \quad v_{\perp} = a \cdot t_A$$

$$a = \frac{E \cdot e}{m}$$

$$v_{\perp} = \frac{E \cdot e}{m} \cdot t_A \quad \text{mit} \quad t_A = \frac{s}{v_{\parallel}}$$

$$v_{\perp} = \frac{E \cdot e}{m} \cdot \frac{s}{v_{\parallel}}$$

Dividiert durch die Geschwindigkeitskomponente in Flugrichtung folgt:

$$\frac{v_{\perp}}{v_{\parallel}} = \frac{E \cdot e \cdot s}{m \cdot v_{\parallel}^2} = \frac{E \cdot e \cdot s}{2 \cdot \Phi}$$

Der Quotient $\frac{v_{\perp}}{v_{\parallel}}$ kann als Maß für die Richtungsänderung aufgefaßt werden, die die Ionen

durch das elektrostatische Feld erfahren. Aus diesem Zusammenhang ist ersichtlich, daß die Ionen im elektrischen Feld nach ihrer Energie Φ separiert werden³⁸.

In der folgenden Abbildung 2.3 wird die Massenseparation mit Hilfe eines elektrischen Sektorfeldinstruments schematisch dargestellt.

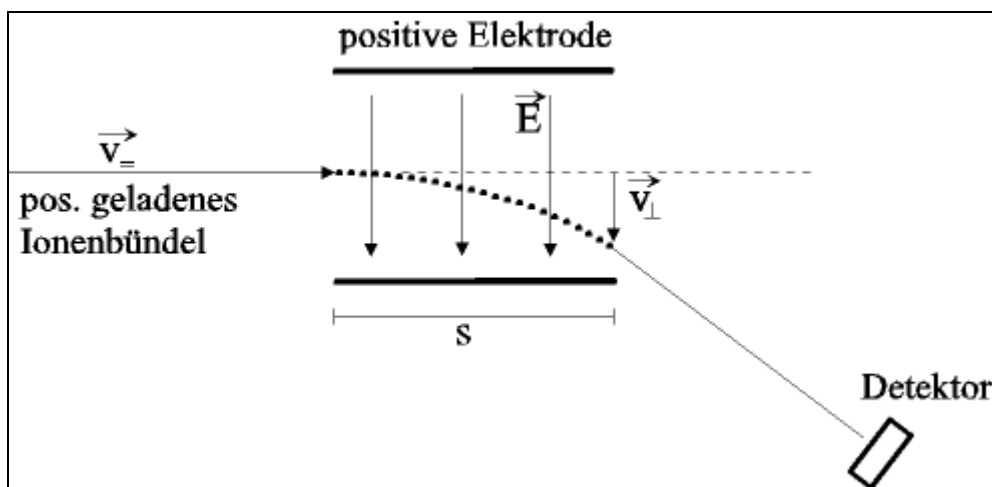


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines elektrischen Sektorfeldinstruments zur Massenseparation

2.2.2 Quadrupol-Massenspektrometer

Das bereits 1953 von Paul³⁹ et al. beschriebene Quadrupolfeld wird erzeugt, indem vier Rundstäbe (besser: hyperbolisches Profil) parallel entlang der Flugrichtung der Ionen einander gegenüberliegend angeordnet werden. Zur Massenanalyse wird an die Stäbe eine Gleichspannungsrampe angelegt, die von einer Wechselspannung überlagert wird. Jeweils zwei gegenüberliegende Stäbe zeigen die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung, während nebeneinanderliegende Stäbe die entgegengesetzte Polarität und eine um 180° versetzte Phase aufweisen.

Der Massenscan erfolgt durch Variation der Gleichspannung und der Amplitude des Wechselfeldes, wobei das Verhältnis zueinander konstant gehalten wird. Auf diese Weise

werden die Ionen im Quadrupolfeld gezwungen, in ihren Trajektorien dem Feld zu folgen. Den Quadrupolmassenfilter können in der Folge nur Ionen eines bestimmten m/z -Wertes passieren.

2.2.3 Ion-Zyklotron-Resonanz-Massenspektrometer

In der *Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry* (ICR-MS)⁴⁰ wird eine magnetische Falle zum Einfangen und zur Massenanalyse von Ionen genutzt. Im ICR-MS werden Ionen in einem homogenen Magnetfeld eines supraleitenden Magneten gefangen, wenn Zentripetal- und Zentrifugalkraft ausgeglichen sind. Durch Einstrahlung einer auf das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis abgestimmten elektromagnetischen Frequenz, d.h. durch Resonanzbildung mit der Umlauffrequenz, wird die kinetische Energie des selektierten Ions erhöht. Das Ion muß dann seine stabile Kreisbahn verlassen und kann detektiert werden. Wird die Resonanzfrequenz sehr schnell ($\Delta t \sim 1 \mu\text{s}$) und über einen weiten Bereich kontinuierlich durchgestimmt, läßt sich mit Hilfe der Fourier-Transformationsrechnung das detektierte komplexe wellenförmige zeitabhängige Signal in die Frequenzdomäne übersetzen (FT-ICR-MS).

2.3 Flugzeitmassenspektrometer

Der Vorschlag, Massenspektrometrie ohne magnetische Felder zu betreiben (vergl. Kapitel 2.2.1), geht auf Stevens⁴¹ zurück und ist 1948 von Cameron und Eggers⁴² unter dem Namen *ion velocitron* realisiert worden.

Im Jahr 1955 haben Wiley und McLaren⁴³ ein Flugzeitmassenspektrometer eingeführt, das eine zweistufige gepulste Ionenextraktion genutzt hat, um räumliche und energetische Fehler bei der Ionengenerierung zu kompensieren. Dabei werden die Ionen durch eine kleine gepulste Spannung aus der Entstehungsregion beschleunigt, damit die an unterschiedlichen Orten in der Quelle erzeugten Ionen korrigiert werden. Die zweite Stufe beschleunigt die Ionen dann auf ihre Endgeschwindigkeit.

Diese Neuerung des *time lag focusing*, d.h. der Einführung eines Zeitintervalls zwischen Ionengenerierung und –abzug hat zu einem „universell“ einsetzbaren Massenspektrometer geführt, das später durch die *Bendix Corporation* kommerzialisiert worden ist.

2.3.1 Grundlagen der MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie

Werden Ionen im elektrostatischen Potentialgradienten erzeugt, nehmen sie aus dem Feld kinetische Energie auf und beschleunigen. Ionen unterschiedlicher m/z -Verhältnisse erreichen im E -Feld verschiedene Endgeschwindigkeiten. Eine sich anschließende feldfreie Flugstrecke legen Ionen mit größerer Geschwindigkeit in kürzerer Zeit zurück als Ionen mit geringerer Geschwindigkeit. Folglich wird eine Trennwirkung erreicht.

Im *Time of Flight*-Massenanalysator (ToF) wird die Zeit zwischen der Erzeugung der Ionen und der Ankunft der voneinander getrennten Spezies am Detektor mit hoher Genauigkeit, z.B. durch Oszilloskope aufgezeichnet. Dies bildet die Grundlage der Flugzeitmassenspektrometrie.

Gerade die *Time of Flight*-Massenanalytik eignet sich besonders gut, wenn viele unterschiedliche Ionen in einem sehr kurzen Zeitintervall, das heißt nicht-kontinuierlich erzeugt werden und als Ionenverbände zusammen vom Entstehungsort extrahiert werden. Dieser Umstand prädestiniert den ToF-Massenanalysator zur Kombination mit Ionenerzeugung durch gepulste Laserdesorption/ Ionisation.

Daher wird in der Analytik von nichtflüchtigen, thermisch sensiblen Molekülen heute hauptsächlich die Methode der *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*-Massenspektrometrie verwendet (MALDI-ToF-MS).

In der MALDI-MS werden üblicherweise Matrixsubstanz und Analyt in einem Lösungsmittel gelöst und einige Tropfen der Mischung auf dem Probeträger auskristallisiert.

Eine präzisere Beschreibung der wichtigen Probenpräparation findet sich im experimentellen Teil dieser Arbeit (vergl. Kapitel 4.1).

Der Probeträger, kurz „tip“, wird mit Hilfe einer Schubstange in das Massenspektrometer geschoben, wo er in der sogenannten Repellerelektrode so einrastet, daß er mit der Elektrode eine plane Oberfläche bildet (vergl. Abbildung 2.4).

Die Bildung einer planen Oberfläche ist notwendig, damit durch den tip nicht die elektrischen Feldlinien im Abzugsfeld gestört und Ionen auf unerwünschte Trajektorien gezwungen werden.

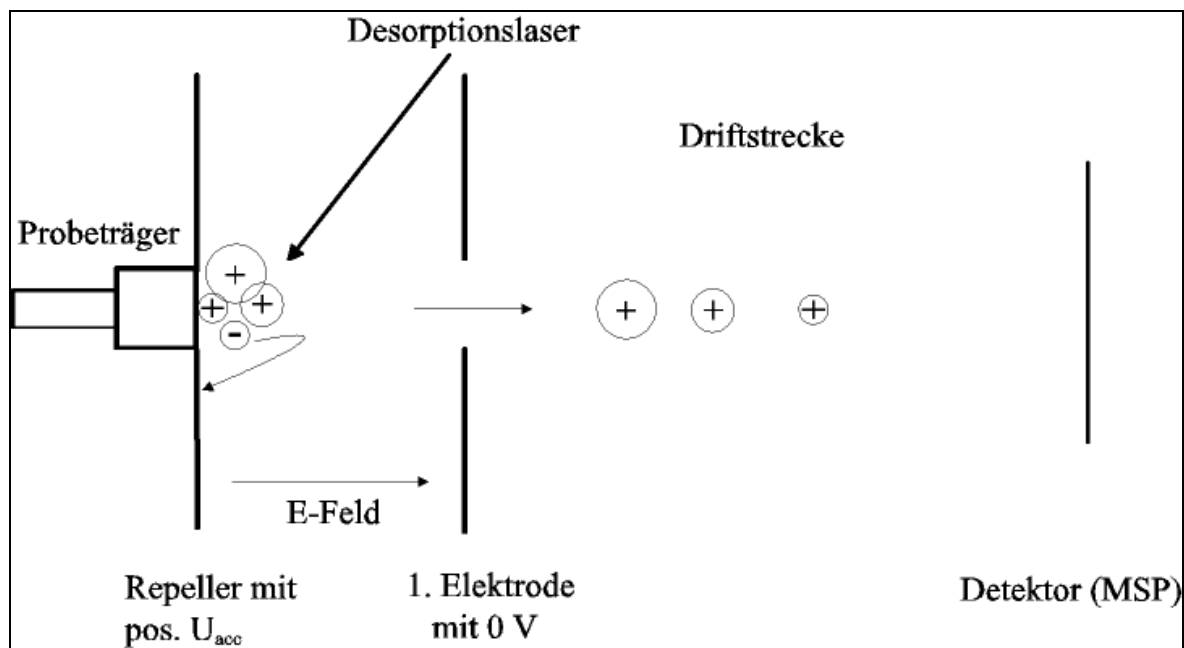


Abbildung 2.4: Prinzip der Massenseparation im MALDI-Flugzeitmassenspektrometer

Die durch die Ionen aus dem elektrischen Beschleunigungsfeld aufgenommene kinetische Energie E_{kin} läßt sich mit der Beschleunigungsspannung U_{acc} wie folgt verknüpfen:

$$E_{kin} = z \cdot e \cdot U_{acc} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$$

Dabei beschreibt e die Elementarladung, z die positive oder negative Anzahl der Elementarladungen, die das Ion trägt, m die molekulare Masse des Ions und v die Endgeschwindigkeit im feldfreien Raum bei $U = 0V$.

Wird am Repeller eine positive Betriebsspannung angelegt und die erste Elektrode geerdet, werden positiv geladene Ionen beschleunigt; liegt am Repeller negatives Potential an, werden negative Ionen in Richtung der mit null Volt versorgten ersten Elektrode abgezogen.

Aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeiten trennen sich die Ionen auf ihrem Flug die feldfreie Strecke entlang auf und treffen schließlich nach m/z getrennt auf dem Detektor auf. Durch Substitution von v durch s/t in der obigen Gleichung wird sofort deutlich, daß die Flugzeit der Ionen proportional zur Wurzel ihrer Masse ist.

$$t \sim \sqrt{m}$$

Wenn die Massenabhängigkeit der Flugzeiten der zu untersuchenden Ionen durch Ionen bekannter Masse kalibriert wird, lassen sich der gerätespezifische Parameter a und die Nachweisverzögerung b durch lineare Regression bestimmen.

$$t = a \cdot \sqrt{m} + b$$

In die Steigung a fließen experimentelle Daten, wie z.B. Betriebsspannungen, die Geometrie der Abzugsfelder und die Länge der Driftstrecke ein, während b durch die Ansprechzeiten des Detektors und der Elektronik verursacht wird.

Die Güte eines Massenspektrometers wird sowohl über sein oberes Massenlimit und über die Transmission, als auch durch das Massenaufklärungsvermögen R beschrieben. Das obere Massenlimit ist eine Funktion des Detektors und kann experimentell bestimmt werden. Die Transmission ist der Anteil der detektierten an den erzeugten Ionen, während das Auflösungsvermögen R die Fähigkeit des Spektrometers beschreibt, das Signal zweier Ionen mit kleinem Massenunterschied auch in Form voneinander getrennter Signalantworten zu detektieren.

In der Massenspektrometrie werden zwei Peaks als voneinander getrennt bezeichnet, wenn das Tal zwischen den Peaks entweder 10%, im Falle hoher Forderungen an die Auflösung, oder 50%, für den Fall moderater Auflösung, betragen.

Wenn der feinste Massenunterschied zwischen zwei Peaks der Wert Δm ist, so definiert sich das Auflösungsvermögen zu

$$R = \frac{m}{\Delta m} .$$

In Flugzeitmassenspektrometern mit ausschließlich statischen elektrischen Feldern (für welche $m \sim \sqrt{t}$ erfüllt ist) wird die Halbwertsbreite Δt (auch: *full width at half maximum*, FWHM) eines Flugzeitsignals zur Bestimmung des Auflösungsvermögens herangezogen und es ergibt sich für ein auf konstante kinetische Energie beschleunigtes Ion⁴⁴:

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2 \cdot \Delta t}$$

Einem hohen Auflösungsvermögen des Massenspektrometers wirken vor allem physikalische Phänomene bei der Entstehung der Ionen entgegen.

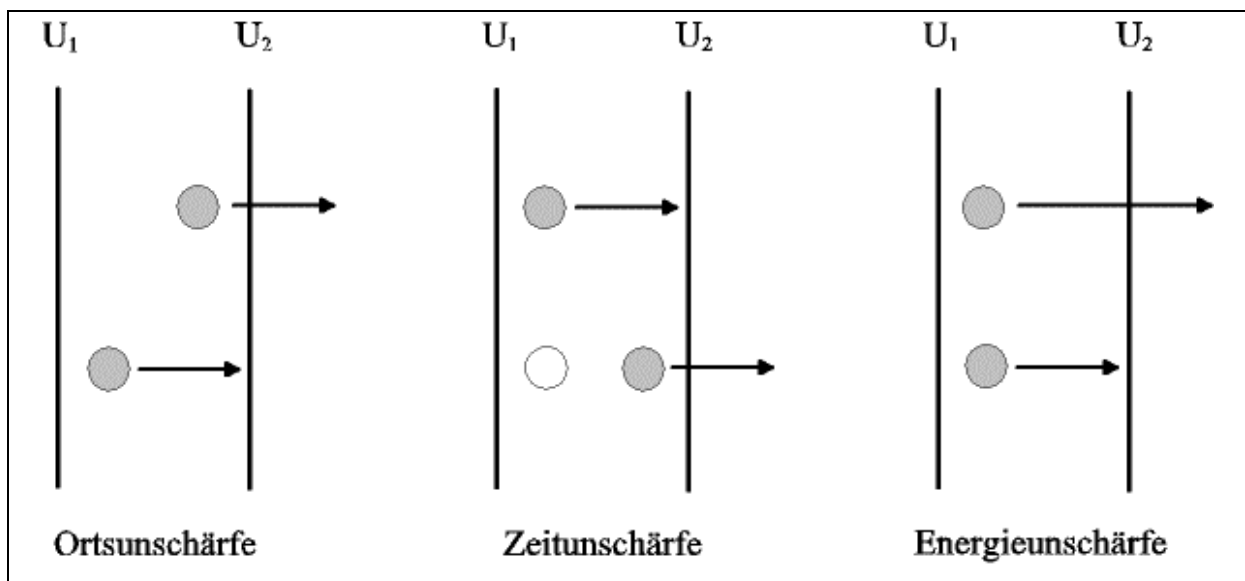


Abbildung 2.5: Ursachen der Signalverbreiterung in einem ToF-Experiment

Unter dem Begriff Zeitunschärfe werden alle Prozesse der Ionengenerierung subsummiert, die relativ zur minimalen Kanalbreite der Signalaufzeichnung signifikant, d.h. detektierbar sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollen darunter Prozesse verstanden werden, die länger als eine Nanosekunde andauern, weil dieser Wert das kleinste Aufzeichnungsintervall des Oszilloskops darstellt, welches die Detektorsignale aufzeichnet. In der MALDI-MS geht in die Zeitunschärfe die Pulsdauer des Lasers ein, d.h. auch Laser-induzierte Prozesse, die

physikalisch-chemisch eigentlich kürzer sind, können sich über die Pulsbreite des Lasers erstrecken. Zur Signalverbreiterung können ferner Komponenten der Eigengeschwindigkeiten der Ionen beitragen, die durch den Desorptionspuls erzeugt werden.

Ortsunschärfe umschreibt in der Lasermassenspektrometrie die endliche Ausdehnung des Ionisationsvolumens. Es ist mit einer Linse physikalisch nicht möglich, einen Laserstrahl räumlich kleiner als λ^2 zu fokussieren. Gemeinhin liegen in der Laborpraxis die Spotgrößen bei guter Fokussierung bei $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$, d.h. bei zehntausend Quadratmicrometern. Im Falle der *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization* kann sich das Ionisationsvolumen in der festen Phase in Abhängigkeit diverser Faktoren, wie der Kühlung infolge Expansion oder der Energiedissipation in Kristallphononen deutlich von dem Ionisationsvolumen in einer Gaswolke unterscheiden.

Energieunschärfe entsteht durch Erzeugung von Ionen auf unterschiedlichen elektrischen Potentialwerten im Abzugsfeld zwischen Repeller und erster Elektrode. In der MALDI-MS kann dies durch Ionisierungsprozesse innerhalb des in das Vakuum propagierenden Desorptionsplume geschehen, so beispielsweise durch Protonenübertragung in Matrix-Analyt-Clustern oder infolge Wechselwirkung bereits in der Gasphase befindlicher Spezies mit dem Laserlicht.

Gerade diese die Massenauflösung begrenzenden Prozesse stellen ein Hindernis bei der Entwicklung höherauflösender Massenspektrometer dar. Dabei gilt es zu unterscheiden zwischen natürlichen Verbreiterungen, die durch Geschick und Erfahrung des Experimentators nicht zu überwinden sind und Fehlern, die durch nicht ausreichende Kenntnisse der dynamischen physikalischen Vorgänge in die MALDI-Massenspektrometrie einfließen, sei es über die konstruktive Seite oder über den Einfluß der Chemie in Form mangelhafter Probenpräparation.

Ionen, die im elektrischen Potential der Beschleunigungsstrecke gebildet werden, erfahren abhängig von ihrer Position unterschiedliche Beschleunigung. Ionen der gleichen Masse zu Ladungsverhältnisses, die auf hohen Potentialwerten erzeugt werden, erreichen eine höhere Geschwindigkeit als Ionen, die relativ dazu auf einem geringeren Potentialniveau starten. Im Ortsfokus wird das Ion mit der höheren Geschwindigkeit das langsamere eingeholt haben.

In einem einstufigen Beschleunigungsfeld liegt der Ortsfokus bei der doppelten Entfernung des Abstandes zwischen dem Ort der Ionenerzeugung und der 0V-Elektrode⁴⁵ (vergl. Abbildung 2.6).

Gewöhnlich ist die Länge der Beschleunigungsstrecke klein gegenüber der Ausdehnung der feldfreien Flugstrecke.

Folglich ist auch die Flugzeit innerhalb der Beschleunigungsregion kurz und die Massenauflösung ($m/\Delta m = t/2\Delta t$) ist nur gering. Das Symbol t drückt die Gesamtflugzeit des Ions bis zum Detektor aus, während Δt die zeitliche Breite der auf dem Detektor auftreffenden Ionenwolke bezeichnet. Wenn die Flugzeitverbreiterung einer Ionenwolke an einem Punkt in der feldfreien Flugstrecke nach ihrer relativen kinetischen Energie U in die folgende Taylorreihe entwickelt wird,

$$\frac{\Delta t}{t} = a \cdot \frac{\Delta U}{U} + b \cdot \left(\frac{\Delta U}{U}\right)^2 + c \cdot \left(\frac{\Delta U}{U}\right)^3 + \dots$$

kann gezeigt werden, daß im Ortsfokus eines einstufigen Beschleunigungsfeldes der lineare Koeffizient a verschwindet ($a=0$)⁸.

Ein hypothetisches, in diesem Punkt aquiriertes Massenspektrum wird als nach erster Ordnung Energie-korrigiert bezeichnet.

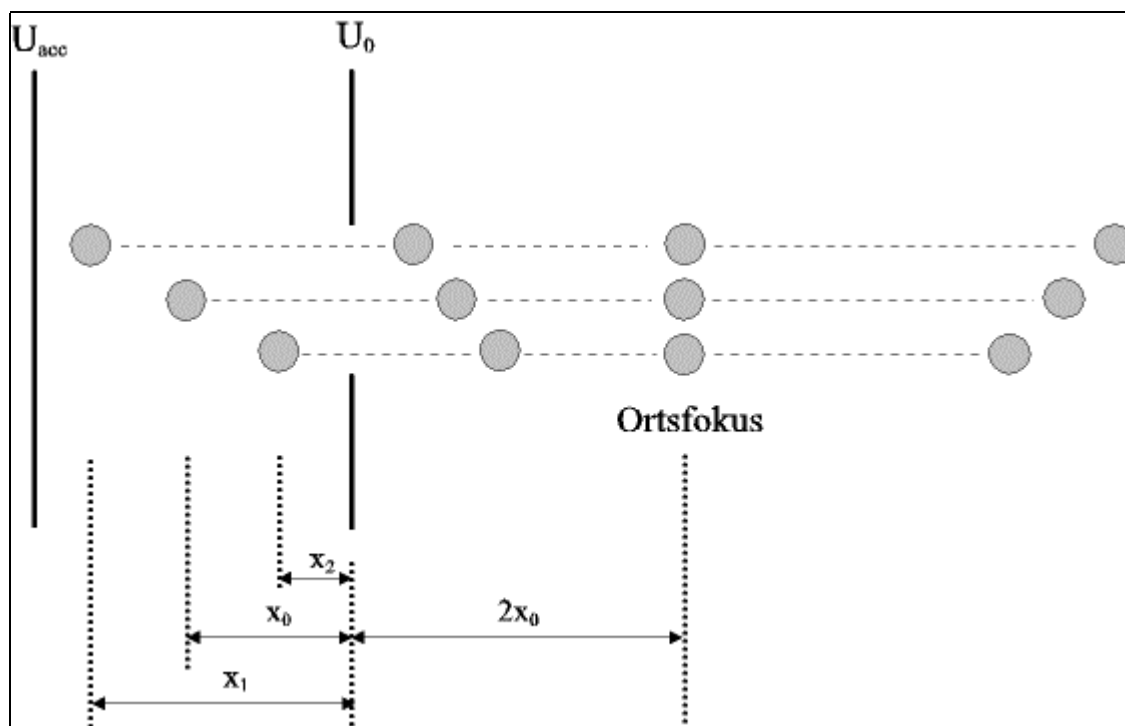


Abbildung 2.6: Ortsfokus bei einstufigem Beschleunigungsfeld

Bereits Wiley und McLaren haben gezeigt, daß bei Ergänzung des obigen *setup* durch ein zweites Beschleunigungsfeld und geschickte Wahl der Potentialverhältnisse, die Position des Ortsfokus erster Ordnung weiter in Richtung auf den Detektor verschoben werden kann, was zu einer deutlichen Verbesserung des Massenaufösungsvermögens führt⁸. Die beschriebene zweistufige Geometrie der Ionenquelle wird als Wiley-McLaren-Anordnung bezeichnet (vergl. Abbildung 2.7).

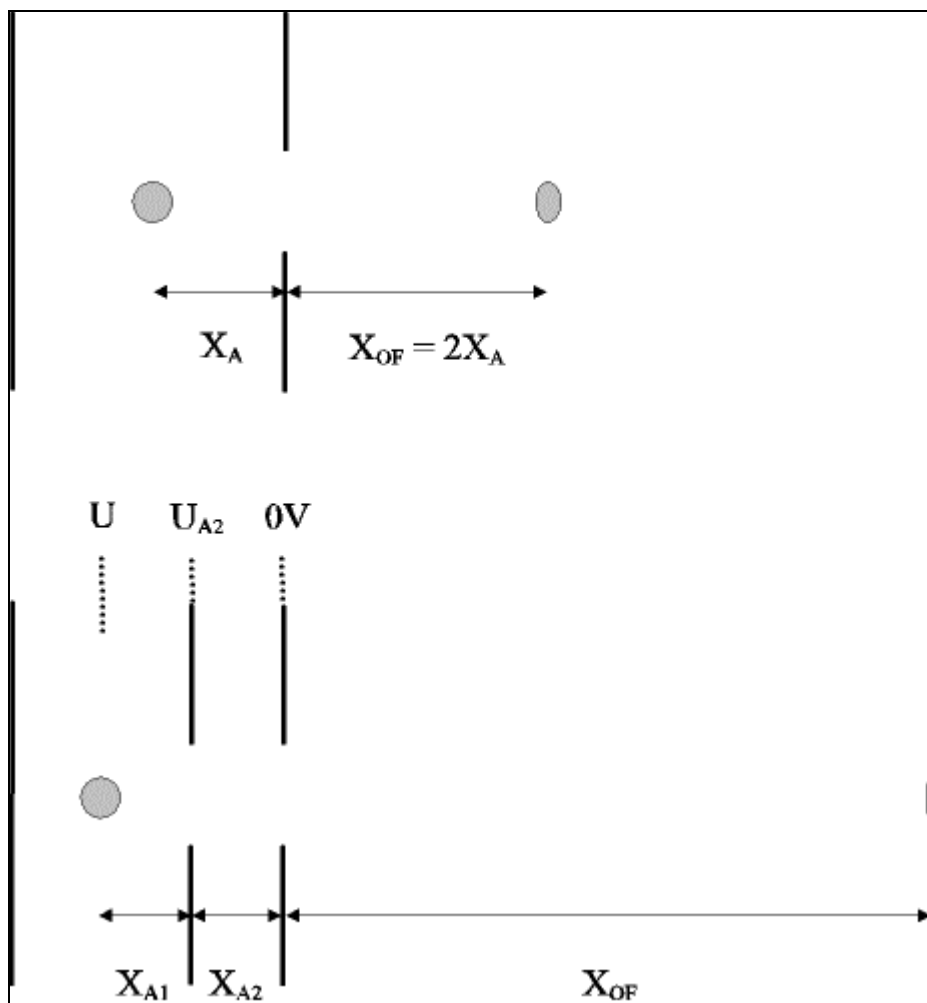


Abbildung 2.7: oben: Ortsfokus bei einstufigem Beschleunigungsfeld; unten: Ortsfokus zweiter Ordnung bei zweistufigem Beschleunigungsfeld (Ortsfokus invariant, da das Verhältnis X_{A2}/X_{A1} festgelegt ist)

Für einen definierten Ortsfokus zeigt die Wiley-McLaren-Bedingung, daß noch ein Parameter zur freien Wahl zur Verfügung steht, denn die Gleichung kann für eine Mannigfaltigkeit der geometrischen Wertepaare sowie für die der elektrostatischen Größen erfüllt werden.

$$X_{SF} = 2X_{A1} \cdot \left(\frac{U}{U_{A2}} \right)^{\frac{3}{2}} \cdot \left(1 - \frac{X_{A2}}{X_{A1}} \cdot \left(\frac{U}{U_{A2}} + \sqrt{\frac{U}{U_{A2}}} \right)^{-1} \right)$$

Der zur Verfügung stehende Wertebereich kann dazu genutzt werden, eine zusätzliche Bedingung zu erfüllen, die sich als Energiekorrektur in der zweiten Ordnung der Taylor-Reihenentwicklung auswirkt. Wird die Geometrie der zweistufigen Ionenquelle konstruktiv festgelegt, kann der Ortsfokus zweiter Ordnung nicht mehr durch Veränderung der Beschleunigungspotentiale verschoben werden⁴⁶.

Die meisten der heute betriebenen Massenspektrometer nutzen einen zweistufigen Aufbau der Ionenquelle.

Die wahrscheinlich wichtigste Weiterentwicklung der Massenanalytoren in der Flugzeitmassenspektrometrie geht auf die Arbeiten von Alikanov⁴⁷ und Mamyrin⁴⁸ zurück, die zur Kompensation der Energiefehler der Ionen vorgeschlagen haben, Ionen mit Hilfe elektrostatischer Felder abzubremsen, deren Flugrichtung umzukehren und sie unter einem gewissen Winkel zum einfallenden Ionenstrahl auf einem Detektor zu fokussieren. Ein solcher Aufbau wird als Reflektron-Flugzeitmassenspektrometer (ReToF-MS) bezeichnet und ist in der folgenden Abbildung 2.8 dargestellt.

Das Reflektron korrigiert die kinetischen Energieverbreiterungen von Ionen gleicher m/z-Verhältnisse dadurch, daß höherenergetische Ionen tiefer in das Reflektronfeld eintauchen und sich aus diesem Grund länger im Reflektron aufhalten als Ionen mit niedriger Energie.

Gewöhnlich werden die Ionen im zweistufigen Reflektron zunächst durch ein Bremsfeld, das etwa zwei Drittel ihrer Energie kompensiert, stark abgebremst, wobei sich positive Ionen durch einen positiven elektrischen Feldgradienten abbremsen lassen, während negative Ionen durch negative Elektrodenspannungen verzögert werden. Im Anschluß an das durch die Brems Elektroden aufgebaute Feld schließt sich das Korrekturfeld an, welches von möglichst vielen scheibenförmigen Elektroden aufgespannt wird.

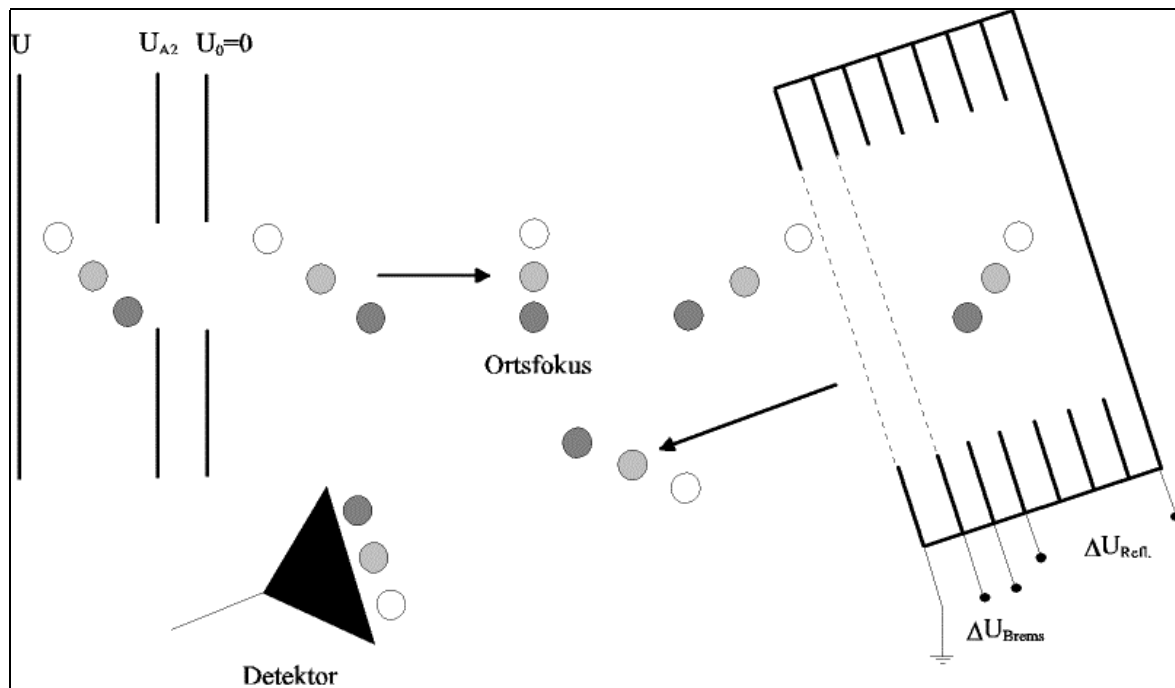


Abbildung 2.8: Schemazeichnung eines Reflektron-Flugzeitmassenspektrometers (helle Kreise: Ionenbündel mit hoher kinetischer Energie, dunkle Kreise: Ionen mit geringer kinetischer Energie)

Die Zahl der Elektroden wird groß gewählt, damit das Korrekturfeld möglichst homogen ist. Die Elektroden werden in der Weise verschaltet, daß die Feldstärke zur Endplatte hin immer weiter zunimmt. Ist die kinetische Energie der Ionen in Vorwärtsrichtung kompensiert, deren Geschwindigkeit folglich Null, wirkt das Reflektronfeld in Rückwärtsrichtung beschleunigend.

In Verbindung mit Multiphotonen-Ionisation können in Reflektron-Flugzeitmassenspektrometern Massenauflösungen in der Größenordnung von 35000 erzielt werden⁴⁹.

Zu einer eingehenderen Besprechung der Reflektron-Technik, etwa zu Fragen der Feldhomogenität oder zum Detektorwinkel relativ zum Reflektron sei neben der bereits erwähnten Literatur auf Bergmann⁴⁹ et al. sowie auf Frey⁵⁰ et al. verwiesen.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete lineare Flugzeitmassenspektrometer (vergl. Kapitel 4.2) verfügt über eine relativ lange feldfreie Flugstrecke von rund zwei Metern. Eine lange Flugstrecke allein reicht allerdings nicht aus, um hohe Massenauflösung zu erzielen.

Im normalen LinToF-Betrieb können Auflösungen in der Größenordnung von $R = 500$ erzielt werden. Für höherauflösende Untersuchungen schließt sich an das zweistufige Beschleunigungsfeld ein gepulstes Elektrodensystem aus elf Elektroden an, das die mit Hilfe der *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* erzeugten Ionen in Abhängigkeit ihrer Position im elektrischen Feld nachbeschleunigt. Eine solche pulsare Elektrodenanordnung wird als *Post Source Pulse Focusing-System* (PSPF) bezeichnet und wird in ihrer Wirkungsweise im Kapitel 4.2.1 im Einzelnen besprochen.

Eine weitere Methode zur Verbesserung der Massenauflösung setzt bei der Entstehung der Ionen an. Bei der *Delayed Ion Extraction* (DE)⁵¹ wird die breite Geschwindigkeitsverteilung der MALDI-Ionen durch zeitliche Fokussierung mit einem gepulsten elektrischen Feld reduziert. Für DE wird die Ionenquelle in zwei Beschleunigungsstufen untergliedert, von welchen die erste zwischen dem Repeller R und der ersten Elektrode und die zweite Stufe zwischen E1 und E2 liegt (vergl. Abbildung 2.9).

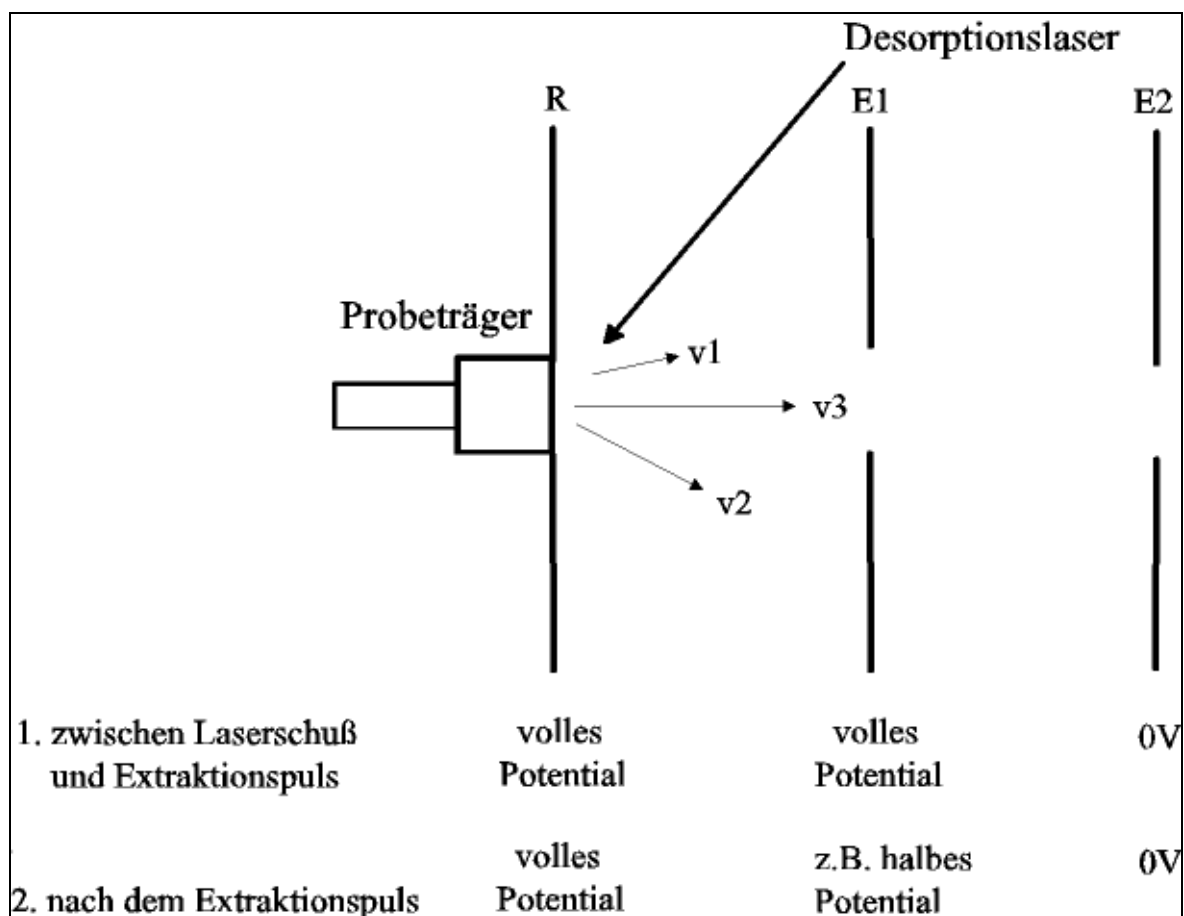


Abbildung 2.9: Schema zur zeitverzögerten Ionenextraktion (*Delayed Ion Extraction*)

Zum Zeitpunkt der Ionengenerierung durch den Laserpuls liegt zwischen dem Repeller R und der Elektrode E1 kein Potentialgradient an (vergl. Abbildung 2.9). Dadurch können sich alle Ionen mit verschiedenen Geschwindigkeiten frei in das Vakuum ausbreiten. Nach einer Verzögerungszeit in Höhe einiger hundert Nanosekunden wird das Abzugspotential E1 eingeschaltet. Die vormals langsamen Ionen erhalten nun eine größere Beschleunigung als die vormals schnelleren. Diese von der Position des Ions beim Einschalten des Feldes abhängige Beschleunigung bewirkt eine Auflösungsverbesserung etwa um den Faktor 4 im LinToF-Modus und um den Faktor 3 im ReToF-Modus.

3 **Vorstellungen zum Ablauf der Desorption und der Ionengenerierung in der UV-MALDI-MS**

Bei der mechanistischen Betrachtung der hochkomplexen Vorgänge während der Matrix-unterstützten Laserdesorption/ Ionisation wird zweckmäßig in Bezug auf die Ionenbildung zwischen der Primärionengenerierung, d.h. der spontanen Erzeugung von zumeist Matrixionen und der Bildung sekundärer Ionen durch Ionisierungsprozesse, z.B. in der überdichten Gasphase oberhalb des Probeträgers unterschieden. Auch im Hinblick auf den Materietransport aus der kondensierten in die Gasphase werden in der Fachliteratur verschiedene Modelle kontrovers diskutiert, weil verschiedene physikalische Prozesse zur Desorption beitragen. Aus allein massenspektrometrischen Untersuchungen, z.B. mit *delayed ion extraction* oder auch mit Postionisationsexperimenten, lassen sich viele dieser Prozesse nur ansatzweise oder durch Rückschlüsse eruieren. Deshalb wird in dieser Arbeit durch spektroskopische Experimente an den die Desorption begleitenden Lichtereignissen ein Beitrag zur Erklärung der auftretenden Phänomene geleistet werden. Die Verknüpfung massenspektrometrischer mit spektroskopischen Untersuchungen bietet die Möglichkeit, zu einem tieferen Verständnis der Desorptionsvorgänge zu gelangen.

Unter Einbeziehung theoretischer Berechnungen sollte es den Forschern künftig möglich werden, höherauflösende MALDI-Massenspektrometer zu realisieren und die chemisch-physikalische Anwendungsbreite dieser Geräte zu erhöhen.

3.1 Desorptionsmodelle

Unter dem Begriff Desorptionsmodell sollen in dieser Arbeit die Mechanismen des Materietransports aus der kondensierten festen Phase in die Gasphase verstanden werden. Hierbei spielen die Umverteilung der anfangs elektronischen Anregungsenergie in die vibratorischen Freiheitsgrade als eigentlichem *onset* des Desorptionsvorganges genauso wie Überlegungen zum dynamisch-mechanischen sowie zum thermischen Verhalten der Matrixsubstanz während des Laserpulses eine wichtige Rolle.

Im Zusammenhang mit dem dynamisch-mechanischen Verhalten wird in der Literatur ein *pressure pulse*-Modell, d.h. eine durch den Laserpuls ausgelöste Komprimierung der Matrixsubstanz als Druckbeitrag diskutiert.

Auch thermische Desorption als Folge schlagartiger Aufheizung der Matrix mit einigen tausend Kelvin pro Sekunde kann zur Sublimation beitragen.

Ein wissenschaftlich allgemein akzeptiertes Desorptionsmodell existiert bisher nicht.

3.1.1 Der *onset* des Desorptionsvorganges

Trifft ein ultravioletter Laserpuls auf das kristalline Gefüge der Matrix, so absorbieren die Moleküle Laserquanten und gehen dadurch in einen elektronischen Anregungszustand über. Für ultraviolettes Laserlicht der Wellenlänge 355 nm stellt das konjugierte π -Elektronensystem der Phenylgruppe die chromophore Gruppe bei der Absorption dar. Der elektronische Übergang ist dann vom Typ $\pi\pi^*$. Ist ein solcher Übergang aus Symmetriegründen erlaubt, wird er einen großen Absorptionskoeffizienten ϵ_{\max} bei dieser Wellenlänge zeigen.

Viele der UV-MALDI-Matrixsubstanzen sind funktionalisierte aromatische Carbonsäuren. Das bedingt, daß je nach Desorptionslaserwellenlänge neben der Anregung des π -Elektronensystems auch $n\pi^*$ -Absorption durch die nichtbindenden Elektronen der Carbonylgruppe erfolgen kann. In organischen Lösungsmitteln liegen die Absorptionsbanden der Carbonylgruppe solcher Matrices allerdings im kürzerwelligen Ultravioletten und weisen zumeist kleine Absorptionskoeffizienten auf. Jedoch können $n\pi^*$ -Niveaus infolge $\pi\pi^* \leftrightarrow n\pi^*$ -Kopplung zur Absorption beitragen und so die Lage der Banden beeinflussen.

Die für MALDI-Experimentatoren äußerst wichtigen Informationen über die Absorptionskoeffizienten der organischen Kristallite der Matrixsubstanzen sind der Literatur nicht zu entnehmen, da deren Bestimmung nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz naturgemäß nicht möglich ist. Einen Ansatz zur Messung von Festkörper-Absorptions/ Reflexions-

Eigenschaften in Abhängigkeit der Desortionslaserwellenlänge bieten ellipsometrische Experimente^{ii,52}.

Die Intensität und die spektrale Lage einer UV-Absorptionsbande hängen von der Größe des Übergangsmomentes ab. Das Übergangsmoment ist das Raumintegral des Produkts aller elektronischen Wellenfunktionen der Ausgangs- und Endzustände mit dem Dipolübergangsmomentvektor \sqrt{D} . Das Quadrat des Übergangsmomentes ist die Dipolstärke D . Sie steht proportional mit der Absolutintensität $\int \epsilon \, dv$ der Absorptionsbande in Beziehung.

Etwaige Feinstruktur in den Elektronenspektren ist durch die Überlagerung eines Elektronenüberganges mit Schwingungsübergängen zu erklären. Nach dem Franck-Condon-Prinzip erfolgt die Elektronenanregung gegenüber der Schwingung so rasch, daß währenddessen die Geometrie und damit die kinetische Energie der Schwingungen des Moleküls nicht verändert wird.

Die elektronischen Zustände werden also von Schwingungs- und Rotationszuständen überlagert, so daß bei Elektronenanregung über die Kopplung mit dem Dipolübergangsmomentvektor gleichzeitig Schwingungen und Rotationen angeregt werden können.

Auf der Basis solcher Überlegungen haben 1997 Zhigilei et al.⁵³ ein moleküldynamisches Modell zur Beschreibung der Laserverdampfung organischer Kristallvolumina unter Annahme eines *breathing sphere*-Ansatzes entwickelt.

Danach bewirkt die Absorption ultravioletter Laserstrahlung starke vibratorische Anregung im elektronisch angeregten Zustand und zwar durch die Prozesse der Inneren Umwandlung innerhalb einer äußerst kurzen Zeitspanne von rund einer Picosekunde, gefolgt von einem etwas langsameren Prozeß der Kühlung der vibratorisch heißen Moleküle (vergl. Kapitel 3.3). Die Computersimulation bestätigt den aus Experimenten ermittelten *onset* des Desortionsprozesses innerhalb der ersten 20 ps des Laserpulses⁵⁴.

Der *breathing sphere*-Ansatz basiert auf der Ratenverteilung elektronischer Anregungsenergie auf drei translatorische und einen integralen inneren vibratorischen Freiheitsgrad (dem „*breathing*“). Durch die Berücksichtigung der Kopplung des Vibrationsfreiheitsgrades

ⁱⁱ Durch ellipsometrische Messungen mit zirkular polarisiertem Laserlicht an stark absorbierenden Medien unter nicht spiegelnder Reflexion lassen sich Real- und Imaginärteil der komplexen Dielektrizitätskonstante bestimmen, wenn Oszillatorstärke und Dämpfungskonstante bekannt sind. Aus Interferenzmessungen lassen sich auf den Brechungsindex der absorbierenden Schicht und die Schichtdicke schließen.

mit den durch den Laser erzeugten Kristallphononen wird der Energietransfer vom angeregten Molekül auf die Gitternachbarn in das Modell einbezogen. Auf diese Weise geht die im angeregten Molekül deponierte Vibrationsenergie in Höhe eines Photonenquantums als kinetische innere Vibrationsenergie in das Modell ein. Für die Berechnung müssen auch das Kristallsystem und die Klasse berücksichtigt werden (Hexagonal dichteste Packung).

