

Matrixabhängiges Ablationsverhalten von Neutralen
und Oberflächencharakteristika bei der
Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation

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

vorgelegt von

Tassilo Muskat

Kiel

2004

Referent/in:

Korreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

Zusammenfassung

Die MALDI stellt eine moderne Methode zur Analyse großer Moleküle biologischen bzw. organochemischen Ursprungs mittels Massenspektrometrie dar. Dabei sind die zu grundlegenden Prozesse dieser Methode noch weitgehend unverstanden. Durch einen Hilfsstoff, die sogenannte Matrix, wird der Analyt vor Zerstörung durch Laserbeschuss geschützt. Zugleich sorgt die Matrix für Ionisation des Analyten. Während die ionisierenden Eigenschaften der Matrix durch die Substanz selbst festgelegt sind, ließen sich die Ablationseigenschaften variieren, wenn diese von der Anregungswellenlänge und nicht vom Absorptionskoeffizienten abhängen. Empirisch zeigen stark ablatierende Matrices Fluoreszenz im roten Spektralbereich. Daher wurden wellenlängenaufgelöste Untersuchungen der laserinduzierten Fluoreszenz der verschiedenen Matrices unternommen. Um die Ablationseigenschaften der Matrices zu untersuchen, wurden die Geschwindigkeiten der ablatierten Neutralteilchen untersucht. Hierzu wurde zeitversetzt zum Ablationslaser eine Nachanregung (Postionisation) durch einen zweiten Laser innerhalb der Ablationswolke (Plume) hervorgerufen. Die Matrices zeigen unterschiedliches Ablationsverhalten. Die Ablation ist jetähnlich und lässt sich am ehesten mit einer verschobenen Maxwell-Boltzmann-Geschwindigkeitsverteilung beschreiben. Als charakteristische Werte können z.B. die wahrscheinlichsten Geschwindigkeiten ermittelt werden. Weiterhin kann aus der Breite der Verteilung die Temperatur des Plumes ermittelt werden.

Untersucht man nun die Plumeentwicklung durch Variation von Laserleistung, Innendruck der Quellregion oder des Postionisationsortes, so wird eine ausgedehnte Entwicklung noch bis zu 1.4mm nach dem Ablationsort festgestellt. In der Literatur wurde dagegen bisher von einer kompakten Plumeentwicklung ausgegangen. Durch Stoßprozesse, die während dieser langen Plumeentwicklung stattfinden, ist aber auch eine ausgedehnte Ionenbildung möglich. Diese später erzeugten Ionen tragen zum Untergrundrauschen bei. In der Literatur wurden Matrixmoleküle und -cluster als Quelle des sogenannten chemical noise identifiziert. Die Entstehung dieser Verunreinigung der Spektren lässt sich mit den gefundenen Ergebnissen ebenso erklären, wie der Erfolg der Atmosphären-Druck-MALDI. Bei dieser wird durch den erhöhten Hintergrunddruck ein kompakter Plume ausgebildet und die lang andauernden Stoßprozesse vermieden.

abstract

MALDI has established as modern analytic discipline to investigate large molecules by mass spectrometry. Those molecules may origin from biological or organochemical investigations. Although its success for some dedicated questions there is a leak of knowledge about the fundamental process during ablation and ionization. The analyte is protected by a so called matrix during laser excitation against the destructive processes. This matrix evokes ionization, e.g. protonation, of the analyte as well. The ionization tendency is an intrinsic character of the matrix. One question was how ablation characteristics are influenced by ablation wavelength. The ablation could be controlled, if ablation depends more on wavelength than absorption coefficients. In Experiments strong ablative matrices show fluorescence in the red part of spectrum. Laser induced fluorescence of several matrices was investigated. To analyze the ablative character of these matrices velocity distributions of ablated neutral molecules were recorded. Therefore a second laser (postionization-laser) was focused delayed into the ablation plume evoked by the ablation laser.

There are differences between the examined matrices in the ablative character. All develop an jet-like ablation described best by a shifted Maxwell-Boltzmann-Distribution. Characteristic values of those distributions are the most probable velocity and the broadness of distribution. The latter one is an indicator of plume temperature.

