

Planung und Aufbau von  
Flugzeit Massenspektrometern  
und  
Verwendung der Massenspektrometrie  
zur Konformationsanalyse

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von

Andreas Uphoff

Kiel

2002

Referent/in:.....

Korreferent/in:.....

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Zum Druck genehmigt: Kiel,.....

Der Dekan

A musical score for a snare drum piece in 4/4 time, consisting of four staves. The first staff begins with a treble clef and a 4/4 time signature. The melody is composed of eighth and quarter notes. The second and third staves feature triplets of eighth notes, indicated by a '3' above a slur. The fourth staff concludes the piece with a double bar line.

(Michael Palin, Monty Python)



## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die Planung, Simulation und Konstruktion zweier Massenspektrometer beschrieben. Hierzu wird zunächst die Theorie der Flugzeit-Massenspektrometrie entwickelt. Formeln zur Beschreibung der Flugzeit durch ein allgemeines, mit nur linearen elektrischen Feldern arbeitendes, Flugzeit-Massenspektrometer (ToF-MS) werden angegeben. Die angegebenen Formeln werden in Potenzreihen entwickelt und in einer einheitlichen Form dargestellt. Aus den genäherten Formeln werden die Bedingungen für optimale Geometrie und Spannungswerte besonders im Quellenbereich eines Massenspektrometers hergeleitet.

Der Stand der Entwicklung bei miniaturisierten Massenspektrometern mit Schwerpunkt auf Flugzeit Massenspektrometern wird dargestellt. Es werden besonders verschiedene Techniken zur Ionenerzeugung für Flugzeit Massenspektrometer diskutiert und Beispiele für die Verwendung in miniaturisierten Massenspektrometern angegeben.

Auf der Grundlage der bekannten Geräte wird das Design eines miniaturisierten ToF Massenspektrometers mit neuartigem Reflektor beschrieben. Der Aufbau der Simulation mit Hilfe von SIMION und die Optimierung der genauen Reflektorform durch Simplex Optimierung wird vorgestellt. Aus der Simulation des Gesamtgerätes werden wichtige Eigenschaften des Massenspektrometers untersucht und anschliessend mit dem Verhalten des tatsächlich realisierten Gerätes verglichen. Das realisierte Gerät zeigt Eigenschaften, die in guter Übereinstimmung mit der theoretischen Erwartung stehen. Ansätze zur Verbesserung des Gerätes werden diskutiert.

Die Eigenschaften eines zweiten, alternativen Aufbaus werden durch Simulation bestimmt. Dieses zweite Design zeigt etwas geringere Auflösung, aber höhere Sensitivität als der erste Aufbau, wurde aber wegen technischer Umsetzungsprobleme noch nicht realisiert.

Der Aufbau eines MADLI-ToF Massenspektrometers wird beschrieben, dessen Quelle kommerziell erhältlich ist. Das Gerät wird mit SIMION simuliert und die Optimierung der Spannungen am gitterlosen Reflektor werden optimiert. Die in der Simulation gefundenen Eigenschaften des Gerätes werden mit ersten Messungen verglichen.

Die Anwendung der Massenspektrometrie zur Analyse der Konformation von Proteinen und Peptiden wird diskutiert, verschiedene Verfahren werden vorgestellt. Die Untersuchungen zur Veränderung der Ladungsverteilung und der Fragmentierungsmuster bei ESI Massenspektrometrie von  $\beta$ -Amyloid werden geschildert. Bei den Untersuchungen wurden leider keine signifikanten Hinweise auf die erwarteten Konformationsänderungen festgestellt. Die möglichen Ursachen dafür werden diskutiert.

## Abstract

This thesis describes planning and building of two mass spectrometers. First the general theory of time-of-flight mass spectrometers is developed. Mathematical descriptions of the time-of-flight through an arbitrary mass spectrometer are given. The electrical fields in this treatment are restricted to linear homogeneous fields.

The given formulae are developed into power series and presented in a uniform way. From these power series optimal geometries and potentials for maximum performance are calculated. The main stress is on the ion source of the mass spectrometer.

The state of the art in miniature mass spectrometer development is reviewed. Emphasis is placed on the development of small *time-of-flight* mass spectrometers. Different ion source for time-of-flight mass spectrometers are presented and examples are given for their use in miniature mass spectrometers.

On the basis of the known instruments the design of a miniaturized mass spectrometer with new reflector construction is described. The new instrument is simulated using SIMION and the optimal reflector geometry is found using simplex optimization. From simulation of the optimized instrument important characteristics of the instrument have been examined, which are compared to the actual characteristics of the built instrument. The measurements agree well with the expected values from simulation. Approaches for improvement of the instrument performance are discussed.

A second alternative construction with the same reflector design is described, which shows less resolving power but probably more sensitivity. Due to construction problems this second instrument was not build.

Construction of a MADLI ToF mass spectrometer that has a commercially available ion source is described. A simulation is developed using SIMION and the reflector of this instrument is optimized. Instrument characteristics derived from the simulation are compared to actual measurements.

Application of mass spectrometry for analysis of conformational states of proteins and peptides is reviewed. Experiments monitoring the charge state distribution and fragmentation patterns of ESI spectra of  $\beta$ -amyloid are described. In these experiments no significant evidence for the expected conformational change was found. Possible reasons for this unexpected failure are discussed.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theorie</b>	<b>3</b>
2.1	Einleitung . . . . .	3
2.1.1	Geschichte . . . . .	3
2.1.2	Grundprinzip . . . . .	3
2.2	Aufbau eines ToF MS . . . . .	4
2.3	Fehlerquellen . . . . .	7
2.4	physikalische Grundlagen . . . . .	9
2.4.1	erste Beschleunigungsstufe . . . . .	12
2.4.2	zweite Beschleunigungsstufe . . . . .	13
2.4.3	feldfreie Flugstrecke . . . . .	14
2.4.4	Reflektor . . . . .	15
2.4.5	Nachbeschleunigungsstufe . . . . .	16
2.5	Näherung der ToF Formel . . . . .	17
2.6	Fehlerkorrektur . . . . .	20
2.6.1	Zeitfehler . . . . .	20
2.6.2	Ortsfehler . . . . .	20
2.6.3	Energiefehler - Geschwindigkeitsfokussierung . . . . .	22
2.6.4	Energiefehler - Post source pulse focussing . . . . .	25
<b>3</b>	<b>Mini-Tof</b>	<b>29</b>
3.1	Vorteile der Miniaturisierung . . . . .	29
3.2	bisherige Ansätze . . . . .	30
3.2.1	Massenanalysatoren . . . . .	31
3.2.2	Ionenquellen für Flugzeit Massenspektrometer . . . . .	36
3.3	Planung des Mini-ToF-MS . . . . .	42
3.3.1	Ionisierung . . . . .	42
3.3.2	Reflektor . . . . .	43
3.3.3	Quelle . . . . .	44
3.3.4	Detektor . . . . .	45
3.4	Aufbau der Simulation . . . . .	45
3.4.1	Reflektor . . . . .	46

3.4.2	Detektor . . . . .	49
3.4.3	Quelle . . . . .	49
3.5	Optimierung des Reflektors . . . . .	53
3.5.1	Simplex-Verfahren . . . . .	53
3.5.2	Ergebnisse . . . . .	59
3.6	Simulationsergebnisse des vollständigen Mini-ToF-MS . . . . .	62
3.6.1	Simulation des optimierten Gerätes mit Ablenkdraht . . . . .	69
3.7	mechanische Realisierung . . . . .	71
3.7.1	Gehäuse . . . . .	72
3.7.2	Quelle . . . . .	72
3.7.3	Reflektor . . . . .	72
3.7.4	Detektor . . . . .	73
3.7.5	optischer Aufbau . . . . .	73
3.7.6	Elektronik . . . . .	74
3.7.7	Probeneinlass . . . . .	75
3.8	erste Messungen . . . . .	75
3.8.1	REMPI . . . . .	75
3.8.2	Laser EI . . . . .	78
3.9	Verbesserungen . . . . .	79
3.9.1	Einlasssystem . . . . .	80
3.9.2	Ionisierung . . . . .	81
3.9.3	Laser . . . . .	82
3.9.4	Reflektor . . . . .	82
<b>4</b>	<b>MALDI-ToF</b>	<b>83</b>
4.1	Scout Ionenquelle . . . . .	83
4.2	Reflektor . . . . .	84
4.3	Ergebnisse der Simulation . . . . .	85
4.4	mechanische Realisierung . . . . .	92
4.5	erste Messungen . . . . .	94
<b>5</b>	<b>Konformationsanalyse von Peptiden</b>	<b>96</b>
5.1	Motivation . . . . .	96
5.2	„klassische“ Methoden der Konformationsanalyse . . . . .	97
5.2.1	Circulardichroismus . . . . .	97
5.2.2	Gelpermeationschromatographie . . . . .	97
5.2.3	Lichtstreuung . . . . .	98
5.2.4	Röntgenstrukturanalyse . . . . .	98
5.2.5	Kernspinresonanzspektroskopie . . . . .	99
5.3	massenspektrometrische Methoden . . . . .	100
5.3.1	Enzymatischer Verdau und Massenspektrometrie . . . . .	100
5.3.2	H/D-Austausch und Massenspektrometrie . . . . .	101
5.3.3	Analyse des mittleren Ladungszustands bei ESI . . . . .	103

5.3.4	Fragmentierung im Massenspektrometer . . . . .	105
5.4	PeptidAuswahl . . . . .	109
5.5	Alzheimer-Krankheit und $\beta$ -Amyloid . . . . .	110
5.6	Experimenteller Aufbau . . . . .	111
5.7	Ergebnisse . . . . .	114
5.8	Diskussion . . . . .	120
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>124</b>
<b>A</b>	<b>Mini-ToF-MS</b>	<b>126</b>
A.1	Geometriedateien . . . . .	126
A.1.1	Ionenquelle, zweidimensional . . . . .	126
A.1.2	Ionenquelle mit Draht, dreidimensional . . . . .	127
A.1.3	Reflektor, fixer Teil . . . . .	127
A.1.4	Reflektor, fixer Teil dreidimensional . . . . .	129
A.1.5	Reflektorteller . . . . .	130
A.1.6	Reflektorteller, dreidimensional . . . . .	131
A.2	Simplex Algorithmus: Spiegelung an der Hyperebene . . . . .	133
A.3	technische Zeichnung . . . . .	134
A.4	Fotografie . . . . .	135
<b>B</b>	<b>MALDI-ToF-MS</b>	<b>136</b>
B.1	Geometriedateien . . . . .	136
B.2	Programm zur Spannungsoptimierung . . . . .	138
B.3	Widerstandswerte Spannungsteiler . . . . .	146
B.4	verwendete Hochspannungsnetzgeräte . . . . .	146
B.5	Verkabelung . . . . .	147
B.6	Software Parameter . . . . .	148
<b>C</b>	<b>Konformationsanalyse mit Massenspektrometrie</b>	<b>149</b>
C.1	Zuordnung der Fragmentierungsprodukte von $[M+6H]^{+6}$ . . . . .	150
C.2	Zuordnung der Fragmentierungsprodukte von $[M+5H]^{+5}$ . . . . .	151
C.3	Zuordnung der Fragmentierungsprodukte von $[M+4H]^{+4}$ . . . . .	152
C.4	Versuchsergebnisse . . . . .	153
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>155</b>



# 1 Einleitung

Massenspektrometrie ist schon seit langem eine wichtige Untersuchungsmethode der Chemie und Physik. Anwendungsbereiche finden sich in Gebieten wie der organischen analytischen Chemie, der Oberflächenuntersuchung von Festkörpern, der Spektroskopie mit resonanter Mehrphotonen Ionisation und der Gasphasenkinetik chemischer Reaktionen, um nur einige zu nennen. Seit neuerer Zeit wird Massenspektrometrie auch verstärkt bei biochemischen Fragestellungen angewandt.

Parallel zur immer verbreiteteren Anwendung der Massenspektrometrie wurde auch die Technik der Massenspektrometer immer weiter verbessert. Anwendungen im biochemischen Bereich wurden beispielsweise erst durch die Entwicklung schonender Ionisationsmethoden (besonders MALDI und ESI – siehe Abschnitt 3.2.2.3 und Abschnitt 5.3.3.1) ermöglicht. Insbesondere die Flugzeit-Massenspektrometrie, mit der sich diese Arbeit hauptsächlich beschäftigt, hat wegen der Möglichkeit, sehr hohe Massen zu analysieren, ein hohes Potential bei der Analyse großer Makromoleküle und biologischer Substanzen.

Die technischen Weiterentwicklungen in der Flugzeit-Massenspektrometrie betreffen hauptsächlich das Auflösungsvermögen, das bei diesem Massenanalysator anfänglich stark beschränkt war. Hier wurden Techniken wie der Reflektor und die verzögerte Extraktion entwickelt, um die Auflösung zu steigern. Der Reflektor ist ein Element, das heute in fast allen Flugzeit-Massenspektrometern anzutreffen ist. Für den Reflektor wurden schon viele verschiedene Aufbauten beschrieben, die meist eine Verbesserung der Eigenschaften des Reflektors zum Ziel hatten. Erst seit kürzerer Zeit gibt es Entwicklungen, die versuchen, mit einer einfacheren Konstruktion des Reflektors das gleiche Verhalten zu erreichen (siehe Abschnitt 3.3.2). In diese Linie reiht sich diese Arbeit mit der Entwicklung eines neuen Reflektordesigns, das nur aus einem Element besteht, ein.

Ein weiterer Trend ist die Entwicklung immer kleinerer Flugzeit-Massenspektrometer. Die Verkleinerung erlaubt neue Einsatzfelder für die Massenspektrometrie in mobilen Anwendungen und die Verwendung in „desktop“ Geräten. Diese Tendenz ist beispielsweise bei Quadrupol-Massenspektrometern in der GC/MS Kopplung schon zu beobachten. Durch Verbesserung der Technik könnten auch Flugzeit-Massenspektrometer in solchen kompakten Routinegeräten eingesetzt werden. Anwendungsgebiete für diese Geräte könnten z.B. in der online Prozessüberwachung liegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein miniaturisiertes Flugzeit-Massenspektro-

## 1 Einleitung

meter konstruiert und gebaut, das zukünftig als Routine-Analysegerät eingesetzt werden soll. Das Gerät beinhaltet den oben erwähnten, neu entwickelten Reflektor. Der Entwicklung dieses Gerätes ist der größte Teil dieser Arbeit (Abschnitt 3) gewidmet.

Da der Reflektor als Bauteil in kaum einem Flugzeit-Massenspektrometer mehr fehlt, musste auch für das zweite im Rahmen dieser Arbeit gebaute Instrument ein Reflektor optimiert werden (siehe Abschnitt 4). Es handelt sich bei diesem Gerät aber nicht um eine vollständige Neuentwicklung. Es mussten lediglich die Parameter des Reflektors den Bedingungen eines anderen Geräts angepasst werden.

Bei diesem zweiten Instrument handelt es sich um ein MALDI-ToF-MS. Wie bereits oben erwähnt handelt es sich bei der MALDI Technik um eine Methode, die besonders intensiv in der Biochemie eingesetzt wird. Es lag also nahe, die Anwendung der Massenspektrometrie auf biochemische Fragestellungen als Thema aufzugreifen<sup>1</sup>. Hier wurde ein Thema aufgegriffen, das schon vor Jahren in der Arbeitsgruppe Grotemeyer untersucht wurde. Es wurde versucht, mit Hilfe von Massenspektrometrie die Konformationsänderung von Peptiden zu verfolgen.

Auf den ersten Blick scheint eine solche Anwendung widersinnig zu sein, da sich die Masse des Moleküls bei einer Konformationsänderung nicht ändert. Es sind jedoch einige Techniken entwickelt worden, mit denen Strukturänderungen im Massenspektrometer dennoch beobachtet werden können. Zwei dieser Techniken wurden in dieser Arbeit an einem interessanten Beispielpeptid, dem  $\beta$ -Amyloid, ausprobiert. Dieses Peptid spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit. Eine genaue Beschreibung der Experimente ist in Abschnitt 5 zu finden.

Begonnen wird diese Arbeit mit einem allgemeinen Teil über die Theorie der Flugzeit-Massenspektrometrie. Obwohl die Theorie schon seit langem bekannt ist, gibt es doch immer noch Verbesserungen besonders in der Darstellung der Gleichungen. Auch in dieser Arbeit wurde eine kleine Verbesserung eingeführt, in dem die genäherten Gleichungen für alle Teile eines Flugzeit-Massenspektrometers in einer einheitlichen Form dargestellt wurden. Das Erstellen einer vollständigen Flugzeitgleichung wird dadurch erleichtert.

Dieser Abschnitt dient der generellen Orientierung des Lesers, schafft aber auch die Grundlagen für die spätere Planung der Massenspektrometer. Besonders die Rechnungen zur zweistufigen Ionenquelle werden später bei der Planung des miniaturisierten Flugzeit-Massenspektrometers wieder genutzt.

---

<sup>1</sup>Die Untersuchungen zur Konformation von  $\beta$ -Amyloid sind nicht mit dem MALDI Gerät durchgeführt worden. Die mit diesem Gerät geplanten Experimente wurden wegen eines Forschungsaufenthaltes zunächst aufgeschoben und konnten dann aus experimentellen und zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

# 2 Theorie

## 2.1 Einleitung

### 2.1.1 Geschichte

Obwohl die Flugzeitmassenspektrometrie vom Prinzip sehr einfach ist, entwickelte sie sich erst spät im 20ten Jahrhundert. Das erste Flugzeit Massenspektrometer (ToF-MS) wurde 1948 von Cameron und Eggers entwickelt [1], während Sektorfeld Massenspektrometer bereits seit 1919 gebaut wurden. Das erste ToF-MS mit einem Auflösungsvermögen von mehr als 50 entstand im Jahr 1953 [2]. Der Hauptgrund für diese Entwicklung lag in dem Erfolg der etablierten Massenanalytoren und im Fehlen von Ionisationsmethoden für hochmolekulare Substanzen, so dass der größte Vorteil der Flugzeitmassenspektrometrie –der prinzipiell unbegrenzte Massenbereich– nicht ausgenutzt werden konnte.

Ein großer Fortschritt in der Technik der ToF-MS war die Erfindung des Reflektors oder Ionenspiegels durch Mamyrin 1966 [2]. Mit dieser Methode konnte die Auflösung der Instrumente von einigen 100 auf etwa 5000 erhöht werden. Heute können lineare ToF-MS gebaut werden, die Auflösungen von ca. 6000 [3] erreichen. Geräte mit Reflektor können Auflösungen von deutlich über 10000 haben. Der erreichbare Massenbereich liegt bei bis zu  $10^6$  Da.

Mit dem Voranschreiten der Entwicklung sanfter Ionisationsmethoden wie Plasmasorption (PD), Felddesorption (FD), Laserdesorption (LD), Matrixassistierte Laserdesorption (MALDI) und Elektrospray (ESI) wuchs auch das Interesse an Flugzeitmassenspektrometern, besonders weil alle genannten Methoden (außer ESI) gepulst sind und sich daher gerade für den Einsatz in ToF-MS Instrumenten eignen. Besonders MALDI, 1987 von Hillenkamp und Karas entwickelt [4, 5], in Verbindung mit ToF-MS wird heutzutage intensiv in der biochemischen Forschung und zur Analyse von Polymeren genutzt.

### 2.1.2 Grundprinzip

Die Grundidee der Flugzeitmassenspektrometrie ist einfach: Ionen mit unterschiedlichem Masse zu Ladung ( $m/z$ ) Verhältnis werden in einem elektrischen Feld mit der gleichen Energie beschleunigt, erreichen dabei aber unterschiedliche

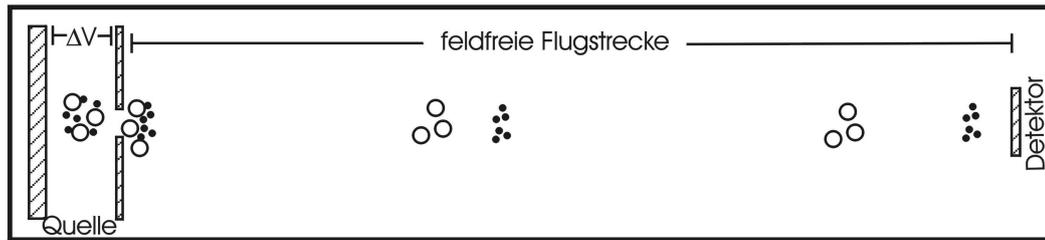


Abbildung 2.1: Grundprinzip der Flugzeitmassenspektrometrie

Endgeschwindigkeiten. Nach dem Durchfliegen der feldfreien Flugstrecke erreichen sie den Detektor daher zu verschiedenen Zeiten. (vergl. Abb. 2.1)

Die Massenaufösung eines Flugzeitmassenspektrometers hängt also davon ab, wie gut zwei Ionenpakete mit unterschiedlicher Masse während des Fluges zeitlich getrennt werden. Der Flugzeitunterschied und damit die Auflösung können gesteigert werden, indem die Flugstrecke verlängert wird, da sich so die Geschwindigkeitsunterschiede zwischen den Ionenpaketen länger auswirken können. Eine andere Möglichkeit, die Auflösung zu steigern, ist dafür zu sorgen, dass die Ionenpakete am Detektor sehr schmal werden und daher auch nahe beieinander liegende Pakete noch getrennt werden können.

Methoden, um sehr schmale Ionenpakete zu erzeugen, werden im Folgenden ausführlich besprochen werden. Mit diesen Techniken können besonders die uneinheitlichen Startbedingungen der Ionen ausgeglichen werden. Diese Fehler und ihre Korrekturmöglichkeiten werden weiter unten aufgeführt. Es gibt aber natürlich auch Einflüsse auf die Auflösung eines Massenspektrometers, die nur durch gute Fertigung und hochwertige Bauteile vermieden werden können, so zum Beispiel die Ansprechzeit des Detektors oder die Güte der elektrischen Felder.

## 2.2 allgemeiner Aufbau eines Flugzeitmassenspektrometers

Das in Abbildung 2.1 dargestellte Gerät ist das am einfachsten aufgebaute Instrument, das man sich vorstellen kann. Es besteht nur aus einer Quelle mit einem statischen Beschleunigungsfeld, der feldfreien Flugstrecke und dem Detektor. Gewöhnlich sind Flugzeitmassenspektrometer etwas komplizierter aufgebaut. Ein typisches Gerät besteht zum Beispiel aus einer zweistufigen Ionenquelle, einer feldfreien Flugstrecke, einem zweistufigen Reflektor, einer weiteren feldfreien Strecke und einer Nachbeschleunigungsstufe direkt vor dem Detektor. Die Funktion dieser Elemente soll im Folgenden kurz erläutert werden, bevor die Flugzeit durch die einzelnen Teile in Abschnitt 2.4 mathematisch beschrieben wird.

- Ionenquelle: Die Ionenquelle dient dazu, die Ionen, die in der Quellenregi-

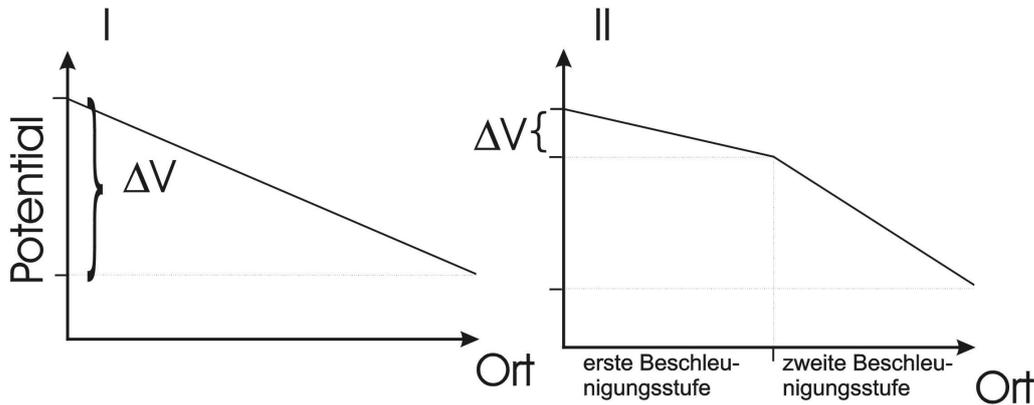


Abbildung 2.2: Potentialverlauf in einer einstufigen Ionenquelle (I) und in einer zweistufigen Ionenquelle (II). Die mit  $\Delta V$  bezeichnete Spannung muß bei „delayed extraction“ in kurzer Zeit geschaltet werden, damit die Ionen im feldfreien Raum entstehen können.

on erzeugt wurden, in das Gerät hinein zu beschleunigen. Die wichtigsten Punkte dabei sind, dass möglichst viele Ionen in das Gerät und schließlich auf den Detektor gelangen und dass diese Ionen möglichst gleichzeitig am Detektor ankommen. Die Ionenquelle kann dazu genutzt werden, einige der unterschiedlichen Startbedingungen der Ionen wieder auszugleichen. Besonders die Ortsverteilung der Ionen kann gut korrigiert werden. Der Punkt im Gerät, an dem alle Ionen einer Masse, die von verschiedenen Orten in der Quelle gestartet sind, (näherungsweise) gleichzeitig eintreffen, wird der Ortsfokus genannt.

Bei einer einstufigen Ionenquelle, d.h. einem Aufbau mit nur einem homogenen, elektrischen Feld, ist der Ortsfokus durch den Abstand der beiden Elektroden der Quelle festgelegt. Die Lage des Fokuspunktes kann durch die angelegten Spannungen nicht mehr beeinflusst werden. Eine zweistufige Ionenquelle erlaubt mehr Flexibilität. Der Abstand bis zum Ortsfokus (erster Ordnung) kann durch Veränderung der elektrischen Feldstärken in der Quelle verändert werden. Der Potentialverlauf in einer ein- und zweistufigen Ionenquelle ist schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt. Normalerweise ist die Spannungsdifferenz in der ersten Beschleunigungsstufe kleiner als in der zweiten Stufe.

Bei der verzögerten Extraktion („delayed extraction“) werden die Ionen zunächst im feldfreien Raum erzeugt. Nach einer Wartezeit wird dann das Potential an einer der Elektroden der ersten Beschleunigungsstufe so verändert, dass die in Abbildung 2.2 dargestellten Potentialverhältnisse vorliegen. Wie man sieht, muß bei einem zweistufigen Aufbau nur eine viel geringere Spannung geschaltet werden. Dies ist ein Vorteil der zweistufigen Ionenquel-

le.

In einem Aufbau ohne gepulste Extraktion gibt es, wie später näher erläutert werden wird, nur einen *Ortsfokuspunkt*. Ionen, die mit verschiedener Energie (am gleichen Ort) starten, treffen sich in keinem Fokuspunkt. Die Existenz eines Energie- bzw. Geschwindigkeitsfokuspunktes kann nur durch verzögertes Anschalten der ersten Beschleunigungsspannung erreicht werden.

Die in Abbildung 2.4 angedeutete Referenzebene ist der Ort, an dem das Referenzion startet, also der Bezugspunkt für alle später durchgeführten Rechnungen. Die Referenzebene sollte so gewählt werden, dass alle erwarteten Ionen in ihrer Nähe starten. Bei Ionisation in der Gasphase wäre das zum Beispiel die Mitte des Ionisationsvolumens, bei Ionisation an Oberflächen könnte die Oberfläche als Referenzebene gewählt werden.

- **Feldfreie Flugstrecke:** In der feldfreien Region im Gerät findet die Trennung der Ionen verschiedener Masse auf Grund ihrer Geschwindigkeitsunterschiede statt. Je länger die Flugstrecke wird, um so größer wird die zeitliche Trennung der einzelnen Ionenpakete. Die Flugstrecke kann verlängert werden, indem die Gerätedimensionen vergrößert werden, man kann aber auch die Flugbahn der Ionen „falten“, um mit kleinen Gerätedimensionen trotzdem eine lange Flugstrecke zu erreichen. Die Faltung der Flugbahn wird meist mit Hilfe von Reflektoren durchgeführt,
- **Reflektor:** Der Reflektor dient zur Energiekorrektur der Ionen. Ionen, die in den Reflektor eindringen, werden abgebremst, bis sie ihre gesamte kinetische Energie verloren haben. Anschließend werden die Ionen in entgegengesetzter Richtung wieder beschleunigt und verlassen den Reflektor mit der gleichen Geschwindigkeit, die sie beim Eintritt hatten. Der Korrektur-effekt beruht darauf, dass Ionen mit höherer Eintrittsenergie weiter in den Reflektor eindringen und damit auch längere Zeit im Reflektor verbringen. Bei der richtigen Wahl der Reflektorspannung und -geometrie werden die schnelleren Ionen genau so lange verzögert, dass sie die langsamen Ionen am Ort des Detektors wieder einholen. Ein zweistufiger Aufbau des Reflektors hat den Vorteil, dass eine kompaktere Bauweise erreicht werden kann, ohne die Fokuslänge des Reflektors zu verändern. Außerdem kann bei der zweistufigen Bauweise die Fokuslänge durch Spannungseinstellungen verändert werden. Dadurch können nachträglich kleine Abweichungen in der Geometrie ausgeglichen werden.
- **Nachbeschleunigung:** Dem Detektor wird gewöhnlich noch eine Nachbeschleunigungsstufe vorangestellt. Die Nachbeschleunigung erhöht die Ionenenergie und damit die Sensitivität des Detektors. Damit wird teilweise die abnehmende Empfindlichkeit der MCP (Multi Channel Plate) bzw. MSP

(Multi Sphere Plate) Detektoren kompensiert, die bei hohen Massen stark abnimmt. Durch die Lage direkt vor dem Detektor wird die Flugzeit der Ionen nicht mehr stark verändert. Da die Oberfläche des Detektors meist auf ca. 1.5 kV Potential liegt, muß gegen die Felddurchgriffe sowieso ein Gitter vor den Detektor gespannt werden und die Nachbeschleunigung tritt so zu sagen als Nebeneffekt ein.

- elektrostatische Linsen: Um die Ausbreitung der Ionen senkrecht zur Flugrichtung zu kontrollieren und zum Beispiel eine Auffächerung der Ionen durch inhomogene Felder im Reflektor zu kompensieren, können elektrostatische Linsen benutzt werden. Eine elektrostatische Linse besteht gewöhnlich aus einem Stapel von Ringelektroden mit geerdeten Elektroden an den Außenseiten und einer oder zwei auf positives oder negatives Potential gelegten inneren Elektroden. Durch die geeignete Geometrie und Spannungswahl wird ein inhomogenes elektrisches Feld erzeugt, das auf hindurchfliegende Ionen etwa den gleichen Effekt hat, wie eine analoge optische Linse. Auch andere Bauteile können gewollte oder ungewollte Linseneigenschaften besitzen. Generell entstehen an allen Elektroden, die nicht mit Gittern gegen Felddurchgriffe ausgerüstet wurden, inhomogene elektrische Felder, die Linseneffekte bewirken. Die Theorie von elektrostatischen Linsen wird in dieser Arbeit nicht besprochen werden, kann aber zum Beispiel bei Heddle [6] gefunden werden.

## 2.3 Fehlerquellen

Wie bereits erwähnt, ist die wichtigste Eigenschaft eines Flugzeitmassenspektrometers die zeitliche Fokussierung der Ionenpakete einer Masse am Ort des Detektors. Um das zu erreichen, müssen die Unterschiede der Anfangsbedingungen der verschiedenen Ionen durch das Gerät kompensiert werden. Es gibt viele Gründe für die Verbreiterung der Ionenpakete. In diesem Abschnitt werden jedoch nur die Fehler Erwähnung finden, die in einem Instrument mit ausschließlich linearen Feldern auftreten. Die Flugzeitunterschiede durch verschiedene Flugbahnen in inhomogenen Feldern sind leider nicht so einfach analytisch zu erfassen und werden am besten durch numerische Simulation untersucht.

### Zeitfehler

In ToF-MS kommen normalerweise nur gepulste Ionenquellen zum Einsatz. Die Zeit der Ionenerzeugung wird dabei so kurz wie möglich gehalten, typischerweise einige Nanosekunden. Kontinuierliche Ionenquellen können durch gepulste Extraktion oder durch geeignete Modulation (Hadamard Transform ToF-MS [7]) der erzeugten Ionen an ToF-MS gekoppelt werden. Mit gepulster Extraktion können

auch Probleme durch lange Ionisierungsvorgänge umgangen werden: Die Beschleunigungsspannung wird erst angelegt wenn der Ionisierungsvorgang abgeschlossen ist. Damit haben die Ionen nur noch Orts- und Energiefehler.

### **Ortsfehler**

Wegen der hohen Beschleunigungsspannung von typischerweise mehreren kV pro cm korrespondieren verschiedene Positionen entlang der Flugachse in der Quelle zu stark unterschiedlichen Beschleunigungsenergien und damit zu verschiedenen Endgeschwindigkeiten. Ionen, die am Anfang der Quelle erzeugt werden, durchfliegen eine längere Strecke, erreichen aber eine höhere Endgeschwindigkeit. An einem Punkt der Flugstrecke werden also diese Ionen die langsamen Ionen überholen, die mit „Vorsprung“ weiter am Ende der Quelle erzeugt wurden. Diesen Punkt nennt man den Ortsfokus (space focus) der Quelle. Die Lage des Ortsfokus wird durch die angelegten Spannungen und die Geometrie der Quelle beeinflusst.

### **Richtungs- und Geschwindigkeitsfehler**

Da die Ionen auf Grund ihrer Geschwindigkeitsunterschiede entlang der Flugrichtung getrennt werden, wird die Auflösung auch durch die Energieverteilung bei der Ionenerzeugung begrenzt. Hierbei ist nur der Anteil der kinetischen Energie entscheidend, der parallel zur ionenoptischen Achse steht. Eine Winkelverteilung der Flugrichtung ist daher für diese Betrachtung gleichbedeutend mit einer Verteilung der kinetischen Energie in Flugrichtung. In Realität kann eine andere Flugrichtung auch den Effekt haben, dass das Ion einen anderen Weg durchläuft und dabei andere Felder erfährt als auf der ionenoptischen Achse.

Ein Ion das mit einer Geschwindigkeit in Richtung der negativen ionenoptischen Achse startet, braucht eine gewisse Zeit um abgebremst und in die positive Richtung beschleunigt zu werden. Diese Zeit wird „turn-around time“ genannt. Nach dieser Zeit hat das Ion die gleichen Anfangsbedingungen wie ein Ion, das mit der gleichen Geschwindigkeit in positiver Richtung gestartet ist. Dieses Phänomen ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

Man kann die Energieverteilung der Ionen dadurch minimieren, dass man bereits die Neutralen in einem schmalen, kollimierten Strahl und mit wenig Energiefehler erzeugt. Durch adiabatische Expansion eines Gases ins Vakuum wird die interne Energie der Moleküle in kinetische Energie umgesetzt. Schält man aus so einer Expansionswolke den zentralen Bereich heraus, erhält man einen Molekularstrahl mit kleiner Geschwindigkeitskomponente senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Strahls. Wenn man die Ionen in so einem Molekularstrahl erzeugt und senkrecht zur Strahlrichtung in das Massenspektrometer beschleunigt („orthogonal extraction“) bekommt man energetisch sehr einheitliche Ionen.

Leider ist es nicht immer möglich, große Unterschiede in der kinetischen Energie der Ionen zu vermeiden. Zum Beispiel erzeugt die MALDI Methode immer Ionen

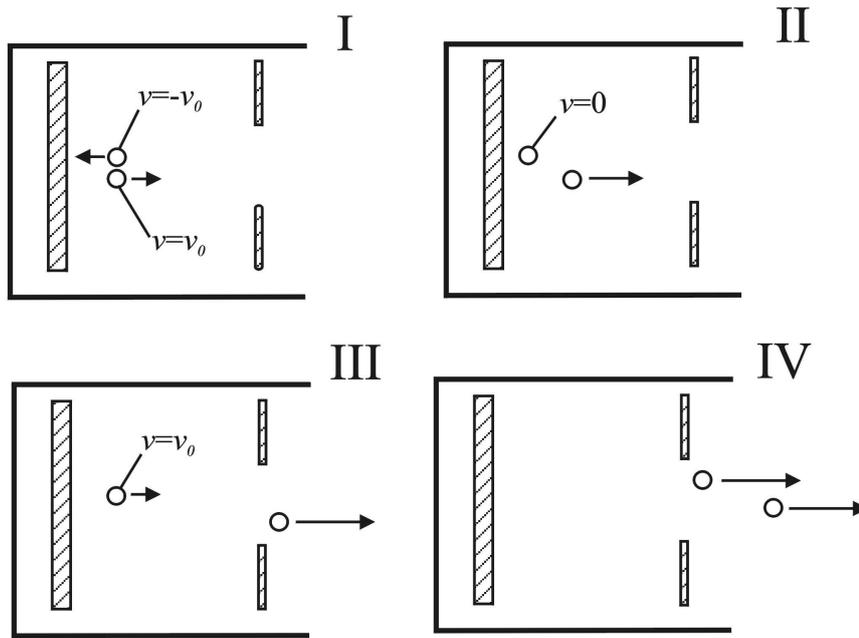


Abbildung 2.3: „turn-around time“ I: Zur Startzeit haben die Ionen die gleiche Geschwindigkeit in entgegengesetzte Richtung. II: Nach der halben turn-around-Zeit ändert das zweite Ion seine Flugrichtung. III: Nach der turn-around-Zeit hat das zweite Ion genau die Startbedingungen des ersten Ions. IV: Im Resultat verhalten sich die Ionen so, als wären sie mit einer Verzögerung von genau der turn-around-Zeit am gleichen Ort erzeugt worden.

mit relativ hohen Startgeschwindigkeiten und einer breiten Geschwindigkeitsverteilung. Den Effekt dieser Verteilung kann man durch „Geschwindigkeitsfokussierung“ kompensieren. Der Nachteil ist, dass man nicht Energie- und Ortsfehler gleichzeitig korrigieren kann und dass die Korrektur der Anfangsenergie nur für einen kleinen Massenbereich gut ist.

## 2.4 physikalische Grundlagen

Die in diesem Text verwendeten Formelzeichen sind in Abbildung 2.4 und Tabelle 2.1 zusammengefasst. Die Nomenklatur lehnt sich an die von Ioanoviciu [8] benutzte an. Der Gang der Herleitung orientiert sich an einer Arbeit von Vestal und Juhasz [9], ist aber modifiziert. Die gefundenen Gleichungen werden in dieser Arbeit in einer einheitlichen funktionalen Form dargestellt, so dass prinzipiell genäherte Ausdrücke für die Flugzeiten in beliebigen, aus linearen Feldern aufgebauten Geräten einfach aus den hier beschriebenen Formeln zusammengesetzt

Geräte Dimensionen		$L_f$	Länge der gesamten feldfreien Flugstrecke
		$D$	zweiter Abschnitt der feldfreien Strecke
		$d_a$	Abstand Referenzebene - erste Elektrode
		$d_b$	Abstand erste Elektrode - zweite Elektrode
		$d_d$	Abstand im Bremsfeld des Reflektors
		$d_r$	Abstand zweite Reflektorelektrode - Umkehrpunkt der Ionen
		$d_p$	Abstand in der Nachbeschleunigungsstufe
Ioneneigenschaften	allgemein	$z$	Anzahl Ladungen
		$e$	Elementarladung
		$m$	Masse
	Referenzion	$v_a$	Geschwindigkeit nach der ersten Beschleunigungsstufe
		$v_b$	Geschwindigkeit nach der zweiten Beschleunigungsstufe
		$v_d$	Geschwindigkeit nach dem Bremsfeld
		$v_p$	Geschwindigkeit nach der Nachbeschleunigungsstufe
	beliebiges Ion	$z_i$	Startpunkt relativ zur Referenzebene
		$v_{zi}$	Startgeschwindigkeit
		$v_2$	Geschwindigkeit nach der ersten Beschleunigungsstufe
	$v_3$	Geschwindigkeit nach der zweiten Beschleunigungsstufe	

Beschleunigungsspannungen werden mit  $\Delta V$  bezeichnet und mit den gleichen Indizes wie die Gerätedimensionen versehen, kinetische Energien werden mit  $T$  gekennzeichnet und mit a,b,d,r,p für das Referenzion und mit i,2,3,4 für das beliebige Ion indiziert. Die Indizierung bei den Geschwindigkeiten erfolgt nach dem gleichen Muster.

Tabelle 2.1: verwendete Formelzeichen

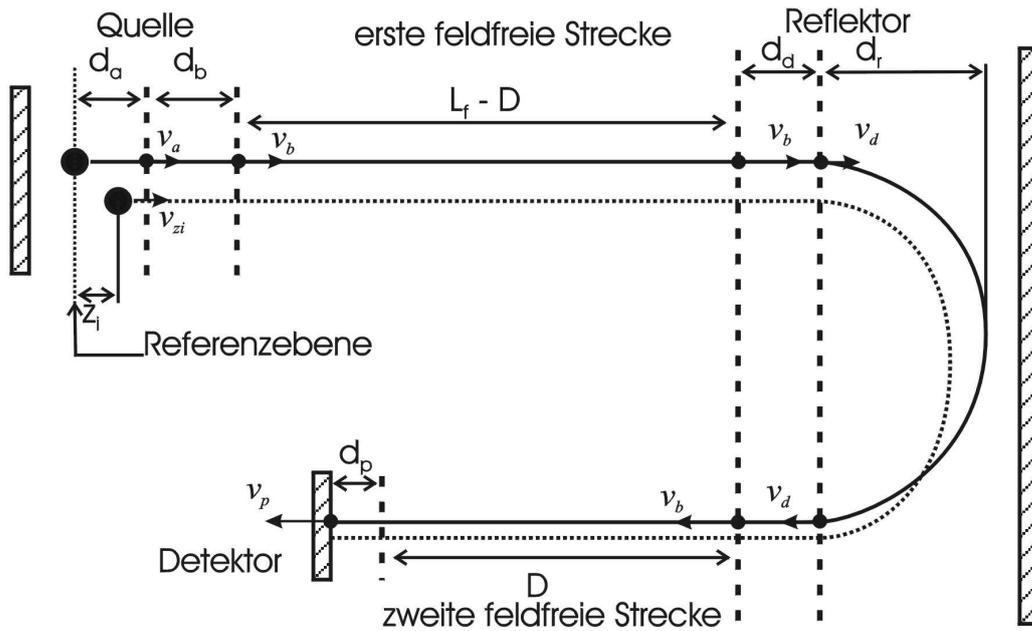


Abbildung 2.4: verwendete Formelzeichen

werden können.

Die wichtigen Formeln zur Beschreibung eines ToF-MS mit linearen Felder können in jedem Lehrbuch der Physik gefunden werden:

$$F = m \cdot a \quad \text{Newtons Gesetz} \quad (2.1)$$

$$F = z \cdot e \cdot E \quad \text{Kraft auf gel. Teilchen im el. Feld} \quad (2.2)$$

$$E = \frac{\Delta V}{d} \quad \text{el. Feldstärke} \quad (2.3)$$

$$a = \frac{dv}{dt} \quad \text{Def. der Beschleunigung} \quad (2.4)$$

$$T = \frac{m}{2} \cdot v^2 \quad \text{kin. Energie} \quad (2.5)$$

$$T + z \cdot e \cdot V = \text{const.} \quad \text{Energieerhaltung}$$

$$T_{II} - T_I = z \cdot e \cdot (V_I - V_{II})^1 \quad (2.6)$$

Da eine Gleichung für die Flugzeit der Ionen gefunden werden soll, wird zunächst Gl. 2.4 nach  $dt$  integriert. Dies ist einfach, da die Beschleunigung in diesem Fall zeit- und geschwindigkeitsunabhängig ist.

$$t = \frac{1}{a} \cdot (v_{II} - v_I)^1 \quad (2.7)$$

<sup>1</sup>Die Indizes I und II dienen hier nur zur Unterscheidung verschiedener Zustände und beziehen sich nicht auf konkrete Situationen.

Dieses ist die Zeit für die Beschleunigung durch ein lineares Feld, wobei  $v_I$  die Anfangsgeschwindigkeit und  $v_{II}$  die Endgeschwindigkeit ist. Praktischer wäre es, wenn die Flugzeit als Funktion von Anfangsposition und Anfangsgeschwindigkeit ausgedrückt werden könnte. Dazu kombiniert man Gl. 2.1 und Gl. 2.3 und löst nach  $a$  auf:

$$a = \frac{F}{m} = \frac{z \cdot e \cdot E}{m} = \frac{z \cdot e \cdot \Delta V}{m \cdot d} \quad (2.8)$$

Aus Gl. 2.5 erhält man den Zusammenhang zwischen  $v$  und  $T$ :

$$v = \sqrt{\frac{2T}{m}} \quad (2.9)$$

### 2.4.1 erste Beschleunigungsstufe

Mit Hilfe von Gl. 2.9 kann  $v_{II}$  in Gl. 3 ersetzt werden. Wird die Gleichung auf die erste Beschleunigungsstufe angewendet, muss man aber zunächst  $T_2$  berechnen. Hierzu wird Gl. 2.6 benutzt. An dieser Stelle geht auch die Anfangsposition  $z_i$  in die Berechnung ein: Wenn das Ion nicht in der Referenzebene erzeugt wird, wird auch nur ein Teil der Beschleunigungsspannung durchlaufen.

$$V_1(z_i) - V_2 = \frac{d_a - z_i}{d_a} \cdot \Delta V_a \quad (2.10)$$

Dabei ist  $\Delta V_a$  die Spannungsdifferenz zwischen Referenzebene und erster Elektrode, die einen Abstand von  $d_a$  haben. Wenn nun Gl. 2.10 und Gl. 2.5 in Gl. 2.6 eingesetzt werden, erhält man die kinetische Energie nach der ersten Beschleunigungsstufe:

$$T_2 = \frac{m}{2} v_{zi}^2 + z \cdot e \cdot \frac{d_a - z_i}{d_a} \cdot \Delta V_a \quad (2.11)$$

Aus der Kombination aus Gl. 2.9 und Gl. 2.11 ergibt sich die Geschwindigkeit  $v_2$  als Funktion von  $v_{zi}$  und  $z_i$ .

$$\begin{aligned} v_2 &= \sqrt{\frac{2}{m} \left( \frac{m}{2} v_{zi}^2 + z \cdot e \cdot \frac{d_a - z_i}{d_a} \cdot \Delta V_a \right)} \\ &= \sqrt{v_{zi}^2 + 2 \cdot z \cdot e \cdot \frac{\Delta V_a}{m} - 2 \cdot z \cdot e \cdot \frac{z_i \cdot \Delta V_a}{d_a \cdot m}} \\ &= \sqrt{v_{zi}^2 + v_a^2 - \frac{z_i}{d_a} \cdot v_a^2} \\ &= v_a \cdot \sqrt{1 + \left( \frac{v_{zi}}{v_a} \right)^2 - \frac{z_i}{d_a}} \end{aligned} \quad (2.12)$$

Hierbei bedeutet  $v_a$  die Geschwindigkeit des Referenzions das mit  $v_{zi} = 0$  und  $z_i = 0$  startet. Nachdem diese Gleichung hergeleitet ist, kann die Flugzeit des Ions durch die erste Beschleunigungsstufe als Funktion von  $v_{zi}$  und  $z_i$  angegeben werden. Dazu setzt man Gl. 2.8 und Gl. 2.12 in Gl. 3 ein und erhält:

$$\begin{aligned} t_a &= \frac{m \cdot d_a}{e \cdot z \cdot \Delta V_a} \cdot \left( v_a \cdot \sqrt{1 + \left( \frac{v_{zi}}{v_a} \right)^2} - \frac{z_i}{d_a} - v_{zi} \right) \\ &= \frac{2 \cdot d_a}{v_a} \cdot \left[ \sqrt{1 + \left( \frac{v_{zi}}{v_a} \right)^2} - \frac{z_i}{d_a} - \frac{v_{zi}}{v_a} \right] \end{aligned} \quad (2.13)$$

Der letzte Zusammenhang ergibt sich durch Identifikation von  $\frac{m \cdot d_a}{e \cdot z \cdot \Delta V_a}$  mit  $\frac{2 \cdot d_a}{v_a^2}$ . Mit Gl. 2.13 wurde die Flugzeit durch die erste Beschleunigungsstufe befriedigend ausgedrückt. Nebenbei wurde mit Gl. 2.12 auch die Endgeschwindigkeit nach der Beschleunigung erhalten, die als Parameter in der nächsten Stufe benötigt wird.

## 2.4.2 zweite Beschleunigungsstufe

Für die zweite Beschleunigungsstufe verwendet man den gleichen Ansatz und berechnet zunächst wie in Gl. 2.12 die Endgeschwindigkeit der beliebigen Ionen:

$$v_3 = \sqrt{v_2^2 + 2 \cdot z \cdot e \cdot \frac{\Delta V_b}{m}} \quad (2.14)$$

Die Geschwindigkeit des Referenzions  $v_b$  wird erhalten, wenn für  $v_2$  in der Gleichung  $v_a$ , die Geschwindigkeit des Referenzions nach der ersten Beschleunigungsstufe, eingesetzt wird. Mit diesem Zusammenhang erhält man aus Gl. 2.14:

$$v_b^2 - v_a^2 = 2 \cdot z \cdot e \cdot \frac{\Delta V_b}{m} \quad (2.15)$$

Mit diesem Ergebnis und Gl. 2.12 ergibt sich aus Gl. 2.14 folgende Gleichung:

$$\begin{aligned} v_3 &= \sqrt{v_a^2 \cdot \left[ 1 + \left( \frac{v_{zi}}{v_a} \right)^2 - \frac{z_i}{d_a} \right] + v_b^2 - v_a^2} \\ &= \sqrt{v_a^2 \cdot \left[ \left( \frac{v_{zi}}{v_a} \right)^2 - \frac{z_i}{d_a} \right] + v_b^2} \\ &= \sqrt{v_{zi}^2 + v_b^2 - \frac{z_i}{d_a} \cdot v_a^2} \end{aligned} \quad (2.16)$$

## 2 Theorie

Wie man jetzt schon deutlich sehen kann, werden die entsprechenden Gleichungen für weitere Stufen von folgender Form sein:

$$v_n = \sqrt{v_{n,Referenzion}^2 + v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} \cdot v_a^2} \quad (2.17)$$

Die Geschwindigkeit des Referenzions nach dem n-ten linearen Feld errechnet man dabei am besten über Gl. 2.9:

$$v_{n,Referenzion} = \sqrt{\frac{2 \cdot z \cdot e \cdot \sum_{i=1}^n \Delta V_i}{m}} \quad (2.18)$$

Da nun die Geschwindigkeit des beliebigen Ions vor und nach der Beschleunigungsstufe bekannt ist, kann die Zeit, die das Ion zum Durchfliegen der Strecke braucht, wieder mit Gl. 3 berechnet werden:

$$t_b = \frac{1}{a_b} \cdot (v_3 - v_2) \quad (2.19)$$

Hierbei kann die Beschleunigung mit Gl. 2.8 und Gl. 2.15 gefunden werden.

$$a_b = \frac{1}{2d_b} \cdot (v_b^2 - v_a^2) \quad (2.20)$$

Oder wenn man die Gleichung allgemein ausdrücken möchte:

$$a_n = \frac{1}{2d_n} \cdot (v_{n,Referenzion}^2 - v_{n-1,Referenzion}^2) \quad (2.21)$$

Die Flugzeit durch die zweite Beschleunigungsstufe ergibt sich nun durch Einsetzen von Gl. 2.16, Gl. 2.12 und Gl. 2.20:

$$t_b = \frac{2d_b}{(v_b^2 - v_a^2)} \cdot \left( \sqrt{v_b^2 + v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} \cdot v_a^2} - \sqrt{v_a^2 + v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} \cdot v_a^2} \right) \quad (2.22)$$

### 2.4.3 feldfreie Flugstrecke

In der feldfreien Strecke ändert sich die Geschwindigkeit des Ions nicht und die Flugzeit ist daher auch nur von der vorher erreichten Geschwindigkeit und der Länge der Strecke abhängig. Da die Geschwindigkeit der Ionen vor und nach dem Reflektor gleich ist, kann man sogar beide feldfreie Strecken gemeinsam behandeln.

$$t_{Lf} = \frac{L_f - D}{v_3} + \frac{D}{v_3} = \frac{L_f}{v_3} \quad (2.23)$$

Mit Gl. 2.16 erhalten wir daraus:

$$t_{Lf} = L_f \cdot \left( \sqrt{v_b^2 + v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} \cdot v_a^2} \right)^{-1} \quad (2.24)$$

### 2.4.4 Reflektor

Der nächste Abschnitt, den das Ion durchfliegt, ist der Reflektor, der sehr ähnlich wie die Ionenquelle funktioniert. Die prinzipielle Ähnlichkeit erkennt man gut, wenn man sich ansieht, wie die Ionen wieder beschleunigt werden. Der große Unterschied besteht darin, dass die Ionen zu dem Zeitpunkt, an dem sie ihre Flugrichtung umdrehen, also gerade wieder beschleunigt werden, alle keine kinetische Energie besitzen. Deswegen dringen sie aber verschieden tief in den Reflektor ein. Ionen mit höherer Geschwindigkeit fliegen einfach weiter in das Reflektorfeld hinein, bevor sie vollständig abgebremst sind.

Wenn die Ionen in das Reflektorfeld eindringen, also genug Energie haben, um das Bremsfeld zu überwinden aber nicht so viel Energie, dass sie die Rückwand des Reflektors erreichen und dort entladen werden, kann die Flugzeit des Ions berechnet werden, ohne die Eindringtiefe zu kennen. Dazu benutzt man Gl. 3 und setzt  $v_I$  gleich Null. Da der Reflektor zweimal durchlaufen wird, muss Gl. 3 mit 2 multipliziert werden.

$$t_r = 2 \cdot \frac{v_4}{a_r} = \frac{4d_r}{v_d^2} v_4 \quad (2.25)$$

Die Geschwindigkeit der Ionen nach dem Bremsfeld kann mit Gl. 2.17 berechnet werden.

$$v_4 = \sqrt{v_d^2 + v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} v_a^2} \quad (2.26)$$

$$t_r = \frac{4d_r}{v_d^2} \cdot \sqrt{v_d^2 + v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} v_a^2} \quad (2.27)$$

Die Geschwindigkeit des Referenzions nach dem Bremsfeld, kann mit Gl. 2.18 gefunden werden:

$$v_d = \sqrt{\frac{2 \cdot z \cdot e \cdot (\Delta V_a + \Delta V_b - \Delta V_d)}{m}} \quad (2.28)$$

Damit kann die Flugzeit durch das Reflektorfeld berechnet werden und alle Angaben sind bekannt, um die Flugzeit durch das Bremsfeld wie in Gl. 2.22 zu berechnen:

$$t_d = \frac{4d_d}{(v_d^2 - v_b^2)} \cdot \left( \sqrt{v_d^2 + v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} \cdot v_a^2} - \sqrt{v_b^2 + v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} \cdot v_a^2} \right) \quad (2.29)$$

Die Flugzeit ist natürlich wieder mit 2 multipliziert, weil das Ion auch das Bremsfeld zweimal durchläuft.

### 2.4.4.1 idealer Reflektor

Der ideale Reflektor würde die Flugzeit der Ionen völlig unabhängig von der Energie der Ionen machen. Bei den normalen Aufbauten ist der Reflektor aus linearen elektrischen Feldern zusammengesetzt, die den oben hergeleiteten Formeln für die Flugzeit folgen. Wie man sofort erkennt, ist die Flugzeit dabei noch von der Energie der Ionen, bzw. von der Geschwindigkeit bei Eintritt in den Reflektor abhängig. Beim gewöhnlichen Vorgehen entwickelt man nun die Flugzeitfunktion nach der Energie (bzw. Geschwindigkeit) in ein Polynom und setzt einzelne Koeffizienten Null, um die Fokussierungsbedingungen zu erhalten. Es gibt aber auch eine Form des elektrischen Feldes, bei der die analytische Flugzeitfunktion direkt von der Energie unabhängig wird. Allgemein gilt für die Flugzeit durch den Reflektor:

$$t = 2 \int_0^{x_{max}} \frac{1}{v(x)} dx = 2 \int_0^{x_{max}} \left( \frac{2ez}{m} (V_{Start} - V(x)) \right)^{-\frac{1}{2}} dx \quad (2.30)$$

Dabei ist  $ez \cdot V_{Start}$  die Energie des Ions bei Eintritt in den Reflektor und  $V(x)$  der Spannungsverlauf im Reflektor. Setzt man  $V(x) = a \cdot x^2$ , erhält man als Lösung des Integrals[10]:

$$t = \frac{\pi}{\left(\frac{2ea}{m}\right)^{\frac{1}{2}}} \quad (2.31)$$

Die Flugzeit wird also von der anfänglichen Energie der Ionen völlig unabhängig. Man muss beachten, dass es in diesem Reflektoraufbau keine feldfreie Flugstrecke gibt. Der Detektor muss direkt am Ausgang des Reflektorfeldes liegen, um optimales Verhalten zu erzielen. Reflektoren mit annähernd quadratischem Feldverlauf sind mit einer Abfolge von vielen ringförmigen Elektroden gebaut worden. [11, 12](Der quadratische Feldverlauf wurde also durch viele lineare elektrische Felder angenähert.) Dieser Aufbau ist sehr aufwendig, da sehr viele Elektroden für einen angemessenen Feldverlauf nötig sind. Es gibt noch einen anderen Ansatz, einen quadratischen Feldverlauf zu erzeugen, der mit einer zylindrischen Elektrode mit einer V-förmigen Gegenelektrode arbeitet[13, 14]. Leider ist dieser Aufbau wegen der stark gekrümmten Feldlinien mit einer unvorteilhaften örtlichen Defokussierung verbunden.