Die Simulation wird auf einen 337 nm Laserpuls von 15 ps Dauer beschränkt. Unter Annahme einer Eindringtiefe des Laserpulses von 7 nm resultiert eine Absorption der Laserenergie von 99%.

Auf der Basis dieser Randbedingungen ziehen die Autoren aus der Simulation qualitative Rückschlüsse auf den Laserverdampfungsprozeß als kolligativen Substanzausstoß aus der kristallinen Matrix und zwar:

- a) zur durchschnittlichen und maximalen kinetischen Energie in den *breathing*-Modi innerhalb der Eindringregion des Laserpulses,
- b) zur Zahl der pro Puls desorbierten Moleküle und deren Aggregation in der Gasphase,
- c) zur Geschwindigkeitsverteilung der Matrixsubstanz und des Analyten,
- d) zum steilen Temperaturanstieg in der Eindringregion während des Laserpulses,
- e) zum steilen Druckanstieg in der Matrix (*pressure pulse*),
- f) zum Einsetzen des Desorptionsprozesses in Abhängigkeit der Laserleistungsdichte.

In einem Zeitraum von 15 ps werden bei weniger als einem Fünftel der Moleküle im Desorptionsvolumen eine hohe kinetische Energie von rund 1,8 eV im „inneren Freiheitsgrad“ deponiert, was zu einer durchschnittlichen Energiedichte von 0,3 eV pro Molekül führt.

Andere Autoren ermitteln eine Energiedichte von 1 eV/Molekül an der Oberfläche der Matrixsubstanz⁵⁵.

Aus der „Defektdichte“ läßt sich der Phasenübergang ermitteln. Die meisten, aber nicht alle im Anregungsvolumen befindlichen Moleküle gehen mit untereinander vergleichbaren

Geschwindigkeiten in die Gasphase über. Die Simulation liefert eine Durchschnittsgeschwindigkeit der sublimierten Moleküle von 200 m/s und die Maximalgeschwindigkeit von nahe der Oberfläche startenden Molekülen liegt bei ca. 700 m/s. Die Eruption von Matrixsubstanz verläuft linear von dem Zeitpunkt an, an welchem der Druck seinen maximalen Wert erreicht hat (bei ca. 20 ps). Es wird eine Kompressionswelle innerhalb der Matrix ausgelöst, die sich mit 2760 m/s hauptsächlich in Richtung der Oberflächennormalen fortpflanzt.

In Bezug auf den Temperaturanstieg muß im Rahmen dieser Betrachtung zwischen einem relativ zum Laserpuls radialen und einem axialen Anteil unterschieden werden. Temperaturanstieg bedeutet eine Erhöhung der durchschnittlichen kinetischen Energie auf die zur Verfügung stehenden Freiheitsgrade, die in diesem Fall mit guter Wahrscheinlichkeit nichtgleichgewichtsverteilt sind.

Der steile Temperaturanstieg koinzidiert mit dem Einsetzen der Defektdichte. Gegen Ende des 15 ps langen Laserpulses erreichen die Moleküle im Anregungsvolumen eine radiale, d.h. quer zum Laserpuls auftretende, „Durchschnittstemperatur“ von 700 K. Ihr axialer Anteil liegt bei 1000 K. Der Laserpuls generiert also für beide Komponenten eine Heizrate von rund 10^{13} K/s. Dieses Ergebnis der Simulation liegt um zwei Zehnerpotenzen über der Heizrate, die bei der Nanosekunden-UV-Laserdesorption organischer Substanz auftreten soll⁵⁶.

Das Modell und die Simulation liefern eine ausgezeichnete, vertiefende Einsicht in die Initialprozesse bei der Laserdesorption organischer Substanzen.

Leider ist es den Autoren aus rechnerischen Gründen nicht möglich, auch die „Spätfolgen“ der Desorption zu modellieren. So muß sich das Modell auf die ersten 100 ps aller ablaufenden Prozesse beschränken. Zudem werden in der MALDI-Massenspektrometrie hauptsächlich Nanosekunden-Laser eingesetzt. Bei solchen im Vergleich zu einem 15 ps-Puls langen Wechselwirkungszeiten komplizieren sich die Verhältnisse wahrscheinlich dramatisch. Zhigilei et al. erwähnen, daß aufgrund der zweidimensionalen Modellierung die Eindringtiefe des Laserpulses im Vergleich zum typischen MALDI-Experiment unterbewertet wird.

Unberücksichtigt bleiben auch Fragen des Lasereinstrahlungswinkels gegenüber der Oberflächennormalen, die im Hinblick auf die Absorption des Lichtes wesentlich sind, weil mit zunehmend flach werdendem Einfallswinkel der Anteil elastisch gestreuten Lichts stark zunimmt (Rayleigh-Streuung).

Zu untersuchen bleiben Fragen der Mehrfachreflexion und -absorption, d.h. mehrfache Reflexionen von Laserlicht zwischen Probeträger und der vakuumseitigen Kristalloberfläche.

Die Dissipation elektronischer Energie in die Schwingungsfreiheitsgrade ist nicht der einzige zu berücksichtigende Prozeß. Emission aus angeregten Zuständen ist, sofern sie mit Relaxationsprozessen konkurrieren kann, für das Molekül eine weitere Möglichkeit, Photoenergie wieder abzugeben.

Die in der Computersimulation nach dem *breathing model* errechneten Initialgeschwindigkeiten der sublimierten Ionen werden durch einen experimentellen Beitrag von Glückmann⁵⁷ in ihrer Größenordnung bestätigt. Bei der experimentellen Bestimmung solcher Größen gehen allerdings die Rahmenbedingungen des Versuchs ein: So sind die Startgeschwindigkeiten von Analytionen, wie z.B. [Mellitin+H]⁺, das aus gepreßtem 2,5-DHB-Pellets mit 120 m/s bis 150 m/s desorbiert wird, deutlich geringer als die v_0 -Werte bei der typischen *dried droplet*-Präparation ($v_0 \sim 580$ m/s, Matrix 2,5-DHB). Im allgemeinen werden die Initialgeschwindigkeiten der durch die Desorption gebildeten primären Ionen eher als zu klein eingeschätzt, weil sie durch die dichte Gaswolke oberhalb der Probenoberfläche beschleunigt werden und dabei viele Stöße erfahren.

Das Modell kann allerdings nicht erklären, warum derselbe Analyt aus verschiedenen Matrixsubstanzen mit differierenden Initialgeschwindigkeiten desorbiert.

Clott⁵⁸ et al. haben die Kompressionswirkungen von NIR-Picosekunden-Laserpulsen auf Anthracen-Folien experimentell untersucht. Dieser Arbeit ist zu entnehmen, daß ein infraroter Laserpuls eine starke Kompressionswelle in organischen Kristalliten erzeugt.

Solche Kompressionen lassen sich mit Hilfe kohärenter Raman-Streuung indirekt beobachten. Eine Raman-aktive Bande verschiebt sich in Abhängigkeit der momentanen Materialdichte ins Blaue, wenn die Dichte relativ zum Ausgangswert stark steigt. Aus dem Shift läßt sich nach Kalibrierung der Maximaldruck ermitteln. Findet neben isothermer Kompression zusätzlich thermische Expansion statt, verbreitert sich die verschobene Raman-Bande. Die Autoren haben durch den NIR-Laserbeschuß in Anthracen Maximaldrücke von mehr als 4 GPa bei Temperaturen von 350°C erzeugt. Mit Hilfe der Raman-Streuung ist es den Autoren auch möglich, zwischen reversibler und irreversibler Kompression zu differenzieren; Irreversible Kompression von Anthracen trete bei Laserpulsen mit einer Anstiegsflanke ein, die zeitlich kürzer als 25 ps ist. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Schockwellen in Anthracen ausbreiten, liegen bei ca. 4000 m/s, während die Schallgeschwindigkeit dort etwa 3200 m/s beträgt.

Aus dem Studium der Lumineszenzprozesse sollten sich Daten gewinnen lassen, die zur einer differenzierteren Einsicht in den Desorptionsprozeß führen und die Möglichkeit zur Ableitung von Korrekturfaktoren bieten, die bei der Verbesserung eines solchen Modells helfen können.

Der Ansatz, mit Hilfe laserinduzierter Fluoreszenz-Spektroskopie Informationen über den Matrixplume zu gewinnen, findet sich auch bei Poretzky⁵⁹ et al. Diese Autoren untersuchen den durch 193 nm bzw. 248 nm-Anregung mit hoher Leistung erzeugten Desorptionsplume von 3-Hydroxypicolinsäure mit Hilfe der LIF-Spektroskopie unter Nachanregung mittels eines 308 nm-Excimer-Lasers. Mit einer variabel zeitverzögerten bildgebenden CCD-Anordnung ist es möglich, die räumliche Entwicklung des Plumes zeitabhängig zu photographieren. Es zeigt sich, daß ein auf diese Weise erzeugter Plume hauptsächlich aus Matrix und Matrixfragmenten mit zwei unterschiedlichen Geschwindigkeitskomponenten besteht, nämlich einer schnellen Komponente mit ~1000 m/s aus den Fragmenten und einem langsameren Anteil mit 500 m/s aus intakten 3-HPA-Molekülen.

Poretzky et al. haben auch die Absorptionsspektren von gasförmigem und festem 3-HPA untersucht und ermitteln für die feste Phase ein Absorptionsmaximum von ca. 315 nm mit einer Rotverschiebung gegenüber der Gasphase von ca. 15 nm.

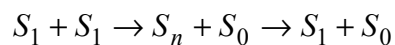
Das Gasphasen-Absorptionsspektrum koinzidiert gut mit dem UV-VIS-Spektrum von 3-HPA in wäßriger Lösung und weist eine Rotverschiebung von 10 nm auf.

In einer weiteren Publikation derselben Autoren⁶⁰ wird das LIF-Imaging des Plumes auf ein Matrix-Analyt-Gemisch ausgeweitet. Ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiertes Protein zeigt bei der Desorption aus 3-HPA-Matrix eine nicht-Gauss-förmige radiale Dichteverteilung. Die axialen Geschwindigkeitsverteilungen in Richtung der Oberflächennormalen sind für die Matrix und für das Protein vergleichbar. Im Gegensatz dazu steht die Geschwindigkeitsverteilung in radialer Richtung, die im Falle des Analyten sehr viel schmaler ist.

Ehring und Sundqvist⁶¹ haben in ihrer Arbeit 1995 die Festkörper-Lumineszenzspektren einiger MALDI-Matrices (337 nm-Anregung mit einem Stickstofflaser) mit deren Absorptionsspektren in Lösung verglichen. Alle untersuchten Matrices mit Ausnahme von

2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure (HABA)ⁱⁱⁱ zeigen breite Emissionsbanden ohne signifikante Feinstruktur.

Die spektroskopischen Untersuchungen an 2,5-DHB und Ferulasäure bei unterschiedlichen Temperaturen erlauben den Autoren, auf die Quantenausbeute an Festkörperlumineszenz zu schließen, die bei beiden Matrices an der Schwelle der Ionenproduktion bei kleiner 20% liegt. Nur ein geringer Teil der eingestrahnten Laserenergie würde in Form von Lumineszenz wieder emittiert. Ehring et al. postulieren, daß das Quenching der Lumineszenz wahrscheinlich durch die Energieaufwendungen für den Phasenübergang und durch $S_1 \leftrightarrow S_1$ Annihilationsprozesse erfolgt und daß die elektronisch angeregten Zustände aufgrund ihrer Mobilität als Excitonen miteinander zu wechselwirken vermögen.



Sie gründen diese Behauptung auf der Beobachtung, daß bei tiefen Temperaturen (77 K) die Excitonen eine höhere Lebenszeit aufweisen, d.h. eine Wechselwirkung wahrscheinlicher ist. Für 2,5-DHB und Ferulasäure werden weder verzögerte Fluoreszenz noch Phosphoreszenz detektiert, allerdings emittiere 3-HPA noch 100 μ s nach dem Ende des Desorptionslaserpulses noch Photonen. Der Bestimmung der Lebensdauer dieses zeitverzögerten Fluoreszenzsignals sei aber aufgrund schwacher Signalintensität nicht möglich.

3.1.2 Die Desorptionswolke

Moleküldynamische Simulationen bestätigen die aus den Massenspektren gezogenen Rückschlüsse, daß die UV-MALDI-Desorptionswolke durch eine äußerst schnelle, fast explosionsartige Expansion aus der kondensierten festen Phase in die Gasphase entsteht.

Neben einzelnen Matrix- und Analytmolekülen sowie Matrixfragmenten ionischer und neutraler Art werden heterogene und homogene Cluster und Aggregate desorbiert. Matrixionen und –radikalkationen ionisieren im *plume* die Analytmoleküle.

ⁱⁱⁱ HABA zeigt bei niedriger Laserleistung keine Fluoreszenz. Bei höheren Leistungen lassen sich schwache Emissionen detektieren, die wahrscheinlich von Fragmenten stammen.

Weniger als 0,01% der Menge der desorbierten Substanz liegt in der Wolke in ionischer Form vor⁶². Durch den Potentialgradienten werden diese Ionen durch die überdichte Gaswolke hindurch beschleunigt und können dabei Reaktionen eingehen.

Die Dichte des *plume* hundert Nanosekunden nach dem Desorptionslaserpuls beträgt noch einige Prozent der Festkörperdichte⁶³.

Die durch den Desorptionslaserschuss erzeugten Neutralen und Ionen propagieren mit einer Eigengeschwindigkeit in das Vakuum. Die meisten Autoren ermitteln für Matrixionen Startgeschwindigkeiten von 200 m/s bis 1500 m/s. Analytmoleküle sind trotz ihrer meist sehr viel größeren Masse kaum langsamer. Ihre Geschwindigkeit liegt ca. 200 m/s unter der der Matrixmoleküle⁶⁴.

Im Hinblick auf die Geschwindigkeitsverteilung muß zwischen dem axialen, d.h. dem Anteil in der Oberflächennormalen und dem dazu radialen Anteil unterschieden werden. Während Matrix und Analyt in axialer Richtung vergleichbare Geschwindigkeiten aufweisen, sind sie in radialer Richtung deutlich unterschiedlich⁶⁰. Die axiale Geschwindigkeitsverteilung des Analyten zeigt kein Gauss-Profil.

Im Gegensatz dazu ermitteln Glückmann⁶⁵ et al. eine nahezu symmetrische Verteilung der Initialgeschwindigkeiten für verschiedene Analytsubstanzen, die aus DHB desorbiert worden sind. Die Geschwindigkeitsverteilung der desorbierten Substanz folge einer \cos^n -Verteilung, wobei n zwischen 0 und 2,5 liege. Die Verteilung bleibe vom Einfallswinkel des Lasers unbeeinflusst.

Die explosive Freisetzung von Substanz aus der kondensierten Phase kann als jet-artige Expansion aufgefaßt werden, bei der durch den Phasenübergang die inneren Freiheitsgrade leicht gekühlt werden. Dabei bleibt die innere Energie der großen Analytmoleküle relativ hoch (500 K)⁶⁶, weil sie nicht so effizient gekühlt werden wie kleine Moleküle.

Matrixmoleküle verteilen sich „isotrop“ im Gasvolumen oberhalb der Matrixoberfläche. Die Dichteverteilung der Analytmoleküle ist enger.

Die primären Ionen werden also in einem moderat warmen, relativ dichten Bad aus Neutralen und Clustern erzeugt und gehen Stöße ein, bevor sie in die feldfreie Region des Massenspektrometers extrahiert werden. Infolge der Stöße reagieren die primären Ionen mit anderen Spezies in der Desorptionswolke und generieren sekundäre Ionen, so daß die im

Massenspektrum detektierten Ionen andere sein können als die primären. Die Ionisierung im *plume* geschieht über Protonen- sowie Elektronentransfer- und Kationisierungsreaktionen.

3.2 Mechanismen der Ionenerzeugung

Im Gegensatz zur Elektronenstoß- oder zur Multiphotonen-Ionisation, bei denen durch Elektronenverlust hauptsächlich Radikalkationen $M^{+\cdot}$, die sog. *odd electron ions*^{iv} der Probesubstanzen generiert werden, weisen die MALDI-Massenspektren zumeist protonierte Analytationen $[A+H]^+$ oder Alkalimetalladdukt-Ionen wie z.B. $[A+Na]^+$ auf. Die Bildung der Analytationen erfolgt also nicht einfach durch Verlust von Elektronen sondern über Protonenübertragung durch die Matrix oder infolge Adduktbildung mit Alkali-, Erdalkali- oder Schwermetallionen.

Zusätzlich zu den Analytationen treten in den MALDI-Massenspektren Signale von Matrixfragment-Ionen, homogenen Matrixclustern, protonierten Matrixionen und auch Radikalkationen der Matrix auf.

Zur Erklärung dieser Phänomene werden in der Fachliteratur modellhaft einige unterschiedliche Mechanismen der Ionenerzeugung diskutiert. Die teilweise kontroversen Diskussionen zeugen davon, daß die physikalisch-chemischen Grundlagen der Ionenbildung nach wie vor nicht völlig verstanden sind.

Bei der Diskussion der Ionisationsprozesse ist es zweckmäßig, zwischen der Generierung primärer Ionen und den durch die primären erzeugten sekundären Ionen, z.B. des Analyten zu differenzieren.

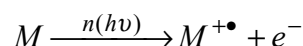
^{iv} *Even electron ions*, d.h. Ionen mit geschlossener Valenzschale, fragmentieren im Gegensatz zu den *odd electron ions* (Ionen mit offener Valenzschale) zumeist unter Bildung neuer *even electron*-Ionen und von Neutralen.

3.2.1 Primäre Ionen

Im Falle positiver Beschleunigungspotentiale werden Massenspektren positiver Ionen aquiriert. Massenspektren negativer Ionen sind genauso aussagekräftig wie die der umgekehrt komplementär geladenen Spezies, jedoch werden die meisten Flugzeitmassenspektrometer im positiven Modus betrieben.

Im Massenspektrum positiver Matrixionen werden hauptsächlich protonierte bzw. kationisierte Molekülkationen $[M+H]^+$ bzw. $[M+X]^+$, Fragmentionen $[M-Y]^+$ und zum Teil auch Radikalkationen $M^{\bullet+}$ detektiert. Die Erzeugung von Ionen in der Gasphase ist ein endothermer Vorgang, weil eine Bindung gebrochen und zur Trennung der Ionen die Coulomb-Anziehungskraft überwunden werden muß.

Bei Überlegungen im Zusammenhang mit durch Laserstrahlung desorbierter und ionisierter organischer Materie drängt sich die Vermutung auf, daß Matrixmoleküle durch Multiphotonenionisation nach folgendem Schema ionisiert würden:



Über eine längere Zeit ist dieser Mechanismus für die Generierung primärer Matrixionen verantwortlich gehalten worden, nach dem die Bildung von Matrixradikalkationen den Initialschritt aller ablaufenden Ionisierungsprozesse bildet⁶⁷.

Dahinter steht die Frage, ob ein Matrixmolekül infolge Zweiphotonenionisation durch den Desorptionslaser ionisierbar ist, denn ein Dreiphotonenionisationsprozeß ist aufgrund der in der MALDI verwendeten Laserleistungsdichten unwahrscheinlich.

Typische in der UV-MALDI eingesetzte Laser sind der Stickstoff- (337 nm) und der Nd-YAG-Laser (355 nm). Ein Stickstofflaser liefert pro Photon 3,68 eV Energie, während ein YAG-Laser 3,49 eV zur Verfügung stellt.

Für einige der Matrixsubstanzen sind die Ionisationsgrenzen aus REMPI (*Resonant Multi Photon Ionisation*) Experimenten im Molekularstrahl bekannt.

Die Ionisationsgrenze von 2,5-Dihydroxybenzoesäure liegt allerdings bei 8,05 eV⁶⁸ und kann daher durch Aufnahme von zwei Laserphotonen dieser Energien nicht überwunden werden, sofern in der Gasphase über dem Probenträger nicht Prozesse ablaufen, die das Ionisationspotential der Matrixsubstanz senken. Die für 2,5-DHB publizierte Ionisationsgrenze ist nur für die Gasphase aussagekräftig. Nach wie vor existieren keine Ansätze, Ionisationspotentiale von Matrixsubstanzen im Festkörper zu bestimmen.

Für die meisten UV-MALDI-Matrices wird erwartet, daß sie sich mit Quantenenergien in der Höhe von 9-10 eV ionisieren lassen.

So ist das Ionisationspotential des Dimeren von 2,5-DHB mit 7,93 eV ein wenig geringer als das des freien Moleküls. Daraus läßt sich folgern, daß sich durch homogene oder heterogene Clusterbildung die Ionisationsschwelle eines Matrixmoleküls möglicherweise senkt.

Jedoch zeigen die Untersuchungen von Meffert¹⁶, daß die mit Nanosekunden-Multiphotonenionisation bei 260 nm erhaltenen Massenspektren der Matrixsubstanzen Ferulasäure, Sinapinsäure und 2,5-Dihydroxybenzoesäure keine homogenen Matrixcluster ausweisen. Diese Experimente zur photochemischen Reaktivität sind durch Laserdesorption in einen Überschallgasstrahl durchgeführt worden. Da in einem solchen Molekularstrahl im Gegensatz zum MALDI-Desorptionsplume rotatorische und vibratorische Freiheitsgrade stark gekühlt werden, sollte, sofern die Matrixmoleküle aggregieren, gerade hier Clusterbildung beobachtet werden.

Dagegen erzeugt der Desorptionslaserpuls im MALDI-Experiment eine über alle zur Verfügung stehenden Freiheitsgrade hohe Anregung der Matrixmoleküle, die einer Clusterbildung entgegenwirkt.

Die Hauptreaktion der Nanosekunden-Multiphotonenionisation der drei oben genannten Matrices bildet die Fragmentierung durch Decarboxylierung.

Homogene Matrixcluster lassen sich durch Multiphotonenionisation mit Hilfe zeitlich deutlich kürzerer Laserpulse detektieren. Mit 500 fs-UV-Laserpulsen wird beispielsweise von Ferulasäure im Massenspektrum noch der tetramere homogene Cluster detektiert, wobei das Molekülion das intensivste Signal darstellt. Des weiteren werden mit den kürzeren Pulsen im Vergleich mit der ns-MUPI weniger Fragmentationen generiert, was darauf hindeutet, daß die angeregten Zwischenzustände der untersuchten MALDI-Matrixverbindungen nur geringe Lebensdauern aufweisen.

Ein Zweiphotonenprozeß zur Ionisierung der Matrixsubstanz mit einem UV-Nanosekundenlaser erforderte aber gerade eine große Lebensdauer des intermediären angeregten Zustandes.

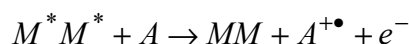
In diesem Zusammenhang können Untersuchungen zur Lebensdauer der angeregten Zustände, die über Lumineszenzspektroskopie zugänglich sind, wertvolle Beiträge zur Klärung der Phänomene leisten, denn die Emission aus den angeregten Zuständen charakterisiert selbige (vergl. Kapitel 5.2).

Diese neueren Erkenntnisse lassen einige der noch 1995 publizierten Ionisierungsmechanismen⁶⁹ unter Beteiligung initial gebildeter Molekül-Radikalkationen als nicht mehr so wahrscheinlich erscheinen, weil die Ionisationspotentiale hoch und die Lebensdauern der Übergangszustände klein sind.

Wenn auch direkte Multiphotonenionisation zur Bildung primärer Ionen der Matrixsubstanz unwahrscheinlich erscheint, so spielen doch elektronisch angeregte Zustände eine wichtige Rolle in der UV-MALDI.

Dabei lassen sich die bei der Bildung primärer Ionen ablaufenden elektronischen Zustandsänderungen zweckmäßig in Prozesse untergliedern, die im organischen Kristallgitter und solche, die in der Gasphase ablaufen.

Bei der Diskussion über die Verteilung der elektronischen Anregungsenergie in der festen Phase hat sich ein sog. *energy pooling*-Modell^{70,71} entwickelt, das auf einer Multi-Zentren-Vorstellung des Energietransfers nach folgendem Schema beruht:



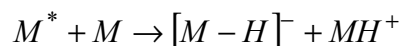
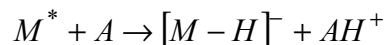
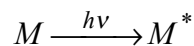
Aus den oben dargestellten Gründen ist davon auszugehen, daß mehr als ein angeregtes Matrixmolekül notwendig ist, um in der MALDI Ionen zu bilden.

In das *energy pooling*-Modell fließt Ehring's Interpretation der Festphasen-Lumineszenzspektren ein, wonach der Desorptionslaserpuls Bildung von Excitonen im Matrixkristall zur Folge hat, welche über Exciton-Annihilation die Energie beispielsweise an den Analyten weiterzugeben und in der Folge zu ionisieren vermögen (vergl. Kapitel 3.1.1).

Zur Verifizierung des Modells können auch die eigenen Untersuchungen an den Lumineszenzerscheinungen während des Desorptionsprozesses beitragen. Hierzu sei auf die Kapitel 5 und 6 verwiesen.

Neben den dargestellten Überlegungen zu den Energietransferprozessen in der festen Phase existieren bereits seit 1987 mechanistische Vorstellung zur Ionengenerierung in der Gasphase⁷².

In der MALDI-Massenspektrometrie liefern protonierte Molekülkationen zumeist die intensivsten Signale; dafür wird ein Protonentransfer aus dem angeregten Zustand eines Matrixmoleküls auf den Analyten nach folgendem Schema verantwortlich gemacht (*excited state proton transfer*):



Nach diesem Schema erhöht die Photoanregung des Matrixmoleküls die Säurestärke im angeregten Zustand und versetzt dadurch das angeregte Molekül in die Lage, neutrale Matrix- oder Analytmoleküle zu ionisieren.

Die Schwäche dieser Vorstellung ist, daß sie keine Aussagen darüber trifft, in welchem Aggregatzustand die Prozesse ablaufen. So ist die Photoanregung der Matrixmoleküle in der festen Phase sicher, unklar aber bleibt, ob sie diese Energie nicht während des Überganges in die Gasphase längst wieder dissipiert hat - eben über die Ionisierung von Matrix oder Analyt bereits in der festen Phase oder in Form von Kristallphononen oder Excitonen. Bereits in der Gasphase befindliche angeregte Matrixmoleküle müssen zur Energieabgabe nach obigem Schema stoßen oder sich in Clustern aggregieren.

Wenn Protonentransfer aus angeregten Zuständen an den Ionisierungsprozessen beteiligt ist, entsteht die Frage, welche der funktionellen Gruppen das saure Proton trägt. Viele der Matrixsubstanzen enthalten Carboxyl- und Hydroxylgruppen, die als Protonenlieferanten in Frage kommen.

Mit den ultravioletten Desorptionslasern erfolgt $\pi\pi^*$ -Anregung des aromatischen π -Elektronensystems. Durch Kopplung des $\pi\pi^*$ -Übergangs mit einem $n\pi^*$ -Übergang kann sich die Acidität der funktionellen Gruppe erhöhen (vergl. Kapitel 3.3).

Einflüsse des *excited state proton transfer* auf die Ionisierungseffizienz lassen sich durch chemische Modifizierung der Matrixsubstanzen eruieren, indem Carboxylgruppen verestert und Hydroxy- in Methoxygruppen überführt werden. Hinsichtlich des Einflusses der Derivatisierung der Hydroxylgruppen widersprechen sich die Resultate einiger Arbeitsgruppen, so daß auf diesem Feld noch Forschung zu leisten ist^{73,74}.

Bei der Ionisierung von Aminosäuren durch Protonentransfer von Matrixmolekülen in heterogenen Clustern hat Meffert¹⁶ am Beispiel der Ferulasäure und des 3,4-Dimethoxybenzoesäuremethylester gezeigt, daß das hydroxylische Proton und nicht das der Carboxylgruppe auf den Analyten übertragen wird. Offensichtlich ist das Hydroxylproton von Ferulasäure im angeregten Zustand saurer als das Carboxylproton.

Einige der MALDI-Matrixsubstanzen lassen sich in die Klasse der ortho-Hydroxycarbonsäuren einordnen (2,5-Dihydroxybenzoesäure, Salicylsäure). Aufgrund der Position der Hydroxygruppe kann diese Substanzklasse zu intramolekularem Protonentransfer befähigt sein, was zu einer „Mobilisierung“ des Protons beitragen und mithin zu einer Erhöhung des Massensignals an protoniertem Analyten führen kann⁷⁵.

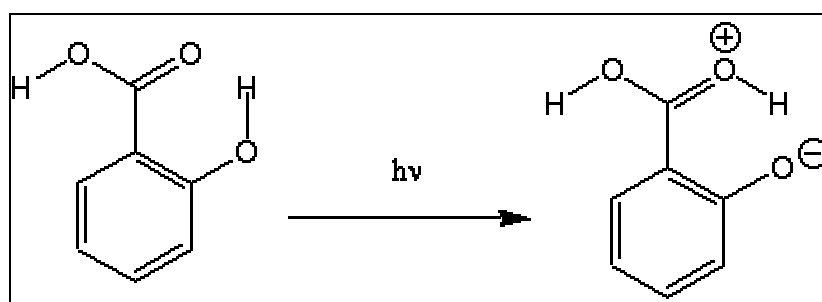
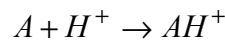


Abbildung 3.1: Intramolekularer Protonentransfer im angeregten Zustand (Salicylsäure)

3.2.1.1 Säure-Base-Eigenschaften primärer Ionen in der Gasphase

Zur der Bewertung der Säure-Base-Eigenschaften der Matrixsubstanzen untereinander und gegenüber dem Analyten eignet sich die Bestimmung der relativen Protonenaffinitäten PA und der Gasphasenbasizitäten GB.



Die Protonenaffinität ist mit der Gasphasenbasizität über die folgende Gleichung verknüpft:

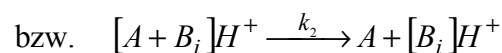
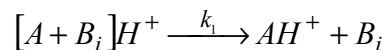
$$GB = PA - T\Delta S^0(H^+)$$

Die thermochemischen Daten werden aus der Dissoziationskinetik von protonierten Heterodimeren vom Typ $[A + B_{\text{ref}}]H^+$ ermittelt. B_{ref} bezeichnet eine Serie von Referenzbasen, deren Protonenaffinitäten bekannt sind.

Weil MALDI-Matrices meist stark polare Substanzen sind, für welche die Bestimmung thermochemischer Daten unter Gleichgewichtsbedingungen schwierig ist, werden Protonenaffinitäten mit der kinetischen Methode von Cooks bestimmt⁷⁶.

Verfolgt wird der Zerfall des Clusters $[A + B_{\text{ref}}]H^+$, nachdem er z.B. über Stoßaktivierung mit einem Edelgas angeregt wurde^{77,78}.

Die kinetische Methode liefert dann relative Ionenaffinitäten nach:



und es folgt:

$$\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right) = -\frac{\Delta(\Delta G^*)}{RT_{\text{eff}}}$$

$$\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right) = \frac{\Delta GB}{RT_{eff}} = \frac{\Delta PA}{RT_{eff}} - \frac{\Delta(\Delta S^0(H^+))}{R}$$

Der natürliche Logarithmus der relativen Ratenkonstanten hängt von der freien Aktivierungsenthalpie der beiden konkurrierenden Prozesse und der effektiven Temperatur ab. Können Rückreaktionen vernachlässigt werden, wird die relative freie Aktivierungsenthalpie umgekehrt gleich der relativen Gasphasenbasizität, also $-\Delta(\Delta G^*) = \Delta GB = GB(A) - GB(B_i)$. Die Ratenkonstante k_1/k_2 wird experimentell durch die Aufzeichnung der relativen Signalintensitäten der Zerfallsprodukte in einem Massenspektrometer bestimmt. Nach Auftragung von $\ln(k_1/k_2)$ gegen $PA(B_i)$ liefert die Steigung der durch lineare Regression der Meßwerte erzeugten Geraden die effektive Temperatur T_{eff} , und der Schnittpunkt mit der Abszisse die Gasphasenbasizität des untersuchten Analyten $GB^{rel}(A)$:

$$\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right) = \left(\frac{PA(A)}{RT_{eff}} - \frac{\Delta(\Delta S^0(H^+))}{R}\right) + \frac{PA(B_i)}{RT_{eff}}$$

$$\frac{GB^{rel}(A)}{RT_{eff}} = \left(\frac{PA(A)}{RT_{eff}} - \frac{\Delta(\Delta S^0(H^+))}{R}\right)$$

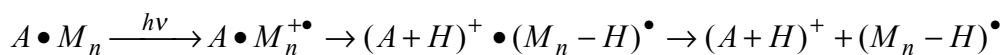
$$GB^{rel}(A) = PA(A) - T_{eff}\Delta(\Delta S^0(H^+))$$

Nach den Untersuchungen von Jorgensen⁷⁹ et al. läßt sich hohe Protonenaffinität einer Matrixsubstanz deutlich mit der Fähigkeit, mehrfach geladene Ionen zu generieren, korrelieren. Nach der Reihenfolge steigender Protonenaffinität geordnet, d.h. nach sinkender Effizienz bei Ionenbildung durch Protonierung, ergibt sich folgendes Bild:

α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure < 3,4-Dihydroxymizimtsäure < 4-Hydroxy-3-methoxy-mizimtsäure < 3,5-Dimethoxy-4-hydroxymizimtsäure << 2-(Hydroxyphenylazo)-benzoesäure

Die Protonenaffinitäten dieser Matrixsubstanzen liegen ca. zwischen 840 kJ/mol (α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure) und 940 kJ/mol (2-(Hydroxyphenylazo)-benzoesäure).

Eine eingehendere Besprechung der relativen thermochemischen Korrelationen in der Gasphase (PA, GB) zwischen Matrixradikalkation einerseits und verschiedenen Aminosäuren als Vertreterinnen der Analyte andererseits findet sich bei Meffert¹⁶. Dort werden Aussagen hinsichtlich der Wahrscheinlichkeiten des dissoziativen Protonentransfers von Matrixradikalkationen auf Aminosäuren in heterogenen Intraclusterreaktionen (Die Cluster werden aus dem Analyten A und mehreren Matrixmolekülen M_n gebildet.) nach dem folgenden Schema getroffen:



Grundlegende Voraussetzung für dissoziativen Protonentransfer ist also:

$$PA(M-H)^\bullet < PA(A)$$

Anhand der durchgeführten Meßreihen mit verschiedenen MALDI-Matrices und Vergleich der Ergebnisse lassen sich folgende Abschätzungen zu den Protonenaffinitäten der [Matrix – H]-Radikale machen:

$$PA(\text{Alanin}) = 215 \text{ kcal/mol} > PA([\text{Sinapinsäure} - H]^\bullet) > PA(\text{Glycin}) \\ > PA([\text{Ferulasäure} - H]^\bullet) > PA([\text{Vanillinsäure} - H]^\bullet) > PA([3,4 - \text{DHB}]^\bullet)$$

3.2.1.2 Thermische und mechanische Ionisationsprozesse

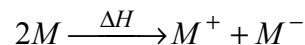
Abschließend sollte noch auf die Möglichkeit thermischer oder mechanischer Ionisierungsprozesse eingegangen werden.

Obwohl durch den UV-Laserbeschuß im angeregten Matrixvolumen extrem hohe Heizraten von 10^{10} bis 10^{13} K/s erreicht werden, sind die Endtemperaturen der desorbierten Spezies gering^{18,53}. So wird von den meisten Autoren die durch den Desorptionslaser ausgelöste Vibrationstemperatur im Kristallgefüge zu 500 K - 1000 K geschätzt^{80,81}. Sie erreicht ihr Maximum, wenn auch der Laserpuls seine maximale Intensität erreicht hat.

Zu diesem Zeitpunkt setzt allerdings der Transfer von Substanz in die Gasphase ein, was zu einer Kühlung des elektronisch und vibratorisch angeregten Kristallgitters führt.

Des Weiteren werden die Kristallschwingungen der Analytsubstanz mit jenen der Matrix equilibriert. Es erfolgt also schneller Energieabtransport über die Kristallphononen.

Die dargelegten Überlegungen legen nahe, daß bei den relativ geringen internen Energien die thermischer Auslösung einer Disproportionierungsreaktion nach dem folgenden Schema unwahrscheinlich erscheint:



Die Ionengenerierung bei der *Matrix Assisted Laser Desorption* ist immer von der Freisetzung größerer Mengen neutraler Spezies begleitet⁵⁶. So beläuft sich der Anteil der erzeugten Ionen bezüglich der Neutralen auf ca. 10^{-4} bis 10^{-5} .

Neutrale werden durch das Beschleunigungspotential zwischen der Repellerelektrode und der ersten Beschleunigungsplatte nicht berührt. Sie propagieren also mit den durch den Desorptionslaserschuss erzeugten Geschwindigkeiten in das Vakuum. Werden diese Neutralen durch einen zweiten Laser kurz oberhalb der Oberfläche ionisiert, läßt sich daraus auf die Geschwindigkeitsverteilung schließen, mit welcher der Desorptionslaserschuss neutrale Moleküle freisetzt.

Der UV-Desorptionslaserpuls evoziert mechanischen Streß innerhalb seiner Eindringtiefe in das kristalline Gefüge. Innerhalb einiger Nanosekunden werden Kristallbindungen gebrochen und Material abgetragen. Gleichzeitig pflanzt sich ein sog. *pressure pulse*, d.h. eine schlagartige Komprimierungswelle mit hoher Geschwindigkeit ungefähr parallel zum Einfallswinkel Lasers im Kristallgefüge fort^{70,18,53}. Die Ionenbildung erfolge auch hier durch Annihilierung der Energie zweier angeregter Zentren.

Die Auswirkungen laserinduzierter Schockwellen auf organische Kristalle erfordern noch weitere Untersuchungen. Dlott et al. haben an Anthracen gezeigt, daß solche Wellen Drücke von mehreren GPa erzeugen können und die Fortpflanzungsgeschwindigkeiten bei 4 km/s liegen (vergl. selbes Kapitel, oben). Über Raman-Streuungsmessungen sind Maximaltemperaturen von nur 350 K bestimmt worden.

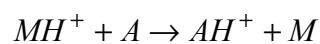
3.2.2 Sekundäre Ionen

Mit zunehmender Einsicht in die im Desorptionsplume ablaufenden physikalischen Prozesse, wie der Geschwindigkeits- oder der Dichteverteilung der unterschiedlichen Spezies, gehen auch die Erkenntnisse zu deren ionisch-chemischen Reaktionen bei der Bildung sekundärer Ionen einher.

In der Desorptionswolke reagieren primäre Matrix-Radikalkationen mit neutralen Matrixmolekülen im Sinne von Matrix-Matrix-Reaktionen und bilden über Protonentransfer protonierte Matrixionen⁸².



Die protonierten Matrixionen werden für die Bildung protonierter Analytionen im Sinne der folgenden sekundären Matrix-Analyt-Reaktion verantwortlich gemacht:

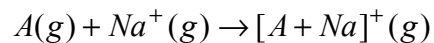


Protonierte Analytionen stellen gewöhnlich die Hauptmassensignale in der MALDI-MS dar. Diese Reaktion wird durch die negative freie Enthalpie getrieben, $\Delta G < 0$. In der Praxis sind die thermodynamischen Daten solcher Gasphasenreaktionen zumeist nicht bekannt. Deshalb werden experimentell die Wärmetönungen ΔH dieser Reaktionen herangezogen und unter Vernachlässigung entropischer Energiebeiträge enthalpische Werte aus Relativmessungen bestimmt. Diese ΔH -Werte lassen sich mit der Protonenaffinität (PA) korrelieren (vergl. Kapitel 3.2.1.1). Eine Zusammenstellung der PA-Werte einiger Matrixsubstanzen sowie weniger Analyten findet sich bei Zenobi et al³³.

Häufig werden in den MALDI-Massenspektren auch Alkaliion-Addukte der Analytsubstanzen detektiert. Diese Natrium und Kalium-Addukte entstehen aus Verunreinigungen der verwendeten Chemikalien mit diesen Salzen.

Es sind zwei verschiedene Mechanismen denkbar, wie es zu solchen Metalladduken kommen kann, und zwar einmal durch eine Präformierung von Ionenpaaren bereits in der Matrix oder zum anderen durch getrennte Desorption unter nachfolgender Adduktbildung in der Gasphase.

Wang¹¹ et al. haben mit einem zwei-Laser-Experiment zeigen können, daß Analytsubstanzen durchaus in der Lage sind, Alkaliionen in der Desorptionswolke einzufangen. Dazu haben die Autoren Natriumionen aus NaI und zeitverzögert dazu Gramacidin S aus 2,5-DHB desorbiert und festgestellt, daß das Signal des Gramacidin S/ Natrium-Addukts in seiner Intensität deutlich zugenommen hat. Das ist nur möglich, wenn die Adduktbildung in der Gasphase nach folgendem Schema geschieht:



In der Massenanalytik von unpolaren synthetischen Polymeren bildet die Adduktion von Metallkationen zuweilen die Hauptreaktion der Ionenbildung. Hier werden der Matrix/ Analytmischung die Salze von vornherein zugesetzt. Beispielsweise eignet sich zur Analytik von Polystyrolen aus der Matrixsubstanz Dithranol der Zusatz von Silbertrifluoracetat. Die Ag⁺-Addukte der einzelnen Oligomere dominieren in diesem Fall deutlich alle anderen Metalladdukte (Na⁺, K⁺). Aufgrund der Coulomb-Abstoßungskräfte werden gewöhnlich auch keine zweifach geladenen Spezies detektiert.

3.3 Theorie der Lumineszenz

Die spontane Emission von Photonen aus einem elektronisch angeregten Zustand eines Moleküls bezeichnet man als Lumineszenz und unterscheidet Fluoreszenz von Phosphoreszenz dadurch, daß der Übergang zwischen Zuständen gleicher ($\Delta S=0$) oder unterschiedlicher Multiplizität ($\Delta S \neq 0$) erfolgt, d.h. spin-erlaubt bzw. spin-verboten ist.

Fluoreszenz organischer Moleküle erfolgt zumeist aus dem energetisch niedrigsten Schwingungsniveau des untersten elektronisch angeregten Singulettzustandes ($S_1^{v=0}$), weil höher schwingungsangeregte Niveaus $v=1, 2, \dots, n$ im Vergleich zur Emission intern schnell relaxieren („*vibration relaxation*“, VR; bzw. „*internal vibration relaxation*“, IVR).

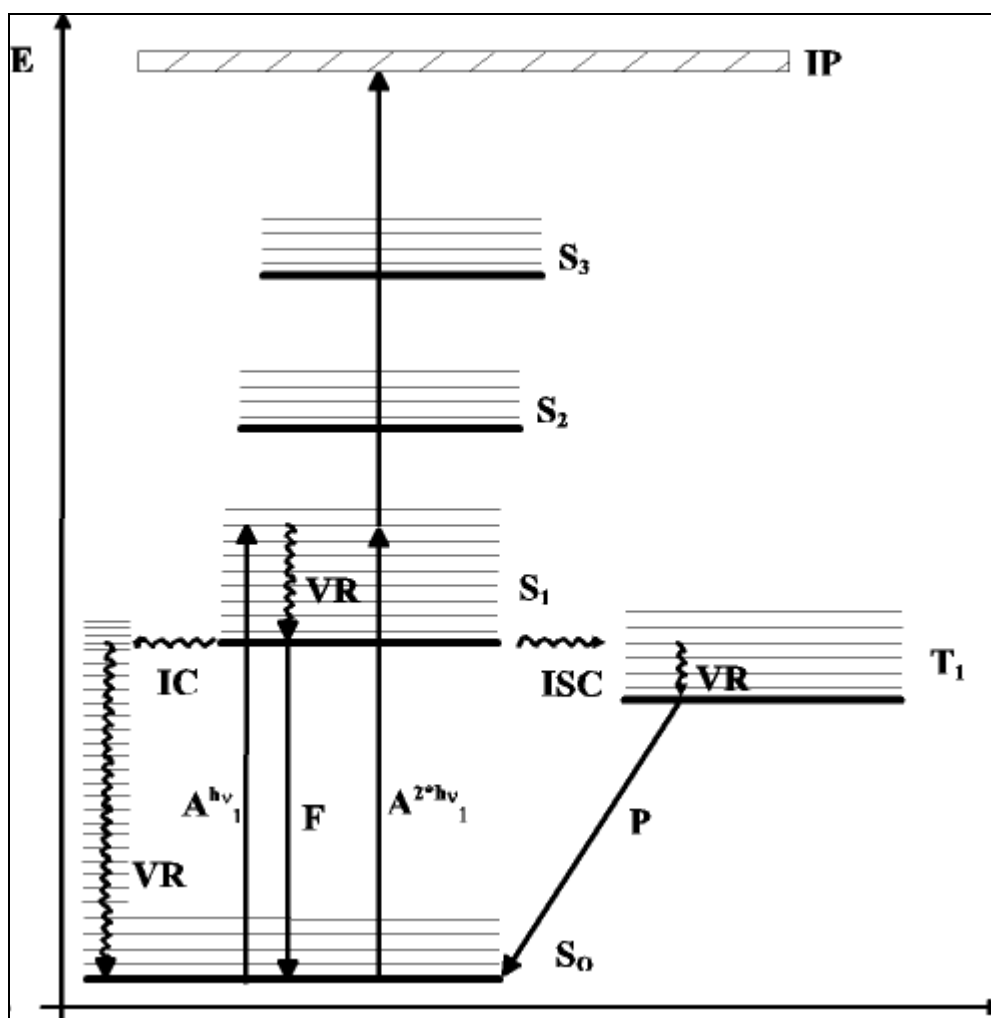


Abbildung 3.2: Jablonski-Diagramm zur Darstellung strahlender und strahlungsloser Photoprozesse

Ein strahlender Übergang gleicher Multiplizität in den elektronischen Grundzustand wird als $S_1^{v=0} \rightarrow S_0$ gekennzeichnet.

Die innere Umwandlung („*internal conversion*“, IC) ist ein strahlungsloser Photoprozeß, der zwischen zwei isoenergetischen Zuständen derselben Multiplizität auftritt (z.B. $S_2 \rightsquigarrow S_1$). Diese Umwandlung ist im Vergleich zum konkurrierenden strahlenden Übergang $S_2 \rightarrow S_0$ schnell. Ein Interkombinationsübergang („*intersystem crossing*“, ISC) ist ein strahlungsloser, ebenfalls isoenergetischer Photoprozeß zwischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität (z.B. $S_1 \rightsquigarrow T_1$).