By varying parameters like laser power, pressure in source or distance to ablation event plume evolution can be examined. In contradiction to earlier literature a long lasting evolution up to 1.4mm after ablation is found. Impact processes during this long evolution even ionization on such long time scale is possible. Those ions contribute to the noise in MALDI mass spectra. Matrix molecules and -clusters were identified as source for so called chemical noise in literature. The source of this noise as well as success of atmospheric pressure MALDI can be explained by results of this thesis. In the latter case the plume is build up much more compact. Long lasting impact processes are avoided by those conditions.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	14
1. Einleitung	16
2. Theorie der Massenspektrometrie	18
2.1. Massenseparatoren	18
2.1.1. Flugzeitmassenspektrometer	19
2.2. verschiedene Ionisationsverfahren für TOF-MS	23
2.2.1. (Resonant enhanced) Multi Photon Ionisation ((RE)MPI)	25
3. Theorie der MALDI	29
3.1. Ionisationsmechanismen der MALDI	30
Primäre Ionenbildung	30
3.1.1. Energy pooling	31
3.1.2. Excited State Proton Transfere (ESPT)	32
3.1.3. Disproportionierungsmechanismen	33
Sekundäre Ionenbildung	34
3.1.4. Elektronentransfer	34
3.1.5. Protonentransfer	34
3.1.6. Adduktbildung	35
3.2. Ablationsmechanismen der MALDI	36
3.2.1. Initialparameter der Ablation	36

3.2.2.	Simulationen der Ablation	38
3.2.3.	Photothermische Ablation	40
3.2.4.	Photochemische Ablation	44
3.2.5.	Photomechanische Ablation	45
4.	Spektroskopische Informationen verschiedener Matrizes	51
4.1.	Theorie der Lumineszenz	53
4.2.	Versuchsaufbau zur Detektion von LIF	55
4.3.	Emissionsspektren verschiedener MALDI-Matrizes	57
4.4.	Stokes-Shift zur Charakterisierung der Desorption?	65
5.	Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten	67
5.1.	Aufbau Postionisation	71
5.1.1.	Ablationslaser	71
5.1.2.	Massenspektrometer	72
5.1.3.	Zeitliche Synchronisation und Steuerung	73
5.1.4.	Nachionisation	74
5.1.5.	Gewichtung mit Laserleistung und Matrix-Integral	74
5.1.6.	Probenpräparation	75
5.2.	Bestimmung des Postionisationsortes	76
5.2.1.	Optische Postionisationsortbestimmung	77
5.2.2.	Berechnung des Postionisationsortes aus Flugzeitdaten	78
5.3.	Abtastung der Probenoberfläche	80
5.3.1.	Probendicke	81
5.4.	Geschwindigkeitsverteilungen verschiedener Matrizes	86
5.4.1.	Ferulasäure	92
5.4.2.	2,5-Dihydroxybenzoesäure	99
5.4.3.	Sinapinsäure	103
5.4.4.	Dithranol	106
5.5.	Einbettung von Analyten	108
5.6.	Abstandsabhängigkeit	113
5.7.	Druckabhängigkeit	117
5.8.	Einfluss der Laserleistung	119
6.	Zusammenfassung	123

7. Ausblick	126
Danksagung	130
Literaturverzeichnis	133
A. Aufbau-Skizzen und Triggerdiagramm	139
B. Datenbearbeitung	146
B.1. Ortsberechnung und Fehlerbetrachtung derselben	146
B.2. Datenverarbeitung	152
C. Programme und Skripte	155
C.1. Labview-Program „getMS_post,,	155
C.2. Batchprogramme	159
C.2.1. Rohdatenaufbereitung durch „mstrans_post1“	159
C.2.2. Rohdatenaufbereitung durch „mstrans_post“	160
C.2.3. Skript „xmgr_base_kor“ zur Basislinienkorrektur durch xmgrace .	161
C.2.4. Skript zur Extraktion der MOPO-Leistungsdaten.	162

Abkürzungsverzeichnis

A ⁺	Analytradikalkation
AH ⁺ , A+H ⁺	Protoniertes Analytkation
ALOX	Aluminiumoxid
AgTFA	Silbertrifluoracetat
B-Feld	Magnetfeld
BS	Beamsplitter
CCA	4-Hydroxy- α -Cyanozimtsäure
CCD	Charged-Coupled-Device
D	Detektor
DE	Delayed Extraction
DHB	Dihydroxybenzoesäure (hier 2,5-DHB)
E-Feld	Elektrisches Feld
ESEM	Environmental Scanning Microscop
ESI	Electro Spray Ionisation
ESPT	Excited State Proton Transfere
EtOH	Ethanol
F	Laserfluss (Fluence)
FA	Ferulasäure
FHWM	Halbwertsbreite
HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HTFA	Trifluoressigsäure
I	Laseranregung (Irradiance)
IAA	Trans-Indol-3-acrylsäure
IC	Internal Conversion
ICR	Ionencyclotron
IE	Ionisierungsenergie