### 2.4.5 Nachbeschleunigungsstufe

Der letzte Abschnitt, den das Ion durchfliegt, ist die Nachbeschleunigungsstufe kurz vor dem Detektor. Die erforderlichen Größen, um die Flugzeit durch diese Region zu berechnen, werden wieder mit Hilfe der Gleichungen 2.17 und 2.18 erhalten, die anschließend zu einer Gleichung analog zu Gl. 2.22 zusammengesetzt

werden.

$$v_4 = \sqrt{v_p^2 + v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} v_a^2} \quad (2.32)$$

$$v_p = \sqrt{\frac{2 \cdot z \cdot e \cdot (\Delta V_a + \Delta V_b + \Delta V_p)}{m}} \quad (2.33)$$

$$t_p = \frac{2d_p}{(v_p^2 - v_b^2)} \cdot \left( \sqrt{v_p^2 + v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} \cdot v_a^2} - \sqrt{v_b^2 + v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} \cdot v_a^2} \right) \quad (2.34)$$

Nun sind die Flugzeiten für alle Abschnitte des ToF-MS berechnet und die Gesamtflugzeit kann als Summe der einzelnen Zeiten leicht berechnet werden. Die angegebenen Formeln sind exakt für alle Instrumente, die nur mit linearen, homogenen Feldern arbeiten. Es wurde jedoch noch nicht der benötigte kleine Winkel zwischen einfallendem und ausfallendem Ionenstrahl im Reflektor bedacht. Formeln um diesen Einfluss zu berücksichtigen, findet man bei Ioanovicu et. al. [15].

Die Eigenschaften eines Gerätes mit inhomogenen Feldern sind sehr viel komplexer und können im allgemeinen nicht mehr analytisch dargestellt werden, da schon die exakte Beschreibung der bestehenden Felder oft sehr schwierig sein kann. Insbesondere wenn noch Abschirmungseffekte durch die Ionenwolke berücksichtigt werden sollen, wird es sehr komplex. Solche Probleme geht man am besten mit numerischer Simulation an. Ein gutes Programm für diese Zwecke ist SIMION [16].

## 2.5 Näherung der ToF Formel

Wenn man nur die Flugzeit verschiedener Ionen berechnen möchte, sind die oben hergeleiteten Formeln völlig ausreichend. Die Gesamtflugzeit ergibt sich einfach als Summe der Gleichungen 2.13, 2.22, 2.24, 2.27, 2.29 und 2.34. Wenn man jedoch versucht mit den Gleichungen die fokussierenden Eigenschaften des Massenspektrometers zu berechnen, stößt man schnell auf Schwierigkeiten wegen der Quadratwurzeln in den Ausdrücken. Es ist daher sinnvoll, hier eine Näherung anzubringen, um die Wurzeln zu eliminieren. Diese kann durch Entwicklung in eine Potenzreihe geschehen:

$$\sqrt{1+x} = 1 + \frac{1}{2}x - \frac{1}{8}x^2 + \frac{1}{16}x^3 - \frac{5}{128}x^4 + \dots \quad (2.35)$$

$$\frac{1}{\sqrt{1+x}} = 1 - \frac{1}{2}x + \frac{3}{8}x^2 - \frac{5}{16}x^3 + \frac{35}{128}x^4 - \dots \quad (2.36)$$

Die auftretenden Wurzeln müssen also in die obige Form gebracht werden. Zum Beispiel:

$$\sqrt{v_b^2 + v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} \cdot v_a^2} = v_b \cdot \sqrt{1 + \frac{v_{zi}^2}{v_b^2} - \frac{z_i}{d_a} \cdot \frac{v_a^2}{v_b^2}} \quad (2.37)$$

## 2 Theorie

$x$  wäre in diesem Fall also:

$$x = \frac{v_{zi}^2}{v_b^2} - \frac{z_i}{d_a} \cdot \frac{v_a^2}{v_b^2} \quad (2.38)$$

Da die Näherung nur gilt, wenn  $|x| \ll 1$ , muss noch die Größe von  $x$  untersucht werden. Die Anfangsgeschwindigkeit  $v_{zi}$  sollte in allen Fällen um einige Zehnerpotenzen kleiner sein als alle späteren Geschwindigkeiten. Die Anfangsposition  $z_i$  sollte in allen sinnvollen Anwendungen auch sehr viel kleiner sein, als die Länge der ersten Beschleunigungsstufe  $d_a$ . Man kann daher abschätzen, dass  $x$  in allen uns interessierenden Fällen viel kleiner als 1 sein wird und die Näherung somit angewandt werden darf.

Die Überlegung, dass  $x$  kleiner 1 ist, kann auch über die kinetische Energie  $T$  geführt werden. Da das Quadrat der Geschwindigkeit  $v^2$  proportional zur kinetischen Energie ist, kann man statt Gleichung 2.38 auch schreiben:

$$x = \frac{T_{zi} - \frac{z_i}{d_a} \cdot T_a}{T_b} = \frac{T_{zi} + \left(1 - \frac{z_i}{d_a}\right) T_a - T_a}{T_b} = \frac{T_2 - T_a}{T_b} \quad (2.39)$$

Der Unterschied zwischen Referenzion und beliebigem Ion sollte stets klein sein, weswegen  $x$  auch immer viel kleiner als 1 ist.

Wenn man die auftretenden Wurzeln betrachtet, wird man feststellen, dass  $x$  immer von der Form  $x = \frac{y}{v_n^2}$  ist, wobei nur der Index  $n$  im Nenner sich ändert. Dabei gilt:

$$y = v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} \cdot v_a^2 \quad (2.40)$$

Es werden daher die Wurzeln alle nach dem jeweiligen  $x$  entwickelt, aber dann als Potenzreihe in  $y$  dargestellt, damit eine einheitliche Darstellung für alle Reihen möglich ist. Die Koeffizienten der Potenzreihen von  $y$  sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

	$y^0$	$y^1$	$y^2$	$y^3$	$y^4$
$t_a$	$2 \frac{d_a}{v_a} \cdot \left(1 - \frac{v_{zi}}{v_a}\right)$	$\frac{d_a}{v_a}$	$-\frac{1}{4} \cdot \frac{d_a}{v_a}$	$\frac{1}{8} \cdot \frac{d_a}{v_a}$	$-\frac{5}{64} \cdot \frac{d_a}{v_a}$
$t_b$	$\frac{2 \cdot d_b}{v_b^2 - v_a^2} \cdot (v_b - v_a)$	$\frac{d_b}{v_b^2 - v_a^2} \cdot \left(\frac{1}{v_b} - \frac{1}{v_a}\right)$	$-\frac{d_b}{4(v_b^2 - v_a^2)} \cdot \left(\frac{1}{v_b^3} - \frac{1}{v_a^3}\right)$	$\frac{d_b}{8(v_b^2 - v_a^2)} \cdot \left(\frac{1}{v_b^5} - \frac{1}{v_a^5}\right)$	$-\frac{5d_b}{64(v_b^2 - v_a^2)} \cdot \left(\frac{1}{v_b^7} - \frac{1}{v_a^7}\right)$
$t_{Lf}^\dagger$	$\frac{L_f}{v_n}$	$-\frac{L_f}{2v_n^3}$	$\frac{3L_f}{8v_n^5}$	$-\frac{5L_f}{16v_n^7}$	$\frac{35L_f}{128v_n^9}$
n=a oder n=b					
$t_d^\dagger$	$\frac{4 \cdot d_d}{v_d^2 - v_n^2} \cdot (v_d - v_n)$	$\frac{d_d}{v_d^2 - v_n^2} \cdot \left(\frac{1}{v_d} - \frac{1}{v_n}\right)$	$-\frac{d_d}{2(v_d^2 - v_n^2)} \cdot \left(\frac{1}{v_d^3} - \frac{1}{v_n^3}\right)$	$\frac{d_d}{4(v_d^2 - v_n^2)} \cdot \left(\frac{1}{v_d^5} - \frac{1}{v_n^5}\right)$	$-\frac{5d_d}{32(v_d^2 - v_n^2)} \cdot \left(\frac{1}{v_d^7} - \frac{1}{v_n^7}\right)$
n=a oder n=b					
$t_r^\ddagger$	$\frac{4 \cdot d_r}{v_n}$	$\frac{2 \cdot d_r}{v_n^3}$	$-\frac{d_r}{2v_n^5}$	$\frac{d_r}{4v_n^7}$	$-\frac{5 \cdot d_r}{32v_n^9}$
n=d oder a oder b					
$t_p^\dagger$	$\frac{2 \cdot d_p}{v_p^2 - v_n^2} \cdot (v_p - v_n)$	$\frac{d_p}{v_p^2 - v_n^2} \cdot \left(\frac{1}{v_p} - \frac{1}{v_n}\right)$	$-\frac{d_p}{4(v_p^2 - v_n^2)} \cdot \left(\frac{1}{v_p^3} - \frac{1}{v_n^3}\right)$	$\frac{d_p}{8(v_p^2 - v_n^2)} \cdot \left(\frac{1}{v_p^5} - \frac{1}{v_n^5}\right)$	$-\frac{5d_p}{64(v_p^2 - v_n^2)} \cdot \left(\frac{1}{v_p^7} - \frac{1}{v_n^7}\right)$
n=a oder n=b					

$^\dagger$  n ist a wenn eine einstufige Quelle benutzt wird, b bei einer zweistufigen Quelle

$^\ddagger$  n ist d wenn ein zweistufiger Reflektor benutzt wird, a oder b je nach Quelle<sup>†</sup>

Tabelle 2.2: Koeffizienten der Potenzreihenentwicklung bis zu  $y^4$

Mit einer Kombination dieser Koeffizienten kann eine Flugzeitgleichung für beliebig aufgebaute Geräte aufgestellt werden. Dazu müssen nur die entsprechenden Koeffizienten aufaddiert werden. Alle Gleichungen haben die Form eines Polynoms in  $y$ :

$$t_{total} = f_0 + f_1 \cdot y + f_2 \cdot y^2 + f_3 \cdot y^3 + f_4 \cdot y^4 + \dots \quad (2.41)$$

## 2.6 Fehlerkorrektur

Im folgenden Abschnitt soll gezeigt werden, wie die unter Punkt 2.3 vorgestellten Fehler durch geschickte Wahl der Geometrie und der elektrischen Felder weitgehend korrigiert werden können. Wie gezeigt werden wird, können leider nicht alle Fehler gleichzeitig und nicht immer über den gesamten Massenbereich ausgeglichen werden.

### 2.6.1 Zeitfehler

Wenn die Ionen zwar am gleichen Ort und mit gleicher Energie erzeugt werden, aber der Zeitpunkt der Erzeugung unterschiedlich ist, kann dieses leicht korrigiert werden. Da die Neutralen offensichtlich ein örtlich scharf begrenztes Ionenpaket bilden, das wegen der einheitlichen kinetischen Energie sich auch zeitlich nicht verbreitert, muss man nur dafür sorgen, dass die bereits entstandenen Ionen in diesem Ionenpaket bleiben, bis der Ionisierungsvorgang abgeschlossen ist. Die erste Beschleunigungsstufe muss also für diese Zeit feldfrei gehalten werden, bis alle Ionen erzeugt wurden. Wenn nun das Beschleunigungsfeld angeschaltet wird, haben alle Ionen die gleichen Startbedingungen und kommen gleichzeitig am Detektor an. Diese Technik nennt sich „delayed extraction“ und wird auch zur Geschwindigkeitsfokussierung (siehe unten) benötigt.

### 2.6.2 Ortsfehler

Eine schwierigere Situation ergibt sich, wenn die Ionen zwar gleichzeitig, aber nicht am gleichen Ort entstehen. Dies kann zum Beispiel bei Ionisation in der Gasphase passieren. In diesem Fall erhalten die Ionen, die am Anfang der Beschleunigungsstrecke erzeugt werden, eine höhere kinetische Energie als Ionen, die weiter hinten erzeugt werden. Sie müssen aber auch eine längere Strecke zurücklegen. Es muss also einen Punkt im Massenspektrometer geben, an dem die langsameren Ionen, die mit Vorsprung gestartet sind, von den schnelleren Ionen eingeholt werden. Wenn der Detektor an diesem Ort positioniert wird, ist die Auflösung des Massenspektrometers am besten. Die genaue Lage des Ortsfokus wird ermittelt, indem die Flugzeitgleichung für das Massenspektrometer in der genäherten Form (wie in Gl. 2.41) zu einem Polynom in  $z_i$  umsortiert wird. Der Ortsfokus ist dann in erster Näherung an dem Ort, wo der erste Koeffizient Null wird. Streng genommen treffen sich also nicht alle Ionen zur gleichen Zeit am gleichen Punkt. Die Ankunftszeit eines Ions am Ortsfokus ist durch die Terme zweiter und höherer Ordnung etwas von der Position des Ions bei seiner Entstehung abhängig und wir berechnen nur die Bedingungen bei denen alle Ionen möglichst zeitgleich an einem Punkt sind.

Die Koeffizienten  $f_i$  in Gl. 2.41 sind alle unabhängig von dem Ort der Ionenentstehung. Nur  $y$  ist eine Funktion von  $z_i$ . Wenn wir nun die Anfangsgeschwindigkeit

vernachlässigen, erhält man für  $y$ :

$$y = -\frac{v_a^2}{d_a} \cdot z_i \quad (2.42)$$

Durch Umsortieren von Gl. 2.41 in ein Polynom von  $z_i$  erhält man:

$$t_{total} = f_0 + f_1 \left( -\frac{v_a^2}{d_a} \right) \cdot z_i + f_2 \left( -\frac{v_a^2}{d_a} \right)^2 \cdot z_i^2 + f_3 \left( -\frac{v_a^2}{d_a} \right)^3 \cdot z_i^3 + f_4 \left( -\frac{v_a^2}{d_a} \right)^4 \cdot z_i^4 + \dots \quad (2.43)$$

Mit dieser Gleichung soll jetzt der Ortsfokus von zwei einfachen Anordnungen berechnet werden.

#### 1. einstufige Ionenquelle und feldfreie Flugstrecke

Der Koeffizient  $f_1$  wird durch Addieren der relevanten Terme aus Tabelle 2.2 gebildet:

$$f_1 = \frac{d_a}{v_a^3} - \frac{L_f}{2 \cdot v_a^3} \quad (2.44)$$

Die Gleichung, die gelöst werden muss, ist also:

$$0 = \left( \frac{d_a}{v_a^3} - \frac{L_f}{2 \cdot v_a^3} \right) \cdot \left( -\frac{v_a^2}{d_a} \right) \quad (2.45)$$

Die Lösung dieser Gleichung ist:

$$L_f = 2 \cdot d_a \quad (2.46)$$

Bei einer einstufigen Ionenquelle ist der Ortsfokus (in erster Näherung) also völlig von den eingestellten Spannungen der Quelle unabhängig und immer im Abstand von zweimal dem Abstand zwischen Referenzebene (dem Entstehungsort der Ionen) und der ersten Elektrode.

#### 2. zweistufige Ionenquelle und feldfreie Flugstrecke

Der Koeffizient  $f_1$  wird wieder durch Addition der relevanten Terme aus Tabelle 2.2 gebildet und ergibt sich zu:

$$f_1 = \frac{d_a}{v_a^3} + \frac{d_b}{v_b^2 - v_a^2} \cdot \left( \frac{1}{v_b} - \frac{1}{v_a} \right) - \frac{L_f}{2 \cdot v_b^3} \quad (2.47)$$

Auf gleiche Weise erhält man den Koeffizienten  $f_2$ :

$$f_2 = -\frac{d_a}{4 \cdot v_a^3} - \frac{d_b}{4 \cdot (v_b^2 - v_a^2)} \cdot \left( \frac{1}{v_b^3} - \frac{1}{v_a^3} \right) - \frac{3L_f}{8v_b^5} \quad (2.48)$$

Ortsfokussierung erster Ordnung ist erreicht, wenn folgende Bedingung erfüllt ist:

$$0 = f_1 \cdot \left( -\frac{v_a^2}{d_a} \right) = \left[ \frac{d_a}{v_a^3} + \frac{d_b}{v_b^2 - v_a^2} \cdot \left( \frac{1}{v_b} - \frac{1}{v_a} \right) - \frac{L_f}{2 \cdot v_b^3} \right] \left( -\frac{v_a^2}{d_a} \right) \quad (2.49)$$

Durch Auflösen nach  $L_f$  erhält man:

$$L_f = 2 \cdot v_b^2 \cdot \frac{d_a \cdot v_b \cdot v_a + d_a \cdot v_b^2 - d_b \cdot v_a^2}{v_a^3 \cdot (v_a + v_b)} \quad (2.50)$$

Wie man sieht, ist der Exponent der Geschwindigkeiten im Zähler und im Nenner gleich. Die Gleichung vereinfacht sich also, wenn wir  $v_a$  durch  $v_b$  ausdrücken. Das kann mit Hilfe der Spannungsdifferenzen in beiden Beschleunigungsstrecken geschehen:

$$v_a = v_b \cdot \sqrt{c} \quad (2.51)$$

$$c = \frac{V_a}{V_a + V_b} \quad (2.52)$$

Durch Einsetzen in Gl. 2.50 wird die Position des Ortsfokus in der Form ausgedrückt, wie sie von Wiley und McLaren[17] erhalten wurde:

$$L_f = 2d_a \cdot \left(\frac{1}{c}\right)^{\frac{3}{2}} \cdot \left[1 - \frac{\frac{d_b}{d_a}}{\frac{1}{c} + \sqrt{\frac{1}{c}}}\right] \quad (2.53)$$

Ortsfokussierung zweiter Ordnung ist erreicht, wenn zusätzlich zu Gl. 2.49 auch der Koeffizient vor  $z_i^2$  Null wird:

$$0 = f_2 \cdot \left(-\frac{v_a^2}{d_a}\right)^2 \quad (2.54)$$

Durch Eliminieren von  $d_a$  in Gl. 2.49 und 2.54 und anschließendes Auflösen nach  $L_f$  erhält man:

$$L_f = 2 \cdot d_b \cdot \frac{v_b^2}{v_b^2 - 3v_a^2} \quad (2.55)$$

Nach Anwenden von Gl. 2.51 ergibt sich daraus:

$$L_f = 2d_b \cdot \frac{1}{1 - 3c} \quad (2.56)$$

Eine umfassendere Diskussion der Fokussierungsbedingungen verschiedener Gerätetypen findet sich bei Vestal et al.[9].

### 2.6.3 Energiefehler - Geschwindigkeitsfokussierung

Wenn die Ionen an einer Oberfläche erzeugt werden, wie beispielsweise bei MALDI, spielt die räumliche Ausdehnung des Ionisierungsortes keine so große Rolle. Die Auflösung wird hauptsächlich durch die unterschiedlichen Desorptionsgeschwindigkeiten der Ionen begrenzt. Die Geschwindigkeitsverteilung gerade bei

MALDI kann sehr breit sein und ist meist bei einigen hundert Metern pro Sekunde zentriert, wogegen der Ionisierungsort wahrscheinlich auf wenige Mikrometer über dem Probenträger begrenzt ist [18, 19, 20].

Für diese Betrachtung wird angenommen, dass alle Ionen am gleichen Ort mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten entstehen. Dieser Fehler kann ausgeglichen werden, indem mit dem Extraktionspuls eine Weile gewartet wird, bis sich die schnellen Ionen räumlich von den langsameren getrennt haben. Dadurch bekommen die schnelleren Ionen weniger kinetische Energie im Beschleunigungsfeld als die langsameren und es kann bei geeigneter Wahl der Wartezeit und der Spannungen wieder einen Fokuspunkt geben, an dem sich alle Ionen zur gleichen Zeit treffen.

Die genaue Lage des Fokuspunktes der Geschwindigkeitsfokussierung („Geschwindigkeitsfokus“) kann wieder berechnet werden, indem die genäherte Gleichung für die Flugzeit, Gl. 2.41, in ein Polynom der Anfangsgeschwindigkeit entwickelt wird. Dazu muss noch beachtet werden, dass die Anfangsposition  $z_i$  von der Wartezeit  $\Delta t$  und der Geschwindigkeit der Ionen  $v_{zi}$  abhängt. Man erhält also für  $y$ :

$$y = v_{zi}^2 - \frac{z_i}{d_a} \cdot v_a^2 = v_{zi}^2 - \frac{v_{zi}^2 \cdot \Delta t}{d_a} \cdot v_a^2 = v_{zi}^2 - \frac{v_a^2 \cdot \Delta t}{d_a} \cdot v_{zi} \quad (2.57)$$

Wenn  $\tau$  als Abkürzung für  $\frac{v_a^2 \cdot \Delta t}{d_a}$  eingeführt wird, erhält man aus Gl. 2.41 durch Umsortieren in ein Polynom in  $v_{zi}$  folgende Gleichung:

$$t = f_0^* + \left( -\frac{2d_a}{v_a^2} - f_1 \cdot \tau \right) \cdot v_{zi} + (f_1 + f_2 \cdot \tau^2) \cdot v_{zi}^2 + (-2f_2 \cdot \tau - f_3 \cdot \tau^2) \cdot v_{zi}^3 + \dots \quad (2.58)$$

Hier bedeutet  $f_0^*$  den ersten Koeffizienten ohne die  $v_{zi}$  Abhängigkeit, die durch die erste Beschleunigungsstufe erzeugt wird.

$$f_0^* = f_0 - \left( -\frac{2d_a}{v_a^2} \cdot v_{zi} \right) \quad (2.59)$$

Geschwindigkeitsfokussierung erster Ordnung wird erhalten, wenn der Koeffizient vor  $v_{zi}^1$  verschwindet, Fokussierung zweiter Ordnung wird erreicht, wenn linearer und quadratischer Koeffizient Null werden.

Als einfaches Beispiel soll hier Geschwindigkeitsfokussierung erster Ordnung einer einstufigen Ionenquelle behandelt werden. Der Koeffizient  $f_1$  ist der gleiche wie zuvor in Gl. 2.47, daher ist die Bedingung für Geschwindigkeitsfokussierung in diesem Fall:

$$0 = \left( \frac{d_a}{v_a^3} - \frac{L_f}{2v_a^3} \right) \cdot \left( -\frac{v_a^2 \cdot \Delta t}{d_a} \right) - \frac{2d_a}{v_a^2} \quad (2.60)$$

Die Lösung ist:

$$\Delta t = \frac{-4d_a^2}{2d_a - L_f} \cdot \frac{1}{v_a} \quad (2.61)$$

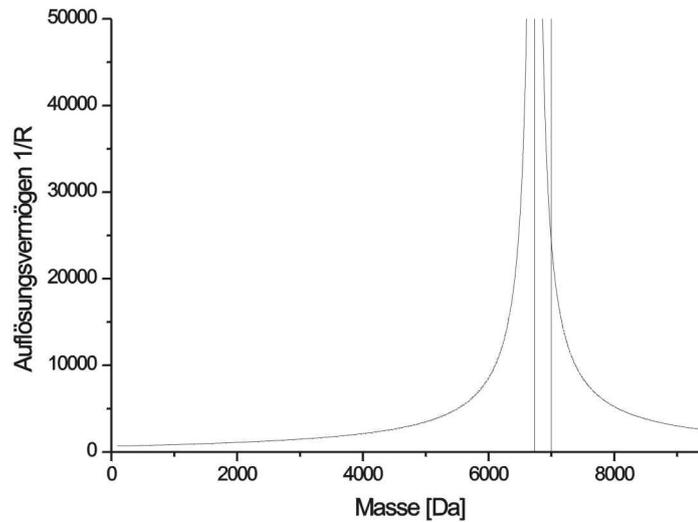


Abbildung 2.5: Massenabhängigkeit des Auflösungsvermögens ( $\frac{1}{R}$ ) bei Geschwindigkeitsfokussierung

Wie man sieht, ist die optimale Verzögerungszeit von  $v_a$  abhängig und damit auch massenabhängig. Die optimalen Fokussierungsbedingungen gelten also nur für einen engen Massenbereich. Um eine Vorstellung davon zu bekommen, wie stark die Massenabhängigkeit ist, wird als nächstes die Abhängigkeit der Auflösung von der Masse der Ionen betrachtet. Die Auflösung ist wie folgt definiert:

$$R = \frac{\Delta m}{m} = \frac{2\Delta t}{t} \quad (2.62)$$

mit der Flugzeit  $t$  und der Peakbreite  $\Delta t$ . Für diese Betrachtung wird die Peakbreite die Differenz der Flugzeiten für  $v_{zi} = 0$  und  $v_{zi} = maximal$  genähert. Die Flugzeit wird als Summe der Gleichungen 2.13, 2.24 und  $\Delta t$  ausgedrückt.

Die Geräteparameter in diesem Beispiel sind folgendermaßen gewählt:  $d_a = 0.1m$ ,  $L_f = 1m$ ,  $\Delta V = 20000V$  mit Ionen mit einer Geschwindigkeitsverteilung von  $300\frac{m}{s}$  Breite (0 bis 300 m/s). Die Verzögerung wurde so gewählt, dass Ionen mit  $7000\frac{m}{z}$  optimal erster Ordnung fokussiert werden sollten. In Abb. 2.5 sieht man, dass die Auflösung stark von der Masse der Ionen abhängt und auch nicht bei  $7000\frac{m}{z}$  optimal ist, sondern bei ca.  $6730\frac{m}{z}$ . Geschwindigkeitsfokussierung erster Ordnung ist also nicht genug, um dieses Gerät erfolgreich zu beschreiben. Der Einfluss des quadratischen Terms in Gl. 2.58 ist zu groß um vernachlässigt zu werden.

Bei der Berechnung wurde ein massenunabhängiger Geschwindigkeitsfehler angenommen. Die Geschwindigkeits-Orts-Verteilung zum Zeitpunkt des Extrakti-

onspulses ist also für alle Massen gleich. Die Unterschiede in der Auflösung stammen daher, dass schwerere Ionen eine geringere Zusatzgeschwindigkeit durch die Beschleunigungsstufe erhalten und daher hinter der Quelle einen geringeren Geschwindigkeitsunterschied besitzen. Die langsamen Ionen benötigen daher eine längere Strecke, um von den schnelleren eingeholt zu werden und der Fokuspunkt verschiebt sich nach hinten. Ganz entsprechend verschiebt sich bei leichteren Ionen der Fokuspunkt zu kürzeren Strecken. So ergibt sich die in Abbildung 2.5 dargestellte Peakform des massenabhängigen Auflösungsvermögens.

#### 2.6.4 Energiefehler - Post source pulse focussing

Es gibt noch eine weitere Technik, um breite Geschwindigkeitsverteilungen der Ionen zu korrigieren, die besonders geeignet ist, um Ionenverluste während der Verzögerungszeit zu vermeiden [21, 22, 23]. Die Grundidee der PSPF-Methode ist, die Ionen sofort in einer zwei- (oder mehr-) stufigen Quelle zu beschleunigen und anschließend nach einer bestimmten Verzögerung mit einem gepulsten Nachbeschleunigungsfeld zu korrigieren.

Man kann den Aufbau als eine Abfolge von zwei unabhängigen Ionenquellen verstehen. Die erste Quelle wird dazu genutzt die anfängliche Geschwindigkeitsverteilung der Ionen in eine hauptsächlich räumliche Verteilung zu übersetzen. Wenn alle Ionen von Interesse in der zweiten Ionenquelle angekommen sind, wird diese angeschaltet und die Ionen, die nun sehr ähnliche Geschwindigkeiten aber unterschiedliche Orte haben, ortsfokussiert. Man muss dabei beachten, dass die Ionen bereits eine beachtliche Anfangsgeschwindigkeit haben, der Ortsfokus liegt also nicht an dem Punkt, der in Abschnitt 2.6.2 berechnet wurde, sondern deutlich weiter von der Quelle entfernt.

Mit dem PSPF-Aufbau können auch räumliche und zeitliche Verteilungen der Ionen korrigiert werden. Um zu verstehen, wie das geht, betrachten wir genauer, wie die Ionenverteilung hinter der ersten Quelle von den Anfangsbedingungen abhängt. Ionen, die vom gleichen Ort starten, aber verschiedene Anfangsgeschwindigkeiten haben, erfahren alle die gleiche Beschleunigung in der ersten Quelle. Die schnelleren Ionen verlassen die Quelle daher etwas früher und befinden sich vorn im PSPF-Feld. Ohne PSPF-Korrektur gäbe es keinen Fokuspunkt im Gerät. Anders verhält es sich bei Ionen, die mit der gleichen Geschwindigkeit aber von verschiedenen Orten starten. Hier verlassen die langsamen Ionen die Quelle zuerst. Es gibt auch ohne das PSPF-Feld einen Fokuspunkt, der durch die PSPF-Korrektur noch näher an die Ionenquelle geschoben wird. Dies ist beispielhaft in Abb. 2.6 dargestellt. Ionen, die am gleichen Ort und mit der gleichen Geschwindigkeit entstehen, aber zu verschiedenen Zeiten, haben nach der ersten Beschleunigungsstufe alle die gleiche Geschwindigkeit. Diese Ionen werden genau im Ortsfokus des PSPF Feldes fokussiert, wobei der Abstand des Ortsfokus, wie oben erwähnt, von der Geschwindigkeit abhängt.

Man kann mit dieser qualitativen Betrachtung bereits erkennen, dass die drei

## 2 Theorie

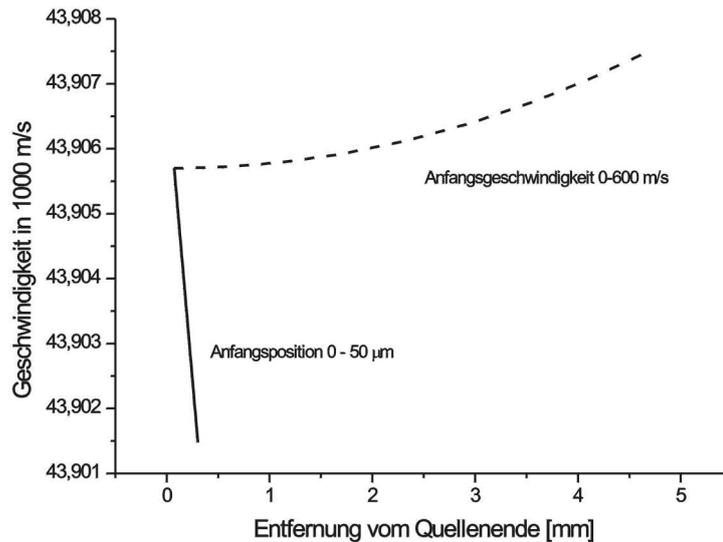


Abbildung 2.6: Positionsabhängigkeit der Geschwindigkeit nach zweistufiger Ionenquelle  $d_a = 13\text{mm}$ ,  $d_b = 9\text{mm}$ ,  $\Delta V_a = 1000\text{V}$ ,  $\Delta V_b = 19000\text{V}$ , Masse =  $2000\text{Da}$ ,  $t = 2.985\mu\text{s}$

Fokuspunkte für die verschiedenen Fehler niemals zusammenfallen können. Da für Geschwindigkeits- und Zeitfehler jedoch jeweils sehr flache  $v$ - $x$ -Kurven auftreten, werden die beiden entsprechenden Fokuspunkte recht nahe beieinander liegen. Der Ortsfokus des PSPF liegt um so näher an den anderen beiden, je weiter entfernt der Ortsfokus der zweistufigen Ionenquelle liegt, also je größer das Verhältnis  $\Delta V_b$  zu  $\Delta V_a$  ist.

Die Abhängigkeit des Auflösungsvermögens von der Masse ist für Geschwindigkeitsfokussierung in etwa gleich mit dem Verhalten bei „delayed extraction“. Die entsprechende Darstellung für einen Aufbau wie in Abb. 2.6 kann in Abb. 2.7 gefunden werden.

In Abbildung 2.8 sind die Fokussierungseigenschaften für verschiedene Fehlerquellen einmal gemeinsam dargestellt. Die Abbildung bezieht sich wieder auf das in Abb. 2.6 beschriebene Gerät. Wie erwartet liegen die Maxima der Auflösung für Zeit- und Geschwindigkeitsfokussierung relativ nahe beieinander. Bei den gewählten Werten von  $50\text{ ns}$  Zeitfehler,  $50\ \mu\text{m}$  Ortsfehler und  $400\text{ m/s}$  Geschwindigkeitsfehler<sup>2</sup> ist der Geschwindigkeitsfehler bestimmend für die Lage des Maximums der Auflösung. Der Ortsfehler ist hingegen der beschränkende Faktor für die erreichbare Auflösung, da das Maximum zu sehr viel höheren Massen verschoben ist. Dieser Effekt ist, wie schon oben beschrieben, auf die stark unterschiedliche Entfernung von Orts- und Geschwindigkeitsfokuspunkt von der Quelle

<sup>2</sup>Die gewählten Werte sind grob und großzügig geschätzte Werte für Ionisierung mit der MALDI Technik.

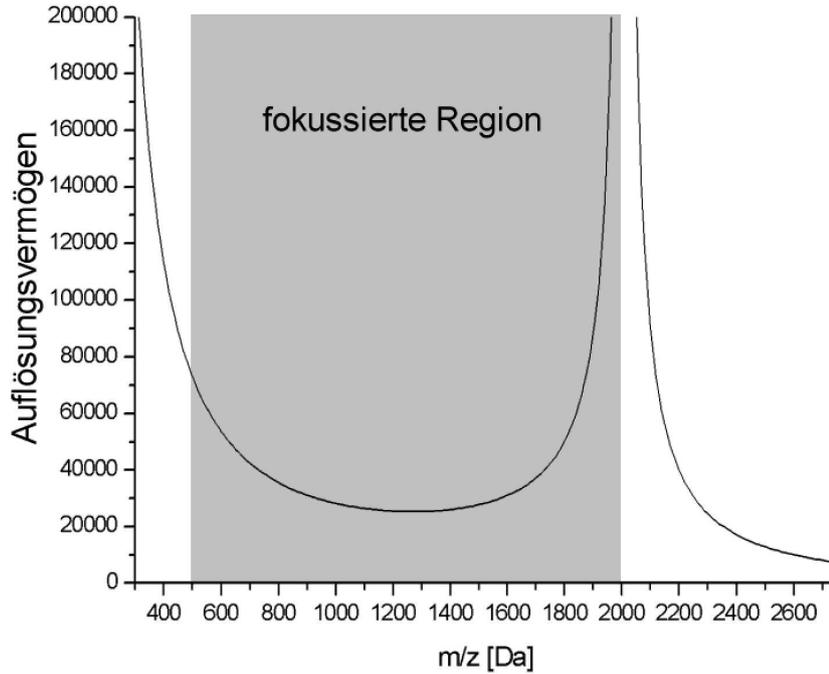


Abbildung 2.7: Massenabhängigkeit des Auflösungsvermögens ( $\frac{1}{R}$ ) bei PSPF

zurückzuführen.

Der größte Nachteil der PSPF-Technik ist, dass die Fokussierung immer auf einen relativ schmalen Massenbereich begrenzt ist. Nur die Ionenpakete, die zum Einschaltzeitpunkt im PSPF-Feld sind, können auch fokussiert werden. Die Breite des korrigierbaren Massenbereichs hängt natürlich von der Geschwindigkeit der Ionen und von der Länge des PSPF-Feldes ab.

Ein weiterer Nachteil der PSPF-Technik ist die Massenkalisierung der Spektren, die durch die Nachbeschleunigung komplizierter wird, als für andere Techniken, für die man den Zusammenhang zwischen Masse und Zeit einfach zu:

$$t = A + B \cdot \sqrt{m} \quad (2.63)$$

annehmen kann. Für die Kalibrierung von PSPF-Spektren werden meist empirische Funktionen zur Anpassung genommen. Eine gebräuchliche Funktion ist [24]:

$$t = A + B \cdot m^{\frac{1}{4}} + C \cdot m^{\frac{1}{2}} + D \cdot m^{\frac{3}{4}} \quad (2.64)$$

Eine Funktion, die auf der analytischen Flugzeitfunktion basiert, kann bei Ioanoviciu gefunden werden [25]:

$$t = A + B \cdot m^{\frac{1}{2}} \left[ \left( 1 - C \cdot m^{-\frac{1}{2}} \right)^{\frac{1}{2}} - D + E \left( 1 - C \cdot m^{-\frac{1}{2}} \right)^{-\frac{1}{2}} \right] \quad (2.65)$$

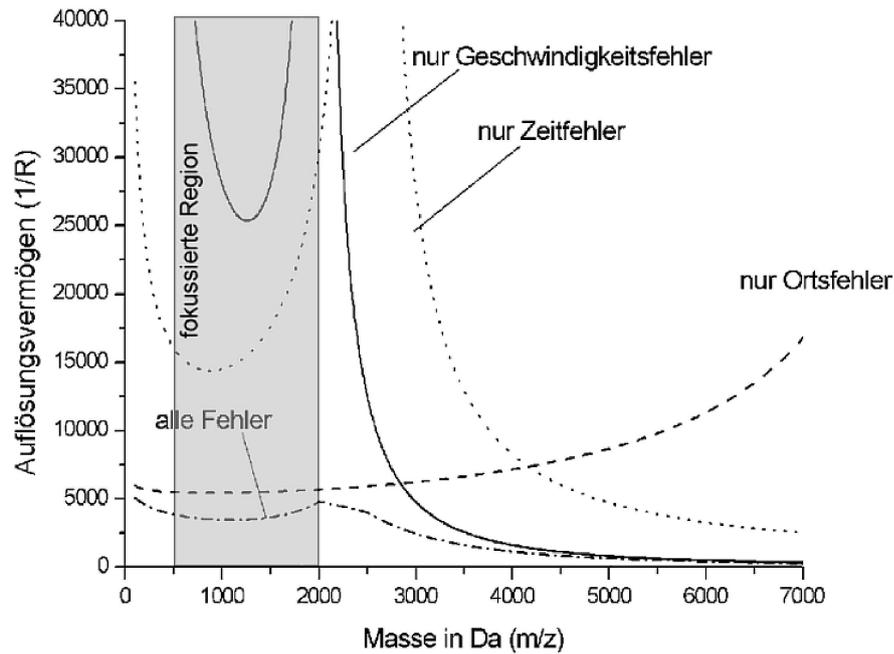


Abbildung 2.8: Massenabhängigkeit des Auflösungsvermögens ( $\frac{1}{R}$ ) bei Geschwindigkeits-, Zeit- und Ortsfehler

Aus praktischen Erwägungen scheint die erste, einfache Funktion vorteilhafter, da sie die Umrechnung der Zeitskala in eine Massenskala sehr viel einfacher macht und auch nur drei statt fünf Punkte zur Kalibrierung benötigt. Nach bisherigen praktischen Erfahrungen im Arbeitskreis wird die Auflösung der Spektren nicht durch die Qualität der Kalibrierung begrenzt. Es wurde allerdings bis heute noch kein experimenteller Vergleich dieser beiden Kalibrierungsfunktionen durchgeführt.

# 3 Aufbau eines miniaturisierten Time-of-Flight Massenspektrometers

## 3.1 Vorteile der Miniaturisierung

Miniaturisierte Massenspektrometer haben prinzipiell die gleichen Eigenschaften, wie ihre großen Verwandten, besitzen aber zusätzlich den Vorteil platzsparend und häufig auch energiesparend, robust und mobil zu sein. Dafür muss man leider bei den meisten Geräten noch Abstriche in Auflösung und Massenbereich hinnehmen. Mit der Verfeinerung der Technik könnten diese Hindernisse aber überwunden werden, so dass das massenspektrometrische Routinegerät der Zukunft vielleicht ein „benchtop“ Gerät sein wird.

In Bereichen, wo die Größe und das Gewicht eine entscheidende Rolle spielt, besonders in der Raumfahrt [26], werden schon seit längerem kleine Massenspektrometer eingesetzt. Mit der Fortentwicklung der Technik werden aber auch neue Einsatzgebiete erschlossen. Gerade in letzter Zeit ist das Interesse an miniaturisierten Massenspektrometern stark gewachsen. Meist sind diese Instrumente als transportable Geräte zu Feldmessungen gedacht [27]. Messungen mit mobilen Analysegeräten sind besonders dann von Vorteil, wenn:

1. die Ergebnisse sehr schnell vorliegen müssen, wie zum Beispiel bei Leckagen potentiell gefährlicher Stoffe,
2. die Probe sich auf dem Weg zum Labor verändern könnte,
3. durch die sofortige Messung vor Ort Zeit und damit Geld gespart werden kann.

Einsatzbereiche liegen insbesondere bei Gasanalysen im militärischen Bereich, in der Schadstoffanalytik und in der mobilen Prozessüberwachung.

Der Hauptvorteil der Massenspektrometrie gegenüber etablierten Methoden der mobilen Gasanalyse wie mit Gaschromatographie besteht in der Geschwindigkeit der Messung und in der zusätzlichen Information der Molekülmasse. Durch die

hohe Sensitivität der Messung kann möglicherweise in einigen Fällen auf eine vorherige Aufkonzentrierung der Probe verzichtet werden.

Die Massenspektrometrie stellt verschiedene Ionisationsverfahren, die später (Abschnitt 3.2.2) genauer erklärt werden, zur Verfügung, die ihre eigenen Vor- und Nachteile haben. Zum Beispiel kann durch REMPI (Resonante Multi Photonen Ionisation, s.S. 3.2.2.4) sehr spezifisch ein Stoff aus einem komplexen Gemisch von Substanzen nachgewiesen werden, ohne dass eine chemische Trennung erfolgen muss. Generell werden die Charakteristika der verschiedenen massenspektrometrischen Methoden durch die Miniaturisierung nicht entscheidend geändert.

Quantifizierung der Messungen ist auch bei miniaturisierten Massenspektrometern grundsätzlich möglich, erfordert aber, wie bei der Gaschromatographie auch, eine stoffspezifische Kalibrierung des Gerätes. Natürlich kann eine Quantifizierung auch durch gleichzeitige Messung einer bekannten Konzentration eines Isotopomers der Substanz von Interesse erfolgen.

## 3.2 bisherige Ansätze

Es gibt bereits seit einigen Jahren Ansätze, miniaturisierte Massenspektrometer zu bauen. Die Anforderungen an diese Geräte sind hoch:

- geringe Ausmaße
- geringer Preis
- geringes Gewicht
- robust
- geringer Energieverbrauch
- einfache Bedienung

Die Entwicklung begann mit kleinen Sektorfeld Massenspektrometern[28], da diese Technik sehr weit verbreitet und erfolgreich war. Heute sind aber Quadrupol Massenspektrometern unter den miniaturisierten Instrumenten am verbreitetsten. Besonders der geringe Anspruch eines Quadrupols an das Vakuum ist ein großer Vorteil dieses Gerätetyps. Schon bei Drücken von ca.  $10^{-2}$  mbar können die kleinen Quadrupol Massenspektrometer arbeiten. Auch bei den anderen Gerätetypen sinken die Ansprüche an das Vakuum mit der Baugröße, da die Ionen kürzere Strecken durchfliegen und damit die mittlere freie Weglänge der Ionen nicht so groß sein muss. Die absoluten Anforderungen an das Vakuum bleiben dabei jedoch so hoch, dass der technische Aufwand nicht entscheidend abnimmt.

Neben den Ansprüchen an das Vakuum ist der verwendbare Quellentyp ein wichtiges Kriterium beim Bau eines miniaturisierten Massenspektrometers. Vor- und Nachteile verschiedener Analysator/Quelle Kombinationen werden im Folgenden besprochen.

### 3.2.1 Massenanalysatoren

Es ist im Prinzip möglich, alle wichtigen Typen von Massenanalysatoren auch miniaturisiert zu bauen [28]. Beispiele für die drei wichtigsten Gerätetypen werden in den folgenden Absätzen besprochen.

#### 3.2.1.1 Quadrupol Massenspektrometer

Im Quadrupol Massenspektrometer werden die Ionen durch eine kollineare Anordnung von vier Stäben geschickt. An diese Stäbe wird eine Gleichspannung und eine Wechselspannung im MHz Bereich angelegt. Durch die richtige Wahl der Spannungen ist nur die Trajektorie der Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladung ( $m/z$ ) Verhältnis stabil. Nur diese speziellen Ionen verlassen den Analysator wieder und werden detektiert. Daher wird die Anordnung auch Quadrupol Massensfilter genannt. Wenn Gleich- und Wechselspannung, bei einem fixen Verhältnis der Spannungen zueinander, verändert werden, kann man nacheinander alle Ionen von Interesse auf den Detektor lenken und so ein komplettes Massenspektrum aufnehmen.

Quadrupol Massenspektrometer sind eine der wichtigsten Gruppen unter den miniaturisierten Massenspektrometern. Dieses ist, wie schon erwähnt, hauptsächlich auf die geringeren Ansprüche dieser Technik an das Vakuum bedingt. Das benötigte Vakuum kann bei diesen Geräten mit einer Pumpstufe erreicht werden, was den technischen Aufwand stark herabsetzt.

Ein Nachteil der Quadrupol Geräte ist die Elektronik zur Erzeugung der Wechselspannung, die viel Leistung aufnimmt. Um eine gute Auflösung trotz der kleinen Analysatorlänge zu erreichen, müssen Amplitude und Frequenz der Wechselspannung höher gewählt werden, als bei „normalen“ Geräten üblich. Da die elektrische Kapazität des Aufbaus wegen der kleinen Abstände zusätzlich steigt, sind die Probleme mit der aufgenommenen Leistung des Geräts bei kleinen Dimensionen noch größer als bei konventionellen Geräten.

Ein weiteres Problem ist die Sensitivität. Wenn ein Quadrupol Analysator um den Faktor  $n$  verkleinert wird, sinkt die Sensitivität des Aufbaus durch die Verkleinerung der Stirnfläche zwischen den Stäben um den Faktor  $n^2$ . Zum Ausgleich der sinkenden Empfindlichkeit durch die Miniaturisierung können mehrere Quadrupol Massenanalysatoren parallel betrieben werden. Die Vor- und Nachteil von miniaturisierten Quadrupol Massenspektrometern werden sehr gut bei Boumsellek zusammengefasst [29].

Aktuelle Beispiele für miniaturisierte Quadrupol Massenspektrometer sind das Micropol System von Boumsellek [30] oder ein ähnliches Gerät von Orient et al. [31]. Beide benutzen ein „array“ von Quadrupol Massenanalysatoren, die parallel angeordnet sind. Holkeboer et al. [32] und Taylor et al. [33] entwickelten Instrumente, die auf einem einfachen Analysator basieren. Typische Massenbereiche solcher Geräte liegen bei 1 bis 100  $m/z$  in einigen Fällen bis zu 300  $m/z$  mit

Peakbreiten von etwa 1 m/z.

### 3.2.1.2 Sektorfeld Massenspektrometer

Im Sektorfeld Massenspektrometer werden Ionen mit Hilfe von elektrischen (E) und magnetischen (B) Feldern analysiert. Im B Feld werden die Ionen gemäß der Formel

$$\frac{m \cdot v}{z} = B \cdot r_B \quad (3.1)$$

nach Impuls pro Ladung aufgetrennt. Hier bedeuten: m die Ionenmasse, v die Geschwindigkeit, z die Ladung der Ionen, B die magnetische Feldstärke und  $r_B$  den Radius der Kreisbahn der Ionen. Ionen mit gleicher Ladung und Geschwindigkeit werden also nach Masse getrennt, indem sie auf Kreisbahnen mit verschiedenen Radien gebracht werden und das Magnetfeld örtlich getrennt verlassen. Wenn kein fotografischer Film oder ein ähnlicher großer Detektor benutzt wird, können alle Massen nacheinander auf den fest angebrachten Detektor gelenkt werden, indem das Magnetfeld in seiner Stärke verändert wird. Dies ist der normale Betriebsmodus, es gibt aber natürlich auch die Möglichkeit den gleichen Effekt durch Scannen der Beschleunigungsspannung der Ionen zu erzielen. Die meisten Instrumente nutzen jedoch sowohl ein elektrisches als auch ein magnetisches Feld zur Massentrennung. Die Trennung im E-Feld erfolgt auf Grund der Unterschiede in kinetischer Energie zu Ladung der Ionen, wie man der folgenden Gleichung entnehmen kann:

$$\frac{m \cdot v^2}{z} = E \cdot r_E \quad (3.2)$$

Es gibt zwei Standardaufbauten, die besonders häufig benutzt werden und beide in der Hintereinanderschaltung von einem E-Feld und einem B-Feld bestehen. Dies sind die Mattauch-Herzog Geometrie und die Nier-Johnson Geometrie. Man nennt diese Geräte auch doppelfokussierende Massenspektrometer.

Beide Typen von Spektrometer sind so konzipiert, dass sie Ionen mit gleichem m/z Verhältnis in einem Punkt räumlich fokussieren und räumlich möglichst weit von benachbarten Ionen mit ähnlichem m/z Verhältnis trennen. Bei der Mattauch-Herzog Geometrie liegen alle Fokuslinien für verschiedene Massen nebeneinander auf einer Ebenen. Die Aufnahme der Spektren kann daher quasi-simultan über eine photographische Platte oder einen Array-Detektor erfolgen (mehrere 100 Da gleichzeitig). Bei der Nier-Johnson Geometrie ist die Fokussierungsbedingung immer nur für ein m/z Verhältnis erfüllt. Die Signalaufnahme erfolgt an einem elektrischen Detektor ohne Ortsauflösung, auf den durch Scannen der Felder nacheinander alle Massen fokussiert werden.

Sektorfeldgeräte sind die älteste Art Massenspektrometer und bekannt für hohe Auflösung und Präzision. Aber es sind auch häufig sehr große Geräte, da die Auflösung mit der Länge der Flugstrecke steigt und da sie meist große Elektromagneten beinhalten. Vorteile dieser Art Massenspektrometer sind die bauartbedingte Möglichkeit zu Tandem MS Messungen, die bei einfachen Quadrupol

Instrumenten nicht gegeben ist. Der Strombedarf ist durch das Fehlen von hochfrequenten Wechselspannungen im Sektorfeldgerät geringer als im Quadrupol.

Der benötigte Magnet ist auch ein großer Vorteil der Sektorfeldgeräte. Wenn man statt des im Labormaßstab häufig benutzten Elektromagneten einen starken Permanentmagneten verwendet, so fällt bei diesem Element der Strombedarf völlig weg. Durch die Verwendung eines Permanentmagneten kann jedoch das Magnetfeld nicht mehr verändert werden, so dass entweder auf eine nicht-scannende Anordnung zurückgegriffen werden muss, oder die Massen mit der Beschleunigungsspannung gescannt werden müssen. Für beide Ansätze gibt es Beispiele: Ein Instrument in der Mattauch-Herzog Geometrie mit einem Massenbereich von bis zu 240 Da und einer Auflösung von ca. 500 wurde berichtet [34] sowie ein Instrument mit ähnlichem Massenbereich und einer Auflösung von 131 in der Nier-Johnson Geometrie, das die Beschleunigungsspannung scannt [35]. Das letzte Gerät hat Gesamtausmaße von 17 x 37 x 57 cm und ein Gewicht von 20 kg.

Geräte mit überlagertem elektrischem und magnetischem Feld wurden ebenfalls entwickelt. Auch hier gibt es mehrere mögliche Anordnungen. Es wurden zum Beispiel ein Gerät mit linearen gekreuzten Feldern (Wien-Filter)[28] oder ein Gerät mit 90° elektrischem Sektor und gekreuztem B-Feld realisiert [36, 37]. Diese Geräte sind noch etwas kompakter in der Baugröße des Analysators, haben aber etwa gleiche Ansprüche an Vakuumtechnik und Elektronik, so dass die Gesamtgröße und das Gewicht dieser Geräte mit den vorgenannten etwa gleich sind.

### 3.2.1.3 Flugzeit Massenspektrometer

Im ToF Massenspektrometer werden Ionen je nach ihrer Endgeschwindigkeit nach einem elektrischen Beschleunigungsfeld getrennt. Diese Technik hat viele Vorteile, die sie für die Miniaturisierung interessant macht. Die Geräte sind relativ einfach aufgebaut und damit auch verhältnismäßig günstig im Preis und haben trotzdem einen großen, theoretisch unbegrenzten, Massenbereich und eine hohe Sensitivität. Wegen dieser Vorteile sind ToF MS Geräte normaler Größe heute häufig die Geräte der Wahl bei der empfindlichen Messung schwerer Moleküle, besonders biologischen Ursprungs.

Ein großer Vorteil, besonders in der Kopplung mit chromatografischen Methoden, ist die kurze Akquisitionszeit für ein Massenspektrum. Die Frequenz, mit der Spektren aufgenommen werden können, ist theoretisch nur von der Flugzeit der Ionen durch das Gerät begrenzt, die im Bereich von etwa 100  $\mu s$  liegt. Eine Datenaufnahme mit mehreren Kilohertz wird allerdings durch die Geschwindigkeit der elektronischen Datenverarbeitung verhindert. Das Problem mit langsamer Datenverarbeitung kann teilweise dadurch umgangen werden, dass mit der Hadamard Transformations Technik gearbeitet wird.

Bei dieser Methode wird das Massenspektrum mit einem „ion gate“ mit der gleichen Zeitauflösung moduliert, mit der auch am Detektor das Signal aufge-

nommen wird. Zur Modulation nimmt man eine periodisch wiederholte Pulssequenz von 1 und 0 (Signal an bzw. Signal aus), deren Periodenlänge genau der gewünschten Spektrenlänge entspricht. Dadurch ergibt sich am Detektor ein Signal, das der Überlagerung vieler Massenspektren entspricht. Um aus diesem Signal das ursprüngliche Massenspektrum wieder rekonstruieren zu können, muss man besondere Pulssequenzen benutzen. Das Erzeugen dieser Sequenzen wird bei Harwit und Sloane [38] gut beschrieben. Für den Spezialfall, dass diese Sequenzen  $2^n - 1$  Elemente beinhalten, nennt man diese „Shift Register Sequenz maximaler Länge“ (maximal length shift-register sequence). Diese Sequenzen haben die Eigenschaft, dass sie genau so viele Einsen beinhalten wie Nullen (bei ungerader Sequenzlänge  $\pm 1$ ). Man nennt die Sequenzen daher auch „Pseudozufalls-Sequenzen“ (pseudo-random sequence). Bei einer Modulation mit dieser Art Pulsfolge, werden also im Durchschnitt 50% der Zeit Ionen zum Detektor durchgelassen. Wenn die Pulsfolge beispielsweise ...1110100 1110100... lautet und das Signal jeweils für  $0.1 \mu\text{s}$  moduliert wird, setzt sich das Detektorsignal der ersten  $0.1 \mu\text{s}$ , dem ersten Zeitfenster, als Summe der Signale aus den ersten drei und des fünften Zeitfensters des Massenspektrums zusammen. Entsprechend verhält sich das Detektorsignal der nächsten Zeitfenster so, als hätte man das Massenspektrum (als Zeilenvektor betrachtet) mit folgender Matrix multipliziert:

$$S_7 = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$$

Diese S-Matrix ist mit der Hadamard Matrix verwandt und hat die Eigenschaft, dass ihre inverse Matrix einfach zu berechnen ist. Multipliziert man jetzt das Detektorsignal, das man ebenfalls als Zeilenvektor betrachtet, mit der inversen Matrix, so erhält man das ursprüngliche Spektrum zurück. Besonders effizient geschieht diese Umwandlung mit Hilfe der schnellen Hadamard Transformation, wie beispielsweise in [38] beschrieben. Diese Methode wird bereits in Massenspektrometern genutzt [7, 39], bisher aber noch nicht in miniaturisierten Aufbauten.

Die Realisierung von miniaturisierten ToF Instrumenten leidet besonders unter den hohen Anforderungen dieses Gerätetyps an das Vakuum, so dass die Größe nicht vom Analysator, sondern von den Vakuumpumpen begrenzt wird. Dieses ist immer noch der Fall, aber die modernen Turbomolekularpumpen sind schon stark in ihren Dimensionen geschrumpft. Bei einigen Systemen wird auch nach einem anfängliche Abpumpvorgang das Hochvakuum durch eine Ionen Getter Pumpe erhalten, die Platz- und Energieansprüche minimieren hilft. Dieses Vakuumsystem kann natürlich auch bei anderen Gerätetypen eingesetzt werden.

Ein weiteres Problem bei ToF Instrumenten ist die gepulste Ionenerzeugung, die man benötigt, um die Signaltbreite im Flugzeitspektrum klein zu halten. Die häufigst gebrauchte Ionenquelle für kleine Moleküle ist die Elektronenionisations (EI)-Quelle, die aber kontinuierlich arbeitet und eine räumlich stark ausgedehnte Ionenwolke produziert. Für ToF Geräte ist diese Quelle, wie alle anderen kontinuierlich arbeitenden Quellen, nicht ohne weiteres zu gebrauchen. Man kann eine kontinuierliche Quelle mit einem ToF Gerät nur koppeln, wenn zwischen Quelle und Analysator ein gepulstes Element, wie zum Beispiel eine Quadrupol Ionenfalle liegt. Wenn man eine Ionenquelle mit sehr kurzer Ionisierungszeit bauen möchte, so kommt man um die Benutzung eines gepulsten Lasers nicht herum.

Es gibt Beispiele für beide Arten von ToF Massenspektrometern. Geräte mit kontinuierlicher Ionenerzeugung und einer gepulsten Ioneneinführung in den ToF Teil des Instruments sind mit Quadrupol Ionenfalle [40] und mit Quadrupol „ion guide“ und orthogonaler Extraktion [41] realisiert worden. Diese Instrumente sind recht kompakt in der Bauweise, tragen aber natürlich einige Nachteile der Quadrupolmassenfilter, wie die Notwendigkeit eine Radiofrequenz (Rf) Spannung zu erzeugen und den bauartbedingten, begrenzten Massenbereich. Der große Vorteil dieser Konstruktion ist das Zurückgreifen auf sehr bewährte Quellen mit sehr breitem Einsatzbereich im niedermolekularen Bereich und die einfache Kopplung der Instrumente mit chromatografischen Methoden, die einen kontinuierlichen Analytstrom liefern.