Für das Phänomen der Phosphoreszenz ist der strahlende Übergang aus einem Triplettzustand in den Singulettgrundzustand verantwortlich ($T_1 \rightarrow S_0$). In organischen Verbindungen wird der unterste Triplettzustand T_1 zumeist durch Interkombinationsübergänge $S_1 \rightsquigarrow T_n \rightsquigarrow T_1$ populiert.

Sowohl innere Umwandlungen als auch Interkombinationsübergänge sind dann wahrscheinlich, wenn die Energiedifferenz zwischen Schwingungsniveaus des elektronisch angeregten Ausgangszustandes und hoch schwingungsangeregten Niveaus des elektronisch tiefer liegenden Zustandes klein ist (z.B. $S_2 \rightsquigarrow S_1$, $S_1 \rightsquigarrow T_1$).

So sind z.B. die Ratenkonstanten von Interkombinationsübergängen von Carbonylfunktionalisierten Verbindungen sehr viel größer als die von Aromaten, weil in ersteren die Energielücke zwischen $S_1 \leftrightarrow T_1$ kleiner ist⁸³. Im allgemeinen sind aufgrund von Spin-Orbit Kopplungsmechanismen $^1n\pi^* \leftrightarrow ^3\pi\pi^*$ und $^1\pi\pi^* \leftrightarrow ^3n\pi^*$ Prozesse schnell, während $^1n\pi^* \leftrightarrow ^3n\pi^*$ und $^1\pi\pi^* \leftrightarrow ^3\pi\pi^*$ Prozesse langsam sind.

Die Lebenszeit τ eines elektronisch angeregten Zustandes ist die Zeit, in der die Intensität der emittierten Strahlung auf den Faktor $1/e$ der maximalen Intensität gesunken ist, sofern keine anderen Deaktivierungsprozesse abgelaufen sind.

Wird eine Probe durch einen Lichtpuls angeregt, der im Vergleich zur Dauer der Lumineszenz kurz ist, so wird die Intensität des emittierten Lichts bei I_0 ein Maximum durchlaufen, um danach exponentiell abzufallen. Aufgrund der Lebenszeiten τ der zugehörigen angeregten Zustände wird die Intensität des Fluoreszenzlichts schneller als die der Phosphoreszenz sinken. Fluoreszenz ist ein schneller Prozeß, der zeitlich im Bereich zwischen 10^{-9} s und 10^{-6} s abläuft, während Phosphoreszenzlebensdauern zwischen 10^{-4} s und 10^2 s anzusiedeln sind.

Die Abhängigkeit der Lumineszenzintensität von der Zeit läßt sich durch ein Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung beschreiben,

$$I_t = I_0 \cdot e^{-k_0 \cdot t}$$

wobei k die Ratenkonstante des strahlenden Prozesses angibt. I_0 ist die Lumineszenzintensität zur Zeit $t=0$, bei der sie ihr Maximum hat. Die mittlere natürliche Lebensdauer τ_0 ist umgekehrt proportional zur Ratenkonstanten.

$$\tau_0 = \frac{1}{k_0}$$

In logarithmierter Form ergibt sich:

$$\ln I_t - \ln I_0 = -\left(\frac{t}{\tau}\right)$$

Die Lebenszeit τ der angeregten Zustände, aus welchen Lumineszenzlicht emittiert wird, läßt sich also aus der Auftragung des Logarithmus der Lumineszenzintensität I_t gegen die Zeit ermitteln.

Da Matrixsubstanzen so gewählt werden, daß sie bei der Desorptionslaserwellenlänge absorbierend sind, ist die durch den UV-Laserschuß in einigen Nanosekunden in die Matrix eingebrachte Energie so hoch, daß Matrixmoleküle in hohe elektronische und Schwingungsniveaus angeregt werden können. Selbst unter der Annahme eines effizienten Wärmeausgleichs (z.B. an den Probenträger aus Stahl) wird es in der kondensierten Phase also Zeitabschnitte während und nach dem Laserschuß geben, in denen die Schwingungsenergie sehr viel größer ist, als es dem thermischen Gleichgewicht entspräche. Zudem wird elektronische Energie durch die strahlungslosen Übergänge der inneren Umwandlung und der Spinumkehr in kinetische Energie umgewandelt. Die beteiligten Moleküle können also als „heiß“ bezeichnet werden, und es ist zu erwarten, daß Lichtemission aus mehreren angeregten Singulett- oder Triplettzuständen erfolgt, sofern selbige nicht effektiv gequenchet werden.

Aufgrund des „fließenden“ Übergangs der festen in Gasphase während der Desorption sowie aufgrund vieler unterschiedlicher photoinduzierter Prozesse, wie der Photodissoziation, Excimerbildung oder Protonenübertragung, sind strahlende Übergänge verschiedener Spezies in den beiden Phasen parallel zueinander bzw. nacheinander möglich. Aus der spektralen Auflösung ließe sich möglicherweise durch den Vergleich mit Literaturdaten auf die lumineszierenden Spezies schließen.

Der *decay* der Lumineszenzintensität kann sich aus den dargestellten Gründen aus mehreren Exponentialfunktionen zusammensetzen. Aus der Lebensdauer der Zustände läßt sich auf Fluoreszenz und Phosphoreszenz folgern.

Im Kapitel 5.2 wird der Desorptionsprozeß mit Hilfe spektraler Informationen von vier chemisch unterschiedlichen Matrixsubstanzen untersucht. 2,5-Dihydroxybenzoesäure⁶⁸ (2,5-DHB) ist die wohl am meisten verbreitete Matrixsubstanz, während 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) in der Literatur⁵⁹ mit Hinblick auf den UV-MALDI-Desorptionsprozeß bereits teilweise untersucht worden ist. Durch das Stickstoffatom im aromatischen System sollten 3-HPA effektivere Interkombinationsübergänge in den Triplettzustand möglich sein, aus dem Phosphoreszenz erfolgen kann.

1,8-Dihydroxy-9[10H]-anthracenon (Dithranol) ist in eigenen Experimenten durch eine ungewöhnlich stark rotverschobene Lumineszenz in Erscheinung getreten, während sowohl 2,5-DHB als auch 3-HPA intensiv im Blauen lumineszieren.

Von der Matrixsubstanz 2,5-Dihydroxybenzoesäure sind keine Emissionsspektren aus der Gasphase bekannt. Ehring und Sundqvist⁶¹ haben die Fluoreszenzlebenszeit von 2,5-DHB in der festen Phase bei 300 K zu 5 ns bestimmt.

Karbach et al.⁶⁸ haben das Fluoreszenz-Anregungsspektrum von im Molekularstrahl gekühltem 2,5-DHB untersucht und für den elektronischen Grundübergang $S_1^{v=0} \leftarrow S_0^{v=0}$ eine Energie von 27957 cm^{-1} (357,69 nm) erhalten. Die aus Zweifarben-Photoionisations-Experimenten ermittelte Ionisationsgrenze von jet-gekühltem 2,5-DHB ist 8,05 eV.

Nach Untersuchungen von Poretzky et al.⁶⁰ zeigt die Matrixsubstanz 3-Hydroxypicolinsäure unter intensiver Laseranregung bei 248 nm eine breite und langlebige blaue Lumineszenz nur aus der festen Phase. Spontane, durch den Desorptionslaserschuß hervorgerufene Lumineszenz aus der expandierenden Gaswolke ist nicht detektiert worden. Durch Nachanregung des *plumes* mit einem zum Desorptionslaser zeitverzögerten 308 nm-XeCl-

Laserpuls kann Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF) ausgelöst werden, um die Dichte- und Geschwindigkeitsverteilung neutraler oder ionischer Spezies innerhalb der Gaswolke untersuchen zu können.

Das Gasphasenabsorptionsspektrum von 3-HPA weist drei breite Banden bei ca. 190 nm, 222 nm und 300 nm auf und ähnelt sehr dem Spektrum in wässriger Lösung. Das Absorptionsspektrum der festen Phase ist gegenüber dem der Gasphase ca. 10 nm rotverschoben.

Im UV-VIS-Spektrum zeigt Dithranol im Bereich der in der MALDI verwendeten Laserwellenlängen hohe Absorptionskoeffizienten. Diese bieten allerdings nur einen groben Anhalt zur Lage der Absorptionsbanden in Festkörper. Allerdings lassen sich über die Berücksichtigung mesomerer und induktiver Effekte der Hydroxyfunktionen Rückschlüsse auf das Absorptions- und Emissionsverhalten ziehen:

Eine Hydroxyfunktion stellt aufgrund ihrer elektronenschiebenden Eigenschaften eine auxochrome Gruppe dar, die über ihre nichtbindenden freien Elektronenpaare am Sauerstoff eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsbanden gegenüber dem unsubstituierten aromatischen Grundgerüst erzeugt.

Von der Matrixsubstanz Dithranol sind aus der Literatur keine Daten zur Gasphasenlumineszenz zu entnehmen. Das Maximum der Festkörperfluoreszenz haben Ehring⁶¹ et al. bei 594 nm bestimmt.

Solche Informationen sind für spektroskopische Experimente in der Gasphase, z.B. zur effizienten, selektiven Populierung von Singulett- oder Triplettzuständen notwendig, die im Rahmen von Nachanregungsexperimenten zur Charakterisierung der Desorptionswolke nützlich sind. Umfangreiche Untersuchungen existieren zu Gasphasenspektren annelierter Aromaten wie dem Anthracen als dem aromatischen Grundgerüst des Dithranols sowie einigen Sauerstoff- und Halogen-funktionalisierten Derivaten.

So zeigt das chemisch verwandte Anthrachinon aus der Matrix von Ether-Isopentan-Ethanol bei 77 K Festkörperphosphoreszenz aus Triplettzuständen vom $n\pi^*$ -Charakter mit einer Lebenszeit von über zwei Millisekunden⁸⁴. Anthracen bildet unter den Bedingungen der *supersonic jet expansion* Dimere, die mit Laser-induzierter-Fluoreszenzspektroskopie (LIF) untersucht werden können⁸⁵.

Lambert et al.⁸⁶ haben den elektronischen Grundübergang $S_1^{v=0} \leftarrow S_0^{v=0}$ von Anthracen im Molekularstrahl zu 27695 cm^{-1} (361,08 nm) bestimmt. Der Fluoreszenzübergang aus einer festen n-Heptan-Matrix (12 K) ist bei 381,29 nm lokalisiert, also um rund 20nm gegenüber der Anregung in der Gasphase rotverschoben⁸⁷.

3.3.1 Festkörperlumineszenz

Die MALDI-Matrixsubstanzen lumineszieren aus der festen Phase. Bei der üblichen *dried droplet* Präparation aus dem Lösungsmittel bilden sie polykristalline organische Kristalle.

Durch die Einstrahlung von Infrarot- oder Ultraviolett-Photonen ist es möglich, den Ladungsträgern in organischen Kristallen im Vergleich zur thermischen Energie kT wesentlich größere Energiebeträge $h\nu$ zuzuführen, ohne gleichzeitig das Gitter in einem größeren Bereich als dem des fokussierten Laserspots aufzuheizen.

Um beispielsweise strukturelle Informationen über im Kristallgitter der Matrixsubstanz isolierte Moleküle (Analyt) zu gewinnen, bieten sich zwei analytische Techniken an, nämlich Laser-induzierte Fluoreszenz-Spektroskopie (LIF) und Raman- bzw. Resonante Raman-Spektroskopie.

Bei der LIF-Spektroskopie werden nach der Anregung mit einer UV-Laserlinie durch Aufzeichnung des Lumineszenzspektrums die angeregten Zustände des Moleküls charakterisiert. Alternativ läßt sich Fluoreszenzlicht als Funktion der Frequenz des anregenden Laserlichts sammeln, sofern ein durchstimmbares Lasersystem zur Verfügung steht (Farbstofflaser, OPO).

Beim Durchtritt von Laserlicht durch Materie tritt neben der Intensitätsabnahme in Vorwärtsrichtung (Absorption) auch seitliche Ablenkung (Streuung) auf. Obwohl die Matrixsubstanz bei der Laserwellenlänge ν_0 gut absorbiert, wird der größte Teil des Laserlichts ohne Änderung der Wellenlänge elastisch gestreut (Rayleigh-Streuung).

Dennoch kann durch inelastische Wechselwirkung von Photonen mit Ladungsträgern im Kristall Lichtenergie aufgenommen werden, wobei fiktive Gitterschwingungsteilchen, die Phononen erzeugt werden. Das auf diese Weise inelastisch gestreute Licht ist um den Betrag ν_v gegenüber der Laserlinie ν_0 frequenzverschoben. Bei einer Anregung durch ultraviolettes

Laserlicht unter Beteiligung elektronisch angeregter Zustände wird von resonanter Raman-Streuung gesprochen.

Aufgrund der beteiligten angeregten Zustände kann dem resonanten Raman-Spektrum das Fluoreszenzspektrum überlagert sein. Die Fluoreszenzregion ist spektral gegenüber der UV-Anregungswellenlänge gemeinhin deutlich weiter rotverschoben als die Raman-Region. Das Raman-Spektrum liegt innerhalb von 20 Nanometern oberhalb der UV-Anregungswellenlänge⁸⁸.

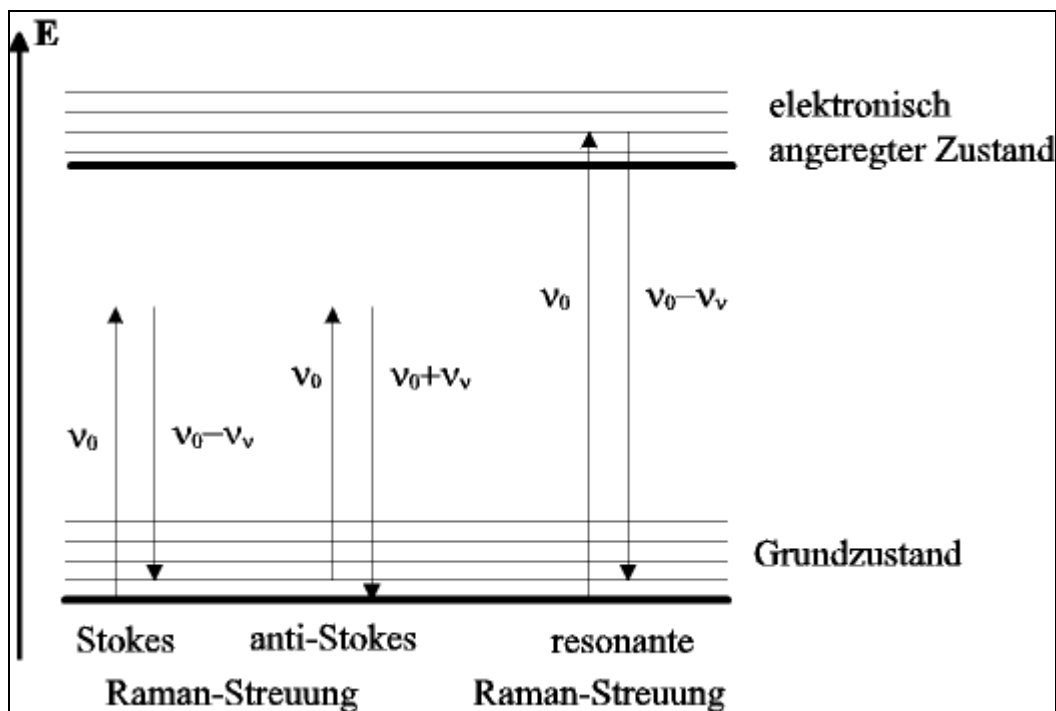


Abbildung 3.3: Graphische Darstellung der Resonanten Raman-Streuung

Bei der Wechselwirkung von Photonen mit Phononen kann es zur Erzeugung eines Phonons kommen (Stokes'sche Wechselwirkung) oder zu seiner Vernichtung (Absorption) (Anti-Stokes'sche Wechselwirkung). Der Wechselwirkungsprozeß verläuft über Zwischenschritte: In nichtpolaren Festkörpern wird die Stokes'sche Komponente der Raman-Streuung modellhaft über die Bildung und Rekombination von Elektron-Loch-Paaren erklärt.

Die inelastische Streuung von Licht unter Mitwirkung von Phononen wird als Raman-Streuung bezeichnet, wenn die Phononen dem optischen Zweig angehören, und als Brillouin-Streuung, wenn die Phononen dem akustischen Zweig zuzuordnen sind.

Der Ramaneffekt ist mit dem Tensor der Polarisierbarkeit verknüpft. Für Festkörper ergibt er sich aus der Entwicklung des Tensors nach den Potenzen der Gitterschwingungen.

Im Gegensatz zu den mit Infrarot- und Ramanspektroskopischen Experimenten hochauflösbaren Rotations- und Vibrationsstrukturen in der Gasphase ergibt sich für die kondensierte feste Phase eine andere Situation: Bei Matrix-isolierten Molekülen kollabiert die Rotationsstruktur in eine einzige Bande, der sogenannten *zero-phonon line* (ZPL), welche von einer breiten Phononenbande begleitet ist⁸⁹, die den Abtransport von Teilen der Schwingungsanregungsenergie durch das Kristallgitter anzeigt (delokalisierte Phononenmodi). Solche Effekte sind bisher für zwei- oder dreiatomige Moleküle in gefrorenen Edelgasmatrices untersucht worden.

Im Falle der *Matrix Assisted Laser Desorption* muß berücksichtigt werden, daß die elektronische Anregungsenergie in delokalisierten Zuständen über das Kristallgitter verteilt werden können („Excitonenbildung“)^{v,90}.

Small⁹¹ untersucht die Tieftemperatur-Phononenstruktur der Fluoreszenz von Anthracen in einer p-Terphenyl-Matrix bei 4,2K. Das Fluoreszenzspektrum dieses anellierten Aromaten weist eine relativ gute Vibrationsauflösung auf. Im Vergleich zum Absorptionsspektrum unter gleichen Bedingungen kann Small aus den relativen Peakhöhen auf Reabsorption einiger Banden schließen.

Da in der MALDI-MS normalerweise nicht mit stark gekühlten Proben gearbeitet wird, können auch keine vibratorisch hochaufgelösten LIF-Spektren erwartet werden.

^v Die physikalische Definition von Excitonen entstammt der Theorie der Halbleiter. Danach ist ein Exciton ein Elektron-Loch-Paar, das sich frei im Kristall bewegen kann, aber in weniger als einer Nanosekunde wieder rekombiniert.

4 Experimentelles

Diese experimentelle Arbeit stützt sich auf ein im Arbeitskreis entwickeltes und gebautes lineares Flugzeitmassenspektrometer. Im Hinblick auf seine Funktionalität als Massenspektrometer ist zu keinem Zeitpunkt die Geometrie der Ionenquelle für die beabsichtigten spektroskopischen Experimente wesentlich verändert worden; auch deshalb, um jederzeit die Lumineszenzdaten mit den Massenspektren vergleichen zu können.

Diese Vorgehensweise bereitet allerdings nicht unwesentliche Schwierigkeiten bei der Spektroskopie: So ist der Desorptionsort immer mindestens 75 mm vom Beobachtungsfenster entfernt, und die abbildende Optik muß darauf abgestimmt werden. Für die Laser-induzierten Fluoreszenzexperimente ist daher eine zweidimensional verschiebbare, vakuumdichte Anordnung realisiert worden, mit deren Hilfe direkt am Entstehungsort der Lumineszenz mit einem Lichtwellenleiter spektroskopiert werden kann.

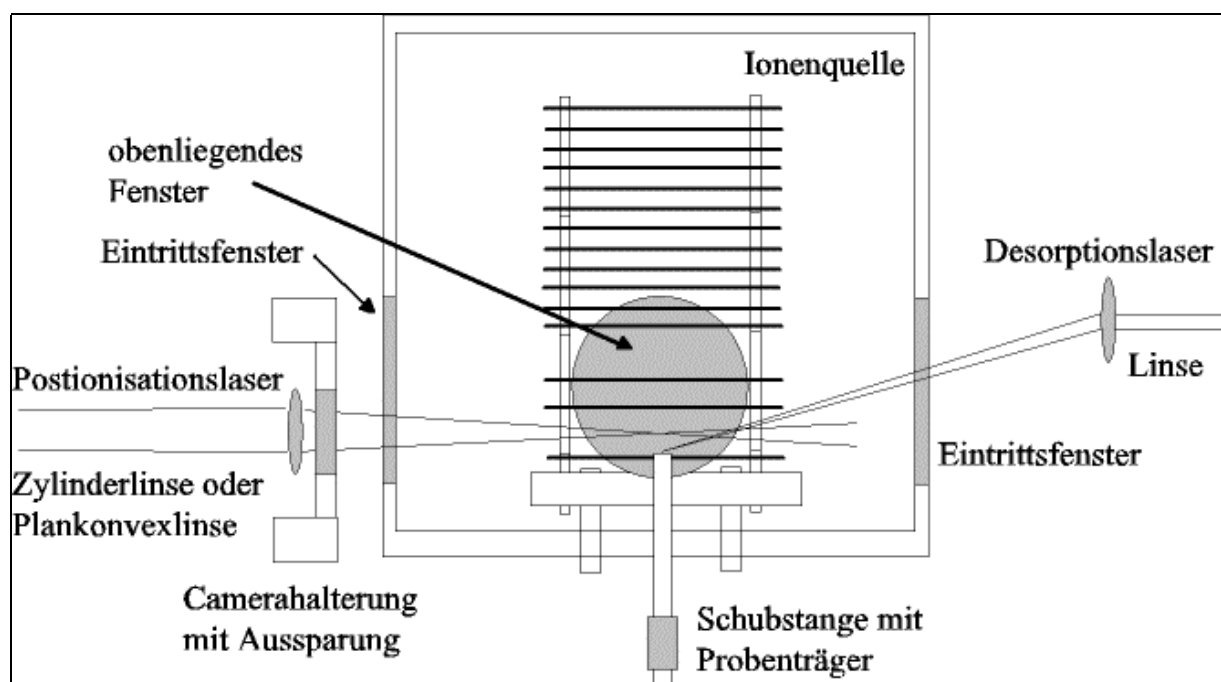


Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau der Ionenquelle; Strahlengänge der Laser

Durch das in Flugrichtung der Ionen rechte Fenster in der Ionenquelle tritt der Desorptionslaser ein, durch das obenliegende Fenster kann mit einer Camera photographiert

oder alternativ der Lichtwellenleiter durchgeführt werden, das linke Fenster dient der Einkopplung eines zweiten Fragmentierungs- bzw. Nachanregungslasers, dessen Strahlengang durch eine Bohrung in einer senkrecht stehenden optische Schiene geführt wird, die zur Halterung der Camera dient (vergl. Abbildung 4.1).

4.1 MALDI-Probenpräparation

Die Probenpräparation in der *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* bedarf besonderer Aufmerksamkeit. Genauso wie bei der beinahe empirischen Wahl der Matrixsubstanzen, kann eine nur in Grenzen gültige Richtlinie zur Vorgehensweise bei der Präparation gegeben werden.

Wesentliches Merkmal der MALDI gegenüber einfacher Laserdesorption der zu untersuchenden Substanz bildet die Verwendung einer Hilfssubstanz, der Matrix. Gewöhnlich werden zur Probenpräparation die Matrixsubstanz und der Analyt in einem flüchtigen organischen Lösungsmittel oder in Wasser gelöst und gemeinsam auf dem Probeträger durch Verdunsten des Lösungsmittels auskristallisiert. Bei dieser, als *dried droplet*-Präparation bezeichneten Methode, bildet die Matrix/Analytmischung zumeist ein gemeinsames polykristallines Gefüge aus.

Vielfach kann die Kristallisation durch einen kalten oder zuweilen auch warmen Luftstrom gefördert werden.

Die Ausbildung eines gemeinsamen Kristallgitters ist aber nicht immer unbedingt notwendig, um ein Analytsignal zu erhalten^{10,vi}. Die Matrixsubstanz kann zunächst getrennt vom Analyten auf dem Probeträger auskristallisiert werden. In der Folge läßt sich eine Lösung des Analyten zum Kristallinat hinzugeben, so daß der Festkörper durch das Lösemittel nur teilweise erneut gelöst wird und der Analyt in konzentrierter Form auf dem Matrixkristallinat haftet.

Matrix/Analytgemische lassen sich auch durch Sprayverfahren auf dem Probeträger aufbringen. Hierdurch werden besonders dünne und gleichmäßig verteilte Kristallite gewonnen.

^{vi} Amorphe Proben liefern meist kein MALDI-Massensignal.

Um besonders dicke Schichten der Matrix/Analytgemische zu erzeugen, werden beide Substanzen häufig auch innig vermischt und in einer Presse zu einem Pellet gepreßt. Aus dieser Tablette lassen sich Bereiche ausstechen und auf den Probeträger kleben. Diese so erzeugten dicken Schichten eignen sich besonders für Experimente mit hoher Laserleistung über lange Versuchszeiten, in welchen relativ konstante Signalintensitäten erforderlich sind.

Die Erfahrung bei der Desorption aus Preßlingen zeigt, daß im Tiegel ausgiebig homogenisierte Probengemische aufgrund der hohen Oberfläche gute Signale liefern. Bei dieser Präparationsmethode ist allerdings darauf zu achten, daß der Analyt nicht durch Mechanolyse zerstört wird.

4.1.1 Die MALDI-Matrixsubstanzen

Die Auswahl der Matrixsubstanz geschieht in Abhängigkeit des zu untersuchenden Analyten. Generell eignen sich zur UV-MALDI derivatisierte aromatische Carbonsäuren, anellierte funktionalisierte Aromaten sowie ebensolche Heteroaromaten. Infolge ihrer aromatischen π -Elektronensysteme absorbieren die meisten Matrices relativ gut im nahen ultravioletten Bereich der elektromagnetischen Spektrums, was sie als „Transportvehikel“ für die Analytsubstanz beim Phasenübergang geeignet macht.

Auch das optimale Matrix-zu-Analytverhältnis muß experimentell ermittelt werden⁹². Die Matrixsubstanz wird gewöhnlich gegenüber dem Analyten in mindestens tausendfachem molaren Überschuß vorgelegt.

Einflüsse auf das Massenspektrum über die Ionisierung üben nicht nur der pH-Wert der Matrixsubstanz¹⁹ (in Lösung), sondern vor allem ihre thermodynamischen Eigenschaften in der Gasphase, wie die Protonenaffinität (PA) und die Gasphasenbasizität (GB)⁹³ aus.

Eine Matrixsubstanz sollte über ein acides Proton verfügen, das während der Desorption auf den Analyten übertragbar ist. Das acide Proton muß nicht unbedingt aus einer Carboxylgruppe stammen; nach Untersuchungen von Meffert¹⁶ werden von Hydroxyfunktionalisierten aromatischen Carbonsäuren auch die Protonen der Hydroxylgruppe auf den Analyten übertragen.

Als UV-MALDI Matrices eignen sich beispielsweise aza-funktionalisierte aromatische Carbonsäuren wie z.B. 2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure gut zur Analyse von synthetischen Polymeren⁹⁴. 2,6-Dihydroxyacetophenon wird als Matrix für fragile Peptide und kleine Proteine eingesetzt⁹⁵, während sich eine Mischung aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 1-Hydroxyisochinolin in der Massenspektrometrie von Oligosacchariden Verwendung findet⁹⁶. Für die Analyse von Peptiden hat sich auch die Matrix α -Cyano-4-hydroxymizinsäure als geeignet erwiesen⁹⁷.

Jedoch hat sich gezeigt, daß einige Matrixsubstanzen besonders häufig in der MALDI-Massenspektrometrie Verwendung finden. Besonders 2,5-Dihydroxybenzoesäure darf als fast universell einsetzbare Matrix gelten.

Für die Lumineszenzuntersuchungen sind im Rahmen dieser Arbeit vier repräsentative Vertreter der in der MALDI eingesetzten Substanzklassen gewählt worden, deren Strukturformeln in der folgenden Abbildung 4.2 dargestellt sind.

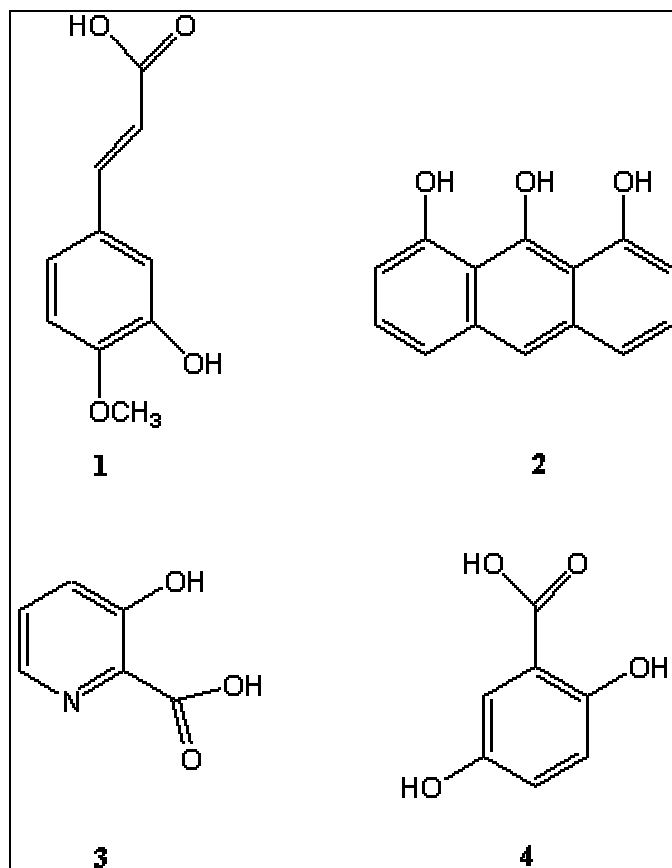


Abbildung 4.2: Strukturformeln der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten MALDI-Matrices (1: Ferulasäure; 2: Dithranol; 3: 3-Hydroxypicolinsäure; 4: 2,5-Dihydroxybenzoesäure)

Als Vertreterin für Matrices mit einer längeren Seitenkette, mit neben dem aromatischen System zusätzlicher π -Bindung und einer Methoxyfunktion steht 4-Methoxy-3-hydroxyzimtsäure (Ferulasäure). Der anellierte Aromat Dithranol (1,8-Dihydroxy-9[10H]-anthracenon) eignet sich ausgezeichnet zur Analytik unpolarer synthetischer Polymere, wenn ein kationisierendes Agens (z.B. Silbertrifluoracetat) beigemischt ist. 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) hat wie 2,5-DHB eine Hydroxyfunktion in ortho-Stellung und steht hier als Vertreterin für Heteroaromaten.

4.2 Aufbau und Beschreibung des Lin-ToF-Massenspektrometers

Das im Arbeitskreis konstruierte und gebaute lineare Flugzeit-Massenspektrometer besteht aus einer für die *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization* konstruierten Ionenquelle und einem ca. zwei Meter langen Flugrohr⁹⁸. Der schematische Aufbau kann der ganzseitigen Abbildung 4.4 auf der nächsten Seite entnommen werden. Die Gesamtflugstrecke der Ionen vom Desorptionsort bis zum Detektor beträgt 2207 mm.

Ionenquelle und Flugrohr sind über ein mechanisches Drehschiebeventil (6``VAT) voneinander getrennt und werden über jeweils eine Turbomolekularpumpe (Fa. Balzers TPU 330 bzw. Fa. Leybold Turbovac 150) auf einen Enddruck von ca. 10^{-6} mbar evakuiert.

Die zu vermessende Probe wird auf einem Edelstahl-Probenträger auskristallisiert und nach der Montage des Probenträgers auf der Spitze einer Schubstange durch eine Vakuumschleuse soweit in die Ionenquelle geschoben, daß der Träger in der Repellerelektrode einrastet.

Die Ionenquelle ist ein System auf einer elektrisch isolierenden Keramikhalterung (Aluminiumoxid) hintereinander angeordneter Elektroden mit einer Gesamtlänge von 144 mm (vergl. Schemazeichnung in Abbildung 4.3).

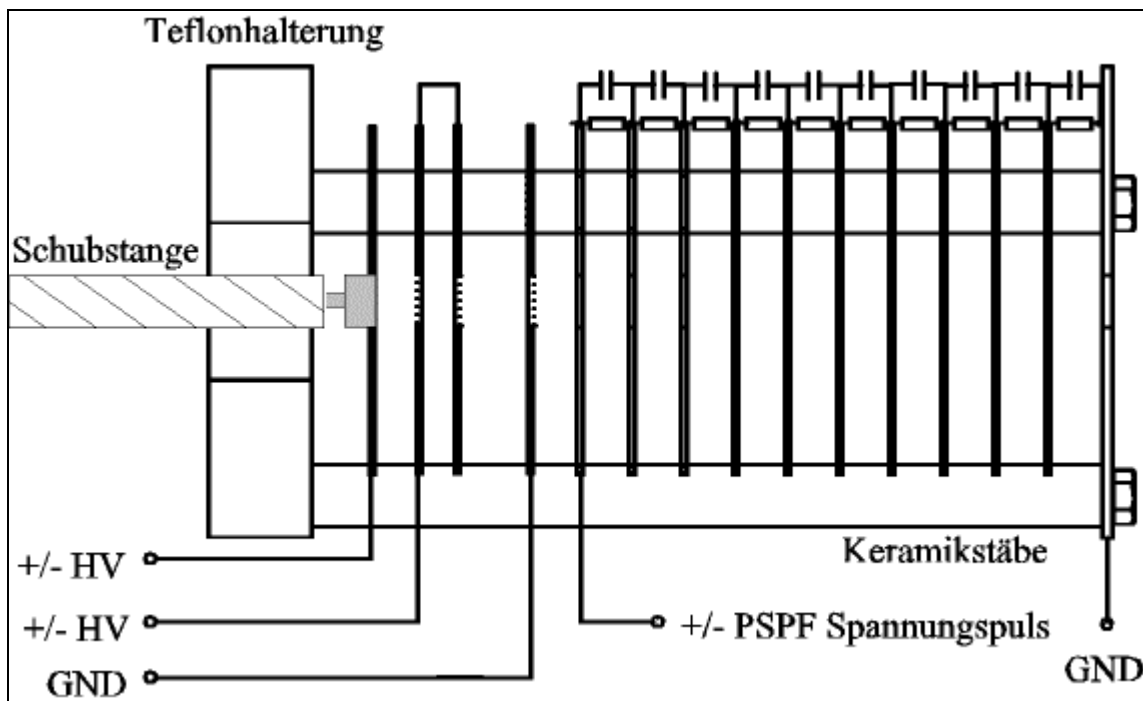


Abbildung 4.3: Die Ionenquelle mit Post Source Pulse Focusing – System

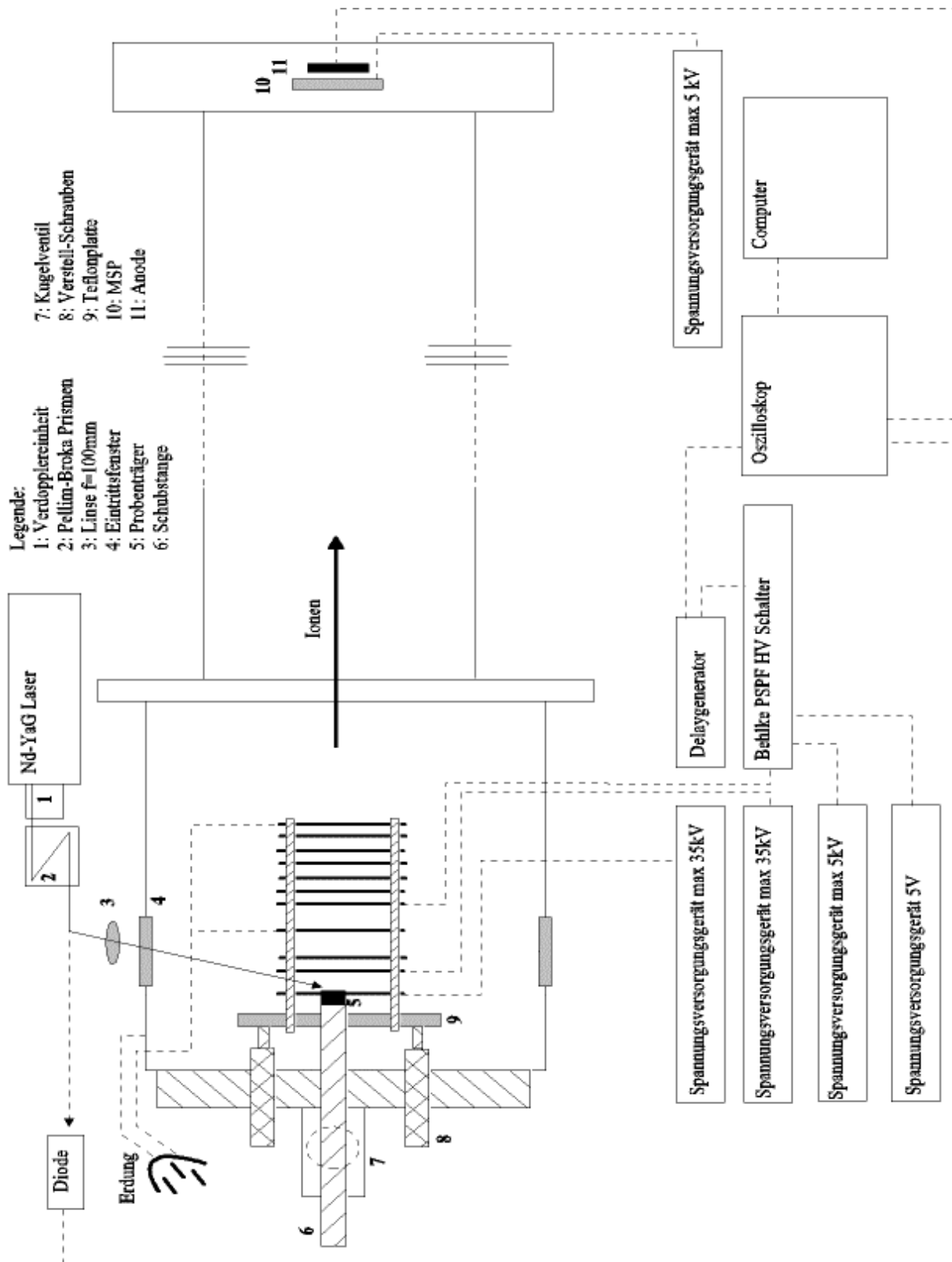


Abbildung 4.4: Fließschema zum MALDI-LinToF-Massenspektrometer

Die Elektroden der Ionenquelle sind Edelstahlscheiben variabler Stärke von 65 mm Durchmesser. Zur Beschleunigung positiver Ionen wird an die Repellerelektrode ein positives statisches elektrisches Potential in Höhe 20 kV bis 22 kV und an die in Flugrichtung zweite Elektrode ein um einige hundert Volt geringeres Potential angelegt. Die zweite Elektrode ist mit der dritten über Kupferklammern verbrückt, so daß beide das gleiche elektrische Potential aufweisen. Die vierte Elektrode wird geerdet, d.h. daß auf der Strecke zwischen der 3. und 4. Elektrode die Hauptbeschleunigung der Ionen stattfindet.

Die beschleunigten Ionen trennen sich auf dem feldfreien Flugweg nach ihren Massen auf und lösen im auf -2,3 kV bis -2,5 kV liegenden *Micro Sphere Plate*-Detektor (Fa. El-Mul, 33mm Durchmesser des MSP^{vii}) ein elektrisches Signal aus, das vom Oszilloskop (Fa. Tektronics, TEK 540a) detektiert wird. Das Oszilloskop wird von einem Personalcomputer (GPIB-Karte) über einen IEEE 488 Port mit Hilfe eines von T. Muskat⁹⁹ auf Basis von Labview 5.1 und National Instruments Treibern entwickelten Programmes ausgelesen.

Die Desorption schwerflüchtiger Substanz aus der festen in die Gasphase erfolgt durch UV-Laserbeschuß bei der frequenzverdreifachten Fundamentalen der Wellenlänge 355 nm, die ein Spectra-Physics DCR 11 Nd-YAG-Laser liefert. Der Laser liefert 5-6 ns kurze Pulse mit einer maximalen Intensität von 60 mJ und einer Repetitionsrate von 10 Hz.

Für die spektralen Untersuchungen in Kapitel 5.2 ist die saubere Trennung der frequenzverdreifachten Fundamentalen von der verdoppelten grünen Linie bei 532 nm unerlässlich. Daher ist nach dem Verdopplerwürfel ein aus vier Prismen bestehendes Pellim-Broka-System installiert worden, das die Unterdrückung der 532 nm-Linie gegenüber der 355 nm-Linie gewährleistet. Zusätzlich durchläuft der Laserpuls noch zwei 3 mm starke UG 5 Filter der Firma Schott, die UV-transparent, aber im Sichtbaren absorbierend sind.

Da die Laserausgangsleistung für MALDI-Experimente zu hoch ist und bei zu weitem Absenken der Blitzlampenspannung der Verdopplungsprozeß zusammenbricht, wird der Laserpuls durch zweimaliges Umspiegeln an im Winkel von 45° zum Strahl stehenden Suprasilfenstern abgeschwächt.

^{vii} Die elektrische Verschaltung ist derzeit „grounded anode configuration“ (vergl. Fa. El-Mul, MSP operating instructions).

Auf diese Weise wird direkt vor dem Eintrittsfenster in die Ionenquelle eine für die Desorption ausreichende Laserleistung zwischen 0,02 mJ und 0,2 mJ gewährleistet.

Der Aufbau der Ionenquelle, d.h. die Abstände der Elektroden, ist für Erzeugung von Massenspektren entwickelt und optimiert worden. Der mit ursprünglich 9 mm geringe Abstand des Repellers von der zweiten Elektrode bedingt, daß der maximal mögliche Einfallswinkel des Desorptionslaserpulses rund $12,5^\circ$ relativ zur Oberflächennormalen des Probenträgers beträgt. Der Desorptionslaserstrahl wird mit einer plankonvexen Linse der Brennweite 100 mm auf den Probenträger fokussiert.

Zur Verbesserung der Massenauflösung, d.h. zur Korrektur von durch die endliche Dauer des Desorptionsprozesses entstehenden Flugzeitfehlern, ist die Ionenquelle des Lin-ToF-MS durch ein *Post Source Pulse Focusing-System* (PSPF) aus elf Elektroden erweitert worden. Diese elf PSPF-Elektroden sind untereinander über $1,5\text{ k}\Omega$ -Arbeitswiderstände verbunden, die zusammen mit parallel zu den Widerständen geschalteten Kondensatoren ($C=33\text{pF}$) gewährleisten, daß die elektrische Feldstärke des PSPF-Feldes nahezu linear über die Elektroden abfällt. Der Gesamtwiderstand über die PSPF-Elektroden beträgt also $15\text{ k}\Omega$.

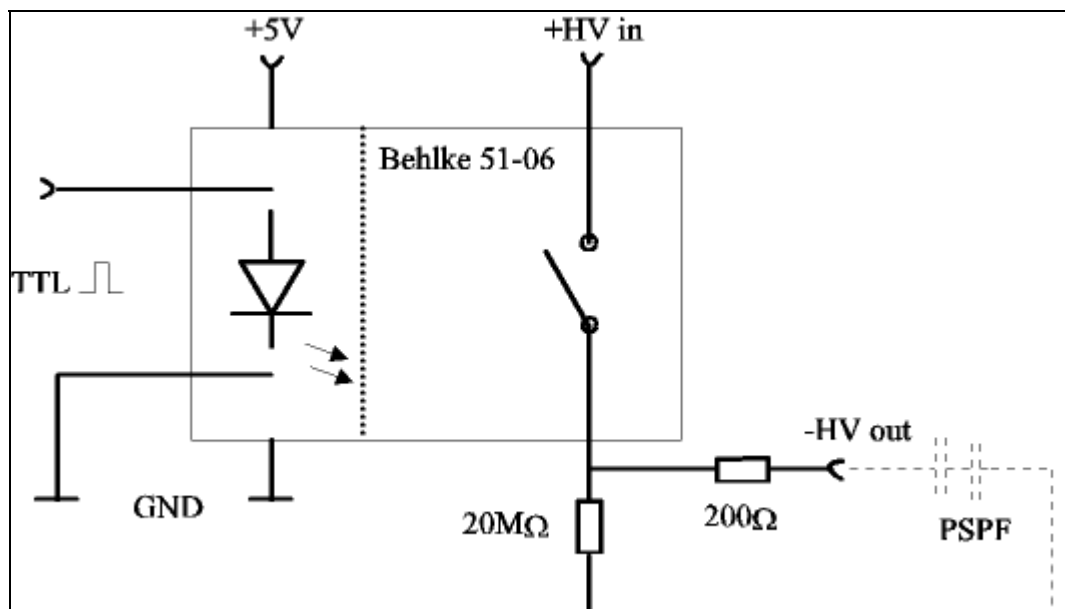


Abbildung 4.5: Schaltbild für das Pulsieren der PSPF-Spannung mit Hilfe eines Behlke HTS 51-06 Hochspannungsschalters

Das PSPF wird erst dann von einem schnellen elektronischen Transistorschalter (Fa. Behlke, HTS 51-06) eingeschaltet, wenn sich die hochauflösend nachzuweisenden Ionen innerhalb der PSPF-Strecke befinden. Diese Ionen erfahren eine ortsabhängige Nachbeschleunigung, die bessere Massenauflösung bewirkt¹⁰⁰ (vergl. Kapitel 4.2.1).

Der Behlke-Pulser HTS 51-06 ist in der Lage, innerhalb von 4 Nanosekunden 5000V zu schalten.

Startpunkt jedes MALDI-Experiments bildet der Desorptionslaserschuß. Eine Photodiode registriert das grüne 532 nm-Streulicht vor dem Pellin-Broka und triggert das digitale Speicheroszilloskop. Das Oszilloskop verfügt über einen triggerinvertierenden „*main trigger* TTL“-Ausgang ohne wesentliche Zeitverzögerung, der den invertierten Trigger an einen Stanford Research *delay*-Generator (Modell DG 535) übergibt. Werden hochaufgelöste Massenspektren aquiriert, muß der Trigger zeitverzögert zum Desorptionspuls an den Behlkeschalter übergeben werden, damit dieser mit der optimalen Zeitverzögerung das PSPF-Feld schalten kann. Der delay-Generator hält in einem typischen Experiment den Triggerpuls für 100 µs aufrecht. In dieser Zeitspanne haben die zu untersuchenden Ionen zumeist den Detektor erreicht, und das Einzelexperiment ist abgeschlossen. Das PSPF-Feld klingt im Anschluß nach einer Exponentialfunktion frei innerhalb einiger hundert Microsekunden ab und ist vor dem Beginn des nächsten Einzelexperimentes null.

4.2.1 Verbesserung der Massenauflösung mit dem PSPF-System

Mit dem Ziel, auch in einem linearen Flugzeitmassenspektrometer hochaufgelöste Massenspektren zu aquirieren, ist in dieser Arbeitsgruppe⁹⁸ 1993 das *Post Source Pulse Focusing-System* entwickelt und realisiert worden (vergl. Abbildung 4.3).

An das zweistufige Beschleunigungsfeld mit einer Gesamtlänge von 29,5 mm schließt sich das mit elf Elektroden aufgebaute PSPF-System mit einer Länge von 102 mm an.

Mit Hilfe des Behlke-Schalters wird dann an die PSPF-Elektroden eine Spannung angelegt, wenn die besser aufzulösende Ionenwolke sich innerhalb der PSPF-Flugstrecke befindet.

Das *E*-Feld baut sich innerhalb weniger Nanosekunden auf, und die im Feld befindlichen Ionen erfahren in Abhängigkeit ihrer Position im Feld eine Nachbeschleunigung. Da die PSPF-Spannung innerhalb der Korrekturstrecke homogen abfällt, durchlaufen nach dem Einschalten des Pulses die schnelleren Ionen, die bereits einen größeren Teil der PSPF-

Strecke durchflogen haben, eine geringere Spannungsdifferenz als langsame Ionen, die noch nicht weit in die PSPF-Strecke eingedrungen sind. Langsame Ionen werden daher stärker beschleunigt als schnellere Ionen. Wenn die PSPF-Spannung zum richtigen Zeitpunkt eingeschaltet wird und der Spannungspuls die notwendige Höhe hat, läßt es sich erreichen, daß die vormals langsameren Ionen die schnelleren bis zum Detektor wieder eingeholt haben.

Mit dieser Technik können Geschwindigkeitsfehler, die aus unterschiedlichen Startgeschwindigkeiten bei der Desorption resultieren, und auch Zeitfehler korrigiert werden, die aus verschiedenen Startzeiten, Ionenbildungszeiten und der endlichen Dauer des Laserpulses entstehen (vergl. Abbildung 4.6).

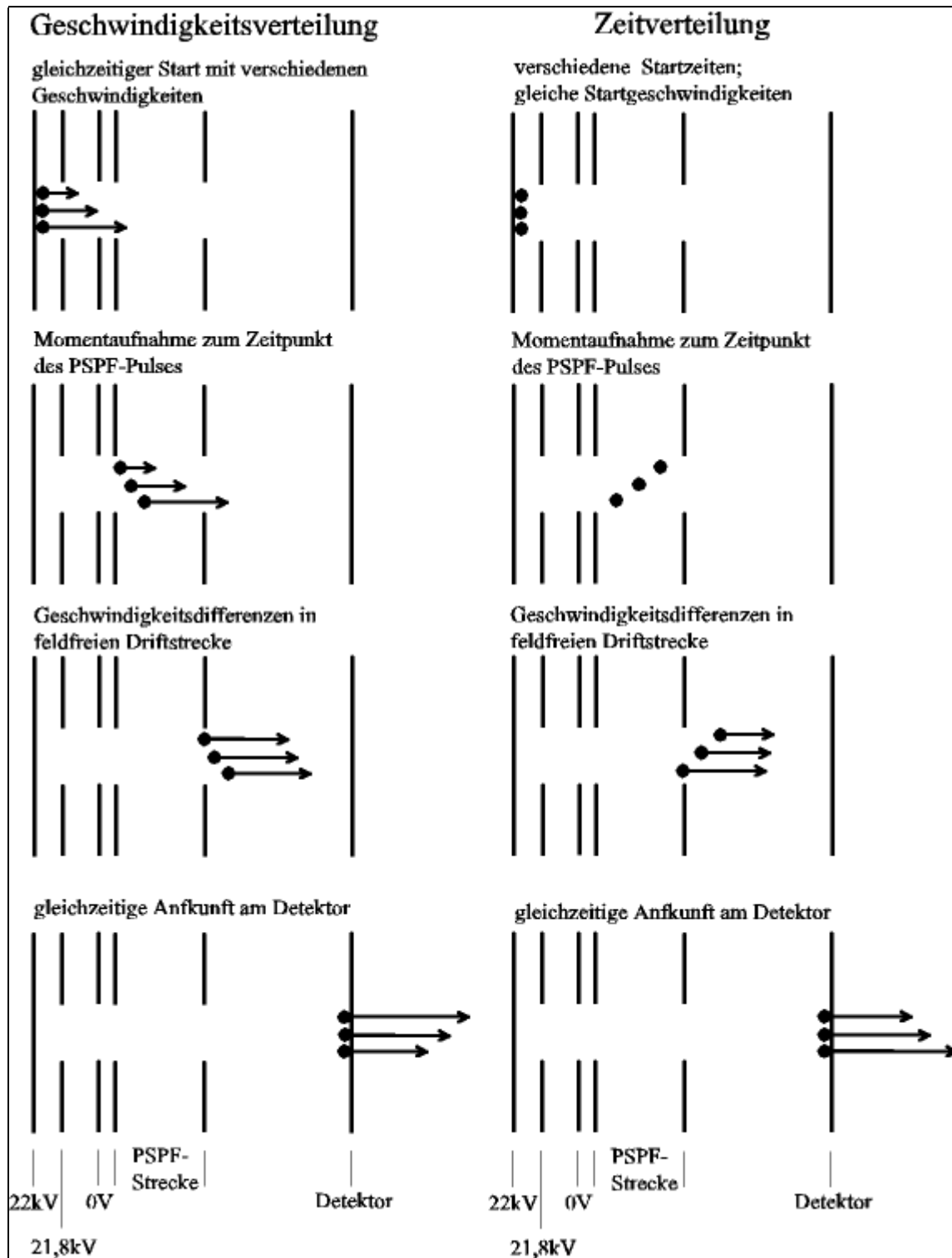


Abbildung 4.6: Wirkungsweise der PSPF-Technik bei der Korrektur von Flugzeitfehlern

Der Unterschied zur Auflösungsverbesserung mit Hilfe eines Ionenreflektors besteht darin, daß im PSPF-Feld die Ionen eine „aktive“ Energiekorrektur erfahren, während die kinetische Energie der Ionen im feldfreien Raum vor dem Reflektor dieselbe ist, die sie nach dem

Passieren des Reflektron-Feldes haben. Die Korrektur im Reflektron geschieht über verschiedene Trajektorien im Feld, welche zu unterschiedlichen Verweildauern führen.

Ein großer Vorteil bei der Korrektur mit Hilfe dynamischer Felder gegenüber der mit statischen besteht in der Möglichkeit, Zeitfehler zu kompensieren. Aus diesem Grund eignet sich das PSPF-System besonders dann, wenn von vornherein bekannt ist, daß die Ionengenerierung sich zeitlich über einen weiten Bereich erstreckt, beispielsweise bei der IR-MALDI^{viii}.

Der Einsatz der PSPF-Technik wird durch die Länge der Elektrodenanordnungen eingeschränkt. Denn es können nur jene Verteilungen von Ionen korrigiert werden, die sich zum Einschaltzeitpunkt der Spannung innerhalb der PSPF-Strecke befinden. Ionen, die beim Einschalten bereits den PSPF-Bereich passiert haben (z.B. die leichten, schnellen Matrixionen), fliegen unbeeinflusst weiter, während Nachzügler durch das aufgebaute Feld, das dann als Bremsfeld wirkt, verzögert werden. Das bedeutet bei der Detektion der Nachzügler eine deutliche Auflösungsver schlechterung.

Die PSPF-Elektroden müssen sich möglichst dicht an die 0 V-Elektrode anschließen, weil die Korrektur über die Wegunterschiede bis zum Einschaltzeitpunkt erfolgt. Je weiter die PSPF-Strecke von der Ionenquelle entfernt ist, desto besser sind Ionen unterschiedlicher Massen bereits aufgetrennt. Ein weit von der Ionenquelle entfernt installiertes gepulstes Feld macht also diesen gewünschten Trenneffekt infolge Nachbeschleunigung wieder zunichte. Das heißt, Signale unterschiedlicher Massen rücken bis zur Detektion zeitlich zusammen ($\Delta t = t_{m2} - t_{m1}$ würde kleiner). Darüber hinaus verkleinerte sich der fokussierbare Massenbereich mit dem Abstand, was ebenfalls ein unerwünschter Effekt ist.

Zur Optimierung aller in die Verbesserung der Massenauflösung eingehenden Parameter, wie der Abstände der Elektroden, der Höhe der Potentiale und dem Zeitintervall bis zum Einschalten des Pulsers, ist eine rechnerische iterative Vorgehensweise notwendig, um die Mannigfaltigkeit der Variablen durchzustimmen. Zu diesem Zweck ist von Bönisch¹⁰¹ ein Rechner-gestütztes Programm entwickelt worden.

^{viii} Der typische IR-MALDI Laser ist der CO₂-Laser. Er zeigt einen ziemlich breiten, intensiven Laserpuls von meist über 100ns Länge, der von einem *tail* von mehreren Microsekunden Dauer gefolgt wird.

Eine Beschreibung der Wirkungsweise des PSPF-Feldes aus den zugrunde liegenden kinematischen und elektrostatischen physikalischen Gleichungen findet sich bei Ioanovicu¹⁰².

Für Flugzeitmassenspektrometer mit statischen elektrischen Feldern existiert ein linearer Zusammenhang zwischen dem Quadrat des Masse zu Ladungsverhältnisses $(m/z)^2$ und der Flugzeit (vergl. auch Kapitel 2.3.1). Die lineare Abhängigkeit wird durch die Anordnung der Felder nicht berührt, und sie gilt auch bei Verwendung eines Reflektrons. Die Massenkalisierung erfolgt mit zwei oder drei Substanzen bekannter Masse, d.h. sie basiert auf zwei bis drei Stützpunkten.

Bei der Anwendung zeitlich veränderlicher Felder, wie bei der PSPF-Methode, gilt dieser einfache Zusammenhang nicht mehr, weil Ionen verschiedener Massen unterschiedlich stark nachbeschleunigt werden.

Der Abhängigkeit der Flugzeit von der Masse läßt sich aber durch folgendes, aus einer Taylorreihe abgeleitetes Polynom annähern:

$$t(m) = c_0 + c_1 \cdot m^{\frac{1}{4}} + c_2 \cdot m^{\frac{1}{2}} + c_3 \cdot m^{\frac{3}{4}} \quad [4.1]$$

Für die Massenkalisierung müssen die Parameter c_0 bis c_3 bestimmt werden. Daher sind mindestens vier Kalibrierpunkte notwendig. Um Auswirkungen von Kalibrierungsfehlern zu unterdrücken, ist es sinnvoll, deutlich mehr als vier Stützpunkte zu verwenden und sie möglichst gleichmäßig über den durch das PSPF-Feld fokussierten Bereich zu verteilen.

Die Bestimmung der Parameter c_0 bis c_3 der Kalibrierfunktion durch Optimierung über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate übernimmt ein Computerprogramm.

Als Kalibrierungssubstanzen sind Kationenaddukte von Polymeren gut geeignet, weil sie eine ganze Reihe äquidistanter Signale liefern.

Aus den oben dargelegten Gründen erfordert jede Änderung der Geräteparameter wie der Beschleunigungsspannung oder des *delay* des PSPF-Pulses eine neue Massenkalisierung, was für Routineanalytik unpraktisch ist. Die Verwendung eines PSPF-Systems sollte daher sinnvoll mit einem Probeträger verknüpft werden, der durch zweidimensionale Verschiebung die Möglichkeit bietet, von mehreren Desorptionsorten zu desorbieren, ohne den Probeträger zu wechseln.

So könnten abwechselnd die zu analysierende Substanz und die Kalibrierungsmischung desorbiert werden. Auf diese Weise ließe sich bei jeder Änderung der Geräteparameter rasch eine Massenkalisierung durchführen.

Die Einstellung der PSPF-Spannung und ihres *delay* stellen einen Kompromiß zwischen der Korrektur der Orts-, Zeit- und Geschwindigkeitsverteilungen dar. In Bezug auf die Orts-, genauso wie auf die Zeitverteilung der Ionen gilt, daß sich die Auflösung des Massenspektrometers bei konstanter PSPF-Spannung mit der Erhöhung der Hauptbeschleunigungsspannung erhöht, während die Geschwindigkeitsverteilung diesem Trend entgegenläuft¹⁰⁰.

Die Kombination dieser drei Verteilungsfunktionen führt zu dem Ergebnis, daß bei zweistufigem Abzugsfeld die Spannungsdifferenz zwischen Repeller und erster Beschleunigungselektrode bei etwa 200 V liegen sollte. Die PSPF-Korrekturspannung liegt in der Größenordnung von 2,3 kV.

Ioanoviciu schlägt für die Kalibrierung von durch gepulste Felder auflösungsverbesserten Massenspektren eine andere Gleichung vor, die ebenfalls auf der Bestimmung mehrerer Kalibrierungsfaktoren beruht. In der folgenden Gleichung sind mindestens fünf Stützpunkte zur Umrechnung der Ionenflugzeit in Masseninformationen notwendig:

$$t_i = a_0 + a_1 \cdot \sqrt{m} \cdot \left[\left(\sqrt{1 - \frac{a_2}{\sqrt{m}}} \right) - a_3 + \frac{a_4}{\sqrt{1 - \frac{a_2}{\sqrt{m}}}} \right] \quad [4.2]$$

Der mathematische Vergleich beider Kalibrierungsfunktionen auf der Basis realer Daten (Polystyrol-Oligomere zwischen $m/z = 1100$ und $m/z = 1800$) zeigt, daß die beiden Gleichungen nicht zu einem identischen Ergebnis führen. Aus der Gleichung [4.2] werden im Massenbereich zwischen $m/z = 1250$ und $m/z = 1400$ relativ zur Gleichung [4.1] bis zu 20 ns zu niedrige Flugzeiten errechnet (Fehler bei $m/z = 1206$ ist $5 \cdot 10^{-4}$). Für Ionen oberhalb $m/z = 1400$ bis $m/z = 1750$ werden mit der Gleichung [4.2] um den gleichen Betrag höhere Flugzeiten ermittelt, als mit Gleichung [4.1] (Fehler bei $m/z = 1831$ ist $4 \cdot 10^{-4}$).

4.3 Beschreibung der zur Spektroskopie am Desorptionsprozeß verwendeten Geräte

4.3.1 LIF(t)-Experimente

4.3.1.1 Detektionssysteme

Für die integrale Erfassung der Lumineszenz in Abhängigkeit von der Zeit wird ein ungepulst betriebener Photomultiplier vom Typ Hamamatsu R928 mit 10 Dynoden verwendet, der vom ultravioletten Bereich des elektromagnetischen Spektrums bis in den roten Bereich eingesetzt werden kann (185 nm - 900 nm).

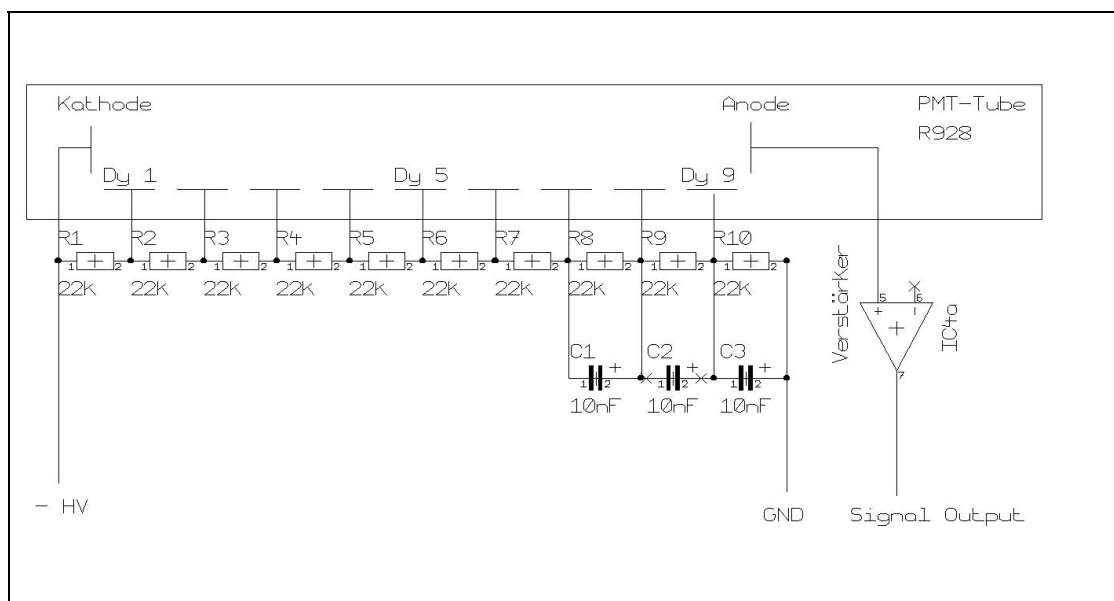


Abbildung 4.7: Hochverstärkende Schaltung des Photomultipliers mit 9 aktiven Dynoden

Die Potentiale zwischen den Dynoden werden über einen Spannungsteiler aus zehn in Reihe geschalteten Widerständen von 22 k Ω erzeugt. Der Gesamtwiderstand des PMT beträgt also 220 k Ω . Um die Dynodenpotentiale während der Verstärkung eines Lichtpulses auf konstantem Potential zu halten und hohe Ströme am Ende der Verstärkungskaskade abzuf puffern, werden zwischen den drei letzten Dynoden Kondensatoren mit je einer Kapazität von 0,01 μ F parallel zu den Widerständen gelötet.

Die Durchgangszeit für ein Signal (Deltafunktion) ist eine Exponentialfunktion der angelegten Spannung. Sie beträgt bei – 1000 V Photokathodenspannung 22 ns mit einem *jitter* von 1,2 ns.

Auf die „richtige“ Signalwiedergabe und -vervielfachung muß bei den Lumineszenzexperimenten besonderer Augenmerk gelegt werden, wenn die Signale sofort mit Beginn des Laserschusses einsetzen und in dazu vergleichbar kurzer Zeit wieder abnehmen.

Bei den in Kapitel 5.2 durchgeführten Experimenten werden zum Teil sehr viel geringere Kathodenspannungen verwendet, weil ab einem Schwellenwert Reflexionen des Meßsignals erfolgen. Das Phänomen macht sich im $I(t)$ -Spektrum durch einen zweiten Peak nach dem eigentlichen Meßsignal bemerkbar, der ein vom Versuch selber unabhängiges *delay* von ca. 180 ns aufweist.

Dieser Effekt kann einerseits durch den Impedanzunterschied zwischen PMT (220 k Ω) und Oszilloskop-Eingang (50 Ω), oder andererseits in der Photomultierröhre selbst durch zu hohe Elektronendichten innerhalb des PMT, also an der Photokathode bzw. an den Dynoden hervorgerufen werden.

Der Impedanzunterschied zwischen PMT-Ausgang und dem Oszilloskop-Eingang läßt sich verringern, indem ein Verstärker zwischengeschaltet wird. Neben der Impedanzanpassung durch die Nutzung seines 500 Ω -Eingangs, verbessert der Stanford Research-Verstärker (Modell SR 445) das Signal-Rausch-Verhältnis und bietet die Möglichkeit, sehr schwache Signale zu verstärken.

Der Einsatz des Verstärkers verringert zwar das Phänomen der Signalreflexion, behebt es aber nicht völlig. Das läßt darauf schließen, daß das Problem innerhalb der Photomultiplier-Tube selbst liegt.

Weitere Versuche, den PMT kapazitiv durch Änderung von Kapazität und Anzahl der Kondensatoren und impedanzmäßig durch Wahl unterschiedlich großer Widerstände bei der Spannungsteilung an den Dynoden für die LIF-Experimente zu modifizieren, haben keinen Erfolg gezeigt.

Bei solchen Modifizierungen muß auch berücksichtigt bleiben, daß ein hochohmiger Photomultiplier Signale stets langsamer verarbeitet als ein niederohmiger und daher die Signalvervielfachung beeinflußt wird.

Am $1\text{M}\Omega$ -Eingang des Oszilloskops kann das LIF-Signal nicht gemessen werden, weil schnelle Spannungsänderungen im Nanosekundenbereich dann nicht korrekt wiedergegeben werden.

Zur Unterdrückung der Streulicht-Laserlinie gegenüber der Lumineszenz sind Versuche mit gepulsten Photomultipliern durchgeführt worden. Dabei stehen apparativ grundsätzlich mehrere Alternativen zur Verfügung:

1. Pulsen der gesamten PMT-Spannung an den Dynoden mit Hilfe eines schnellen elektronischen Schalters (Fa. Behlke, Frankfurt)
2. Pulsen der letzten zwei bis drei Dynoden, an welchen der Dynodenstrom bereits relativ groß geworden ist (nach De Marco und Penco)¹⁰³
3. Pulsen der Photokathode (nach De Martini und Wacks)¹⁰⁴

Das Pulsen der negativen Gesamtspannung am PMT führt aufgrund der hohen zu schaltenden Spannungen (-1000 V) infolge kapazitiver Ladungs- und Umladungseffekte, sowie auch infolge des erzeugten elektromagnetischen Impulses auf die Leitungen, zu erheblichen Signalstörungen und ist daher nicht sinnvoll, weil sich die Spektren nicht mehr auswerten lassen.

Auch beim Pulsen der letzten Dynoden entstehen durch Umladungseffekte unerwünschte Signalstörungen, und das Signal-Rausch-Verhältnis verschlechtert sich drastisch – sehr wahrscheinlich durch bereits vervielfachte Elektronen, die Raumladungen erzeugen.

Die dritte Methode hat den Vorteil, daß es nicht nötig wird, Spannungen im Kilovoltbereich zu schalten. Intention ist es, daß ein relativ kleines negatives elektrisches Potential durch die Laserlichtstreuung unvermeidbar erzeugte Photoelektronen daran hindert, die erste Dynode zu erreichen, d.h. daß die Potentialdifferenz zwischen der Kathode und der ersten Dynode von Elektronen nicht überwunden werden kann. Wird nach Ende des Laserpulses die Photokathode durch einen positiven elektrischen Rechteckpuls (ca. 50 V - 150 V, je nach Verschaltung und Anzahl der Dynoden) für Elektronen durchlässig, kann zumindest in dieser Hinsicht die Vervielfachung ohne störende Einflüsse erfolgen. Allerdings ist die erreichte

Unterdrückung des Laserstreulichts um den Faktor 10 zu gering, um relativ dazu das Lumineszenzlicht zu detektieren. Zudem wird auch in diesem Fall das Meßsignal gestört.

In der neueren Literatur wird darauf hingewiesen, daß trotz einer Dämpfung gestreuter Laserphotonen um den Faktor 10^5 gegenüber LIF-Photonen das Pulsen der Photokathode problematisch ist, weil möglicherweise durch Ionisation von Restgas im PMT selbst Signal erzeugt werden kann¹⁰⁵.

Zusammenfassend läßt sich also folgern, daß sich mit gepulsten Photovervielfacher-schaltungen das Laserlicht gegenüber dem viel schwächeren Lumineszenzlicht nicht ausreichend unterdrücken läßt. Ein weiterer Nachteil einer hochverstärkten Verschaltung mit 10 Dynoden sind die relativ hohe Ansprech- und Signaldurchgangszeit. Zur Separierung von im Nanosekundenbereich fast zeitgleichen Lichtereignissen müssen also sowohl die Ansprech- als auch die Signaldurchgangszeit verringert werden.

Diese Forderungen an das Photomultiplier-Detektionssystem lassen sich dadurch realisieren, daß anstelle aller Dynoden nur wenige zur Vervielfachung des Signals genutzt werden. Diese Vorgehensweise zieht natürlich einen über die Zahl der geerdeten Dynoden exponentiell sinkenden Verstärkungsfaktor nach sich. Die hohe Verstärkung wird also zugunsten höherer Detektionsgeschwindigkeit aufgegeben, was dann sinnvoll ist, wenn die Lumineszenzintensität ausreicht, um auswertbare Signale zu erzeugen.

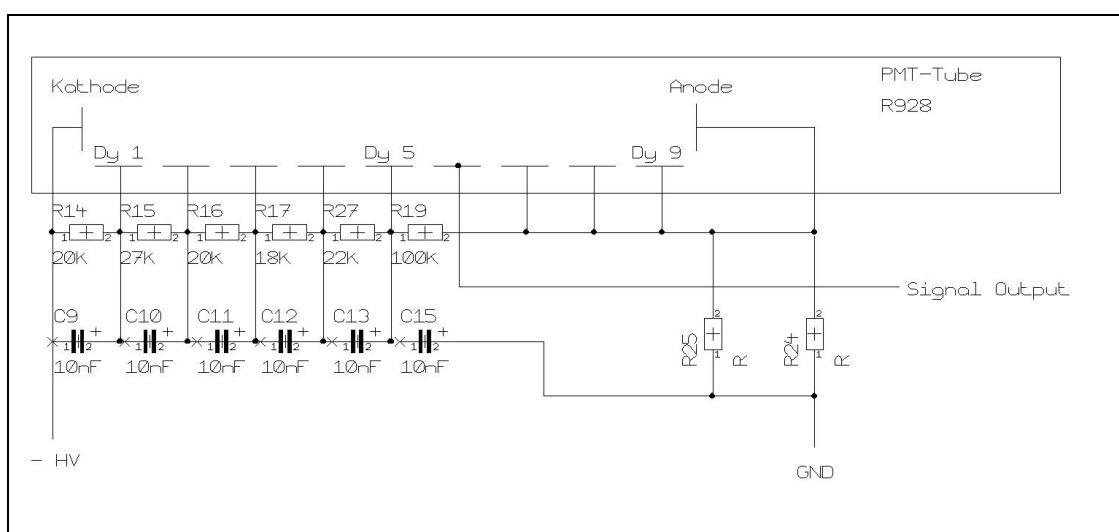


Abbildung 4.8: Schnelle Photomultiplierschaltung mit 300ps Anstiegszeit und sechster Dynode als Anode

Eine an Dasch¹⁰⁶ angelehnte schnelle Photovervielfacherschaltung wird in Abbildung 4.8 dargestellt. Diese schnelle Photovervielfacherschaltung mit 5 aktiven Dynoden und der sechsten Dynode als Anode gewährleistet eine Anstiegszeit von 300 ps (vergl. Dasch). Der Verstärkungsfaktor dürfte mit dieser Verschaltung auf etwa 10^3 bis 10^4 gesunken sein.

Ziel der dargestellten Versuche ist es, neben dem dominierenden ultravioletten Laserstreulichtanteil kleine Intensitäten an durch Lumineszenz erzeugten Photonen zu detektieren. Da Lumineszenz im Vergleich zur Anregungswellenlänge weit rotverschoben zu erwarten ist, sollte es hilfreich sein, durch geeignete UV-absorbierende Filtersysteme den Laserstreulichtanteil zu reduzieren.

Um den Photomultiplier nicht durch gestreutes Laserlicht zu übersättigen, wird in den meisten Experimenten in Kapitel 5.2 die Protokathode mit Schott UV-Filtern vom Typ GG385 geschützt, die unterhalb 400 nm stark absorbierend und oberhalb 400 nm durchlässig sind. Ein 1 mm starker GG385-Filter hat bei der verwendeten Laserwellenlänge von 355 nm eine Transmission $T = 0,02$. Das im Katalog der Firma Schott enthaltene Computer-Programm Filter97 errechnet für 7 mm GG385-Filter eine Transmission $\ll 10^{-5}$.

4.3.1.2 Versuchsaufbau

4.3.1.2.1 Untersuchungen zur Zeitdomäne der die Desorption begleitenden Lumineszenz mit Photomultipliern

Die Lichtereignisse während des Desorptionsprozesses werden senkrecht zum einfallenden Desorptionslaserstrahl und senkrecht zur Flugrichtung der Ionen spektroskopiert. Weil die Experimente im vollständig funktionstüchtig bleibenden Massenspektrometer erfolgen, lassen sich die Untersuchungen nur durch das obenliegende Suprasilfenster der Ionenquelle durchführen. Die *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization* geschieht unter in der Massenspektrometrie üblichen Hochvakuumbedingungen. Aus diesen Rahmenbedingungen folgt, daß zur integralen Erfassung aller Lichtereignisse während der Desorption der Photomultiplier auf dem obenliegenden „Top-Fenster“ der Ionenquelle positioniert werden muß; damit beträgt die minimale Entfernung des PMT vom Desorptionsort 81 mm

(Durchmesser der Ionenquelle 150 mm, Höhe des Fensterflansches 6 mm). Die Abbildung 4.9 zeigt schematisch den Versuchsaufbau.

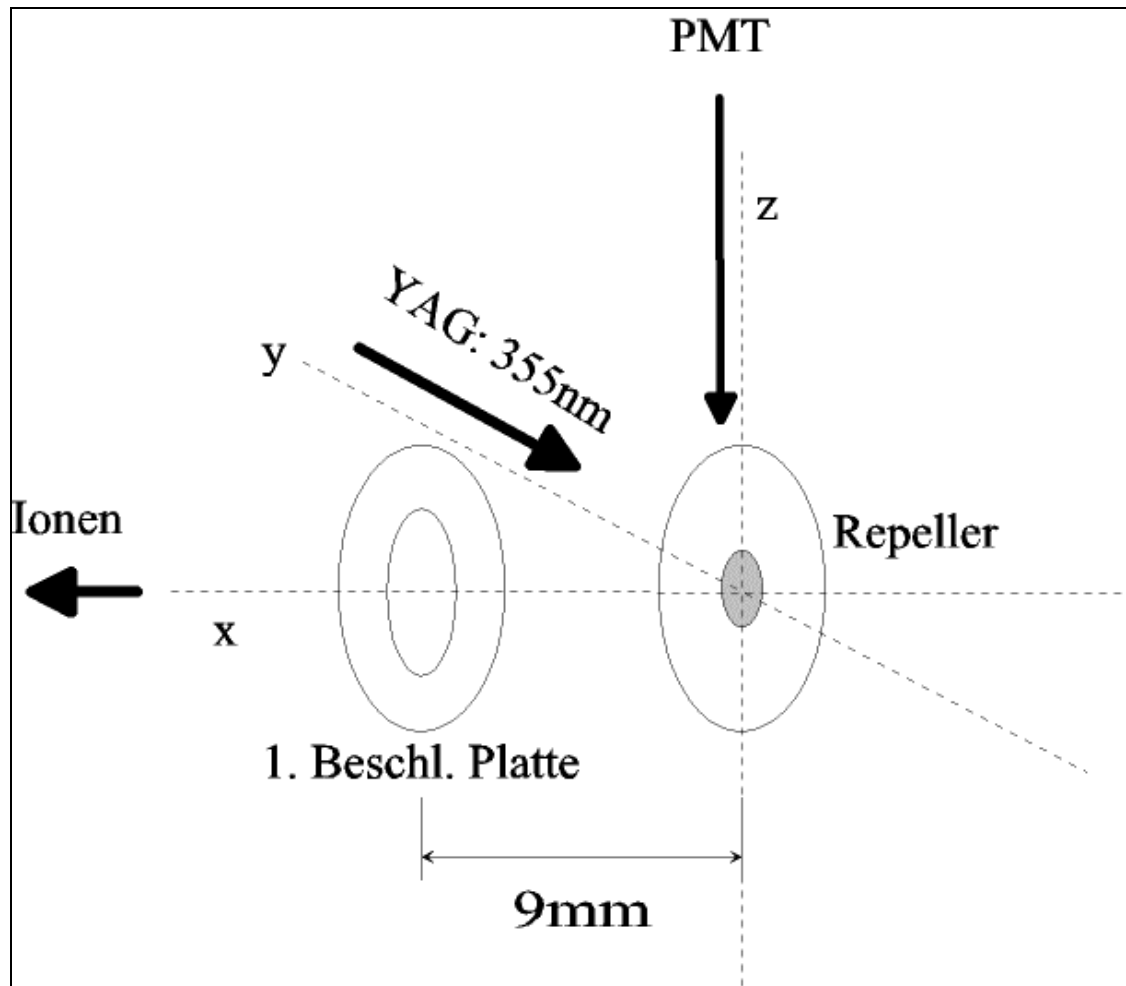


Abbildung 4.9: Schematische Seitenansicht des experimentellen Versuchsaufbaus zur Ermittlung der Zeitdomäne der Lumineszenz

Zur Vermeidung von Übersättigung der Photokathode durch gestreutes Laserlicht kann die Kathode durch mehrere Millimeter starke UV-Filter (Schott GG385) geschützt werden, die oberhalb 400 nm > 99% Transmission aufweisen, aber bei 355 nm stark absorbierend sind ($T_{355\text{nm}} \sim 1\%$, bei 1 mm Filterstärke).

4.3.1.2.2 Spektral aufgelöste Untersuchungen zur Zeitdomäne der Lumineszenz mit Photomultipliern als Detektoren

Mit Hilfe eines Übergangsflasses können sowohl der hochverstärkte als auch der schnelle Photomultiplier als Detektor am Monochromator installiert werden. Dieser Versuchsaufbau bietet die Möglichkeit, die Lumineszenzlebensdauern in Abhängigkeit der Wellenlänge zu messen und Rückschlüsse auf die Licht emittierenden Spezies zu ziehen, wenn die Intensität des gesammelten Lumineszenzlichtes nach der spektralen Auftrennung ausreichend ist.

4.3.2 Spektral aufgelöste Untersuchungen der Laser-induzierten Fluoreszenz während der MALDI-Desorption

Zur spektralen Auftrennung des Lumineszenzlichts während des Desorptionsprozesses wird ein 0,275 m - Monochromator der Firma Spectroscopy & Instruments (S&I) verwendet, der mit einem computergesteuerten Gitterhalter (dem sog. *turret*) für maximal drei optische Gitter der Größe 68 mm*68 mm oder 68 mm*84 mm ausgestattet ist. Die Konstruktion des Spektrometers ist vom Typ Czerny-Turner¹⁰⁷.

Die in den Experimenten verwendeten Gitter sind von der Größe 68 mm * 68 mm und das Gitter #1 verfügt über 600 Linien/mm (500 nm *blaze*), während das zweite installierte Gitter 2400 Linien/mm (240 nm *blaze*) aufweist. Gitter 1 überdeckt in seiner Focalebene nominal ca. 143 nm, Gitter #2 ca. 35 nm.

Der Motor des Gitterhalters wird über einen Spectra Pro Scan Controller angesteuert und die Gitterposition über eine RS 232 Schnittstelle ausgelesen.

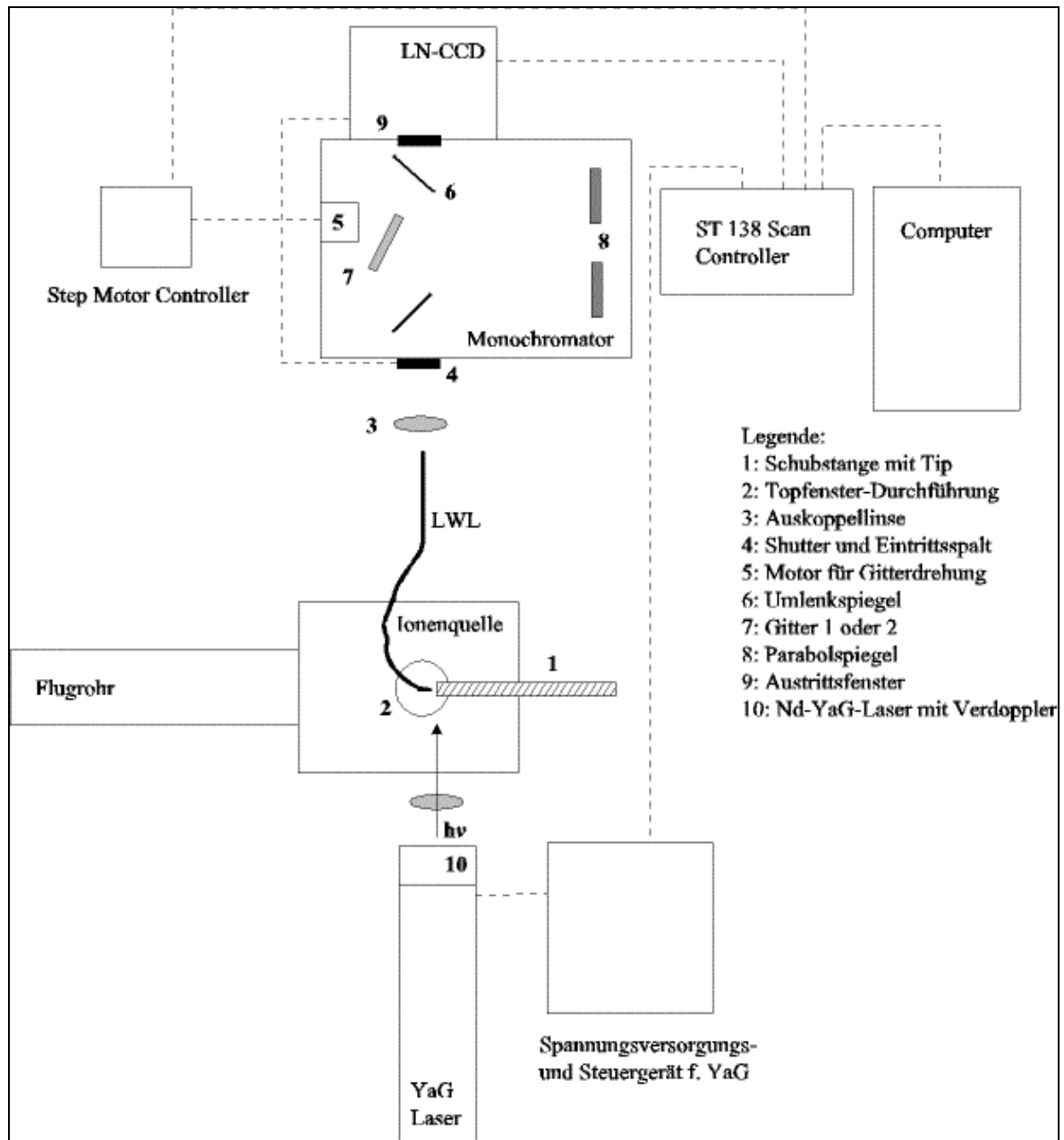


Abbildung 4.10: Fließschema des Versuchsaufbaus zur spektralen Aufbereitung des Lumineszenzlichts

Als Detektor dient eine Flüssigstickstoff-gekühlte *Charge Coupled Device* (LN-CCD) Camera, deren optisch sensibler Detektorchip (Typ EEV-15) 256 mal 1024 Pixel der Größe $27\mu\text{m} \times 27\mu\text{m}$ aufweist. Ihr nutzbarer Spektralbereich liegt zwischen 250 nm und 1080 nm (UV coating). Die wirksame Fläche des EEV-15 Chips beträgt 6,9 mm mal 27,6 mm.

Der Detektor wird mit der langen Seite horizontal am Ausgangsspalt des Spektrometers installiert, so daß sich das Spektrum über seine Längsachse aufspannt.

Die Steuerung und das Auslesen des CCD-Chips erfolgt über den ST138 Detektor Controller (S&I) mit einer maximalen Ausletiefe von 18 bit/pixel (16 bit maximale A/D Wandlung) und der internen Taktfrequenz von 150 kHz. Minimale Belichtungszeit (*exposure time*) des Chips im *full frame*-Modus, bei dem jedes einzelne Pixel separat ausgelesen wird, ist 5 ms.

Das digitalisierte Meßsignal wird an einen Personalcomputer übergeben und mit der Winspec Spektroskopie Software der Firma Princeton Instruments bearbeitet, die auch die Gesamtsteuerung der für das LIF(λ)-Experiment benötigten Geräte übernimmt.

Der ST 138 Detektor Controller wird für auf den Desorptionslaserschuß synchronisierte Experimente durch der Q-Switch Sync-Ausgang des Lasers getriggert. Der Controller regelt auch die Betriebstemperatur des photoaktiven CCD-Chips (-100°C). Für zum Laserpuls zeitlich verzögerte Untersuchungen steht der Stanford Research Delaygenerator (Modell SR445) zur Verfügung. Mit dem synchronisierenden TTL Puls des Lasers startet die Belichtungs- und Auslese-Prozedur. Weil der Monochromator mit einem mechanisch angetriebenen und elektronisch ansteuerbaren Verschlußmechanismus (*shutter*)^{ix} ausgestattet ist, muß er rechtzeitig zu Beginn des Experiments geöffnet sein. Der *shutter* ist aufgrund seines elektromechanischen Antriebes relativ zur Meßprozedur langsam. Er öffnet oder schießt vollständig in 26,75 ms. Die Steuersoftware erlaubt es, für synchronisierte Messungen den *shutter* vor dem Start des Experimentes zu öffnen (*preopen*-Option).

Für die beabsichtigten spektralen Experimente ist es nicht sinnvoll, die Gesamtfläche des CCD-Chips zur Detektion zu nutzen, weil durch die dann erzeugte große Datenmenge die Auslese- und Verarbeitungsgeschwindigkeiten drastisch sinken. Durch die *binning*-Routine, d.h. durch die Software gesteuertes zeilen- oder blockweises Auslesen, kann der CCD-Chip als Zeilenarray betrieben werden, was für die spektralen Informationen zumeist völlig ausreichend ist. So werden im experimentellen Teil der Arbeit nur eine, zehn oder hundert Zeilen in der horizontalen Breite des Chips genutzt.

Da der Monochromator aus konstruktiven Gründen nicht direkt an ein Fenster in der Ionenquelle angeflanscht und ebenfalls nicht über einfaches ein abbildendes Linsensystem mit

^{ix} Der *shutter* kann, wenn das für zeitaufgelöste Experimente erforderlich ist, vom Experimentator ausgebaut werden. Die CCD-Steuersoftware gestattet es, dem Meßsignal vor- oder nachgelagerte unerwünschte Signale zu verwerfen.

der zu untersuchenden Lichtquelle verbunden werden kann, ist im Rahmen dieser Arbeit eine auf einem Lichtwellenleiter (LWL) basierende Übertragung des Meßsignals entwickelt worden.

Zur Sammlung des Lumineszenzlichtes eignet sich allein das obenliegende Fenster der Ionenquelle, weil orthogonal zur Oberfläche des Probenträgers die Ionen das Massensignal erzeugen und in zum Desorptionslaserpuls entgegengesetzter Orientierung durch den Photomultiplier sehr viel Rayleigh-Streulicht aufgefangen würde. Deshalb ist eine zweidimensional verschiebbare einfache Durchführung für den Lichtwellenleiter vom Umgebungsdruck außerhalb der Ionenquelle in das Hochvakuum des Massenspektrometers entwickelt worden. Die Sammlung des Lumineszenzlichts mit dem Glasfaserkabel erfolgt so, daß es an der Repellerelektrode anliegt. Auf diese Weise kann die Festkörperlumineszenz genauso wie die Gasphasenfluoreszenz unter dem Einkoppelwinkel $\Theta = 12,7^\circ$ detektiert werden. Alternativ ist eine um 6° in Flugrichtung der Ionen geneigte Vakuumdurchführung gebaut worden, mit der unter diesem maximal realisierbaren Winkel relativ zur Probenoberfläche das Lumineszenzlicht in der „Aufsicht“ eingekoppelt werden soll. Beide Vakuumdurchführungen können im Anhang unter Kapitel 7.1 eingesehen werden.

Mit Hilfe dieser vakuumdichten Durchführung kann das Sammelende des Glasfaserkabels sehr nahe am Desorptionsort positioniert werden. Zudem gestattet die Verschiebbarkeit des LWL in Flugrichtung der Ionen, etwaige Gasphasenlumineszenz abhängig vom Ort ihrer Entstehung zu detektieren.

Das Kernmaterial (*core*) des 1,5 m langen Glasfaserkabels (Firma Ceram Optec, Bonn) besteht aus auch im ultravioletten Bereich des Spektrums transparentem *fused silica* (Siliziumdioxid, Handelsname Optran UV) mit einem Durchmesser von 1250 μm und ist an beiden Enden optisch plan poliert^x. Die numerische Apertur (*numerical aperture*, NA) des Kernmaterials beträgt 0.22, der Brechungsindex ist stufenförmig (*step index profile*).

Die numerische Apertur ist eine für das Sammelvermögen des LWL besonders wichtige Größe. Sie gibt den Akzeptanzwinkel des Glasfaserkabels für die erfolgreiche Einkopplung

^x Der große Durchmesser des LWL bedingt, daß die Lichtwellen im Leiter mehrfach gebrochen werden. Die Führung der Moden erfolgt daher multimodal und das Glasfaserkabel hat aufgrund dieser „Vermischung“ der Wellen keine ortsabbildenden Eigenschaften. Ortsabbildung läßt sich mit vielen dünnen Monomodenfäsern erreichen, indem sie zu einem Faserbündel zusammengefaßt werden.

von Licht in das Kernmaterial an. Oberhalb des NA-Wertes wird die Lichtwelle entweder totalreflektiert oder durch Mehrfachbrechung an Übergängen des Brechungsindex (d.h. zwischen *core* und *cladding*^{xi} zu Nullintensität abgeschwächt. Der Akzeptanzwinkel Θ relativ zur Kernnormalen ergibt sich aus dem inversen Sinus der NA und beträgt also $12,71^\circ$. Alle innerhalb $12,71^\circ$ zur Kernnormalen auftreffenden Lichtwellen werden als geführte Moden durch den Lichtwellenleiter transportiert.

Dieselben Überlegungen gelten auch für das Austreten der geführten Moden aus dem LWL, d.h. für die Signalauskopplung. Die aus dem Glasfaserkabel austretenden stark divergenten Lichtwellen werden genau dann durch einen Achromaten (plankonvex, unterhalb 380 nm wenig UV durchlässig) mit $f = 20$ mm und $d = 10$ mm parallelisiert, wenn sich die Oberfläche des LWL im Brennpunkt der Linse befindet. Auf diese Weise wird das parallelisierte Lumineszenzlicht unter Ausleuchtung des gesamten Eintrittsspalts in den Monochromator überführt.

Die Kalibrierung beider Spektrometergitter erfolgt mit Hilfe des Spektrums einer Quecksilberdampfampe. Das Winspec-Programm errechnet nach sorgfältiger Kalibrierung die maximale Auflösung des Monochromators mit dem Gitter #1 zu 0,12 nm (fokale Länge 281.4 mm) und mit dem Gitter #2 zu 0,03 nm.

^{xi} Beschichtung zwischen Kernmaterial und Schutzmantel mit im Vergleich zum Kern unterschiedlichem Brechungsindex.

4.4 Photographische Abbildung der Lumineszenz

Für ortsaufgelöste Untersuchungen der Lumineszenzphänomene am UV-MALDI-Desorptionsprozeß stehen eine abbildende Linsenoptik und eine CCD-Camera zur Verfügung.

Die photographischen Untersuchungen sind von außerhalb des Hochvakuums mit Hilfe eines sog. Tachonar-Objektivs mit einer Brennweite von 75 mm durchgeführt worden. Das Objektiv der Firma Astro (Berlin) zeichnet sich durch besonders hohe Lichtstärke aus (Lichtstärke 1:1).

Die Bildgebung erfolgt mit einer thermoelektrisch-gekühlten (-10°C max.) TE-CCD-Camera der Firma Princeton Instruments (PI), deren 25,9 x 6,7 mm² große aktive Oberfläche aus 22,5 x 22,5 µm² großen Pixeln (1152 x 298 Pixel) zusammengesetzt ist.