Geräte, die einen gepulsten Laser zur Ionenerzeugung nutzen, haben zwar einen erheblich größeren apparativen Aufwand, besitzen aber auch einzigartige Vorteile. Benutzt man die MALDI Technik, wie dies bei den meisten der bisher entwickelten miniaturisierten ToF Instrumenten mit Laser der Fall ist [42, 43, 44], so kann man den Vorteil des großen Massenbereichs der ToF MS Technik nutzen. Diese Geräte können zum Beispiel für die mobile Identifikation von biologischem Material genutzt werden [45]. Ein Einlasssystem zur automatischen Beprobung von Aerosolen in Luft ist in Entwicklung [46, 47], bei dem die Aerosolpartikel auf einem Videoband abgeschieden, mit Matrix versetzt und ins Vakuum gebracht werden. Natürlich können aus dieser Entwicklung auch kleinere, einfach zu bedienende Massenspektrometer für das biochemische Labor hervorgehen.

Niedermolekulare Stoffe können mit Hilfe eines Lasers resonant mit mehreren Photonen ionisiert werden (REMPI). Dieses geht besonders gut bei aromatischen Substanzen, die im langwelligen UV resonante Übergänge zeigen. REMPI ist eine sehr selektive Ionisationsmethode, die vorherige Aufkonzentrierung des Moleküls von Interesse überflüssig machen kann. Durch die Schmalbandigkeit des Ionisationslasers und durch die Kühlung der internen Freiheitsgrade (durch adiabatische Expansion im Überschall-Jet) der Moleküle kann die Selektivität in Grenzen verbessert werden. Diese Art der Ionisation ist von großem Vorteil, wenn spezifisch wenige Moleküle (quantitativ) nachgewiesen werden sollen. Die Flexibilität des Gerätes wird dabei stark verringert, aber die Sensitivität und Spezifität ist für den Nachweis der entsprechenden Stoffe sehr gut.

### 3.2.2 Ionenquellen für Flugzeit Massenspektrometer

Wie schon im vorangehenden Abschnitt erläutert, können ToF Massenspektrometer mit kontinuierlichen und nicht kontinuierlichen Ionenquellen gekoppelt werden. Die gepulsten Quellen sind für Flugzeit Massenspektrometer die natürlichere Wahl, sind aber in der Ionisierungstechnik aufwendiger, da sie meist einen Laser mit kurzen Pulsen benötigen. Kontinuierliche Quellen sind besonders dann gebräuchlich, wenn dem Massenspektrometer eine chromatografische Stufe (besonders HPLC) vorangeht. Diese Quellen sind vielleicht in der Ionisierungstechnik weniger auswendig, benötigen aber eine Vorrichtung, um die gebildeten Ionen zu speichern und gepulst in den Analysator zu überführen. Im einfachsten Fall ist dies mit verzögerter Extraktion (delayed extraction) zu realisieren. Weniger Ionenverluste erleidet man, wenn eine Quadrupol Ionenfalle zum Speichern und Pulsen benutzt wird. Dies bedeutet natürlich wieder recht hohen instrumentellen Aufwand. Im Folgenden werden die Ionisationstechniken etwas detaillierter besprochen und -falls bekannt- Beispiele für ihre Anwendung bei miniaturisierten ToF Massenspektrometern gegeben. Ein großer Überblick zu Ionenquellen für ToF Massenspektrometer ist bei Boesl et al. [48] zu finden.

#### 3.2.2.1 Elektronenionisation (EI)

Die Elektronenionisation (EI) ist wohl die etablierteste Methode der Ionenerzeugung. Bei dieser Methode werden die Analytmoleküle mit hochenergetischen Elektronen beschossen. Sie verlieren dadurch gewöhnlich selbst ein Elektron, so dass Radikal Kationen  $[M^+]$  entstehen. Meist werden die Elektronen von einem Wolfram Filament erzeugt und auf die gewünschte Energie, häufig 70 eV, beschleunigt. Die Elektronenenergie ist viel höher als für die Ionisation erforderlich, weswegen unspezifisch alle am Ionisierungsort vorhandenen Moleküle, auch Edelgase, ionisiert werden. Die bei der Ionisierung übertragene Überschussenergie bewirkt oft eine starke Fragmentierung der Ionen, die zur Identifikation herangezogen werden kann und für die meisten Substanzklassen gut erforscht ist. Bei empfindlichen Molekülen kann die Fragmentierung durch Senken der Elektronenenergie zurückgedrängt werden.

Als Elektronenquelle kann statt des Filaments auch ein Plasma benutzt werden. Ein Gerät, das in Halbleitertechnik gefertigt wird und eine Elektronenquelle mit Plasma als Elektronenerzeuger beinhaltet, wurde von Sieberg et al. beschrieben [49]. Der Massenanalysator in diesem Beispiel ist eine ungewöhnliche Konstruktion, mit einer Rf Spannung die longitudinal zur Flugrichtung aufrecht erhalten wird. Die Flugstrecke wird dadurch zum Massenfilter, da stets nur Ionen mit der richtigen Geschwindigkeit beschleunigt werden. Ionen, die mit ihrer Geschwindigkeit nicht in Resonanz mit der Rf Spannung sind, werden gebremst und an den Wänden neutralisiert.

Eine EI Quelle, die ringförmig und symmetrisch zur ionenoptischen Achse ge-

baut ist, wurde von White et al. [50] beschrieben. Diese Quelle hat den Vorteil, dass ein größeres Volumen zur Ionenerzeugung genutzt wird. Die ringförmig erzeugten Ionen werden durch die Ionoptik auf den zentral angebrachten Detektor fokussiert. Extraktion der Ionen geschieht in diesem Gerät mit delayed extraction. Der große Vorteil dieser Konstruktion ist die gesteigerte Sensitivität, die durch eine höhere Ionenausbeute erzielt wird. Die Ionenquelle arbeitet bei dieser Konstruktion allerdings als Restgas Analysator, das heißt das gesamte Gerät ist mehr oder weniger gleichmäßig mit dem zu analysierenden Gas gefüllt. Für angemessen kurze Verweilzeiten der Probe im Gerät muss deswegen der Druck sehr niedrig gehalten werden ( $10^{-7}$  mbar).

In einem Instrument von Cotter et al. [41] wird eine normale EI Quelle mit Hilfe eines Quadrupol „ion guide“ mit dem Massenanalysator gekoppelt und dort orthogonal und verzögert extrahiert. Dieser Aufbau erlaubt im Quellenbereich erhöhte Drücke zu benutzen und somit eine größere Anzahl Ionen zu erzeugen und eine höhere Sensitivität zu erreichen, ohne die Auflösung negativ zu beeinflussen. Die erreichte Auflösung dieses Instruments liegt bei ca. 5500. Dieses ist schon vergleichbar mit der Auflösung eines Gerätes normaler Größe. Die Auflösung eines Gerätes mit 1.3 m Flugstrecke und einer fokussierenden EI Quelle mit orthogonaler Extraktion wurde mit ca. 10 000 berichtet [51].

Eine weitere mögliche Kombination einer EI Quelle mit einem ToF Massenspektrometer bedient sich einer Quadrupol Ionenfalle als Speicher für Ionen und zur gepulsten Injektion in den Analysator. Diese Kombination wurde jedoch noch nicht in miniaturisierten Designs angewendet. Ein Instrument mit Photoionisationsquelle wird im nächsten Abschnitt beschrieben. Das gleiche Gerät soll in Zukunft auch mit einer EI Quelle ausgestattet werden, um Vergleiche mit EI Spektren Datenbanken zu gestatten [40].

### 3.2.2.2 Photoionisation (PI)

Bei der Photoionisation wird die Probe durch Absorption eines einzigen Photons ionisiert. Das verwendete Licht muss also sehr kurzwellig sein. Eine gebräuchliche Wellenlänge ist frequenzverdreifachtes Licht eines bereits verdreifachten Nd:YAG-Lasers. Die Nd:YAG Grundwellenlänge ist 1064 nm, das verdreifachte Licht hat 355 nm, das nochmals verdreifachte Licht hat schließlich 118 nm entsprechend 10.5 eV. Die letzte Frequenzverdreifachung kann in einer Edelgas-Zelle durchgeführt werden. Da der Nd:YAG Laser durch Q-switching bereits kurze Laserpulse erzeugt, entsteht ein VUV (Vakuum Ultraviolett) Puls von ca. 10 ns Länge. Dadurch wird die Ionisierung kurzzeitig genug, um direkt mit ToF Instrumenten kombiniert zu werden.

Eine andere Methode, um VUV Licht zu erzeugen, ist direkt durch Gasentladungsröhren [40]. Die Gasfüllung wird durch elektrische Entladungen hoch angeregt und strahlt -je nach Gasmischung- Licht in diskreten Linien von etwa 8 bis 12 eV (155 bis 103 nm) aus. Dieses Licht ist kontinuierlich. Die entsprechen-

de Ionenquelle kann deswegen nicht unmittelbar mit einem ToF Gerät gekoppelt werden.

Typische Ionisierungsenergien von organischen Substanzen liegen etwa in dem Bereich, der von diesem VUV Licht erreicht werden kann. Nach einer Faustregel liegen die Ionisierungsenergien von organischen Molekülen zwischen 7 und 13 eV, die Ionisierungsenergien von aromatischen Substanzen liegen mit 8 bis 11 eV etwas tiefer. Die Hauptbestandteile von Luft, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> haben jedoch eine Ionisierungsenergie von >12 eV, so dass diese Moleküle mit dem erzeugten VUV Licht nicht ionisiert werden. Dieses bedeutet einen großen Vorteil dieser Methode gegenüber völlig unspezifischen Methoden wie der EI, da der gesamte dynamische Bereich des Detektors nun für die in kleinen Mengen vorhandenen Analyten genutzt werden kann. Die ubiquitären Substanzen wie N<sub>2</sub> sättigen den Detektor nicht und überdecken auch kein Nutzsignal. Natürlich können mit dieser Methode auch Informationen verloren gehen, da bestimmte Substanzklassen mit hoher Ionisierungsenergie nicht detektiert werden können, aber die meisten organischen Moleküle werden mit Photonen von 10.5 eV bereits ionisiert.

Minaturisierte Instrumente wurden sowohl mit gepulsten, als auch mit kontinuierlichen PI Quellen bereits realisiert. Einen versechsfachten YAG Laser benutzen Zimmermann et al. [52] in einem mobilen Massenspektrometer, das außerdem auch im REMPI (s. Abschnitt 3.2.2.4) und LEI (s. Abschnitt 3.2.2.5) Modus betrieben werden kann. Durch die Wahl des Ionisierungsverfahrens können die Eigenschaften der gemessenen Spektren bestimmt werden. Mit PI erhält man mit diesem Gerät eine relativ geringe Fragmentierung verglichen mit normalen EI Spektren, da nur eine kleine Überschussenergie im Molekül deponiert wird. N-Nonanon, das im EI Spektrum einen Molekülpeak von etwa 10 % der Intensität des Basispeaks hat, wird bei PI so wenig fragmentiert, dass der Molekülpeak selbst Basispeak ist. Die Analyse von Alkangemischen, wie sie zum Beispiel bei Verbrennungen auftreten, wird dadurch stark erleichtert.

Ein zweites Gerät mit PI Quelle wird von Syage et al. [40] beschrieben. Dieses Instrument wird mit einer Gasentladungsröhre betrieben, erzeugt also kontinuierlich Ionen. Die Ionen werden zunächst in einer Quadrupol Ionenfalle gespeichert und schließlich mit einer Wiederholrate von 20 bis 100 Hz in den ToF Analysator injiziert. Die Ionenfalle wird so betrieben, dass Ionen mit bis zu 800 m/z gespeichert werden. Eine Auswahl an 48 Stoffen, die Bedeutung bei der chemischen Kriegsführung haben, wurde getestet und zum größten Teil auch detektiert. Die nicht detektierten Stoffe Phosgen und Chlorpikrin haben eine zu hohe Ionisierungsenergie, um von der verwendeten PI Quelle ionisiert zu werden. Die Quelle zeigt also eine gute Ionisierung für eine große Auswahl verschiedener Substanzklassen. Die Detektionsgrenze liegt dabei durch die Ionisierung bei höheren Drücken und die Speicherung in der Ionenfalle bei etwa 100 ppb. Die Auflösung erreicht 200 bis 400 bei 139 m/z.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die PI Quelle zwar nicht alle Substanzen so gut ionisiert wie die EI Quelle, aber gerade dadurch einige Vorteile besitzt.

Durch die niedrige Überschussenergie wird durch PI weniger Fragmentierung induziert und durch geeignete Wahl der Anregungswellenlänge können ungewollte Substanzen wie zum Beispiel  $N_2$  ausgeblendet werden. Wie auch bei der EI Quelle ist die Kopplung mit einem ToF Gerät mit erheblichem Aufwand verbunden. Wenn VUV Laserpulse genutzt werden, fällt diese Komplikation weg. Ein weiterer Vorteil des Lasereinsatzes ist, dass mit wenig Aufwand auch ein noch sanfteres und spezifischeres Ionisierungsverfahren, nämlich REMPI, genutzt werden kann.

### 3.2.2.3 Matrix Assistierte Laser Desorption/Ionisation (MALDI)

MALDI ist eine sehr wichtige und häufig genutzte Methode, um große Moleküle vollständig in die Gasphase zu überführen und schonend zu ionisieren. Bei MALDI werden die Analytmoleküle in Lösung oder im Feststoff mit Matrixmolekülen gemischt. Die gemischte Probe wird auf einen Probenträger aufgetragen und in das Gerät eingeschleust. Hier wird die Probe mit einem Laserpuls angeregt, wodurch die Matrixmoleküle Energie aufnehmen (die Analytmoleküle sollten idealerweise bei der verwendeten Wellenlänge nicht absorbieren). Die Matrix kann die Energie nicht schnell genug verteilen und wird in Folge dessen explosionsartig aus der Probe herausgeschleudert und nimmt dabei Analytmoleküle mit sich. Die Ionisierung findet wahrscheinlich durch Protonenübertragung in der Gasphase in Clustern aus Matrix und Analytmolekülen statt [53]. Meist werden durch diese Ionisationsmethode einfach geladene, protonierte Molekülonen  $[M + H]^+$  erzeugt. MALDI ist geeignet, um Moleküle mit Massen von bis zu mehreren Millionen Da unzerstört zu ionisieren und wird deswegen besonders bei der Untersuchung von großen Biomolekülen und Polymeren genutzt.

Es gibt zwei Varianten der MALDI Technik, die UV MALDI und die IR MALDI, bei denen unterschiedliche Wellenlängen zur Desorption und Ionisation genutzt werden. Am weitesten verbreitet ist die UV Variante, bei der typischer Weise aromatische Säuren als Matrixsubstanzen genutzt werden. Insbesondere Benzoesäure und Zimtsäurederivate haben sich als gute Matrices erwiesen und werden intensiv genutzt. Bei der IR Variante werden Matrices gebraucht, die im IR, möglichst bei der Wellenlänge des  $CO_2$  Lasers gut absorbieren. Hier hat sich besonders Glycerin bewährt, es gibt aber auch andere brauchbare Substanzen, zum Beispiel festes Wasser. Flüssige Matrixsubstanzen haben den Vorteil, dass stets Analyt und Matrix an die Stelle des Laserbeschusses nachgeliefert werden. Die entstandenen Löcher „heilen aus“. Trotzdem hat sich die UV MALDI deutlich besser durchgesetzt, wahrscheinlich weil viel mehr Matrixsubstanzen zur Auswahl stehen und die Methode dadurch breiter einsetzbar wird, denn durch die Löslichkeit des Analyten, die Protonenaffinität und andere Eigenschaften ist es häufig nötig eine passende Matrix auszuwählen, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

Die MALDI Technik passt sehr gut zur Flugzeit Massenspektrometrie als zeit-aufgelöster Analyseverfahren, da der Ionisierungsprozess etwa die gleiche Länge hat wie der Laserpuls, also gewöhnlich ca. 5 bis 10 ns. Da die Ionen auf einer

Oberfläche erzeugt werden, spielt die Ortsverteilung keine so große Rolle und besonders die turn-around-Zeit (siehe Abschnitt 2.3) nicht, die sonst häufig zu den größten Abweichungen bei der Flugzeit führt. Leider ist aber die Geschwindigkeitsverteilung der Ionen sehr groß und weitgehend unabhängig von der Masse der Ionen [18]. Dies ist ein Unterschied zu den bisher angeführten Quellen, bei denen der Ionisierungsort meist groß ist, aber die Geschwindigkeit der Ionen klein. Zur Korrektur der Geschwindigkeitsunterschiede kommen mehrere Techniken in Frage, besonders der Reflektor, das Geschwindigkeitsfokussieren durch verzögerte Extraktion und die PSPF Technik.

Die meisten miniaturisierten ToF Massenspektrometer mit MALDI Quelle greifen auf den Reflektor als energiekorrigierendes Element zurück [46, 43, 44, 42]. Dies ist ein bewährter Aufbau, der auch bei Geräten im Labormaßstab meist benutzt wird. Der besondere Vorteil ist, dass keine schnellen Hochspannungsschalter benutzt werden müssen. Der Aufwand einen Reflektor zu bauen sollte allerdings auch nicht unterschätzt werden. Es wurden daher neue Reflektoraufbauten vorgestellt, die den Reflektor billiger und einfacher anzufertigen machen. So wurde zum Beispiel der Reflektor statt aus mehreren Metallelektroden einfach aus einer biegsamen Elektronik-Leiterplatte hergestellt [43] oder der Reflektor statt aus vielen Elemente nur aus wenigen [54, 55, 56] oder sogar nur einem [42] aufgebaut.

#### 3.2.2.4 Resonante Multi Photonen Ionisation (REMPI)

Die REMPI Methode benötigt auch einen Laser zur Ionisierung. Im Gegensatz zur PI werden aber 2 (oder mehr) Photonen zur Ionisierung benutzt. Mit dem ersten absorbierten Photon geht das Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand über. Mit dem zweiten Photon wird dieses angeregte Molekül schließlich ionisiert. Die Photonen können je nach Anwendung die gleiche oder verschiedene Wellenlängen haben.

Die Ionisierungseffizienz ist nur groß, wenn das erste Photon

- in Resonanz mit einem molekularen Übergang steht, also bevorzugt absorbiert wird und
- zu einem relativ langlebigen Zustand führt und
- die Energie des zweiten Photons zur Ionisierung ausreicht

Wenn das erste Photon nicht absorbiert wird, da kein resonantes Energieniveau im angeregten Zustand existiert, oder der angeregte Zustand so schnell wieder abgeregt wird, dass bei Eintreffen des zweiten Photons keine angeregten Zustände mehr vorhanden sind, wird keine Ionisierung beobachtet. Die Auswahl der Moleküle, die mit REMPI bei einer bestimmten Wellenlänge ionisiert werden können, findet also über die Lage der der Energieniveaus im angeregten Zustand und über die Ionisierungsenergie der Moleküle statt. Die Auswahlkriterien werden dabei um

so schärfer, je kälter die Analytmoleküle sind. Bei Expansion im Überschallgasjet kann so sehr spezifische Ionisierung einzelner Substanzen aus einer komplexen Mischung erreicht werden. Bei höheren Schwingungs-Rotations-Temperaturen erreicht man die Ionisierung von bestimmten Substanzklassen. Bei 266 nm ist beispielsweise die Ionisierung von vielen aromatischen Verbindungen bevorzugt.

Vorteile wie auch Nachteile dieser Ionisierungstechnik liegen auf der Hand. Zum einen kann mit REMPI eine Substanz spezifisch und selektiv aus einer komplexen Mischung heraus ionisiert und nachgewiesen werden, zum anderen müssen aber Informationen über die Energiezustände der Substanz verfügbar sein. Das Umstellen des Gerätes auf eine andere Substanz oder Substanzklasse kann unter Umständen mit erheblichem Aufwand verbunden sein, wenn der verwendete Laser nicht in der Frequenz veränderlich ist (dies ist gewöhnlich der Fall, wenn eine der harmonischen Oberfrequenzen eines Nd:YAG Lasers zur Anregung genutzt wird).

REMPI wurde in mobilen TOF Massenspektrometern zum Beispiel von Thanner et al. [57] oder von Zimmermann et al. [52] verwendet. Im letzten Beispiel wurde in einem Gerät die Ionisierung mit REMPI, PI und LEI realisiert, um quasi gleichzeitig Übersichtsspektren mit PI und aromaten-spezifische Spektren mit REMPI bei 266 nm aufnehmen zu können. Ein Gerät mit REMPI und LEI Ionisierung wurde von Boesl et al. realisiert [48]. Der Analysator in diesem Aufbau war ein lineares TOF MS mit Ortsfokussierung zweiter Ordnung mit einer Länge von 13 cm.

### 3.2.2.5 Laser Elektronenionisation (LEI)

Laser Induzierte Elektronenionisation (LEI) wurde zuerst von Grottemeyer et al. [58] beschrieben. Bei der LEI Technik handelt es sich prinzipiell um Elektronenionisation mit einer gepulsten Elektronenquelle. Die Elektronen werden erzeugt, indem ein Laserpuls mit Photonenenergie von mehr als der entsprechenden Austrittsarbeit auf ein Metallziel geschickt wird. Zweckmäßigerweise verwendet man als Metall ein Material mit kleiner Austrittsarbeit aber guter mechanischer und thermischer Belastbarkeit, wie zum Beispiel Tantal (Austrittsarbeit ca. 4.25 eV oder 292 nm). Das Metallziel kann einfach die zweite Elektrode des ersten Beschleunigungsfeldes sein, es kann aber auch ein Draht in der Nähe der zweiten Elektrode sein. Die entstandenen Elektronen werden im Quellenbereich beschleunigt und zwar entgegengesetzt der Flugrichtung positiver Ionen. Wenn sie genug kinetische Energie durch das elektrische Feld erhalten haben, ionisieren sie die Analytmoleküle, mit denen sie auf dem Weg zusammentreffen.

Die Ionisierungseigenschaften sind denen einer normalen EI Quelle sehr ähnlich. Allerdings lässt sich die Elektronenenergie nicht so genau einstellen, wenn die Ionisierung an jedem Ort im Beschleunigungsfeld stattfinden kann. Wenn ein gut kollimierter Überschall-Gasjet benutzt wird, lässt sich die Elektronenenergie am Ionisierungsort aber gut bestimmen und in Maßen über die Spannungseinstellungen der Quelle verändern.

Ein großer Vorteil der LEI Technik ist die Möglichkeit ohne großen Aufwand zur REMPI Technik überzugehen, indem der Laserfokus einfach ein paar Millimeter verschoben wird und die Wellenlänge des Lasers auf einen resonanten Übergang eingestellt wird. Natürlich wird hierzu wieder ein Laser mit einstellbarer Wellenlänge benötigt, der im mobilen Einsatz möglicherweise schwer zu betreiben ist.

Wie zu erwarten ist, wird die LEI Technik kaum allein in miniaturisierten TOF MS eingesetzt, sondern meist mit REMPI kombiniert. LEI wird in dem Gerät von Zimmermann et al. [52] als ergänzende Zusatztechnik verwendet, die mit wenig Aufwand (und in diesem Gerät mit der gleichen Wellenlänge) weitere Informationen liefert, aber nicht durch apparative Maßnahmen unterstützt wird. Die Auflösung ist entsprechend mäßig. In dem von Boesl et al. [48] beschriebenen Gerät wird LEI mit einem Überschall Molekularstrahl gemacht - die Leistung des 13 cm langen Geräts mit Ortsfokussierung zweiter Ordnung ist etwa vergleichbar mit der Leistung bei REMPI Betrieb.

## 3.3 Planung des Mini-ToF-MS

Das hier geplante Mini-ToF-MS ist für den Einsatz in der Analytik flüchtiger Stoffe gedacht, also relativ niedermolekularer Verbindungen. Es sollen einzelne Stoffe selektiv und sensitiv nachgewiesen und quantifiziert werden. Das Gerät sollte transportabel und möglichst robust aufgebaut sein. Zur Transportabilität und aus Kostengründen sollte das Gerät aus relativ wenigen, stabilen Elementen bestehen. Das Gerät wird nicht darauf angewiesen sein, autonom zu arbeiten, deswegen spielen Erwägungen des Energieverbrauchs einzelner Elemente keine übergeordnete Rolle.

Die Anforderungen und Planungen bezüglich der einzelnen Geräteteile werden in den folgenden Abschnitten etwas genauer erörtert. Zur Orientierung ist in Abbildung 3.1 eine Skizze des schließlich realisierten Gerätes dargestellt.

### 3.3.1 Ionisierung

Besonders zur stoffspezifischen Ionisierung von Gasgemischen bietet sich REMPI als Ionisationsmethode an. Diese Methode ist vom apparativen Aufwand im Massenspektrometer sehr leicht zu realisieren, da nur zwei UV-durchlässige Fenster im Gerät eingeplant werden müssen. Schwierigkeiten bereitet dagegen die Auswahl des Lasersystems, das klein, robust und möglichst durchstimmbaar sein sollte. Ein kleines, nicht durchstimmbares Lasersystem könnte mit einem diodengepumpten Nd:YAG Laser gefunden werden. Die Durchstimmbaarkeit des Lasers, falls sie sich als wirklich nötig erweisen sollte, könnte möglicherweise mit einem OPO (optical parametrical oscillator) realisiert werden. Es gibt jedoch ein literaturbekanntes Gerät [52], das gute Leistung bei festfrequentem Betrieb mit 266 nm zeigt. Die-

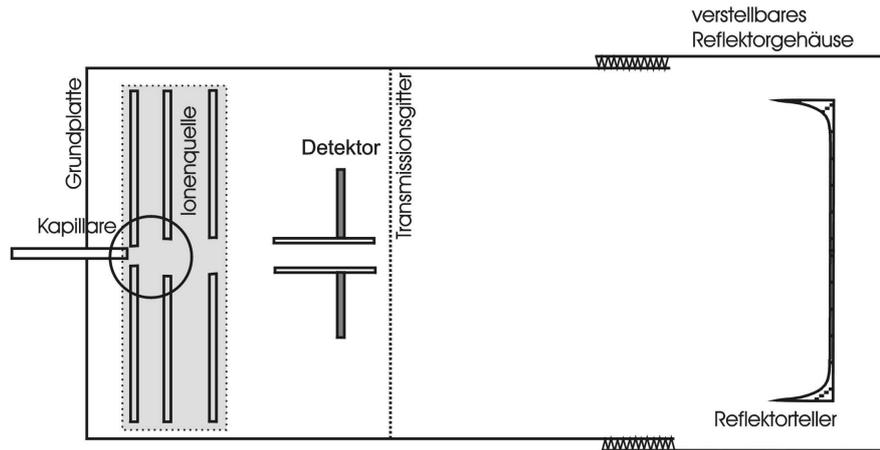


Abbildung 3.1: Skizze des realisierten miniaturisierten ToF MS.

se Ergebnisse lassen hoffen, dass eine Durchstimbarkeit des Lasersystems nicht unbedingt nötig ist.

Wie bereits oben erwähnt, ist die Kombination von REMPI mit LEI sehr vorteilhaft, weil komplementäre Informationen gewonnen werden und weil der Umbau zwischen beiden Ionisierungsarten relativ einfach erfolgen kann. Als zweite Ionisierungsart soll LEI bei diesem Gerät daher gleich eingeplant werden.

### 3.3.2 Reflektor

Ein Reflektor hat zwei Vorteile, die den Einbau dieses Elements in ein miniaturisiertes Massenspektrometer nahelegen. Zum einen verlängert der Reflektor den Flugweg der Ionen, ohne die Gerätedimensionen anwachsen zu lassen. Man erhält daher eine gesteigert Auflösung des Gerätes. Zum anderen ist der Reflektor in der Lage Energiefehler zu korrigieren, ohne dafür gepulste Felder zu benötigen. Auch das sollte die Auflösung des Gerätes steigern. Es scheint also angemessen, einen Reflektor in das zu konstruierenden Gerät einzuplanen.

Ein Nachteil von Reflektoren ist die aufwendige Konstruktion mit einer Folge von mehreren Elektroden und meist mit Gittern, die außerdem immer Verluste an Sensitivität zur Folge haben. Wie bereits oben erwähnt, gibt es Ansätze, wie die Reflektor-Konstruktion einfacher und billiger gemacht werden kann. Der einfachste und radikalste Ansatz zur Simplifizierung des Designs stammt von Cornish und Cotter [42], die einfach eine auf Spannung gelegte, leicht verkippte Platte im Flugrohr als Reflektor benutzen. Eine Skizze des von Cotter verwendeten Aufbaus findet sich in Abbildung 3.2.

In logischer Fortführung dieser Entwicklung, wurde in dieser Arbeit ein neues Reflektordesign entwickelt, bei dem erstmals das Reflektorfeld durch einen nicht-ebenen Reflektorteller geformt wurde. Die Eigenschaften und die Optimierung

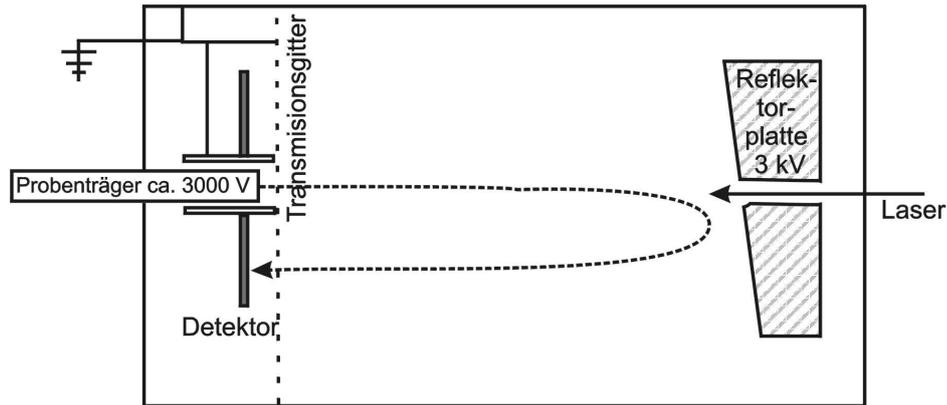


Abbildung 3.2: Von Cotter et al. [42] konstruiertes MALDI-ToF-MS mit ebener Reflektorplatte.

der neuen Konstruktion werden in Abschnitten 3.6 und 3.5 genauer beschrieben. Durch diese verfeinerte Reflektorkonstruktion erhält man, wie in Abschnitt 3.4.1.2 genauer beschrieben, flacher verlaufende Feldlinien, einen etwas näher am Ideal liegenden Feldverlauf und eine längere Flugstrecke.

### 3.3.3 Quelle

Da zwei Elemente des Gerätes, die REMPI Methode und der Reflektor, bereits entschieden sind, sollten jetzt die anderen Elemente so gewählt werden, dass sie optimal zusammenzupassen. Dazu sind in der Quelle einige Entscheidungen zu treffen.

#### 3.3.3.1 Einlasssystem

Für das REMPI Verfahren reicht bei diesem Gerät ein effusiver Einlass aus. Der Abkühlungseffekt bei dieser Art des Einlasses ist nicht sehr ausgeprägt, das bringt aber den Vorteil mit sich, dass die Resonanzfrequenz der Analytsubstanz nicht ganz genau getroffen werden muss, um Ionisierung zu bewirken. Wenn im Endeffekt ein festfrequenter Nd:YAG Laser benutzt werden soll, ist dies ein Vorteil, da die Auswahl der erzeugbaren Wellenlängen nicht sehr groß ist.

Die Kapillare zum Probeneinlass wurde aus technischen Gründen durch die Grundplatte des Gerätes geführt. Die Probe strömt dabei durch ein Gitter in der Repellerelektrode in Richtung der ionenoptischen Achse in das Gerät. Diese Anordnung ist sicher nicht die beste, da die Geschwindigkeit der Moleküle in Expansionsrichtung größer ist, als senkrecht dazu. Diese Anordnung war aber technisch so viel einfacher zu realisieren, dass ein erster Versuch mit dieser Anordnung gestartet wurde.

### 3.3.3.2 Quellentyp

Da als Hauptfehler in dem geplanten Gerät der Ortsfehler angenommen wurde, wurde die Geometrie so geplant, dass die Ionenquelle einen Ortsfokus zweiter Ordnung am Beginn des Reflektorfeldes hat. Dort sollten alle Ionen einer Masse gleichzeitig sehr nahe zueinander kommen und somit fast nur noch einen Energiefehler haben, der durch den Reflektor korrigiert werden kann.

Die richtige Geometrie und die korrekten Spannungen für die Ortsfokussierung zweiter Ordnung wurden mit den in Abschnitt 2.6.2 hergeleiteten Formeln berechnet. Die Ionenquelle wurde anschließend mit Hilfe von SIMION numerisch simuliert, um die Fokussierung und die kollimierenden Eigenschaften der Quelle zu bestätigen bzw. zu untersuchen.

### 3.3.4 Detektor

Es ist schwierig, ein minaturisierte TOF MS zu planen, wenn ein normaler MCP oder MSP Detektor benutzt werden soll. Dies liegt nicht an der Baugröße des Detektors, sondern daran, dass die Ionen einen relativ großen Ablenkwinkel bekommen müssen, um von Detektor eingefangen werden zu können. Der Detektor muss so positioniert sein, dass er den Ionenstrahl aus der Quelle nicht verdeckt und der reflektierte Ionenstrahl sollte möglichst in der Mitte des Detektors aufkommen -schon aus diesen Forderungen ergibt sich ein Abstand von ca. 2 bis 3 cm zwischen Mitte der Ionenquelle und Mitte des Detektors. Auf kürzere Längen der Flugstrecke von etwa 10 cm entspricht dies bereits einem Winkel von ca. 14 Grad. Durch so große Ablenkung würde die Auflösung des Geräts unnötig gesenkt werden.

Um den Winkel geringer zu halten, kann man in der Mitte durchbohrte MCP Detektoren benutzen. Der Ionenstrahl aus der Quelle wird durch die Mitte des Detektors in den Reflektor geschickt und dort so reflektiert, dass er auf die aktive Fläche des Detektors, jetzt nur einige Millimeter neben dem einfallenden Strahl, trifft. Ein solcher Detektor wurde auch in dem hier beschriebenen Gerät geplant. Der verwendete Detektoraufbau ist käuflich erhältlich und in Abbildung 3.5 dargestellt.

## 3.4 Aufbau der Simulation

Nachdem der prinzipielle Aufbau des neuen Gerätes geplant war, musste das Gerät als nächster Schritt simuliert werden, um den Reflektoraufbau zu optimieren, dessen elektrisches Feld nicht mit analytischen Funktionen beschrieben kann.

Für die Simulation wurde das Gerät in drei voneinander unabhängige Teile aufgeteilt. Die Schnittstellen der einzelnen Teile sind jeweils geerdet. Die Quelle endet mit der letzten, geerdeten Elektrode, darauf folgt der Detektor, der quellenseitig durch die geerdete Grundplatte abgeschlossen ist. Auf der Reflektorseite schließt

der Detektor mit einem Gitter ab, das sich über den gesamten Flugrohrdurchmesser erstreckt. Der letzte Abschnitt besteht aus dem Reflektor mit umgebendem Flugrohr. Durch diese Aufteilung wird größtmögliche Flexibilität bei gleichzeitig relativ geringem Simulationsaufwand erreicht. So kann die Quelle gegenüber dem Restgerät geneigt werden, ohne dass dafür die Geometrie einer Komponente verändert werden müsste. Die Simulation des Reflektorbereichs muss in einem dreidimensionalen Array erfolgen, wenn der Reflektor etwas im Rohr geneigt wird, weil dadurch die Zylindersymmetrie des Aufbaus zerstört wird. Durch die Aufteilung muss dafür nur der Reflektor dreidimensional modelliert werden. Alle anderen Teile bleiben zylindersymmetrisch und können mit kleinerem Speicher- und Rechenaufwand simuliert werden.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurden Reflektor und Detektor wieder zu einem Abschnitt zusammengeführt, als klar wurde, dass das Verkippen des Reflektors gegenüber dem Detektor nur zu Auflösungsverschlechterung führt.

#### 3.4.1 Reflektor

Der Reflektor in dem hier beschriebenen Gerät hat einen völlig neuen Aufbau. Das optimale Design ist noch nicht bekannt und ist auch nur schwer analytisch zu ermitteln. Die Konstruktion muss daher numerisch optimiert werden. Die Form und Position des Reflektortellers in dem Flugrohr sollte daher sehr leicht zu ändern sein. Dieses wurde durch Darstellung der Geometrie in der Geometriebeschreibungssprache von SIMION gewährleistet. Für weitere Flexibilität wurde die Beschreibung in zwei Teile geteilt: Ein Teil für die fixen Bestandteile des Reflektorbereichs, also das Flugrohr, das Gitter und den Endflansch und ein Teil für den eigentlichen Reflektorteller, der in Position und Form veränderlich sein sollte. Die Beschreibung des Reflektortellers erfolgte in einer separaten Datei, die einfach ausgetauscht werden konnte. Die einzelnen Teile werden im Folgenden näher beschrieben.

##### 3.4.1.1 fixer Teil

Der unveränderliche Teil des Reflektorbereichs besteht, wie schon oben beschrieben, aus den Wandungen des Instruments und dem Gitter, das den Bereich zum Detektor hin abschließt. Die Dimensionen des Flugrohres wurden auf 80 mm Innendurchmesser mal 160 mm Länge festgesetzt. Der Innendurchmesser wurde so gewählt, dass er einem kommerziell erhältlichen Standardmaß entsprach. Die maximale Länge wurde auf eine angemessen scheinende Größe gesetzt, die auch während der Optimierung nicht mehr variiert werden musste. Der optimale Abstand des Reflektortellers vom Detektor lag in dem vorgegebenen Bereich.

Die Beschreibung des fixen Teils des Reflektors in der SIMION Geometriesprache ist in Anhang A.1.3 zu finden. In dieser Geometriebeschreibung wird auch gleichzeitig der Detektor modelliert. Eine dreidimensionale Version der Be-

schreibung des Reflektorraums findet sich in Anhang A.1.4, in diesem Fall ohne Detektor, der ja zylindersymmetrisch bleibt und daher in einer eigenen Datei beschrieben wird.

### 3.4.1.2 variabler Teil

Der variable Teil des Reflektors beschreibt die genaue Form und Position des Reflektortellers. Die Position und Geometrie des Reflektors wurde zur flexibleren Behandlung in einer eigenen Datei beschrieben. Die Form des zylindersymmetrischen Reflektortellers wurde durch ein Polygon mit 75 Punkten beschrieben, die einen Abstand von 0.5 mm haben. Nach einigen anfänglichen Versuchen wurde entschieden, die Form des Reflektortellers durch eine Exponentialfunktion zu beschreiben.

Die genaue Form des Reflektortellers scheint nicht sehr entscheidend für die Eigenschaften des Reflektors zu sein. Es wurden auch Simulationen mit anderen Kurven als der Exponentialfunktion durchgeführt, wobei die Energiekorrektur des Reflektors sich nicht signifikant änderte. Ein größerer Unterschied besteht jedoch zu dem von Cotter konstruierten Reflektor ohne hochgezogenen Rand. Die Unterschiede bestehen insbesondere darin, dass die hier beschriebene neue Konstruktion, ein elektrisches Feld konstruiert, dass näher an dem idealen quadratischen Verlauf liegt, und dass die Feldlinien in der Mitte des Reflektors flacher verlaufen. Der optimaler Abstand des Reflektortellers vom geerdeten Gitter ist bei der hier beschriebenen Konstruktion außerdem länger als bei dem Reflektor ohne Rand. Dadurch wird die Gesamtflugzeit länger und die Auflösung des Geräts bei gleicher Korrekturleistung des Reflektors besser. In Abbildung 3.3 werden die Feldverläufe eines Reflektors mit exponentiell ansteigendem Rand, mit viertelkreis-förmigen Rand und ohne Rand verglichen.

Die Exponentialfunktion wurde deswegen gewählt, weil bei dieser Funktion Breite und Höhe des Randbereichs mit den Funktionsparametern einfach eingestellt werden können und weil die Steigerung beim Übergang zum flachen Bereich des Reflektors bei dieser Funktion stetig verläuft. Wie in Tabelle 3.2 dargestellt, hängen die Korrektoreigenschaften des Reflektors letztlich auch von der genauen Form des Rands ab. Es wird jedoch vermutet, dass mit anderen Randformen ein ebenso gutes Optimum gefunden werden kann. Die verwendete Randfunktion ist in der folgenden Gleichung (3.3) beschrieben.

$$\text{Höhe}(x) = A \cdot e^{-\frac{(r-x)}{k}} \quad (3.3)$$

Hierbei ist A die maximale Höhe des Reflektors über seiner Grundplatte, k die Abklingkonstante der Exponentialfunktion, r der Radius des Reflektortellers und x die radiale Position im Reflektor von der Mitte aus gerechnet. Die Geometrie des Reflektors ist schematisch in Abb. 3.4 dargestellt.

Aus den beiden Parametern A und k wurde die Höhe des Reflektors als Funktion der Position (r-x) alle 0.5 mm berechnet. Die berechneten Punkte wurden

### 3 Mini-Tof

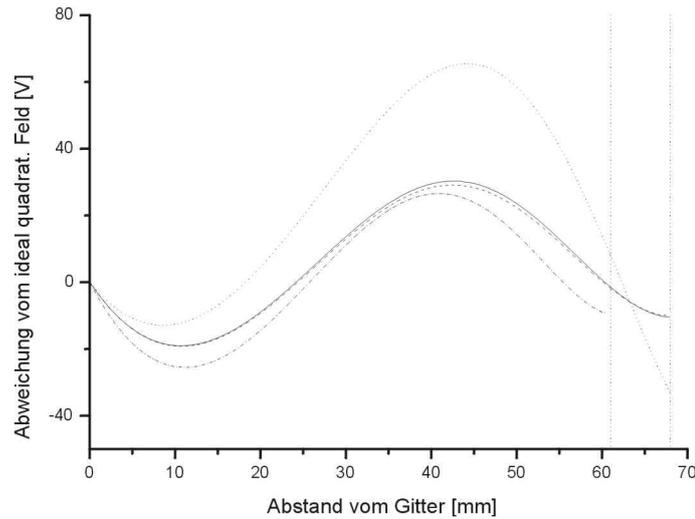


Abbildung 3.3: Abweichung des elektrischen Feldes vom ideal quadratischen Verlauf bei exponentiell ansteigendem Rand (durchgezogene Linie), bei viertelkreis-förmigem Rand (gestrichelte Linie) und bei flachem Reflektor (gepunktete Linie Abstand 61 mm, gestrichpunktete Linie Abstand 68 mm) Die beiden Reflektoren mit Rand unterscheiden sich kaum in der Feldform, der flache Reflektor zeigt bei gleichem Abstand große Abweichungen vom quadratischen Verlauf, bei 10% kleinerem Abstand wird der Feldverlauf vergleichbar.

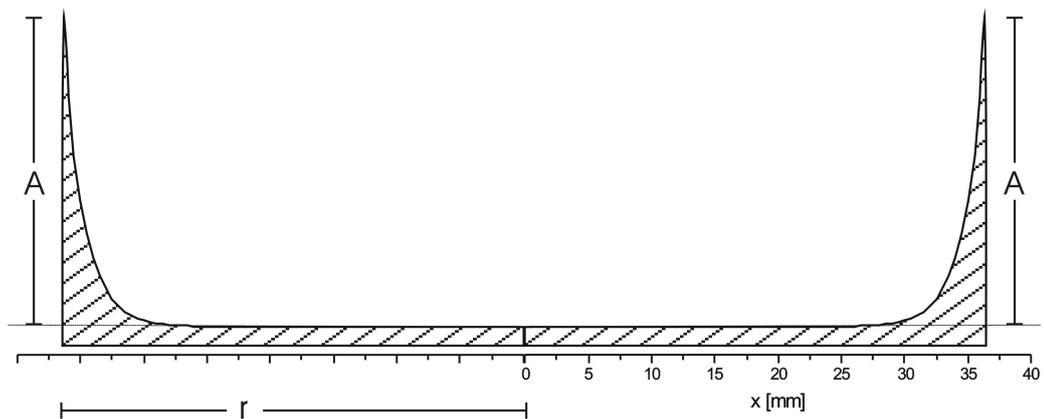


Abbildung 3.4: schematische Darstellung des Reflektortellers und der in Gleichung 3.3 gebrauchten Symbole

als Punkte des Polygons verwendet. Auf Grund der aktuellen Ausrichtung des Koordinatensystems in der Beschreibung werden die berechneten Höhen negativ gerechnet. Die Berechnung wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms „Excel“ durchgeführt. Das entsprechende Tabellenblatt wurde dann als Ascii Datei exportiert und direkt als Beschreibung der Reflektorgeometrie in dem SIMION Geometriefile eingefügt.

Der Reflektor wurde sowohl zylindersymmetrisch als auch verkippt simuliert. Zum Kippen des Reflektors wurde der gesamte Reflektorbereich mit einem dreidimensionalen elektrischen Feld simuliert, da dabei die Symmetrie des Aufbaus verloren geht. Die entsprechende Geometriebeschreibung findet sich in Anhang A.1.5 für den zylindersymmetrischen Fall und in Anhang A.1.6 für den unsymmetrischen Fall.

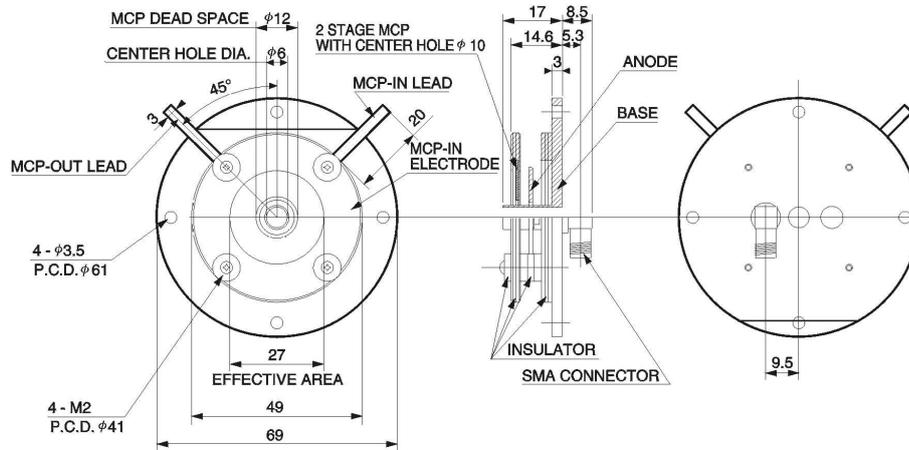
### 3.4.2 Detektor

Der Detektor wurde in den Ausmaßen modelliert, die er nach Herstellerangaben hat. Eine schematische Darstellung des Detektors mit Bemaßung ist in Abb. 3.5 zu finden. Der Detektor ist zur Quelle mit seiner geerdeten Grundplatte abgeschirmt. Eine ebenfalls geerdete Röhre schirmt die durch die Mitte des Detektor fliegenden Ionen von der dort angelegten Spannung ab. Das Gitter, das den Detektor zum Flugrohr hin abschirmt, ist so gelegt, dass die Röhre direkt am Gitter abschließt. An der Oberfläche des Detektors ist als typische Spannung -1500 V angelegt. Die Geometriedatei zur Beschreibung des Detektors ist in Anhang A.1.3 als Teil der Reflektorbeschreibung zu finden.

### 3.4.3 Quelle

Als Quelle wurde ein zweistufiger Aufbau gewählt. Dies hat den Vorteil, dass eine Fokussierung zweiter Ordnung möglich ist und dass eventuelle Abweichungen von der Geometrie durch Spannungsänderung wieder ausgeglichen werden können (wobei die Fokussierung natürlich schlechter wird).

Die Geometrie der Quelle wurde mit Hilfe der Formeln 2.49 und 2.56 berechnet. Die zu lösenden Gleichungen werden recht kompliziert und können nicht mehr analytisch behandelt werden. Die Gesamtlänge  $d_a + d_b + L_f$  (Quellenlänge von der Referenzebene bis zum Fokuspunkt) konnte aber numerisch als Funktion von  $d_a$  und  $d_b$  dargestellt werden. Die grafische Auftragung der Funktion ist in Abb. 3.6 zu finden. Hier ist der Abstand zwischen Referenzebene und erster Elektrode ( $d_a$ ) in mm auf der x-Achse aufgetragen und der Abstand zwischen erster und zweiter Elektrode ( $d_b$ ) auf der y-Achse. Wie man erkennt, ist die Gesamtlänge der Quelle bis zum Ortsfokus zweiter Ordnung immer recht klein. Nur in extremen Fällen, bei großem  $d_a$  und kleinem  $d_b$  kann die Gesamtlänge bis zu etwa 9mal länger sein, als die Länge der elektrischen Felder. Die Gesamtlänge bis zum Fokuspunkt nimmt zu, wenn die Länge der Beschleunigungsstrecken,  $d_a$  oder  $d_b$ , zunimmt. Der



TMCPA0042EA

Abbildung 3.5: Aufbau des Hamamatsu F4294-09 MCP Detektors mit Bemaßung. Aus einer Broschüre des Herstellers (<http://usa.hamamatsu.com/hcpdf/F4294-09.pdf>)

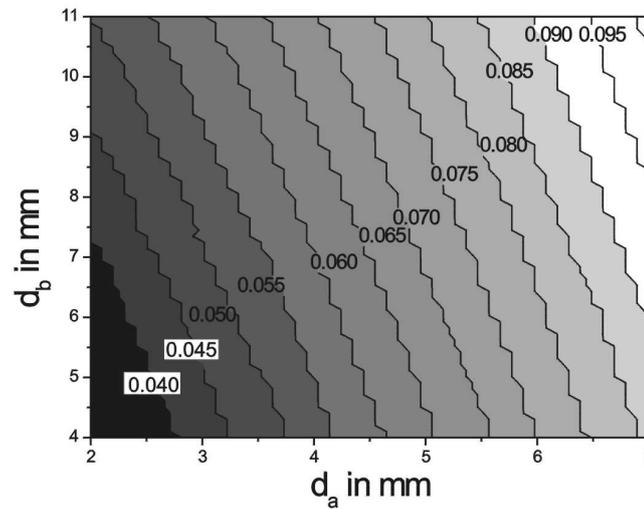


Abbildung 3.6: Gesamtlänge (in Metern) einer zweistufigen Ionenquelle als Funktion von  $d_a$  und  $d_b$

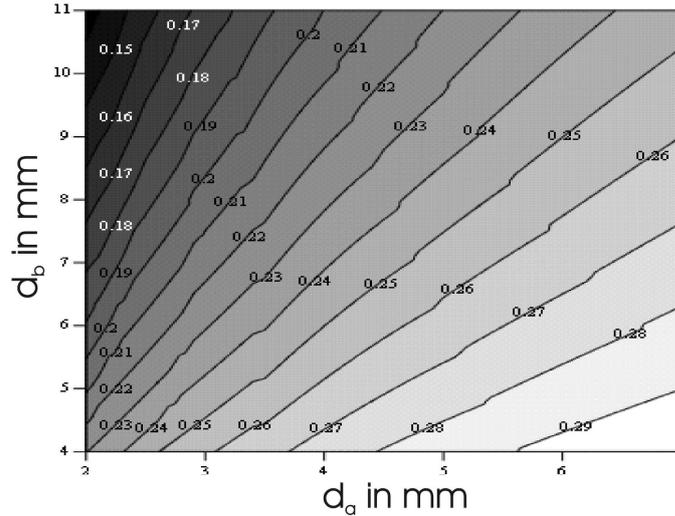


Abbildung 3.7: Spannungsverhältnis  $c$  ( $= \frac{V_a}{V_a+V_b}$ ) einer zweistufigen Ionenquelle als Funktion von  $d_a$  und  $d_b$

Einfluss von  $d_a$  ist aber ungleich größer. Der annähernd lineare Zusammenhang bleibt auch bei hier nicht dargestellten, größeren Werten von  $d_a$  bzw.  $d_b$  bestehen.

Sind die Werte von  $d_a$  und  $d_b$  festgelegt, so stehen auch die Lage des Ortsfokus und das Spannungsverhältnis  $c = \frac{V_a}{V_a+V_b}$  in der Quelle fest. Der Ortsfokuspunkt kann aus Abbildung 3.6 abgelesen werden, die Spannungsverhältnisse können dann einfach mit Hilfe von Gleichung 2.56 berechnet werden. Die dadurch entstehende Funktion wurde in Abbildung 3.7 dargestellt. Die Achsenskalierung entspricht dabei der Skalierung in Abbildung 3.6.

Da die Werte von  $c$  nur sehr langsam mit  $d_a$  zunehmen und schließlich gegen  $c = 0.33\bar{3}$  konvergieren, nimmt die Feldstärke in der ersten Beschleunigungsstrecke bei gegebener Gesamt-Spannungsdifferenz mit deren Länge ab. Dies ist nicht sehr vorteilhaft, da sich dadurch die Unterschiede der Ionen in Anfangsenergie und -winkel stärker auswirken können. Es ist außerdem ein Problem bei der Ionisation mit LEI, da dadurch die Elektronen einen größeren Weg zurücklegen müssen, bis sie die optimale Ionisierungsenergie erreicht haben. Die Ortsunschärfe bei der Ionisation wird dadurch größer, weil die Ionisationseffizienz der Elektronen nicht schlagartig ansteigt, sondern graduell mit der Energie der Elektronen steigt. Um eine gute Ionenausbeute zu bekommen, muss man bei schwachen Feldern also Ionen aus einem größeren Bereich als bei stärkeren Feldern einsammeln.

Bei der Konstruktion der Quelle wurde also darauf geachtet, dass die erste Beschleunigungsstrecke  $d_a$  so kurz wie möglich gewählt wurde, so dass die zu erwartende Feldstärke im ersten Feld bei einer Gesamtspannung von 1000 V bei etwa 50 V/mm liegt.

Da der Abstand  $d_a$  von dem Ort der Ionenerzeugung gemessen wird, muss

die Ionenquelle etwas größer gebaut werden, so dass die Ionen etwa auf halbem Weg zwischen Draht und Repellerelektrode erzeugt werden können. Der genaue Ort der Ionenerzeugung kann bei REMPI mit der Lage des Laserfokus genau eingestellt werden, bei LEI sollte die Lage durch geeignete Wahl der Gesamt-Beschleunigungsspannung verschoben werden können. Bei höherer Spannung erreichen die Elektronen früher die zur Ionisierung notwendige Energie. Es ist allerdings zu erwarten, dass die Ortsunschärfe bei LEI sehr groß werden wird.

Die Maße der Ionenquelle wurden schließlich so gewählt, dass die gesamte Länge der Quelle von der Repellerelektrode gerechnet 60 mm beträgt. Die gewählten Längen betragen:  $d_a = 3\text{mm}$ ,  $d_b = 10.4\text{mm}$  und der Repeller-Ionisierungsort Abstand wurde auf 1.6 mm festgelegt. Das Spannungsverhältnis  $c$  ist damit auf 0.179 festgelegt. Bedenkt man, dass nur  $\frac{3}{4.6} = a$  der ersten Spannungsdifferenz genutzt werden, erhält man ein analoges Verhältnis der zwischen den Elektroden abfallenden Spannungen von 0.25 berechnet mit dem folgenden Zusammenhang:

$$\frac{\Delta V_x}{\Delta V_{gesamt}} = \frac{c}{a - a \cdot c + c} \quad (3.4)$$

Hierbei bedeutet  $\Delta V_x$  die Spannungsdifferenz zwischen Repeller und erster Elektrode und  $\Delta V_{gesamt}$  ist die Spannungsdifferenz zwischen Repeller und zweiter Elektrode. Bei einer Spannung  $\Delta V_{gesamt}$  von 1000 Volt erhalten die Elektronen bei der LEI Ionisierung von der Mitte des ersten Beschleunigungsfeldes bis zum Repeller etwa 125 eV Energie. Am Ort der geplanten Referenzebene, die ca. 0.7 mm von der Mitte des ersten Feldes entfernt ist, haben die Elektronen etwa 40 eV kinetische Energie, was zur Ionisation bereits ausreichen dürfte. Vermutlich wird die Ionisation jedoch auf der gesamten Strecke zwischen Draht und Repeller stattfinden.

Eine Beschreibung der Ionenquelle in der SIMION Geometriesprache ist in Anhang A.1.1 zu finden. Die Auflösung in dieser Beschreibung ist relativ hoch gewählt, damit die berechneten Fokuseigenschaften auch zu beobachten sind. Bei einer Simulationsgenauigkeit von 0.5 mm wie sonst gewählt, ergeben sich leider schon Abweichungen von der analytisch berechneten Fokuslänge. Die dreidimensionale Simulation in Anhang A.1.2 wurde allerdings mit der Genauigkeit von 0.5 mm modelliert, da die Größe der zu berechnenden Felder schon so groß wird, dass sich Probleme in der Programmstabilität ergeben. Dafür kann in dieser Simulation der Einfluss des Drahtes, der in der Mitte des ersten Beschleunigungsfeldes gespannt ist, auf das Verhalten des Gerätes untersucht werden. Wenn der Draht sorgfältig auf das Mittelpotential der ersten Beschleunigungsstrecke eingestellt wird, ist der Einfluss allerdings minimal.