Die CCD-Steuerung und den Datentransfer zu einem Computer geschehen über einen PI-Controller vom Typ ST-138 mit Hilfe der Winspec Software.

Über die Software läßt sich auch der vor der Camera befindliche mechanische Shutter steuern.

Das Lichtereignis befindet sich objektseitig in einer Entfernung von minimal 81 mm. Wenn die CCD-Camera am Ende eines Tubus der Länge 145 mm angebracht wird, resultiert ein Vergrößerungsfaktor von 1,6 (vergl. Abbildung 4.11).

Die photographische Optik wird senkrecht zum Desorptionsjet und zum einfallenden Laserstrahl oberhalb der Ionenquelle mit Hilfe eines verschiebbaren Schlittens an einer senkrecht aufgebauten optischen Schiene (Spindler&Hoyer FLS95) installiert.

Um den photoaktiven CCD-Chip der Camera vor Übersättigung zu schützen und um ultraviolettes Laserstreulicht von sichtbarem Lumineszenzlicht zu trennen, werden oberhalb des obenliegenden Ionenquellenfensters 6 mm UV-Filter der Firma Schott positioniert.

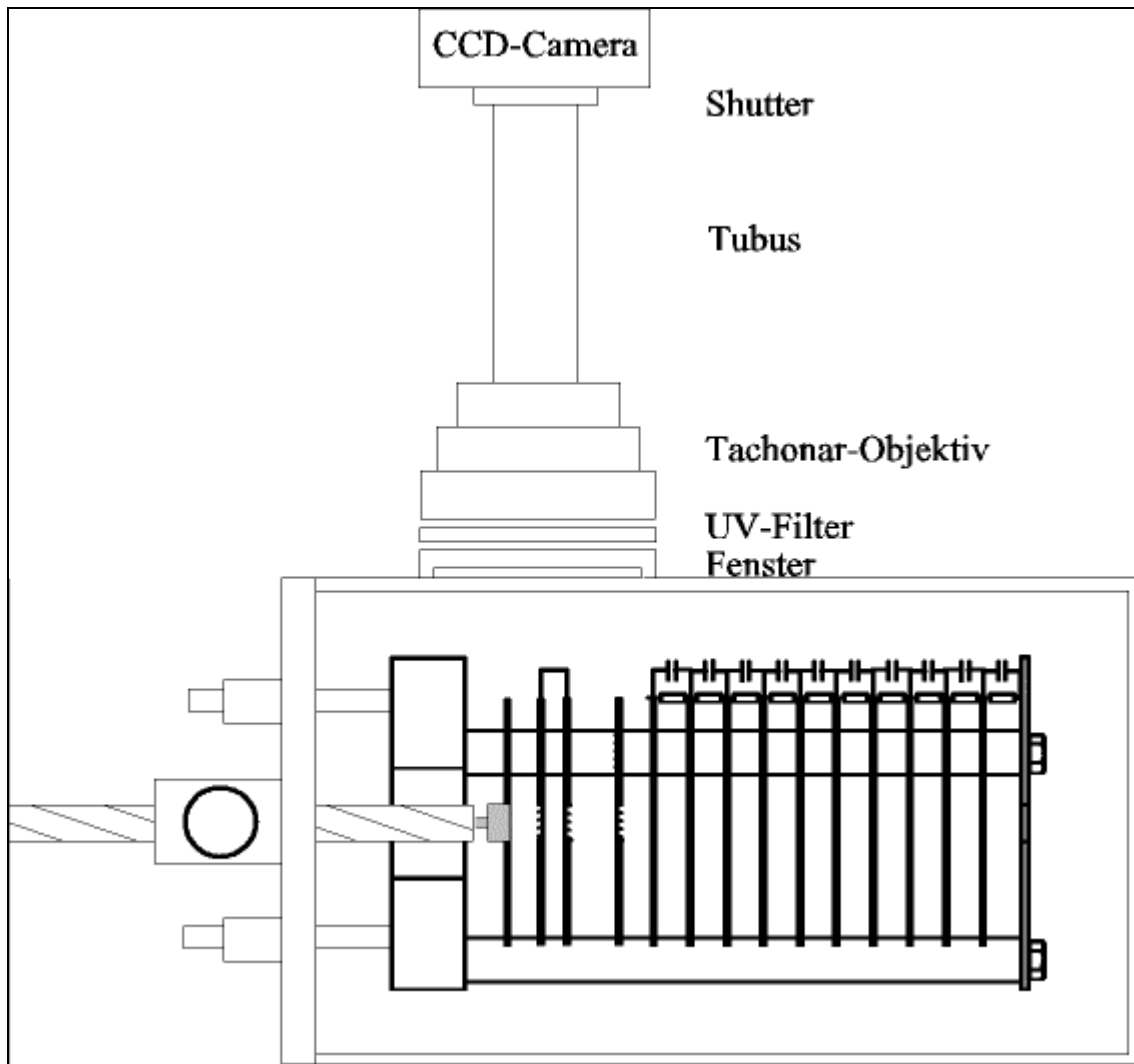


Abbildung 4.11: Versuchsaufbau zur photographischen Abbildung der Lumineszenz

5 Ergebnisse der Untersuchung des MALDI – Desorptionsprozesses

5.1 Postionisationsexperimente in der Desorptionswolke

Wie bereits im Kapitel 3 zum Thema der Vorstellungen zum Ablauf der Desorption und der Ionengenerierung in der UV-MALDI-Massenspektrometrie erläutert worden ist, expandieren in der Desorptionswolke eine ganze Reihe unterschiedlicher Spezies. Durch das elektrische Feld werden die primären und sekundären Ionen durch die in hohem Überschuß präsenten neutralen Matrixmoleküle hindurch beschleunigt.

Gerade diese Neutralen sind von besonderem Interesse bei der Ermittlung der durch den Desorptionslaserpuls erzeugten Initialgeschwindigkeit der Teilchen. Ihre Startgeschwindigkeiten lassen sich durch Postionisationsexperimente mit einem zweiten Laserpuls bestimmen (vergl. Abbildung 4.1).

Mit Hilfe solcher Experimente werden Informationen darüber gewonnen, ob die desorbierten Matrixionen eine andere Geschwindigkeitsverteilung als neutrale Matrixmoleküle aufweisen.

Wenn der zeitliche Abstand der beiden Laserpulse variiert und der Ionisierungsort konstant gehalten wird, folgt unmittelbar aus dem Einsetzen der Neutralenproduktion und ihrem Ausbleiben die Geschwindigkeitsverteilung von durch den Desorptionslaserpuls generierten Neutralen. Wenn aus diesem Experiment direkt die Geschwindigkeitsverteilung neutraler Matrixmoleküle ermittelt wird, muß die Zeitspanne der Generierung der Neutralen relativ zum eingestellten *delay* vernachlässigbar sein.

Nach Arbeiten von Vertes⁶³ et al. sowie Juhasz¹⁰⁸ et al. ist der Desorptionsprozeß innerhalb weniger zehn Nanosekunden abgeschlossen. Knochenmuss¹⁰⁹ et al. folgern aus Studien mit zwei zeitverzögerten Desorptionslaserpulsen, daß der Zeitraum der Ionengenerierung innerhalb der zeitlichen Breite des Laser liegt.

Ein solch kurzer Zeitraum der Ionengenerierung macht sich gegenüber dem Zeitunterschied zwischen Desorptionslaser und Postionisationslaser von minimal 2 µs kaum bemerkbar, aus dem auf die Geschwindigkeitsverteilung der Neutralen geschlossen wird (vergl. unten).

Zudem birgt die Signalbreite des Postionisationssignals selbst Informationen über die Dauer der Neutralenproduktion. Es ist zu vermuten, daß ein langer Prozeß zur Generierung der Neutralen sich nach der Postionisation in ein zeitlich breites Signal am Detektor übersetzt. Zeitlich kurze Ionensignale stehen im Gegensatz dazu für ebenso kurze Generierungszeiten.

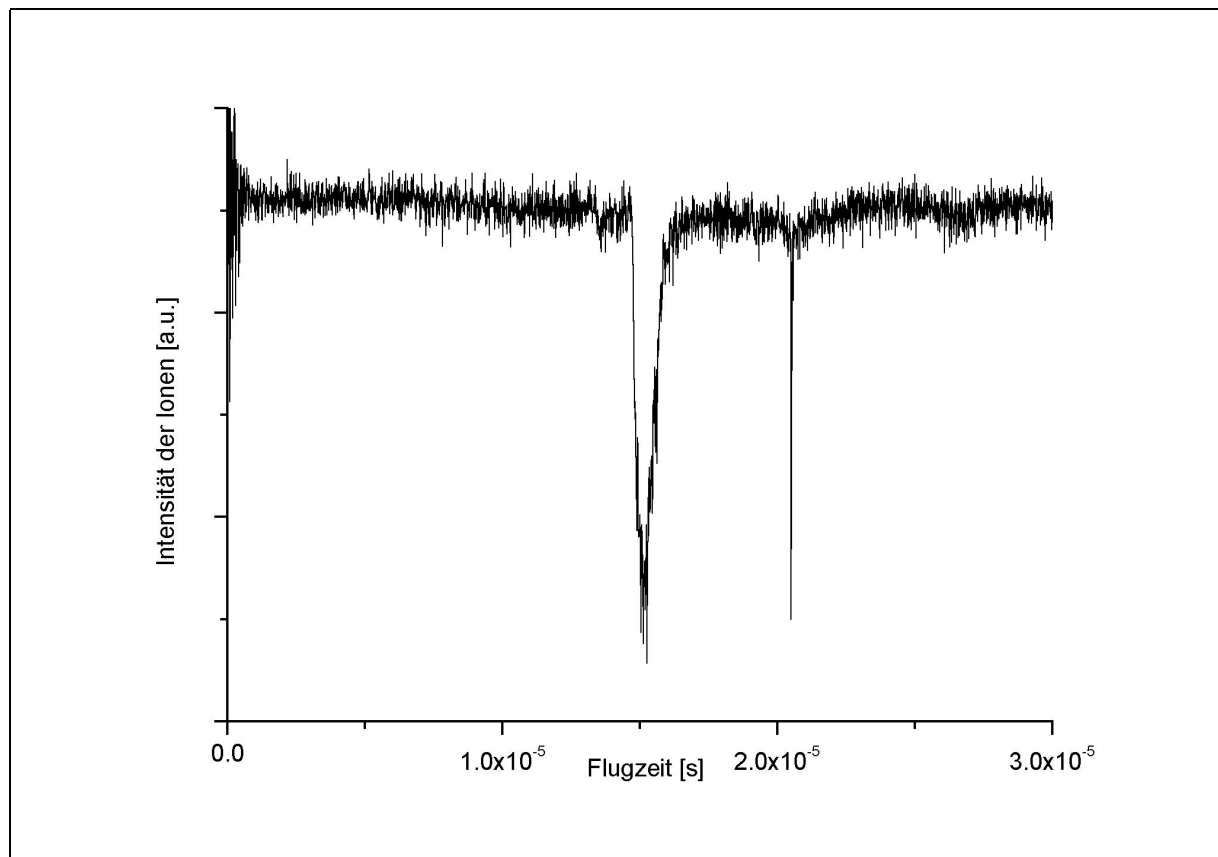


Abbildung 5.1: Postionisations-Massenspektrum von Ferulasäure

In der obigen Abbildung 5.1 ist ein Massenspektrum der Matrixsubstanz Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure) dargestellt. Der breite Massenpeak mit dem Intensitätsmaximum bei 15,2 Mikrosekunden Flugzeit wird durch die bei der Desorption erzeugten primären und sekundären Ionen erzeugt. Er spiegelt die Molekülonen $[M+H]^+$ der Ferulasäure genauso wie Fragmentionen und Cluster wider. Diese Ionen werden ohne das fokussierende PSPF-System nicht gut aufgelöst und fallen folglich in einem breiten Massenpeak zusammen.

Der zweite, scharfe Peak im Massenspektrum entsteht durch die Generierung von Ionen mit dem Postionisationslaserpuls.

Der intensive ultraviolette Laserpuls (250 nm) fragmentiert die neutralen Ferulasäuremoleküle durch Abspaltung des neutralen Fragments Kohlendioxid (Decarboxylierung). Gleichzeitig wird die Ferulasäure durch Multiphotonenionisation¹⁶ ionisiert (vergl. Abbildung 5.2).

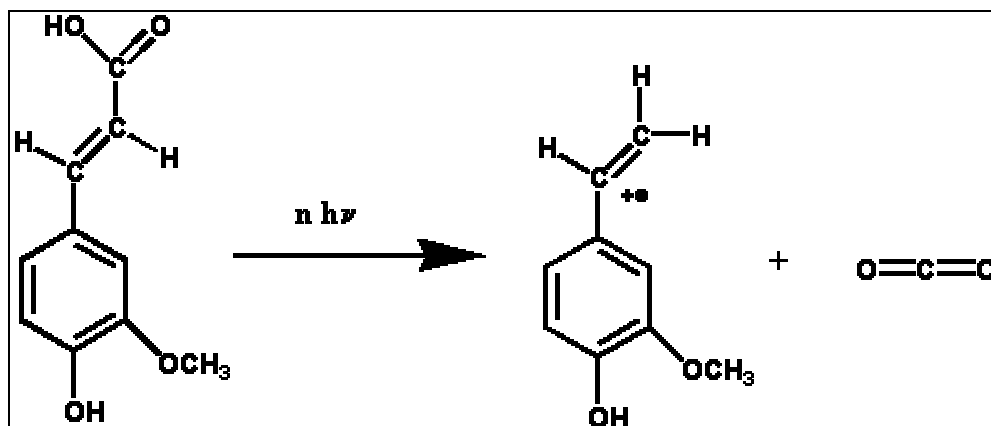


Abbildung 5.2: Fragmentierung und Ionisierung von Ferulasäure

Da die Fragmentierung und die Ionisation im elektrischen Potentialgradienten in einem Abstand von 2,5 mm von der Oberfläche der Probe entfernt erfolgen, werden die Fragmentionen (*odd electron ions*, OE^+) in Richtung auf den Detektor beschleunigt. Die Breite des Fragmentationensignals in der Abbildung 5.1 liegt mit 28 ns deutlich oberhalb der Pulsdauer des OPO-Lasers (8 ns - 10 ns). Dieser Effekt kann sowohl apparative als auch physikalische Gründe haben. Zum einen arbeiten der Desorptionslaser und der Ionisationslaser nicht phasenstarr, d.h. zwischen beiden entsteht immer ein *jitter*, der sich signalverbreiternd auswirkt. Zum anderen spiegelt die Signalbreite auch die räumliche Ausdehnung des Ionisationslaser-Fokus wider, die über Potentialunterschiede in Flugzeitverbreiterungen übersetzt wird.

Das bedeutet, daß entgegen der Vermutungen aus der Flugzeitbreite des Fragmentationensignals nicht die Zeitspanne der Ionengenerierung bestimmt werden kann, weil dieser Beitrag relativ zur Laserbreite und zu den geschilderten Effekten der Signalverbreiterung nicht meßbar ist.

Wenn das zeitliche *delay* zwischen Desorptionslaserpuls und dem Fragmentierungslaser verändert wird, wird für jede einzelne Zeitspanne jeweils ein Massenspektrum der prompten Ionen und der Fragmentionen wie in Abbildung 5.1 erhalten.

Die Abbildung 5.3 zeigt den *overlay* aus 18 solcher Einzelmassenspektren zwischen 17 μs und 27 Mikrosekunden Flugzeit. In allen Massenspektren liegt das breite Signal der durch den Desorptionslaser erzeugten Ionen an derselben Stelle und wird in der folgenden Abbildung deshalb nicht dargestellt.

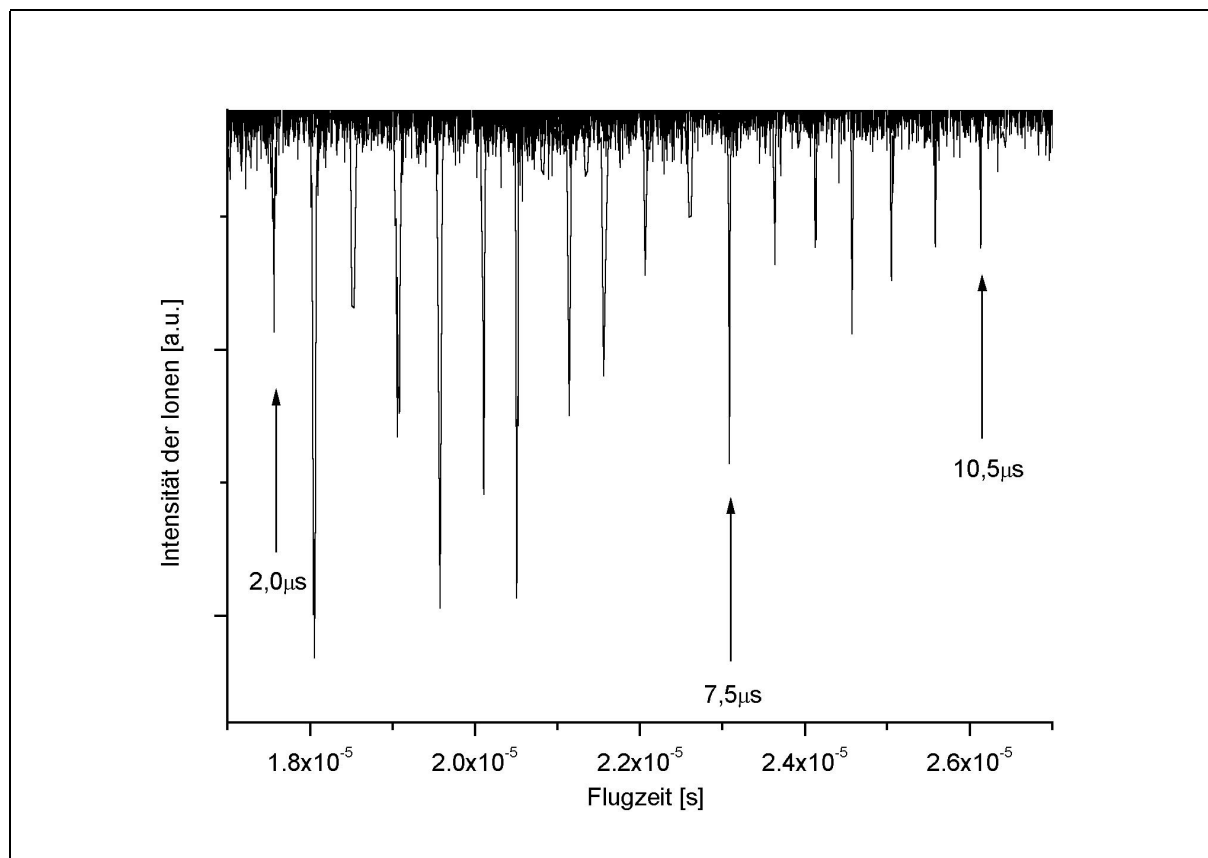


Abbildung 5.3: Overlay aus 18 Positionierungsexperimenten mit unterschiedlichem delay

Wenn das *delay* zwischen dem Desorptionslaser und dem Fragmentierungslaser zwischen Null Sekunden und 15 Mikrosekunden in 500 ns – Schritten erhöht wird, setzt ab $2,0 \mu\text{s}$ erstmals das Fragmentationensignal ein. Fragmentationen lassen sich noch bis $10,5 \mu\text{s}$ nach dem Triggerereignis erzeugen und nachweisen.

Die schnellsten neutralen Ferulasäuremoleküle legen die 2,5 mm lange Flugstrecke aufgrund ihrer durch den Desorptionslaserpuls hervorgerufenen Initialgeschwindigkeit in $2,0 \mu\text{s}$ zurück. Für diese Moleküle resultiert also eine Initialgeschwindigkeit von 1250 m/s.

Daß $10,5 \mu\text{s}$ nach dem *trigger* immer noch neutrale Ferulasäure-Moleküle den Nachionisationsort passieren können, kann prinzipiell zwei Ursachen haben:

- Die Ionen werden nach dem 5 ns - 6 ns langen Desorptionslaserpuls noch für sehr lange Zeiträume erzeugt und verlassen auch dann noch die feste Matrix mit relativ hoher Geschwindigkeit. Diese „thermische“ Interpretation¹¹⁰ des Desorptionsverhaltens erweist sich vor dem Hintergrund der in den Kapiteln 5.2 und 5.3 gezeigten optischen Untersuchungen als unwahrscheinlich.
- Ionen und Neutrale werden innerhalb kurzer Zeiträume (einige zehn Nanosekunden) desorbiert und ionisiert. Die Geschwindigkeitsverteilung der neutralen Moleküle ist sehr breit.

Nach der letzteren Interpretation, die durch die Arbeiten von Vertes⁶³ et al. gestützt wird, folgt für die nach 10,5 μ s ionisierten Neutralen eine Geschwindigkeit von etwa 240 m/s. Und die Einhüllende der Signale in Abbildung 5.3 liefert unmittelbar die Durchschnittsgeschwindigkeit der desorbierten neutralen Ferulasäuremoleküle.

Die initiale Geschwindigkeitsverteilung der neutralen Ferulasäuremoleküle ist in der Abbildung 5.4 dargestellt. Aufgetragen sind die Peakintensitäten der Postionisations-Signale gegen die Geschwindigkeit. Ein Gauss-Fit liefert die Verteilung der Geschwindigkeiten, die für neutrale Ferulasäuremoleküle 737 ± 41 m/s beträgt. Der relative Fehler bei der Anpassung der Meßwerte durch die Fitfunktion ist 5,7 %. Die Peakintensitäten der Postionisations-Signale streuen relativ stark. Diese Meßunsicherheiten lassen sich durch mehrfache Wiederholungen des Experimentes verringern.

Nach Umrechnung der Geschwindigkeitsdaten in die Translationsenergien nach der Formel $E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} mv^2$ folgt, daß neutrale Ferulasäuremoleküle durch den Desorptionslaserschuß mit kinetischen Überschußenergien zwischen maximal 1,21 eV und minimal 0,04 eV freigesetzt werden, wobei der Mittelwert bei 0,61 eV liegt.

Diese experimentellen Ergebnisse zeigen, daß die durch Computersimulation nach dem *breathing sphere*-Modell errechneten Maximal- und Durchschnittsgeschwindigkeiten der Neutralen deutlich zu niedrig ermittelt worden sind (vergl. Kapitel 3.1.1). Dort bedarf es daher einer Korrektur der Parametersätze.

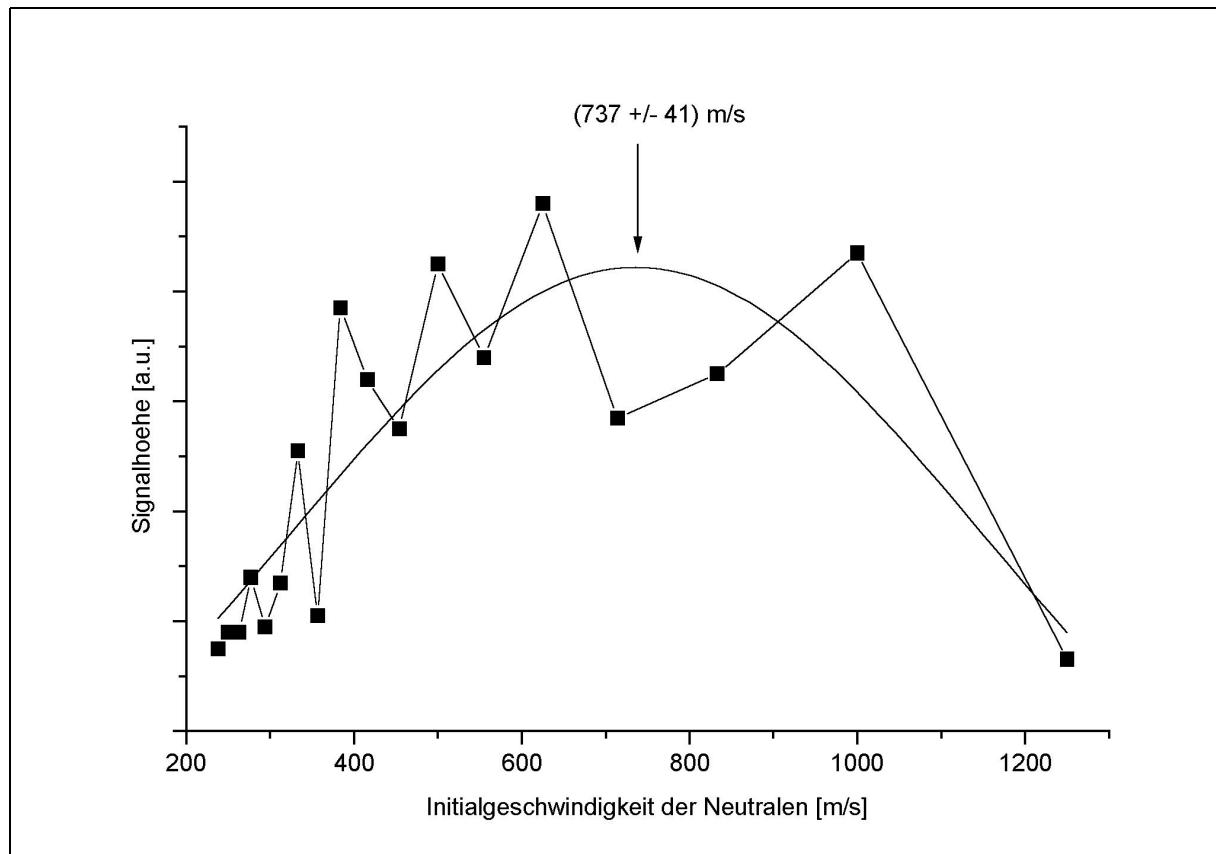


Abbildung 5.4: Initial-Geschwindigkeitsverteilung neutraler Ferulasäuremoleküle

Solche Daten sind zum Vergleich mit anderen massenspektrometrischen und optischen Verfahren zur Bestimmung der Initialgeschwindigkeiten von Ionen bei der Desorption wertvoll. So haben Juhasz¹⁰⁸ et al. die Startgeschwindigkeiten desorbierter Matrix- und Analytionen mit Hilfe von *delayed extraction*-Experimenten bestimmt:

Für die Matrixionen 3-HPA und Sinapinsäure liegen sie bei ca. 634 ± 39 m/s bzw. 658 ± 27 m/s, während der Analyt Rinderinsulin ($m/z = 5734$) aus diesen beiden Matrices mit 537 ± 18 m/s bzw. 352 ± 15 m/s propagiert. Glückmann¹¹¹ und Mitarbeiter bestimmen die Initialgeschwindigkeit von protoniertem Rinderinsulin $[M+H]^+$ aus Ferulasäure zu 410 m/s bei einer Desorptionswellenlänge von 337 nm. In der Literatur publizierte Daten zu den Startgeschwindigkeiten von prompt erzeugten Ferulasäureionen existieren zur Zeit noch nicht. Es ist allerdings zu vermuten, daß sie sich nicht wesentlich von den Werten der anderen Matrixsubstanzen unterscheiden werden.

Schlußfolgernd läßt sich daher feststellen, daß neutrale Matrixmoleküle unter merklich höherer Durchschnittsgeschwindigkeit in das Vakuum expandieren als Matrixionen. Möglicherweise wird für die Ionisation ein Teil der in den äußeren Freiheitsgraden zur Verfügung stehenden Energie verbraucht.

5.2 Optische Spektroskopie am Desorptionsprozeß

In der UV-MALDI Massenspektrometrie werden eine Reihe unterschiedlicher Matrices eingesetzt, die das Laserlicht gut absorbieren, den Analyten in die Gasphase desorbieren und durch Protonenübertragung zu ionisieren vermögen.

Aus der Fülle der möglichen Matrixsubstanzen werden hier vier häufig verwendete Vertreter eingesetzt, um über ihr zeitliches und spektrales Verhalten während der Desorption Informationen zum Desorptionsvorgang zu gewinnen. Durch die Photographie mit einer gut ortsauflösenden Optik soll im Kapitel 5.3 die räumliche Ausdehnung der Desorptionswolke untersucht und Aussagen zur dreidimensionalen Verteilung der Teilchendichte getroffen werden.

Durch die Verknüpfung der spektralen mit den zeitlichen und örtlichen Informationen soll eine genauere Einsicht in die hochdynamischen Vorgänge während der Laserdesorption gewonnen werden.

Da parallel zu diesen Untersuchungen das Massenspektrometer vollständig funktionsfähig bleibt, können in jedem Stadium des Experiments massenspektrometrische Daten mit den spektroskopischen Ergebnissen verglichen werden.

Die Laserdesorption eines Festkörpervolumens aus dem Kristallverband ist durch Lumineszenzerscheinungen begleitet, wenn Matrix oder Analyt bei der verwendeten Laserwellenlänge absorbieren und die Energie nicht gänzlich über strahlungslose Prozesse dissipieren. Deshalb ist es bei der MALDI schwierig, Lumineszenz der gasförmigen Phase von der des desintegrierenden Festkörpers zu unterscheiden:

- Dicht oberhalb der Probenoberfläche wird durch die Desorption ein Mikrovolumen „überdichten“ Gases ausgebildet, das in das Vakuum propagiert⁵⁹. Somit wird die Grenze zwischen gasförmiger und fester Phase verwischt.
- In diesem dichten Gasvolumen ist strahlungslose Deaktivierung (*quenching*) infolge intermolekularer Stöße unterschiedlicher Spezies sehr wahrscheinlich. Das Lumineszenzlicht aus der Gasphase wird also wenig intensiv sein und sich nicht weit in Vorwärtsrichtung ausbreiten.

- Der nicht absorbierte Anteil der eingestrahlten Laserenergie wird durch elastische Streuung an Matrixkristallen und der Probenträgeroberfläche wieder abgegeben. Dieser Rayleigh-Streuungsanteil ist um so höher, je steiler der Einfallswinkel des Lasers ist¹¹².

5.2.1 Zeitaufgelöste Lumineszenzspektroskopie am Desorptionsprozeß

5.2.1.1 Versuche mit einem hochverstärkten Photomultiplier

Durch die Untersuchung der bei dem Desorptionsprozeß auftretenden Lumineszenzerscheinungen in Abhängigkeit von der Zeit läßt sich entscheiden, zu welchem Zeitpunkt relativ zum Laserschuß Lichtemission von festen oder gasförmigen Spezies einsetzt, ihr Maximum durchläuft und wie lange sie andauert.

Es soll festgestellt werden, inwieweit die Fluoreszenz mit der Energiedissipation über Vibrationsrelaxation konkurrieren kann. Aus solchen Ergebnissen läßt sich folgern, ob Fluoreszenz nur aus der festen Phase heraus auftritt oder ob die in die Gasphase propagierenden angeregten Matrixmoleküle noch lumineszieren.

Wenn die Lebensdauer τ der angeregten Zustände eines Teilchens in der Desorptionswolke bestimmbar wäre, trüge diese Erkenntnis zum Verständnis der komplexen Prozesse in der Wolke bei, z.B. wenn sich die Größe des Wertes τ zu einem bestimmten Zeitpunkt nach dem Laserschuß ändert, so kann das z.B. auf Clusterbildung im *plume* oder auf Energieabgabe durch Stöße hindeuten. Auf diese Weise kann die Lebensdauer der angeregten Zustände Informationen über die Teilchendichte in der Desorptionswolke liefern.

Wenn parallel zur Aufzeichnung des Lumineszenzsignals ein Massenspektrum aquiriert wird, ist es sicher, daß die Laserleistung ausgereicht hat, um Substanz zu verdampfen und zu ionisieren.

Das MALDI-Lin-ToF Massenspektrometer ist für spektroskopische Untersuchungen am Desorptionsprozeß nicht verändert worden, um die eingestellten Bedingungen mit denen beim Betrieb als MALDI-Ionenquelle gearbeitet wird, vergleichbar zu halten. Allerdings werden

die Repeller- und die erste Beschleunigungs-Elektrode mit schwarzer Pappe beklebt, um Lichtreflexionen zu vermeiden.

Die Ionenquelle wird bei allen Versuchen im Vakuum von ca. 10^{-6} mbar betrieben. Die Probenpräparation erfolgt nach der üblichen „*dried droplet*“-Methode auf einen Probenträger aus Stahl.

Es ist evident, daß neben der Lichtemission aus der festen Phase auch Emission aus angeregten Zuständen vieler unterschiedlicher Spezies in der Gasphase auftreten kann, von denen die im Massenspektrum detektierten Ionen nur ein kleiner Teil sind³³.

Bei der Aufzeichnung der Gesamtlumineszenzintensität als Funktion der Zeit in einem bestimmten Raumwinkel senkrecht zum Desorptionsort und zum einfallenden Laserstrahl werden alle strahlungsemitterenden Prozesse integral erfaßt (zum Versuchsaufbau vergl. Kap. 4.3, Abbildung 4.7). Diese strahlenden Prozesse lassen sich nur dann untereinander differenzieren, wenn sie zeitlich hinlänglich sukzessive ablaufen, d.h. sich nicht völlig überlagern und sich in ihrer Intensität nicht um Größenordnungen unterscheiden.

Zu diesem Zweck wird, wie im Kapitel 4.3.1.1 erläutert, zunächst ein ungepulst betriebener Photomultiplier (mit Hamamatsu R928-Röhre) verwendet. Im hochverstärkten Standard-setup werden über Spannungsteilung alle neun Dynoden genutzt, so daß der PMT bei einer Photokathodenspannung von -1000 V eine Verstärkung von 10^7 erreichen kann.

Zur Vermeidung von Übersättigung der Photokathode durch hohe Intensität an durch die Probe gestreutem Laserlicht wird die Photokathode durch insgesamt 7 mm starke Ultraviolettfilter geschützt (Gesamttransmission bei 355 nm $\ll 10^{-5}$). Der Photomultiplier wird senkrecht zu der Probenoberfläche und senkrecht zum Desorptionslaser in minimal 81 mm Entfernung außerhalb der Ionenquelle auf dem obenliegenden Fenster positioniert und sorgfältig gegen Streulicht geschützt.

Das PMT-Signal wird an den 50 Ω -Eingang des rauscharmen Verstärker der Firma Stanford Research übergeben und wahlweise 5 oder 25-fach verstärkt.

Das verstärkte Signal wird von einem Oszilloskop aufgezeichnet, über 32 Schuß gemittelt und gespeichert. Das Oszilloskop wird über eine Photodiode mit dem Laser synchronisiert und getriggert. Die über die schnelle Photodiode bestimmte Halbwertsbreite des Nd-YAG-Lasers auf der frequenzverdreifachten Fundamentalen bei 355 nm beträgt ca. 17 ns. Es ist möglich,

daß die schnelle Photodiode die Pulsdauer als zu lang angibt. Laut Spectra Physics Laser-Handbuch hat die Frequenzverdreifachte eine Pulslänge von 5-6 ns.

Die Ausgangsleistung des Lasers beträgt bei 355 nm nach dem Pellim-Broka (Trennung der 532 nm Linie von der frequenzverdreifachten Fundamentalen bei 355 nm) ca. 5 mJ. Durch zweifaches Umspiegeln an Suprasilfenstern und Abschwächung durch eine Iris wird die Leistung auf maximal ca. 0,2 mJ direkt vor dem Eintrittsfenster in die Ionenquelle gesenkt.

Zunächst werden Blindspektren durch 355 nm-Laserbeschuß eines blanken Probenträgers aufgenommen, um das Reflexions- und Streuverhalten der Stahloberfläche zu ermitteln.

In der ersten Serie von Versuchen wird die Antwort des Multipliers in Abhängigkeit von der angelegten Spannung untersucht. Sowohl der Verstärkungsfaktor als auch die *transition time* des PMT sind Funktionen der Kathodenspannung, die über Spannungsteiler für das Potential der Dynoden sorgt.

Es muß Sorge dafür getragen werden, daß bei unterschiedlichen Kathodenspannungen Dauer und Intensität des eigentlichen Meßsignals nicht verfälscht werden.

Abbildung 5.5 zeigt zwei zusammengehörige Gruppen von Signalen. Als Signale mit kleiner Intensität erscheinen die Hintergrundspektren unter 355 nm-Laserbeschuß des blanken Probenträgers, die zum Vergleich in die Graphik aufgenommen sind. Trotz der Ultraviolettfiter detektiert der Photomultiplier eine geringe Menge gestreutes Laserlicht.

Die Halbwertsbreiten dieser Streulichtsignale betragen unabhängig von der Spannung am PMT ca. 18 ns, was sich mit der von der Photodiode detektierten Pulsdauer deckt.

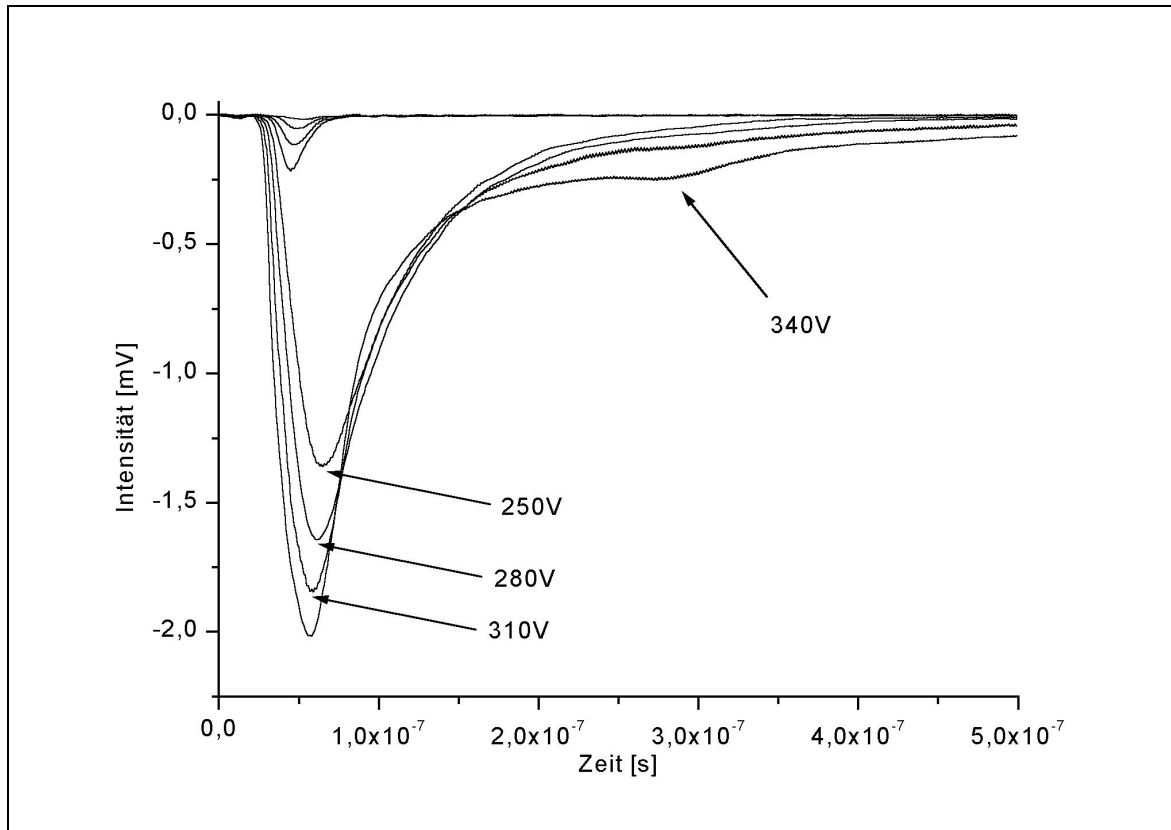


Abbildung 5.5: Gesamtlumineszenzintensität von 3-Hydroxypicolinsäure in Abhängigkeit der Kathodenspannung des Photomultipliers

Die vier zusammengehörigen Signale mit hoher Intensität zeigen die Gesamtlumineszenz-Intensität der Matrixsubstanz als Funktion der Zeit.

Die Lumineszenzsignale bei Laserbeschuß der Matrixsubstanz 3-Hydroxypicolinsäure weisen unter denselben Bedingungen wie für den blanken Probenträger um den Faktor 9 höhere Intensitäten auf.

In der Gesamtmeßzeit von 500 ns steigt die Lumineszenzsignal schnell an, durchläuft nach 55 ns bis 65 ns ein Maximum und sinkt wieder auf den Nullwert.

Versuche mit größerer Meßzeit haben gezeigt, daß bei allen untersuchten Matrices nach 500 ns keine weiteren Signale mehr auftreten, d.h. eine Bevölkerung von langlebigen Triplettzuständen, aus denen Phosphoreszenz erfolgen kann, findet nicht statt oder ist selbst für die Detektion mit dem hochverstärkenden PMT zu lichtschwach.

Bei der Erhöhung der Photokathodenspannung am PMT in vier 30 V-Schritten von 250 V auf 340 V wird das Streulichtsignal aufgrund höherer Verstärkung größer. Infolge der höheren Spannung sinkt die Signaldurchgangszeit („*transition time*“) des PMT, so daß die Detektion der Lumineszenzsignale entsprechend früher erfolgt (vergl. Abbildung 5.5).

Die Antwort des PMT auf das Laserstreulichtsignal setzt etwa 31 ns nach dem Triggerereignis ein. Dieses *delay* wird neben den Signallaufzeiten in den (kurz gewählten) BNC-Kabeln und der Ansprechzeit des Oszilloskops vor allem durch die *transition time* des PMT hervorgerufen.

Das Abklingen der Lumineszenz erfolgt in Abhängigkeit der Lebensdauer des verantwortlichen angeregten Zustandes, und zwar nach einer Exponentialfunktion. Fluoreszieren mehrere Spezies, z.B. neben neutralen Matrixmolekülen auch die ionisierten Moleküle, können überlagerte Abklingfunktionen erwartet werden. Zudem gilt es, auch den Beitrag des Aggregatzustandes zu berücksichtigen, weil sich die Lebensdauern von Molekülen in der Gasphase von solchen in der festen Phase unterscheiden.

Trotz der Vielfalt der möglicherweise beteiligten Zustände ist es sinnvoll, die Laser-induzierte Fluoreszenzemission zeitlich integral zu erfassen, um einen Einstieg in die Zeitdomäne der beteiligten Prozesse zu erlangen.

Die Lebensdauer τ eines beteiligten angeregten Zustandes läßt sich aus der Auftragung des Logarithmus der Lumineszenzintensität gegen die Zeit ermitteln (vergl. Kapitel 3.3). Nach Anpassung einer Ausgleichsgeraden an die fallende Flanke ergibt die Steigung der Geraden unmittelbar die Zeitkonstante τ .

Bei der praktischen Bestimmung der Lebenszeiten entsteht die Schwierigkeit, daß der Photomultiplier nicht die korrekte Abklingfunktion der Fluoreszenz wiedergibt, weil mit steigender Lumineszenzintensität aufgrund nicht vermeidbarer elektronischer Phänomene ab einem Schwellenwert Signalreflexionen auftreten.

Daher wird der Photomultiplier zunächst nicht auf seiner maximalen Kathodenspannung betrieben. Trotzdem erscheint ab einer Photokathodenspannung von 340 V ein zweiter Peak im LIF(t)-Spektrum, der die Abklingkurve des Lumineszenzsignals dergestalt verfälscht, daß sie flacher wird (vergl. Lumineszenzkurve für 340 V in Abbildung 5.5).

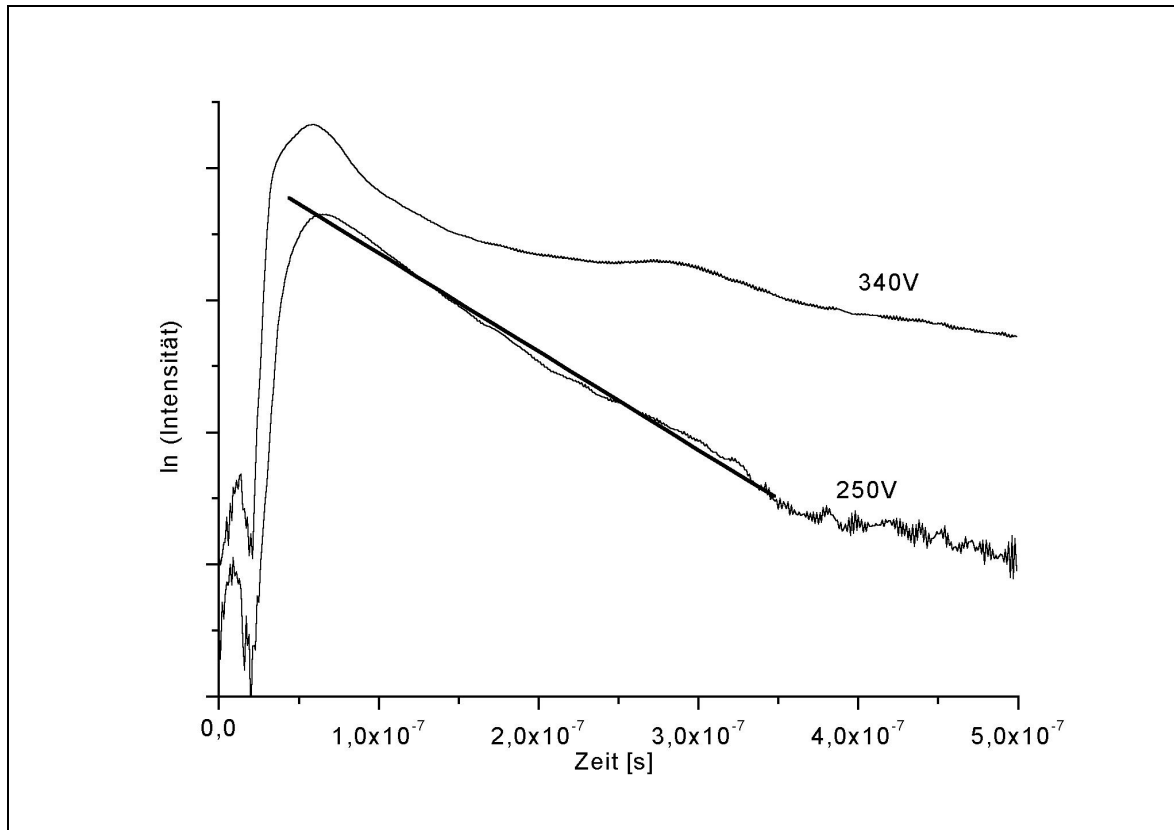


Abbildung 5.6: Logarithmische Darstellung des Gesamt-Lumineszenzsignals von 3-HPA bei einer Photokathodenspannung von 250 V (untere Kurve) und bei 340 V (obere Kurve)

Die Verfälschung des Lumineszenzsignals von 3-HPA wird durch die logarithmische Auftragung in der obigen Abbildung 5.6 deutlich gemacht.

Die obere Kurve zeigt die nicht korrekt wiedergegebene Zeitabhängigkeit der Fluoreszenz von 3-HPA bei einer Photokathodenspannung von 340 V, die untere das Lumineszenzsignal bei 250 V. Im Bereich unter hundert Nanosekunden nach dem Laserpuls weist das Signal bei 340 V ein deutliches Überschwingen auf. Dieser Effekt wird durch das 355 nm-Streulicht des Lasers erzeugt. Das 280 ns später einsetzende zweite Nebenmaximum rührt allein aus der Reflexion des Hauptmaximums. Die Signalreflexion wird durch nicht ausreichend abgegliche Abschlußwiderstände zwischen dem Photomultiplier (22 k Ω) und dem Eingang des aufzeichnenden Oszilloskops evoziert (50 Ω) und ist mit derzeitiger Photomultiplier-Technik nicht zu vermeiden.

Die Ausbildung des Nebenmaximums verfälscht zusätzlich die Abklingfunktion, so daß diese nicht mehr sinnvoll auswertbar ist.

Beim Vergleich des 340 V-Signals mit der bei kleinerer Spannung erzeugten Antwort des PMT wird deutlich, daß bei 250 V die Signalreflexion noch nicht eintritt. Trotz der nun möglichen Auswertung des „Lumineszenz“-*decay* ist zu vermuten (vergl. Graph mit Ausgleichsgerade in der Abbildung 5.6), daß die aus der Steigung ermittelte Lebenszeit allein die Summe der Abklingfunktion der Dynoden des Photomultipliers beschreibt.

Dies wird durch Versuche mit anderen Matrixsubstanzen bestätigt, für welche im Rahmen der Meßgenauigkeit nach Auftragung von $\ln(\text{Intensität})$ gegen die Zeit t dieselbe Lebenszeit errechnet wird.

Die Lumineszenz-Abklingfunktionen sind folglich nicht charakteristisch für das Abklingen der Lumineszenz selbst, sondern beschreiben hauptsächlich das Verhalten der Photomultiplier-Röhre und ihrer Verschaltung selbst. Daraus folgt, daß mit dieser Verschaltung des PMT nur eingeschränkt Aussagen über die Dauer der Lumineszenz gemacht werden können.

Zusammenfassend läßt sich trotzdem folgern:

- Spätestens 500 ns nach dem Desorptions-Laserschuß kann auch mit dem hochverstärkten, also sehr sensitiven Photomultiplier keine Lumineszenz mehr detektiert werden.
- Die Dauer der Lumineszenz liegt in derselben Größenordnung oder ist kürzer als die Ansprech- und Signaldurchgangszeit des Photomultipliers.
- Bei 3-HPA sind weder verzögerte Fluoreszenz noch Phosphoreszenz zu detektieren.

Diese Ergebnisse koinzidieren insoweit nicht mit den von Ehring⁶¹ et al veröffentlichten Untersuchungen, als die Autoren für 3-HPA verzögerte Fluoreszenz nach $\Delta t = 19 \mu\text{s}$ mit einer Lebenszeit von $\tau = 3,8 \mu\text{s}$ finden. Des weiteren detektieren die Autoren bei $\lambda \sim 500 \text{ nm}$ ein Signal, das als Phosphoreszenz gedeutet wird und dessen Lebenszeit aufgrund zu kleiner Intensität nicht bestimmt werden kann.

Anhand der in diesem Kapitel vorgestellten Experimente läßt sich vermuten, daß der in den Arbeiten von Ehring verwandte *optical multichannel analyzer* (OMA2000) vergleichbare Phänomene der Signalreflexion zeigt. Diese häufig zitierten Laser-induzierten Fluoreszenz-Messungen weisen ebenfalls das typische „Übersteuern“ infolge der Vervielfachung des

Laserstreulichts auf. Da die $\ln(I_{LIF})(t)$ -Darstellung zusätzlich auf die ersten 80 ns beschränkt ist und die Anpassung der Ausgleichsgeraden auf wenigen Punkten beruht, ist anzunehmen, daß die Fluoreszenzlebenszeiten der Matrixsubstanzen (2,5-DHB, $\tau = 5 \pm 1$ ns; 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure, $\tau = 5 \pm 1$ ns) nicht korrekt bestimmt worden sind.

5.2.1.2 Versuche mit einem schnellen Photomultiplier

Da die kurzlebigen Fluoreszenz-Ereignisse mit dem Standard-setup des PMT nicht zufriedenstellend aufgelöst werden können, ist im Rahmen dieser Arbeit ein schnelleres Detektionssystem entwickelt worden (vergl. Kapitel 4.3.1.1).

Die Ansprech- und die Signaldurchgangszeiten eines Photomultipliers lassen sich verkürzen, indem nicht alle neun Dynoden zur Signalverstärkung genutzt werden¹⁰⁶.

Werden nur die ersten fünf Dynoden zur Verstärkung und die sechste Dynode als Anode genutzt, läßt sich eine Ansprechzeit des Photomultipliers von 300 ps realisieren. Durch eine solche Beschaltung sinkt allerdings die Signalverstärkung um vier bis fünf Zehnerpotenzen. Ein zusätzlicher Vorteil der Beschaltung besteht darin, daß durch die geringere Signalverstärkung die Raumladungseffekte am Ende der Vervielfachung unterdrückt werden, da die erzeugten Ströme kleiner sind.

Unter Nutzung der schnellen Photovervielfacherschaltung wird die Zeitdomäne der Lumineszenz bei der Laserverdampfung verschiedener Matrixsubstanzen erneut untersucht, um die mit dem hochverstärkten PMT gezogenen Rückschlüsse zu verifizieren.

Der schnelle Photomultiplier wird bei einer Kathodenspannung von -1000 V betrieben. Das Signal wird an den 50Ω -Eingang des Stanford Research-Verstärkers übergeben, 25-fach verstärkt und auf dem Oszilloskop gemittelt und gespeichert.

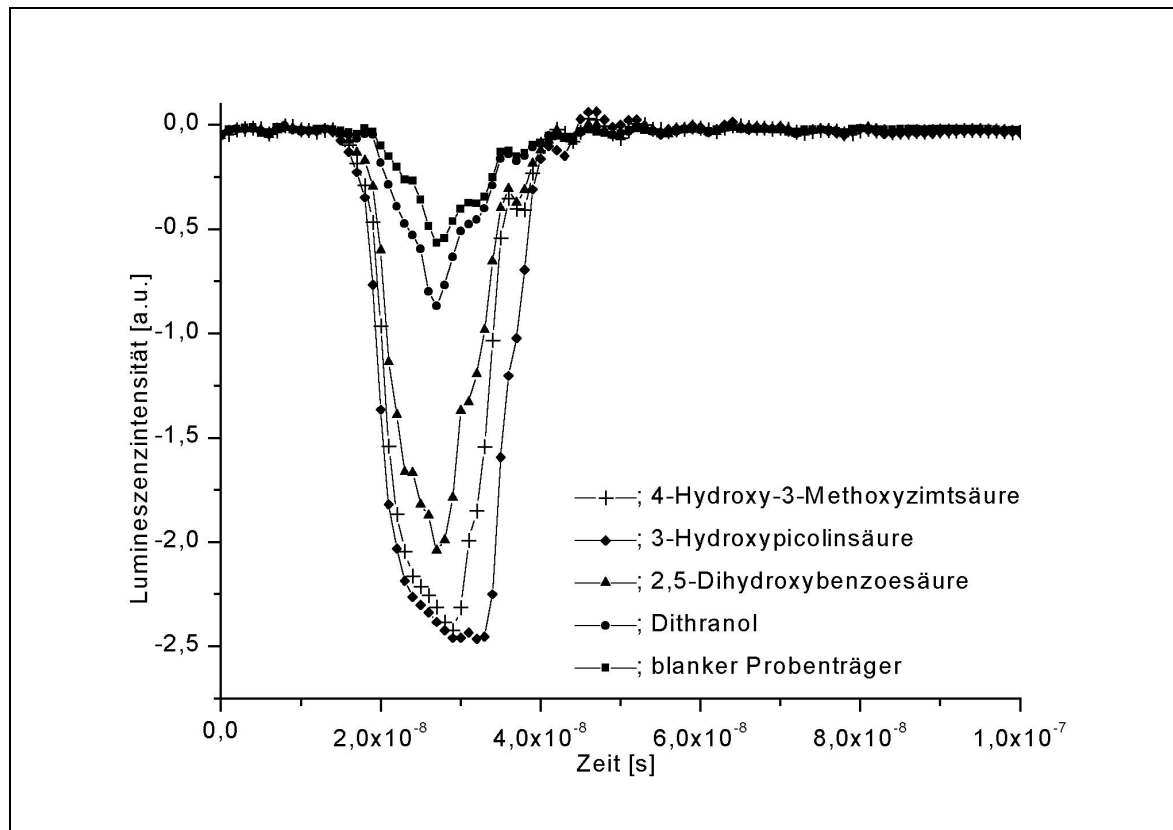


Abbildung 5.7: Lumineszenzdauer bei verschiedenen Matrices

Abbildung 5.7 zeigt die Dauer der Lumineszenzerscheinungen verschiedener Matrixsubstanzen sowie im Vergleich dazu das Laserstreulicht-Signal des blanken Probenträgers. Die Laserleistung beträgt konstant 0,2 mJ vor dem Eintrittsfenster in die Ionenquelle.

Das Lumineszenzereignis setzt bei allen vier Matrixsubstanzen ca. 15 ns nach dem Triggerereignis ein und ist nach ca. 40 ns beendet, so daß die Basisbreite der Peaks mit maximal rund 25 ns detektiert wird. 3-Hydroxypicolinsäure weist mit 17 ns die größte und Dithranol mit 10 ns die kleinste Halbwertsbreite der Peaks auf (vergl. Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1

	Basisbreite [ns]	Halbwertsbreite [ns]
3-Hydroxypicolinsäure	26	17
4-Hydroxy-3-Methoxyzimsäure	26	13
2,5-Dihydroxybenzoesäure	26	12
Dithranol	22	10
blanker Träger	22	10

Die Zimt-, Picolin- und Benzoessäurederivate weisen im Vergleich zu Dithranol eine deutlich höhere Lumineszenzintensität auf. Dithranol zeigt eine nur geringfügig stärkere Fluoreszenz als das Streulichtsignal des blanken Probenträgers. Die Form der Dithranolkurve ähnelt stark der des blanken Probenträgers. Die Lumineszenzintensität wird nach den in dieser Arbeit gemachten Erfahrungen auch durch die Schichtdicke und nicht minder durch die Polykristallinität der auf dem Probenträger auskristallisierten Matrixsubstanzen beeinflusst^{xii}. Einflüsse der Kristallstruktur auf den Desorptionsprozeß werden im Kapitel 5.3 eingehender besprochen werden.

Die Lumineszenzdauer der vier Matrixsubstanzen entspricht in etwa der Pulsdauer des Lasers. Lumineszenz tritt ausschließlich zeitgleich mit dem Laserpuls auf. Die Signaldauer der vier chemisch unterschiedlichen Matrixsubstanzen untereinander unterscheidet sich nicht signifikant und es sind keine verzögerten Fluoreszenz-Signale zu erkennen.

Die Verwendung eines schnellen Photomultipliers zur Untersuchung der Zeitdomäne der Desorption zeigt deutlich, daß die Dauer der Lumineszenz nicht so groß ist, wie sie durch den hochverstärkten PMT detektiert wird. Die aus den Experimenten in Kapitel 5.2.1.1 gezogenen Rückschlüsse zur Dauer und Art der Lumineszenz sind trotzdem zutreffend.

Durch die Auftragung des natürlichen Logarithmus der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit ließe sich aus der Steigung der linearen Fitfunktion die Lebensdauer des beteiligten Zustandes errechnen, wenn die Fluoreszenz nach einer oder mehreren Exponentialfunktionen abfällt. Wie in Abbildung 5.7 zu erkennen ist, folgt keine der vier untersuchten Matrixsubstanzen einer solchen *decay*-Funktion.

Die Lumineszenzmaxima der Zimtsäure- und Picolinsäurederivate sind zeitlich gegenüber dem Laserstreulichtsignal des blanken Probenträgers um ca. 2 ns verschoben. Die Signalform mit im Bereich der Peakmaxima nach größeren Zeiten hin steigenden Intensitäten deutet darauf hin, daß sich diese Peaks aus zwei überlagerten Funktionen zusammensetzen. Dieses

^{xii} Große Schichtdicken scheinen sich positiv auf die Lumineszenz-Signalintensität auszuwirken. Die Löslichkeiten der vier Matrixsubstanzen in unterschiedlichen Lösungsmitteln beeinflussen das Kristallisationsverhalten. Die aromatischen Carbonsäuren neigen bei der *dried droplet*-Präparation zur Ausbildung größerer Kristallverbände, besonders wenn statt aus leicht flüchtigen Lösungsmittel aus Wasser/Acetonitril präpariert wird.

Ergebnis läßt sich als zusätzlicher Fluoreszenzbeitrag deuten. An die fallenden Peakflanken lassen sich jedoch keine Exponentialfunktionen anfitzen.

Ein Fluoreszenzbeitrag durch in die Gasphase expandierende elektronisch angeregte Spezies, für welche im Vergleich zur festen Phase andere Lebensdauern zu erwarten sind, wird ebenfalls nicht detektiert.

Die Matrices fluoreszieren also nur solange, wie sie durch das Laserfeld angeregt werden. Das heißt, daß die Fluoreszenzemission sofort wieder erlischt, sobald der Laserpuls beendet ist. Daraus lassen sich zwei Schlußfolgerungen ziehen:

- Die zur Bevölkung des elektronisch angeregten Zustandes aufgenommene Laserenergie wird zum größten Teil innerhalb einer auch mit dem schnellen Photomultiplier nicht meßbaren Zeitspanne vermutlich in Schwingungsenergie umgewandelt.
- Die angeregten Zustände werden innerhalb kürzester Zeit wieder gequencht, z.B. durch Verunreinigungen, wie z.B. Na^+ oder K^+ oder durch $S_1 \leftrightarrow S_1$ Annihilations-Prozesse⁶¹.

Fluoreszenzemission ist also ein dem eigentlichen Desorptionsprozeß, d.h. dem Massetransport in die Gasphase vorgelagerter bzw. beigeordneter Prozeß und die Dissipation der elektronischen Energie in die Schwingungsfreiheitsgrade der eigentliche Startpunkt der Laserdesorption.

Wenn aber alle Licht emittierenden elektronischen Prozesse mit dem Verlöschen des Laserpulses beendet sind, kann auch keine durch den Desorptionslaser hervorgerufene Gasphasenfluoreszenz erwartet werden. Daraus folgt auch, daß Licht emittierende Prozesse nur aus dem Aggregatzustand des Festkörpers erfolgen – also durch den Laserpuls als eine der Reaktionen der Matrixsubstanz ausschließlich Festkörperfluoreszenz evoziert wird.

Anhand der oben dargelegten Ergebnisse zur Zeitabhängigkeit der Lumineszenz erscheint es als sicher, daß die Umverteilung der elektronischen Energie in die Schwingungsfreiheitsgrade nicht der einzige Umwandlungsprozeß vor dem Beginn der Desorption ist; denn die Kopplung der elektronischen mit den vibronischen Zuständen (*internal conversion*) konkurriert mit dem strahlenden Übergang zwischen den elektronischen Zuständen $S_1 \rightarrow S_0$ (Fluoreszenz).

Unter dem in dieser Arbeit verwendeten massenspektrometrischen *setup* kann durch Positionierung von desorbierten Neutralen unter denselben Bedingungen wie jenen im spektroskopischen Teil festgestellt werden, daß sie sich noch 10500 ns nach dem Ende des Desorptionslaserpulses ionisieren lassen (vergl. Kapitel 5.1). Dieser Effekt aus der Zukunft nach der Desorption läßt sich in zweifach interpretieren:

- Die Auswirkungen des Laserpulses, d.h. die Freisetzung von neutralen Matrixmolekülen, sei um den Faktor 20 länger als die Lumineszenz. Dies deute auf langandauernde thermische Freisetzung von Substanz aus der kristallinen festen Phase hin.
- Die Geschwindigkeitsverteilung der desorbierten neutralen Moleküle sei sehr breit, so daß schnelle Moleküle relativ früh den Ionisationsort und langsame ihn spät erreichen.

Die letzte Interpretation erscheint im Licht der im Kapitel 5.1 dargelegten Ergebnisse unter Einbezug der aus der Literatur entnehmbaren Erkenntnisse plausibel.

Es wird deutlich, daß die bei der Desorption ablaufenden lumineszierenden Prozesse mit einer Zeitdomäne von maximal 25 ns sehr schnell sind und nur zeitgleich mit dem Laserpuls auftreten. Ein solches Verhalten ist von vornherein nicht zu erwarten.

Durch wellenlängen-aufgelöste Untersuchungen sollen die Kenntnisse über den Desorptionsprozeß vertieft werden.

5.2.2 Wellenlängen - aufgelöste Lumineszenzspektroskopie am Desorptionsprozeß

Mit dem im Kapitel 4.3.2 skizzierten Versuchsaufbau unter Nutzung eines Lichtwellenleiters wird das beim Desorptionsprozeß emittierte Lumineszenzlicht dicht am Desorptionsort im Hochvakuum des Massenspektrometers gesammelt. Auf der Austrittsseite des Glasfaserkabels wird das Licht mit einem Achromaten ($f = 20$ mm) parallelisiert und auf den Eintrittsspalt des Spektrometers abgebildet, um dann von einem der Gitter spektral aufgelöst und von der CCD Camera detektiert zu werden. Das Lumineszenzlicht wird dabei über 300 Laserpulse gesammelt (Meßzeit 30 Sekunden, Repetitionsrate des Desorptionslasers 10 Hz).

Abbildung 5.8 zeigt ein mit diesem Versuchsaufbau aquiriertes Lumineszenzspektrum der Matrixsubstanz 3-Hydroxypicolinsäure zwischen 400 nm und 650 nm. Das Picolinsäurederivat weist bei Laseranregungswellenlänge von 355 nm ein Emissionsmaximum bei 428 nm sowie ein Nebenmaximum im Blauen bei 417 nm auf. Weit rotverschoben erscheint mit geringerer Intensität eine Bande bei 485 nm. Das Fluoreszenzspektrum enthält geringe Mengen Grünanteile, denn erst bei ca. 575 nm sinkt die Intensität der Emission bis nahezu Null.

Das Experiment ist bei der Wellenlänge 400 nm abgebrochen worden, weil die achromatische Auskoppellinse unterhalb dieses Wertes im Ultravioletten zunehmend stärker absorbiert^{xiii}.

In der Abbildung 5.9 ist das Fluoreszenzspektrum von Dithranol (1,8-Dihydroxy-9[10H]-anthracenon) dargestellt. Das Anthracenderivat weist ein sehr weit rotverschobenes Fluoreszenzspektrum mit einem Maximum bei 611 nm auf. Im gelbroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums liegen auch die beiden Nebenmaxima bei 598 nm und 621 nm. Den Hauptmaxima vorgelagert erscheint eine Bande bei 570 nm. Der scharfe *spike* bei ca. 710 nm stellt die erste Gitterbeugungs-Nebenordnung der Laserwellenlänge von 355 nm dar. Unterhalb 450 nm und oberhalb 800 nm existieren keine weiteren Banden.

Die am häufigsten eingesetzte Matrixsubstanz 2,5-Dihydroxybenzoesäure liefert das in der Abbildung 5.10 dargestellte Fluoreszenzspektrum mit einer typisch von 400 nm an steigenden breiten Bande, die bei 415 nm ihr Maximum erreicht. Ein ebenfalls breites Nebenmaximum liegt im Bereich zwischen 434 nm und 442 nm. In den grüngelben Bereich des Spektrums hinein sinkt die detektierte Signalintensität ohne weitere Bandenstrukturierung kontinuierlich ab.

Abbildung 5.11 zeigt das Fluoreszenzspektrum von Ferulasäure (4-Hydroxy-3-Methoxyzimtsäure) im Spektralbereich zwischen 400 nm und 650 nm. Ferulasäure weist ein Emissionsmaximum bei 481 nm sowie eine vorgelagerte Bande bei 443 nm auf. Weitere Banden ober- oder unterhalb der Hauptemissionen erscheinen nicht.

^{xiii} Der Achromat hat bei 400nm noch 96% Transmission.

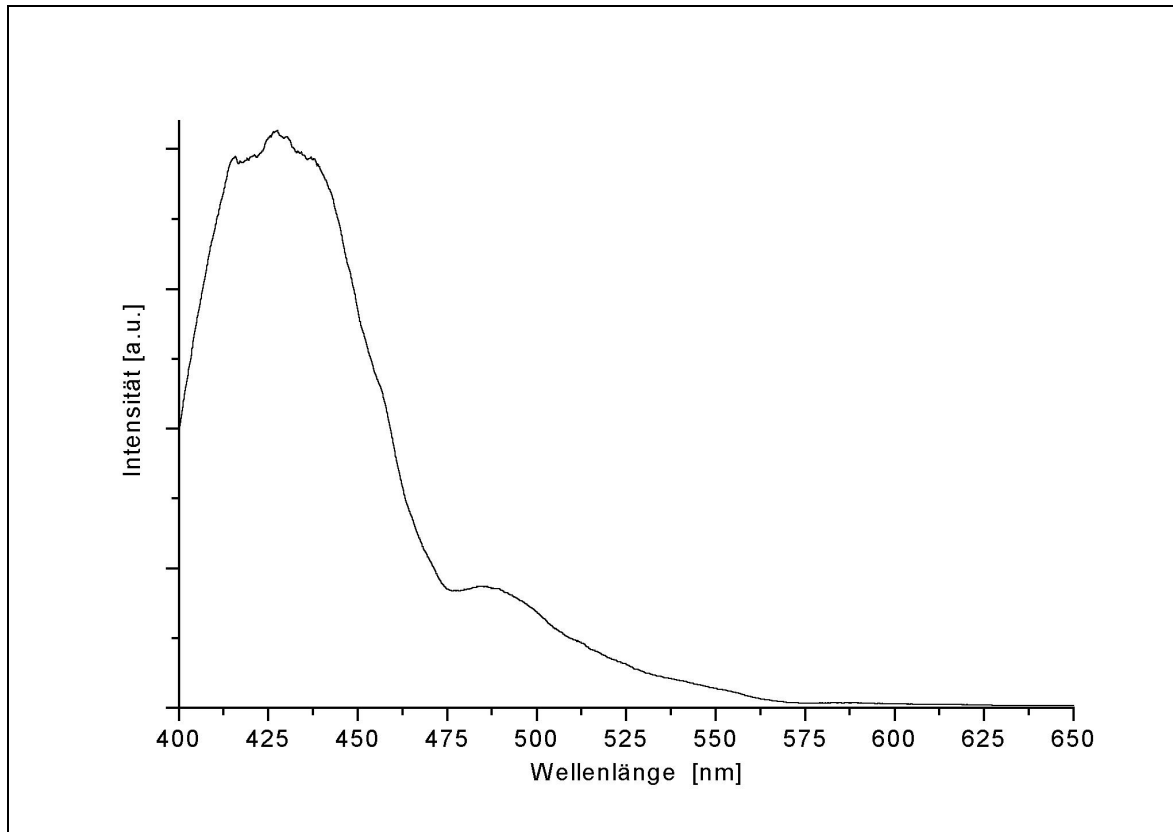


Abbildung 5.8: Lumineszenzspektrum von 3-Hydroxypicolinsäure

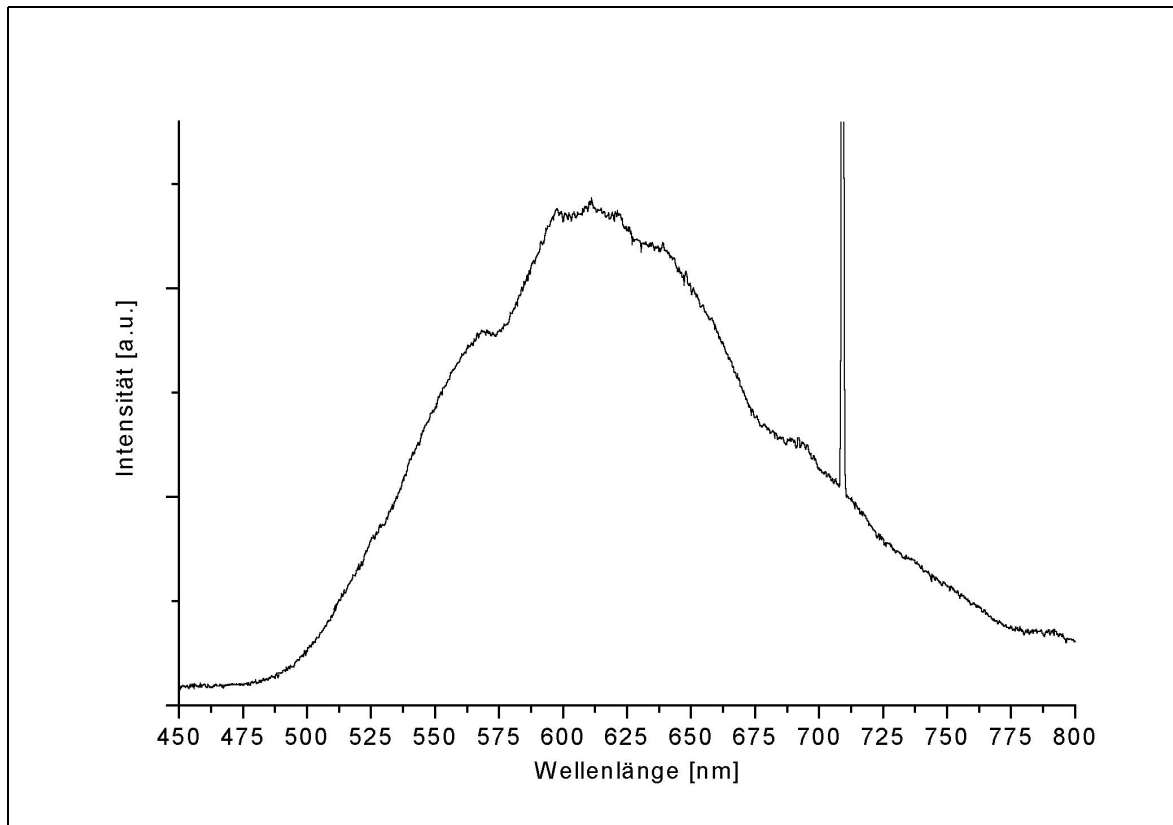


Abbildung 5.9: Lumineszenzspektrum von Dithranol

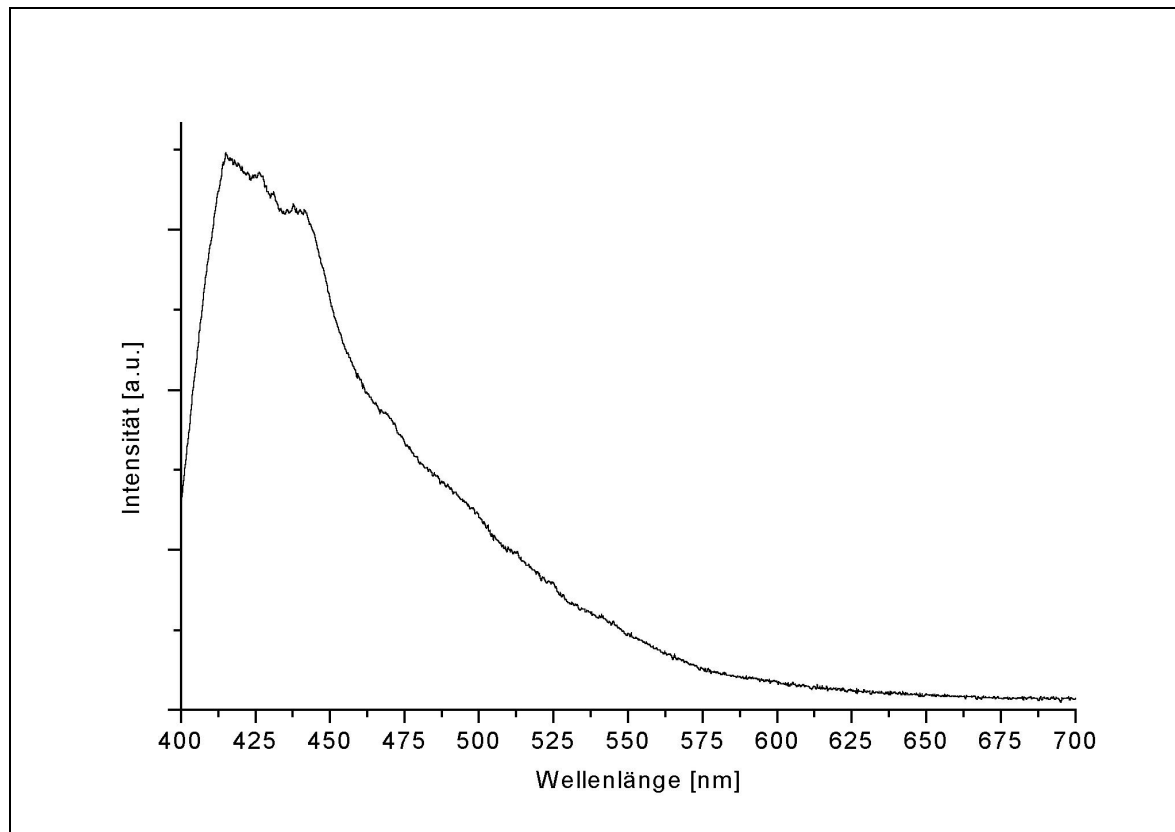


Abbildung 5.10: Lumineszenzspektrum von 2,5-Dihydroxybenzoesäure

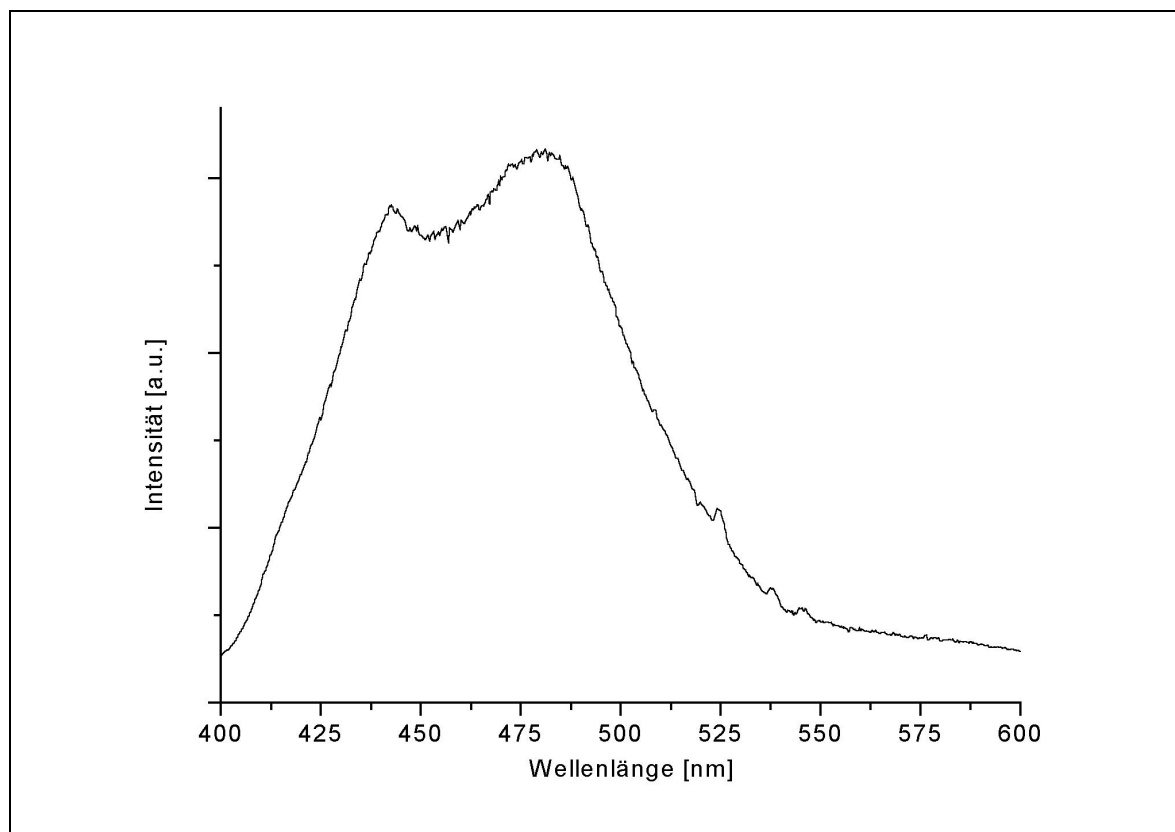


Abbildung 5.11: Lumineszenzspektrum von Ferulasäure (4-Hydroxy-3-Methoxyzimtsäure)

Alle dargestellten Spektren sind unter für die MALDI-Massenspektrometrie typischen Bedingungen, wie konstanter UV-Laserleistung von ca. 0,2 $\mu\text{J}/\text{Puls}$ und Hochvakuum im Massenspektrometer akquiriert worden.

Die hier gezeigten Lumineszenzspektren ohne am Repeller angelegte Beschleunigungsspannung zeigen keinerlei Unterschiede zu den Spektren mit elektrischem Abzugspotential.

Bei allen vier untersuchten Matrices wird die Schwingungsstruktur der Banden nicht aufgelöst. Eine Kühlung der Schwingungsfreiheitsgrade von sublimierenden Spezies, die sich möglicherweise durch Überlagerung der Banden mit Linienspektren manifestieren würde, wird nicht detektiert.

Ehring et al. haben bei ihren Lumineszenzuntersuchungen die Fluoreszenzmaxima von 3-HPA zu 432 nm sowie die von Dithranol und 2,5-DHB zu 594 nm bzw. 430 nm bestimmt. Die elektronische Anregung der Matrixsubstanzen ist mit einem 337 nm-Stickstofflaser durchgeführt worden.

Somit liegen die in dieser Arbeit bestimmten Maxima für die im Blauen fluoreszierenden Matrices deutlich unter den von Ehring bestimmten Werten, während die Dithranol-Emission 17 nm oberhalb liegt.

Diese Differenzen in den Emissionsmaxima lassen sich durch die Verwendung einer längerwelligen Erregerlinie im Rahmen dieser Arbeit nicht begründen. Der von Ehring und Mitarbeitern genutzte Stickstofflaser (337 nm, 29670 cm^{-1}) und der hier verwandte frequenzverdreifachte Nd-YAG-Laser (355 nm, 28170 cm^{-1}) sind beide in der Lage, die Matrixsubstanzen in den ersten elektronischen Zustand S_1 anzuregen, auch wenn der Absorptionskoeffizient von 3-HPA bei beiden Wellenlängen sehr gering ist (vergl. Tabelle 5.3).

Als Grund für die Verschiebung der in dieser Arbeit gegenüber den von Ehring et al. bestimmten Maxima kann vielmehr die Verwendung unterschiedlicher Gitter-Monochromatoren gelten. Das hier verwendete, bei einer *blaze*-Wellenlänge von 500 nm optimal reflektierende Gitter mit 600 Strichen pro Zentimeter ist besonders gut für die Emissionsmessungen geeignet, weil es zwischen 300 nm und 750 nm den besten Wirkungsgrad hat^{xiv}. Die Signalintensitäten verschieben sich mit einem Gitter deutlich anderer *blaze*-Wellenlänge.

^{xiv} Der günstigste Wirkungsgrad kann wie folgt abgeschätzt werden: $\lambda_B - \frac{1}{2}\lambda_B \rightarrow \lambda_B + \frac{1}{2}\lambda_B$

Das verwendete Spektrometer ist über die Emissionslinien einer Quecksilberdampfampe kalibriert worden. Der absolute Fehler der Wellenlängenkalibration liegt bei 0,12 nm.

Zum Vergleich mit den Emissionsdaten sind im Rahmen dieser Arbeit auch UV-VIS Absorptionsmessungen an Lösungen der Matrices vorgenommen worden, so daß der Stokes-Shift der Fluoreszenz ermittelt werden kann. Die Ergebnisse der im Anhang befindlichen Absorptionsspektren sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt. Die ermittelten Emissionsmaxima unterscheiden sich von den durch Ehring⁶¹ et al. publizierten Ergebnissen um bis zu 31 nm^{xv}.

Tabelle 5.2

	Emissions- maximum [nm]	Nebenmaxima [nm]	Emissions- maximum nach Ehring [nm]	Abstand der Maxima $\Delta\lambda_{\text{Emiss.}}$ [nm]
3-HPA	428	417, 485	432	- 4
Dithranol	611	570, 598, 621	594	+ 17
2,5-DHB	415	434-442	430	- 15
Ferulasäure	481	443	450	+ 31

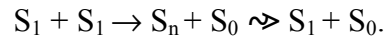
Tabelle 5.3

	Absorptions- maximum [nm]	Absorptions- koeffizient bei $\lambda=355\text{nm}$ [L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	Absorptions- koeffizient bei $\lambda=337\text{nm}$ [L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	Stokes-Shift der Maxima [cm ⁻¹]
3-HPA	301	30	125	9860
Dithranol	357	5836	5292	11640
2,5-DHB	333	824	1989	5930
Ferulasäure	319	1968	5793	10560

Von besonderem Interesse sind die Stokes-Verschiebungen der Emissions- gegenüber den Absorptionsbanden. Bleiben Lösungsmittel- und Konzentrationseffekte zunächst unberücksichtigt, läßt sich der Energiewert der Verschiebung als Maß für die Energiedissipation in Form der Schwingungsrelaxation im Matrix-Festkörper auffassen. Substanzen mit einer hohen Stokes-Verschiebung sollten sich daher besser als Matrices eignen, als solche mit einer kleinen Verschiebung, weil erstere die Anregungsenergie effizienter in Schwingungsenergie umwandeln und auf diese Weise zur Desorption beitragen.

^{xv} Der Publikation lassen sich weder Informationen zum Spektrometer noch zum verwendeten Gitter entnehmen.

Nach der Ehring'schen Interpretation erzeuge der Laserpuls im Kristallgitter der Matrix neben der vibratorischen Anregung, die zur Ausbildung der Phononenstruktur führt, hochgradig mobile Excitonen, die über $S_1 \leftrightarrow S_1$ Annihilierungsprozesse nach folgender Photoreaktion auf der Picosekunden-Zeitskala ebenfalls zum raschen Aufheizen des angeregten Matrixvolumens beitragen:



Werden die in den obigen Tabellen zusammengefaßten spektroskopischen Daten herangezogen, muß gefolgert werden, daß aufgrund der geringen Überlappung der Absorptions- mit den Emissionsspektren Annihilierungsprozesse mobiler Excitonen für typische MALDI-Matrixsubstanzen nicht wahrscheinlich sind.

Informationen über die Umwandlung der elektronischen Energie im Kristallgitter lassen sich auch aus den Seitenbanden sowie aus den Breiten der Banden gewinnen.

Abbildung 5.12 zeigt einen Overlay des Absorptions- mit dem Fluoreszenzspektrum von Ferulasäure. Die Signalintensität des Absorptionsspektrums an der Ordinate ist zur besseren Vergleichbarkeit auf die Intensität der Emission skaliert worden. Auf der Abszisse ist die Energie in reziproken Zentimetern aufgetragen. Der *spike* bei 28170 cm^{-1} ist die Erregerlinie des Nd-YAG-Lasers bei 355 nm.

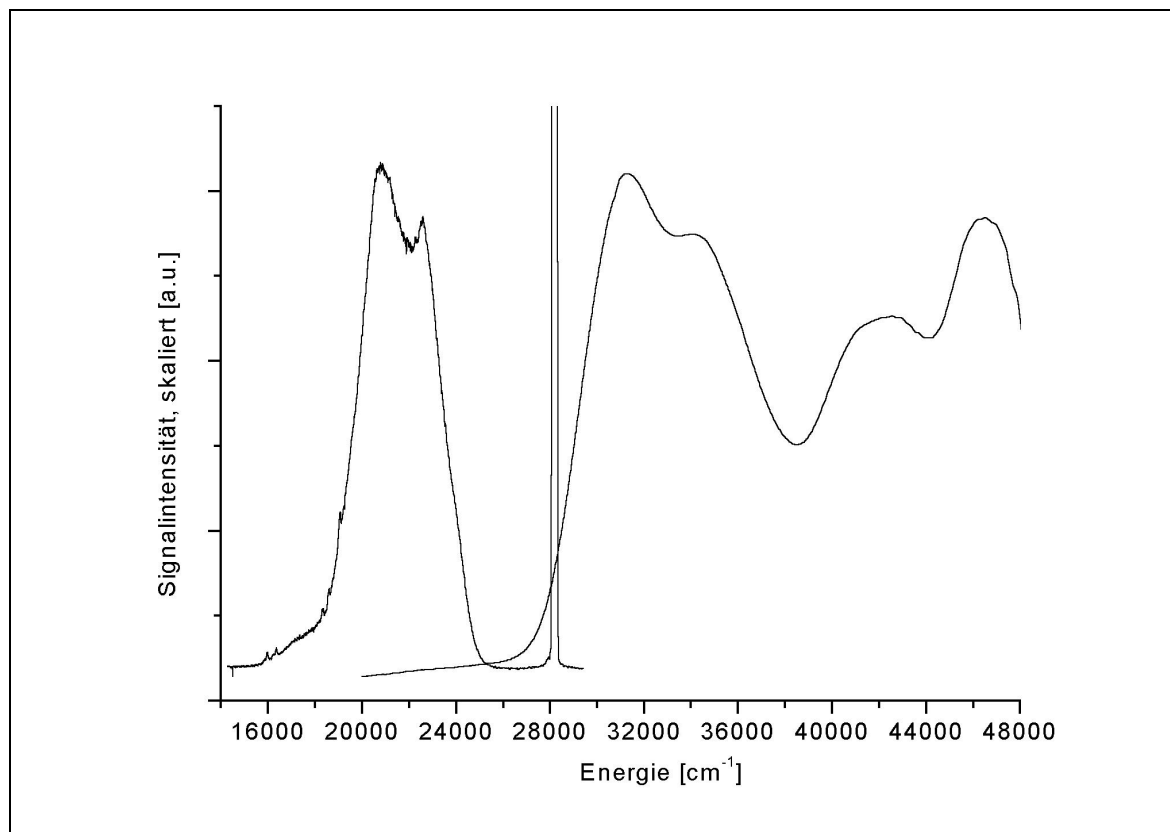


Abbildung 5.12: Festphasenemissions- und UV-VIS-Absorptionsspektrum von Ferulasäure (in Wasser:EtOH, 50%:50%)

Ferulasäure zeigt eine breite $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande zwischen 30000 cm^{-1} und 36000 cm^{-1} mit einem Maximum bei 31368 cm^{-1} und einer Nebenbande bei 34200 cm^{-1} . Die energetisch höhere Seitenbande weist auf $\pi\pi^* \leftrightarrow n\pi^*$ -Kopplung des konjugierten π -Elektronensystems mit den nichtbindenden Elektronen der metaständigen Methoxygruppe bei einer Energiedifferenz von $\Delta E = 2832\text{ cm}^{-1}$ hin. Das mit ca. 10560 Wellenzahlen stark rotverschobene Festkörper-Fluoreszenzspektrum hat das Bandenmaximum bei 20790 cm^{-1} und eine Seitenbande bei 22573 cm^{-1} . Die Energiedifferenz ΔE zwischen den Emissionsbanden ist folglich 1783 cm^{-1} . Der Energiewert läßt sich als $\pi\pi^* \leftrightarrow n\pi^*$ -Kopplung des konjugierten π -Elektronensystems mit der Carbonylfunktion der Carboxygruppe auslegen: Im Grundzustand liegen die Franck-Condon-Faktoren günstig für eine Beteiligung der Methoxygruppe an der Absorption, während im angeregten Zustand die Molekülgeometrie eine Wechselwirkung der Säuregruppe mit dem delokalisierten π -Elektronensystem favorisiert. Das Emissionsspektrum bestätigt daher die Vermutung, daß die Matrixsubstanzen im angeregten Zustand saurer als im Grundzustand seien⁵³.

Die Feststellung, daß das Emissionsspektrum das Fluoreszenz-Anregungsspektrum widerspiegelt („*mirror image rule*“) greift im vorliegenden Fall nicht und muß daher beim Vergleich der jeweiligen Spektren in den Abbildungen 5.8 und 5.9 differenziert betrachtet werden: Zum einen sollten für einen solchen Vergleich die Aggregatzustände der Substanzen, aus welchen Emission erfolgt, dieselben wie bei der Absorption sein. Zum anderen ist die spektrale Energieverteilung des Anregungslichtes im UV-VIS-Absorptionsspektrum ($I_0(\lambda)$) eine andere, als die schmalbandige Laser-Anregung der Fluoreszenzemission.

Aus diesen Gründen folgt, daß die Methoxygruppe der Ferulasäure durchaus an der Absorption, die Carbonylgruppe aber an der Emission beteiligt sein kann (vergl. oben).

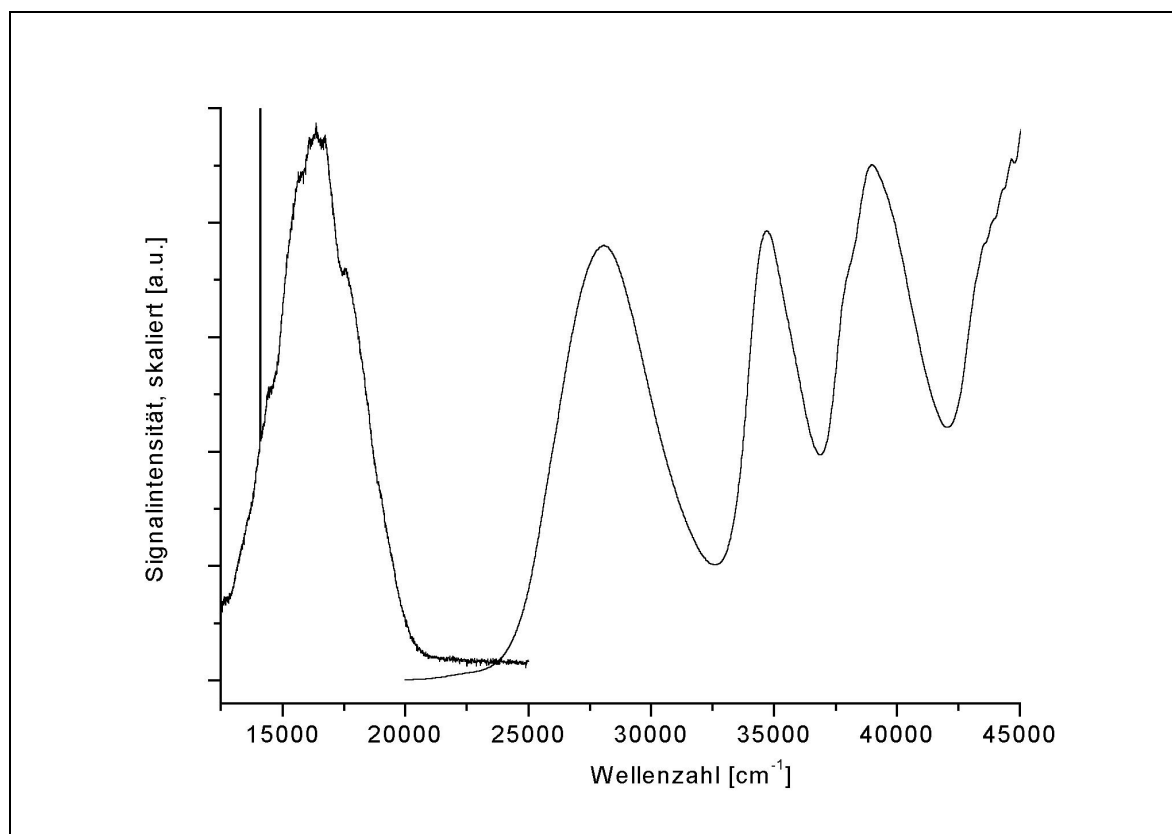


Abbildung 5.13: Festphasenemissions- und UV-VIS-Absorptionsspektrum von Dithranol (in THF)

Das UV-VIS-Absorptionsspektrum von Dithranol im Lösungsmittel Tetrahydrofuran zeigt im Spektralbereich zwischen 25000 cm^{-1} und 42000 cm^{-1} drei nicht strukturierte Banden, die in der Reihenfolge steigender Energie der elektronischen $\pi\pi^*$ -Anregung in die Singulett-Niveaus S_1 bei 28074 cm^{-1} sowie S_2 bei 34698 cm^{-1} und S_3 bei 38971 cm^{-1} zugeordnet werden

können. Obwohl Dithranol über drei Hydroxygruppen verfügt, werden $n\pi^*$ -Übergänge nicht angeregt. Einzig der Übergang $S_0 \rightarrow S_3$ scheint eine schwache niederenergetische Seitenbande aufzuweisen. Der S_2 -Zustand liegt rund 6624 cm^{-1} über dem S_1 -Zustand und der energetische Abstand $\Delta E = E_{S_3} - E_{S_2}$ ist 4273 cm^{-1} .