## 3.5 Optimierung des Reflektors

Zur Optimierung des Reflektors wurde eine Simulation von Detektor und Reflektorbereich aufgebaut wie oben beschrieben. Die Testionen wurden am Gitter, das Detektor und Reflektor voneinander trennt, erzeugt und zwar ohne jeden Ortsfehler sondern nur mit verschiedenen Geschwindigkeiten. Die verschiedenen Parameter des Reflektoraufbaus wurden verändert und auf gute Auflösung hin optimiert. Es handelt sich hierbei um ein mehrdimensionales Optimierungsproblem, dessen Lösung durch Vermessen der gesamten erzeugten Hyperfläche sehr aufwendig wäre. Dies gilt besonders, da die Änderung der Geometrie sich mit SIMION nicht automatisieren lässt und die Auswertung der Versuche ebenfalls nicht mit SIMION erfolgt, sondern nach Importieren der erzeugten Flugdaten in „Excel“. Um den Optimierungsaufwand zu verringern und trotzdem die besten Parameter zu bekommen, wurde das Simplexverfahren angewandt, das im Folgenden beschrieben wird.

### 3.5.1 Simplex-Verfahren

Das Simplexverfahren ist ein Standardverfahren zur Optimierung mehrdimensionaler Probleme [59, 60]. Ein Simplex ist ein einfaches geometrisches Gebilde. Ein nulldimensionaler Simplex ist ein Punkt, ein eindimensionaler Simplex eine Strecke, ein zweidimensionaler Simplex ist ein Dreieck und so weiter. Man probiert jetzt die  $(n+1)$ -dimensionale Hyperfläche des gegebenen Problems mit  $n$  Variablen mit einem Simplex. Man benötigt einen Punkt mehr als das Problem Dimensionen hat, also für ein zweidimensionales Problem drei, für ein dreidimensionales Problem vier und so weiter. Als Beispiel sei hier der zweidimensional Fall beschrieben, da sich der noch leicht visualisieren lässt. Man beginnt mit drei Punkten  $L, M, H$  auf der von der Funktion aufgespannten Fläche. Die Funktionswerte der zweidimensionalen Punkte werden berechnet und verglichen. Wenn der Maximalpunkt der Funktion gesucht wird, wird nun der Punkt  $L$  mit dem kleinsten Funktionswert aus dem Simplex entfernt und durch einen Punkt  $L'$  ersetzt, der –vermutlich– näher am Maximum liegt. Der neue Punkt  $L'$  wird ermittelt, indem der Punkt mit kleinstem Funktionswert ( $L$ ) an der Geraden, die durch die anderen beiden Punkte beschrieben wird, gespiegelt wird. Der Funktionswert des neuen Punktes  $L'$  wird ermittelt. Falls der neue Punkt immer noch den kleinsten Funktionswert hat, wird der Punkt mit dem zweitkleinsten Funktionswert ( $M$ ) gespiegelt und der Funktionswert dieses neuen Punktes ermittelt. Dann wird mit dem Algorithmus von vorn begonnen. Dies ist die einfache Simplex Optimierung, die aber noch verbessert werden kann, indem die Punkte nicht nur einfach gespiegelt werden, sondern auch die Größe des verwendeten Simplex verändert wird.

Nach einer Spiegelung wird der Abstand von der Spiegelebene um einen Faktor (gewöhnlich 2) vergrößert, wenn der neue Punkt  $L'$  jetzt den höchsten Funkti-

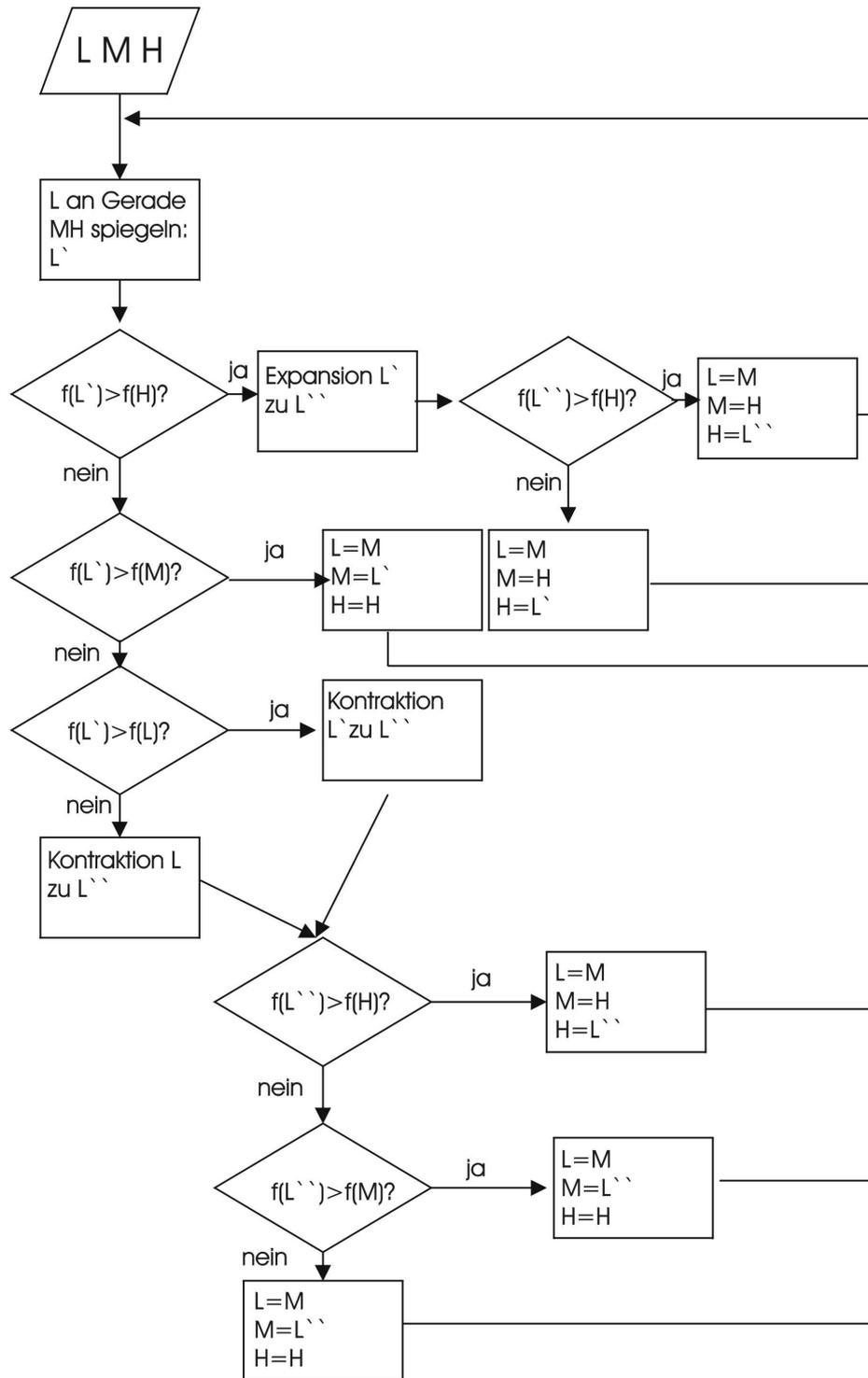


Abbildung 3.8: Flussdiagramm des Nelder Mead Simplexalgorithmus.

onswert hat. Wenn der Punkt mit größerem Abstand ( $L''$ ) jetzt weiterhin den höchsten Funktionswert hat, wird der Algorithmus von vorn begonnen, wenn der neue Punkt einen kleineren Funktionswert hat, wird der letzte Punkt ( $L'$ ) wieder eingesetzt und von vorn begonnen.

Falls der gespiegelte Punkt  $L'$  immer noch den kleinsten Funktionswert hat, wird der Abstand von der Spiegelebene verringert. Der Abstand des Punktes mit höherem Funktionswert von der Spiegelebene wird um einen Faktor (gewöhnlich 0.5) verringert. Wenn dieser Punkt  $L''$  immer noch den kleinsten Funktionswert hat, wird der Punkt mit dem zweitkleinsten Funktionswert ( $M$ ) gespiegelt und mit dem Algorithmus von vorn begonnen. Der Algorithmus ist als Flussdiagramm in Abb. 3.8 zu sehen.

Für höherdimensionale Probleme wird genau gleich verfahren, nur dass nicht an einer Geraden, sondern an einer Fläche oder Hyperfläche gespiegelt wird. Die Berechnung der Spiegelung wurde mit Hilfe eines Mathcad Programms durchgeführt, der Rest des Algorithmus wurde von Hand ausgeführt. Die Mathcad Berechnung ist in Anhang A.2 zu finden. Die Eingabematrix für den im Anhang gezeigten Mathcad Algorithmus wurde in Excel erzeugt, die Kommunikation zwischen den beiden Programmen erfolgte über MathConnex.

#### 3.5.1.1 Variablen

Als wichtige Variablen bei der Konstruktion des Reflektors wurden der Abstand des Reflektortellers vom Gitter ( $Pos$ ), der Radius des Reflektortellers ( $r$ ), die Neigung des Reflektortellers, die Höhe des Reflektorrands (Parameter  $A$  in Gl. 3.3) und die Abklingkonstante  $k$  aus Gl. 3.3 angenommen. Zunächst wurde in Vorversuchen das Verhalten der Simulation bei Änderung der Variablen untersucht.

Wie früh erkannt wurde, ist die Änderung des Reflektordurchmessers zur Optimierung nicht sehr empfehlenswert, da der Verlauf der Feldlinien im Reflektorraum durch eine Verkleinerung des Durchmessers stärker gekrümmt wird. Dies ist in Abb. 3.9 dargestellt, ist aber auch intuitiv ersichtlich, da sich die Feldlinien in der Nähe des Objektes der Objektform anpassen. Die Objektform ist bei größerem Reflektorteller flacher.

Ein flacher Verlauf der Feldlinien im Reflektorbereich ist im Gerät sehr wünschenswert, da dadurch Ionen, die an verschiedenen Stellen in das Reflektorfeld eindringen, etwa das gleiche Reflektorfeld durchfliegen. Anfangs parallel fliegende Ionen bleiben dadurch parallel. Durch stark gekrümmte Feldlinien ergibt sich ein defokussierender Effekt des Reflektors und damit eine schlechte Sensitivität, da nicht alle Ionen den Detektor erreichen und eine schlechtere Auflösung, da Ionen sehr unterschiedliche Trajektorien durchfliegen können und daher unterschiedliche Zeiten benötigen, bevor sie am Detektor ankommen.

Aus diesen Erwägungen wurde der Reflektordurchmesser bei den Optimierungen als fester Parameter betrachtet und auf einen angemessenen, möglichst ho-

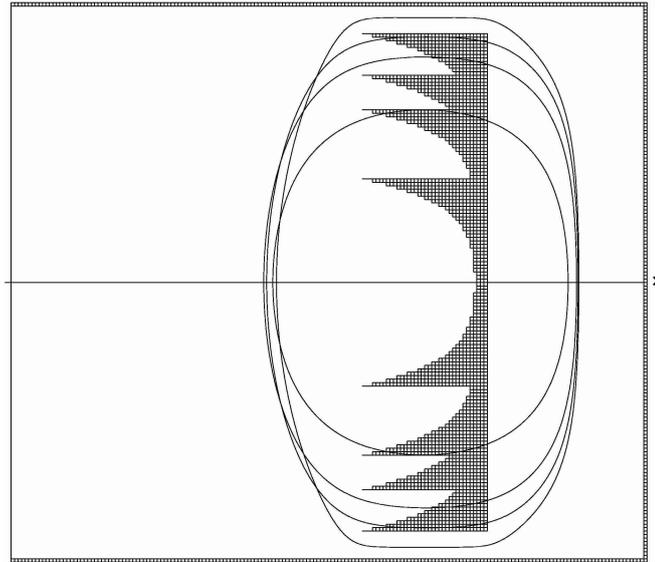


Abbildung 3.9: Überlagerung von 4 Reflektoren mit Radius  $r=15$  mm,  $r=25$  mm,  $r=30$  mm und  $r=36$  mm. Die Feldlinie bei 400V ist eingezeichnet und zeigt deutlich unterschiedliche Krümmung.

hen Wert gesetzt. Der Reflektordurchmesser bei allen im Folgenden beschriebenen Geräten ist 72 mm (Radius 36 mm).

In einem koaxial gebauten Gerät wie dem hier vorgestellten ist ein Problem, dass Ionen wieder in die Quelle zurück reflektiert werden können, wenn ihre Radialgeschwindigkeit nicht hoch genug ist. Ein Ion, das in der Mitte des Gitters zwischen Quelle und Reflektor mit einer Energie von ca 900 eV erzeugt wird, benötigt einen Anfangswinkel von ca. 1.3 bis 2.7 Grad, um auf den Detektor zu gelangen. Es müssen etwa 2 cm Weg zurückgelegt werden und das in Flugzeiten von etwa  $10 \mu s$  (bei 100 Da). Das entspricht einer Geschwindigkeit von ca.  $2000 \frac{m}{s}$ . Solch hohe Radialgeschwindigkeiten treten in einem effusiven Einlasssystem wie hier geplant nicht auf, besonders nicht, da der Einlass in Richtung der ionenoptischen Achse erfolgt. Wenn keine baulichen Maßnahmen getroffen werden, werden die meisten der erzeugten Ionen den Detektor gar nicht erreichen. Verschiedene Maßnahmen wurden erwogen: zunächst wurde mit einer Verkipfung des Reflektortellers experimentiert. Mit diesem Aufbau wurde sogar ein Optimierungslauf gestartet, der aber nicht zu einem akzeptablen Ergebnis konvertierte, da entweder die Flugzeitunterschiede zwischen den Ionen zu groß waren oder nur ein sehr kleiner Anteil der Ionen auf den Detektor traf.

Dieser unerwünschte Effekt liegt an der Verkipfung des Reflektors. Wie schon oben beschrieben, treffen die Ionen ohne weitere Maßnahmen nicht auf den Detektor, wenn sie geradlinig in den Reflektorbereich fliegen. Wenn der Reflektor

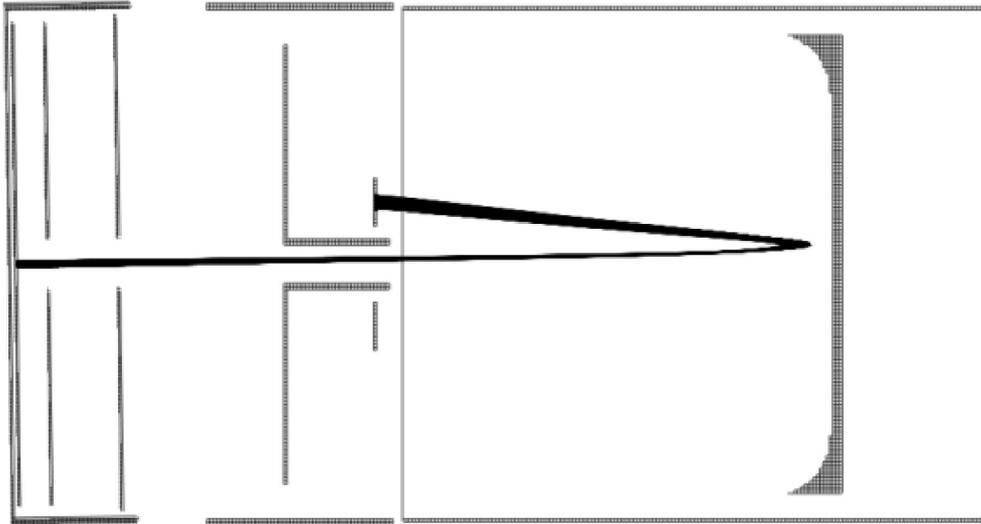


Abbildung 3.10: Ionentrajektorien bei Verkippung der Quelle um ca.  $1^\circ$  gegenüber dem Restgerät.

verkippt ist, treffen die Ionen zwar am Detektor auf, der Detektor steht aber nicht senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Ionen. Dieser Effekt wurde auch schon vorher z.B. von Grottemeyer et al. bemerkt [61]. Für eine gute Auflösung muss der Detektor senkrecht auf der Ausbreitungsrichtung der Ionen stehen, das heißt in diesem Fall ebenfalls um einige Grad geneigt. Das wäre in diesem Aufbau allerdings schwer technisch zu realisieren. Es wurde daher beschlossen, Reflektor und Detektor symmetrisch in das Flugrohr einzubauen. Damit fällt der Reflektorwinkel als veränderliche Variable aus der Optimierung heraus.

Ein zweite Idee, wie die Ionen auf den Detektor gelenkt werden können, ist die Verkippung der Quelle gegen das Restgerät. Da die Ionen schon gleich zu Anfang ihrer Flugbahn mit einem Winkelkorrektur beginnen, kann der Winkel hier kleiner sein, als wenn der Reflektor gekippt wird und die zu erwartende Auflösung wird besser. In diesem Fall müssen die Ionen schräg durch das geerdete Rohr des Detektors fliegen. Dadurch ist der mögliche Winkelbereich eingeschränkt. Die Länge des Rohres beträgt 16.5 mm, der Durchmesser ist 6 mm. Daraus ergibt sich ein maximal möglicher Winkel von  $20^\circ$ , der bei weitem für diesen Zweck ausreicht. Bei realistischen Winkeln um etwa  $1 - 2^\circ$  ist die Öffnung für die Ionen noch groß genug, so dass sich keine Probleme ergeben sollten.

Es wurde also ein Gerät geplant, bei dem die Quelle in einem eigenen Feld simuliert wurde, das dann in SIMIONS „workbench“ um einige Grad gedreht werden konnte. Da zwischen Quelle und Reflektorbereich ein Stück feldfreier Raum ist, stellt diese Trennung des Geräts kein Problem bei der Simulation dar. Der Winkel zwischen Quelle und restlichem Gerät wurde so klein wie möglich gewählt,

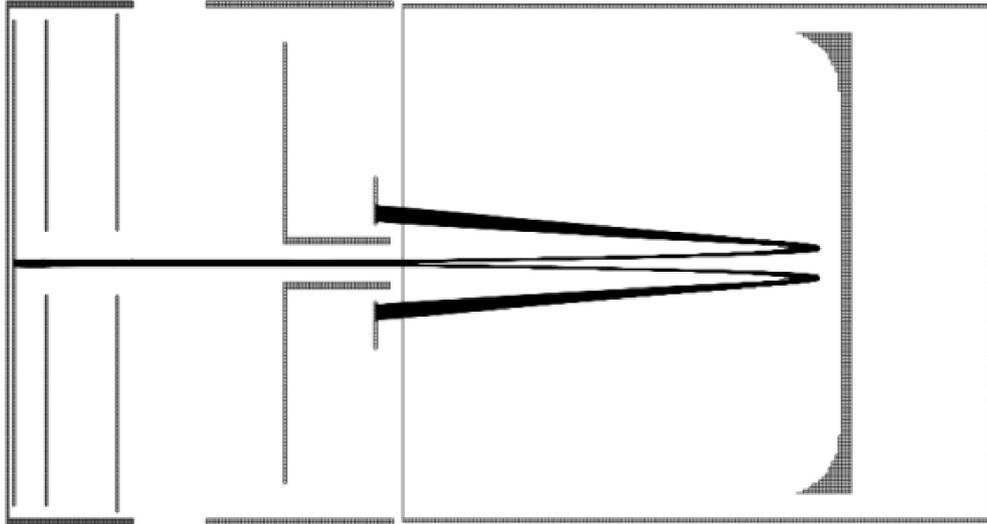


Abbildung 3.11: Iontrajektorien bei Ablenkung durch einen Draht in der Röhre des Detektors.

so dass die Ionen unter möglichst kleinem Winkel auf den Detektor treffen. Die Trajektorien in einem solchen Gerät sind beispielhaft in Abb. 3.10 abgebildet. Die Eigenschaften dieses Geräts werden genauer in Abschnitt 3.6 beschrieben. Dieser Gerätetyp ist schließlich auch mechanisch realisiert worden, wie in Abschnitt 3.7 beschrieben. Der Winkel der Quelle zum Restgerät geht nicht als zu optimierender Parameter in die Berechnung mit ein, da schon intuitiv klar ist, dass möglichst kleine Winkel die beste Auflösung ergeben. Der Winkel muss so gewählt werden, dass möglichst viele Ionen auf den Detektor treffen und so ein Kompromiss zwischen Auflösung und Sensitivität gefunden wird.

Eine dritte Möglichkeit, die Ionen auf den Detektor zu lenken wurde ebenfalls simuliert. Ein Draht wurde konzentrisch in das geerdete Rohr im Detektor eingespannt und auf wenige Volt positiver Spannung gelegt. Die Ionen, die sich nahe der Mitte der ionenoptischen Achse befinden, werden durch den Draht stark abgelenkt, Ionen die weiter entfernt von der Achse fliegen, erfahren wenig Ablenkung. Durch diese Anordnung wird ein größerer Teil der Detektorfläche ausgenutzt, da die Ionen nicht nur in eine Richtung, sondern konzentrisch in alle Richtungen abgelenkt werden. Dieser Aufbau wurde zwar auch simuliert, aber noch nicht praktisch realisiert. Eine beispielhafte Darstellung der Ionen Trajektorien in einem solchen Gerät ist in Abb. 3.11 zu sehen. Meines Wissens nach wurde eine solche Anordnung zur Ablenkung von Ionen noch nicht benutzt. Man findet solche Drähte aber zur Bündelung von Ionenstrahlen als „ion guide“ in einigen Geräten [62].

Nach diesen Überlegungen bleiben also zwei Aufbauten zur Optimierung übrig, wobei jeweils ein Parameter, der Winkel der Quelle bzw. die Spannung des Ab-

lenkdrahtes, nicht optimiert werden müssen, sondern nur möglichst klein und so gewählt, dass viele Ionen den Detektor treffen. Die zu optimierenden Parameter sind in beiden Aufbauten gleich und sind genau die anfangs erwähnten: der Abstand des Reflektortellers vom Gitter (Pos), die Höhe des Reflektorrandes (Parameter A in Gl. 3.3) und die Abklingkonstante  $k$  aus Gl. 3.3. Es wurde nur das Gerät mit verkippter Ionenquelle optimiert und später realisiert. Da sich die Aufbauten nicht stark unterscheiden, wird aber erwartet, dass damit auch die optimale Konfiguration für den zweiten Aufbau annähernd gefunden wurde. Aus dieser Überlegung heraus wurden die Eigenschaften des optimierten Geräts auch im Aufbau mit konzentrischer Ionenquelle und Ablenkdraht untersucht. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 3.6.1 zu finden.

#### 3.5.1.2 Bewertung

Die Simulationen wurden nach der größten Zeitdifferenz der Ankunftszeit der Ionen am Detektor bewertet. Für die Optimierung des Reflektorbereichs wurde ein sehr einfacher Ansatz gewählt. Die Ionen wurden am geplanten Ortsfokuspunkt der Quelle erzeugt und unter einem Winkel von 1 bis  $2.5^\circ$  mit Energien zwischen 800 und 900 eV in den Reflektorbereich geschickt. Der Startwinkel wurde so optimiert, dass die meisten Ionen auf den Detektor trafen. Es wurden also nur die Energiefokussierungsfähigkeiten des Reflektors getestet und Einflüsse von Ortsfehlern außer acht gelassen. Diese Einflüsse wurden später bei der Optimierung des gesamten Gerätes berücksichtigt. Als Ergebnis der Simulation wurden die Auftreffzeiten der Ionen in eine Datei geschrieben. Die Datei wurde als Datenbank in Excel abgefragt und nur alle Daten von Ionen importiert, die auf dem Detektor auftreffen. Dieses wurde anhand der Ortskoordinaten des Auftreffens festgestellt. Als Bewertungsparameter wurde einfach die maximale Flugzeitabweichung der am Detektor auftreffenden Ionen berechnet. Die Bewertung wurde als Funktionswert einer unbekanntenen Funktion mit drei Variablen angesehen und mit Hilfe der Simplexmethode, die in Abschnitt 3.5.1 beschrieben wurde, minimiert.

#### 3.5.2 Ergebnisse

Zunächst wurde nur der Reflektorbereich wie im letzten Abschnitt beschrieben optimiert. Hierzu wurden vier willkürliche Punkte als Anfangssatz gewählt. Die simulierten Aufbauten wurden in der Reihenfolge ihrer Simulation numeriert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 wiedergegeben. Wie man erkennen kann, wird die Zeitdifferenz zu Anfang der Optimierung schnell besser, um dann relativ konstant auf schlechtem Niveau stehen zu bleiben. Die Optimierung hat sich offensichtlich in einer Schleife gefangen, da der Simplex eine stark verlängerte Form angenommen hat. Um wieder in einen richtigen Bereich zu gelangen wurde `min18` eingeführt, ein Punkt, der in der Nähe der bis dahin optimalen Punkte liegt. Mit diesem Punkt wurde gerade das bis dahin optimale Setup gefunden. Es wurde

### 3 Mini-Tof

noch etwas mit dem Simplexverfahren weiteroptimiert, wobei aber keine Verbesserung der Zeitdifferenz mehr gefunden wurde (Daten nicht aufgeführt).

	min1	min2	min3	min4	min5	min6	min7
xPosition [mm]	67	55	60	70	60.15	69.25	68.52
Randhöhe [mm]	16.5	20	10	13	10.92	8.59	6.47
Konstante <sup>1</sup>	3.5	4	3	2.5	0.23	1	0.25
Winkel [Grad]	2	2.5	2.5	1.5	2.5	1.5	1
Zeitdiff. [ns]	255	485	86	106	93	10	14

	min8	min9	min10	min11	min12	min13	min14
xPosition [mm]	60.96	60.76	60.35	60.46	59.9	59.97	59.92
Randhöhe [mm]	8.78	9.32	10.39	10.12	10.54	10.13	10.4
Konstante <sup>1</sup>	5.48	4.17	1.54	2.2	1.58	2.65	1.93
Winkel [Grad]	2	2.5	2.5	2.5	2	1.5	2.5
Zeitdiff. [ns]	89	102	86	80	90	86	90

	min15	min16	min17	min18	min19
xPosition [mm]	59.96	60.49	60.48	70	70.48
Randhöhe [mm]	10.2	9.99	10.02	7	10.02
Konstante <sup>1</sup>	2.47	2.53	2.45	3	2.45
Winkel [Grad]	2	2.5	2.5	1	1.5
Zeitdiff. [ns]	83	82	82	8.5	36

Tabelle 3.1: Simulationsergebnisse der Reflektoroptimierung

Von min18 aus wurde der Parameterraum in alle Richtungen etwas erkundet, um festzustellen, ob sich das System an einem Minimum befindet. Die Ergebnisse dieser Simulationen sind in Tabelle 3.2 zu finden. Man sieht hier, dass die Ergebnisse etwas besser werden, wenn der Rand des Reflektors höher wird und wenn der Abstand zum Gitter verringert wird. Bei einer Verringerung des Abstandes von 70 auf 67 mm steigt der Flugzeitunterschied allerdings wieder an. Bei 68 mm Abstand ist auch eine Erhöhung des Randes nicht mehr von Vorteil. Es wurde entschieden, den Aufbau mit den Parametern x-Position 68 mm, Randhöhe 7 mm und Abklingkonstante 3 zu realisieren. Bei der hier gewählten Auflösung der Simulation mit 0.5 mm ist es fraglich, wie signifikant die Unterschiede der einzelnen

<sup>1</sup>siehe Gleichung 3.3

	x Position [mm]	Randhöhe [mm]	Konstante	Zeitdifferenz [ns]
min18	70	7	3	8.5
min20	69	7	3	9.7
min21	71	7	3	12
min22	70	7.5	3	4.5
min23	70	6.5	3	12.6
min24	70	7	3.5	6.7
min25	70	7	2.5	9.8
min26	68	7	3	5.6
min27	67	7	3	8.4
min28	68	7.5	3	10

Tabelle 3.2: Erkundung des Parameterraums um min18 herum. Alle Ionen fliegen unter einem Winkel von  $1^\circ$ .

Anordnungen noch sind. Da die Ionen der Reflektoroberfläche nicht sehr nahe kommen und SIMION das elektrische Feld besser als mit der Auflösung der Elektroden simuliert, können die Ergebnisse möglicherweise noch aussagekräftig sein, für eine weitere Annäherung an das Optimum sollte jedoch eine Simulation mit größerem Aufwand durchgeführt werden.

Die Optimierung des Reflektors wurde nicht weiter durchgeführt, da angenommen wurde, dass andere Effekte die Auflösung dominieren werden, so dass die Gesamtauflösung nicht durch die Energiefokussierung des Reflektors begrenzt wird.

Zur weiteren Charakterisierung des Reflektors wurde das elektrische Feld entlang der Flugbahn der Ionen ermittelt. Hierzu wurde ein Ion mit 900 eV Anfangsenergie erzeugt und durch den Reflektor geschickt. Es wurden der Ort und die kinetische Energie des Ions alle 10 ns in eine Datei geschrieben. Diese Daten wurden schließlich mit Hilfe von Origin als Funktion der Energie in Abhängigkeit des Ortes dargestellt. Wie in Abschnitt 2.4.4.1 beschrieben wurde, ist der ideale Feldverlauf für einen Reflektor von der Form  $V(x) = ax^2$ . In Abbildung 3.12 ist der Spannungsverlauf im Reflektorbereich zusammen mit einem ideal quadratischen Verlauf und der Abweichung beider Kurven aufgetragen. Man erkennt, dass der Spannungsverlauf besonders im wichtigen Bereich zwischen 800 und 900 Volt (dem erwarteten Energiebereich der Ionen) nahe bei der idealen Kurve liegt und um weniger als 10 Volt von einem ideal quadratischen Verlauf abweicht. Abweichungen vom idealen Verlauf bei kleineren Spannungen werden vermutlich nicht einen so großen Einfluss auf die Flugzeit der Ionen haben, da die Ionen dort noch höhere Geschwindigkeit besitzen und so nur kleine relative Änderungen in der Geschwindigkeit auftreten können.

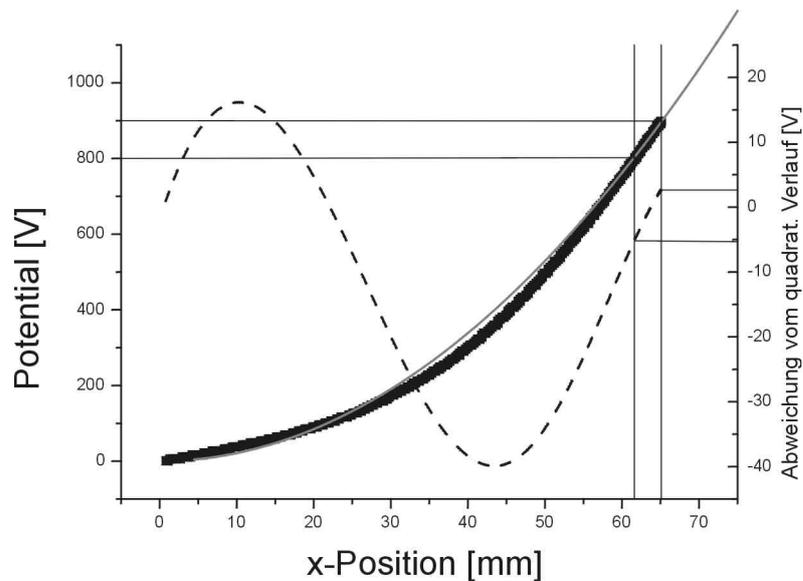


Abbildung 3.12: Potentialverlauf im Reflektorbereich von min26. Die dicke Linie zeigt den in der Simulation gefundenen Verlauf, die graue Linie zeigt einen idealen quadratischen Potentialverlauf und die gestrichelte Linie die Abweichungen beider Kurven.

### 3.6 Simulationsergebnisse des vollständigen Mini-ToF-MS

Nachdem ein ausreichend optimierter Aufbau für den Reflektorbereich gefunden wurde, wurde das gesamte Gerät in der Simulation zusammengesetzt. Die zweistufige Ionenquelle wurde dabei zunächst ohne den Draht zur Ionenerzeugung mit LEI simuliert, dafür aber mit höherer Auflösung von 6 Punkten pro Millimeter. Zur Simulation mit dem Draht in der Ionenquelle wurde die Auflösung wieder auf zwei Punkte pro Millimeter zurückgenommen, da die Symmetrie durch den Einbau des Drahtes zurückgeht und die Quelle dann als dreidimensionales Feld simuliert werden muss, was sehr viel mehr Speicherplatz beansprucht. Nach den in dieser Arbeit gemachten Erfahrungen läuft SIMION auch auf Systemen mit mehr Hauptspeicher nicht mehr sehr stabil, wenn die Feldgröße etwa 50 Megabyte überschreitet. Vor allem aus diesem Grund wurde hier auf genauere Simulation verzichtet.

Die zweistufige Quelle wurde bereits in Abschnitt 3.4.3 genauer beschrieben. Der Ortsfokus der Quelle wurde so berechnet, dass der Abstand der Repeller-elektrode zum Ortsfokus 60 mm beträgt. Der Abstand von der Repellerelektrode zum Gitter, das den Repellerbereich abtrennt wurde genau auf 60 mm gesetzt. Da die Quelle als einzelnes Element in die Simulation eingefügt wurde, konnte die

Verkipfung der Quelle sehr leicht geändert werden. Typische Werte lagen bei 0.5 bis 1.5°.

Bei der Simulation des Gesamtgerätes wurde zunächst der Winkel so eingestellt, dass der Anteil der am Detektor ankommenden Ionen möglichst groß war und der Winkel so klein wie möglich. Alle Aufbauten wurden mit dem gleichen Satz Testionen bewertet, die gewählt wurden, um möglichst realistische Ionisierungsbedingungen nachzustellen und trotzdem den Aufwand der Simulation klein zu halten. Es wurden 550 Testionen um den Referenzpunkt der Ionenquelle erzeugt. In Flugrichtung, wo mit einer starken Änderung des Verhaltens gerechnet werden muss, wurden 50 Positionen mit einem Abstand von ca. 1/20 mm auf einer Gesamtstrecke von 2.3 mm gewählt. Senkrecht dazu, wo die Änderung des Verhaltens geringer ist, wurden 11 Positionen mit einem Abstand von 0.1 mm gewählt. Es ergibt sich ein Testionen-Raster mit einer Ausdehnung von  $2.3 \times 1.0$  mm. Die Ausdehnung in Flugrichtung ist für REMPI viel zu groß gewählt, möglicherweise wird bei LEI aber auf der gesamten Strecke zwischen Draht und Repellerplatte ionisiert, was einer Abweichung von  $\pm 1.15$  mm in dieser Richtung entspricht. In der Simulation wurde die Anfangsenergie der Ionen jeweils auf 0.1 eV gesetzt, was in etwa der thermischen Energie der Ionen entspricht. Die Anfangsgeschwindigkeit der Ionen ist nur in Richtung der Symmetrieachse der Quelle gerichtet, was natürlich nicht der Realität entspricht, aber auch nicht so fern sein wird, da der Einlass hinter dem Repeller liegt. Die Vorzugsrichtung der Ionen wird also in Richtung der Symmetrieachse sein. Zur Auswertung wurden wieder die Flugzeiten in eine Textdatei geschrieben, mit Excel importiert und die größte Flugzeitabweichung als Bewertungsparameter genommen. Durch diese worst-case Schätzung werden einige der Unzulänglichkeiten der Simulation sicher wieder ausgeglichen und das tatsächliche Verhalten des Gerätes einigermaßen korrekt wiedergegeben.

Als erstes wurde getestet, wie die Zeitdifferenz am Detektor unter den veränderten Bedingungen ist. Dazu wurden die eben beschriebenen Testionen mit einer Masse von 200 Da unter einem Quellenwinkel von 0.8° durch das Gerät geschickt. Das Ergebnis war erstaunlich gut und lieferte einen maximalen Flugzeitunterschied von nur 9 ns für die Ionen aus dem doch sehr groß gewählten Ionisierungsvolumen. Bei einer Flugzeit von im Mittel 9.448  $\mu$ s entspricht das einer Auflösung von ca. 525, was zur Gasanalyse bereits vollkommen ausreichen würde. Zusätzlich wurde der Abstand des Reflektors etwas geändert, um zu sehen, ob sich hier ein anderes Optimum ergibt. Es zeigt sich, dass eine weitere Verkleinerung des Abstandes den Flugzeitunterschied noch etwas weiter verringern kann. Es wurde daher entschieden, den Reflektorabstand in der mechanischen Realisierung verstellbar zu gestalten, um hier eine empirische Optimierung zu gestatten. Die Simulationsergebnisse des Gesamtgerätes mit unterschiedlichen Reflektorpositionen sind in Tabelle 3.3 zu finden.

Die nachfolgenden Rechnungen wurden mit min31 durchgeführt. Als nächstes wurde das Verhalten bei verschiedenen Massen betrachtet. Alle bisherigen Simulation wurden mit 200 Da durchgeführt. Nun wurden die oben beschriebenen

### 3 Mini-Tof

	x Position [mm]	Zeitdifferenz [ns]
min29	69	12
min30	68	9
min31	67	7.4
min32	66	10.6

Tabelle 3.3: Simulation des Gesamtgerätes mit unterschiedlichen Reflektorpositionen. Die Quelle hat einen Winkel von  $0.8^\circ$  zum Reflektor.

min31	mittlere Flugzeit [ $\mu s$ ]	Zeitdifferenz [ns]	Auflösung
200 Da	9.375	7.4	633
201 Da	9.398	7.4	635
500 Da	14.822	11.8	628
501 Da	14.837	11.8	628
800 Da	18.749	14.9	629
801 Da	18.761	14.9	629

Tabelle 3.4: Verhalten bei verschiedenen Massen

Testionen mit 201, 500, 501, 800 und 801 Da erzeugt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Wie zu erwarten war, verändert sich die Auflösung des Aufbaus nicht, wenn sich die Masse der Ionen ändert.

Um herauszufinden, an welcher Stelle in der Ionenquelle die größten Flugzeitunterschiede entstehen, wurde die Flugzeit der Ionen als Konturdiagramm gegen die Startposition in der Ionenquelle aufgetragen. Abbildung 3.13 zeigt diese Auftragung. Wie man erkennt, treten die größten Flugzeitunterschiede bei Ionen auf, die in der Nähe des Repellers erzeugt werden. In dem Bereich um 1.3 mm vom Repeller entfernt sind die Flugzeitunterschiede am kleinsten. Bei einem Abstand von mehr als  $\pm 0.5$  mm vom Minimum wird der Flugzeitunterschied größer als eine Nanosekunde und die Abhängigkeit der Flugzeit von der Position wird größer. Die Lage des Minimums dieser Verteilung ist erstaunlich, da die Referenzebene einen Abstand von 1.6 mm vom Repeller haben sollte. Wie in Abbildung 3.14 gezeigt, wird die Lage des Minimums mit dem Reflektor-Gitter-Abstand verschoben. Bei einem Abstand von 68 mm, dem bei der Optimierung des Reflektors gefundenen besten Wert, liegt das Minimum in der Referenzebene bei ca. 1.6 mm. Dadurch dass die Testionen nicht symmetrisch um diese Ebene verteilt sind, ist dies aber nicht die optimale Einstellung für das Gesamtgerät. Bei einem Abstand von 67 mm wird das Minimum so weit verschoben, dass es etwa mittig im Bereich der Testionen liegt.

Senkrecht zur Flugrichtung kann man in Abbildung 3.13 beobachten, dass die Flugzeitunterschiede zu positiven Werten hin etwas größer werden. Ionen, die mit

### 3.6 Simulationsergebnisse des vollständigen Mini-ToF-MS

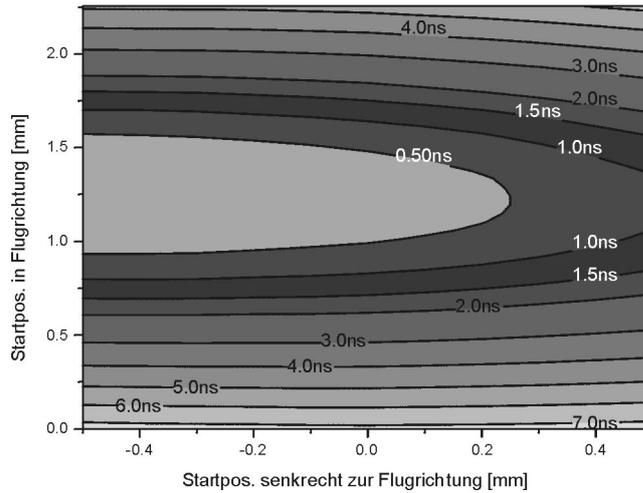


Abbildung 3.13: Darstellung der Flugzeit in Abhängigkeit von der Startposition relativ zur Mitte des Repellers für die Testionen mit Masse 200 Da. Die Oberfläche des Repellers befindet sich am unteren Rand der Abbildung, die Flugrichtung der Ionen ist in Richtung der y-Achse. Die Position des Drahtes entspricht etwa dem oberen Rand der Abbildung.

positiven Positionswerten senkrecht zur Flugrichtung starten, fliegen sozusagen in der „Innenkurve“, werden also in Abb. 3.10 im oberen Bereich der Ionenquelle erzeugt. Die Unterschiede die bei Positionsunterschieden senkrecht zur Flugrichtung auftreten, sind vermutlich durch die verschiedenen Flugbahnen im anisotropen Feld des Reflektors zu erklären. Was auch zu den Flugzeitunterschieden führen kann, ist die Verkippung des Ionenpakets am Ortsfokus. Die Ausdehnung des Ionenpakets am Ortsfokus beträgt in Flugrichtung etwa  $75 \mu\text{m}$  und ist nicht sehr von der Position der Ionen senkrecht zur Flugrichtung abhängig, aber natürlich ist die Ortsfokus-Linie um  $0.8^\circ$  gegenüber dem Gitter geneigt, was zu den etwas größeren Flugzeitunterschieden auf einer Seite der Ionenquelle führen kann.

Insgesamt ist das Verhalten der Simulation für diese Testionen sehr zufriedenstellend, wenn man bedenkt, dass hier ein relativ großes Volumen zur Ionisierung angenommen wurde. Die Auflösung bei REMPI sollte nach diesen Untersuchungen wegen des viel kleineren Ionisierungsvolumen noch um einiges höher liegen als hier berechnet.

Ein Problem, das bisher noch nicht berücksichtigt wurde, ist die Geschwindigkeitsverteilung der Ionen zum Ionisierungszeitpunkt. Wenn die Ionen keine Vorzugsrichtung haben, sondern in alle Richtungen die gleiche Geschwindigkeitsverteilung, tritt das in Abschnitt 2.3 beschriebene Phänomen der „turn-around time“ auf, wodurch die Flugzeitunterschiede stark erhöht werden. Für Ionen mit Masse

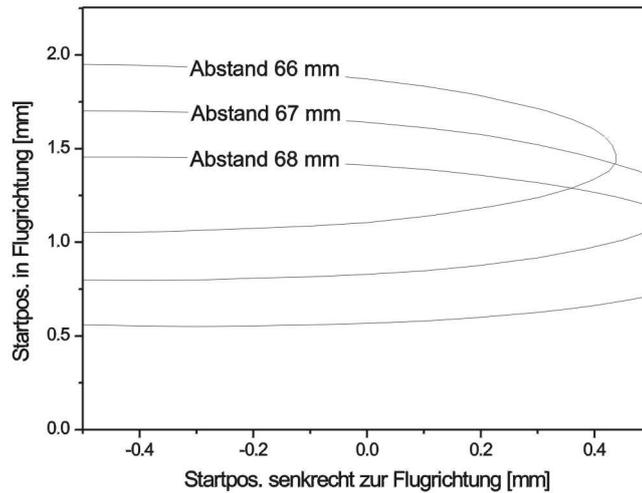


Abbildung 3.14: Bereich mit Flugzeitunterschieden von  $< 1\text{ ns}$  für Reflektor-Gitter-Abstände von 66, 67 und 68 mm.

200 Da und einer kinetischen Energie von 0.1 eV beträgt die Verzögerung etwa 25 ns, was die Auflösung bereits von 630 auf etwa 150 senkt. Auch eine Auflösung von 150 ist noch akzeptabel für Gasuntersuchungen, bei denen meist Stoffe mit Massen von weniger als 200 Da von Interesse sind. Auf lange Sicht sollte aber angestrebt werden, das Einlasssystem so zu gestalten, dass die Probe als Molekularstrahl in die Quelle gebracht wird, da die Leistung des Gerätes dadurch stark gesteigert werden könnte. Die Auflösung sollte sich etwas steigern lassen, wenn die Spannungen an Quelle und Reflektor angehoben werden. In der Simulation ergibt sich durch eine Verdoppelung aller Spannungen eine Steigerung der Auflösung von 150 auf etwa 180. Eine andere Maßnahme zur Auflösungsverbesserung wäre eine gepulste Extraktion, die aber wieder mit erhöhtem technischen Aufwand verbunden wäre. Von dieser Maßnahme wurde zunächst Abstand genommen, da die Veränderung des Einlasssystem für einfacher und effizienter erachtet wird, besonders da bei der Verwendung von Geschwindigkeitsfokussierung durch gepulste Extraktion die Ortsfokussierung verloren geht, die bei Ionisation aus der Gasphase besonders wichtig ist.

Da das Gerät zunächst mit effusivem Einlasssystem realisiert wurde, wurde auch die Abhängigkeit der Flugzeit vom Startwinkel der Ionen bei Anfangsenergien von 0.1 eV untersucht. Wie in Abbildung 3.15 zu sehen ist, treffen nicht alle Ionen am Detektor auf. Nur die Ionen, die in einem Kegel mit etwa  $70^\circ$  Öffnungswinkel um die Symmetrieachse der Quelle starten, können am Detektor nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl für Ionen, die in positive (ohne turn-around) als auch in negative Richtung (mit turn-around) starten. Bei einer gleichmäßigen Verteilung der Startwinkel gelangen also etwa 20 Prozent aller

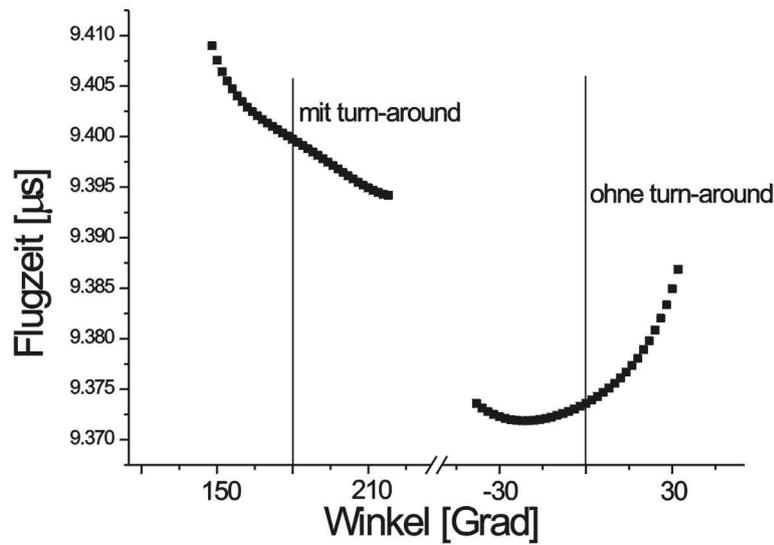


Abbildung 3.15: Abhängigkeit der Flugzeit vom Startwinkel der Ionen bei 0.1 eV Anfangsenergie und 900 Volt Repellerspannung (Reflektor 1000 V).

Ionen auf den Detektor. Bei einer Verdoppelung der Spannungen in Quelle und Reflektor erweitert sich der Anteil der auf den Detektor treffenden Ionen bei sonst gleichen Bedingungen auf etwa 43 Prozent. Der Öffnungswinkel des Kegels beträgt ca.  $110^\circ$ . Auch die Flugzeitunterschiede werden bei höheren Spannungen geringer und betragen bei verdoppelter Spannung trotz größerer Kegelöffnung nur etwa 8 ns für die in positive Flugrichtung startenden Ionen statt etwa 15 ns wie in Abb. 3.15.

Bei einheitlicher aber höherer Anfangsenergie der Ionen, wie sie bei Bildung eines Molekularstrahls von größeren Molekülen durch die nahezu vollständige Umwandlung der inneren Energie in kinetische Energie entstehen können, ändert sich die Auflösung des Gerätes nicht sehr stark. Es wurden Flugzeitunterschiede bei 0.1, 1 und 10 eV Anfangsenergie berechnet. Die Werte sind in Tabelle 3.5 zu finden.

Die Abhängigkeit der Flugzeit von der Anfangsenergie wurde durch die Simulation eines Ions aus der Mitte der Ionenquelle bei verschiedenen Energien untersucht. Es ergibt sich der Zusammenhang, wie er in Abbildung 3.16 dargestellt ist. Man sieht sehr schön den großen Einfluss der „turn-around time“. Während zwischen -0.1 und +0.1 eV die Steigung der Kurve recht groß ist, liegt die Änderung der Flugzeit im Bereich über 0.1 eV bei nur ca. 30 ns pro eV.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das hier simulierte Gerät sehr viel-

Anfangs- energie [eV]	mittlere Flugzeit [ $\mu s$ ]	Flugzeit- unter- schied [ns]	Auflösung
-0.1	9.401	7.1	662
0.1	9.375	7.4	633
1	9.346	7.3	640
10	9.256	8.8	526

Tabelle 3.5: Flugzeitunterschied und Auflösung bei verschiedenen einheitlichen Anfangsenergien der Testionen in min31.

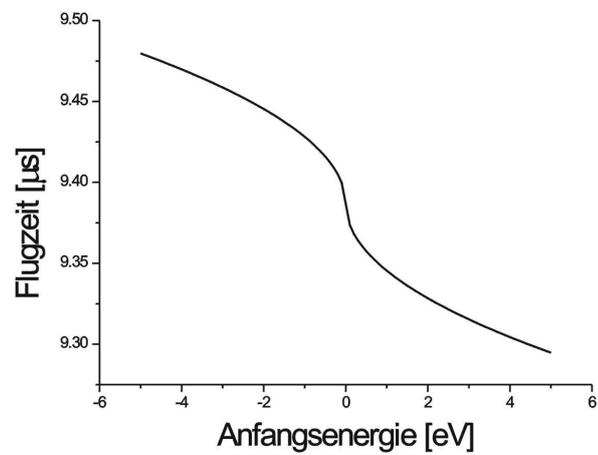


Abbildung 3.16: Flugzeit eines Ions aus der Mitte der Quelle bei verschiedenen Anfangsenergien.

### 3.6 Simulationsergebnisse des vollständigen Mini-ToF-MS

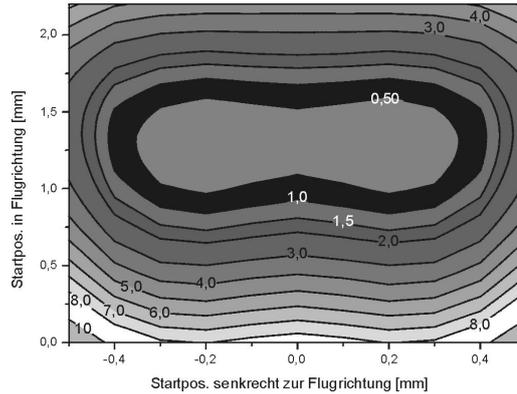


Abbildung 3.17: Flugzeitunterschiede in Abhängigkeit von der Startposition der Ionen in der Quelle bei Verwendung eines Ablenkdrahtes mit einer Spannung von 1.5 V. Der Abstand zwischen Reflektor und Gitter beträgt 68 mm.

versprechende Eigenschaften zeigt. Es ist bei Betrieb mit effusivem Einlasssystem eine Auflösung von ca. 150 zu erwarten, die hauptsächlich durch den großen Flugzeitfehler durch die „turn-around time“ bedingt ist. Die Auflösung wird sich in diesem Fall auch mit REMPI wahrscheinlich nicht stark verbessern lassen, da auch hier die „turn-around time“ die Auflösung dominiert. Wenn allerdings ein Molekularstrahl-Einlasssystem verwendet wird, ist eine große Auflösungsverbesserung zu erwarten. Die Auflösung wird vermutlich bei etwa 600 für LEI und noch weit höher für REMPI liegen. Aus Gründen der einfachen Realisierung wurde trotzdem zunächst nur ein effusiver Einlass gebaut.

#### 3.6.1 Simulation des optimierten Gerätes mit Ablenkdraht

Um die in Abschnitt 3.5.1.1 diskutierte zweite Möglichkeit, die Ionen auf den Detektor zu lenken, zu untersuchen, wurde das oben beschriebene, optimierte Gerät leicht verändert. Der Winkel der Ionenquelle wurde auf  $0^\circ$  gesetzt, die Quelle steht also wieder konzentrisch zu Detektor und Reflektor, dafür wurde in das geerdete Rohr des Detektors ein -in der Simulation unendlich dünner- Draht eingesetzt. Ein Bild dieses Aufbaus und eine Darstellung der Flugbahnen der Ionen ist bereits in Abbildung 3.11 zu sehen.

Mit diesem Aufbau wurden die gleichen Tests durchgeführt, wie mit dem Gerät mit verkippter Quelle. Der Potentialverlauf im Reflektorbereich kann sich bei dieser Modifikation nicht geändert haben, da die Änderungen nur im davon abgetrennten Quellenbereich stattgefunden haben, da sich aber die Flugbahn der Ionen durch den Reflektor ändert, kann sich auch die Energiekorrektur verändern.

Die Flugzeitunterschiede in Abhängigkeit von der Startposition in der Ionen-

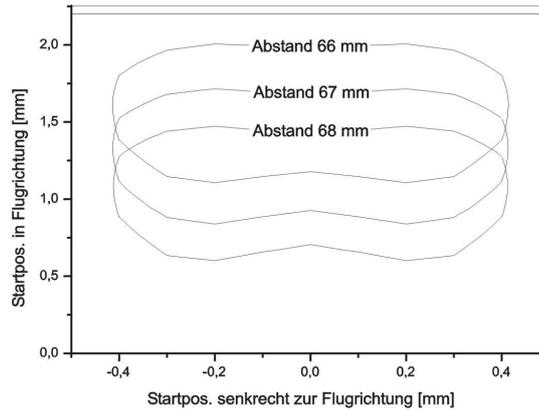


Abbildung 3.18: Bereich mit Flugzeitunterschieden von  $< 1\text{ ns}$  für Reflektor-Gitter-Abstände von 66, 67 und 68 mm bei Verwendung eines Ablenkdrahts mit einer Spannung von 1.5 V.

quelle sind in Abbildung 3.17 dargestellt. Im Vergleich mit Abbildung 3.13 verändert sich die Lage des Minimums nur wenig. Die Abhängigkeit der Flugzeit von der Startposition wird aber bei dieser Konstruktion größer. Dadurch wird der maximale Flugzeitunterschied der betrachteten Ionen größer. Ein weiterer Einfluss, der den Flugzeitunterschied vergrößert, ist die asymmetrische Lage des Minimums im Feld der Testionen. Wie schon oben beobachtet, kann die Lage des Minimums durch Veränderung des Reflektor-Gitter-Abstandes verschoben werden. Bei Vergrößerung des Reflektor-Gitter-Abstandes auf 68 mm, wie in Abbildung 3.18 dargestellt, wird das Minimum auf ca. 1.1 mm Abstand vom Repeller verschoben und damit fast exakt in die Mitte der Ionenquelle. In diesem Fall ist der maximale Flugzeitunterschied am kleinsten und liegt bei etwa 9 ns.

Die Auflösung wird bei der Verwendung des Ablenkdrahtes etwas gesenkt, wie man an den größeren Flugzeitunterschieden erkennt. Das liegt vermutlich daran, dass die Ionen unter einem größeren Winkel abgelenkt werden müssen, da die Ablenkung etwas später erfolgt.

Interessant ist das Verhalten des Geräts bei verschiedenen Startwinkeln der Ionen. Bei dem Aufbau mit gekippter Quelle wurde beobachtet, dass nicht alle Startwinkel die Ionen auf den Detektor treffen lassen. Das Problem ist bei dem Aufbau mit Ablenkdraht nicht mehr vorhanden, wie in Abbildung 3.19 dargestellt ist. Bis zu einer Startenergie von 0.25 eV treffen alle Ionen, die in der Mitte der Ionenquelle mit beliebigem Anfangswinkel starten, auf den Detektor. Dies ist wahrscheinlich der größte Vorteil des Aufbaus mit Ablenkdraht.

Das Verhalten der Flugzeit bei verschiedenen Anfangsenergien ist bei dem Aufbau mit Ablenkdraht exakt analog dem Verhalten des Geräts mit gekippter Ionenquelle. Nur die absoluten Flugzeiten sind bei der Verwendung des Ablenkdrahts größer, was aber am längeren Abstand zwischen Reflektor und Gitter liegt.

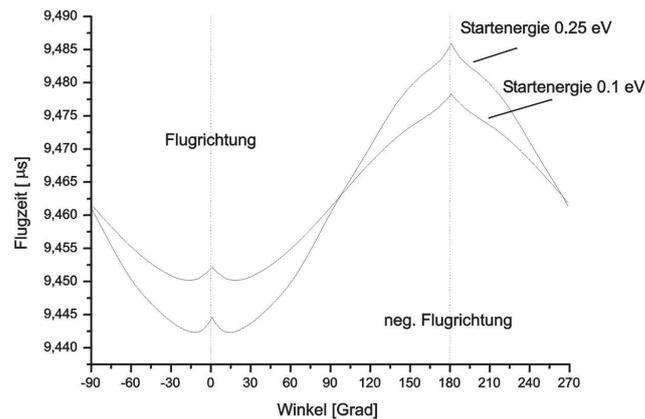


Abbildung 3.19: Abhängigkeit der Flugzeit vom Startwinkel der Ionen bei 0.1 eV und 0.25 eV Anfangsenergie und 900 V Repellerspannung. Ionisationsort: 1.1 mm vom Repeller entfernt in der Mitte der Ionenquelle.

Insgesamt ist das Verhalten des Geräts mit Ablenkdraht sehr ähnlich dem anderen Aufbau. Die Auflösung wird -vermutlich durch den größeren Ablenkwinkel der Ionen- herabgesetzt, dafür wird aber der akzeptierte Winkelbereich stark vergrößert. Besonders in dem Fall des effusiven Einlasses ist die Auflösung sowieso durch den „turn-around“ Effekt begrenzt und nicht durch den Ortsfehler der Ionen. Daher überwiegen in diesem Fall die positiven Auswirkungen des Aufbaus mit Ablenkdraht.

Die mechanische Realisierung des hier simulierten Gerätes ist leider nicht so einfach, da die Aufhängung des Drahtes nur sehr wenig Platz benötigen darf. Ionen, die mehr als 0.5 mm vom Draht entfernt fliegen, werden nicht mehr genügend abgelenkt, um auf den Detektor zu treffen. Die Stirnfläche der Aufhängung sollte also diesen Bereich möglichst nicht überdecken. Außerdem muss die Spannungsversorgung des Drahtes abgeschirmt sein, um ungewollte Ablenkung zu verhindern. Vielleicht könnte das Problem mit einer sehr steifen, dünnen Abschirmung, die auch zugleich als mechanische Aufhängung dient, gelöst werden. Aus diesen hauptsächlich technischen Gründen wurde der Aufbau bisher noch nicht realisiert.

### 3.7 mechanische Realisierung

Die mechanische Planung dieses Gerätes wurde zum größten Teil von Herrn M. Karstens durchgeführt, der auch die technischen Zeichnungen anfertigte. Die Teile wurden zum überwiegenden Teil in der feinmechanischen Werkstatt der Dräger Werke angefertigt, einige wurde jedoch auch in der hauseigenen Werkstatt hergestellt. Eine technische Zeichnung des Gesamtgerätes und ein Foto der noch nicht

zusammengebauten Einzelteile sind in Anhang A.3 und Anhang A.4 zu finden.

#### 3.7.1 Gehäuse

Das Gehäuse des Spektrometers wurde aus nicht, wie ursprünglich geplant, aus einem Standardrohr gefertigt, sondern aus vollem Material gedreht. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass alle Flansche auch direkt aus dem Material gefertigt werden können und nicht als extra Bestandteil von außen angesetzt werden müssen. Alle elektrischen Durchführungen wurden durch den vorderen Flansch geführt, an dem auch die Quelle aufgehängt wurde. Im Quellenbereich wurden an den Seiten zwei Quarzfenster mit 40 mm Durchmesser eingebaut. Auf der Oberseite wurde ein Anschluß zur Vakuummessung eingeplant und an der Unterseite wurde der Flansch für die Turbomolekularpumpe angebracht. Der hintere Teil des Gehäuses wurde außen rund gedreht und teilweise mit einem Feingewinde versehen. Auf das Feingewinde wurde ein Gewinding gesetzt, der als Verstellvorrichtung für den dosenartigen hinteren Abschluß des Gerätes dient. In der verstellbaren Dose befindet sich innen der Reflektorteller, der damit also einen variablen Abstand zum Gitter vor dem Detektor einnehmen kann.

Der vordere Flansch beinhaltet außer der Mikrometerschraube zum Verkippen der Quelle und der zentralen Durchführung für die Einlasskapillare noch 5 elektrische Durchführungen für Detektor und Quelle. Die hintere Abschlußdose beinhaltet eine elektrische Durchführung für den Reflektorteller und eine Mikrometerschraube zum Verkippen des Reflektortellers.

#### 3.7.2 Quelle

Die Quelle wurde auf einer Grundplatte aufgebaut, die zweipunktgelagert und von außen mit einer Mikrometerschraube verstellbar ist. In die Grundplatte wurden vier Kunststoff-Gewindestangen eingeschraubt. Auf diese wurden Keramikhülsen als Abstandhalter aufgesetzt und zwischen die Hülse die drei Elektroden der Quelle positioniert. Diese Art des Aufbaus ist bewährt und gewährt große Flexibilität bei möglichen Änderungen der Quellengeometrie, da nur neue Distanzhülsen gefertigt werden müssen.

#### 3.7.3 Reflektor

Der Reflektor wurde auf einer zweipunktgelagerten, verstellbaren Halterung angebracht, die an der hinteren Wand des Gerätes befestigt wurde. Die Position des Reflektors wurde dadurch verstellbar gemacht, dass der gesamte hintere Bereich des Gerätes etwas gegenüber dem Restgehäuse verschiebbar konstruiert wurde.

### 3.7.4 Detektor

Der Detektor wurde als Einheit gekauft und unverändert eingesetzt. Die Befestigung des Detektors erfolgte über vier Kunststoffgewindestangen direkt auf dem vorderen Flansch, so dass die Position des Detektors durch Verstellen der Quelle nicht geändert wird. Zwischen die ersten Elektroden wurde ein Tantaldraht eingesetzt. Dazu wurde mittig in zwei diagonal gegenüberliegende Keramikhülsen ein kleines Loch gebohrt und der Draht durch diese Löcher gefädelt und leicht gespannt. Der Draht verläuft dadurch diagonal und mittig durch die erste Beschleunigungsstufe. Alle elektrischen Anschlüsse für Elektroden und Draht wurden mit Silberdraht ausgeführt, der in Glasröhrchen verlegt wurde. Das Trenngitter zwischen Detektor und Reflektorbereich wurde in eine Elektrodenplatte eingeklebt, die auf der Grundplatte des Detektors mit vier Metallstangen angebracht wurde (in Zeichnung und Foto nicht gezeigt).

### 3.7.5 optischer Aufbau

Da Tantal eine Elektronenaustrittsarbeit von etwa 4.25 eV [63] besitzt, kann eine Elektronenerzeugung durch einen Ein-Elektronen-Prozess nur bei Wellenlängen kleiner als ca. 292 nm stattfinden. Anfängliche Versuche, eine Elektronenerzeugung durch einen Zwei-Elektronen-Prozess mit einem N<sub>2</sub>-Laser zu bekommen, schlugen fehl, da nicht genug Leistung zur Verfügung gestellt werden konnte. Als Lasersystem wurde daher das im Arbeitskreis vorhandene MOPO (Master-Oscillator-Power-Oscillator) System von Spectra Physics genutzt. Das MOPO System ist ein Nd:YAG gepumptes, in weiten Wellenlängenbereichen durchstimmbares Lasersystem, das nichtlineare Effekte in  $\beta$ -Bariumborat (BBO) Kristallen zum Durchstimmen ausnutzt. (Spectra Physics Quanta Ray, Pro 230 (Nd:YAG), MOPO 790, FDO-900 Frequenzverdopplereinheit). Durch den großen zugänglichen Wellenlängenbereich ist mit diesem Aufbau auch leicht REMPI mit verschiedenen Substanzen zu betreiben.

Der optische Aufbau wird in Abbildung 3.20 beschrieben. Zunächst wurde ein Referenzlaser aufgebaut und so einjustiert, dass der Strahl horizontal durch die Mitte der Ionenquelle verläuft. Anschließend wurden die Prismen P1 und P2 sowie die Linse mittig in den Referenzstrahl eingebaut. Das Prisma P2 und die Linse sind gemeinsam auf einem Verschiebetisch angebracht, so dass der Fokus des Lasers etwas neben den Draht gesetzt werden kann, ohne die Lage des Fokus aus der Mitte der Ionenquelle zu nehmen. Mit einem zweiten Verschiebetisch, der auf dem ersten angebracht ist, kann die Linse und damit die Lage des Fokus senkrecht zur Flugrichtung der Ionen verschoben werden. Nachdem alle optischen Bauteile positioniert waren, wurde der UV-Laserstrahl mit dem Referenzstrahl zur Deckung gebracht. Die Lage des Fokuspunktes wurde bei geöffnetem Gerät grob per Augenmaß in die Mitte der Quelle eingestellt. Die Feinjustage erfolgte schließlich nach Signalintensität und -auflösung. Die Fokussierung des Lasers auf den Draht

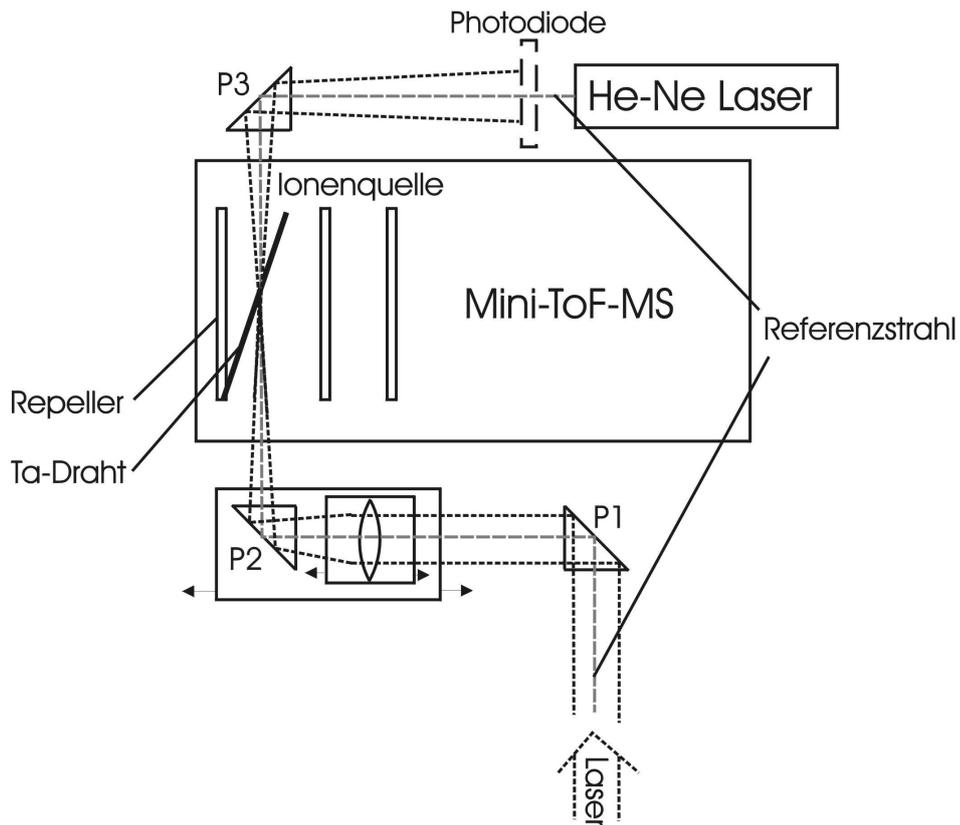


Abbildung 3.20: optischer Aufbau des Mini-ToF-MS

konnte auch sehr gut anhand der Abbildung des Drahtes am Austrittsfenster nachvollzogen werden. Bei maximaler Bildgröße, war der Strahldurchmesser am Ort des Drahtes am kleinsten.

Im Meßbetrieb wurde vor den Referenzlaser eine Photodiode montiert, um zum einem den He-Ne-Laser vor der UV-Laserstrahlung zu schützen, zum anderen um ein Triggersignal für die Messung zu erzeugen.

### 3.7.6 Elektronik

Die Spannungen für Quelle und Reflektor wurden mit einem Mittelspannungs-Netzgerät (Fug MCN 14-1250) und einem im Hause hergestellten Spannungsteiler hergestellt. Die Spannung für den Detektor wurde mit einem Hochspannungs-Netzgerät (Fug HCN 14-3500) hergestellt. Die Signalaufnahme erfolgte mit einem Tektroniks Oszilloskop (TDS 520) mit 500 MHz und 500 MSample/s. Getriggert wurde auf das Ausgangssignal der Photodiode. Das Signal des Detektors wurde in einem Vorverstärker (Stanford Research Systems, Model SR445) verstärkt bevor es zum Oszilloskop gelangte.

### 3.7.7 Probeneinlass

Der Probeneinlass wurde mit einer Stahlkapillare von 200 mm Länge und 0.3 mm Durchmesser realisiert. Die Kapillare wurde mit Swagelok Verbindungen mit einem Ballventil zum Verschließen des Einlasses und mit einem Nadelventil zum Einstellen des Durchflusses versehen. Hinter dem Nadelventil wurde ein Behälter für die flüchtige Probe eingesetzt. Über die Probe kann über einen Anschluß Trägergas geleitet werden. Für die hier durchgeführten Experimente wurde entweder Luft oder Stickstoff als Trägergas bei einem Druck von etwa 1 atm benutzt. Das Nadelventil wurde dabei so eingestellt, dass das Vakuum nicht schlechter als  $10^{-4}$  mbar wurde. Das Vakuum bei geschlossenem Ventil beträgt ca.  $10^{-6}$  mbar.

## 3.8 erste Messungen

Für erste Messungen wurden Benzolspektren mit REMPI bei 258.964 nm aufgenommen. Die Laserleistung bei dieser Wellenlänge betrug etwa 2 mJ pro Puls, die Pulslänge bei diesem Lasersystem ist etwa 10 ns. Die Laserleistung entspricht also etwa  $2 \cdot 10^5$  Watt.

### 3.8.1 REMPI

Für die resonante Multiphotonen-Ionisation wurde der Laser zwischen Draht und Repeller etwa auf halber Strecke fokussiert. Die Laserleistung wurde dadurch eingestellt, dass mit einer Irisblende die äußeren Teile des Laserstrahls ausgeblendet wurden. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass der Laserfokus ebenfalls kleiner werden sollte, wenn nur ein kleiner Bereich in der Mitte der Linse genutzt wird, da Linsenfehler weniger hervortreten. Ein beispielhaftes Spektrum von Benzol ist in Abb. 3.21 zu sehen.

Bei der Optimierung des Gerätes wurde beobachtet, dass die optimalen Spannungseinstellungen nicht exakt bei den vorausgerechneten Werten lagen, sondern ein optimales Verhältnis von Gesamtspannung zu Spannung in der ersten Beschleunigungsstrecke von etwa 0.28 (gegenüber rechnerisch 0.25) gefunden wurde. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Fokus des Lasers nicht genau in der Mitte der Strecke zwischen Draht und Repeller liegt, sondern etwas in Richtung des Repellers verschoben.

Durch Änderung der Gesamtbeschleunigungsspannung wurde die Form des elektrischen Feldes im Reflektorbereich getestet. Da die Startbedingungen der Ionen dabei nicht geändert werden, ist die Halbwertsbreite der Peaks ein Maß dafür, wie gut die Energiekorrektur des Reflektors im Bereich der aktuellen Beschleunigungsspannung ist. Die Unterschiede in der Flugzeit zeigen wie gut die Energiekorrektur über den gesamten Energiebereich ist. In Abbildung 3.22 sind die Flugzeitunterschiede relativ zu Ionen mit einer Beschleunigungsspannung von 900 Volt dargestellt. In der gleichen Abbildung wurden die simulierten Werte

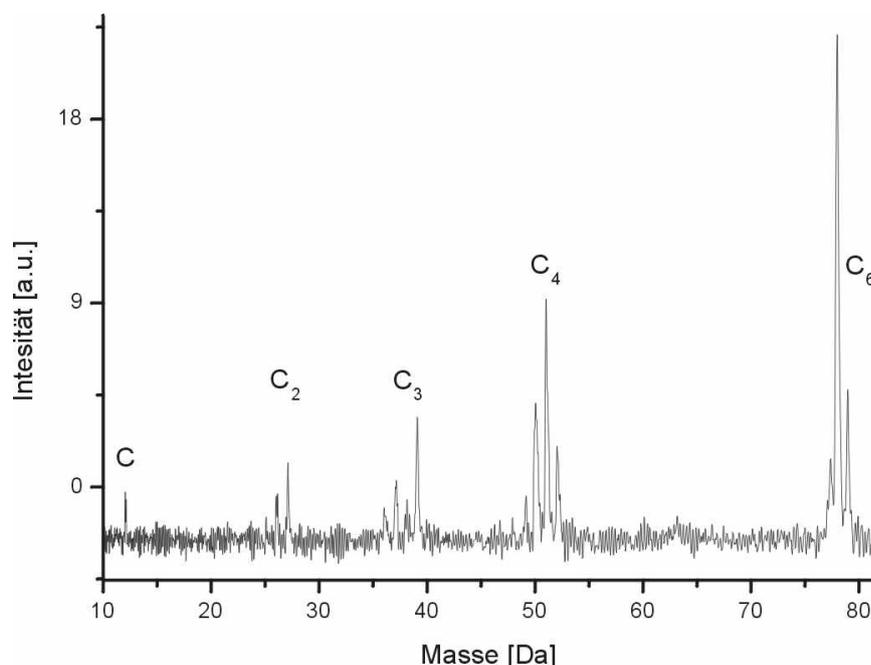


Abbildung 3.21: REMPI Benzolspektrum bei 258.964 nm. Reflektorspannung 1000 Volt, Gesamtbeschleunigungsspannung 850 Volt, Drahtspannung 724 Volt, Spannungsdifferenz in der ersten Beschleunigungsstrecke 126 Volt, Detektorspannung 1520 Volt. Die Auflösung liegt bei ca. 232 mit FWHM Definition.

für Flugzeitunterschiede bis zum Ortsfokus und für Flugzeitunterschiede bis zum Detektor dargestellt. Wie man erkennt, sind in der Simulation die Flugzeitunterschiede zum größten Teil auf die unterschiedliche Flugzeit bis zum Ortsfokus zurückzuführen. Die Flugzeit durch den Reflektor ist annähernd konstant. Wie man sieht ist die experimentelle Kurve sehr viel steiler, als die theoretisch gefundene. Es wird vermutet, dass dieses Verhalten auf ein noch nicht optimal eingestelltes Feld des Reflektors zurückzuführen ist. Dies ist gut möglich, wenn die Auflösung durch die „turn-around“ Zeit begrenzt wird, da in diesem Fall die Gesamtauflösung des Gerätes nur wenig auf die genaue Form des elektrischen Feldes im Reflektor reagiert. Eine Optimierung der Reflektoreinstellung durch Variation der Beschleunigungsspannung wurde durchgeführt. Dazu wurde der Reflektorabstand, gemessen in Umdrehungen des Einstellringes, verändert und zu jeder Einstellung die Flugzeit der Ionen bei Beschleunigungsspannungen von 1000 und 800 Volt gemessen. Es wurde festgestellt, dass die Flugzeitunterschiede mit geringerem Reflektor-Detektor Abstand abnehmen und am Anschlag minimal sind. Die gewählten Spannungen beschleunigen die Ionen vom Referenzpunkt in der Mitte zwischen Draht und Repeller mit Energien von ca. 950 bzw. 760 eV. In der Simu-

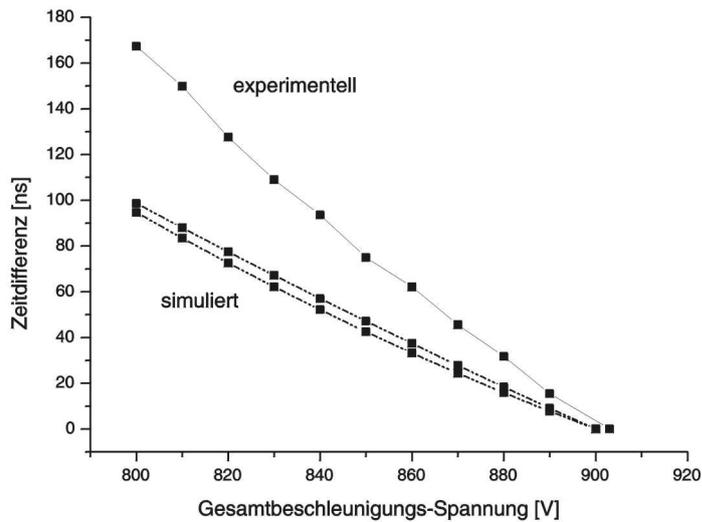


Abbildung 3.22: Experimentelle und simulierte Flugzeitunterschiede für Benzolionen (78 Da) bei Variation der Beschleunigungsspannung vor der Abstandsoptimierung. Die gestrichelten Kurven zeigen simulierte Werte, die obere Kurve zeigt Flugzeitunterschiede (zeitliche Signalbreite) am Detektor, die untere am Ortsfokuspunkt.

lation beträgt der Flugzeitunterschied für diese Einstellungen etwa 180 ns sowohl zum Ortsfokus als auch bis zum Detektor. Die analytische Berechnung der Flugzeitunterschiede mit Gleichung 2.13, 2.22 und 2.24 bis zum Ortsfokuspunkt ergibt ebenfalls knapp 180 ns Flugzeitdifferenz. Außerdem sind die absoluten Flugzeiten der Ionen bei optimaler Einstellung sehr nahe an den berechneten Flugzeiten in der Simulation. Die Messwerte sind in Abbildung 3.23 zu sehen. Hier sind auch die simulierten Werte eingezeichnet. Die Eigenschaften des simulierten Gerätes sind bei ca. 11 Umdrehungen erreicht.

Bei der neuen Reflektorposition wurde der Einfluss des Verkippungswinkels des Reflektors untersucht. Es ergab sich hierbei kein signifikanter Einfluss des Winkels auf die Flugzeit. Die Auflösung des Gerätes wurde durch das Verändern des Winkels ebenfalls nicht signifikant verändert (Daten nicht gezeigt). Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass auch der Einfallswinkel der Ionen auf den Detektor nicht der die Auflösung begrenzende Einfluss ist. Wie nach diesen Ergebnissen nicht anders zu erwarten, hat auch der Winkel der Quelle zum Reflektorbereich keinen signifikanten Einfluss auf das Verhalten des Gerätes.

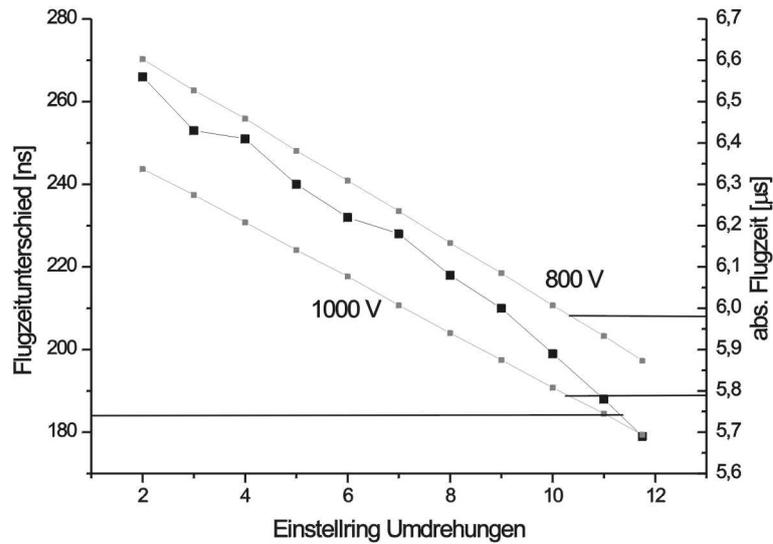


Abbildung 3.23: Flugzeitunterschiede und absolute Flugzeiten für Benzolionen (78 Da), die mit 1000 Volt bzw. 800 Volt Spannung am Repeller beschleunigt werden. Die waagerechten Striche bezeichnen die in der Simulation gefundenen Werte.

### 3.8.2 Laser EI

Für die Laser-Elektronen-Ionisation mit dem Mini-ToF-MS wurde der Laserstrahl einfach auf den Draht gelenkt und etwas defokussiert, um die thermische Belastung des Drahtes klein zu halten. Als Laser wurde bei ersten Versuchen ein frequenzverdreifender Nd:YAG Laser benutzt, der eine Wellenlänge von 355 nm liefert. Unter diesen Bedingungen ist das Herauslösen eines Elektrons aus dem Draht ein Zweiphotonenprozess, weswegen mit relativ hohen Photonenströmen gearbeitet werden musste. Unter diesen Bedingungen ist das größte beobachtete Signal immer auf abgetragenes Metall aus dem Draht zurückzuführen. Es konnten immer Ta (181 Da), TaO (197 Da) und TaO<sub>2</sub> (213 Da) beobachtet werden. Nach dem Erscheinungsbild der Spektren sind die Ionisierungsbedingungen sehr „hart“ bei dem derzeitigen Aufbau. Es konnten keine Molekülpeaks von Ethanol, Benzol oder Toluol nachgewiesen werden. In Abbildung 3.24 ist das LEI-Spektrum von Aceton zu sehen, bei dem der Molekülpeak auftritt. Die Auflösung bei LEI Betrieb mit 355 nm ist deutlich schlechter als bei REMPI, worauf dies zurückzuführen ist, ist nicht ganz klar.

Nach Simulation liegen die Flugzeiten der Elektronen bis zum Repeller, auf den sie auftreffen, bei etwa einer halben Nanosekunde. Das Volumen das mit Elektro-

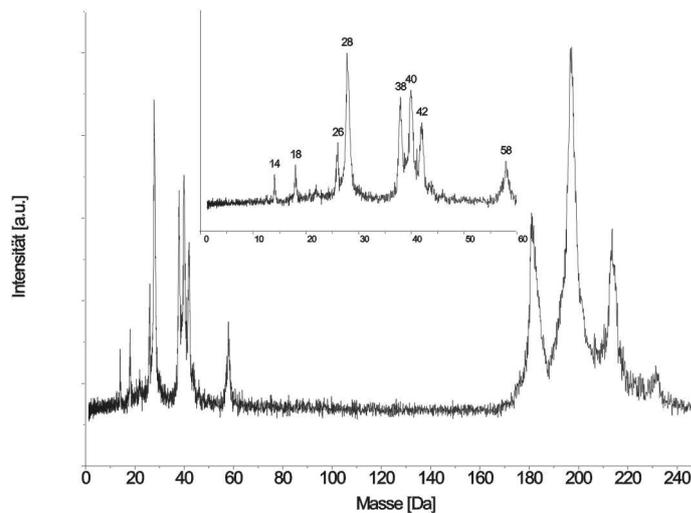


Abbildung 3.24: Massenspektrum von Aceton im LEI Betrieb mit 355 nm (evtl. verunreinigt mit Benzol, Toluol, Ethanol). Im oberen Bereich finden sich Ta, TaO und TaO<sub>2</sub>.

nen gefüllt wird, hat am Repeller einen Durchmesser von etwa einem Millimeter und ist 1.3 Millimeter lang. Mit diesen Vorgaben liefert die Simulation nicht die beobachtete Halbwertsbreite des Acetonpeaks von etwa 100 ns. Es wird vermutet, dass der Prozess des Elektronen-Herauslösens unter diesen Bedingungen einen thermischen Anteil hat und daher sehr viel länger dauert als angenommen.

Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass die Auflösung der LEI Spektren besser ist, wenn die Elektronenerzeugung mit einer Wellenlänge von 266 nm geschieht. Ein Spektrum von Benzol ist in Abbildung 3.25 zu finden. Hier betragen die Peakbreiten auf halber Höhe etwa 25 ns, was einer Auflösung von ca. 120 bei Masse 78 entspricht. Die kleinen Unterschiede in der Peakbreite, die zu der, verglichen mit REMPI Spektren, schlechteren Auflösung führen, können wahrscheinlich zum größten Teil auf das größere Ionisationsvolumen zurückgeführt werden. Es wird vermutet, dass auch bei dieser Betriebsart eine starke Verbesserung der Auflösung bei Benutzung eines Molekularstrahls eintritt.

### 3.9 Verbesserungen

Das hier vorgestellte miniaturisierte Time-of-Flight Massenspektrometer verhält sich bereits in vielen Aspekten befriedigend. So werden im REMPI Betrieb etwa die Auflösungen erreicht, die auch mit Hilfe der Simulation vorausgesagt wurden.

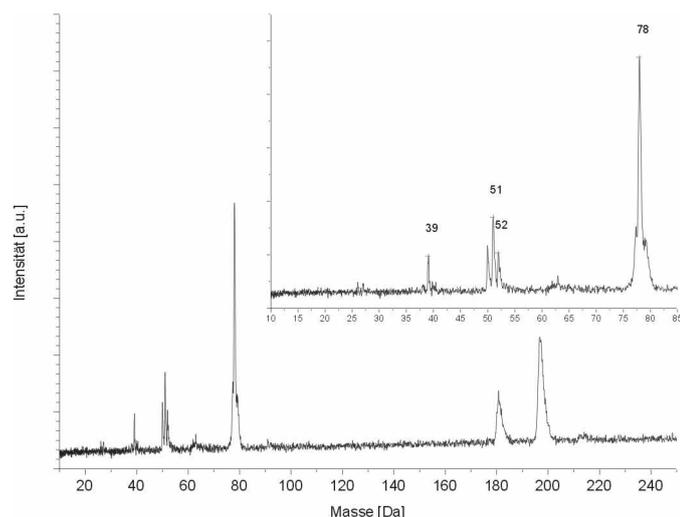


Abbildung 3.25: Massenspektrum von Benzol im LEI Betrieb mit 266 nm. Im oberen Bereich finden sich Ta, und TaO. Die Auflösung bei 78 Da beträgt ca. 120.

Im Falle des Benzols ließen sich auch relativ kleine Mengen Analyt sicher nachweisen. Probleme liegen besonders in der langen Zeit, die zwischen zwei Proben gewartet werden muss, bis das vorherige Signal abgeklungen ist. Dies ist ein Problem des effusiven Einlasses. Die Auflösung und damit verbunden die Sensitivität des Systems sollte durch Veränderung des Einlasssystem ebenfalls noch verbessert werden können.

Weitere Unzulänglichkeiten liegen im verwendeten Lasersystem, das in keiner Weise als miniaturisiert bezeichnet werden kann. Für später Anwendungen im mobilen Einsatz muss hier eine kleinere Lichtquelle gefunden werden, die festfrequent oder –bevorzugt– durchstimmbare ist.

### 3.9.1 Einlasssystem

Insbesondere am Einlasssystem scheinen viele sinnvolle und effektive Verbesserungen möglich. Das Problem mit den langen Karenzzeiten zwischen den Messungen liegt sicher an dem relativ großen Totvolumen im Einlasssystem. Da das Absperrventil am Ende der Kapillare angebracht ist, muss die gesamte Kapillare und der Raum zwischen Absperrventil und Nadelventil erst vom Analyten evakuiert werden, bevor das Signal ganz verschwindet. Ein erster Lösungsansatz war, die Länge der Kapillare zu verringern um dadurch das Totvolumen etwas zu verkleinern. Ein Problem bei diesem Vorgehen ist, dass die Drosselwirkung der Kapillare verringert wird und damit die Einstellung eines angemessenen Gasflusses schwieriger wird, da sich das Nadelventil nicht so fein einstellen lässt. Außerdem liegt das

größte Analytreservoir vermutlich in dem Raum zwischen den beiden Ventilen.

Eine bessere Lösung wäre der Umbau des Einlasssystem, so dass ein Molekularstrahl erzeugt wird. Ein Problem ergibt sich dabei in den kleinen Ausmaßen des Gerätes. Ein übliches gepulstes Ventil müßte außen an das Gerät angesetzt werden. Da die Frontplatte des Gerätes aber schon für sehr viele Durchführungen genutzt wird, sind größere Platzprobleme vorauszusehen. Auch ein seitliches Aufsetzen des Einlasssystem ist nicht ohne größere technische Veränderung des Gerätes durchzuführen, da hier die Fenster für den Laser bzw. der Vakuummesskopf angebracht sind. Da auch die obere Bohrung nicht zentral über der Quelle angebracht ist, wird wohl das Gehäuse zum Umrüsten des Einlasssystem stark verändert werden müssen.

Die Umstellung des Einlasssystem wird also eine Menge technischer Probleme aufwerfen, wird aber mit größter Wahrscheinlichkeit zu einer starken Auflösungsverbesserung durch Eliminierung der „turn-around time“ führen. Dadurch sollte sich auch eine Verbesserung der Sensitivität ergeben, da der Ionenfluss zur Auftreffzeit durch die Konzentration auf eine kleinere Zeitspanne größer wird. Außerdem sollte sich durch gepulsten Einlass und Vermeidung von Totvolumina das Problem der Karenzzeiten stark verbessern lassen. Der gepulste Einlass hat weiterhin den Vorteil dass damit die benötigte Probenmenge verringert wird, da nur zu der eigentlichen Messung Probe eingelassen wird. Dadurch wird natürlich auch das Vakuumssystem entlastet und das erreichte Endvakuum wird sicher verbessert.

#### 3.9.2 Ionisierung

Das Verhalten des Gerätes bei REMPI scheint bereits jetzt nicht verbesserungsbedürftig. Das Verhalten bei LEI ist allerdings noch nicht ganz verstanden. Die Auflösung entspricht in etwa der erwarteten Auflösung, wenn die Ionisierung auf der gesamten Strecke zwischen Draht und Repeller stattfindet. Wenn das der Fall ist, sollten die Elektronen, die in der Nähe des Repellers erst Ionisieren, aber etwa 100 eV Energie besitzen und insbesondere auch das Trägergas  $N_2$  ionisieren. Das ist aber in den Spektren nicht immer zu sehen. Diese Ungereimtheit konnte noch nicht endgültig geklärt werden.

Wenn die Ionisation wirklich auf der gesamten Strecke zwischen Draht und Repeller stattfindet, kann das Verhalten des Gerätes möglicherweise verbessert werden, wenn der Abstand weiter verkleinert wird. Dazu kann der Draht in seiner Position verändert werden oder der Repeller näher an den Rest der Ionenquelle geschoben werden. Da man allerdings auch mit REMPI in der Referenzebene ionisieren möchte, gibt es nur einen Spielraum von ca. einem Millimeter, um den der Repeller verschoben werden kann, bzw. etwa 0.5 mm um die der Draht näher an den Repeller geschoben werden kann. Die Änderung ist mit relativ wenig Aufwand zu realisieren, ob eine große Verbesserung dadurch erzielt werden kann, ist ungewiss.

### 3.9.3 Laser

Es sind Überlegungen in Gange, den verwendeten Laser durch ein anderes Lasersystem auszutauschen.

### 3.9.4 Reflektor

Es scheint in der aktuellen Situation keinen Sinn zu ergeben, den Reflektorbereich des Gerätes zu verändern, da die Auflösung nicht durch das Verhalten des Reflektors begrenzt wird, sondern wahrscheinlich durch die Anfangsbedingungen der Ionen. Bevor nicht diese Probleme behoben sind, ist eine Änderung des Reflektoraufbaus nicht angebracht. Natürlich könnten in der Simulation andere Reflektorgeometrien ausprobiert werden, um eventuell noch bessere Feldgeometrien zu erzeugen.

Durch den Aufbau des hier realisierten Geräts könnten neue Reflektorteller sehr einfach eingesetzt werden. Wenn also die Auflösung durch Veränderung an anderer Stelle durch die Energiekorrektur des Reflektors begrenzt werden sollte, so könnten neu konstruierte Reflektoren leicht ausprobiert werden. Es wird allerdings bezweifelt, dass sich die Notwendigkeit dazu ergeben wird.

## 4 Aufbau eines MALDI-ToF-MS

Als zweites Aufbauprojekt dieser Arbeit sollte ein leicht modifiziertes MALDI Flugzeitmassenspektrometer gebaut werden, das die Option besitzt, entlang der Flugbahn der Ionen einen Laserstrahl einzukoppeln. Mit diesem Gerät sollen Photofragmentierungen der bei dem MALDI Prozess gebildeten Ionen untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit sind jedoch keine solchen Experimente durchgeführt worden.

Die Quelle dieses Gerätes war bereits vorhanden. Es handelt sich dabei um eine kommerziell erhältliche Bruker Scout Quelle (Baujahr etwa 1995). Der Massenanalysator ist der Nachbau eines Gerätes, das bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden ist [64], wobei der Reflektor neu optimiert werden musste. Die einzelnen Teile des Apparats werden im folgenden genauer beschrieben.

### 4.1 Scout Ionenquelle

Bei der Scout Ionenquelle handelt es sich um eine einstufige Ionenquelle mit einer besonders geformten Extraktor-Elektrode. Hinter der geerdeten Extraktor-Elektrode befindet sich eine elektrostatische Linse und ein Satz Deflektor-Elektroden, die zum exakten Positionieren des Ionenstrahls nutzen lassen oder zum Ausblenden von bestimmten Ionen, wie zum Beispiel Matrixsignalen. Die Ionenquelle besitzt einen Probenträger mit 26 Probenpositionen. Der Probenträger wird von einem motorgetriebenen Stempel aus einer Schleuse mit Vorvakuum durch ein Plattenventil in das Hauptvakuum gebracht und dort in einem Ring abgesetzt, der mit zwei Motoren verschiebbar gelagert ist, so dass alle Probenpositionen an den Ort des Laserfokus gefahren werden können.

Der verwendete  $N_2$  Laser wird über ein Fenster in das Gerät eingekoppelt und durch zwei Spiegel fast senkrecht auf die Probe gelenkt. Über den gleichen Lichtweg wird die Probe auch mit Licht aus einer Halogenlampe beleuchtet. Über einen ganz analogen Lichtweg nur um  $90^\circ$  versetzt, wird die beschossene Probenposition mit einer Video-Kamera beobachtet. Das Bild der Video-Kamera wird auf einem Bildschirm dargestellt. Der Laserstrahl kann über einen Graufilter in der Intensität abgeschwächt werden. Durch Änderung der Linsenabstände in einem Teleskop kann die Fokussierung des Lasers beeinflusst werden. Die Größe des Laserstrahls wird durch Verwendung einer Irisblende beschränkt. Abschwächung und

Fokussierung können mit Hilfe der mitgelieferten Software „XACQ“ eingestellt werden, da die entsprechenden Elemente motorbetrieben sind.

Die Steuerung des Massenspektrometers erfolgt über einen OS/9 Steuercomputer, der auch für die Datenaufnahme zuständig ist. Die Benutzerschnittstelle und die Datenverarbeitung wird auf einem Sun Rechner realisiert. Auf diesem Rechner laufen die Programme „XACQ“ zur Kommunikation mit dem Steuercomputer und „XMASS“ zur Auswertung und Bearbeitung der Spektren. Die Steuerbefehle zum Bewegen der Motoren oder zum Aufnehmen eines Spektrums werden an den Steuercomputer weitergegeben und von diesem an die Steuerelektronik des Massenspektrometers weitergereicht. Der Steuercomputer ist mit zwei 125 MHz Digitalisierkarten ausgestattet, die entweder dazu genutzt werden können, zwei Detektoren mit einer Zeitauflösung von 8 ns auszulesen, oder einen Detektor mit einer Zeitauflösung von vier ns. Die aufgenommenen Daten werden im Aufnahmetakt von höchstens 4 Hz an den Sunrechner weitergereicht und dort dargestellt, aufsummiert, abgespeichert und bearbeitet.

Auch die Steuerung der Hochspannungsversorgungen per Software ist vorgesehen, wird aber in dem derzeitigen Aufbau nicht genutzt. Die Hochspannung für Repeller, Linsen, Reflektor und Detektor wird manuell eingestellt.

Der Probenträger dient gleichzeitig als Repellerelektrode. Der elektrische Kontakt zur Spannungsversorgung wird über den Halterungsring hergestellt. Nach Herstellerangaben kann eine Spannung von bis zu 30 kV an die Repellerelektrode angelegt werden.

Die Dimensionen der Ionenquelle wurden so gut wie möglich vermessen und aus den gewonnenen Daten eine Simulation erstellt. Eine Ansicht der wichtigen elektrostatischen Bauteile der Quelle ist in Abbildung 4.1 zu finden.

## 4.2 Reflektor

Der in diesem Gerät verwendete Reflektor hat einen gitterlosen Aufbau. Der Verzicht auf Gitter bewirkt eine bessere Transmission der Ionen durch das Instrument, hat aber zur Folge, dass inhomogene Felder entstehen, die eine Defokussierung der Ionen senkrecht zur Flugrichtung hervorrufen. Diese Defokussierung muss durch fokussierende Elemente in der Quelle wieder ausgeglichen werden. Der Reflektor besteht aus 17 ringförmigen Elektroden, die drei unterschiedliche Feldbereiche definieren. Die ersten vier Elektroden werden zur Erzeugung zweier relativ starker (unterschiedlicher) Bremsfelder genutzt, während die hinteren 13 Elektroden ein relativ schwaches, lineares Reflektorfeld definieren. Dieses Reflektordesign wurde bereits 1987 von Grottemeyer et al. [64] in einem Massenspektrometer mit REMPI Quelle und Molekularstrahl benutzt. Die Geometrie des Reflektors wurde unverändert übernommen, die optimalen Spannungswerte mussten allerdings wegen der anderen Charakteristik der Quelle und der viel höheren Beschleunigungsspannungen neu berechnet werden. Die genaue Geometrie ist in

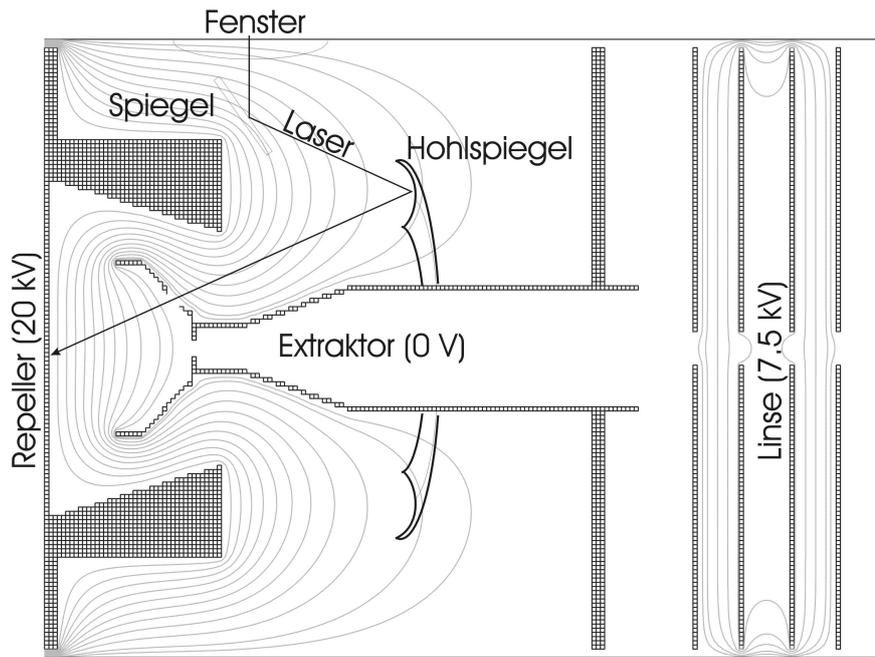


Abbildung 4.1: SimIon Darstellung der Scout Ionenquelle mit angedeutetem Strahlengang des Lasers.

der entsprechenden Geometriedatei in Anhang B.1 zu finden. Eine von SimIon generierte Abbildung mit Äquipotentiallinien ist in Abbildung 4.2 zu sehen.

Wie man erkennt, sind die Felder stark inhomogen, was eine analytische Behandlung der Bewegung der Ionen in diesen Feldern stark erschwert. Da auch die Abbildungseigenschaft senkrecht zur Flugrichtung eine entscheidende Rolle spielt, kann das Verhalten des Reflektors nur sinnvoll in einer Simulation des Gesamtgerätes modelliert werden.

Das Ziel der Simulation war, optimale Spannungseinstellungen für die einzelnen Elektroden des Reflektors zu finden. Da das Einstellen der Potentiale an den Elektroden im fertigen Gerät mit Hilfe von Spannungsteilern bei den geplanten Hochspannungswerten von bis zu 30 kV nicht mehr möglich ist, oder mit sehr großem Aufwand verbunden, müssen die Spannungen durch einen fest eingebauten Spannungsteiler direkt im Hochvakuum definiert werden. Die Optimierung der Spannungen während des Betriebes ist also nicht möglich und muss durch die Optimierung durch Simulation ersetzt werden.

### 4.3 Ergebnisse der Simulation

Die optimalen Spannungsverhältnisse im Reflektor wurden für eine Beschleunigungsspannung von 20 kV und eine Reflektorspannung von 22 kV gefunden. Dabei

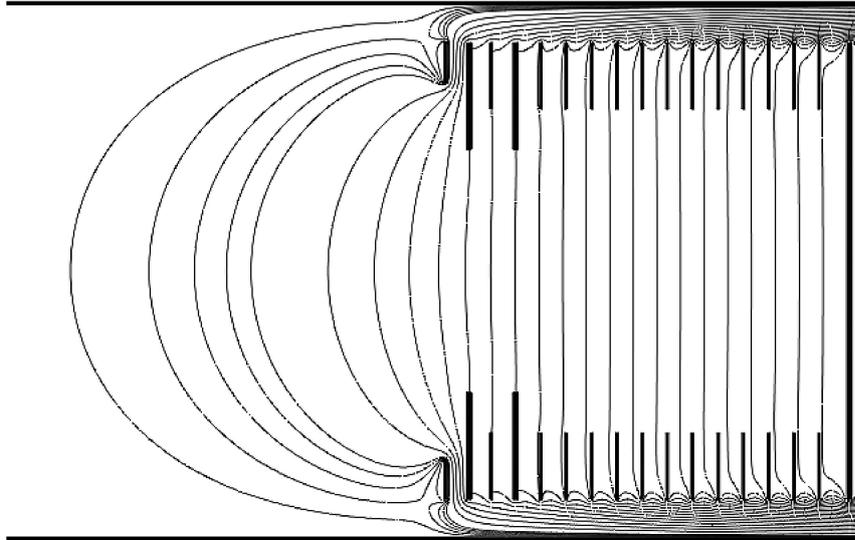


Abbildung 4.2: SimIon Darstellung des gitterlosen Reflektors mit Äquipotentiallinien. Von 200 bis 1000 Volt sind die Potentiale mit einem Abstand von 200 Volt eingetragen, danach mit einem Abstand von 1 kV.

wurden die Spannungen an zweiter und vierter Reflektorelektrode variiert. Alle Spannungswerte für die anderen Elektroden wurden zwischen den festgelegten Werten linear interpoliert.

Zur Optimierung der Spannungswerte wurde die Skriptsprache von SIMION genutzt, um automatisch Spannungswerte in einem vorgegebenen Intervall an den Reflektorelektroden und an die Linse in der Scout Quelle anzulegen. Die größte Flugzeitdifferenz der Ionen, die am Detektor ankommen, wurde zusammen mit den Spannungswerten in eine Datei geschrieben. Diese Datei wurde anschließend mit Hilfe von Origin ausgewertet. Das verwendete Programm ist im Anhang B.2 zu finden.

Zunächst wurde das Verhalten für Ionen mit ausschließlich Energiefehler simuliert. Die Testionen wurden in der Mitte der Ionenquelle mit Energien von 0 bis 20 eV erzeugt. Das Verhalten des Reflektors reagiert nicht sehr stark auf die Spannungseinstellungen, wie man in Abbildung 4.3 sehen kann. Die optimalen Spannungswerte liegen im Bereich von etwa 14 kV bis 15 kV für die vierte Elektrode. Die Spannung an der zweiten Elektrode scheint keinen großen Einfluß auf die Eigenschaften des Reflektors zu haben. Der Wert der Linsenspannung in der Quelle wurde ebenfalls variiert, führte aber zu keinen signifikanten Änderungen der Flugzeit (Daten nicht gezeigt).

In einem zweiten Lauf wurde das Verhalten mit Testionen aus einem ausgedehnten Volumen untersucht. Das verwendete Ionisationsvolumen hat eine Ausdehnung von  $50 \mu\text{m}$  in Flugrichtung und  $200 \mu\text{m}$  senkrecht dazu. Die berechneten

Elektrode	Spannung [kV]
1	0.00
2	4.63
3	8.80
4	12.97
5	13.66
6	14.36
7	15.05
8	15.75
9	16.44
10	17.14
11	17.83
12	18.53
13	19.22
14	19.92
15	20.61
16	21.31
17	22.00

Tabelle 4.1: Optimale Spannungswerte für den gitterlosen Reflektor bei einer Beschleunigungsspannung von 22 kV.

Flugzeitunterschiede sind in Abbildung 4.4 zu finden. Wie man sieht liegen die optimalen Werte für die Spannung an der vierten Elektrode hierbei deutlich tiefer als für die Energieoptimierung. Bei ca. 12.85 kV ist die minimale Flugzeitdifferenz erreicht. Die Flugzeitdifferenz ist auch von der Einstellung der Linse abhängig. Hier sind bei etwa 6.8 kV die optimalen Werte erreicht.

Schließlich wurde das Verhalten mit Testionen untersucht, die sowohl Orts- als auch Energiefehler haben. Es wurden dazu zwei Sätze Ionen in dem gleichen Ionisationsvolumen wie oben erzeugt. Der erste Satz besaß keine Anfangsenergie, der zweite Satz wurde mit 5eV Startenergie versehen. Das entspricht bei Ionen der Masse 1000 Da einer Anfangsgeschwindigkeit von etwa 1000 m/s, einem Wert, der etwas höher als die erwartete Maximalgeschwindigkeit ist [65]. Die Ergebnisse dieser Rechnung sind in Abbildung 4.5 gezeigt. Die optimalen Spannung verschieben sich nicht stark durch die zusätzliche Energieverteilung. Da die Energiekorrektur ein sehr flaches Minimum hat (siehe Abb. 4.3) wird die Lage des Minimums fast ausschließlich durch die Ortsfehler bestimmt. Der Flugzeitfehler nimmt dabei natürlich zu.

Die Rechnung wurde einmal für Ionen der Masse 10 kDa mit der gleichen Startgeschwindigkeit, also einer Anfangsenergie von 50 eV, wiederholt. Die Lage des Minimums ist dabei immer noch im Bereich von 13 kV an der 4. Elektrode, wobei die Spannung an der 2. Elektrode keinen großen Einfluß auf den Flugzeitfehler

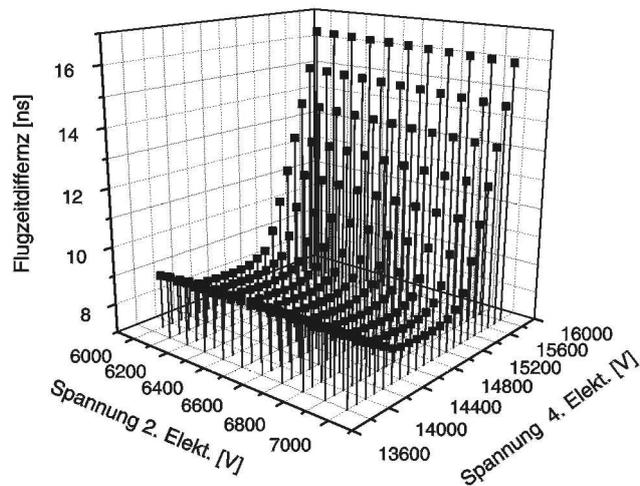


Abbildung 4.3: Ergebnisse der Optimierung der Spannungen an Elektrode 2 und 4 des Reflektors mit Ionen der Masse 1000 Da mit Startenergien von 0 bis 20 eV. Die Startenergien sind deutlich größer als in der Realität erwartet.

hat.

Nach den Ergebnissen vorangegangenen Simulationen wurden die optimalen Werte für die 4. Elektrode zu ca. 12950 V bestimmt. Die Spannungswerte an der 2. Elektrode sind innerhalb des hier simulierten Bereichs nicht sehr entscheidend für die Flugzeitfehler. Es wurden Widerstandswerte für den Spannungsteiler berechnet, die zu den in Tabelle 4.1 aufgeführten Spannungen führen. Die Widerstände und die an den Widerständen auftretenden Verlustleistungen sind in Anhang B.3 aufgeführt.

Nach erfolgter Optimierung wurden die Eigenschaften des simulierten Gerätes untersucht. Die Abhängigkeit der Flugzeit von der Anfangsenergie der Ionen wurde ja bereits implizit bei der Optimierung untersucht. Die entsprechende Kurve hat einen sehr flachen Verlauf und ist in Abbildung 4.6 zu sehen. Wenn man eine Geschwindigkeitsverteilung von bis zu 1000 m/s annimmt, erhält man mit dieser Verteilung eine Auflösung von ca. 2600.

Die Abhängigkeit der Flugzeit von der Position des Startortes ist ebenfalls eine recht flache Funktion, wie in Abbildung 4.7 dargestellt ist. Besonders da der Ionisierungsort bei MALDI gut definiert ist, sollte diese Verteilung keinen beherrschenden Einfluß auf die Auflösung haben. Die Ionisation findet entweder an

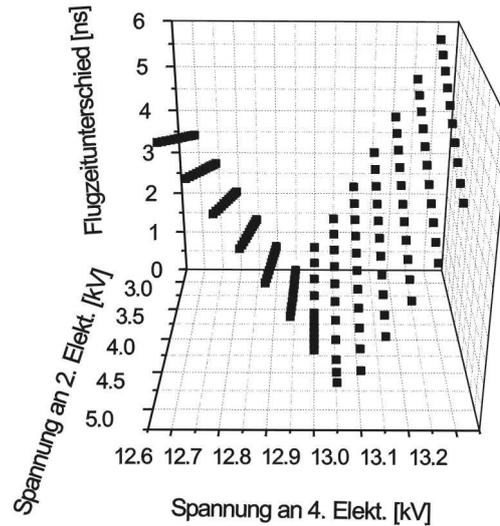


Abbildung 4.4: Ergebnisse der Optimierung der Spannungen an Elektrode 2 und 4 des Reflektors mit Ionen der Masse 1000 Da mit Startenergien von 0 eV und einer räumlichen Ausdehnung von  $50 \times 200 \times 200 \mu\text{m}$ . Die Linsenspannung beträgt 6.8 kV.

der Oberfläche oder unmittelbar darüber statt. Nach Untersuchungen des Ionisationsprozesses [66] liegt das Maximum der Ionisation bei etwa 6 ns nach dem Ionisationspuls. Bei einer Geschwindigkeit der Neutralen von bis zu 1000 m/s liegt der Ionisationsort bei etwa  $10 \mu\text{m}$ . Der Ionisationsort ist also in Richtung der ionenoptischen Achse bis auf etwa  $10 \mu\text{m}$  definiert. Die zu erwartende Zeitdifferenz dadurch liegt bei unter 1 ns. Eine entscheidendere Rolle könnte in diesem Fall die Dicke der Probe spielen.

Wichtiger als die Abhängigkeit der Flugzeit vom Ionisationsort in Flugrichtung ist die Änderung der Flugzeit bei Abweichungen senkrecht zur Flugrichtung, da der verwendete Laser eine Spotgröße von ca.  $150 \mu\text{m}$  hat. Es gibt also eine sehr viel breitere Ortsverteilung senkrecht zur Flugrichtung. Wie man in Abbildung 4.8 sieht, ist die Abhängigkeit nicht sehr stark. Da die Ionen eine Kurve zum Detektor fliegen, benötigen die Ionen in der „Aussenkurve“, also bei negativen Werten in der Abbildung, längere Zeiten zum Detektor.

Die Flugzeit schwankt um etwa eine Nanosekunde für benachbarte Werte. Dies ist ein Artefakt der Simulation und wird durch die ungenügende Genauigkeit der Berechnung der elektrischen Felder erzeugt. Das elektrische Feld des Reflektors wurde nur bis zu einem Abstand von ca. 22 cm vor der geerdeten Elektrode simuliert. In diesem Abstand findet man noch ein Potential von ca. 60 Volt (0.3% der Gesamtspannung), das beim Austritt aus dem Array abgeschnitten wird. Hieraus ergeben sich die plötzlichen Flugzeitunterschiede. Dieser Effekt könnte vermieden werden, wenn das elektrische Feld des Reflektors in einem größeren Volumen

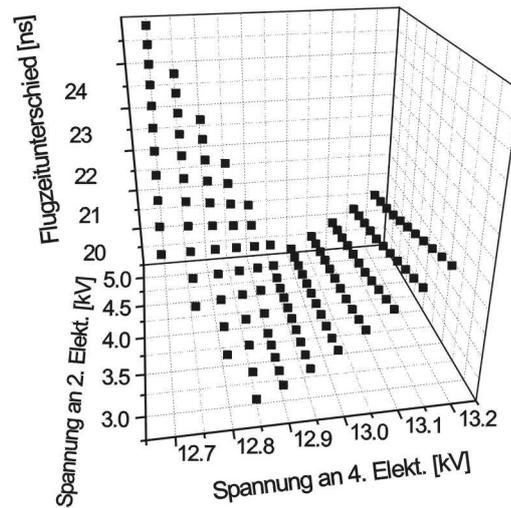


Abbildung 4.5: Ergebnisse der Optimierung der Spannungen an Elektrode 2 und 4 des Reflektors mit Ionen der Masse 1000 Da mit Startenergien von 0 bis 5 eV und einer räumlichen Ausdehnung von  $50 \times 200 \times 200 \mu\text{m}$ . Die Linsenspannung beträgt 6.8 kV.

berechnet würde. Die entsprechende Simulation wäre allerdings sehr aufwendig durch den dadurch entstehenden großen Speicherbedarf. Es wurde daher von einer Ausdehnung des Reflektorarrays abgesehen. Bei einer angenommenen Ausdehnung des Laserspots von  $150 \mu\text{m}$  erhält man auch hier eine Flugzeitdifferenz von unter 5 ns. Vermutlich ist dieser Fehler nicht der die Auflösung begrenzende Faktor.