Das Fluoreszenzspektrum wird durch Laseranregung bei 28170 cm^{-1} (355 nm) erzeugt. Auch wenn Absorptionsverschiebungen durch das Lösungsmittel berücksichtigt werden, wird Dithranol sehr gut bei der frequenzverdreifachten Fundamentalen eines Nd-YAG-Lasers absorbieren, wie das auch der hohe Extinktionskoeffizient von $\epsilon=5834 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ bei 355 nm verdeutlicht. Im allgemeinen werden $\pi\pi^*$ -Übergänge beim Wechsel von unpolaren zu polaren Lösungsmitteln bathochrom verschoben (Rotverschiebung). $n\pi^*$ -Übergänge erfahren im Vergleich dazu hypsochrome Verschiebung. Für eine reelle Einschätzung des Absorptionskoeffizienten müßten jedoch Festkörperabsorptionsmessungen durchgeführt werden, die naturgemäß Schwierigkeiten bereiten (vergl. hierzu Kapitel 6.1, Ausblick).

Das Festphasenemissionsspektrum von Dithranol ist gegenüber der $S_0 \rightarrow S_1$ -Absorptionsbande ca. 11640 cm^{-1} rotverschoben und zeigt eine schwache Bandenstrukturierung. Die Energiedifferenz der niederenergetischen Vorbande bei 14663 cm^{-1} zur Hauptbande bei 16365 cm^{-1} beträgt $\Delta E=1702 \text{ cm}^{-1}$, was als Fluoreszenzbeitrag nichtbindender Elektronen des Sauerstoffatoms der mittelständigen Ketogruppe interpretiert werden kann. Dithranol wird im angeregten Zustand in der festen Phase daher wahrscheinlich als Keto-Tautomer vorliegen:

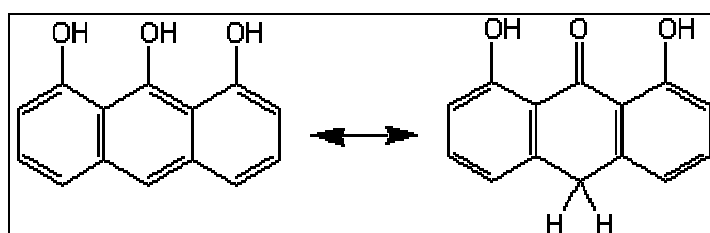


Abbildung 5.14: Zwei tautomere Strukturformeln des Dithranols

Die im Vergleich zur Vorbande um 2684 cm^{-1} nach höherer Energie verschobene, etwas deutlicher strukturierte Bande bei 17347 cm^{-1} kann der über Wasserstoffbrücken assoziierten OH-Valenzschwingung zugeordnet werden und stützt somit obige Interpretation.

Untersuchungen zu den relativen Stabilitäten der Keto- und Enol-Formen in der Gasphase existieren hauptsächlich zum Aceton.

In einer vergleichenden Studie zur Keto-Enol-Tautomerie von Aceton in flüssiger und gasförmiger Phase stellen Chiang¹¹³ et al. fest, daß sich die Bildungsenthalpien der enol-Form des Aceton in Abhängigkeit des Aggregatzustandes kaum unterscheiden und in beiden Fällen mit ca. 9 kcal/mol (in Acetonitril) bzw. 12 kcal/mol (Gasphase) endotherm sind.

Diese geringe Energiebarriere bei der Keto-Enol-Tautomerie legt nahe, daß die Keto-Form des Dithranols in signifikanter Menge bei der Phasenumwandlung vorliegt.

Mit dem gewählten Aufbau kann unter MALDI-Bedingungen Gasphasenfluoreszenz von der Festkörperlumineszenz nur über unterschiedliche Lebenszeiten der beteiligten angeregten Zustände unterschieden werden.

Eine örtliche Differenzierung zwischen den Lumineszenzerscheinungen beider Aggregatzustände erfordert an der Einkoppelseite des Lichtwellenleiters eine Ortsauflösung im Bereich von mindestens $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ^{xvi}.

Zudem lumineszieren die Matrixsubstanzen aus dem Festkörper mit sehr viel höherer Intensität als aus der Gasphase. Die Desintegrierung des Festkörpervolumens macht eine Unterscheidung beider Aggregatzustände schwierig.

Unter Berücksichtigung der im folgenden Kapitel 5.3 dargestellten orts aufgelösten Untersuchungen, d.h. der Photographie des *plume* und des fluoreszierenden Festkörpers, erhärten sich die Hinweise, daß die in diesem Kapitel dargestellten Spektren wahrscheinlich die der Festkörperfluoreszenz sind.

^{xvi} Im Rahmen dieser Arbeit ist versucht worden, die notwendige Ortsauflösung bei der Einkopplung in den Lichtwellenleiter mit Hilfe eines selbstgebauten sog. *pigtail* zu erreichen. Das *pigtail* ist ein PMMA-Röhrchen von 5 mm Durchmesser. Die ortsauflösende Komponente bildet ein Achromat ($f=6\text{mm}$, $d=3\text{mm}$). An dessen bildseitiger Brennebene wird das Ende des Lichtwellenleiters positioniert, damit möglichst viel Lumineszenzlicht eingekoppelt werden kann.

5.3 Photographische Abbildung der MALDI-Desorption

Die die MALDI-Desorption begleitende Lumineszenz legt es nahe, das emittierte Licht als Hilfsmittel zu nutzen, um die Fluoreszenz der festen Matrix direkt zu untersuchen und möglicherweise auch Hinweise zur räumlichen Ausdehnung der Desorptionswolke zu erhalten.

Da die elektronischen Prozesse dicht an der Probenoberfläche ablaufen und abgesehen vom reflektierten Laserlicht sehr lichtschwach sind, müssen diese Schwierigkeiten mit einer speziellen Optik überwunden werden.

Das in den Versuchen eingesetzte Tachonarobjektiv ist sehr lichtstark und vergrößert im gewählten Aufbau den Objektausschnitt immerhin um den Faktor 1,6. Laserstreulicht kann durch 6 mm UV-Filter vor dem Objektiv absorbiert werden.

Die Desorptionswolke wird mit dem im Kapitel 4.4 dargestellten Aufbau in minimal 81 mm Entfernung senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Wolke photographiert. Die Camera wird mit dem Desorptionslaser über den Q-Switch-Sync-Ausgang des Lasers synchronisiert.

Die im folgenden dargestellten LIF-Photos spiegeln das durch fünf UV-Desorptionslaserpulse erzeugte Lichtsignal wider.

Wenn die desorbierten Moleküle mit einer durch den Laserpuls ausgelösten Eigengeschwindigkeit von maximal 1000 m/s in das Vakuum expandieren und die Lebenszeiten der angeregten Zustände, aus welchen die Lumineszenz erfolgt mit typisch etwa zehn Nanosekunden angenommen werden, resultiert aus dem Produkt dieser Größen die Erwartung, daß die Wolke etwa 10 μm in Flugrichtung der Ionen lumineszieren sollte.

Förderlich für die Detektierung der Lumineszenz mit der CCD-Camera ist eine hohe Laserleistung, weil dann viel Substanz desorbiert wird und sich die Quantenausbeute erhöhen sollte. Im selben Zuge werden allerdings verstärkt Signalstörungen durch Streueffekte an der Repellerelektrode erzeugt.

Ein Objektausschnitt in der Größe von 100 x 100 μm^2 wird auf dem CCD-Chip 1,6-fach vergrößert, also auf 7 x 7 Pixel abgebildet. Der theoretisch kleinste zu unterscheidende Objektausschnitt in der Gaswolke beträgt 14 x 14 μm^2 und liegt damit noch oberhalb der eigentlich erforderlichen Ortsauflösung.

5.3.1 Photographische Abbildung der Lumineszenz – Unterdrückung der UV-Laserlicht-Streuung durch Filter

Die verwendete CCD-Camera verfügt über einen rechteckigen Chip der Ausmaße 298 Pixel mal 1152 Pixel. Die Camera wird über der Ionenquelle so eingerichtet, daß die lange Kante des Chip in der Massenspektrometerachse (Ionen-optische Achse) liegt.

Die Experimente haben gezeigt, daß die Lumineszenzerscheinungen auf den ersten 200 Pixel der Längsachse des Chip abgebildet werden. Alle anderen Daten werden auch aus Gründen der Datenmenge verworfen.

Die im folgenden gezeigten CCD-Bilder setzen sich daher aus 298 Pixel auf der Ordinate und 200 Pixel an der Abszisse zusammen. Der sichtbare Ausschnitt aus dem Entstehungsraum der Ionen beträgt unter Berücksichtigung der Vergrößerung durch die Optik 4,2 mm mal 2,8 mm (vergl. Abbildung 5.15).

An der Abszisse ist die Ausdehnung der Lumineszenz in Flugrichtung der Ionen aufgetragen, während die Ordinate die Ausdehnung parallel zur Oberfläche des Probeträgers widerspiegelt. Aus dieser Perspektive verläuft der Laserpuls in der Papierebene unter einem Winkel von $12,5^\circ$ von unten her einfallend.

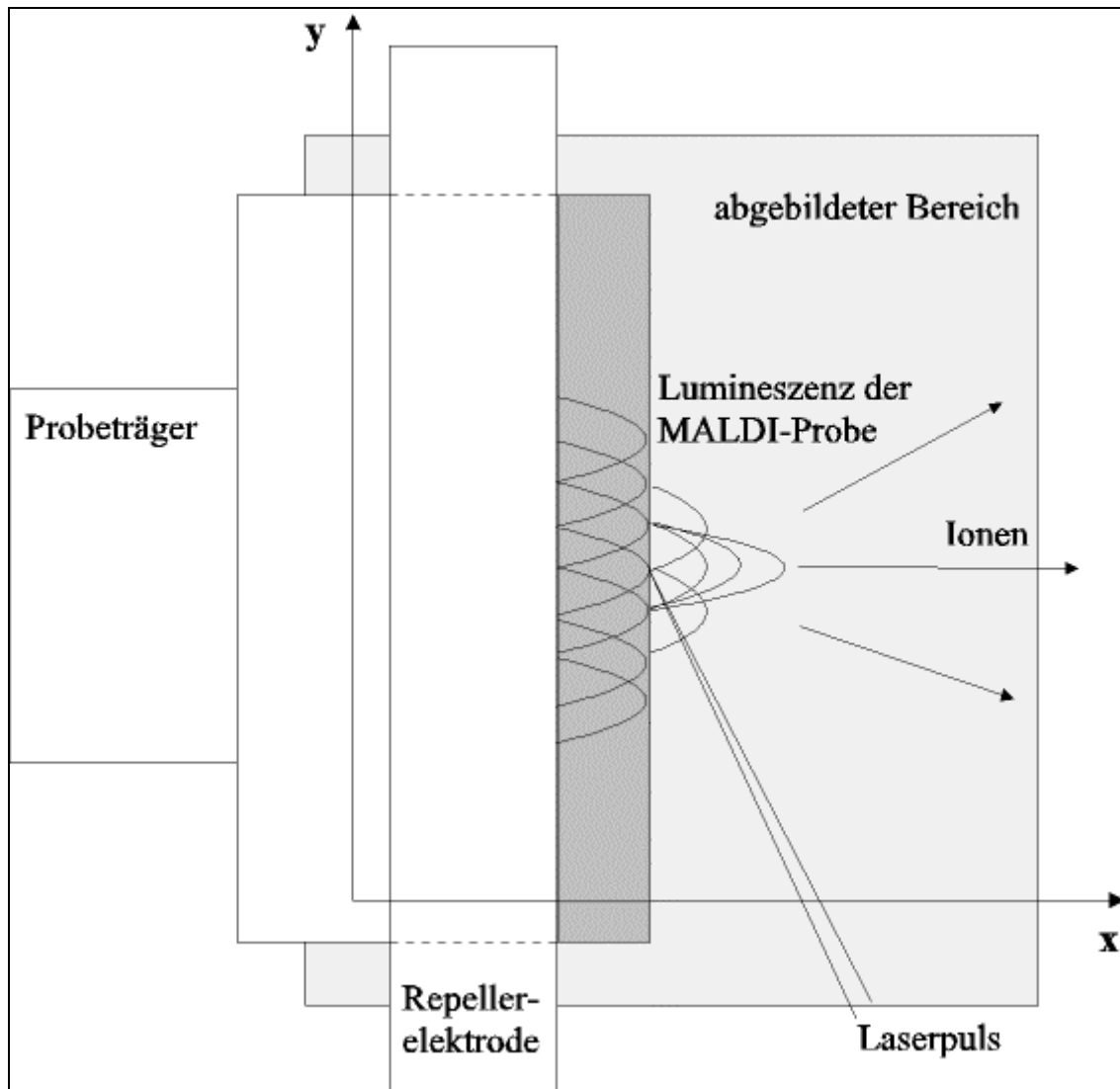


Abbildung 5.15: Schematische Darstellung des durch die Cameraoptik erfaßten Bildes in der Ionenquelle (grau hinterlegt 4,2mm x 2,8mm)

Die Abbildung 5.16 auf der folgenden Seite zeigt eine repräsentative zweidimensionale Aufsicht auf die Lumineszenz während der 355nm-UV-Laserdesorption der Matrixsubstanz 3-Hydroxypicolinsäure. Das ultraviolette Laserstreulicht ist durch Verwendung von 6 mm UV-Filtern unterdrückt worden.

In den Photos wird aufgrund der niedrigen Tiefenschärfe des Objektivs (ca. ± 2 mm) die Kante der Repellerelektrode nicht sehr scharf abgebildet, so daß sie als Orientierungshilfe fehlt. Wie in Abbildung 5.15 zu sehen ist, verläuft die Oberfläche des im Repeller eingerasteten Probeträgers nahe beim Maximum der Lumineszenzintensität.

Die hohen Intensitäten im unteren Bereich des Photos entstehen durch Spiegelungen der Lumineszenz an der polierten Oberfläche des Repellers.

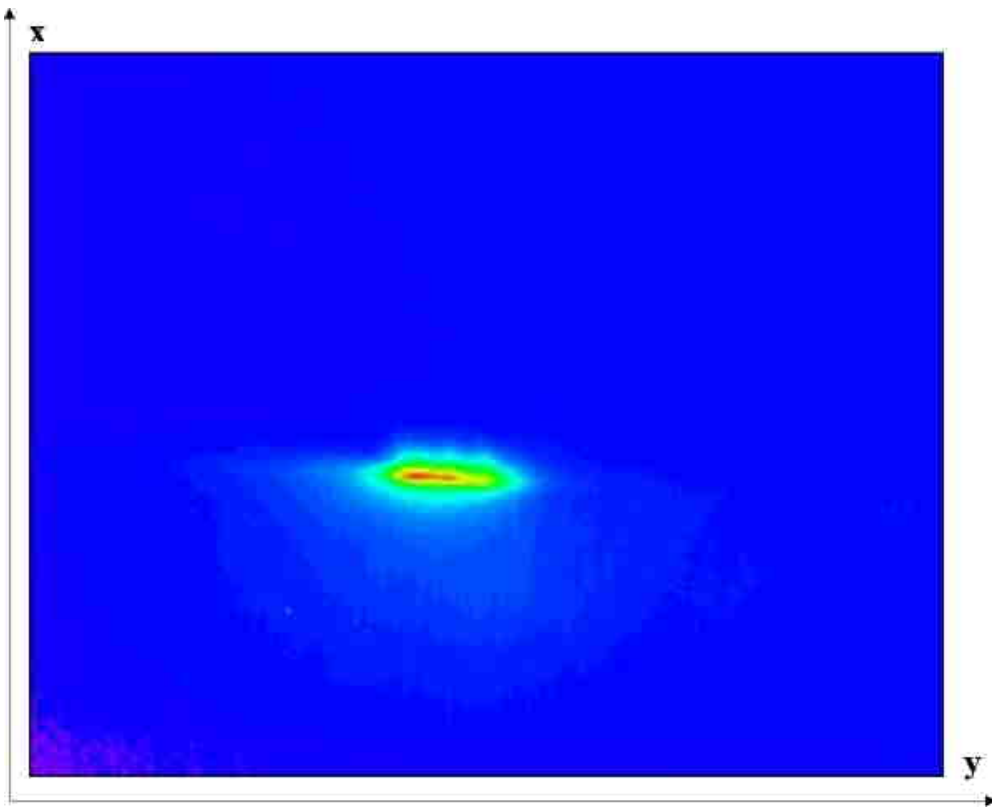


Abbildung 5.16: Zweidimensionale Darstellung der Fluoreszenz einer 3-HPA-MALDI-Probe

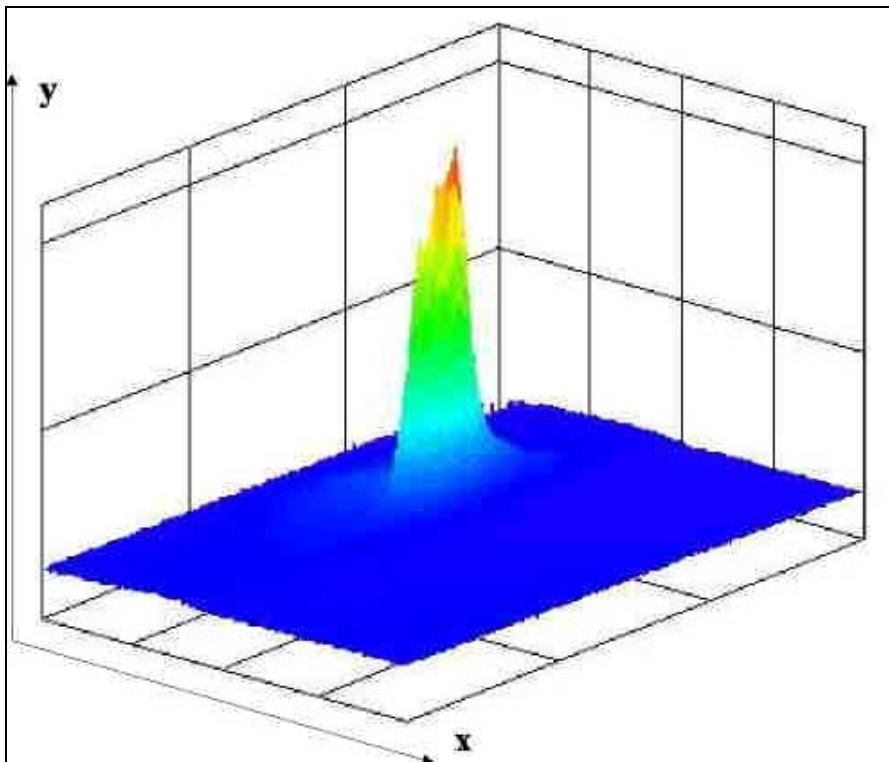


Abbildung 5.17: Dreidimensionale Darstellung der Fluoreszenz einer 3-HPA-MALDI-Probe

Das Signal ist also nicht elliptisch, wie es das Photo vorspiegeln mag, sondern weist in der Aufsicht ein halb-elliptisches Gesamtprofil auf.

Die Abnahme des Lumineszenzsignals in Vorwärtsrichtung wird in der dreidimensionalen Abbildung 5.17 besser deutlich. Sie zeigt einen homogenen, also nicht strukturierten Abfall der Lumineszenzintensität sowohl vom Maximum aus in Vorwärtsrichtung als auch parallel zur Oberfläche der Probe.

Die Abnahme der Fluoreszenz als Funktion der Strecke läßt sich durch eine Gauss-Funktion anfitten. Exponentielle oder höher exponentielle Fitfunktionen, wie sie typischerweise für das zeitliche Abklingen der Lumineszenz zu erwarten sind, versagen bei der Anpassung⁹⁹. Aus der Fitfunktion läßt sich entnehmen, daß die Fluoreszenz in Vorwärtsrichtung (entlang der Abszisse) von ihrem Maximum an der Oberfläche des Probeträgers auf einer Strecke von 80 μm auf den Werte e^{-1} ihrer Maximalintensität sinkt (vergl. Abbildung 5.18).

Versuche zur Abhängigkeit der räumlichen Ausdehnung der Fluoreszenz von der Laserleistung zeigen unzweifelhaft, daß weder die Ausdehnung in Vorwärtsrichtung noch die orthogonal dazu beeinflußt werden⁹⁹. Abbildung 5.18 verdeutlicht dies durch Schnittbildung durch das Maximum der lumineszierenden Region der Matrixsubstanz 3-Hydroxypicolinsäure.

Dabei ist mit der unten angegebenen Iriseinstellung von 10 mm bei sonst konstanter Laserleistung eine Desorptionsfluenz von 0,2 mJ/Puls verbunden. Bei der Iriseinstellung „minimal“ sinkt die Fluenz auf ca. 0,02 mJ/Puls. Der Laserstrahl ist auf etwa 100^2 bis $120^2 \mu\text{m}^2$ Fläche fokussiert, was eine Energiedichte am Desorptionsort von ungefähr $0,1 \text{ MW}/\text{mm}^2$ nach sich zieht.

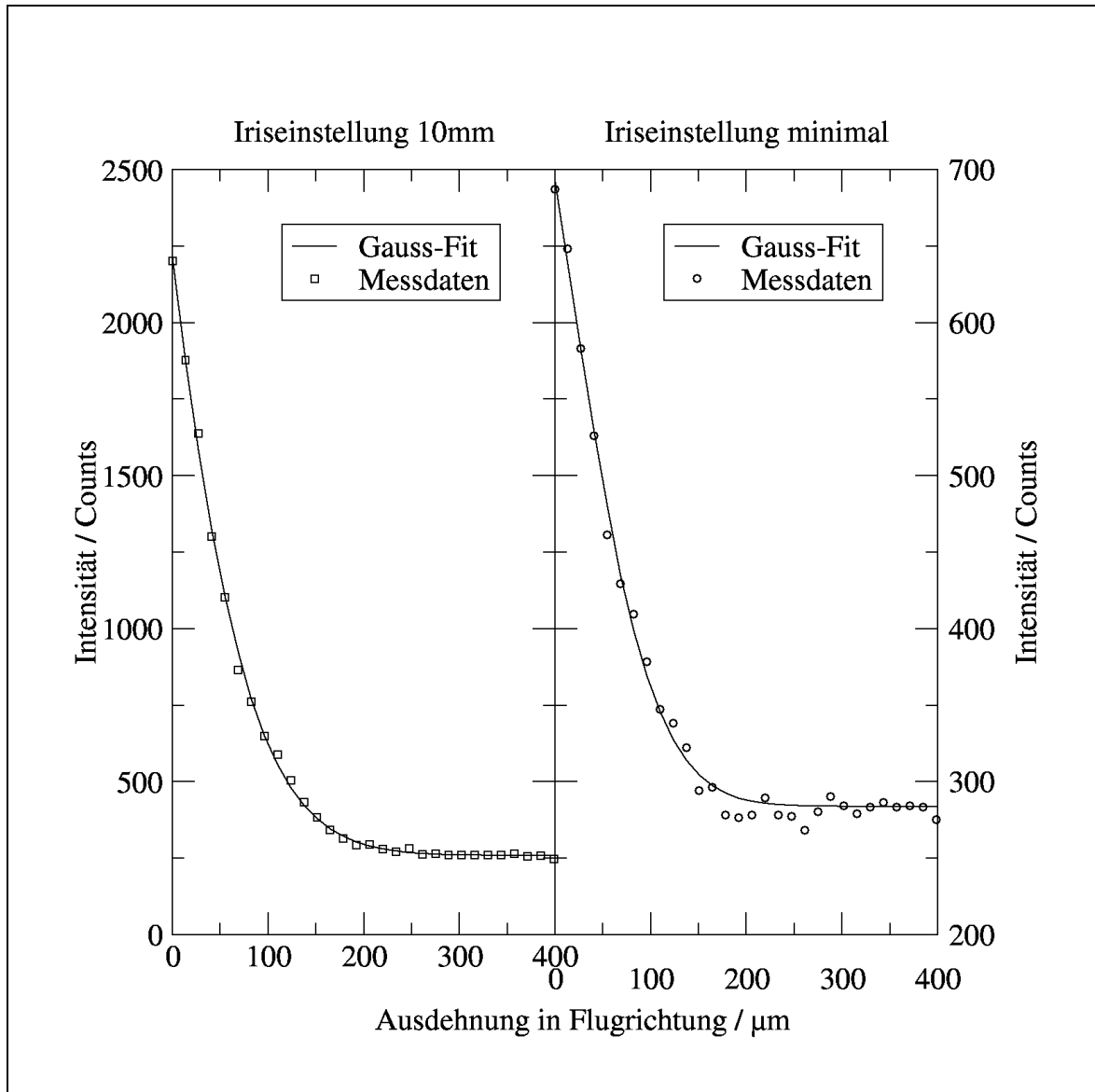


Abbildung 5.18: Intensitätsabfall der Fluoreszenz von 3-HPA in Flugrichtung der Ionen

Durch Schnittbildung entlang der Ordinate (vergl. Abbildung 5.15) läßt sich die Ausdehnung der detektierten Fluoreszenz ($I_{\text{max}} \cdot e^{-1}$) zu rund 660 μm bestimmen.

Aus einfachen geometrischen Überlegungen folgt, daß ein unter einem Winkel von $12,5^\circ$ einfallender 100 μm breiter Laserstrahl die Matrixsubstanz auf einer Strecke von ca. 450 μm anregt.

Die Fläche der Fluoreszenzregion ($1,37 \text{ mm}^2$) liegt also in der Dimension der Größe des Laserspots ($0,64 \text{ mm}^2$), wenn die Matrix in und entgegen der Einfallsrichtung des Laserstrahls noch jeweils 80 μm weit absorbiert.

Aus der Literatur ist bekannt, daß ein durch einen UV-Laserpuls auf einer gut absorbierenden Oberfläche einer Matrix erzeugte Ablationskrater sehr flach ist¹¹⁴. Das bedeutet, daß die Intensität des Pulses aufgrund des Absorptionskoeffizienten der Matrixsubstanz innerhalb des Kristallgitters sehr schnell abnimmt und deshalb nur wenige Schichten abgetragen werden.

Aus mikroskopischen Untersuchungen an Matrixsubstanz-Einkristallen ziehen Kampmeier¹¹⁵ et al. die Schlußfolgerung, daß die bei der UV-MALDI die pro Schuß abgetragene Substanzmenge als Folge des hohen Absorptionskoeffizienten gering ist. Darum ist auch der gebildete Einschußkrater sehr flach. Im Gegensatz dazu sind durch infrarote Desorption erzeugte Ablationsvolumina deutlich größer.

Die Ablationstiefe muß allerdings von der Eindringtiefe der Laserwelle unterschieden werden. Die Abbildungen 5.19 und 5.20 im folgenden Kapitel 5.3.2 verdeutlichen, daß der 355 nm Nd-YAG-Laser den gesamten Kristall zur Fluoreszenz anregt.

5.3.2 Photographische Abbildung der Lumineszenz ohne UV-Filter

In den Abbildungen 5.19 und 5.20 sind LIF-Photos der Matrixsubstanz 2,5-Dihydroxybenzoesäure ohne Verwendung von Ultraviolettfiltern dargestellt.

In der zweidimensionalen Darstellung 5.19 läßt sich die Position des Repellers, in dem der Probeträger eingerastet ist, besser einschätzen, weil er sich durch schwache Lichtreflexionen vom Hintergrund abhebt.

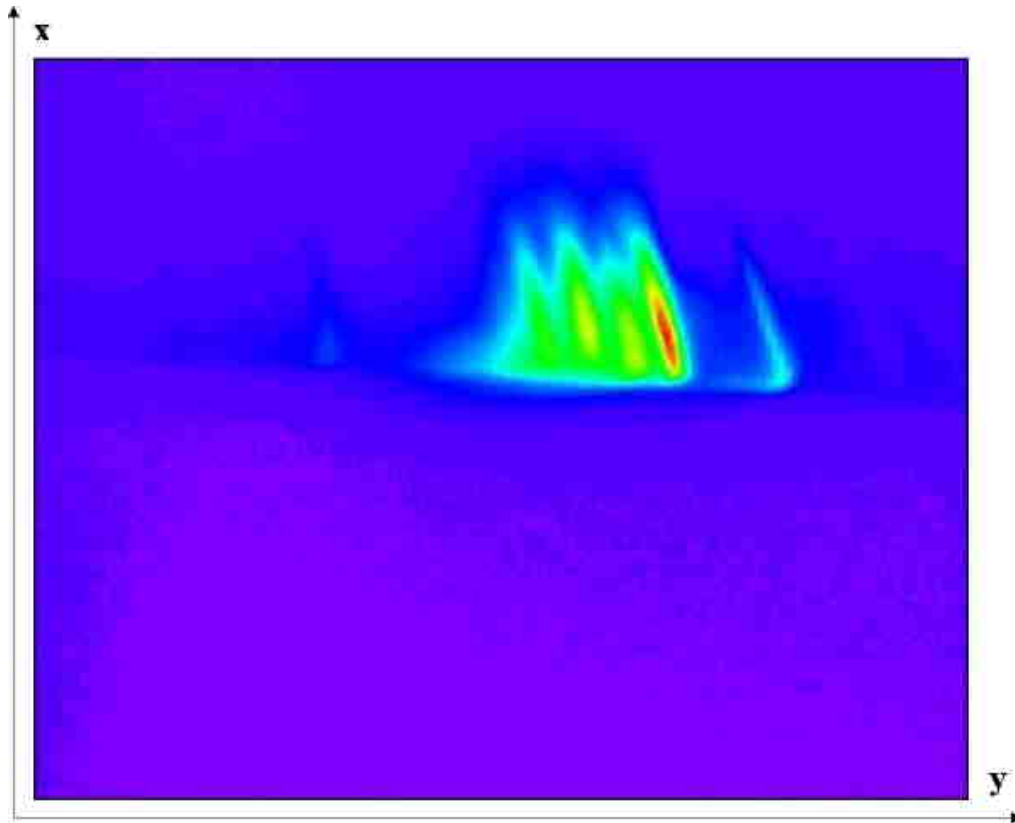


Abbildung 5.19: Zweidimensionale Darstellung der Fluoreszenz einer 2,5-DHB-MALDI-Probe ohne UV-Filter

Die Cameraachse ist in x-Richtung aus apparativen Gründen^{xvii} relativ zum Repeller um $4,5^\circ$ geneigt. Die räumliche Ausdehnung der zentralen Lumineszenzemission beträgt etwas über $420\ \mu\text{m}$ in Vorwärtsrichtung und ca. $815\ \mu\text{m}$ orthogonal dazu.

In der zweidimensionalen Aufsicht läßt sich eine Untergliederung der Lumineszenz in mehrere Einzelbereiche feststellen, die allerdings im dreidimensionalen Bild deutlicher wird. Die Lichtereignisse sind aufgrund des Beitrages an gestreutem Laserlicht nicht mehr homogen, sondern strukturiert.

^{xvii} Der senkrechte optische Aufbau an einem zur Camerahalterung nicht kompatiblen Schienensystem bedingt, daß ohne aufwendigen Umbau zur Fixierung der CCD-Camera nur eine Halterung realisiert werden konnte, die um $4,5^\circ$ gegenüber der Massenspektrometerachse geneigt ist.

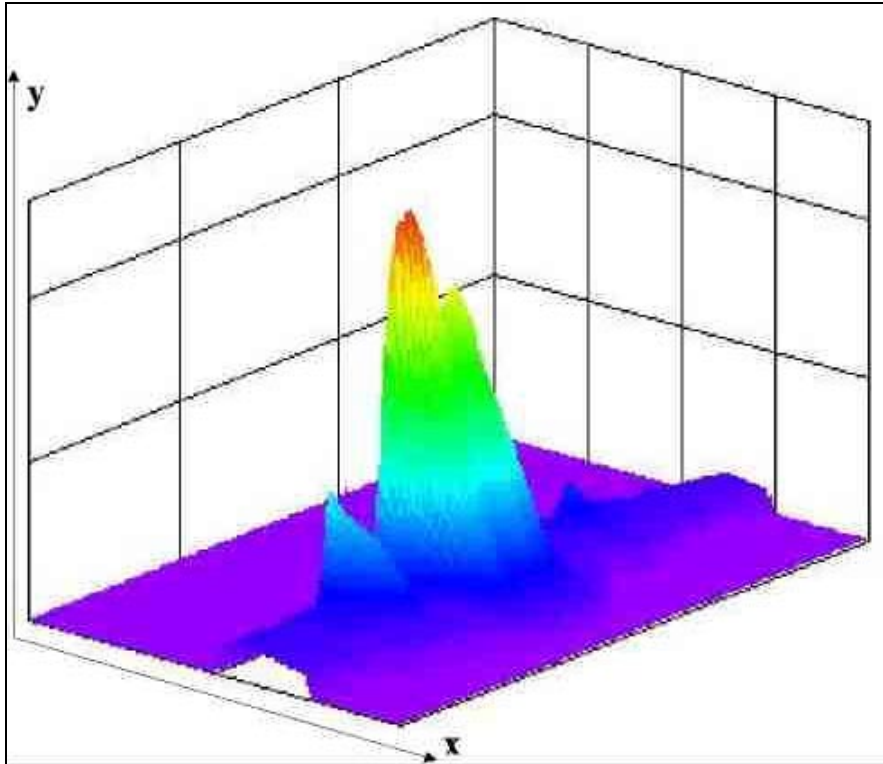


Abbildung 5.20: Dreidimensionale Darstellung der Fluoreszenz einer 2,5-DHB-MALDI-Probe ohne UV-Filter

Die Emission aus 2,5-DHB hat eine Mehrfachmaxima-Struktur, die sich in insgesamt sechs örtlich voneinander getrennte Einzelereignisse unterteilt. Die Untergliederung in intensive und weniger intensive Bereiche kann durch einzelne, dicht nebeneinander liegende Kristalle hervorgerufen werden. Die in der Fläche des Laserspot lokalisierten Kristalle werden getrennt voneinander zur Fluoreszenz angeregt. Allerdings ist die räumliche Breite der mittleren, zentralen Signalgruppe mit etwa $815\ \mu\text{m}$ knapp doppelt so groß, wie die Breite eines unter einem Winkel von $12,5^\circ$ einfallenden, $100\ \mu\text{m}$ breiten Laserpulses, der eine Fläche von $450\ \mu\text{m}$ mal $450\ \mu\text{m}$ überstreicht. Möglicherweise verbreitert sich der Laserspot in Abhängigkeit der Beschaffenheit der polykristallinen Oberfläche durch Brechungseffekte.

Die durch den Beitrag des gestreuten Laserlichts bestimmte räumlich deutlich größere Ausdehnung der Lichtereignisse in Vorwärtsrichtung als jene in der Abbildung 5.12 wird wahrscheinlich durch Streuung und Fluoreszenz an dem Laserlicht zugewandten Kristalloberflächen ausgelöst.

Die Untergliederung der Fluoreszenz und der Streuung findet sich auch in den Photos der anderen grob kristallisierenden Matrices (Ferulasäure, 3-HPA). Im Gegensatz dazu findet sich bei Dithranol keine unterscheidbare Einzelfluoreszenz zufällig angeordneter Kristallverbände (vergl. Anhang, Abbildungen 7.7 und 7.8).

Die vier eruptiven, voneinander getrennten Einzelereignisse im LIF-Photo von 2,5-DHB sind alle gleichermaßen um einen Winkel von ca. 12° gegenüber der Oberflächennormalen geneigt. Dieser Winkel hat aber gerade dieselbe Größenordnung wie der Einfallswinkel des Lasers. Die Fluoreszenzemission und der Beitrag der Streuung lassen vermuten, daß in der Folge auch der Desorptionsprozeß gerichtet, das heißt dem einfallenden Laserlicht zugeneigt ist. Desorption würde dann an den am intensivsten ausgeleuchteten bzw. angeregten Kristalloberflächen stattfinden.

In einer Untersuchung zur Abhängigkeit der Ionengenerierung vom Einstrahlungswinkel des Lasers gelangen Aksouh¹¹⁶ und Mitarbeiter ebenfalls zu dem Schluß, daß in Richtung der einfallenden Laserstrahls Ionen präferiert gebildet werden.

Bei der detektierten Lumineszenz handelt es sich um Emission aus der festen Phase. Diese Behauptung läßt sich dadurch stützen, daß das Anlegen eines elektrischen Beschleunigungsfeldes zwischen dem Repeller und der ersten Beschleunigungselektrode in der Höhe von 13 kV/cm keinerlei Auswirkungen auf die Ausdehnung der Fluoreszenz in Vorwärtsrichtung hat.

5.3.3 Nachanregung der Fluoreszenz in der Desorptionswolke

Unter üblichen MALDI-Bedingungen werden bei der Desorption zum größten Teil neutrale Teilchen erzeugt, die mit der durch den Laserpuls hervorgerufenen Eigengeschwindigkeit in das Vakuum expandieren. Mit einem zweiten Laser lassen sich diese Neutralen zur Fluoreszenz anregen (vergl. auch Kapitel 5.1).

Mit Hilfe der hier verwendeten experimentellen Anordnung ist versucht worden, die Fluoreszenz in der Gasphase photographisch nachzuweisen.

Dieser Ansatz erweist sich als experimentell schwierig, weil die Zahl der pro Desorptionslaserpuls erzeugten Teilchen sehr klein ist und damit auch die zu erwartende Quantenausbeute an Fluoreszenzlicht.

Innerhalb der durch die optischen Elemente, die Camera und die Entfernung zum Desorptionsort erzeugten Erfassungsgrenzen läßt sich Fluoreszenz aus der Gasphase nicht detektieren. Das kann einmal durch eine zu hohe Nachweisschwelle bedingt sein oder dadurch, daß die Lumineszenz beim Übergang in die Gasphase sofort durch Stöße in der expandierenden Teilchenwolke wieder gequencht werden.

6 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum MALDI-Desorptionsprozeß lassen sich in fünf Themenbereiche untergliedern:

- Massenspektrometrische Positionierungs-Experimente zur Geschwindigkeitsverteilung desorbierter neutraler Matrixmoleküle am Beispiel der Ferulasäure
- Zeitaufgelöste Lumineszenzexperimente mit einem hochverstärkten Photomultiplier
- höher zeitaufgelöste Lumineszenzuntersuchungen mit einem speziell verschalteten, schnellen Photomultiplier
- Wellenlängen-aufgelöste Spektroskopie an den den Desorptionsprozeß begleitenden Lumineszenzerscheinungen
- Photographische Abbildung der Festkörperlumineszenz

Es ist erstmalig die Geschwindigkeitsverteilung von durch den Desorptionslaserpuls erzeugten neutralen Matrixmolekülen bei der MALDI-MS bestimmt worden, die sich sonst der direkten massenspektrometrischen Bestimmung aufgrund der Elektroneutralität entzieht.

Obwohl die Meßwerte durch Inhomogenitäten der Matrixoberfläche relativ stark streuen, ist die initiale Geschwindigkeitsverteilung aus dem Kristallverband desorbierter neutraler Ferulasäuremoleküle mit Werten zwischen 240 m/s und 1250 m/s als relativ breit bestimmt worden. Sie weist ihr Maximum bei $v_D = 737 \pm 41$ m/s auf und liegt damit rund 100 m/s bis 150 m/s über der in der Literatur publizierten Durchschnittsgeschwindigkeit v_D von durch den Desorptionslaser prompt erzeugten Ferulasäureionen. Bei dieser Einschätzung muß auf die Initialgeschwindigkeiten der Ionen anderer Matrixsubstanzen zurückgegriffen werden, weil Daten zu den Startgeschwindigkeiten der Ferulasäureionen bislang nicht publiziert sind.

Aus diesen Geschwindigkeitsdaten resultiert eine kinetische Energieverteilung in Vorwärtsrichtung zwischen 0,04 eV und 1,21 eV mit einem durch eine Gaussfunktion angepaßten Mittelwert bei 0,61 eV. Bei der Berechnung dieser Werte bleibt allerdings die Zeitspanne der Freisetzung neutraler Ferulasäuremoleküle unberücksichtigt. Es läßt sich nicht unterscheiden zwischen spät gestarteten, schnellen Neutralen und früh gestarteten langsamen Molekülen, die zum selben Zeitpunkt am Ionisationsort sein mögen. Weiterhin werden Querkomponenten des gerichteten Desorptionsplumes relativ zur ionenoptischen Achse und

eine mögliche zeitliche Abhängigkeit der Dichteänderung nicht in die Rechnungen mit einbezogen.

Die Durchschnittsgeschwindigkeiten der Ferulasäureionen können leider nicht aus den Literaturdaten entnommen werden.

Die Differenz der genäherten Mittelwerte der Neutralen- und der Ionenverteilung ließe sich aber grob mit der statistisch zur Ionisierung aufzuwendenden Arbeit verknüpfen, z.B. als Beitrag in Form von Kollisionsenergie, sofern die Austrittsarbeit aus dem Festkörper für beide Spezies im Mittel gleich ist.

Durch nunmehr geplante weitere Experimente wird es leicht möglich sein, die Meßdaten zügig zu erweitern und über Wiederholung derselben die Meßunsicherheiten zu verringern. Für den Anschluß ist beabsichtigt, die Postionisationsexperimente auf andere Matrices sowie Analytsubstanzen auszuweiten.

In den zeitaufgelösten Experimenten mit einem hochverstärkten Photomultiplier ist deutlich geworden, daß die durch den Desorptionslaserpuls hervorgerufene Lumineszenz der Matrixmoleküle eine sehr kurze Zeitkonstante hat. Die Abklingzeit ist mit dem hochverstärkten *setup* eines Photomultipliers nicht zu detektieren, weil seine Signaldurchgangszeit oberhalb der des Meßereignisses liegt. Nichts desto trotz beweisen die Experimente an vier chemisch unterschiedlichen Matrixsubstanzen unzweifelhaft, daß spätestens 500 Nanosekunden nach dem Desorptionslaseranschlag keinerlei Fluoreszenz mehr zu detektieren ist. Diese Feststellung steht zumindest für die Matrix 3-Hydroxypicolinsäure im Widerspruch zu den Ergebnissen von Ehring et al⁶¹.

Durch eine spezielle Verschaltung der Photomultipliers ist es gelungen, durch Nutzung von nur fünf der 9 Dynoden sowohl die Ansprechzeit (300 ps *rise time*) als auch die Signaldurchgangszeit des PMT auf Kosten des Verstärkungsfaktors deutlich zu senken. Die höher zeitaufgelösten Lumineszenzuntersuchungen haben zu dem Ergebnis geführt, daß die Abklingfunktionen im Rahmen der Meßgenauigkeit kein typisch exponentielles Verhalten aufweisen. Es ist anzunehmen, daß die beteiligten Prozesse noch unterhalb des zeitlichen Auflösungsvermögens des schnellen PMT liegen, möglicherweise sogar auf der Picosekundenzeitskala.

Aus der kurzen Lebensdauer der emittierenden Zustände werden die Lumineszenzphänomene der Laser-induzierten Fluoreszenz zugeordnet. Phosphoreszenz aus längerlebigen Zuständen tritt nicht auf.

Die Fluoreszenz setzt zeitgleich mit dem Auftreffen des Desorptionslaserpulses auf die Matrixprobe ein und endet mit dem Verlöschen des Lasers. In diesem Zusammenhang wird deutlich, daß ein zeitlich besser auflösendes Detektionssystem zur Messung der Fluoreszenzlebensdauer notwendig ist (vergl. Kapitel 6.1).

Die den Desorptionsprozeß begleitenden Fluoreszenzemissionen der vier Matrices sind mit Hilfe eines Lichtwellenleiters gesammelt und in einem Monochromator spektral aufgelöst worden. Hierfür ist eine einfache zweidimensionale Verschiebeeinheit zur Durchführung des LWL ins Hochvakuum des Massenspektrometers konstruiert worden.

Die Fluoreszenzemissionen der vier Matrixsubstanzen weisen gegenüber den Absorptionsspektren in Lösung hohe Stokes-Shifts zwischen 5930 cm^{-1} und 11640 cm^{-1} auf. Die Fluoreszenzmaxima von 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 3-Hydroxypicolinsäure liegen mit 430 nm bzw. 432 nm im sichtbaren blauen Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Ferulasäure und Dithranol emittieren bei 450 nm und 594 nm .

Die Emissionsspektren zeigen breite Banden, die teilweise leicht strukturiert sind. Die niederenergetische Seitenbande im Fluoreszenzspektrum der Ferulasäure mit $\Delta E = 1783\text{ cm}^{-1}$ wird einer $n\pi^* \leftrightarrow \pi\pi^*$ -Kopplung der Carbonylfunktion der Carboxygruppe mit dem aromatischen π -Elektronensystem im angeregten Zustand zugeordnet.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der photographischen Abbildung der Lumineszenz der Matrixsubstanzen muß gefolgert werden, daß die Fluoreszenzspektren die Emissionen aus der festen Phase widerspiegeln.

Die Emissionsmaxima unterscheiden sich nicht-systematisch von den durch Ehring⁶¹ et al. ermittelten Zahlen. Möglicherweise nutzt Ehring ein Gitter mit einer zur Bestimmung der Emission nicht geeigneten *blaze*-Wellenlänge.

Es ist gelungen, im Rahmen dieser Arbeit die lichtschwachen Lumineszenzerscheinungen bei der MALDI-Desorption mit einem lichtstarken Objektiv auf dem Chip einer CCD-Camera photographisch abzubilden. Diese Abbildungen sind im Gegensatz zu in der Literatur^{59,60} dargestellten Untersuchungen unter für MALDI-Experimente typischen Bedingungen im Massenspektrometer aquiriert worden.