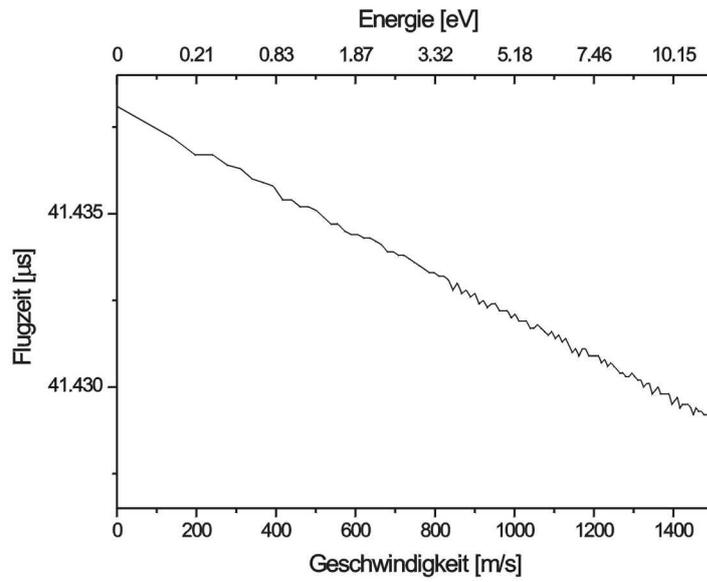


Abbildung 4.6: Abhängigkeit der Flugzeit von der Anfangsenergie der Ionen. Beschleunigungsspannung 20 kV, Masse 1000 Da

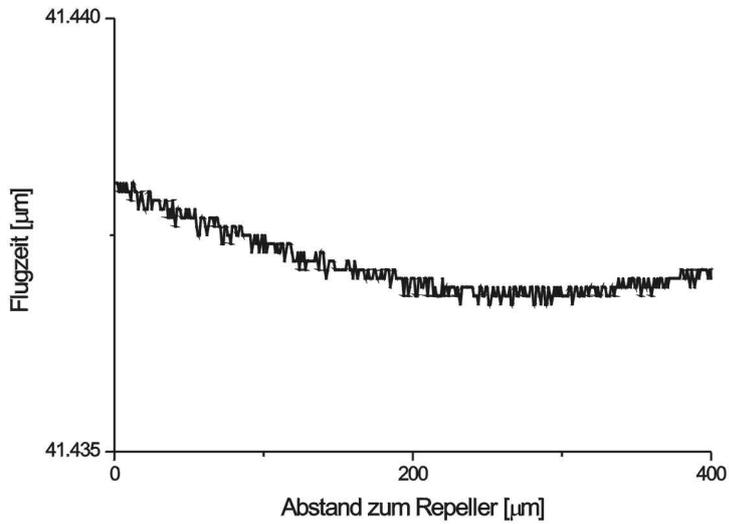


Abbildung 4.7: Abhängigkeit der Flugzeit vom Startort der Ionen. Beschleunigungsspannung 20 kV, Masse 1000 Da

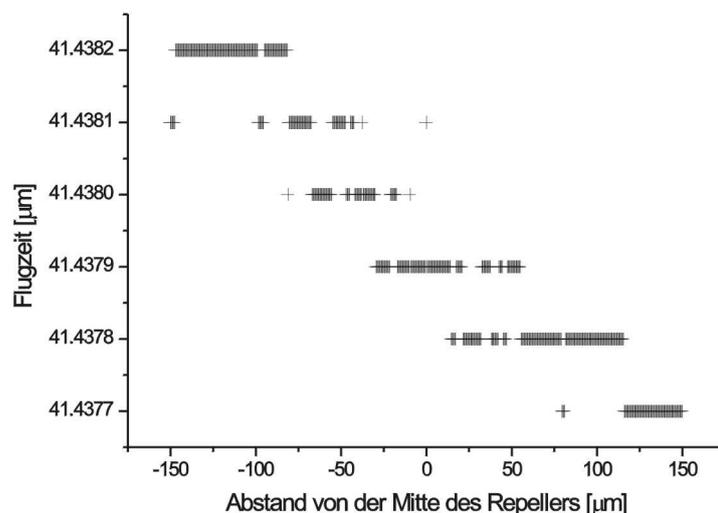


Abbildung 4.8: Abhängigkeit der Flugzeit vom Startort der Ionen senkrecht zur Flugrichtung. Beschleunigungsspannung 20 kV, Masse 1000 Da

## 4.4 mechanische Realisierung

Alle technischen Zeichnungen und mechanischen Planungen für dieses Gerät wurden von Herrn Michael Karstens durchgeführt. Die Einzelteile wurden in der haus-eigenen Werkstatt gefertigt. Abbildung 4.9 zeigt den schematischen Aufbau des Instruments. Die vorhandene Scout Quelle wurde mit Hilfe eines Übergangswürfels an ein Plattenventil und das an ein Flugrohr mit Normflansch gesetzt. Es folgt der Übergang auf ein Flugrohr mit größerem Durchmesser unter einem Winkel von  $3.5^\circ$ . Am Endflansch dieses Rohres wird der Reflektor angebracht. Der Reflektor ist verkipptbar befestigt, so dass kleine Korrekturen noch im laufenden Gerät gemacht werden können. Das Flugrohr zum Detektor ist wieder unter einem Winkel von  $3.5^\circ$  am quellenseitigen Flansch des großen Flugrohres angesetzt. Alle elektrischen Durchführungen für die Ionenquelle waren bereits vorhanden. Ebenso waren alle benötigten Fenster für Laser und Kamera bereits in der Konstruktion der Scout Ionenquelle vorgesehen. Die elektrischen Durchführungen für den Reflektor wurden durch den hinteren Flansch des Flugrohres geführt. Die elektrischen Durchführungen für den Detektor wurden hinter dem Detektor am Endflansch des Flugrohres angebracht. Das Hochvakuum wurde mit Hilfe zweier Turbomolekularpumpen (Pfeiffer TMH 261 /Leybold Turbovac 150) erzeugt. Eine Pumpe wurde am Übergangsstück angesetzt, um den Quellenbereich zu evakuieren. Die andere Pumpe wurde am Hauptrohr im Bereich des Reflektors angesetzt. Das Vorvakuum für beide Pumpen wurde mit einer Vorvakuumpumpe (Edwards «Speedivac» ED 660, Endvakuum ca.  $10^{-3}$  mbar) erzeugt. Die Schleuse zum Probeneinlass wurde von einer separaten Vorvakuumpumpe (Balzers Duo2.5A,

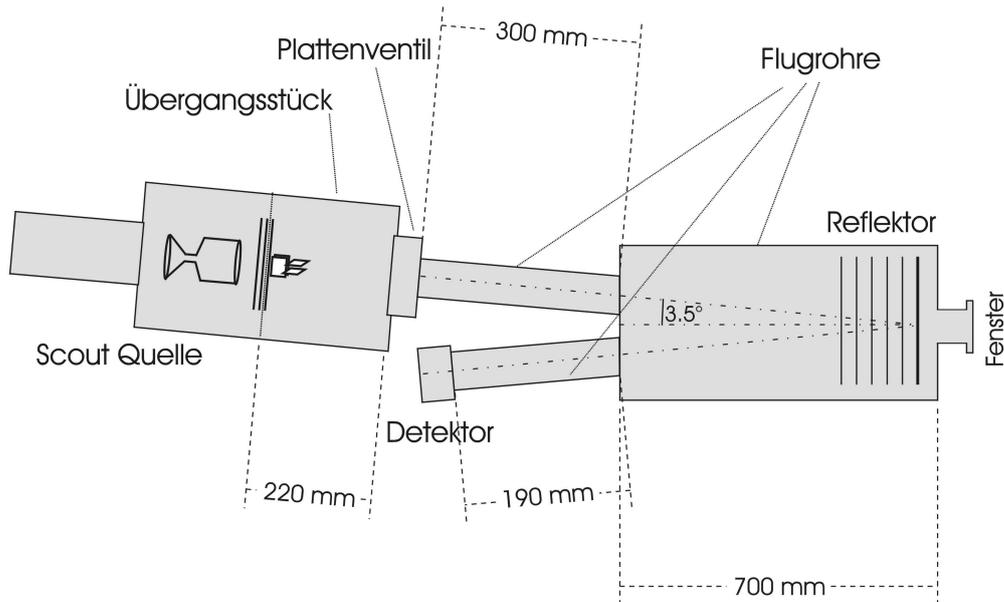


Abbildung 4.9: Schematischer Aufbau des MALDI Massenspektrometers. Es fehlen das Vakuumsystem und der Laser.

2.5 m<sup>3</sup>/h) evakuiert. Der mechanische Aufbau des Reflektors ist in Anhang B.1 zu finden, der elektrische Aufbau des Spannungsteilers wird in Anhang B.3 beschrieben. Die Verbindungen zwischen Gerät und Steuerungselektronik werden in Anhang B.5 dargestellt.

Als Lichtquelle wurde ein N<sub>2</sub>-Laser mit 337 nm Wellenlänge (LSI: VSL-337ND) genutzt. Die maximale Laserenergie liegt bei etwa 120 μJ pro Schuß. Die Länge eines Laserpulses beträgt ca. 4 ns.

Zur Spannungsversorgung wurden Fug Netzgeräte benutzt, wie in Anhang B.4 aufgeführt. Alle nicht verwendeten elektrischen Anschlüsse wurden mit Hilfe von Silberdraht geerdet, um Aufladungen im Gerät vorzubeugen.

Die Datenaufnahme erfolgt mit zwei schnellen Digitalisierkarten (Kanaltiefe 8 ns), die in einem OS9 Rechner betrieben werden. Die Karten werden im „interlace“ modus betrieben, wodurch eine Zeitauflösung von 4ns erreicht wird. Die gesamte Steuerung des Experimentes und die weitere Auswertung der Daten erfolgt mit Hilfe eines SUN Rechners mit Unix Betriebssystem und der zur Quelle gehörigen Software „XACQ“ und „XMASS“ von Bruker. Die in der Software vorgesehene Steuerung der Hochspannungen wurde allerdings nicht verwendet. Die Einstellungen der Parameter für Digitalisierkarten und Motorsteuerung werden in Anhang B.6 aufgelistet.

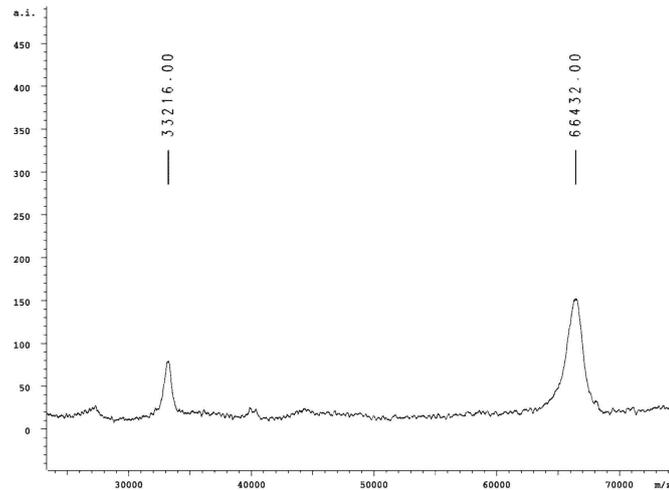


Abbildung 4.10: Massenspektrum im Linearbetrieb. Dargestellt ist  $\text{BSA}^+$  (66 kDa) und  $\text{BSA}^{2+}$  (33 kDa) aus der Matrix Sinapinsäure.

## 4.5 erste Messungen

Zur ersten Optimierung des Geräts wurde zunächst auf den Reflektor verzichtet und der Detektor am Ende des Hauptrohres angebaut. In diesem linearen Aufbau wurden Laserposition und -fokus justiert. Wie erwartet, ist die Auflösung in diesem Betriebsmodus nicht sehr gut, der zu erreichende Massenbereich ist allerdings groß. Es konnten zu Beispiel Messungen an bovinem Serum Albumin (BSA, Masse ca. 66.4 kDa) durchgeführt werden. Bei höheren Massen wird die Sensitivität vermutlich durch den Detektor stark gesenkt. Ein Beispielspektrum findet sich in Abbildung 4.10.

Nachdem das Gerät im linearen Modus funktionierte, wurde der Detektor an die eigentlich dafür vorgesehene Stelle umgesetzt und der Reflektor in das Gerät eingebaut. Der Umbau machte eine erneute Justage der Laserposition erforderlich, da das Instrument nun sehr viel empfindlicher auf die genaue Lage des Lasers reagierte.

Die Auflösung im Reflektormodus steigt auf etwa 1000 bis 1500. Dies entspricht in etwa den Herstellerangaben für das kommerzielle Bruker Reflex Gerät, in dem die gleiche Quelle genutzt wird. Der Massenbereich wird dabei allerdings eingeschränkt. In Abbildung 4.11 ist ein Spektrum von Angiotensin II (1046.542 Da) dargestellt, bei dem eine Auflösung von ca. 1500 erreicht wurde.

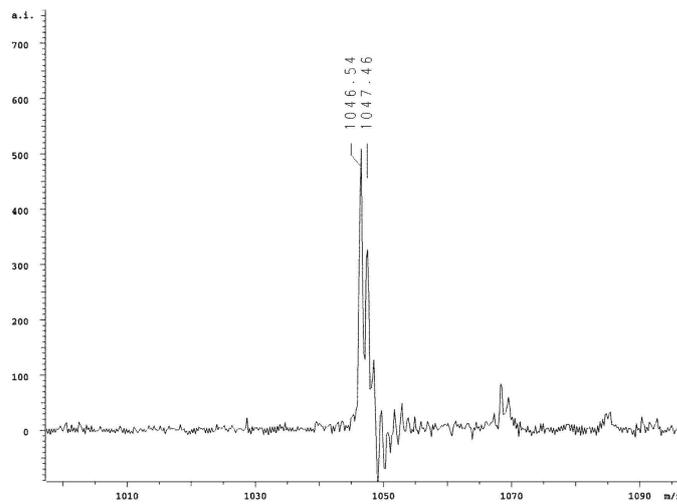


Abbildung 4.11: Massenspektrum im Reflektorbetrieb. Dargestellt ist Angiotensin II (1046.542 Da) aus der Matrix Sinapinsäure. Es wurde Isotopenauflösung erreicht.

# 5 Konformationsanalyse von Peptiden mittels Massenspektrometrie

## 5.1 Motivation

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln die Planung und der Aufbau von Massenspektrometern beschrieben wurde, soll als letzter Abschnitt noch ein anwendungsbezogener Teil folgen. Dazu wurde ein Thema aus dem Grenzgebiet zwischen physikalischer Chemie und Biochemie gewählt. Die Biochemie ist sicher der Wissenschaftszweig, in dem die Massenspektrometrie in den letzten Jahren am meisten an Bedeutung gewonnen hat. Das riesige Human Genome Project wäre zum Beispiel ohne die Hilfe von Massenspektrometrie nicht vorstellbar gewesen.

Durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms eröffnen sich aber weitere große Forschungsfelder. Nach der Zeit der Genomics zieht jetzt eine Zeit der Proteomics heran. Es muss geklärt werden, in welchen Fällen und zu welcher Zeit Proteine exprimiert werden und vor allem welche Funktion die Proteine in der Zelle haben, also welche Wechselwirkung mit anderen Proteinen sie eingehen. Die Funktion von Proteinen ist wiederum eng mit ihrer Struktur verknüpft. Massenspektrometrie ist eine vielversprechende Technik zur Lösung dieser Probleme.

Die Vorteile der Massenspektrometrie liegen insbesondere in der hervorragenden Sensitivität der Messung. Dadurch können Proteine noch in kleinsten Mengen nachgewiesen werden und auch bei Konzentrationen, in denen sie in der Zelle vorliegen, noch untersucht werden. Das ist besonders wichtig, da es häufig schwierig ist, große Mengen eines Proteins zu erhalten. Außerdem können sich Struktur und Verhalten von Proteinen ändern, wenn sie in viel höheren Konzentrationen vorliegen, als in der Zelle vorgesehen.

Der Massenspektrometrie stehen auf diesem Feld große Herausforderungen bevor. Es werden Methoden benötigt, um möglichst alle Proteine aus einem Gemisch nachzuweisen und zu identifizieren, um nichtkovalente Proteinkomplexe nachzuweisen und ihre Stabilität zu messen und um Strukturänderungen bei Proteinen nachzuweisen und Informationen über die Konformation zu erhalten.

## 5.2 „klassische“ Methoden der Konformationsanalyse

Eine gute und kurze Beschreibung der hier aufgeführten Methoden findet sich auch in z.B. bei Lottspeich und Zorbas [67].

### 5.2.1 Circular dichroismus

Die Circular dichroismus(CD)-Spektroskopie basiert auf der unterschiedlichen Absorption einer chiralen Substanz für unterschiedlich zirkular polarisiertes Licht. Die Differenz der beiden Absorptionskoeffizienten wird Elliptizität genannt. Ein CD Spektrum trägt die Elliptizität gegen die Wellenlänge des eingestrahlten Lichts auf. Zur Untersuchung von Peptid und Proteinstrukturen, die sicher das wichtigste Einsatzgebiet der CD-Spektroskopie ist, benutzt man Licht im Wellenlängenbereich zwischen 160 und 250 nm. In diesem Bereich liegen die  $n \rightarrow \pi$  und  $\pi \rightarrow \pi^*$  Absorptionsbanden der Peptidbindung. Die Peptidbindungen sind je nach Sekundärstruktur in verschiedenen chiralen Anordnungen, daher verändert sich das CD-Spektrum stark, wenn ein Peptid seine Sekundärstruktur ändert.

Die CD-Spektren der rein ausgeprägten Sekundärstrukturen wie zum Beispiel  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblatt können über Modellverbindungen mit bekannter Struktur gewonnen werden. Das Spektrum eines Peptids mit unbekannter Struktur wird meist als Linearkombination der Spektren dieser reinen Strukturen angepaßt, um so eine Abschätzung für den Anteil verschiedener Strukturen in dem Peptid zu bekommen.

Diese Methode ist schnell und experimentell einfach, liefert aber keine Information, welcher Teil des Peptids welche Struktur annimmt. Sie ist daher hauptsächlich dazu geeignet, Strukturänderungen (bei homologen Peptiden, in verschiedenen Lösungsmitteln etc.) zu erkennen und günstige Bedingungen zur Stabilisierung einer speziellen Struktur zu finden.

### 5.2.2 Gelpermeationschromatographie

Bei der Gelpermeationschromatographie, auch Gelfiltrationschromatographie oder Ausschlusschromatographie genannt, handelt es sich um eine Trennung von Molekülen aufgrund ihrer Größe. Das zu trennende Gemisch, wird auf ein Gel mit definierter Porengröße aufgetragen. Große Moleküle können nicht in die Poren eindringen und werden daher mit der Lösungsmittelfront eluiert. Kleinerer Moleküle dringen in die Poren ein und werden verzögert, da ihr Elutionsvolumen um das Porenvolumen vergrößert wird. Je kleiner ein Molekül ist, desto länger wird es verzögert, da es auch in kleinere Poren eindringen kann.

Die Trennung hängt natürlich auch von der Form der Moleküle ab. Moleküle, die ein großes Volumen einnehmen, werden früher eluiert. Man kann auf diese

Weise zum Beispiel denaturierte von nativen Proteinen trennen, da die native Konformation meist kompakter ist und später eluiert wird.

Man erhält mit dieser Methode keine Strukturinformation über das Protein und kann meistens auch nicht zwischen zwei verschiedenen nativen Konformationen unterscheiden. Der Vorteil ist jedoch, dass native und denaturierte Proteine getrennt werden können.

### 5.2.3 Lichtstreuung

Die Lichtstreuung ist ebenfalls eine Methode, um Informationen über die Größe von Molekülen zu bekommen. Bei dieser Methode nutzt man aus, dass die Streuung an kleinen Teilchen nicht nur wellenlängen- und winkelabhängig ist, sondern auch von der Größe der Teilchen abhängt. Genauer gesagt, hängt die Intensität der Lichtstreuung vom „radius of gyration“ ab, dem hypothetischen Radius einer Hohlkugel mit gleicher Masse und gleichem Trägheitsmoment wie das betrachtete Teilchen. Das gleiche Teilchen kann also verschiedene anscheinende Radien besitzen, wenn es seine Form ändert.

Auf diese Weise können verschiedene Konformationen eines Proteins unterschieden werden. Diese Methode funktioniert nur für größere Proteine, da die Teilchengröße bei mindestens 5 Nanometer liegen muss, um ausreichend Signal zu erhalten. Für Peptide unter einer Masse von etwa 50 kDa ist die Lichtstreuung deswegen nicht geeignet. Da die Intensität des gestreuten Lichts mit der Teilchengröße zunimmt, kann man besonders gut Aggregation einzelner Moleküle zu größeren Teilchen verfolgen. Eine besonders wichtige Anwendung der Lichtstreuung ist die Untersuchung von Makromolekülen.

Bei der dynamischen Lichtstreuung untersucht man die Fluktuation des gestreuten Lichts während Teilchen in den Strahl und aus ihm heraus wandern. Durch Autokorrelation erhält man aus diesen Daten den Diffusionskoeffizienten, der wieder mit Größe und Form der Moleküle zusammenhängt.

### 5.2.4 Röntgenstrukturanalyse

Im Gegensatz zu den bis hier aufgezählten Methoden ist die Röntgenstrukturanalyse ein Verfahren, mit dem die Konformation von Peptiden auf atomarem Level bestimmt werden kann. Dafür muss man allerdings auch größeren experimentellen Aufwand hinnehmen. Um eine gute Röntgenstruktur zu erhalten benötigt man sehr reine Peptide in Form von großen Einkristallen. Die Zucht solcher Einkristalle ist sehr schwierig und setzt möglicherweise das Testen von mehreren 100 Kristallisationsbedingungen voraus. Dafür benötigt man das zu untersuchende Peptid in einer Menge von etwa einem Milligramm bis zu 100 mg.

Die Röntgenstrukturanalyse beruht auf der Beugung von Röntgenstrahlung an den Atomen der Moleküle, genauer gesagt an den Elektronenwolken der Moleküle. Durch die periodische Anordnung der Moleküle im Kristallgitter interferieren die

gebeugten Strahlen nur in bestimmte Raumrichtungen konstruktiv miteinander. Dies wird mathematisch durch das Bragg'sche Gesetz beschrieben.

$$2 \cdot D \cdot \sin\Theta = n \cdot \lambda \quad n = 1, 2, 3 \dots \quad (5.1)$$

Hierbei bezeichnet  $D$  den Abstand der Kristallebenen,  $\Theta$  den Winkel zwischen Kristall und Röntgenstrahl und  $\lambda$  die Wellenlänge des Röntgenlichts. Um möglichst viele Ebenen des Kristalls während der Messung im richtigen Winkel zum einfallenden Strahl zu orientieren, wird der Kristall während der Messung gedreht. Typischerweise werden Daten über einen Winkelbereich von 60 bis 180 Grad aufgenommen, wobei zwischen zwei Aufnahmen eine Winkeländerung von ein bis zwei Grad liegt. Die Aufnahme des kompletten Datensatzes dauert so fünfzehn bis 60 Stunden.

Hätte man die Information über Phase und Amplitude jedes Reflexes, so wäre die dreidimensionale Struktur des Kristalls damit beschrieben. Leider geht die Phaseninformation der Reflexe bei der Detektion verloren. Die wichtigste Methode, um trotz dieser fehlenden Information, die Struktur zu bestimmen, ist der isomorphe Ersatz. Dabei werden Schwermetallsalze in das Protein eingelagert, ohne dessen Struktur zu ändern. Da die Schweratome wegen ihrer großen Elektronendichte das Beugungsbild dominieren, kann man aus diesen Daten mit Hilfe der Patterson-Synthese auf die Lage dieser Atome schließen, wodurch man eine erste Schätzung des Phasenwinkels erhält. Im günstigsten Fall kann nun auf die Lage weiterer Atome geschlossen werden und die Struktur gelöst werden. Für große Proteinstrukturen müssen jedoch häufig mehrere Schwermetallerivate hergestellt und vermessen werden.

### 5.2.5 Kernspinresonanzspektroskopie

Die andere Methode, um die Struktur von Proteinen auf atomarem Niveau zu bestimmen, ist die NMR-Spektroskopie. Bei der NMR-Spektroskopie wird die zu untersuchende Substanz in ein starkes Magnetfeld gebracht. Dadurch spalten die Energieniveaus der Kernspinorientierung auf. Durch Einstrahlung von Radiowellen können Übergänge zwischen diesen Niveaus induziert werden. Die genaue Resonanzfrequenz hängt von der Atomart und der chemischen Umgebung des Atoms ab. NMR-Spektroskopie wird meistens mit H-Atomen gemacht, es sind aber auch andere Atome zugänglich, von denen  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  und  $^{31}\text{P}$  für die Spektroskopie von Biomolekülen wichtig sind.

Strukturbestimmungen von Biomolekülen werden mit Hilfe von NOESY-Spektren durchgeführt. Dieses Experiment basiert auf dem Kern-Overhauser-Effekt. Bei diesen zweidimensionalen Spektren wird die Wechselwirkung von Kernen durch den Raum nachgewiesen. Die Korrelation zweier Protonen hängt dabei von dem räumlichen Abstand dieser Protonen ab. Wenn zwei Protonen, die in der Primärstruktur des Proteins weit voneinander entfernt sind, durch die dreidimensionale Faltung des Proteins einander nahekommen, kann dies mit dieser

Methode nachgewiesen werden und der Abstand der Protonen bestimmt werden. Mit vielen solcher Abstandsmessungen kann die Proteinstruktur rekonstruiert werden. Die Tertiärstruktur kann häufig erst mit einer Kombination von NMR Spektroskopie und Computersimulation geklärt werden, da meist nicht genug Abstände bestimmt werden können. Aus der Spektroskopie werden die Abstandsrandbedingungen für Moleküldynamik-Rechnungen gewonnen.

Im Gegensatz zur Röntgenstrukturbestimmung erhält man bei der NMR-Spektroskopie die Konformation des Proteins in Lösung. Deswegen erhält man keine starre Struktur, sondern einen ganzen Satz an Strukturen. In flexiblen Bereichen des Moleküls sind die Abweichungen der Strukturen groß, in Bereichen mit definierter Sekundärstruktur erhält man kaum Abweichungen.

Auch bei diesem Verfahren werden jedoch größere Mengen des Proteins und lange Messzeiten benötigt. Mit der Größe der Proteine wird auch die Auswertung der Spektren immer komplizierter. Für Moleküle mit mehr als 15 kDa müssen zur Strukturaufklärung dreidimensionale NMR Spektren und heteronukleare NMR Experimente herangezogen werden.

### 5.3 massenspektrometrische Methoden der Konformationsanalyse von Peptiden

Die oben vorgestellten Methoden zur Konformationsbestimmung lassen sich in zwei extrem unterschiedliche Gruppen einteilen: zum einen die qualitativen Methoden, die nur große Änderungen in der Struktur erkennen lassen, dafür aber mit wenig experimentellem Aufwand durchführbar sind, zum anderen die quantitativen Methoden, die mit hohem experimentellem Aufwand die Struktur von Proteinen auf atomarem Level erkunden. Massenspektrometrie hat das Potential die Lücke zwischen diesen beiden Gruppen zu füllen. Es wurden in den letzten Jahren mehrere Methoden entwickelt, um Massenspektrometrie zur Konformationsanalyse nutzen zu können, die im Folgenden vorgestellt werden sollen. Die größte Triebkraft bei dieser Entwicklung war wahrscheinlich die hohe Empfindlichkeit der Massenspektrometrie, die das Arbeiten mit kleinsten Mengen Protein ermöglicht. Dies zusammen mit kurzen Analysenzeiten sind die Hauptvorteile der Massenspektrometrie gegenüber den quantitativen Methoden. Im Vergleich zu den qualitativen Methoden besteht die Hoffnung, mehr Strukturinformationen über das Protein zu erhalten. So kann zum Beispiel die Lage von Strukturelementen im Molekül mit massenspektrometrischen Methoden gefunden werden.

#### 5.3.1 Enzymatischer Verdau und Massenspektrometrie

Mittels enzymatischen Verdau können Proteine in kleinere Fragmente gespalten werden. Die Fragmentierung ist dabei charakteristisch für das verwendete Enzym. So spaltet z.B. Trypsin, ein häufig verwendetes Enzym, Proteine C-terminal

von Arginin und Lysin in der Proteinkette. Meist wird der enzymatische Verdau verwendet, um ein Protein vollständig in Fragmente zu spalten. Es ergibt sich durch die Spaltung eine für das gespaltene Protein spezifische Mischung von kleinen Peptiden, die nach Trennung durch Gelelektrophorese, HPLC oder Massenspektrometrie ein Signalmuster („fingerprint“) ergibt, das zur Identifizierung der Proteine genutzt werden kann. Für diese Untersuchungen, in denen die Massenspektrometrie wegen ihrer Sensitivität auch eine wichtige Rolle spielt, wird der Verdau so lange durchgeführt, bis keine Reaktion mehr zu beobachten ist. In der Regel ist das nach 4 bis 16 h der Fall.

Wenn man Informationen über die Struktur des Protein erhalten möchte, muss man jedoch den Reaktionsverlauf beobachten. Wie auch anschaulich leicht klar wird, ist die Spaltungsgeschwindigkeit an leicht zugänglichen Stellen des Proteins höher, als bei im Inneren einer gefalteten Struktur verborgenen Stellen. Wenn man also den zeitlicher Verlauf des Verdaus beobachtet, kann man daraus Rückschlüsse auf die Proteinstruktur ziehen. Die Spaltstellen, an denen zuerst eine Reaktion einsetzt, sind an exponierten Stellen in dem untersuchten Protein, die Spaltstellen an denen die Spaltung spät oder garnicht einsetzt sind in festen Strukturen geschützt.

Diese Methode, Enzyme als Sonde für die Zugänglichkeit von bestimmten Peptidbindungen in einem Protein zu nutzen, ist schon länger bekannt [68, 69, 70]. Wie auch bei den anderen massenspektrometrischen Methoden erhält man Informationen über die Lage von Strukturelementen, erfährt aber nichts über die Art der Struktur. Die Methode ist also insbesondere geeignet, Konformationsänderungen eines Proteins nachzuweisen. Beispielsweise kann der Mechanismus der Denaturierung eines Proteins in Guanidinium Hydrochlorid mit der partiellen Proteolyse verfolgt werden, wobei sehr wenig Substanz benötigt wird und in günstigen Fällen mehr Informationen als z.B. mit der CD Technik erhalten werden[68].

#### 5.3.2 H/D-Austausch und Massenspektrometrie

Während der enzymatische Verdau ein großes Enzym nutzt, um die Zugänglichkeit bestimmter Stellen eines Proteins zu testen, verwendet man beim H/D-Austausch das Lösungsmittel selbst, um die Zugänglichkeit zu testen. Das zu untersuchende Protein wird in ein stark mit Deuterium angereichertes, protisches Lösungsmittel (also insbesondere D<sub>2</sub>O) gegeben und der Fortgang der Austauschreaktion zu verschiedenen Zeiten beobachtet. Die Methode basiert darauf, dass sogenannte „labile“ Protonen, wie zum Beispiel die Amidprotonen der Peptidbindungen, durch Deuterium-Ionen ausgetauscht werden können. Dabei ist die Austauschgeschwindigkeit wieder stark abhängig von der Zugänglichkeit der Stelle im Protein. Frei zugängliche Protonen werden fast augenblicklich, also innerhalb von wenigen Sekunden, ausgetauscht, stark strukturierte Bereich können zum Austausch mehrere Stunden oder gar Tage benötigen.

Das Beobachten des Austauschs kann mit verschiedenen Methoden geschehen. Außer der Massenspektrometrie werden insbesondere NMR Spektroskopie und IR Spektroskopie angewandt. Diese Methoden haben den Vorteil, dass sie direkt Rückschlüsse auf die Lage des ausgetauschten Protons zulassen. Das gilt besonders für die NMR Spektroskopie. Wegen der Massenänderung um je ein Da pro ausgetauschtes Proton, ist natürlich auch die Massenspektrometrie eine geeignete Methode, um den H/D-Austausch zu verfolgen. Ein besonderer Vorteil dieser Methode ist, neben der hohen Sensitivität, die Möglichkeit direkt verschiedene Konformere, die unterschiedlich stark austauschen, nebeneinander nachzuweisen. Dies ist mit NMR oder IR nur schwer möglich.

Zunächst erhält man bei der Beobachtung mit MS nur die Änderung der Molekülmasse, also die Anzahl der ausgetauschten Protonen, wodurch man nur auf das Vorhandensein von Struktur schließen kann und die Größe und Stabilität der Struktur abschätzen kann. Verschiedene Konformere treten als Signale bei verschiedenen Massen auf, wenn sie verschieden gut austauschen. Bei der Untersuchung von Konformationsänderungen kann man daher bei der Beobachtung des H/D-Austausches mit Massenspektrometrie, im Gegensatz zur NMR oder IR Spektroskopie, sehr schön zwischen graduellen und plötzlichen, vermutlich kooperativ ablaufenden Konformationsänderungen unterscheiden. Im Fall von graduellen Konformationsänderungen erhält man im Massenspektrum ein sehr breites Signal, also viele verschiedene Molekülspezies (sozusagen sehr viele Konformere). Bei kooperativen Änderungen erhält man hingegen nur zwei scharfe Signale, die dem Anfangs- und dem Endzustand der Konformationsänderung entsprechen. Die Konformationsänderung kann dabei durch verschiedene Einflüsse induziert werden (z.B. Lösungsmittel, Salze, Temperatur, Druck). Ein Beispiel für eine kooperative Konformationsänderung durch Temperaturerhöhung kann z.B. bei Bukau [71] gefunden werden.

Mit Hilfe von Fragmentierungsexperimenten im Massenspektrometer (CID,-PSD) kann aber auch die Position der Strukturelemente ermittelt werden[72, 73]. Bevorzugte Massenspektrometer für diese Art Untersuchung sind ESI-Ionenfallen-MS, da hier leicht stoßinduzierte Fragmentierung (CID - collision induced decay) eingesetzt werden kann und man die Probe direkt im flüssigen Aggregatzustand in das Gerät einbringt. Dadurch erspart man sich mühselige Vorsichtsmaßnahmen, um Rückaustausch während der Probenpräparation auszuschließen. Es wurden aber auch Messungen mit MALDI-MS Geräten gemacht. In diesem Fall nutzt man den metastabilen Zerfall der Ionen im feldfreien Raum für die Fragmentierungsmessungen (PSD - post source decay). Zur Analyse der Fragmente muss in dem Gerät ein ion-gate zu Verfügung stehen.

Im Vergleich mit dem enzymatischen Verdau erhält man mit dieser Methode nicht direkt die Position der Strukturelemente, dafür bekommt man aber ein detaillierteres Bild von der Struktur, da der H/D-Austausch an jeder Peptidbindung stattfinden kann. Nach Fragmentierung kann die Position also genauer eingegrenzt werden. Die beiden Methoden können sogar kombiniert werden, indem das Prote-

in zunächst verdaut wird, um dann einem H/D-Austausch unterzogen zu werden. So kann man Strukturen unterhalb der Auflösung des enzymatischen Verdaus untersuchen.

### 5.3.3 Analyse des mittleren Ladungszustands bei ESI

Während die beiden oben vorgestellten, massenspektrometrischen Methoden weiten Gebrauch gefunden haben, sind die nun folgenden Methoden noch nicht so weit verbreitet und auch teilweise noch umstritten. Zur Erläuterung der Strukturinformation, die in der mittleren Ladung bei der ESI-Massenspektrometrie steckt, muss aber zunächst das Verfahren selbst erläutert werden, da es zuvor noch nicht erwähnt wurde.

#### 5.3.3.1 Elektro-Spray Ionisation - ESI

Die Elektro-Spray Ionisation ist gleichzeitig ein Flüssigkeitseinlasssystem von Normaldruck in das Hochvakuum des Massenspektrometers und eine Ionisationsmethode. Flüssigkeiten können nicht direkt in ein Massenspektrometer eingelassen werden, da die schlagartig verdampfende Flüssigkeit zu einem Vakuumeinbruch führen würde. Bei ESI werden daher zunächst kleine Tröpfchen erzeugt, denen in einem Zwischenvakuum der größte Teil der Lösungsmittelmoleküle entzogen wird. Dadurch wird die Belastung des Vakuumsystems stark herabgesetzt.

Die Ionisation bei ESI läuft wahrscheinlich über die Adduktbildung mit Oberflächenladungen eines kleinen Tröpfchens und anschließender Desorption der Ionen und/oder durch die Desorption von in Lösung vorgebildeten Ionen. Für die Desorption wird die Flüssigkeit in immer kleinere Tröpfchen zerstäubt.

Die Tröpfchen werden dadurch erzeugt, daß die Flüssigkeit mit dem gelösten Analyten durch eine Kapillare geleitet wird, die gegenüber der Einlassöffnung des Massenspektrometers auf hohem positiven Potential liegt. Durch die hohe Spannung und den kleinen Radius der Flüssigkeit am Ende der Kapillare entsteht eine sehr hohe Feldstärke, die eine Ladungstrennung bewirkt: positive Ionen werden an die Flüssigkeitsoberfläche gezogen, negative Ionen in das Flüssigkeitsinnere. Durch die resultierende hohe positive Ladungsdichte an der Flüssigkeitsoberfläche wird schließlich die Oberflächenspannung des Tröpfchens überkompensiert und es kommt zur Coulomb-Explosion: die Flüssigkeit stäubt auseinander. Unterstützt wird das Zerstäuben häufig durch einen Gasstrom, der starke Scherkräfte auf die Flüssigkeit ausübt. Eine schematische Darstellung des ESI Aufbaus ist in Abbildung 5.1 zu sehen.

Die entstandenen Tropfen verlieren in dem meist erwärmten Gasstrom einen Teil ihrer Lösungsmittelmoleküle, wodurch die Ladungsdichte an der Tropfenoberfläche wieder zunimmt und es zu weiteren Coulomb-Explosionen kommen kann. So entstehen immer kleinere Tröpfchen bis zum Schluß nur noch das (mehrfach) geladene Analytmolekül zurückbleibt.

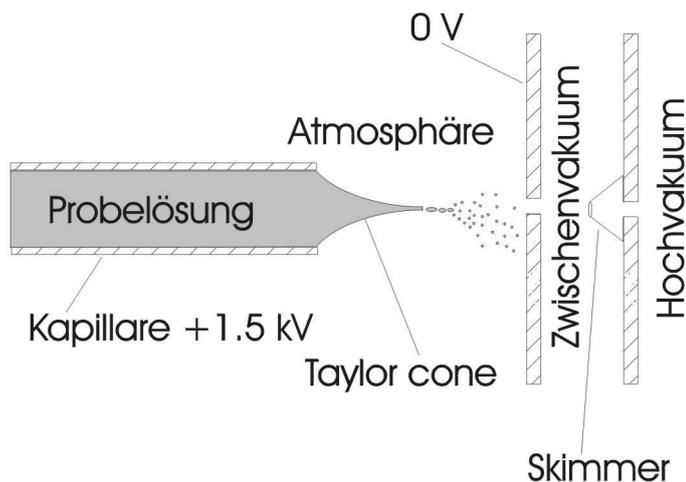


Abbildung 5.1: Schematischer Aufbau einer ESI-Quelle. Zum Einlass in das Zwischenvakuum wird, anders als hier dargestellt, häufig eine Kapillare genutzt, um den Gasstrom zu begrenzen.

Die Ionen oder kleinen geladenen Tröpfchen werden durch eine Kapillare in das Massenspektrometer eingelassen, durch die sie mit Hilfe eines Feldgradienten transportiert werden. Hier verlieren sie in einer Zwischenvakuumkammer zunächst den Rest der Lösungsmittelmoleküle, bevor sie durch einen Skimmer in das Hauptvakuum eingelassen werden.

ESI produziert bevorzugt mehrfach geladene Ionen, was es einfach macht, schwere Moleküle nachzuweisen, da die entsprechenden Signale bei kleinen  $m/z$ -Werten auftreten. Daher wird die ESI Technik auch häufig mit Quadrupol Massenfiltern oder Quadrupol-Ionenfallen kombiniert. Der beschränkte Massenbereich dieser Analysatoren spielt keine so große Rolle, da die Signale großer Moleküle durch die hohe Ladung (bis zu hundert Elementarladungen pro Molekül) in den Messbereich zurückgefaltet werden. Es ergeben sich Signalprogressionen für die verschiedenen Ladungszustände des Moleküls, aus denen sehr genau auf die Molekülmasse zurück geschlossen werden kann.

Ein allgemeiner Überblick über Theorie und Anwendung von ESI Massenspektrometrie ist in einem Tutorial von Gaskell [74] zu finden. Der Ionisationsprozess bei ESI wird z.B. von Fenn [75] und Ashton et al. [76] abgehandelt.

### 5.3.3.2 Analyse des mittleren Ladungszustands bei ESI

Wie oben beschrieben, ist das ESI Spektrum von Proteinen durch das Auftreten vieler Ladungszustände gekennzeichnet. Das Aussehen des Spektrums ist dabei nicht konstant, sondern von vielen externen Faktoren abhängig. Die beobachtete mittlere Ladung und die Breite der Ladungsverteilung können durch

Änderung des pH-Wertes, der Ionenstärke, der Temperatur, der Zusammensetzung des Lösungsmittels und andere Faktoren beeinflusst werden. Es ist möglich, dass diese Änderungen hauptsächlich die Änderung der Proteinstruktur widerspiegeln.

Es gibt mehrere Untersuchungen, nach denen die Verteilung der Ladung im ESI Massenspektrum (charge state distribution - CSD) mit der Struktur der Proteine korreliert [77, 78, 79, 80, 81]. Es wurde dabei beobachtet, dass Strukturveränderung von Proteinen z.B. bei Temperaturänderung [81] und pH-Wert Änderung [79] durch Änderung der CSD beobachtbar sind. In dem letzten Beispiel wurde dabei beobachtet, dass zwei unabhängige Ladungsverteilungen im Spektrum auftreten, die ihre relativen Intensitäten zueinander verändern, selbst aber in ihrer Form unabhängig vom pH-Wert sind.

Diese Beobachtungen können intuitiv damit erklärt werden, dass basische Stellen des Proteins durch die Entfaltung zugänglich werden und daher die mittlere Ladung des Proteins steigt. Eine alternative Betrachtungsweise ist, dass eine kompakte Konformation wegen der Ladungsabstoßung nicht so viele Ladungen aufnehmen kann, wie eine entfaltete Konformation [82, 75]. Wenn zwei Konformere nebeneinander existieren, so ergeben sich auch zwei unterschiedliche Ladungsverteilungen im Spektrum: eine Verteilung mit hoher Ladung für die entfaltetere Konformation und eine Verteilung mit geringerer Ladung für die kompaktere. Es ist noch nicht ganz klar, ob die Struktur der Probe auch in der Gasphase erhalten bleiben muss, um die verschiedenen Ladungsverteilungen beobachten zu können. Es wurde auf jeden Fall gezeigt, dass auch in der Gasphase Protonentransfer stattfindet und für die Veränderung des Ladungszustandes sorgen kann [83]. Es wäre daher möglich, dass sich die Ladungsverteilung zweier Konformationen in der Gasphase wieder angleicht, wenn die Struktur nicht erhalten bleibt.

Vorteile dieser Methode sind die einfache experimentelle Handhabung, Sensitivität und Geschwindigkeit bei der Messung. Es soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass die allgemeine Aussagekraft dieser Untersuchungsmethode noch strittig ist [84].

#### 5.3.4 Fragmentierung im Massenspektrometer

Eine weitere massenspektrometrische Methode zur Konformationsanalyse ist die Fragmentierung des Proteins im Massenspektrometer. Bei dieser Methode ist es unbedingt nötig, dass zumindest ein Teil der Struktur des Proteins beim Übergang in die Gasphase bestehen bleibt, da mit der Fragmentierung im MS nur die Gasphasenkonformation des Proteins abgefragt werden kann. Es gibt Hinweise darauf, dass Proteinstruktur auch in der Gasphase noch teilweise bestehen kann [85, 82, 77, 86] und es konnte sogar gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur von Peptiden einen Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten haben kann [87, 88]. Diese Untersuchungen ermutigen, weitere Nachforschungen in diese Richtung anzustellen.

Natürlich wird die Konformationen eines Peptids oder Proteins sich beim Übergang in die Gasphase ändern, da wichtige Interaktionen mit dem Lösungsmittel - meist Wasser - fehlen. Insbesondere die hydrophobe Wechselwirkung, die einen wichtigen Einfluss auf die Proteinstruktur nimmt, fällt in der Gasphase weg. Die hydrophobe Wechselwirkung bewirkt, dass hydrophobe Aminosäuren im Inneren des Proteins verborgen werden. Der Effekt beruht darauf, dass sich die Struktur des Wassers durch die Interaktion mit hydrophoben Aminosäuren verändert. Die Wassermoleküle werden dazu gezwungen, stärker untereinander zu binden. Dadurch bildet sich eine Wasserstruktur mit verringerter Entropie. Obwohl das Protein durch das Exponieren vieler Aminosäuren eine Konformation mit größerer Entropie erlangen kann, wird die Gesamtentropie durch das Lösungsmittel bestimmt [89].

Andere Wechselwirkungen, die die Konformation von Proteinen ebenfalls bestimmen, können in der Gasphase erhalten bleiben. Hier sind besonders elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zu erwähnen. Unterstützung für die These, dass wichtige Wechselwirkungen auch in der Gasphase erhalten bleiben, obwohl sie eine geringe Stärke haben, kommt aus der Beobachtung vieler nichtkovalenter Komplexe mit Massenspektrometrie. Besonders ESI hat sich als besonders wertvolle Methode erwiesen, um nichtkovalente Komplexe zu untersuchen (z.B. [90, 91]). Ein guter Übersichtsartikel dazu findet sich bei Loo [92]. Es wurden aber auch entsprechende Untersuchungen mit MALDI durchgeführt (z.B. [93]).

Obwohl das Vorhandensein von Struktur in der Gasphase erwiesen scheint, ist das Verhältnis von Gasphasenstruktur zur Struktur in Lösung noch ungeklärt. Auch die Art wie Primär- und Sekundärstruktur das Fragmentierungsverhalten von Proteinen beeinflusst, ist noch nicht endgültig geklärt. Das zur Zeit akzeptierte Modell, das Konzept des mobilen Protons [94], ist noch nicht so verfeinert, dass es den Einfluss von Sekundärstruktur erklären könnte. Aktuelle Erweiterungen des Modells [88, 87] gehen dahin, bevorzugte Fragmentierung benachbart zu sauren Aminosäuren in Gegenwart von basischen Gruppen zu erklären. Besonders die Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen, die intramolekulare Ladungssolvatisierung, scheint dabei das Fragmentierungsverhalten zu beeinflussen. Eine Darstellung des Modells des mobilen Protons ist in dem folgenden Abschnitt zu finden.

Diese Methode der Konformationsanalyse ist noch weit davon entfernt, ein Standardverfahren zu sein. Aber selbst, wenn sich am Ende herausstellen sollte, dass die Struktur in der Gasphase nur wenig mit der Struktur in Lösung zu tun hat, werden auf dem Weg dorthin wichtige neue Erkenntnisse über die Fragmentierungsmechanismen von Proteinen gefunden werden.

### 5.3.4.1 Modell des mobilen Protons

Fragmentierung von in Peptid-Ionen wurden in vielen Arbeiten untersucht [94, 95, 96, 88, 87, 86, 97]. Aus diesen und vielen weiteren Arbeiten kristallisierte sich ein allgemeines Modell für das Fragmentierungsverhalten heraus, das zum Beispiel in [94] beschrieben wird. Das Modell behandelt die ladungsgesteuerte (charge-directed fragmentation) Fragmentierung von einfach und mehrfach geladenen Peptidionen bei niederenergetischer ( $< 100$  eV) Anregung (low-energy CID (collision induced decay), SID (surface induced decay), Photodissoziation).

Die Beobachtungen zeigen, dass die Fragmentierung von protonierten Peptiden ohne basische Aminosäuren in der Sequenz früher einsetzt, als wenn basische Seitengruppen vorhanden sind. Wenn sich eine basische Aminosäure in der Sequenz befindet, korreliert die Energie, bei der Fragmentierung einsetzt, mit der Basizität dieser Aminosäure in der Gasphase (wenn die Werte auf die Freiheitsgrade des Peptids normiert werden<sup>1</sup>). Diese experimentellen Ergebnisse lassen sich erklären, wenn man annimmt, dass nicht alle Stellen, an denen das Peptid protoniert sein könnte, auch zu einer Fragmentierung führen. Protonierung an einem Sauerstoffatom aus der Amidbindung führt nach theoretischen Berechnungen zu einer Erhöhung der C-N-Bindungsordnung und wird wahrscheinlich nicht zu einer Fragmentierungsreaktion führen. Protonierung am Stickstoffatom der Amidbindung schwächt hingegen die C-N-Bindung und wird eine Spaltung dieser Bindung erleichtern [94, 98]. Eine Protonierung an der Seitenkette einer basischen Aminosäure oder am N-Terminus wird auch nicht zur ladungskontrollierten Spaltung von Peptidbindungen führen können. Das Proton muss also vor der Fragmentierung zunächst mobilisiert werden und an eine Stelle transportiert werden, an der eine ladungskontrollierte Spaltung stattfinden kann. Dazu muss natürlich die Energiedifferenz zwischen stabilster Form und reaktiver Form in das Molekül gesteckt werden. Da durch die Anwesenheit von basischen Aminosäuren die Energie der stabilsten Form abgesenkt wird, muss auch mehr Energie aufgebracht werden, bevor Fragmentierung einsetzt.

Wenn Fragmentierung stattfindet, ist sie meist unspezifisch, das heißt alle Peptidbindungen werden ähnlich effizient gebrochen und es sind keine eindeutigen Sequenzabhängigkeiten zu erkennen<sup>2</sup>. Das bedeutet, dass die Protonenübertragung auf jeden der Amidstickstoffe energetisch etwa gleich günstig und kinetisch gleich schnell ist (unwahrscheinlich), oder dass das Proton im Molekül sehr mobil ist und sich zunächst statistisch im Molekül verteilt, bevor die Fragmentierungsreaktion einsetzt. Es gibt theoretische [98] und experimentelle [99] Hinweise darauf, dass

<sup>1</sup>Die Normierung ergibt sich aus der Überlegung, dass die innere Energie des Moleküls über alle inneren Freiheitsgrade verteilt wird und daher die Energie pro Freiheitsgrad die entscheidende Größe in diesem Zusammenhang ist.

<sup>2</sup>Die Untersuchungen wurden alle an kleinen Peptiden durchgeführt, bei denen keine Überstrukturen zu erwarten sind. Untersuchungen, die solche Effekte untersuchen, sind erst seit kurzem in Gange [86]

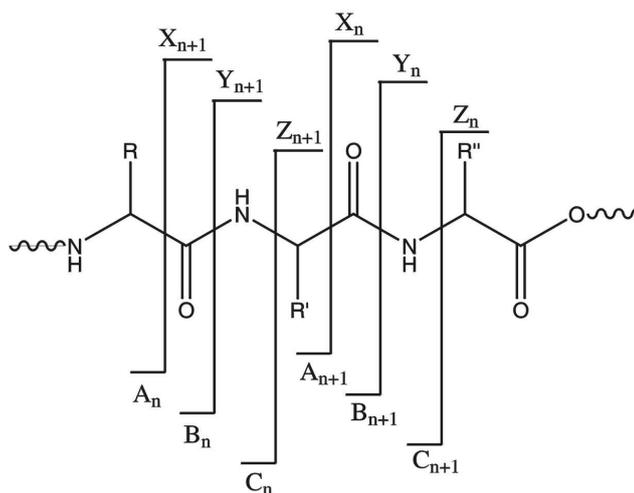


Abbildung 5.2: Nomenklatur der Sequenzionen bei Peptiden nach [100]. Der Index  $n$  steht für die Anzahl von Aminosäuren im Ion.

letzteres der Fall ist.

Das Fragmentierungsverhalten wird komplizierter, wenn auch noch Aminosäuren mit sauren Seitenketten im Peptid vorhanden sind. In Anwesenheit einer basischen Aminosäure im Peptid, beobachtet man eine bevorzugte Spaltung C-terminal von der sauren Aminosäure. Wenn die basische Aminosäure fehlt, erhält man nur eine unspezifische Spaltung. Diese und weitere ähnliche Beobachtungen wurden dadurch erklärt, dass die spezifische Fragmentierung durch Übertragung des Protons von der sauren Aminosäure auf ihre c-terminale Peptidbindung gesteuert wird. Diese Protonierung ist durch die Wechselwirkung mit dem Säurerest ortsfest.

Dieser Mechanismus kann aber nur stattfinden, wenn nicht vorher Fragmentierung bei niedrigerer Energie durch ein „mobiles“ Proton stattfindet, also nur wenn eine basische Aminosäure vorhanden ist, die die Fragmentierungsenergie anhebt. Generell wurde spezifische Fragmentierung in den Fällen gefunden, in denen die Anzahl der Protonen der Anzahl der basischen Reste entspricht [88].

Einige subtilere Effekte bei der Fragmentierung konnten dadurch erklärt werden, dass die Ladung an der protonierten, basischen Seitenkette durch intermolekulare Solvatisierung durch eine Carboxylgruppe stabilisiert werden kann. Diese Carboxylgruppe steht dabei zur Induktion einer spezifischen Spaltung nicht mehr zur Verfügung. Dieses Ergebnis ist besonders deswegen interessant, weil es darauf hindeutet, dass die Struktur von Peptiden in der Gasphase Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten nimmt [88].

Die Nomenklatur zur Bezeichnung der Fragmentionen wurde von Roepstorf und Fohlmann [100] eingeführt und ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Die Fragmentierung zur b-Ionen Serie führt vermutlich zu Oxazolone Strukturen, wie in

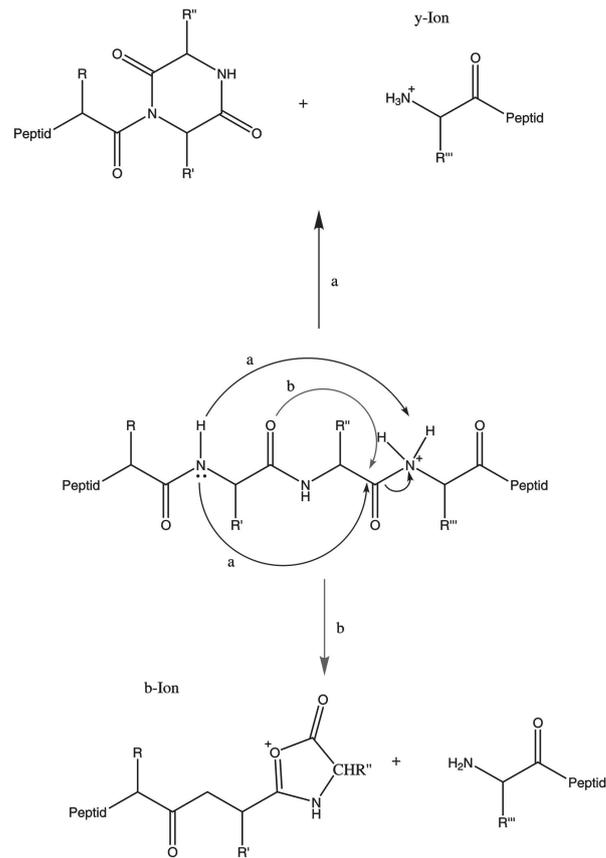


Abbildung 5.3: Fragmentierungsreaktionen zu b- und y-Ionen. Die Pfeile sollen die summarische Änderung verdeutlichen und sind nicht mechanistisch zu verstehen.

Abbildung 5.3b zeigt. Die Fragmentierung zu y-Ionen hat vermutlich cyclische Peptide (Abbildung 5.3a) als Endprodukt [87, 101].

## 5.4 PeptidAuswahl

Die Struktur von Proteinen spielt eine große Rolle für ihre Funktion. Die meisten Proteine nehmen unter ihren natürlichen Bedingungen eine spezifisch gefaltete Konformation ein, in der sie auch biologische Aktivität zeigen. Wird die Konformation durch Änderung äußerer Bedingungen (Temperatur, Druck, pH-Wert, Ionenstärke, Schwermetallkonzentration, Lösungsmittel etc.) gestört, so verliert das Protein seine Struktur und seine biologische Aktivität. Die Konformation wird dabei häufig „random coil“, also zufällig und ohne Sekundärstruktur. Im Körper werden solche denaturierte Proteine meist schnell abgebaut.

Es gibt allerdings Beispiele für Proteine, die nach Verlust ihrer normalen (na-

tiven) Struktur nicht so leicht abgebaut werden, sondern im Gegenteil eine andere stabile Konformation einnehmen, in der sie aggregieren und toxische Eigenschaften zeigen. Bekannte Beispiele für Krankheiten, die durch Veränderung der Konformation von Proteinen auf diese Art gekennzeichnet sind, sind die Prionenerkrankungen BSE, Scrapie, Creutzfeld-Jakob-Krankheit und die Alzheimer-Krankheit[102]. Die häufigste dieser Erkrankungen ist die Alzheimer-Krankheit, die in USA und Europa bereits die vierthäufigste Todesursache darstellt. Nach Schätzungen sind 10% aller Menschen über 65 Jahren von dieser Krankheit betroffen.

Prionenerkrankungen sind ein gutes Beispiel dafür, wie wichtig es ist, nicht nur die Primärstruktur (also die Sequenz) von Proteinen zu bestimmen, sondern auch die Konformation zu untersuchen. Die Untersuchung der Konformation dieser Proteine zeigt möglicherweise Wege auf, die Krankheit auch zu bekämpfen und wenn es mögliche Medikamente gibt, die die Missfaltung verhindern, muss deren Einfluss auf die Proteinkonformation ebenfalls untersucht werden. Es besteht also bedarf an einer schnellen, einfachen und leistungsfähigen Methode zum Nachweis von Konformationsänderungen.

Es soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Konformationsänderungen bei  $\beta$ -Amyloid(1-40), dem Hauptpeptid der Plaques bei der Alzheimer Erkrankung, mit Hilfe von Massenspektrometrie untersucht werden kann. Dieses Peptid ist interessant, da es als Verursacher der Alzheimer-Krankheit vermutet wird, und es schien vielversprechend für die Untersuchung, da es mit anderen Methoden bereits ausführlich untersucht wurde und schon einiges über sein Verhalten bekannt ist, wie im nächsten Abschnitt ausgeführt werden wird.

### 5.5 Alzheimer-Krankheit und $\beta$ -Amyloid

Die Alzheimer-Krankheit wurde das erste Mal 1907 von dem deutschen Neuropathologen Alois Alzheimer [103] beschrieben. Die Symptome der Krankheit sind fortschreitender Gedächtnisverfall und Verlust höherer Hirnfunktionen, die sich in Desorientierung, Paranoia oder anderem abnormalen Verhalten äußern können. In späten Stadien der Krankheit werden die Patienten bettlägerig, stumm und nicht ansprechbar [104].

Die Alzheimer-Krankheit tritt meistens in höherem Alter (>60 Jahre) auf und zeigt keine „klassische“ Vererbung, obwohl Häufungen der Krankheit innerhalb von Familien nachgewiesen wurden<sup>3</sup>. Das hauptsächliche neuropathologische Merkmal der Krankheit sind die massiven Ablagerungen von „Plaques“ im Gehirn, die durch besondere Färbetechniken sichtbar gemacht werden können.

Das Peptid  $\beta$ -Amyloid ( $A\beta$ ) wurde 1985 als der Hauptbestandteil dieser „Plaques“ erkannt und es wird vermutet, dass dieses Peptid die Ursache für die

---

<sup>3</sup>Es gibt eine Variante der Alzheimer-Krankheit, die genetisch bedingt ist, und vererbt wird. Die Krankheit tritt bei dieser Variante meist vor dem sechsten Lebensjahrzehnt auf.

Alzheimer-Krankheit darstellt.  $A\beta$  ist ein Teil eines größeren Transmembran-Proteins, des Amyloid-Precursor-Proteins (APP). Aus diesem Protein wird  $A\beta$  durch die (bisher noch hypothetischen) Proteasen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Secretase freigesetzt. APP und  $A\beta$  sind Bestandteile des normalen Stoffwechsels und an sich noch nicht krankhaft. Erst wenn  $A\beta$  seine native Konformation verliert und beginnt zu aggregieren, zeigen sich Symptome der Krankheit. Der neurotoxische Stoff ist wahrscheinlich ein lösliches Oligomer von  $A\beta$ . [105]

Es gibt mehrere Modelle, mit denen die Aggregation von  $A\beta$  beschrieben wird. Eine wichtige Beobachtung dabei ist, dass  $A\beta$ , wenn es aggregiert ist, eine  $\beta$ -Faltblatt-reiche Struktur annimmt. Die Struktur des Monomeren in Membrannachahmenden Lösungsmitteln ist aber hauptsächlich von  $\alpha$ -Helix gekennzeichnet<sup>4</sup>. Auch durch die Beobachtung der Aggregation mit Hilfe von CD-Spektroskopie kann man feststellen, dass der Anteil der  $\beta$ -Faltblatt Struktur an der Konformation während der Aggregation zunimmt [106, 107].  $A\beta$  durchläuft also offensichtlich eine Konformationsänderung bei der Aggregation.

Es wurde vorgeschlagen, dass die Konformationsänderung der Aggregation vorausgeht und einleitet [108, 109, 110]. Es wurden auch experimentelle Untersuchungen dazu angestellt, die zeigen, dass die Konformationsänderung im Monomer (also vor der Aggregation) stattfindet [106]. Besonders interessant ist eine Untersuchung von Chen et al. [78], in der mit ESI Massenspektrometrie möglicherweise zwei unterschiedliche Konformationen des Monomeren gefunden wurden und gleichzeitig kleine Oligomere beobachtet werden konnten.

Über den Verlauf der anschließenden Aggregation gibt es viele Untersuchungen, die sich auf Lichtstreuung, Sedimentation, Elektronenmikroskopie, Atomic Force Mikroskopie, Festkörper-NMR und andere Experimente stützen. Es bilden sich vermutlich zunächst „Keime“ von etwa 14 nm Durchmesser, die anschließend zu Protofibrillen assoziieren. Die Protofibrillen lagern sich zu Fibrillen zusammen und bilden dann mit anderen Fibrillen und weiteren Molekülen die „Plaques“ [111].

## 5.6 Experimenteller Aufbau

Die hier beschriebenen Experimente wurden im Labor von Dr. M. Baumann im Biomedicum Helsinki, einem der Universität Helsinki angegliederten Institut, durchgeführt. Dort stand für die Messungen ein ESI-Massenspektrometer mit Quadrupol-Ionenfalle zur Verfügung. Es handelt sich um ein Esquire LC 2200 der Firma Bruker, das auch in Abbildung 5.4 dargestellt ist. Das Gerät besteht aus einer Elektrospray-Quelle, die bei Atmosphärendruck betrieben wird, einer Einlasskapillare, einer differentiellen Pumpstufe mit zwei Skimmern, einem

---

<sup>4</sup>Die Untersuchungen wurden in Gemischen von organischen Lösungsmitteln und Wasser durchgeführt. Diese Bedingungen lassen sich rechtfertigen, wenn man bedenkt, dass  $A\beta$  etwa zur Hälfte aus dem in der Membran liegenden Teil des Vorläufers APP stammt.

Quadrupol-Ionguide zum Einkoppeln der Ionen in die Ionenfalle, der Ionenfalle und schließlich dem Detektor.

Bei Verwendung der ESI Quelle wird die Probe mit zusätzlicher Hilfe eines N<sub>2</sub>-Stroms entlang der Einlassnadel zerstäubt. Diese Einrichtung wird als Nebulizer bezeichnet. Den entstehenden Tröpfchen strömt ein erhitzter N<sub>2</sub>-Strom entgegen, um das Lösungsmittel schneller zu verdunsten. Dieser Strom wird als „dry gas“ bezeichnet.

Der gesamte Spray-Teil der Quelle, der bei Normaldruck liegt, lässt sich bei diesem Gerät leicht austauschen. Es können so andere Ionisierungsverfahren eingesetzt werden. Für diese Versuche stand zusätzlich ein online Nanospray-System zur Verfügung. Das Prinzip dieser Ionenquelle ist das gleiche wie bei normalem ESI, der Unterschied besteht nur in der verringerten Flussrate. Um mit ca. 1/10 der Probenmenge noch Signal zu bekommen, wird bei Nanospray die -sehr feine Nadel näher an die Einlassöffnung des Spektrometers geführt und direkt senkrecht zu der Öffnung positioniert. Der Spray wird dabei nur durch elektrostatische Kräfte produziert, eine Unterstützung durch den Nebulizer findet nicht statt. Die Position der Nadel lässt sich über drei Einstellschrauben in allen drei Raumrichtungen verstellen und über ein kleines Mikroskop beobachten. Durch das Mikroskop kann man auch feststellen, ob der Spray noch stabil und gleichmäßig ist.

Die Probenzufuhr erfolgte über eine Kunststoffkapillare, die Probendosierung erfolgt mit einer Mikroliterspritze (Hamilton) und einer Spritzenpumpe. Die Flußrate liegt dabei bei ca. 150 µl/h bei ESI und bei ca. 10 bis 20 µl/h bei Nanospray. Für ESI Messungen wurde die Probe direkt in eine 250µl Spritze gegeben und injiziert. Bei Nanospray Messungen wurde ein ständiger Lösungsmittelstrom mit der Spritzenpumpe produziert, damit ein stabiles Spray entsteht. In diesen Lösungsmittelstrom wurde die Probe (ca. 5µl) über einen HPLC Mikroinjektor luftfrei injiziert. Die feine Nadel mit einer Öffnung von 15 µm wurde durch Mikro-inline-Filter (Upchurch, 1µm SS Filter) vor Partikeln geschützt. Trotzdem traten immer wieder Verstopfungen in der Nadelspitze auf.

Wegen der etwas aufwendigen Technik wurde nach einiger Zeit auf die Nanospray Methode verzichtet. Dadurch mussten die Proben jedoch vor der Messung verdünnt werden, damit der Peptidverbrauch in einem vernünftigen Rahmen blieb. Messungen mit Nanospray wurden direkt mit der unverdünnten Lösung mit 50 bis 250 µM durchgeführt, ESI Proben wurden vor der Messung 1:10 verdünnt. Minimale Probenmengen sind bei Nanospray etwa 5 µl, bei normalem ESI etwa 50µl.

Die Probenreinigung und die Quantifizierung der Proben erfolge über HPLC. Dazu stand ein Beckman Gold 126 HPLC System zur Verfügung. Die Proben wurden über eine spezielle Peptid Säule (Supelco C5) getrennt und über einen UV-Detektor nachgewiesen. Die beiden Laufmitteln waren H<sub>2</sub>O/ 0.05% TFA (A) und Acetonitril/ 0.04% TFA (B). Die verwendete Methode war ein linearer Gradient von 100% A zu 30%A / 70%B in 10 Minuten und anschließend Eluation

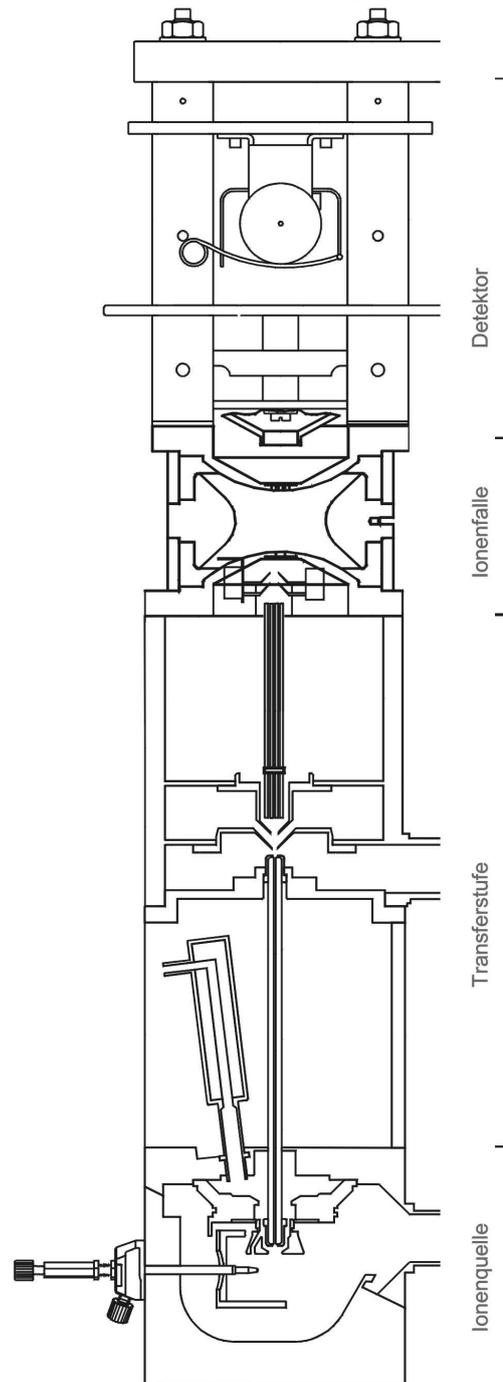


Abbildung 5.4: Aufbau des benutzten ESI Massenspektrometers. Die ESI Ionenquelle kann gegen eine Nanospray Quelle ausgetauscht werden. Die Zeichnung wurde freundlicherweise von der Firma Bruker zur Verfügung gestellt.

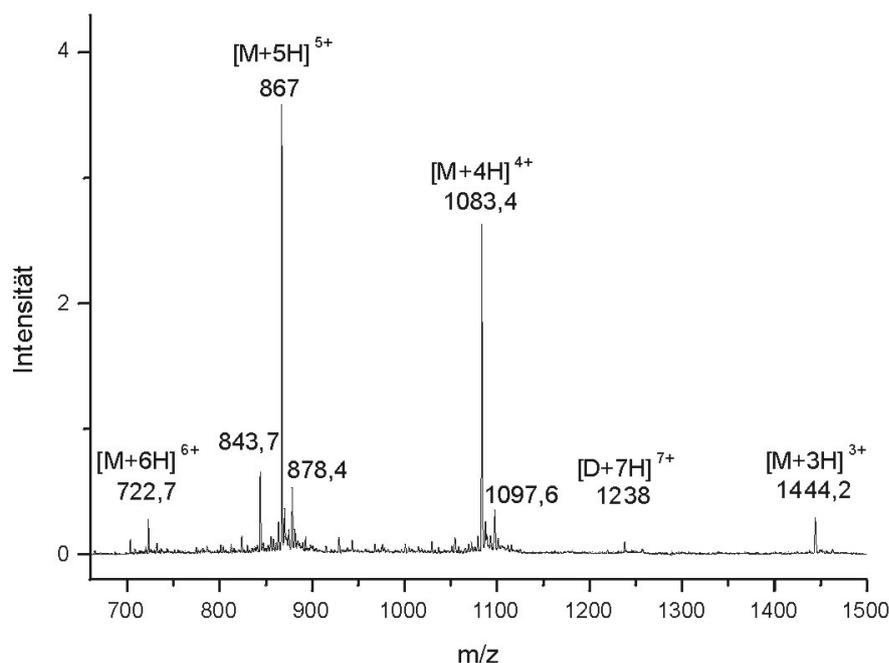


Abbildung 5.5: Massenspektrum von A $\beta$  ca. 70  $\mu$ M in H<sub>2</sub>O, 5% Acetonitril, 0.1% Essig mit Nanospray

mit konstanter Lösungsmittelzusammensetzung für weitere 15 Minuten. Zwischen den Läufen wurde die Säule wieder auf 100% A äquilibriert. Die verwendeten Lösungsmittel waren von höchster erhaltlicher Reinheit. Das Wasser war von MilliQ Qualität.

Synthetisches  $\beta$ -Amyloid (1-40) wurde von verschiedenen Herstellern bezogen (American Peptide Company, Sunnyvale, USA; Bachem, Bubendorf, Schweiz). Das Produkt von Bachem zeichnete sich dabei durch höhere Reinheit aus.

## 5.7 Ergebnisse

Zunächst soll hier das Massenspektrum von A $\beta$ (1-40) vorgestellt werden. Es ist in Abbildung 5.5 dargestellt. Man sieht hauptsächlich die mehrfach geladenen Ionen [M+3H]<sup>+3</sup>, [M+4H]<sup>+4</sup>, [M+5H]<sup>+5</sup>, [M+6H]<sup>+6</sup>. Man erkennt außerdem ein Dimer-Signal ([D+7H]<sup>+7</sup>), das jedoch relativ klein ist. Signale von höheren Oligomeren sind entgegen der in [78] berichteten Ergebnisse nicht vorhanden.

Bei dem Signal bei 843 m/z handelt es sich schon um ein Fragment von A $\beta$ , die weiteren Signale bei 878 und 1097 m/z sind wahrscheinlich auf eine acetylierte Form des Peptids zurück zu führen. Direkt neben den Hauptpeaks sieht man ebenfalls ein Wasser-Addukt. Die sehr kleinen Signale wurden nicht analysiert, sind aber vermutlich Fragmentierungsprodukte.

Der Schwerpunkt der Ladungsverteilung (CSD) verändert sich mit der Konzentration der Probe. Bei kleineren Konzentrationen gewinnen die höheren Ladungszustände an Bedeutung. Es ist außerdem zu beobachten, dass die mittlere Ladung bei Benutzung des normalen ESI-Einlasses erhöht wird. Ein repräsentatives ESI-Spektrum sieht daher völlig unterschiedlich aus. Zur Illustration ist in Abbildung 5.6 ein Spektrum bei ESI Einlass dargestellt. Man erkennt in diesem Spektrum zunächst die viel kleinere Signalintensität und die relativ dominanteren Fragmentsignale.

Der Einfluss der Konzentration auf die mittlere Ladung wurde systematisch untersucht. Die mittlere Ladung wird dabei aus den verschiedenen Monomer-Signalen nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{mittlere Ladung} = \frac{\sum (\text{Peakfläche} \cdot \text{Ladung})}{\sum \text{Peakflächen}} \quad (5.2)$$

Die Konzentrationsabhängigkeit der mittleren Ladung ist in Abbildung 5.7 dargestellt. Man erkennt einen großen Sprung bei Übergang zu einem anderen Einlasssystem, die Steigung der angepassten Gerade bleibt jedoch vor und nach dem Übergang gleich. Es wird vermutet, dass der Prozess, mit dem die mittlere Ladung mit der Konzentration abnimmt, bei beiden Einlasssystemen gleich bleibt. Die erstaunliche Änderung in der mittleren Ladung beim Wechsel der Einlasssysteme könnte auf der Geschwindigkeit der Desolvatisierung beruhen. Fenn [75] argumentiert, dass bei langsamerer Desolvatation mehr Ionen mit geringer Ladung entstehen, da die Ionen aus größeren Tropfen mit weniger Oberflächen-Ladungsdichte desorbiert werden.

Um den möglichen Einfluß der Konformationsänderung auf die Fragmentierung zu untersuchen, wurden MS/MS-Spektren der Hauptsignale  $[M+4H]^{+4}$  und  $[M+5H]^{+5}$  bei Nanospray Ionisation und  $[M+5H]^{+5}$  und  $[M+6H]^{+6}$  bei „normalem“ ESI. Die entsprechenden Spektren sind in Abbildungen 5.8, 5.9 und 5.10 dargestellt.

Auffällig bei diesen drei MS/MS Spektren ist, dass fast ausschließlich Fragmente vom b-Typ auftreten und von diesen auch nur die  $b_{30}$  bis  $b_{39}$  Ionen. Die wenigen y-Ionen, die auftreten, sind sehr wenig intensiv. Im Anhang (C.1, C.2, C.3) sind die genauen Lagen der Signale und die Zuordnung tabellarisch aufgeführt.

Der erste Untersuchungs-Ansatz war, die HPLC-gereinigte A $\beta$  Probe in einer Konzentration von etwa 250  $\mu\text{M}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ , 5% Acetonitril, 0.1% Essigsäure anzusetzen und bei 37° C zu inkubieren. Von der inkubierten Probe wurden täglich 5  $\mu\text{l}$  mit Nanospray vermessen und mit weiteren 5 bis 10  $\mu\text{l}$  wurden HPLC Analysen zur Bestimmung der Konzentration gemacht. Die mit HPLC messbare Konzentration änderte sich dabei über 4 Tage nur sehr langsam. Die Darstellung des Verlaufes von Gesamtsignal, Konzentration (nach HPLC) und mittlerer Ladung für zwei solcher Versuche ist im Anhang (C.4) zu finden. Die Änderung der Gesamtfläche aller Signale und die berechnete mittlerer Ladung war bei diesen Versuchen leider nicht reproduzierbar, was mehrere Gründe haben kann.

## 5 Konformationsanalyse von Peptiden

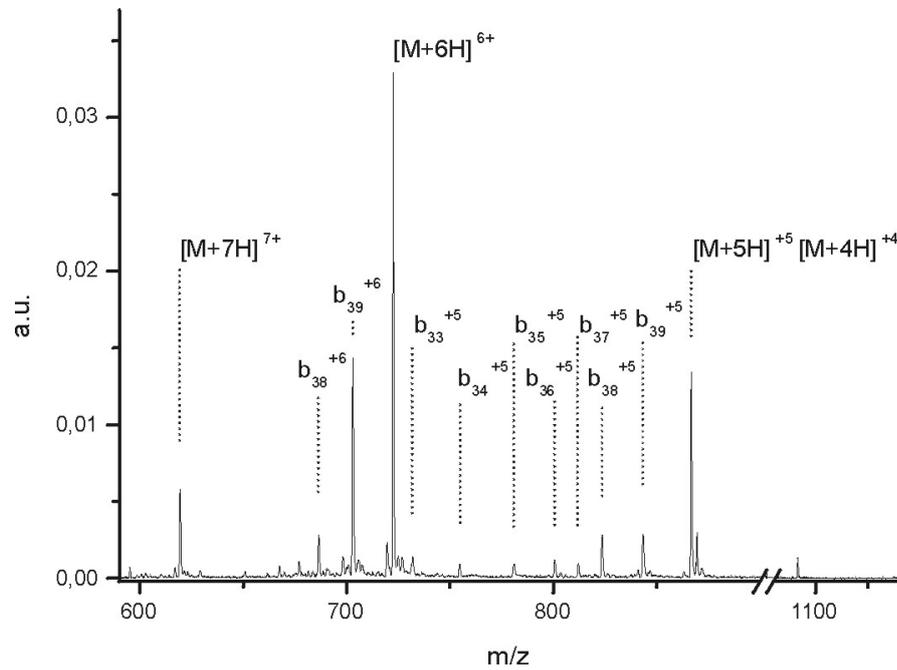


Abbildung 5.6: Massenspektrum von A $\beta$  ca. 5  $\mu$ M in H<sub>2</sub>O, 10% Acetonitril, 0.1% Essig mit ESI

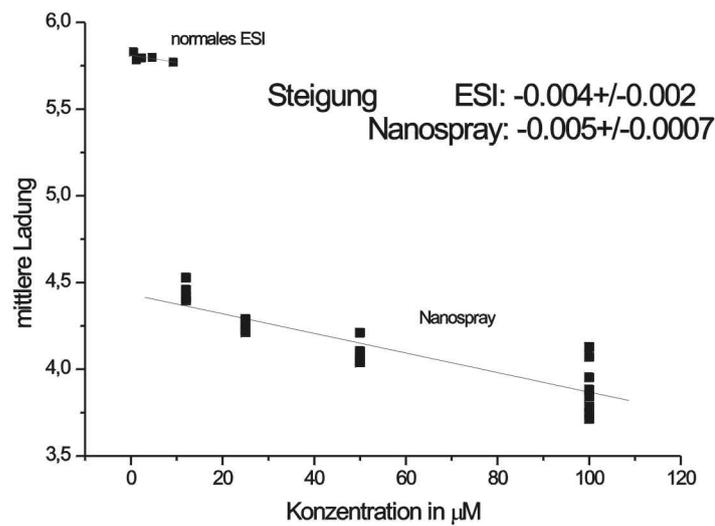
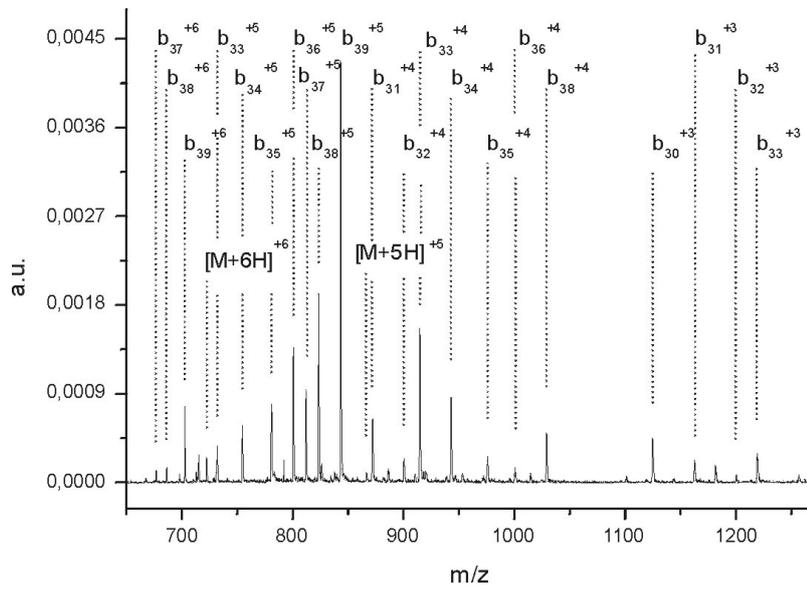
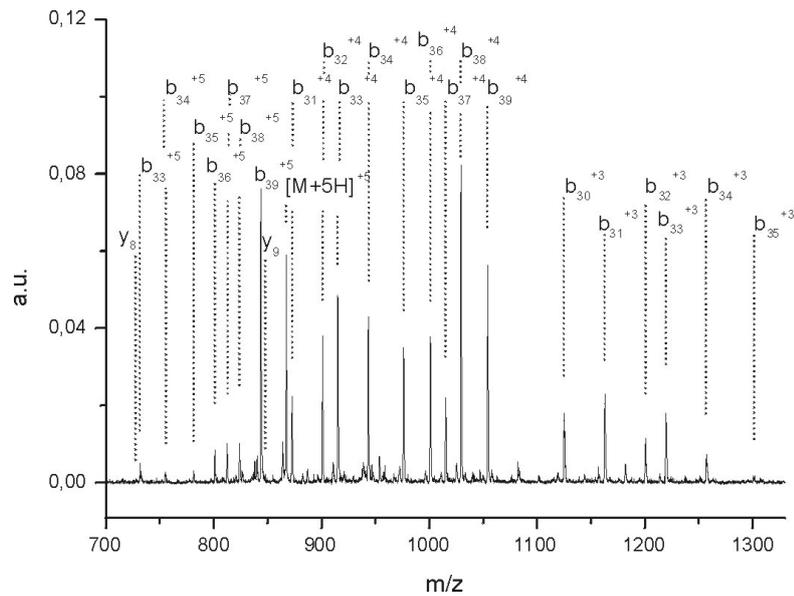


Abbildung 5.7: Konzentrationsabhängigkeit der mittleren Ladung von der Konzentration der Probe bei ESI und Nanospray.

Abbildung 5.8: MS/MS Spektrum des  $[M+6H]^{+6}$  Peaks von  $A\beta$ .Abbildung 5.9: MS/MS Spektrum des  $[M+5H]^{+5}$  Peaks von  $A\beta$ .

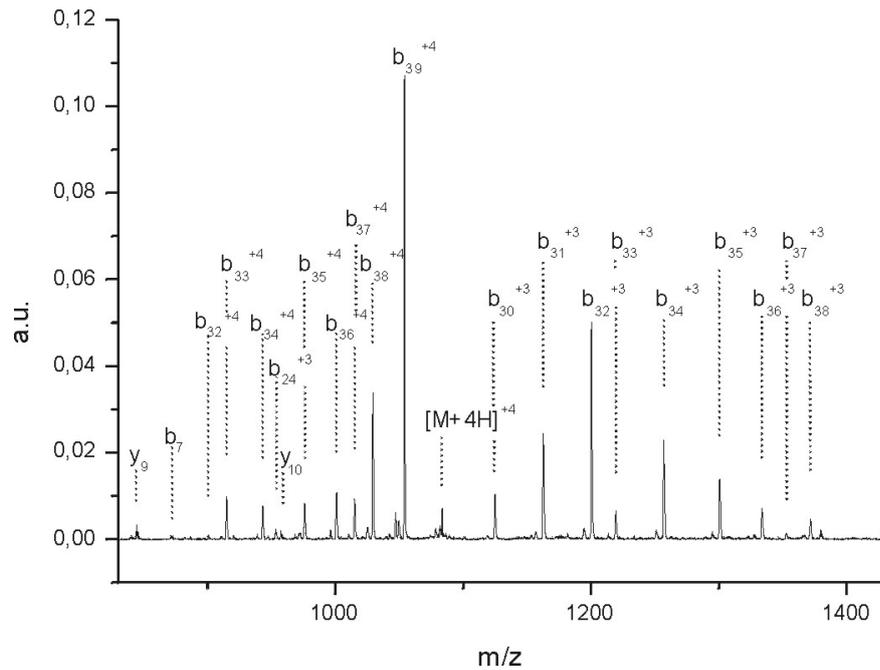


Abbildung 5.10: MS/MS Spektrum des  $[M+4H]^{+4}$  Peaks von  $A\beta$ .

Zum einen gab es bei der Versuchsdurchführung Probleme mit der Kondensation des Lösungsmittel am (kalten) Deckel des Gefäßes, was zu unkontrollierten Konzentrationsschwankungen in der Probe führte. Diese Probleme wurden gelöst, indem durch einen Einsatz das Volumen der Reaktionsgefäße verkleinert wurde. Ein anderes, vermutlich entscheidenderes Problem ist die notwendige Reinigung des Peptids per HPLC vor dem Versuch. Da das Peptid danach fast vollständig vom Lösungsmittel befreit werden muss, ergeben sich bei der Behandlung ebenfalls unkontrollierbare Bedingungen, die den Anfangszustand des Peptides verändern und somit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verhindern. Dass das Aggregationsverhalten von  $A\beta$  von der Vorbehandlung des Peptides stark abhängt, wurde bereits von mehreren Gruppen beschrieben [112, 113].

Es wurde berichtet, dass  $A\beta$  in den Lösungsmitteln DMSO<sup>5</sup> und HFIP<sup>6</sup> eine stabile, monomere Konformation einnimmt [107, 113]. Es wurde daher versucht durch Lösen des Peptids in diesen Lösungsmitteln nach der HPLC-Reinigung und der Befreiung vom Lösungsmittel den Konformationszustand zu standardisieren. Dabei stellte sich heraus, dass HFIP das Peptid wieder löst, DMSO aber nicht zuverlässig oder nicht in vertretbarer Zeit zu einem Wiederauflösen des Peptids führt.

In weiteren Messungen wurde anschließend die Abhängigkeit des gefundenen Si-

<sup>5</sup>Dimethylsulfoxid

<sup>6</sup>1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol

gnals von der Lösungsmittelzusammensetzung betrachtet. Es liegen Untersuchungen vor, nach denen sich besonders der  $\beta$ -Faltblatt Gehalt der  $A\beta$ -Konformation durch Zusatz von HFIP stark senken läßt [107]. Es wurde also eine Lösung von  $A\beta$  in 100% HFIP mit  $H_2O$  versetzt und sofort vermessen. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Anhang C.4 zu finden. Erkennbar ist, dass die Signalintensität der Spektren mit zunehmender HFIP-Konzentration zunimmt. Die mittlere Ladung nimmt auch mit zunehmender HFIP-Konzentration zu, die Änderung ist wegen der großen Fehler aber nicht signifikant. Die Untersuchung der MS/MS<sup>7</sup> Spektren bei verschiedenen HFIP Konzentrationen ergaben keine relativen Änderungen der Fragmentintensitäten, sondern nur ein allgemeines Ansteigen der Intensität mit zunehmender Intensität der Vorläuferionen (Daten nicht gezeigt).

Zwischenzeitlich wurde eine neue Charge Peptid eines anderen Herstellers (Bachem) angefangen, die offensichtlich eine höhere Reinheit als die vorhergehende Probe hatte, denn mit dieser Substanz konnten ohne vorherige Reinigung Spektren aufgenommen werden. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, die Probenvorbereitung stark zu vereinfachen und einfach durch direktes Auflösen der Probe vor der Messung stets gleiche Anfangsbedingungen zu erhalten. Dadurch kann in der aggregierenden Probe ein Zusatz von organischen Lösungsmitteln vermieden werden, der das Verhalten der Probe evtl. verfälschen könnte. Für die eigentliche Messung muss jedoch wieder ca. 10% Acetonitril zugesetzt werden, da sonst die Signalqualität stark abnimmt.

Die Messungen über einige Tage und über einige Stunden zeigen wieder nur ein generelles Absinken der Signalintensität, aber keine signifikante Änderung in der mittleren Ladung. Auch bei der Fragmentierung war keine signifikante Änderung festzustellen ausser der generellen Abnahme des Signals (Daten nicht gezeigt).

Als letzte Untersuchung wurde die Änderung des Signals bei pH-Wert Änderungen durchgeführt. Für diese Experimente liegen leider nicht sehr viele Daten über die Strukturänderung von  $A\beta$  vor, so dass die Ergebnisse nicht einfach mit Strukturänderungen korreliert werden können. Wie in Abbildung 5.11 dargestellt, nimmt die mittlere Ladung des Peptids bei steigendem pH-Wert ab. In den Spektren verschiebt sich das gesamte Peakmuster graduell zu geringerer Ladung (also höherem m/z Wert).

Eine genauere Auswertung der Veränderungen ergibt, dass die  $[M+7H]^{+7}$  und  $[M+6H]^{+6}$  Signale nahezu parallel an Intensität verlieren, während das  $[M+4H]^{+4}$  Signal an Intensität zunimmt. Das  $[M+7H]^{+7}$  nimmt eine Mittelstellung ein, seine Intensität nimmt ab. Die lineare Regression für alle vier Signale ist in Abbildung 5.12 zu sehen.

In einer Arbeit von Kaltashov [79] wird eine Analyse von ESI-Spektren vorgeschlagen, in der das Spektrum als Überlagerung von mehreren Verteilungen

---

<sup>7</sup>Massenspektrum der Fragmentierungsprodukte eines ausgewählten Vorläuferions, auch Tandem Massenspektrometrie genannt. Es werden zwei Massenanalytoren benötigt oder wie im Fall der Ionenfalle eine Isolierung der Vorläuferionen in der Falle und ein anschliessendes Massenspektrum durch massenabhängige, resonante Emission der Fragmentierungsprodukte.

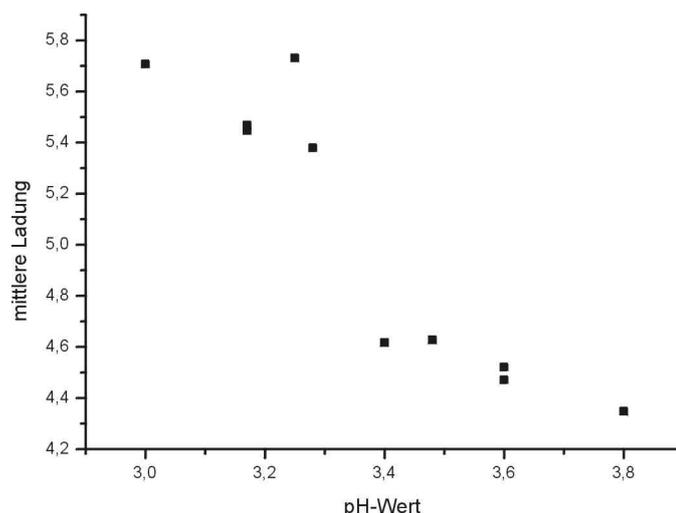


Abbildung 5.11: Änderung der mittleren Ladung von  $A\beta$  bei verschiedenen pH-Werten. Messung aus 10% Acetonitril, ca. 10mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  Puffer. Die pH Werte sind die gemessenen Werte des Puffers ohne Zusatz organischer Lösungsmittel.

angesehen wird. Jede dieser Verteilungen ist unabhängig von den äußeren Bedingungen (pH Wert) und nur die relativen Intensitäten der verschiedenen Verteilungen ändern sich. Jede Verteilung wird dabei einer unterschiedlichen Konformation des Proteins zugeordnet.

Die hier gefundenen Ergebnisse können vorsichtig mit dem gleichen Schema interpretiert werden, wenn man  $[\text{M}+7\text{H}]^{+7}$ ,  $[\text{M}+6\text{H}]^{+6}$  und  $[\text{M}+5\text{H}]^{+5}$  zu einer Verteilung zuordnet und  $[\text{M}+5\text{H}]^{+5}$  und  $[\text{M}+4\text{H}]^{+4}$  zu einer anderen. Der Intensitätsverlauf des  $[\text{M}+5\text{H}]^{+5}$  Signal wird dann durch eine Überlagerung zweier Prozesse beschrieben. Wegen der großen Fehlergrenzen sollte diese Interpretation aber sehr vorsichtig betrachtet werden.

## 5.8 Diskussion

Insgesamt konnten bei dieser Untersuchung keine definitiven Hinweise auf Konformationsänderung im ESI-Spektrum festgestellt werden. Bei den Experimenten zur Veränderung des Signals bei Inkubation in  $\text{H}_2\text{O}$  wurde nach anfänglichen Schwierigkeiten durch Verdunstung des Lösungsmittels nur ein allgemeines Abfallen des Signals beobachtet. Signifikante Änderungen der mittleren Ladung oder des Fragmentierungsmusters wurden nicht festgestellt.

Es ist möglich, dass subtile Effekte durch das relativ starke Schwanken der Signalintensität bei den Spektren überdeckt wurde. Vermutlich durch Änderungen im Sprayverhalten wurden Intensitätsschwankungen von ca. 15% beobachtet. Diese

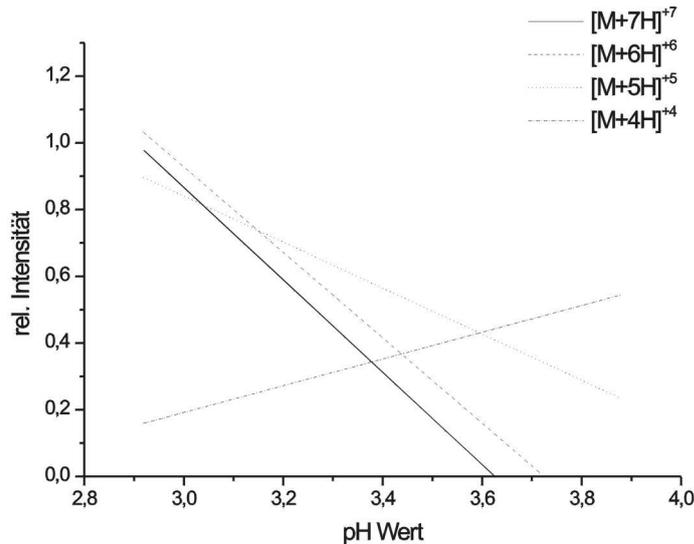


Abbildung 5.12: Änderung der Peakintensitäten von  $A\beta$  bei verschiedenen pH-Werten. Messung aus 10% Acetonitril, ca. 10mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  Puffer. Die gefundenen Steigungen sind:  $M^{+7}$  :  $-1.39 \pm 0.3$ ,  $M^{+6}$  :  $-1.28 \pm 0.3$ ,  $M^{+5}$  :  $-0.7 \pm 0.45$ ,  $M^{+4}$  :  $+0.4 \pm 0.45$

Schwankungen betreffen nicht das gesamte Spektrum gleichmäßig und können daher nicht durch einfaches Normieren der Spektren ausgeglichen werden.

Da in keinem Fall die in [78] berichteten Spektren genau reproduziert werden konnten, wird vermutet, dass die Charakteristik der ESI-Quelle sehr verschieden ist. Es wurden nie Signale von höheren Oligomeren als dem Dimeren beobachtet. Das könnte darauf hindeuten, dass die verwendete Quelle tendenziell niedrigere Ladungszustände erzeugt als die in [78] verwendete. Es konnte auch kein stabiles Signal aus reinem Wasser erhalten werden, was wiederum auf stark unterschiedliche Sprayeigenschaften hindeutet. Zur Messung wurden daher immer 5 bis 10% Acetonitril oder andere organische Lösungsmittel zugesetzt.

Besonders der nicht parallele Verlauf von Konzentration und Signalhöhe in C.1 könnte ein Zeichen dafür sein, dass ein Teil des Signals verloren geht, da es zu wenig geladen ist, um in den messbaren  $m/z$  Bereich zu fallen. Die in der Lösung vermutlich vorhandenen Oligomere sind im Spektrum nicht beobachtbar. Das absinkende Gesamtsignal zeigt also hauptsächlich die fortschreitende Aggregation. Da nur eine Konformation im Spektrum detektiert wird, sind hier auch keine Änderungen in CSD oder Fragmentierung festzustellen.

Ein ähnlicher Effekt wird auch bei der Messung des Signals in Abhängigkeit vom HFIP Gehalt des Lösungsmittels vermutet.

Auch wenn keine Änderungen in der Fragmentierung beobachtet wurden, kann es interessant sein, die Fragmentierung etwas genauer zu untersuchen. Zunächst

ist auffällig, dass nur Fragmente bis  $b_{30}$  beobachtet werden. In der folgenden Sequenz des Peptides:

DAEF**R** **H**DSGY EV**H****H****Q** **K**LVFF AEDVG SN**K**GA IIGLM VGGVV

sind die basischen Aminosäuren mit Boxen und die sauren Aminosäure durch Unterstreichung markiert. Wie man erkennt, sind im n-terminalen Teil des Peptides viele saure und basische Aminosäuren zu finden.

Wie bereits in Abschnitt 5.3.4.1 kurz erwähnt, können Ladungssolvatisierung und Salzbrücken wichtige Wechselwirkungen in der Gasphase sein. Die Vermutung liegt nahe, dass das Peptid in der Gasphase durch solche Wechselwirkungen relativ stark gebunden wird, so dass selbst wenn ein Bruch von Peptidbindungen stattfindet, keine Trennung der Produkte erfolgt. Nur Fragmentierungen im c-terminalen Ende des Peptids, das frei von sauren und basischen Aminosäuren ist, führen zu detektierbaren Fragmentierungsprodukten. Das erklärt auch das Fehlen großer  $\gamma$ -Ionen - die kleinen  $\gamma$ -Ionen treten selten und in geringer Intensität im Spektrum auf.

Ein weiteres Charakteristikum der MS/MS Spektren ist, dass bei Fragmentierung ohne Ladungsverlust und bei Ladungsverlust von 1 Ladung die  $b_{39}$  und  $b_{38}$  Ionen bevorzugt gebildet werden, wohingegen bei Verlust von 2 Ladungen kleinere Fragmente von  $b_{32}$  bis  $b_{34}$ . Dieses Verhalten kann vermutlich mit der Aminosäure Methionin (M) an Position 35 erklärt werden. Dieses ist die einzige polare Aminosäure im c-terminalen Ende des Peptids. Vermutlich werden die Ladungen an dieser Aminosäure und am C-Terminus bevorzugt lokalisiert. Daher sind Fragmentierungen mit Ladungsverlust von 2 vorrangig erst ab  $b_{34}$  zu erwarten.

Die einzige Untersuchung, bei der signifikante Änderungen im Spektrum gefunden wurden, war bei der Variation des pH Wertes. Es ist jedoch nicht klar, ob das Verhalten den Ladungszustand des Peptides in Lösung widerspiegelt (vgl. Abbildung 5.13) oder tatsächlich auf verschiedene Konformationen hinweist.

Besonders da die gefundene mittlere Ladung des Peptids mit der theoretisch berechneten mittleren Ladung bei dem entsprechenden pH Wert gut übereinstimmt, spricht vieles dafür, dass einfach das Lösungsverhalten wiederspiegelt wird. Die gefundenen Daten würden aber auch die Interpretation zulassen, dass zwei verschiedene Konformationen sich in ihrer relativen Intensität ändern. Durch die mit der Messung verbundenen großen Fehler kann diese Frage nicht eindeutig geklärt werden.

Zusammenfassend muss leider gesagt werden, dass bei diesem Peptid mit dem verwendeten ESI Massenspektrometer keine Aussagen über Konformationsänderungen gemacht werden können. Die Hauptgründe dafür sind wahrscheinlich der beschränkte Massenbereich des verwendeten Instrumentes und die Tendenz des Systems etwas weniger Ladung auf den Ionen unterzubringen. Ein Problem sind auch die systemimmanenten Schwankungen bei der Intensitätsmessung, die das Erkennen subtiler Effekte stark erschweren.

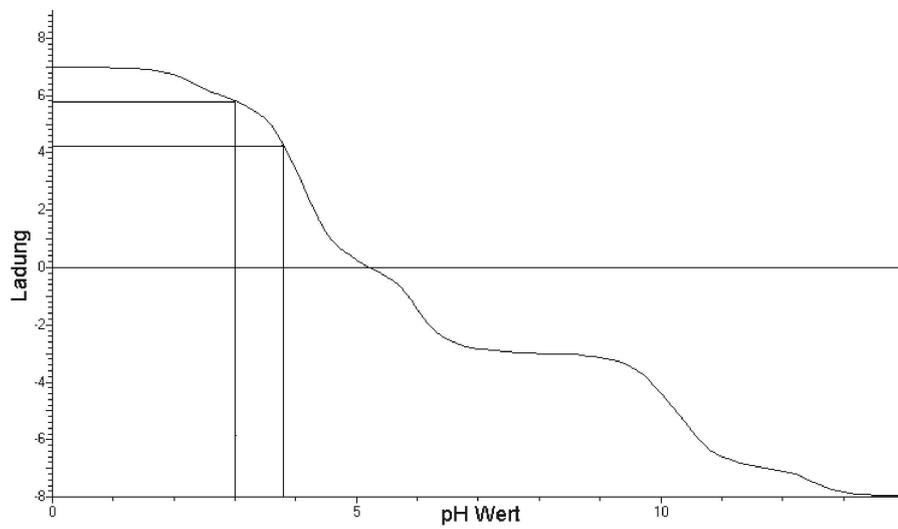


Abbildung 5.13: Theoretische Titrationskurve von A $\beta$ (1-40) erstellt mit Hilfe des Programms GPMAW.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden sehr viele Aspekte der Massenspektrometrie beleuchtet. Der Schwerpunkt lag dabei bei der Planung, Optimierung und Realisierung eines miniaturisierten Flugzeit-Massenspektrometers. In diesem Teil der Arbeit wurde eine neue Reflektor-Konstruktion entwickelt und theoretisch wie praktisch gezeigt, dass das neue Design wie erwartet funktioniert und Vorteile gegenüber anderen Reflektor-Konstruktionen hat.

Das Gerät kann sowohl mit resonanter Multiphotonenionisation als auch mit Laser Elektronenionisation zur Ionenerzeugung betrieben werden. Bei Verwendung der Laser Elektronenionisation treten jedoch in den Spektren stets Signale von Ta und TaO Ionen auf, die durch den Laserbeschuss aus dem als Elektronenquelle dienenden Draht herausgelöst werden. Dieser Effekt ist ausgeprägter, wenn eine Wellenlänge von 355 nm (2-Photonen-Prozess) als wenn eine Wellenlänge von 266 nm (1-Photonen-Prozess) genutzt wird. Diese Beobachtung und die starke Beeinflussung der Auflösung durch die Wellenlänge des verwendeten Lasers deuten darauf hin, dass bei dem Betrieb mit 355 nm thermische Prozesse eine Rolle spielen und die Zeit der Ionenerzeugung stark verlängern. Die erreichte Auflösung bei Betrieb mit 266 nm liegt bei ca. 120.

Bei Verwendung der resonanten Multiphotonen Ionisation ist die Massentrennung nochmals verbessert. Das Auflösungsvermögen liegt bei ca. 230 für eine Masse von 78 Da und sollte durch eine Veränderung des Einlasssystems noch einmal stark angehoben werden können.

Die Simulationsergebnisse dieses Gerätes wurden durch die Ergebnisse erster Messungen bestätigt. Sowohl die absolute Flugzeit als auch die Flugzeitunterschiede bei verschiedenen Beschleunigungsspannungen stimmten recht gut mit den theoretisch bestimmten Werten überein. Die gemessene Auflösung lässt sich in der Simulation reproduzieren, wenn angenommen wird, dass die turn-around Zeit der die Auflösung begrenzende Faktor ist.

Verbesserungen dieses Instruments sollten wegen der Begrenzung der Auflösung durch die turn-around Zeit zunächst am Einlasssystem ansetzen. Es gibt hier schon konkrete Pläne, den effusiven Einlass durch einen Überschall Gasstrahl zu ersetzen. Diese Änderung wird vermutlich in nächster Zeit realisiert werden. Es wird gehofft, dass dadurch nicht nur die Auflösung verbessert wird, sondern auch die Verweilzeit der Probe im Gerät stark verkürzt wird.

Parallel zu dem miniaturisierten ToF MS wurden ein anderes Massenspektro-

meter aufgebaut, das jedoch keine Neukonstruktion erforderte. Die MALDI-Quelle des Gerätes ist ein von Bruker kommerziell vertriebenes System, der Massenanalysator ist im Arbeitskreis bereits in einem anderen Gerät im Einsatz. Durch die andere Charakteristik der Quelle wurde jedoch eine Neuoptimierung der Reflektorspannungen nötig. Die Spannungen können nicht im laufenden Gerät optimiert werden, da ein Aufbau des benötigten Spannungsteilers ausserhalb des Vakuums bei den verwendeten Hochspannungen von bis zu 30 kV technisch zu aufwendig wäre.

Für das systematische Testen verschiedener Spannungen an den 17 Elektroden des Reflektors wurde ein Programm in der Skriptsprache SIMIONS, des Simulationsprogramms, geschrieben. Die mit diesem Programm gefundenen optimalen Spannungswerte werden dabei hauptsächlich durch den Ortsfehler in den Startbedingungen der Ionen bestimmt.

Das realisierte Gerät mit dem optimierten Reflektor zeigt etwas weniger Auflösung, als nach der Simulation erwartet. Dieses Manko könnte möglicherweise an einem zu klein gewählten Ortsfehler in der Simulation liegen.

Damit das Instrument auch zur Untersuchung von Fragmentierung eingesetzt werden kann, wäre der Einbau eines schnellen „ion gate“ von Vorteil. Andere Erweiterungen sind zur Zeit nicht geplant.

Die mit dem MALDI-MS vorgesehenen Messungen zur Konformationsanalyse konnten leider aus experimentellen und zeitlichen Gründen nicht mehr abgeschlossen werden und fanden daher keinen Eingang in diese Arbeit.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente zur Konformationsanalyse wurden vollständig während eines Forschungsaufenthalts in Helsinki/Finnland durchgeführt. Die Ergebnisse lassen leider keinen Schluss auf eine Konformationsänderung des verwendeten Peptides  $\beta$ -Amyloid schliessen, obwohl ein solches Verhalten aufgrund anderer Untersuchungen erwartet werden musste.

Da die Konformationsänderung bei diesem Peptid mit Aggregation verbunden ist, wird vermutet, dass bereits kleinere Oligomere nicht mehr hoch genug geladen werden, um im messbaren  $m/z$  Bereich zu erscheinen. Dieses Problem könnte durch die Verwendung eines anderen ESI Systems und/oder eines Massenanalysators mit größerem Massenbereich umgangen werden.

Obwohl diese Arbeit kaum Hinweise auf Konformationsänderungen bei  $\beta$ -Amyloid mit Massenspektrometrie finden konnte, kann man annehmen, dass sich mit verbesserten experimentellen Bedingungen hier wichtige Ergebnisse ergeben werden. Auf jeden Fall wird die Massenspektrometrie besonders wegen ihrer sehr hohen Sensitivität in der biochemischen Forschung weiter an Bedeutung gewinnen. Wahrscheinlich wird die Massenspektrometrie auch bei der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen und innerhalb von Molekülen bald eine Standardmethode sein.

# A Mini-ToF-MS

## A.1 Geometriedateien

### A.1.1 Ionenquelle, zweidimensional

```
pa_define(120,149,1,c,y,E)
locate(0,0,0,6)
;der Skalierungsfaktor 2 wurde benutzt, damit die
;Zahlenangaben in der Datei
;den Maßen in mm entsprechen
{
;-----
;HÜLLE
e(0)
{fill
{
within{box(0,40,20,41)}
within{box(0,0,0.5,40)}
;geerdetes Gehäuse mit Wandstärke 1 mm
}
}
;platten
e(0) {
fill { within{box(17,0,17,5)}
within{box(17,5,17.5,39)}}
}
e(1) {
fill{ within{box(1,0,1.5,38)}}}
e(2) {
fill{ within{box(6.1,5,6.6,38)}}}
}
```

### A.1.2 Ionenquelle mit Draht, dreidimensional

```

pa_define(50,83,166,p,y,E)
locate(0,0,83,2)
;der Skalierungsfaktor 2 wurde benutzt, damit die
;Zahlenangaben in der Datei
;den Maßen in mm entsprechen
{
;-----
;HÜLLE
e(0)
{Rotate_Fill (360){
within{box(0,40,24.5,41)}
within{box(0,0,0.5,40)}
;geerdetes Gehäuse mit Wandstärke 1 mm
}
}
;platten
e(1) {
Rotate_Fill(360) { within{box(4,2,5,22.5)}}
}
e(3) {
Rotate_Fill(360) { within{box(9.6,2,10.6,22.5)}}
}
e(4) {
Rotate_Fill (360){ within{box(21,2,22,22.5)}}
}
;Draht
e(2) {
fill{ within {box3d(7.3,0,0,7.3,22.5,0)
}}}
}

```

### A.1.3 Reflektor, fixer Teil

```

;Rumpfgerät ohne Reflektor
;alle Spannungen auf 0 Volt, Reflektorspannung ist auf 1000 Volt
;das Reflekttron Geometriefile wird automatisch von Excel erzeugt
;und per include eingefügt. Die Datei muß Reflekt.gem heißen.