Der unter einem Winkel von $12,5^\circ$ einfallende Nd-YAG-Desorptionslaser mit einer Intensität von ca. 12 mJ/mm^2 evoziert in der kristallinen Matrix Fluoreszenzemission, die in Vorwärtsrichtung (Flugrichtung der Ionen) auf etwa $80 \text{ }\mu\text{m}$ (3-HPA) schnell auf den Wert e^{-1} ihrer Maximalintensität sinken.

Aus Fluoreszenzabbildungen der Kristallite von 2,5-Dihydroxybenzoesäure ohne Unterdrückung des Laserstreulichts durch Filter ist ersichtlich, daß sich die Emission in mehrere Bereiche untergliedert. Dies kann einem Beitrag der Laserlichtstreuung in Abhängigkeit des Laserwinkels zugeordnet werden. Dort, wo der Laserpuls auf ihm zugewandte Kristalloberflächen trifft, treten verstärkt Fluoreszenz und Streuung auf.

Die räumliche Ausdehnung der Fluoreszenz von 2,5-DHB in Vorwärtsrichtung beträgt hier $415 \text{ }\mu\text{m}$. Es ist möglich, daß hier ein Beitrag der Streuung an bereits desorbierten Matrixmolekülen aufgezeichnet wird.

6.1 Ausblick

Untersuchungen des Ablationsverhaltens organischer Kristallite unter Bestrahlung mit intensiven, kurzen, ultravioletten Laserpulsen sind nicht nur im Zusammenhang mit den Phasentransfer- und Ionisationsprozessen in der *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization* von Interesse. Thematische Verbindungen bestehen beispielsweise zu optischen Studien an Materialien unter extremen physikalischen Bedingungen, wie der Auswirkungen hoher Heizraten in kleinen Zeitintervallen und adiabatischer reversibler und irreversibler Schockwellen sowie zur Nichtgleichgewichtsthermodynamik.

Für die Zukunft sind weitere Positionierungsexperimente an Ferulasäure und an anderen Matrixsubstanzen geplant, damit die Initialgeschwindigkeiten miteinander verglichen werden können. Dabei gilt es, auch die Entfernung des Ionisationsortes von der Probenoberfläche zu variieren, um festzustellen, ob sich die Geschwindigkeitsverteilung in Abhängigkeit des Positionierungsorts ändert. Aus diesen Daten ließe sich die Dichteverteilung der Neutralen in Flugrichtung der Ionen gewinnen. Wird der Positionierungslaserpuls in ähnlicher Weise durch das obliegende Fenster der Ionenquelle eingekoppelt und dieselbe Serie von Experimenten durchgeführt, entstünde ein zweidimensionales Profil der Dichte- und Geschwindigkeitsverteilung neutraler Matrixmoleküle in der Desorptionswolke.

Zu untersuchen bleibt fürderhin die Abhängigkeit der Neutralenproduktion von der Laserleistung, sowie von Spotgröße und Einfallswinkel des Lasers.

Zudem zeigt die Geschwindigkeitsverteilung eine nicht unerhebliche Abhängigkeit auch von der Probenpräparationsmethode, deren Einflüsse in die Ergebnisbildung Eingang finden müssen.

Eine Weiterführung der zeitaufgelösten Untersuchungen an der Festkörperfluoreszenz ist nur mit einem schnellen optischen Detektionssystem sinnvoll, denn die Lebensdauern der angeregten Zustände liegen unterhalb der Nanosekundenzeitskala. Hierzu wäre eine bildgebende Picosekunden-Camera mit einem MCP-Detektor sinnvoll (z.B. Hamamatsu Streak Camera C7700).

Die Fluoreszenzspektren der Matrixsubstanzen weisen breite Banden auf. Zur Bandenverbreiterung tragen die Temperatur- und die chemische Umgebung der Matrixmoleküle bei.

Aus der Literatur ist bekannt, daß matrix-isolierte Spezies in der festen Phase bei Temperaturen des flüssigen Stickstoffs oder des flüssigen Heliums infolge Kühlung teilweise gut aufgelöste Absorptions- und Emissionsspektren aufweisen¹¹⁷. Zum Studium der an der Emission und der Absorption beteiligten Zustände der Matrixmoleküle bieten sich daher Arbeiten an isolierten Molekülen in gefrorenen nichtabsorbierenden Umgebungen an (Argon, Neon, Shpol'skii-Matrices¹¹⁸).

Im Hinblick auf die Matrixwahl besteht ein Manko an der Verfügbarkeit Festkörperspektroskopischer Daten, mit welchen die Auswahl anhand der Absorptionsfähigkeit bei der verwendeten Laserwellenlänge erleichtert werden könnte. Die UV-VIS-Absorptionsspektren der Matrixsubstanzen in Lösung liefern wegen der Lösungsmittelverschiebungen und der Konzentrationseinflüsse (Dimerbildung bei höheren Konzentrationen) in diesem Zusammenhang nur einen groben Anhalt. So sind für die MALDI-Massenspektrometrie Daten zum Absorptionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$ und zum Brechungsindex $n(\lambda)$ im kondensierten festen Zustand wichtig.

Absorptionskoeffizient und Brechungsindex lassen sich möglicherweise über ellipsometrische Experimente an Matrixeinkristallen gewinnen.

Weitere vertiefende Einblicke in die an der Absorption beteiligten elektronischen und vibratorischen Zustände können über resonante Raman-Streuung gewonnen werden.

Da der Desorptionslaserpuls im Matrixkristallgitter neben optischen Phononen auch akustische generiert, bildet auch die Methode der Photoakustik ein Instrument zur Untersuchung der Laser-Energieverteilung im Matrix-Festkörper.

Trotz des merklichen Erkenntnisgewinns über die Mechanismen des MALDI-Desorptionsprozesses bleibt abschließend mit den Worten von F. Hillenkamp im Abstract zum Wolfgang-Paul-Vortrag anlässlich der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie im März 2001 in München festzustellen:

„...und alle Fragen offen.“

(Brecht)

7

Anhang

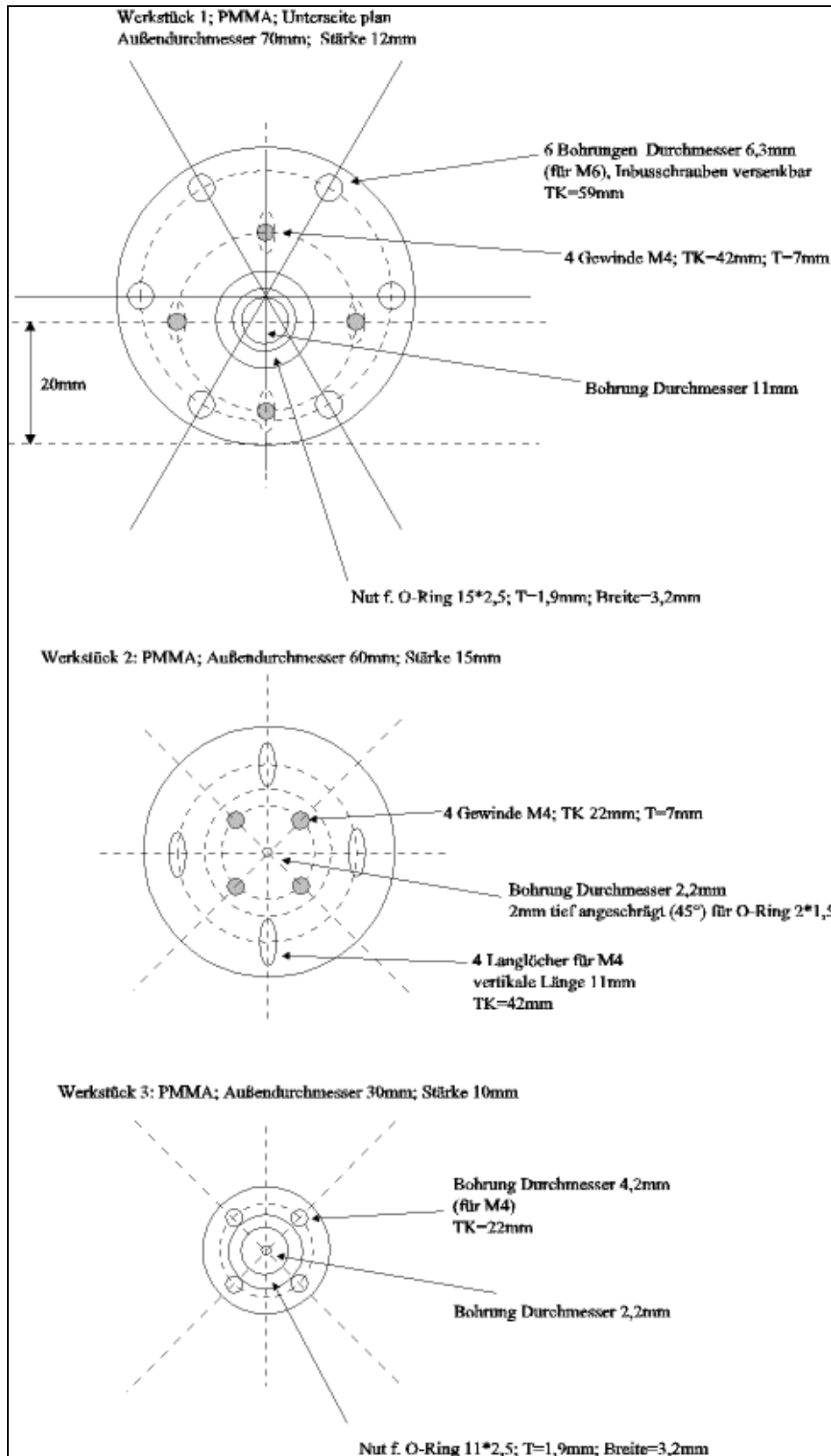


Abbildung 7.1: Vorrichtung zur zweidimensionalen Verschiebung des LWL im Vakuum

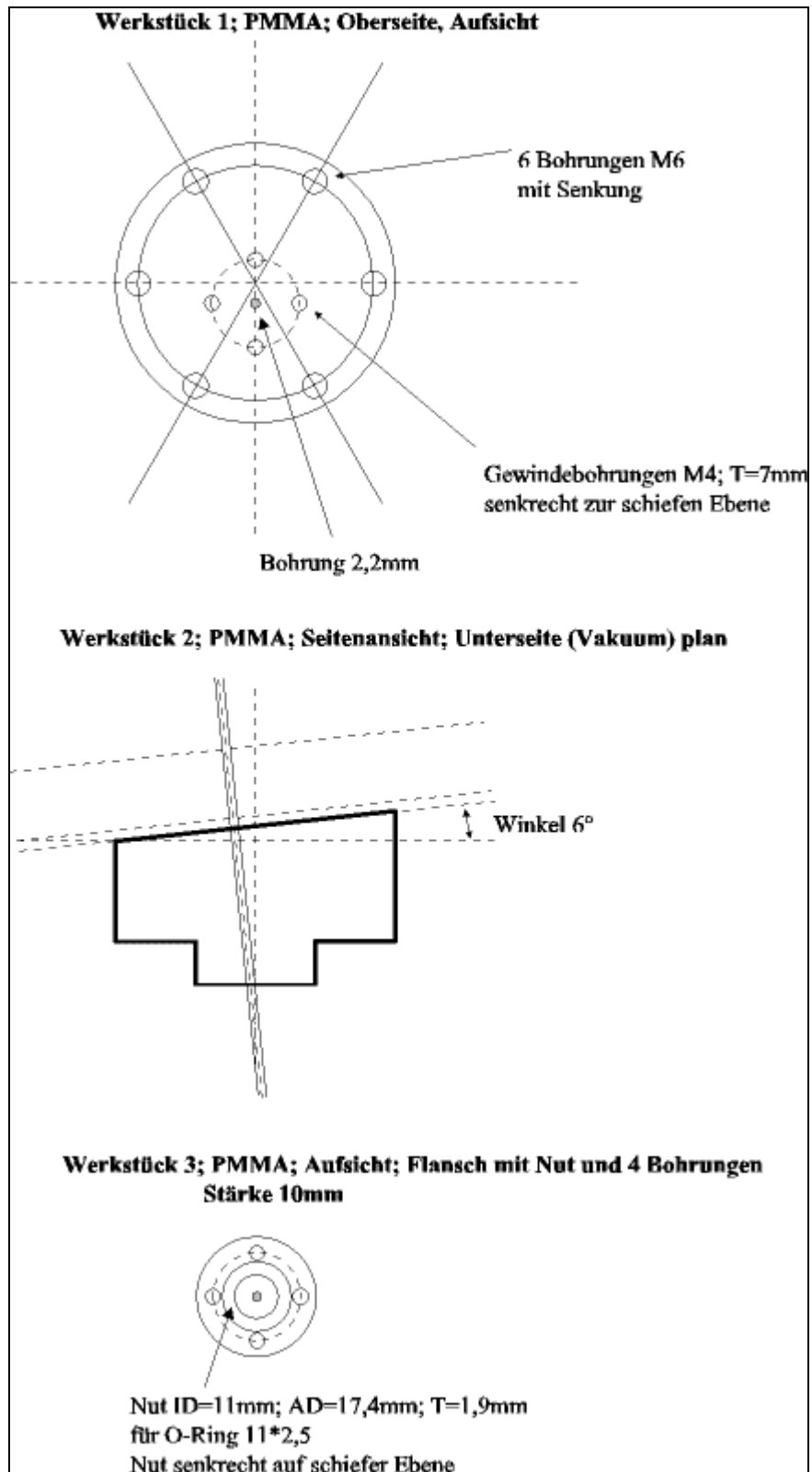


Abbildung 7.2: Vorrichtung zur eindimensionalen Verschiebung des LWL im Vakuum mit 6° Neigung relativ zur Probenoberfläche

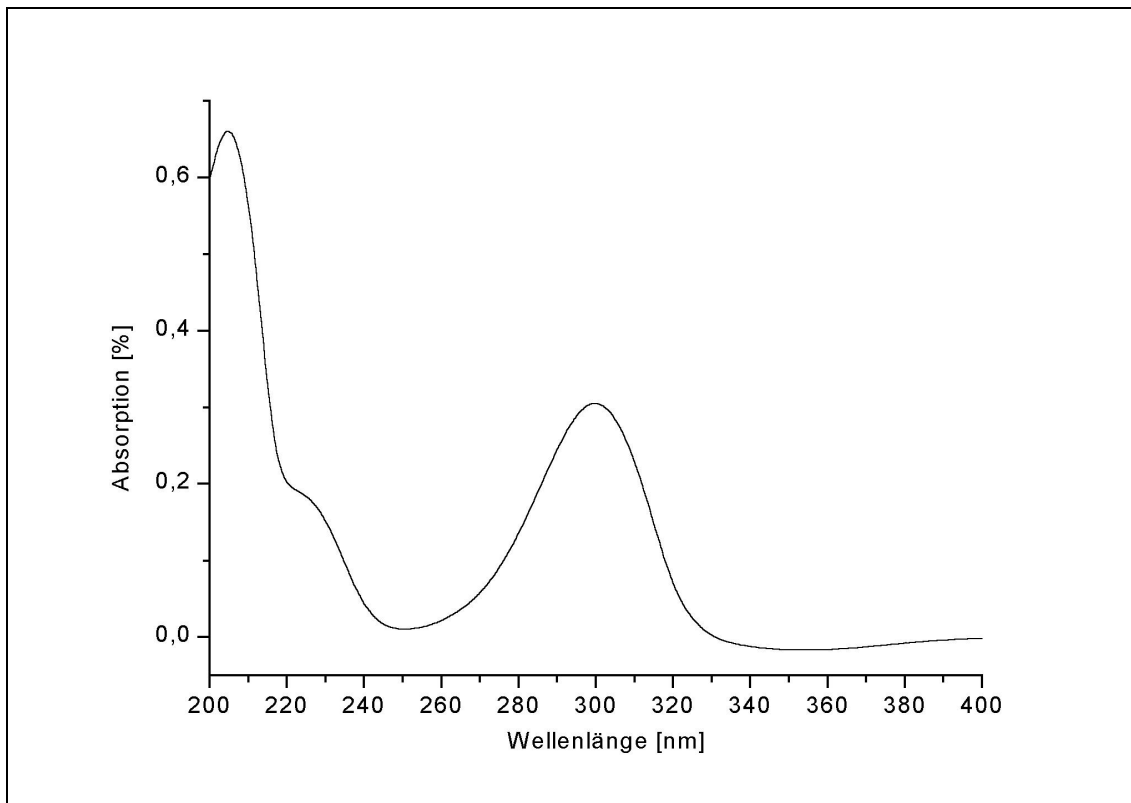


Abbildung 7.3: UV-VIS Absorptionsspektrum von 3-Hydroxypicolinsäure
($c=0,1\text{mmol/l}$, Lösungsmittel Wasser)

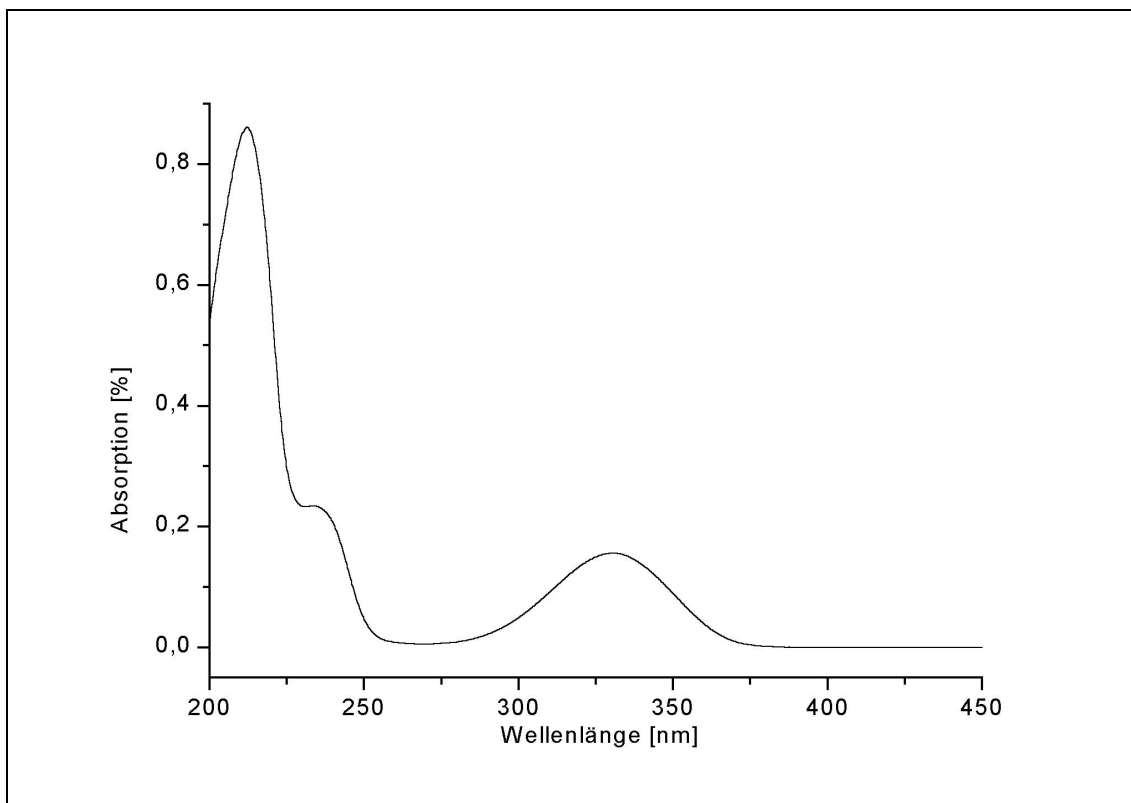


Abbildung 7.4: UV-VIS Absorptionsspektrum von 2,5-Dihydroxybenzoesäure
($c=0,04\text{mmol/l}$, Lösungsmittel THF)

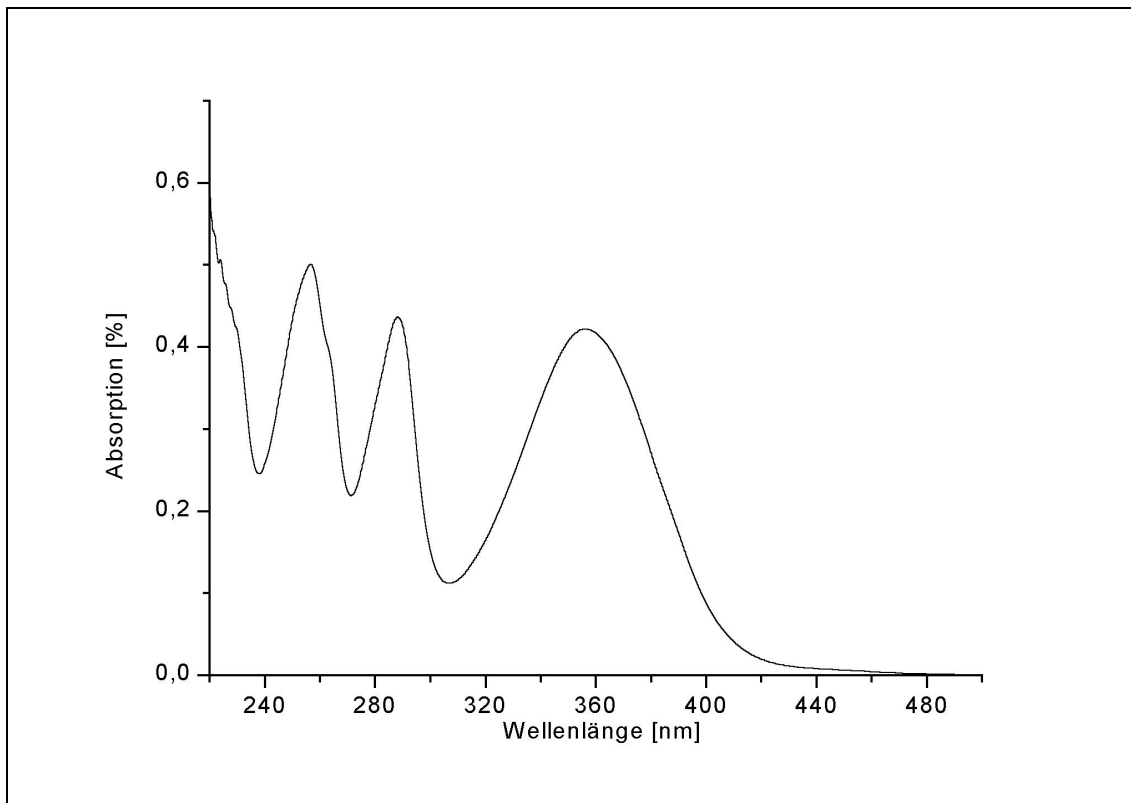


Abbildung 7.5: UV-VIS Absorptionsspektrum von Dithranol
($c=0,04\text{mmol/l}$, Lösungsmittel THF)

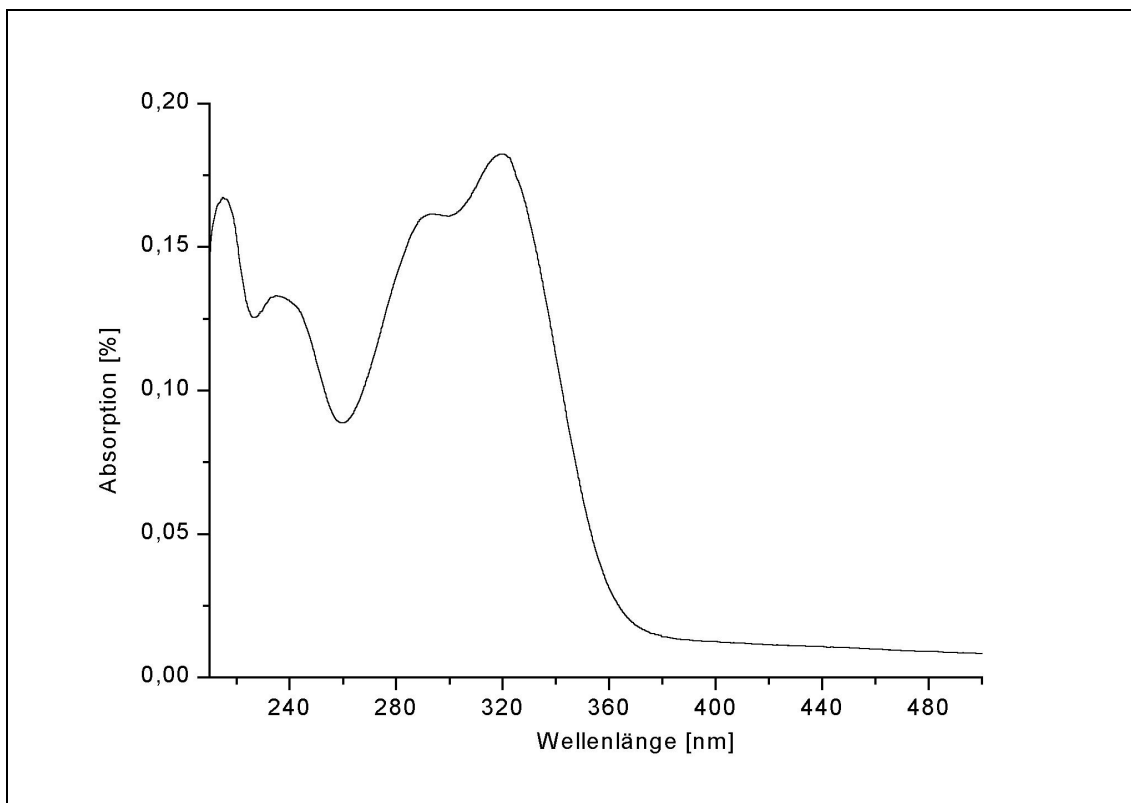


Abbildung 7.6: UV-VIS Absorptionsspektrum von Ferulasäure
($c=0,01\text{mmol/l}$, Lösungsmittel Wasser:EtOH (50:50))

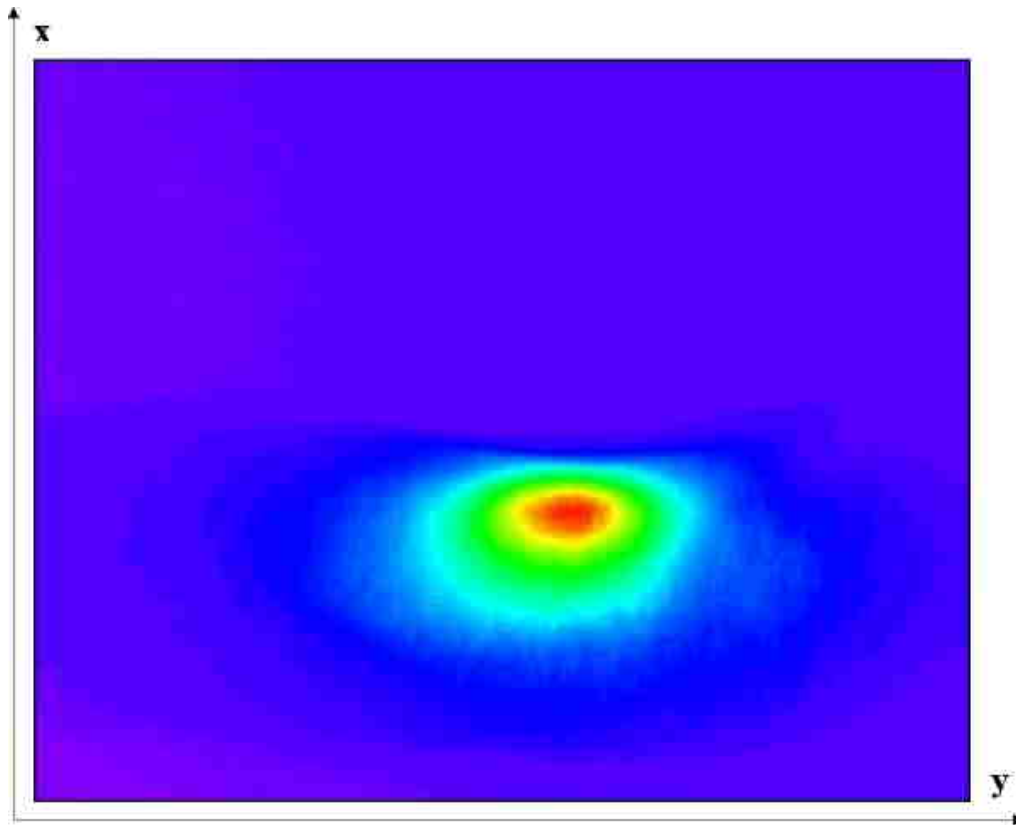


Abbildung 7.7: Zweidimensionale Darstellung der Fluoreszenz einer Dithranol-MALDI-Probe

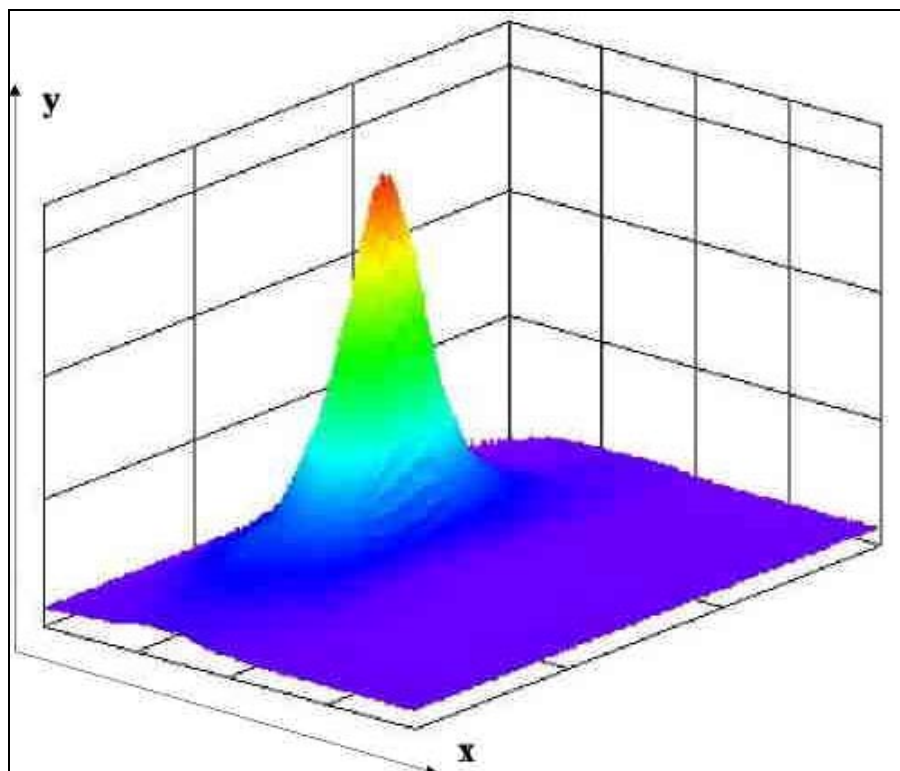


Abbildung 7.8: Dreidimensionale Darstellung der Fluoreszenz einer Dithranol-MALDI-Probe

8 Literaturverzeichnis

- ¹ Hahner, S., A. Schneider, A. Ingendoh, J. Mosner, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) e82
- ² Fenselau, C., *Anal. Chem.* 69 (1997) 661 A
- ³ S. Schmidt, M.F. Appel, R.M. Garnica, R.N. Schindler, T. Benter, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3721
- ⁴ Tönnies, K., C. Weickhardt, Vortrag: Analytische Laserdesorption-Lasermassenspektrometrie mit ultrakurzen Laserpulsen: Anwendungen auf Bodenanalytik, DGMS-Tagung 2001, München
- ⁵ Heger, H.J., R. Zimmermann, R. Dorfner, M. Beckmann, H. Griebel, A. Kettrup, U. Boesl, *Anal. Chem.* 71 (1999) 46
- ⁶ Zamfir, A., J.P.-Katalinic, *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 1, 291
- ⁷ Marshall, A.G., C.L. Hendrickson, G.S. Jackson, *Mass Spec. Rev.* 17 (1998) 1
- ⁸ Weickhardt, C., F. Moritz, J. Grotemeyer, *Mass Spec. Rev.* 15 (1996) 139
- ⁹ Karas, M., D. Bachmann, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* 57 (1985) 2935
- ¹⁰ Horneffer, V., K. Dreisewerd, H.-C. Lüdemann, F. Hillenkamp, M. Läge, K. Strupat, *Int. J. Mass Spec.* 185/186/187 (1999) 859
- ¹¹ Wang, B.H., K. Dreisewerd, U. Bahr, M. Karas, F. Hillenkamp, *J. Am. Soc. Mass Spec.* 4 (1993) 393
- ¹² Land, C.M., G.R. Kinsel, *J. Am. Soc. Mass Spec.* 9 (1998) 1060
- ¹³ Brueker, K., R. Knochenmuss, R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spec.* 10 (1999) 1111
- ¹⁴ van Amerom, F.H.W., W.J. van der Hart, N.M.M. Nibbering, *Int. J. Mass Spec.* 182/183 (1999) 7
- ¹⁵ Krüger, R., A. Pfenninger, M. Karas, Vortrag: Untersuchungen zum Analyteinbau in MALDI-Matrices mit Hilfe von pH-Indikatoren, DGMS-Tagung 2001, München
- ¹⁶ Meffert, A., Dissertation, Universität Würzburg, 1998
- ¹⁷ Karas, M., M. Glückmann, J. Schäfer, *J. Mass Spec.* 35 (2000) 1
- ¹⁸ Zhigilei, L.V., B.J. Garrison, *J. Appl. Phys.* 88(3) (2000) 1281
- ¹⁹ Dogruel, D., P. Williams, *Rapid Comm. Mass Spec.* 10 (1996) 453
- ²⁰ Hoberg, A.-M., D.M. Haddleton, P.J. Derrick, A.T. Jackson, J.H. Scivens, *Eur. Mass Spec.* 4 (1998) 435
- ²¹ Hagelin, G., A. Rogstad, *Rapid Comm. Mass Spec.* 12 (1998) 25
- ²² Martin, K., K. Müllen, *Rapid Comm. Mass Spec.* 10 (1996) 1471
- ²³ Daves, G.D., *Mass Spectrom.* 12 (1979) 59
- ²⁴ O'Farrell, P.H., *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 4007
- ²⁵ Evershed, R., G. Wolf, G. Shaw, G. Eglinton, *Org. Mass Spectrom.* 20(7) (1985) 445
- ²⁶ Macfarlane, R.D., D. F. Torgerson, *Science* 191 (1976) 920
- ²⁷ *Secondary Ion Mass Spectrometry: Basic Concepts, Instrumental Aspects, Applications and Trends*, A. Benninghoven, F. G. Rüdener and H. W. Werner, Wiley, New York, 1987
- ²⁸ Gaskell, S.J., *J. Mass Spec.* 32 (1997) 677
- ²⁹ Thompson, B.A., J.V. Iribane, *J. Chem. Phys.* 71 (1979) 4451
- ³⁰ Fenn, J.B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Mass Spectrom.Rev.* 9 (1990) 37

-
- ³¹ Hillenkamp, F., Ion Formation from Organic Solids, in: Springer Series in Chem. Phys. 25, ed.: A. Benninghoven, Springer, Berlin, 1983
- ³² Kistemaker, P.G., M.M.J. Lens, G.J.Q. van der Peyl, A.J.H. Boerboom, in: Advances in Mass Spectrometry 8A, ed.: A. Quale, Heyden, London, 1980
- ³³ Zenobi, R., R. Knochenmuss, Mass Spec. Reviews 17 (1998) 337
- ³⁴ Thomson, J.J., Rays of Positive Electricity, Longmans Greens, London, 1913
- ³⁵ Aston, F.W., Phil. Mag. 38 (1919) 707
- ³⁶ Dempster, A.J., Proc. Am. Phil. Soc. 75 (1935) 755
- ³⁷ Hill, H.C., Einführung in die Massenspektrometrie, Heyden, Rheine, 1973
- ³⁸ De Hoffmann, D.E., J. Charette, V. Stroobant, Mass Spectrometry, Principles and Applications, Wiley, New York, 1996
- ³⁹ Paul, W., H.S. Steinwedel, Z. Naturforschung 8a (1953) 448
- ⁴⁰ Hartmann, H., K.-P. Wanczek, Ion Cyclotron Resonance Spectrometry, in: Lecture Notes in Chemistry 7, Springer, Berlin, 1978
- ⁴¹ Stevens, W.E., Phys. Rev., 69 (1946) 691
- ⁴² Cameron, A.E., D.F. Eggers Jr., Rev. Sci. Instr. 19 (1948) 605
- ⁴³ Wiley, W.C., J.B. Mc Laren, Rev. Sci. Instr. 26 (1955) 1150
- ⁴⁴ Cotter, R.J., Time of Flight Mass Spectrometry, ACS Professional Reference Books, 1997
- ⁴⁵ Boesl, U., R. Weinkauf, E.W. Schlag, Int. J. Mass Spec. Ion Proc. 112 (1992) 87
- ⁴⁶ Weinkauf, R., K. Walter, C. Weickhardt, U. Boesl, E.W. Schlag, Z. Naturforsch. A 44 (1989) 1219
- ⁴⁷ Alikanov, S.G., Sov. Phys. JETP 4 (1952) 452
- ⁴⁸ Mamayrin, B. A., D.V. Karataev, D.V. Shmikk, V.A. Zagulin, Sov Phys JETP 37 (1973) 45
- ⁴⁹ Bergmann, T., T.P. Martin, H. Schaber, Rev. Sci. Instr. 60 (1989) 347, 792
- ⁵⁰ Frey, R., G. Weiss, H. Kaminski, E.W. Schlag, Z. Naturforsch. A 40 (1985) 1349
- ⁵¹ Vestal, M.L., P. Juhasz, S. A. Martin, Rapid Commun. Mass Spec. 9 (1995) 1044
- ⁵² Berentsen, S., Dissertation, Universität Duisburg (1998)
- ⁵³ Zhigilei, L.V., P.B.S. Kodali, B.J. Garrison, J. Phys. Chem. B 101 (1997) 2028
- ⁵⁴ Kim, H., J.C. Postlewaite, T. Zyung, D. Dlott, Appl. Phys. Lett. 54 (1989) 2274
- ⁵⁵ Chen, X., J.A. Carrol, R.C. Beavis, J. Am. Soc. Mass Spec. 9 (1998) 885
- ⁵⁶ Heise, T.W., E.S. Yeung, Anal. Chem. 66 (1994) 355
- ⁵⁷ Glückmann, M., A. Pfenninger, M. Karas, Posterbeitrag P11, DGMS-Tagung 2001, München
- ⁵⁸ Dlott, D.D., J. Phys. Chem. B 102 (1998) 2121
- ⁵⁹ Puretzky, A.A., D.B. Geohegan, Chem. Phys. Lett. 286 (1998) 425
- ⁶⁰ Puretzky, A.A., D.B. Geohegan, G.B. Hurst, M.V. Buchanan, B.S. Luk'yanchuk, Phys. Rev. Lett. 83(2) (1999) 444
- ⁶¹ Ehring, H., B.U.R. Sundqvist, J. of Mass Spec. 30 (1995), 1303
- ⁶² Mowry, C.D., M.V. Johnston, Rapid Comm. Mass Spec. 7 (1993) 569
- ⁶³ Vertes, A., G. Irinyi, R. Gijbels, Anal. Chem. 65 (1993) 2389
- ⁶⁴ Beavis, R.C., B.T. Chait, Chem. Phys. Lett. 181 (1991) 479

-
- ⁶⁵ Glückmann, M., M. Karas, Poster: Imaging of the Ion Velocity in the Plume produced by UV-MALDI, ASMS, 2000, San Diego
- ⁶⁶ Dreisewerd, K., M. Schurenberg, M. Karas, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spec. Ion Proc.* 154 (1996) 171
- ⁶⁷ Ehring, H., M. Karas, F. Hillenkamp, *Org. Mass Spec.* 27 (1992) 427
- ⁶⁸ Karbach, V., R. Knochenmuss, *Rapid Comm. Mass Spec.* 12 (1998) 968
- ⁶⁹ Liao, P.-C., J. Allison, *J. Mass Spec.* 30 (1995) 511
- ⁷⁰ Johnson, R.E., *Int. J. Mass Spec. Ion Proc.* 139 (1994) 25
- ⁷¹ Knochenmuss, R., F. Dubois, M.J. Dale, R. Zenobi, *Rap. Comm. Mass Spec.* 10 (1996) 871
- ⁷² Karas, M., D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spec. Ion Proc.* 78 (1987) 53
- ⁷³ Karas, M., U. Bahr, J.R. Stah-Zeng, in: *Large Ions: Their Vaporisation, Detection and Structural Analysis*, eds: T. Baer, C.Y. Ng, I. Powis, Wiley, London, 1996
- ⁷⁴ Grigorean, G., R.I. Carey, I.J. Amster, *Eur. Mass Spec.* 27 (1992) 827
- ⁷⁵ Krause, J., M. Stoeckli, U.P. Schlunegger, *Rapid Comm. Mass Spec.* 10 (1996) 1927
- ⁷⁶ McLuckey, S.A., D. Cameron, R.G. Cooks, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 1313
- ⁷⁷ Cheng, X., Z. Wu, C. Fenselau, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 4844
- ⁷⁸ Nold, M.J., B.A. Cerda, C. Wesdemiotis, *J. Am. Soc. Mass Spec.* 10 (1999) 1
- ⁷⁹ Jorgensen, T.J.D., G. Bojesen, H. Rahbek-Nielsen, *Eur. Mass Spec.* 4 (1998) 39
- ⁸⁰ Vertes, A., R. Gijbels, R.D. Levine, *Rap. Comm. Mass Spec.* 4(6) (1990) 228
- ⁸¹ Mowry, C.D., M.V. Johnston, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 1904
- ⁸² Harrison, A.G., *Chemical Ionization Mass Spectrometry*, CRC Press, Boca Raton, 1992
- ⁸³ Creaser, C.S., J.R. Sodeau, in: *Perspectives in Modern Chemical Spectroscopy*, ed.: D.L. Andrews, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1990
- ⁸⁴ Hamanoue, K., T. Nakayama, Y. Kajiwarra, T. Yamaguchi, H. Teranishi, *J. Chem. Phys.* 86 (1987), 6654
- ⁸⁵ Chakraborty, T., E.C. Lim, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 11151
- ⁸⁶ Lambert, W.R., P.M. Felker, J.A. Syage, A.H. Zewail, *J. Chem. Phys.* 81(5) (1984) 2195
- ⁸⁷ Carter, T.P., G.D. Gillispie, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 2691
- ⁸⁸ Asher, S.A., C.H. Munro, *Z. Chi, Laser Focus World* 33(7) (1997) 99
- ⁸⁹ Bondybey, V.E., in: *Chemistry and Physics of Matrix-Isolated Species*, eds.: L. Andrews, M. Moskovits, Elsevier Sciences Publishers, Amsterdam, NL, 1989, p111
- ⁹⁰ Bergmann, Schäfer, *Lehrbuch der Experimentalphysik*, Bd. 6, Festkörper, ed.: W. Raith, de Gruyter, Berlin, 1992, 84ff
- ⁹¹ Small, G.J., *J. Chem. Phys.* 52(2) (1970) 656
- ⁹² Beeson, M.D., K.K. Murray, D.H. Russel, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1981
- ⁹³ Jorgenson, T.J., B.U.R. Sundqvist, *Rapid Comm. Mass Spec.* 5 (1991) 574
- ⁹⁴ Liu, H.M.D., U.P. Schlunegger, *Rapid Comm. Mass Spec.* 10 (1996) 483
- ⁹⁵ Gorman, J.J., B.L. Ferguson, T.B. Nguyen, *Rapid Comm. Mass Spec.* 10 (1996) 529
- ⁹⁶ Mohr, M.D., K.O. Börnsen, H.M. Widmer, *Rapid Comm. Mass Spec.* 9 (1995) 809
- ⁹⁷ Beavis, R.C., T. Chaudhary, B.T. Chait, *Org. Mass Spec.* 27 (1992) 156

-
- ⁹⁸ Kinsel, G.R., J.M. Grundwuermer, J. Grotemeyer, *J. Am. Soc. Mass Spec.* 4 (1993) 2
- ⁹⁹ Muskat, T., Diplomarbeit, Universität Kiel (2001)
- ¹⁰⁰ Amft, M., Dissertation, Universität Würzburg (1998)
- ¹⁰¹ Bönisch, M., Diplomarbeit, Technische Universität München (1992)
- ¹⁰² Ioanoviciu, D., *J. Am. Soc. Mass Spec.* 6 (1995) 889
- ¹⁰³ De Marco, F., E. Penko, *Rev. Sci. Instr.* 40(9) (1969) 1158
- ¹⁰⁴ De Martini, F., K.P. Wacks, *Rev. Sci. Instr.* 38(7) (1967) 866
- ¹⁰⁵ Crasey, D. J., P. A. Halford-Maw, D.E. Heard, J. E. Spence, B. J. Whitaker, *Rev. Sci. Instr.* 69(12) (1998) 4068
- ¹⁰⁶ Dasch, W., Dissertation, Christian-Albrecht-Universität, Kiel 1983
- ¹⁰⁷ Perkampus, H.H., *Lexikon Spektroskopie*, VCH (1993) 101
- ¹⁰⁸ Juhasz, P., M.V. Vestal, S.A. Martin, *J. Am. Soc. Mass Spec.* 8 (1997) 209
- ¹⁰⁹ Knochenmuss, R., A. Vertes, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 5406
- ¹¹⁰ van Breeman, R.B., M. Snow, R.J. Cotter, *Int. J. Mass Spec. Ion Proc.* 49 (1983) 35
- ¹¹¹ Glueckmann, M., M. Karas, *J. Mass Spec.* 34 (1999) 467
- ¹¹² Becker, H.G.O., H. Böttcher, *Einführung in die Photochemie*, DVW-Verlag Berlin, 1991
- ¹¹³ Chiang, Y., A.J. Kresge, N.P. Schepp, *J. Am. Chem Soc.* 111 (1989) 3977
- ¹¹⁴ Bökelmann, V., B. Spengler, R. Kaufmann, *Eur. Mass Spec.* 1 (1995) 81
- ¹¹⁵ Kampmeier, J., K. Dreisewerd, M. Schürenberg, K. Strupat, *Int. J. Mass Spec. Ion Proc.* 167/170 (1997) 31
- ¹¹⁶ Aksouh, F., P. Chaurand, C. Deprun, S. Della-Negra, J. Hoyes, Y. Le Beyec, R.R. Pinho, *Rapid Comm Mass Spec.* 9 (1995) 515
- ¹¹⁷ Bondybey, V.E., in: *Chemistry and Physics of Matrix Isolated Species*, ed: L. Andrews, M. Moscovits, North-Holland, Amsterdam, 1989
- ¹¹⁸ Carter, T.P., G.D. Gillispie, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 2691