```

## A Mini-ToF-MS

```
pa_define(245,83,1,c,y,E)
;zylindersymmetrisches E-Feld mit den geplanten Ausmaßen
;122 mal 41 mm, also mit einer Auflösung von 0.5 mm pro Gitterpunkt

locate(0,0,0,2)
;der Skalierungsfaktor 2 wurde benutzt, damit die Zahlenangaben
;in der Datei den Maßen in mm entsprechen
{
;-----
;HÜLLE
e(0)
{fill
{
within{box(0,40,29,41)}

;geerdetes Gehäuse mit Wandstärke 1 mm
}
}
;-----

;der Detektor
e(-1500) {
fill {
within{box(26,6,26.5,13.5)}
}
}

;geerdete Platte und Bohrung im Detektor
e(0) {
fill {;erst die Röhre
within{ box(12,3,28.5,4)}
;dann die Platte
within{ box(12,4,12.5,34.5)}
}
}
;-----
;das Gitter
e(0) {

fill {
within{box(30.6,40,30.6,0)}
}
}
```

```

;-----
;HINTERES ENDE

locate(30.6,0,0) {
;-----

;HÜLLE
e(0) {
fill {
within {box(0,40,92,40.5)};röhre
within {box(91,0,92,40.5)};endabschluß
within {box(0,0,0,40.5)};gitter
};ende fill
} ;ende e(0)

;-----
;REFLEKTOR
e(1000) { ;e1
include(reflekt.gem)
;das Reflektron ist in einem extra File
} ;ende e1
;-----
} ;ende locate(30.6,0,0)
};ende skalierung mal zwei--

```

#### A.1.4 Reflektor, fixer Teil dreidimensional

```

pa_define(120,122,122,p,nichtgespiegelt,E)
locate(,,1.5) {; skalierung mal 1.5

```

```

;-----
;HÜLLE
locate (0,39.33,39.33) {; drehachse
e(0) {
rotate_fill (360) {
within {box(0,39,80,39.5)};röhre
within {box(79.5,0,80,39.5)};endabschluß
within {box(0,0,0,39.5)};gitter
};ende rotate
} ;ende e(0)

```

```
};ende locate  
  
;-----  
;REFLEKTOR  
e(1000){  
include(reflekt3dvar.gem)  
}  
;-----  
};ende skalierung mal zwei
```

### A.1.5 Reflektorteller

```
;  
; automatisch erzeugtes Geometriefile  
;xPos=                68  
;Höhe=                7  
;Konst. =             3  
  
locate(                68,                0,                0){  
fill { within { box(1.5,0,0,36)}}  
locate(0,36,,,,,270){  
fill { within{ polyline(  
                0,                -7.0000,  
                0.5,                -5.9254,  
                1,                -5.0157,  
                1.5,                -4.2457,  
                2,                -3.5939,  
                2.5,                -3.0422,  
                3,                -2.5752,  
                3.5,                -2.1798,  
                4,                -1.8452,  
                4.5,                -1.5619,  
                5,                -1.3221,  
                5.5,                -1.1192,  
                6,                -0.9473,  
                6.5,                -0.8019,  
                7,                -0.6788,  
  
                ...und so weiter...  
  
                32,                -0.0002,  
                32.5,                -0.0001,
```

```

33,          -0.0001,
33.5,        -0.0001,
34,          -0.0001,
34.5,        -0.0001,
35,          -0.0001,
35.5,        -0.0001,
36,          0.0000,
36,          0,
0,           0)}}

```

```

}}
```

### A.1.6 Reflektorteller, dreidimensional

```

;
; automatisch erzeugtes 3D-Geometriefile

;für die Parameter
;xPos= 68
;Höhe= 7
;Konst. = 3
;Winkel= 3

locate( 68.00 ,0 ,0 ){
locate(0,39.33,39.33,1,0,3 ) { ;Drehachse des Reflektors
rotate_fill (360) { within { box(1.5,0,0,36)}} ;Grundplatte
rotate_fill (360) {
locate(0,36,,,270){
within{ polyline(
0 ,-7.00 ,
0.5 ,-5.93 ,
1 ,-5.02 ,
1.5 ,-4.25 ,
2 ,-3.59 ,

```

...und so weiter...

```

32 ,0.00 ,
32.5 ,0.00 ,
33 ,0.00 ,

```

*A Mini-ToF-MS*

33.5 ,0.00 ,  
34 ,0.00 ,  
34.5 ,0.00 ,  
35 ,0.00 ,  
35.5 ,0.00 ,  
36 ,0.00 ,  
36 ,0.00 ,  
0 ,0.00 )}}

}}}

## A.2 Simplex Algorithmus: Spiegelung an der Hyperebene

in0 : 4\*4 Matrix mit 4 Spaltenvektoren mit den Angaben x-Pos, Höhe, Konstante und Funktionswert.

in1 : Koeffizient mit folgenden Eigenschaften:

in1=1 -> gespiegelt

in1=-0.5 -> Abstand verdoppelt

in1=1.5 -> Abstand verdoppelt und gespiegelt

in1=0.25 -> Abstand halbiert

in1=0.75 -> Abstand halbiert und gespiegelt

in2 :ist nicht Null, wenn der zweitschlechteste Punkt gespiegelt werden soll

a := x\_Position   b := höhe   c := konstante

in0 := zsort(in0, 3)      P0 hat den kleinsten Funktionswert

zweiter(X, y) := if y

A	←	X <sup>(0)</sup>	in0 := zweiter(in0, in2)
X <sup>(0)</sup>	←	X <sup>(1)</sup>	
X <sup>(1)</sup>	←	A	
zweiter	←	X	

$$P0 := \begin{pmatrix} \text{in0}_{0,0} \\ \text{in0}_{1,0} \\ \text{in0}_{2,0} \end{pmatrix} \quad P1 := \begin{pmatrix} \text{in0}_{0,1} \\ \text{in0}_{1,1} \\ \text{in0}_{2,1} \end{pmatrix} \quad P2 := \begin{pmatrix} \text{in0}_{0,2} \\ \text{in0}_{1,2} \\ \text{in0}_{2,2} \end{pmatrix} \quad P3 := \begin{pmatrix} \text{in0}_{0,3} \\ \text{in0}_{1,3} \\ \text{in0}_{2,3} \end{pmatrix}$$

A := P1 - P2      B := P1 - P3      A und B sind die Differenzvektoren

D(a, b, c) := (a   b   c)

F := stapeln[ (A)<sup>T</sup>, (B)<sup>T</sup> ]      Erzeuge die Matrix zur Vektormultiplikation

E(a, b, c) := stapeln(D(a, b, c), F)

n :=  $\begin{pmatrix} |E(1,0,0)| \\ |E(0,1,0)| \\ |E(0,0,1)| \end{pmatrix}$       n = ■      n ist der Normalenvektor auf der Hyperfläche

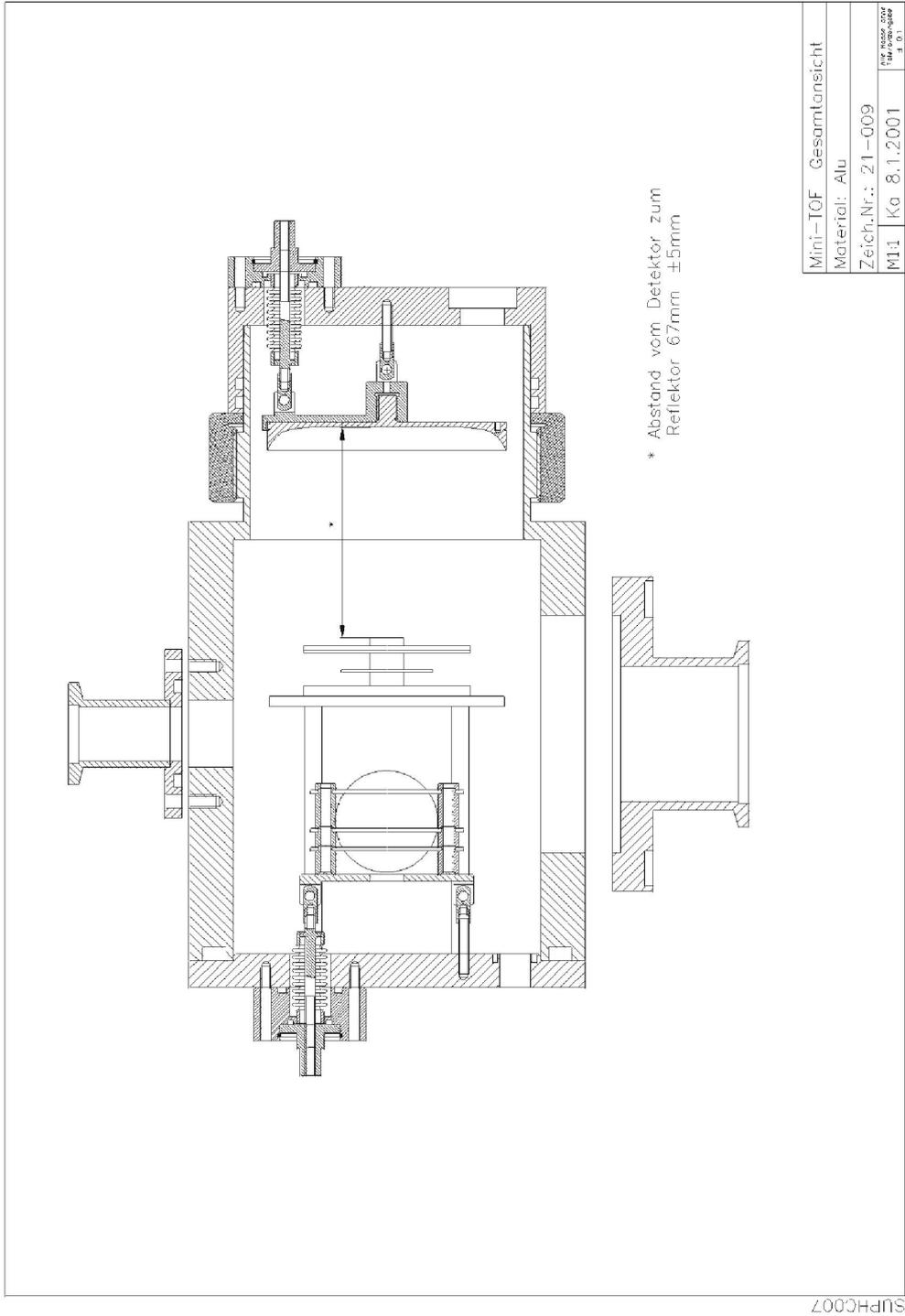
normale :=  $n \cdot \frac{1}{|n|}$       normale ist der auf Einheitslänge normierte Normalenvektor

abstand := normale · P0 - normale · P1      abstand ist der Abstand des Punktes P0 von der Hyperfläche

out0 := P0 - 2 · in1 · abstand · normale

out0 = ■      out0 ist der neue Punkt:

### A.3 technische Zeichnung



## A.4 Fotografie



# B MALDI-ToF-MS

## B.1 Geometriedateien

```
;Reflektor für MALDI-TOF
;eine Einheit entspricht 0.25 mm
;um die Felddurchgriffe gut zu simulieren, wurde eine
;Strecke von 220 mm vor dem Reflektor mit in das Feld
;einbezogen
```

```
pa_define(1500,404,1,cylindrical,y_mirror)
;Feld mit den Ausmaßen 375 mm mal 202 mm in Zylindersymmetrie
```

```
e(0)                                ;Außenhülle
    {                                ;innerer Durchmesser 100 mm
      fill{within{box(0,400,1499,403)}}
    }
    locate(880,0,0,1,0,0,0)
    {
      e(1)
        {                            ;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm
          fill{within{box(4,280,8,339)}}
        }
      e(2)
        {                            ;Öffnung 45 mm, Dicke 2 mm
          fill{within{box(38,180,46,339)}}
        }
      e(3)
        {                            ;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm
          fill{within{box(72,240,76,339)}}
        }
      e(4)
        {                            ;Öffnung 45 mm, Dicke 2 mm
          fill{within{box(106,180,114,339)}}
        }
    }
```

```

}
e(5)
{
;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm
fill{within{box(145,240,149,339)}}
}
e(6)
{
;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm
fill{within{box(182,240,186,339)}}
}
e(7)
{
;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm
fill{within{box(220,240,224,339)}}
}
e(8)
{
;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm
fill{within{box(257,240,261,339)}}
}
e(9)
{
;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm
fill{within{box(294,240,298,339)}}
}
e(10)
{
;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm
fill{within{box(331,240,335,339)}}
}
e(11)
{
;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm
fill{within{box(368,240,372,339)}}
}
e(12)
{
;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm
fill{within{box(406,240,410,339)}}
}
e(13)
{
;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm
fill{within{box(443,240,447,339)}}
}
e(14)
{
;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm
fill{within{box(480,240,484,339)}}
}
e(15)
{
;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm

```

```
        fill{within{box(517,240,521,339)}}
    }
e(16)
    {
        ;Öffnung 70 mm, Dicke 1 mm
        fill{within{box(554,240,558,339)}}
    }
e(17)
        ;Endelektrode ohne Loch
    {
        ;Öffnung 0 mm, Dicke 2 mm
        fill{within{box(597,0,605,339)}}
    }

}
```

## B.2 Programm zur Spannungsoptimierung

```
;scout2.prg
;Programm für das Potetialarray SCOUT2.PAO
;-----
Seg Define_Data
;Variablendefinition
defa _endspannung 22000

defa _bremsfeld1start 6000
defa _bremsfeld1ende 8000
defa _bremsfeld1schritte 10

defa _bremsfeld2start 8000
defa _bremsfeld2ende 17200
defa _bremsfeld2schritte 10

defa _linsestart 5000
defa _linseende 8000
defa _linseschritte 10

defa _ionenzahl 104
;diese Variablen werden nicht zum Einstellen angezeigt
defa aktuell1 0
defa aktuell2 0
defa aktuell3 0
defa elektrode1 1
defa elektrode2 1
```

## B.2 Programm zur Spannungsoptimierung

```
defa elektrode3 1
defa flag1 0
defa flag2 0
;-----
Seg Init_P_Values

rcl flag1
x=0 gto anfang
;zweiten Zähler hochzählen, ersten zurücksetzen
0
sto aktuell1
1
rcl aktuell2
+
sto aktuell2
0
sto flag1

rcl flag2
x=0 gto anfang
;dritten Zähler hochzählen, zweiten und ersten zurücksetzen
0
sto aktuell2
1
rcl aktuell3
+
sto aktuell3
0 sto flag2

; Linsenspannung setzen
lbl anfang
rcl _linseschritte
x>0 gto weiter
;falls 0 eingegeben, nimm den Startwert
rcl _linsestart
sto Adj_elect03
sto elektrode3
exit

lbl weiter
rcl _linseende
rcl _linsestart
```

## B MALDI-ToF-MS

```
-  
rcl _linseschritte  
/  
rcl aktuell3  
*  
rcl _linsestart  
+  
sto elektrode3  
sto Adj_Elect03  
;-----
```

### NÄCHSTER PROGRAMMTEIL

```
;reflekt.prg  
;Programm für das Potentialarray REFLEKT.PAO  
;-----  
Seg Define_Data  
;Variablendefinition  
defa _endspannung 22000
```

...gleiche Variablen wie in scout2.prg...

```
defa flag2 0  
;-----  
Seg Init_P_Values  
;Einstellung der Spannungswerte bevor die Ionen losfliegen  
rcl _endspannung  
sto Adj_elect17  
;letzte Elektrode des Reflektors auf Potential legen  
0  
Sto Adj_Elect01  
;erste Elektrode erden  
rcl _bremsfeld1schritte  
x>0 gto weiter  
;falls 0 eingegeben, nimm den Startwert  
rcl _bremsfeld1start  
sto elektrode1  
sto Adj_Elect02  
gto weiter3  
  
lbl weiter  
rcl _bremsfeld1ende  
rcl _bremsfeld1start
```

```
-  
rcl _bremsfeld1schritte  
/  
rcl aktuell1  
*  
rcl _bremsfeld1start  
+  
sto elektrode1  
sto Adj_Elect02  
  
lbl weiter3  
rcl _bremsfeld2schritte  
x>0 gto weiter2  
;falls 0 eingegeben, nimm den Startwert  
rcl _bremsfeld2start  
sto elektrode2  
rcl _bremsfeld2start  
sto Adj_elect04  
gto weiter4  
  
lbl weiter2  
rcl _bremsfeld2ende  
rcl _bremsfeld2start  
-  
rcl _bremsfeld2schritte  
/  
rcl aktuell2  
*  
rcl _bremsfeld2start  
+  
sto elektrode2  
sto Adj_Elect04  
  
lbl weiter4  
;die restlichen Spannungen setzen  
rcl Adj_elect02  
+  
sto Adj_Elect03  
;sto test3  
rcl Adj_Elect17  
rcl Adj_Elect04  
-  
13
```

## B MALDI-ToF-MS

```
/
sto plus
;Spannungsdifferenz zwisch zwei Platten
;im Reflektorfeld
rcl Adj_Elect04
+
sto Adj_Elect05
;sto test5
rcl plus
+
sto Adj_Elect06
```

... für alle Elektroden ähnlich...

```
rcl plus
+
sto Adj_Elect16
;-----
1
rcl aktuell1
+
sto aktuell1 ;Zähler plus 1
;-----
Seg Initialize
;zu Anfang auf Rerun stellen
1
sto rerun_flym
;-----
```

### NÄCHSTER PROGRAMMTEIL

```
;-----
;detektor.prg
;Programm für das Potentialarray DETEKTOR.PA0
;-----
Seg Define_Data
;Variablendefinition
defa _endspannung 22000
```

...gleiche Variablen wie in scout2.prg...

```
defa flag2 0
;-----
Seg Terminate
;wird nachdem alle Ionen angekommen sind
```

## B.2 Programm zur Spannungsoptimierung

```
;für jedes Ion einmal abgearbeitet

rcl tofmin
rcl Ion_time_of_flight
x<y sto tofmin

rcl tofmax
rcl Ion_time_of_flight
x>y sto tofmax
;liegt ein Extremwert vor?, wenn ja speichern
rcl Ion_Number
rcl _ionenzahl
x>y exit
;wenn noch nicht das letzte Ion angekommen ist,
;beende die Verarbeitung hier
1
sto rerun_flym
rcl tofmax
rcl tofmin
-
;max. Zeitdifferenz
rcl elektrode3
rcl elektrode2
rcl elektrode1
mess ; # ; # ; # ; #
;schreibe Spannungen und Zeitdifferenz
0
sto tofmax
1000
sto tofmin
;Initialisierung der Variablen für den nächste Flug
rcl aktuell1
rcl _bremsfeld1schritte
x>y
exit
;nur erste Spannung aendern

rcl aktuell2
rcl _bremsfeld2schritte
x>y
gto zuruecksetzen1
;erste Spannung zureuck, zweite erhoehen
```

## B MALDI-ToF-MS

```
rcl aktuell3
rcl _linseschritte
x>y
gto zuruecksetzen2
;erste und zweite zurueck, dritte hoch

0
sto rerun_flym
exit

lbl zuruecksetzen1
1
sto flag1
exit
lbl zuruecksetzen2
1
sto flag1
1
sto flag2
exit
;flag1 und flag2 werden benutzt, um in scout2.prg die
;Elektrodezähler zurückzusetzen
;-----
```

## NÄCHSTER PROGRAMMTEIL

```
;-----
;umgebung.prg
;Programm für das Potentialarray UMGEBUNG.PAO
;ein sehr grobes Array, um auch die Ionen zu erfassen,
;die nicht am Detektor ankommen
;-----
;Variablendefinition
defa _endspannung 22000

...gleiche Variablen wie in scout2.prg...

defa flag2 0
;-----
Seg Terminate
;wird nachdem alle Ionen angekommen sind
;für jedes Ion einmal abgearbeitet
rcl Ion_Number
rcl _ionenzahl
```

## B.2 Programm zur Spannungsoptimierung

```
x>y exit
1
sto rerun_flym
rcl tofmin
1000
x>y gto mitzeit
;falls kein Ion am Detektor angekommen ist
;gib -- als Zeitunterschied aus
rcl elektrode3

rcl elektrode2
rcl elektrode1
mess ; # ; # ; # ;--
gto ende

lbl mitzeit
rcl tofmax
rcl tofmin
-
rcl elektrode3
rcl elektrode2

rcl elektrode1

mess ; # ; # ; # ; #
lbl ende
0
sto tofmax
1000
sto tofmin
```

... gleicher Code wie in detektor.prg...

```
lbl zuruecksetzen2
1
sto flag1
1
sto flag2
exit
```

### B.3 Widerstandswerte Spannungsteiler

Elektroden Nr.	Widerstand	Zusammen- setzung	max. Lei- stung bei 30 kV
1-2	66.6 M $\Omega$	200 M $\Omega$ parallel zu 100 M $\Omega$	0.60W
2-3	60.0 M $\Omega$	150 M $\Omega$ parallel zu 100 M $\Omega$	0.54W
3-4	60.0 M $\Omega$	150 M $\Omega$ parallel zu 100 M $\Omega$	0.54W
4-5	10.0 M $\Omega$	10 M $\Omega$	0.09W
5-6	10.0 M $\Omega$	10 M $\Omega$	0.09W
alle folgenden Widerstände sind gleich			
16-17	10 M $\Omega$	10 M $\Omega$	0.09W

### B.4 verwendete Hochspannungsnetzgeräte

Modell	max. Spannung	Zweck
Fug HCD14-20000	20 kV	Repeller
Fug HCN140-35000	35 kV	Linse
Fug HCN35M-35000	35 kV	Reflektor
Fug HCN140-12500	12.5 kV	Detektor



**B.6 Software Parameter**

Funktion	Wert	Kanal	Stecker	Pin
Probenmotor X Offset	3.85	4	J639/I B	8
Probenmotor X Range	-3.14	4	J639/I B	8
Probenmotor Y Offset	3.88	5	J639/I B	14
Probenmotor Y Range	-3.15	5	J639/I B	14
Laser Atten. Offset	0.8	9	J639/I D	47
Laser Atten. Range	6.4	9	J639/I D	47
Laser Fokus Offset	0.5	10	J639/I D	50
Laser Fokus Range	6.7	10	J639/I D	50
Digitizer1 Analog Offset	13	–	–	–
Digitizer2 Analog Offset	2	–	–	–
Digitizer1 Digital Offset	20	–	–	–
Digitizer2 Digital Offset	21	–	–	–

# C Konformationsanalyse mit Massenspektrometrie

In den folgenden Tabellen sind die theoretischen und gefundenen (anscheinenden) Massen der mehrfach geladenen Ionen als mittlere Massen und die Massen der einfach geladenen Ionen als monoisotopische Massen angegeben.

Die inneren Ionen werden mit Sequenz in 1-Buchstaben-Code angegeben. Innere Fragmente wurden nur bei der Fragmentierung aus 250 $\mu$ M Lösung gefunden und auch dort nur in sehr kleinen Intensitäten.

Die theoretischen Massen beruhen auf der Sequenz von A $\beta$ :

DAEFR	HDSGY
EVHHQ	KLVFF
AEDVG	SNKGA
IIGLM	VGGVV

oder im 3-Buchstaben-Code:

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-	His-Asp-Ser-Gly-Tyr-
Glu-Val-His-His-Gln-	Lys-Leu-Val-Phe-Phe-
Ala-Glu-Asp-Val-Gly-	Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-	Val-Gly-Gly-Val-Val

und wurden mit Hilfe des Programmes „MS-Product“, das auf der Internetseite <http://prospector.ucsf.edu/> zu finden ist, berechnet.

## C.1 Zuordnung der Fragmentierungsprodukte von $[M+6H]^{+6}$

theoretische Masse	gefundene Masse	Zuordnung
677.26	676,8	$b_{37}^{+6}$
686.77	686,3	$b_{38}^{+6}$
703.28	702,7	$b_{39}^{+6}$
–	715,2	nicht zugeordnet
722.65	722,3	$[M + 6H]^{+6}$
732.21	731,9	$b_{33}^{+5}$
754.84	754,7	$b_{34}^{+5}$
781.08	780,9	$b_{35}^{+5}$
–	792	nicht zugeordnet
800.91	800,6	$b_{36}^{+5}$
812.32	812	$b_{37}^{+5}$
823.73	823,4	$b_{38}^{+5}$
843.56	843,2	$b_{39}^{+5}$
866.98	866,5	$[M + 5H]^{+5}$
872.46	872	$b_{31}^{+4}$
–	886,2	nicht zugeordnet
900.75	900,2	$b_{32}^{+4}$
915.01	914,6	$b_{33}^{+4}$
943.3	942,9	$b_{34}^{+4}$
976.1	976,1	$b_{35}^{+4}$
1000.88	1000,8	$b_{36}^{+4}$
1029.41	1029	$b_{38}^{+4}$
1125.22	1124,6	$b_{30}^{+3}$
1162.94	1162,7	$b_{31}^{+3}$
1200.66	1200,6	$b_{32}^{+3}$
1219.68	1219,2	$b_{33}^{+3}$

## C.2 Zuordnung der Fragmentierungsprodukte von $[M+5H]^{+5}$

theoretische Masse	gefundene Masse	Zuordnung
430.53	430.4	$y_5$
561.73	561.5	$y_6$
731.94	731.8	$y_8$
732.21	731.8	$b_{33}^{+5}$
754.84	755.1	$b_{34}^{+5}$
781.08	781.3	$b_{35}^{+5}$
800.91	801	$b_{36}^{+5}$
812.32	812.4	$b_{37}^{+5}$
823.73	823.9	$b_{38}^{+5}$
843.56	843.7	$b_{39}^{+5}$
845.1	verdeckt(?)	$y_9$
872.46	872.6	$b_{31}^{+4}$
900.75	900.9	$b_{32}^{+4}$
915.01	915.2	$b_{33}^{+4}$
943.3	943.4	$b_{34}^{+4}$
976.1	976.2	$b_{35}^{+4}$
1000.88	1001	$b_{36}^{+4}$
1015.15	1015.2	$b_{37}^{+4}$
1029.41	1029.5	$b_{38}^{+4}$
1054.19	1054.3	$b_{39}^{+4}$
1125.22	1125.2	$b_{30}^{+3}$
1162.94	1163	$b_{31}^{+3}$
1200.66	1200.6	$b_{32}^{+3}$
1219.68	1219.8	$b_{33}^{+3}$
1257.4	1257.3	$b_{34}^{+3}$

### C.3 Zuordnung der Fragmentierungsprodukte von $[M+4H]^{+4}$

theoretische Masse	gefundene Masse	Zuordnung
416.23	416.2	GSNKG-H <sub>2</sub> O
444.22	444.5	GSNKG
458.24	458.3	SNKGA(??)
487.26	487.1	GSNKGA-28
497.25	497.5	GSNKGA-H <sub>2</sub> O
515.26	515.3	GSNKGA
586.33	586.3	VGSNKGA-28
596.32	596.3	VGSNKGA-H <sub>2</sub> O
614.33	614.3	VGSNKGA
610.33	610.0	GSNKGAI-H <sub>2</sub> O
628.34	628.3	GSNKGAI
699.42	699.3	VGSNKGAI-28
727.41	727.4	VGSNKGAI
812.50	812.4	VGSNKGAI-28
840.49	840.4	VGSNKGAI
430.27	430.2	<i>y</i> <sub>5</sub>
561.31	561.3	<i>y</i> <sub>6</sub>
674.39	674.4	<i>y</i> <sub>7</sub>
731.41	731.4	<i>y</i> <sub>8</sub>
844.5	844.4	<i>y</i> <sub>9</sub>
872.46	872.3	<i>b</i> <sub>31</sub> <sup>+4</sup>
900.75	900.8	<i>b</i> <sub>32</sub> <sup>+4</sup>
915.01	914.9	<i>b</i> <sub>33</sub> <sup>+4</sup>
943.3	943.1	<i>b</i> <sub>34</sub> <sup>+4</sup>
976.1	976.0	<i>b</i> <sub>35</sub> <sup>+4</sup>
1000.88	1000.8	<i>b</i> <sub>36</sub> <sup>+4</sup>
1015.15	1015.0	<i>b</i> <sub>37</sub> <sup>+4</sup>
1029.41	1029.3	<i>b</i> <sub>38</sub> <sup>+4</sup>
1054.19	1054.0	<i>b</i> <sub>39</sub> <sup>+4</sup>
1125.22	1124.9	<i>b</i> <sub>30</sub> <sup>+3</sup>
1162.94	1162.6	<i>b</i> <sub>31</sub> <sup>+3</sup>
1200.66	1200.3	<i>b</i> <sub>32</sub> <sup>+3</sup>
1219.68	1219.3	<i>b</i> <sub>33</sub> <sup>+3</sup>
1257.4	1257.0	<i>b</i> <sub>34</sub> <sup>+3</sup>
1301.13	1300.7	<i>b</i> <sub>35</sub> <sup>+3</sup>
1334.18	1333.7	<i>b</i> <sub>36</sub> <sup>+3</sup>
1353.19	1352.9	<i>b</i> <sub>37</sub> <sup>+3</sup>
1372.21	1371.7	<i>b</i> <sub>38</sub> <sup>+3</sup>

## C.4 Versuchsergebnisse

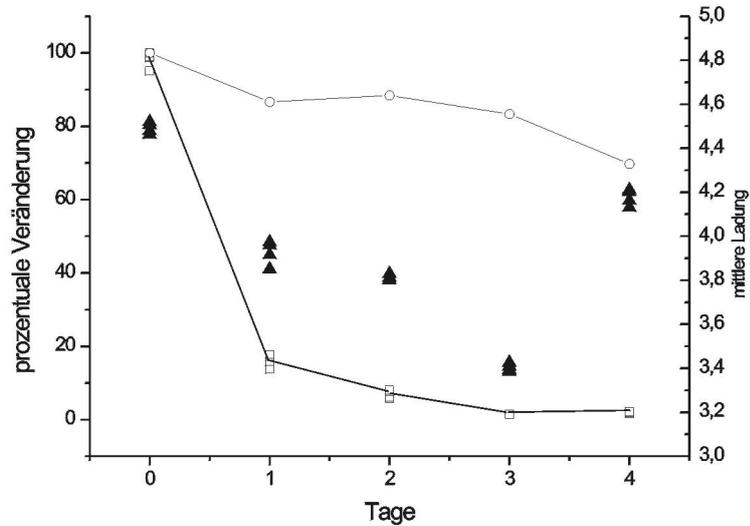


Abbildung C.1: Verlauf von Gesamtsignal (offene Quadrate), Konzentration (offene Kreise) und mittlerer Ladung (volle Dreiecke) für 250  $\mu\text{M}$  A $\beta$  in H<sub>2</sub>O, 5% Acetonitril, 0.1% Essig bei 37°C. Versuch vom 5.11.01 bis 9.11.01.

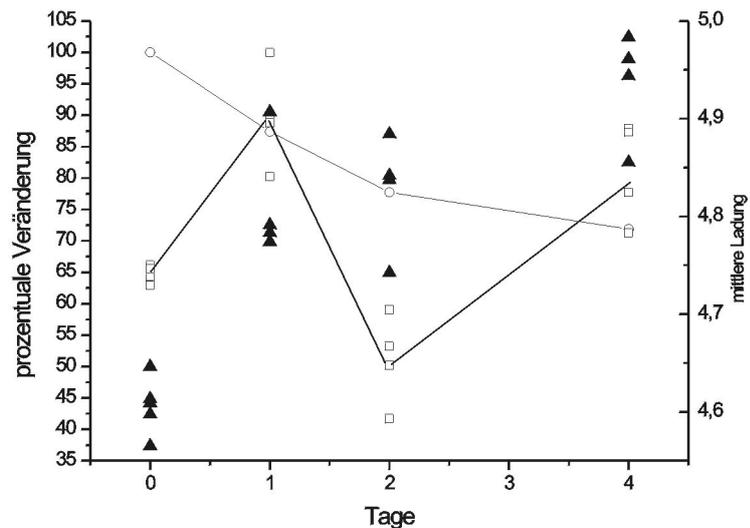


Abbildung C.2: Verlauf von Gesamtsignal (offene Quadrate), Konzentration (offene Kreise) und mittlerer Ladung (volle Dreiecke) für 250  $\mu\text{M}$  A $\beta$  in H<sub>2</sub>O, 5% Acetonitril, 0.1% Essig bei 37°C. Versuch vom 19.11.01 bis 23.11.01.

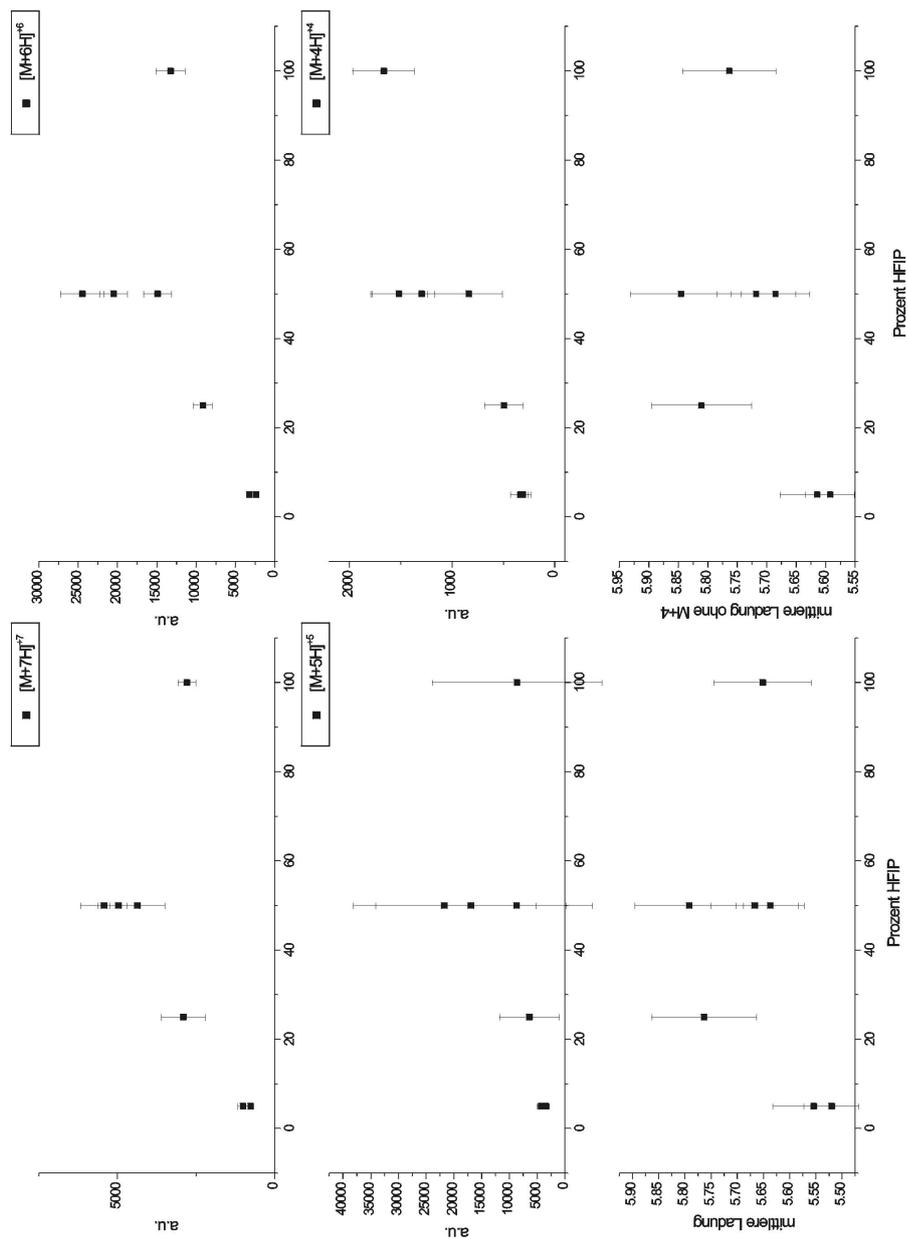


Abbildung C.3: Verlauf der Signalintensitäten und der mittleren Ladung bei Änderung der HFIP Konzentration. Die Messungen wurden in Mischungen von HFIP mit  $H_2O$  mit jeweils 0.05% Essig gemacht. Jeder Punkt repräsentiert eine neue Probe mit je 10 einzelnen Spektren. Die statistischen Fehler (95% Wahrscheinlichkeitsintervall nach Student-t-Verteilung) der Spektren wurde als Fehlerbalken aufgetragen.

# Literaturverzeichnis

- [1] A. E. Cameron and D. F. Eggers. An ion "velocitron". *Review of Scientific Instruments*, 19:605–607, 1948. 2.1.1
- [2] B. A. Mamyryn. Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). *International Journal of Mass Spectrometry*, 206:251–266, 2001. 2.1.1
- [3] U. Even and B. Dick. Computer optimization for high-resolution time-of-flight mass spectrometer. *Review of Scientific Instruments*, 71:4415–4420, 2000. 2.1.1
- [4] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, and F. Hillenkamp. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry*, 78:53–61, 1987. 2.1.1
- [5] F. Hillenkamp and M. Karas. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience. *International Journal of Mass Spectrometry*, 200:71–77, 2000. 2.1.1
- [6] D. W. O. Heddle. *Electrostatic Lens Systems*. Adam Hilger series on atomic and molecular physics. Adam Hilger, Bristol, New York, Philadelphia, 1991. 2.2
- [7] Ansgar Brock, Nestor Rodriguez, and Richard N. Zare. Characterization of a hadamard transform time-of-flight mass spectrometer. *Review of Scientific Instruments*, 71(3):1306–1318, 2000. 2.3, 3.2.1.3
- [8] D. Ioanoviciu. Ion-optical properties of time-of-flight mass spectrometers. *International Journal of Mass Spectrometry*, 206:211–229, 2001. 2.4
- [9] M. Vestal and P. Juhasz. Resolution and mass accuracy in matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 9:892–911, 1998. 2.4, 2.6.2
- [10] B. A. Mamyryn. Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 131:1–19, 1994. 2.4.4.1

- [11] K. Tanaka, H. Wadi, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, and T. Yoshida. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8):151–153, 1988. 2.4.4.1
- [12] Y. Yoshida. US Pat. 4625112, 1986. 2.4.4.1
- [13] S. C. Davis and S. Evans. European Patent Application EP 0 551 999 A1, 1993. 2.4.4.1
- [14] Alex W. Colburn, A. E. Giannakopoulos, Peter J. Derrick, and Markus von Raumer. A quadratic-field reflectron time-of-flight mass spectrometer incorporating intermediate temporal focusing. *European Journal of Mass Spectrometry*, 6:523–530, 2000. 2.4.4.1
- [15] D. Ioanuviciu. Complete third-order resolution formulae for time-of-flight mass spectrometers incorporating reflectrons. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 7:1095–1098, 1993. 2.4.5
- [16] D. A. Dahl. Simion for the personal computer in reflection. *International Journal of Mass Spectrometry*, 200:3–25, 2000. 2.4.5
- [17] W. C. Wiley and I. H. McLaren. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. *Review of Scientific Instruments*, 26:1150–1157, 1955. 2
- [18] Peter Juhasz, Marvin L. Vestal, and Stephen A. Martin. On the initial velocity of ions generated by matrix-assisted laser desorption ionization and its effect on the calibration of delayed extraction time-of-flight mass spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 8:209–217, 1997. 2.6.3, 3.2.2.3
- [19] Stefan Berkenkamp, Christoph Menzel, Franz Hillenkamp, and Klaus Dreisewerd. Measurement of mean initial velocities of analyte and matrix ions in infrared matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13:209–220, 2002. 2.6.3
- [20] T. Huth-Fehre and C. H. Becker. Energetics of gramicidin s after uv laser desorption from a ferulic acid matrix. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 5:378–382, 1991. 2.6.3
- [21] G. R. Kinsel and M. V. Johnson. Post source pulse focussing: A simple method to achieve improved resolution in a time-of-flight mass spectrometer. *International Journal of Mass Spectrometry*, 91:157–176, 1989. 2.6.4

- [22] M. Amft, F. Moritz, C. Weickhardt, and J. Grotemeyer. Instrumental measures to enhance the mass resolution in matrix assisted laser desorption/ionization (maldi) time-of-flight experiments: computational simulations and experimental observations. *International Journal of Mass Spectrometry*, 661-674, 167/168 1997. 2.6.4
- [23] D. Ioanuviciu. Linear time-of-flight mass spectrometers: Postsource pulse focussing conditions and mass scale. *International Journal of Mass Spectrometry*, 6:889–891, 1997. 2.6.4
- [24] Johann M. Grundwürmer, Michael Bönisch, Gary R. Kinsel, Jürgen Grotemeyer, and E. W. Schlag. High-resolution mass spectrometry in a linear time-of-flight mass spectrometer. *International Journal of Mass Spectrometry*, 131:139–148, 1994. 4
- [25] Damaschin Ioanovicu. Linear time-of-flight mass spectrometers: Postsource pulse focussing conditions and mass scale. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 6(10):889–891, 1995. 4
- [26] P. T. Palmer and T. F. Limero. Mass spectrometry in the u.s. space program: Past, present, future. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6):656–675, 2001. 3.1
- [27] David O Sparkman. The 12th sanibel conference on mass spectrometry: Field portable and miniature mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11:468–471, 2000. 3.1
- [28] Ethan R. Badman and R. Graham Cooks. Miniature mass analysers. *Journal of Mass Spectrometry*, 35:659–671, 2000. 3.2, 3.2.1, 3.2.1.2
- [29] S. Boumsellek and R. J. Ferran. Trade-offs in miniature quadrupole designs. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12:633–640, 2001. 3.2.1.1
- [30] R. J. Ferran and S. J. Boumsellek. High-pressure effects in miniature arrays of quadrupole analyzers for residual gas analysis from  $10^9$  to  $10^2$  torr. *Journal of Vacuum Science and Technology*, 14:1258–1265, 1996. 3.2.1.1
- [31] O. J. Orient, A. Chutjian, and V. Garkanian. Miniature, high-resolution, quadrupole mass-spectrometer. *Review of Scientific Instruments*, 68:1393 – 1397, 1997. 3.2.1.1
- [32] D. H. Holkeboer, T. L. Karandy, F. G. Curier, L. C. Frees, and R. E. Ellefson. Miniature quadrupole residual gas analyzer for process monitoring at millitorr pressures. *Journal of Vacuum Science and Technology*, 16:1157–1162, 1998. 3.2.1.1

- [33] S. Taylor, J. J. Tunstall, J. H. Leck, R. F. Tindall, J. P. Jullien, J. Batey, R. R. A. Syms, T. Tate, and M. M. Ahmad. Miniature quadrupole residual gas analyzer for process monitoring at millitorr pressures. *Vacuum*, 53:203–206, 1999. 3.2.1.1
- [34] M. P. Sinha, D. P. Langstaff, D. J. Narayan, and K. Birkinshaw. Resolving power enhancement of a discrete detector (array) by single event detection. *International Journal of Mass Spectrometry*, 176:99–102, 1998. 3.2.1.2
- [35] V. T. Kogan, A. K. Pavlov, Y. V. Chichagov, Y. V. Tubol'tsev, G. Y. Gladkov, A. D. Kazanskii, V. A. Nikolaev, and R. Pavlichkova. Design and testing of a portable magnetic mass spectrometer. *Field Analytical Chemistry and Technology*, 1:331–342, 1997. 3.2.1.2
- [36] C. B. Freidhoff, R. M. Young, S. Sriram, T. T. Braggins, T. W. O'Keefe, J. D. Adam, H. C. Nathanson, and R. R. A. Syms. Chemical sensing using nonoptical microelectromechanical systems. *Journal of Vacuum Science and Technology*, 17:2300–2307, 1999. 3.2.1.2
- [37] Jorge A. Diaz, Clayton F. Giese, and W. Ronald Gentry. Sub-miniature exb sector-field mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6):619–632, 2001. 3.2.1.2
- [38] M. D. Harwit and N. J. Sloan. *Hadamard Transform Optics*. Academic Press, Londonm, 1979. 3.2.1.3
- [39] Facundo M. Fernandez, Jose M. Vadillo, Joel R. Kimmel, Magnus Wetterhall, Karin Markides, Nestor Rodriguez, and Richard N. Zare. Hadamard transform time-of-flight mass spectrometry: A high-speed detector for capillary-format separations. *Analytical Chemistry*, 74:1611–1617, 2002. 3.2.1.3
- [40] Jack A. Syage, Brian J. Nies, Matthew D. Evans, and Karl A. Hanold. Field-portable, high-speed gc/tofms. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6):648–655, 2001. 3.2.1.3, 3.2.2.1, 3.2.2.2
- [41] V. D. Berkout, R. J. Cotter, and D. P. Segers. Miniaturized ei/q/oa tof mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6):641–647, 2001. 3.2.1.3, 3.2.2.1
- [42] Timothy J. Cornish and Robert J. Cotter. High-order kinetic energy focusing in an end cap reflektoron time-of-flight mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 69:4615–4618, 1997. 3.2.1.3, 3.2.2.3, 3.3.2, 3.2

- [43] Timothy J. Cornish, Scott Ecelberger, and Will Brinckerhoff. Miniature time-of-flight mass spectrometer using a flexible circuitboard reflektor. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14:2408–2411, 2000. 3.2.1.3, 3.2.2.3
- [44] Robert J. Cotter, Charles Fancher, and Timothy J. Cornish. Miniaturized time-of-flight mass spectrometer for peptide and oligonucleotide analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 34:1368–1372, 1999. 3.2.1.3, 3.2.2.3
- [45] Peter F. Scholl, Marisa A. Leonardo, Ana M. Rule, Micah A. Carlson, Miquel D. Antoine, and Timothy J. Buckley. The development of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of biological warfare agent aerosols. *Johns Hopkins APL Technical Digest*, 20(3):343–351, 1999. 3.2.1.3
- [46] Timothy J. Cornish and Wayne A. Bryden. Miniature time-of-flight mass spectrometer for a field portable biodetection system. *Johns Hopkins APL Technical Digest*, 20(3):335–342, 1999. 3.2.1.3, 3.2.2.3
- [47] Michael P. McLoughlin, William R. Allmond, Charles W. Anderson, Micah A. Carlson, Daniel J. DeCicco, and Nicholas H. Evancich. Development of a field-portable time-of-flight mass spectrometer system. *Johns Hopkins APL Technical Digest*, 20(3):326–334, 1999. 3.2.1.3
- [48] U. Boesl, R. Weinkauff, C. Weickhardt, and E. W. Schlag. Laser ion source for time-of-flight mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 131:87–124, 1994. 3.2.2, 3.2.2.4, 3.2.2.5
- [49] P. Sieberg, G. Petzold, Á. Hellenbart, and J. Müller. Surface microstructure/miniature mass spectrometer: processing and applications. *Applied Physics A*, 67:155–160, 1998. 3.2.2.1
- [50] A. J. White, M. G. Blamire, C. A. Corlett, B. W. Griffiths, D. M. Martin, and S. J. Mullock. Development of a portable time-of-flight membrane inlet mass spectrometer for environmental analysis. *Review of Scientific Instruments*, 69(2):565–571, 1998. 3.2.2.1
- [51] Y. H. Chen, M. Gonin, K. Fuhrer, A. Dodonov, C. S. Su, and H. Wollnik. Orthogonal electron impact source for a time-of-flight mass spectrometer with high mass resolving power. *International Journal of Mass Spectrometry*, 185-187:221–226, 1999. 3.2.2.1
- [52] F. Mühlberger, R. Zimmermann, and A. Kettrup. A mobile mass spectrometer for comprehensive on-line analysis of traces and bulk components of complex gas mixtures: Parallel application of the laser-based ionization methods vuv single-photon ionization, resonant multiphoton ionization, and

- laser-induced electron impact ionization. *Analytical Chemistry*, 73:3590–3604, 2001. 3.2.2.2, 3.2.2.4, 3.2.2.5, 3.3.1
- [53] Renato Zenobi and Richard Knochenmuss. Ion formation in maldi mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 17:337–366, 1998. 3.2.2.3
- [54] Jun Zhang and Christie G. Enke. Simple cylindrical ion mirror with three elements. *International Journal of Mass Spectrometry*, 11:759–764, 2000. 3.2.2.3
- [55] Jun Zhang, Benjamin D. Gardner, and Christie G. Enke. Simple geometry gridless ion mirror. *International Journal of Mass Spectrometry*, 11:765–769, 2000. 3.2.2.3
- [56] Jun Zhang and Christie Enke. A novel non-linear ion mirror with only three elements. *European Journal of Mass Spectrometry*, 6:515–522, 2000. 3.2.2.3
- [57] R. Thanner, H. Oser, and H.-H. Grotheer. Time-resolved monitoring of aromatic compounds in an experimental incinerator using an improved jet-resonance-enhanced multi-photon ionization system jet-rempi. *European Journal of Mass Spectrometry*, 4:215–222, 1998. 3.2.2.4
- [58] E. R. Rohwer, R. C. Beavis, C. Köster, J. Lindner, J. Grotemeyer, and E. W. Schlag. Fast pulsed laser induced electron generation for electron impact mass spectrometry. *Zeitschrift für Naturforschung*, 43a:1151–1153, 1988. 3.2.2.5
- [59] J. A. Nelder and R. Mead. A simplex method for function minimization. *Computer Journal*, 7:308–313, 1965. 3.5.1
- [60] E. R. Aberg and A. G. T. Gustavsson. Design and evaluation of modified simplex methods. *Analytica Chimica Acta*, 144:39–53, 1982. 3.5.1
- [61] Christian Weickhardt, Friedrich Moritz, and Jürgen Grotemeyer. Time-of-flight mass spectrometry: State-of-the-art in chemical analysis and molecular science. *Mass Spectrometry Reviews*, 15:139–162, 1996. 3.5.1.1
- [62] Renyi Zhang, Luisa T. Molina, and Mario J. Molina. Development of an electrostatic ion guide in chemical ionization mass spectrometry. *Review of Scientific Instruments*, 69(11):4002–4003, 1998. 3.5.1.1
- [63] David R. Lide, editor. *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 75th edition edition, 1994-1995. 3.7.5

- [64] U. Boesl, J. Grotemeyer, K. Walter, and E. W. Schlag. A high resolution time-of-flight mass spectrometer with laser desorption and a laser ionization source. *Analytical Instrumentation*, 16(1):151–171, 1987. 4, 4.2
- [65] Tassilo Muskat. Untersuchungen zur Desorptionsgeschwindigkeit gebräuchlicher Matrixsubstanzen. Dissertation in Vorbereitung, 2002. 4.3
- [66] Eugene Moskovets and Akos Vertes. Fast dynamics of ionization in ultraviolet matrix-assisted laser desorption ionization of biomolecules. *Journal of Physical Chemistry B*, 106:3301–3306, 2002. 4.3
- [67] F. Lottspeich and H. Zorbas, editors. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998. 5.2
- [68] H. H. Yang, X. C. Li, M. Amft, and J. Grotemeyer. Protein conformational changes determined by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 285:118–126, 1998. 5.3.1
- [69] A. Fontana, P. Polverino de Laureto, V. De Fillipis, E. Scaramella, and M. Zambonin. Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Folding & Design*, 2:17–26, 1997. 5.3.1
- [70] S. J. Hubbard. The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1382:191–201, 1998. 5.3.1
- [71] Wolfgang Rist, Thomas J. D. Jorgensen, Peter Roepstorff, Bernd Bukau, and Matthias Mayer. Identification of temperature dependent conformational changes in the e. coli heat shock transcription factor by deuterium exchange experiments. In *35. Diskussionstagung DGMS*, page S28. Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie, Herbert Utz Verlag GmbH, march 2002. 5.3.2
- [72] Mario Kraus, Katharina Janek, Michael Bienert, and Eberhard Krause. Characterisation of intermolecular  $\beta$ -sheet peptides by mass spectrometry and hydrogen isotope exchange. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14:1094–1104, 2000. 5.3.2
- [73] Igor Kaltashov and Stephen J. Eyles. Crossing the phase boundary to study protein dynamics and function: combination of amide hydrogen exchange in solution and ion fragmentation in the gas phase. *Journal of Mass Spectrometry*, 37:557–565, 2002. 5.3.2
- [74] Simon J. Gaskell. Elektrospray: Principles and practice. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(677-688), 1997. 5.3.3.1

- [75] John B. Fenn. Ion formation from charged droplets: Roles of geometry, energy, and time. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 4:524–535, 1993. 5.3.3.1, 5.3.3.2, 5.7
- [76] D. S. Ashton, C. R. Beddell, D. J. Cooper, B. N. Green, and R. W. A. Oliver. Mechanism of production of ions in electrospray mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, 28:721–728, 1993. 5.3.3.1
- [77] David E. Clemmer, Robert R. Hudgins, and Martin F. Jarrold. Naked protein conformations: Cytochrome c in the gas phase. *Journal of the American Chemical Society*, 117:10141–10142, 1995. 5.3.3.2, 5.3.4
- [78] X. G. Chen, S. K. Brining, V. Q. Nguyen, and A. L. Yergey. Simultaneous assessment of conformation and aggregation of  $\beta$ -amyloid peptide using electrospray ionization mass spectrometry. *FASEB Journal*, 11:817–823, 1997. 5.3.3.2, 11, 5.7, 5.8
- [79] Andreas Dobo and Igor A. Kaltashov. Detection of multiple protein conformational ensembles in solution via deconvolution of charge-state distributions in esi ms. *Analytical Chemistry*, 73:4763–4773, 2001. 5.3.3.2, 14
- [80] Hui Lin and Chhabil Dass. Conformational changes in  $\beta$ -endorphin as studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15:2341–2346, 2001. 5.3.3.2
- [81] Rita Grandori, Irena Matecko, Petra Mayr, and Norbert Müller. Probing protein stabilization by glycerol using electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36:918–922, 2001. 5.3.3.2
- [82] Karen J. Light-Wahl, Brenda L. Schwartz, and Richard D. Smith. Observation of the noncovalent quarternary associations of proteins by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, 116:5271–5278, 1994. 5.3.3.2, 5.3.4
- [83] S. A. McLuckey, G. J. VanBerkel, and G. L. Glish. Reactions of dimethylamine with multiply charged ions of cytochrome c. *Journal of the American Chemical Society*, 112:5668–5670, 1990. 5.3.3.2
- [84] F. Halgand and O. Laprévôte. Mean charge state and charge state distribution of proteins as structural probes. an electrospray ionisation mass spectrometry study of lysozyme and ribonuclease a. *European Journal of Mass Spectrometry*, 7:433–439, 2001. 5.3.3.2
- [85] D. Suckau, Y. Shi, S. C. Beu, M. W. Senko, J. P. Quinn, F. M. Wampler III, and F. W. McLafferty. Coexisting stable conformations of gaseous protein ions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90:790–793, 1993. 5.3.4

- [86] David M. Horn, Kathrin Breuker, Aaron J. Frank, and Fred W. McLafferty. Kinetic intermediates in the folding of gaseous protein ions characterized by electron capture dissociation mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 123:9792–9799, 2001. 5.3.4, 5.3.4.1, 2
- [87] William Griffiths and Andreas P. Johnsson. Gas-phase conformation can have an influence on peptide fragmentation. *European Journal of Mass Spectrometry*, 7:89–99, 2001. 5.3.4, 5.3.4.1, 9
- [88] George Tsapralis, Hari Nair, Árpád Somogyi, Vicki H. Wysocki, Wenqing Zhong and Jean H. Futrell, Scott G. Summerfield, and Simon J. Gaskell. Influence of secondary structure on the fragmentation of protonated peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 121:5142–5154, 1999. 5.3.4, 5.3.4.1, 9
- [89] Ken A. Dill. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29(31):7133–7155, 1990. 5.3.4
- [90] Qinyuan Wu, Jimming Gao, Diane Joseph-McCarthy, George B. Sigal, James E. Bruce, George M. Whitesides, and Richard D. Smith. Carbonic anhydrase-inhibitor binding: From solution to the gas phase. *Journal of the American Chemical Society*, 119:1157–1158, 1997. 5.3.4
- [91] Victor J. Nesatyy. Gas-phase binding of non-covalent protein complexes between bovine pancreatic trypsin inhibitor and its target enzymes studied by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36:950–959, 1997. 5.3.4
- [92] Joseph A. Loo. Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *International Journal of Mass Spectrometry*, 200:175–186, 2000. 5.3.4
- [93] Lucinda R. H. Cohen, Kerstin Strupat, and Franz Hillenkamp. Analysis of quaternary protein ensembles by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 8:1046–1052, 1997. 5.3.4
- [94] Ashok R. Dongré, Jennifer L. Jones, Árpád Somogyi, and Vicki H. Wysocki. Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: Evidence for the mobile proton model. *Journal of the American Chemical Society*, 118:8365–8374, 1996. 5.3.4, 5.3.4.1, 8
- [95] Ashok R. Dongré, Árpád Somogyi, and Vicki H. Wysocki. Surface-induced dissociation: An effective tool to probe structure, energetics and fragmentation mechanisms of protonated peptides. *Journal of Mass Spectrometry*, 31:339–350, 1996. 5.3.4.1

- [96] Alex G. Harrison. Fragmentation reactions of protonated peptides containing phenylalanine: a linear free energy correlation in the fragmentation of h-gly-xxx-phe-oh. *International Journal of Mass Spectrometry*, 217:185–193, 2002. 5.3.4.1
- [97] Guido Sonsmann, Axel Römer, and Dietmar Schomburg. Investigation of the influence of charge derivatization on the fragmentation of multiply protonated peptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13:47–58, 2002. 5.3.4.1
- [98] István Pál Csonka, Belá Paizs, György Lendvay, and Sándor Suhai. Proton mobility in protonated peptides: a joint molecular orbital and rrkm study. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14:417–431, 2000. 8, 9
- [99] R. S. Johnson, D. Krylov, and K. A. Walsh. Proton mobility within electrosprayed ions. *Journal of Mass Spectrometry*, 30:386–387, 1995. 9
- [100] P. Roepstorff and J. Fohlmann. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, 11(11):601, 1984. 5.2, 9
- [101] Talat Yalcin, Imre G. Csizmadia, Michael R. Peterson, and Alex G. Harrison. The structure and fragmentation of  $b_n$  ( $n \geq 3$ ) ions in peptide spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 7:233–242, 1996. 9
- [102] S. Prusiner. Prion diseases and the bse crisis. *Science*, 278:245–251, 1997. 5.4
- [103] Alois Alzheimer. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitung für Psychologie*, 64:146–148, 1907. 5.5
- [104] Auli Verkkoniemi. *Variant Alzheimer’s Disease with Spastic Paraparesis*. PhD thesis, University of Helsinki, November 2001. 5.5
- [105] John Hardy and Dennis J. Selkoe. The amyloid hypothesis of alzheimer’s disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297:353–356, 19. Juli 2002. 10
- [106] Olga Gursky and Sergei Aleshkov. Temperature-dependent  $\beta$ -sheet formation on  $\beta$ -amyloid  $A\beta_{1-40}$  peptide in water: uncoupling  $\beta$ -structure folding from aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1476:93–102, 2000. 11
- [107] Colin J. Barrow, Akikazu Yasuda, Peter T. M. Kenny, and Michael G. Zagorski. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid  $\beta$ -peptides of alzheimer’s disease. *Journal of Molekular Biology*, 225:1075–1093, 1992. 11, 13

- [108] Hisakazu Mihara and Yuta Takahashi. Engineering peptides and proteins that undergo  $\alpha$ -to- $\beta$  transitions. *Current Opinion in Structural Biology*, 7:501–508, 1997. 11
- [109] Hisakazu Mihara and Yuta Takahashi. Erratum: Engineering peptides and proteins that undergo  $\alpha$ -to- $\beta$  transitions. *Current Opinion in Structural Biology*, 7:749, 1997. 11
- [110] Jeffery W. Kelly. Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behaviour. *Current Opinion in Structural Biology*, 6:11–17, 1996. 11
- [111] L. C. Serpell. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1502:16–30, 2000. 11
- [112] Youcef Fezoui, Dean M. Hartley, James D. Harper, Ritu Khurana, Dominic M. Walsh, Margaret M. Condron, Dennis J. Selkoe, Peter T. Lansbury Jr., Anthony L. Fink, and David B. Teplow. An improved method of preparing the amyloid  $\beta$ -protein for fibrillogenesis and neurotoxicity experiments. *Amyloid: International Journal of Experimental Clinical Investigations*, 7:166–178, 2000. 5.7
- [113] Z. Szabó, É. Klement, K. Jost, M. Zarándi, K. Soós, and B. Penke. An ft-ir study of the  $\beta$ -amyloid conformation: Standardization of aggregation grade. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265:297–300, 1999. 5.7, 13

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. Grotemeyer für die Gelegenheit in seiner Arbeitsgruppe viel und vielfältiges über Massenspektrometrie zu lernen. Außerdem danke ich ihm für die Unterstützung bei meinem Auslandsaufenthalt, die er mir wie selbstverständlich gewährte.

Herrn Dr. Marc Baumann danke ich für die Betreuung meiner Arbeiten im Biomedicum Helsinki. Auch wenn das Projekt nicht so erfolgreich war, wie gewünscht, habe ich doch viel gelernt. Danke auch für die herzliche Aufnahme auch durch meine Laborkollegen Jaana Vesterinen, Jaana Suopanki und Maciej Łałowski.

Ich danke Dr. Carsten Zechmann, Dr. Bong-Jun Lee, Dipl. Chem. Tassilo Muskat, Dipl. Phys. M. Ehlers, Dipl. Phys. F. Gunzer, Dipl. Phys. Z. Altug, O. Abdel Rahman, Dipl. Chem. C. Grun und P. Zielke, meinen Kollegen während der Zeit dieser Arbeit für ein sehr nettes Arbeitsklima. Besonders möchte ich hier T. Muskat für seine unverbesserliche Hilfsbereitschaft, Diskussionen und Anregungen danken.

Ohne die tatkräftige Hilfe der technischen Mitarbeiter des Hauses, besonders M. Karstens, aber auch U. Eggers, K. Warns und natürlich Herrn Will und die Werkstattmitarbeiter, wären die hier beschriebenen Geräte niemals realisiert und zum Laufen gebracht worden: vielen Dank.

Den Dräger Werken und hier besonders Herrn Dr. Bäther danke ich für das Interesse an der Massenspektrometrie, das zu dem hier beschriebenen Mini-ToF-MS führte. Ohne diese Kooperation wäre vieles anders gewesen.

Herrn Engel der Firma Bruker Daltoniks danke ich für die Bereitstellung der Software „DataAnalysis“ zur Auswertung der ESI-Spektren - ohne diese Hilfe wäre alles viel aufwendiger gewesen. Frau Dr. A. Kiehne von der Firma Bruker danke ich für die Bereitstellung der Abbildung und für stete Hilfsbereitschaft bei Fragen zu dem Esquire Massenspektrometer.

Dr. J. Grötzinger danke ich für schnelle Beratung und Hilfe in biochemischen Fragen.

Henning Roose danke ich für die Durchsicht der Arbeit und für Entspannung bei Kochaktionen zusammen mit Stefan Köster.

Frau M. Bäckman habe ich eine hohe Telefonrechnung zu verdanken und den Antrieb nach Finnland zu gehen. Für verlässliche, tägliche Unterstützung in allen Lebenslage danke ich meinem Bruder und meinen Eltern.