Abkürzungsverzeichnis

IR	Infrarot
ISC	Internal System Crossing
i. vac.	im Vakuum
IVR	Internal Vibrational Relaxation
LDI	Laser Desorption/Ionisation
LIF	Laser induzierte Fluoreszenz
LWL	Lichtwellenleiter
Lsgm	Lösungsmittel
m	Masse
M ⁺	Matrix- oder Molekülradikalkation
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MB	Maxwell-Boltzmann
MCP	Microchannelplate
MD	Molekül Dynamisch
MH ⁺ , M+H ⁺	Protoniertes Matrix- oder Molekülkation
MPI	Multi Photon Ionisation
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie
Nd:YAG	Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat
PA	Protonenaffinität
PC	Personal Computer
PD	Photodiode
PMT	Photomultiplier
PSPF	Post Source Pulse Focusing
REMPI	Resonance Enhanced Multi Photon Ionisation
RTemp	Raumtemperatur
SA	Sinapinsäure
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time Of Flight

Abkürzungsverzeichnis

UV	Ultraviolett
vac.	Vakuum
VR	Virbronical Relaxation
VUV	Vakuum Ultraviolett
Y	Ausbeute, Intensität (Yield)
z	Ladung

Abbildungsverzeichnis

2.1.	Verschlechterung des Auflösungsvermögens in einem TOF.	20
2.2.	Schematische Darstellung einer Wiley-McLaren-Anordnung. Fall a: „delayed extraction“ zum Zeitpunkt der Ablation. Fall b: Statischer Betrieb oder „delayed extraction“ zum Zeitpunkt des Ionenabzuges.	21
2.3.	Wirkungsweise des PSPF-Systems.	24
2.4.	Schematische Darstellung der Absorptionswahrscheinlichkeiten bei verschiedenen Überlappungsintegralen.	27
4.1.	Jablonski-Diagramm zur Verdeutlichung der Umwandlungsprozesse im angeregten Molekül. A: Anregung; F: Fluoreszenz; P: Phosphoreszenz; S_i : Singulett- und T_i : Triplett-Zustand.	53
4.2.	Laserinduzierte Fluoreszenz von 2,5-DHB.	58
4.3.	Emissionsspektrum von 3-HPA.	59
4.4.	Emissionsspektrum von SA.	60
4.5.	Fluoreszenzspektrum von FA.	61
4.6.	Laserinduzierte Fluoreszenz von CCA.	62
4.7.	Emissionsspektrum von IAA.	63
4.8.	Laserinduzierte Festkörperfluoreszenz von Dithranol.	64
5.1.	Schematischer Aufbau des linearen TOF-MS.	72
5.2.	Flugzeitveränderung vom FA- $[M+H]^+$ -Peak mit zunehmendem Probenabtrag.	82
5.3.	Flugzeitvariation vom Dithranol- $[M+H]^+$ -Peak mit Fortschritt des Experiments.	83

Abbildungsverzeichnis

5.4. ESEM Abbildung einer „dried-droplet“-Probe von Ferulasäure auf einem Stahlprobenträger.	84
5.5. ESEM-Aufnahme einer „dried-droplet“-Probe von Dithranol auf einem Stahlprobenträger.	85
5.6. Flugzeitspektrum von 2,5-DHB.	87
5.7. Flugzeitspektrum von DHB mit Postionisation zu drei verschiedenen Zeitpunkten.	89
5.8. Flugzeitspektrum von FA.	94
5.9. Geschwindigkeitsverteilung des Ferulasäuremoleküls bei einer Ablation mit 337nm. Mittlere durchflogene Strecke 1.1mm.	96
5.10. Neutralengeschwindigkeiten der Ferulasäure bei einer Ablationswellenlänge von 355nm (mittlerer Abstand 1.24mm).	98
5.11. Geschwindigkeitsverteilung des DHB-Moleküls bei einer Ablationswellenlänge von 337nm und einem mittleren Abstand von 1.38mm.	100
5.12. Neutralengeschwindigkeit von DHB bei einer Ablation mit 355nm und 1.32mm mittlerem Abstand.	101
5.13. Geschwindigkeitsverteilung von SA bei Ablation mit 337nm in einem mittlerem Abstand von 1.17mm.	104
5.14. Bei 355nm Ablationswellenlänge hervorgerufene Neutralengeschwindigkeitsverteilung von Sinapinsäure. Mittlerer Abstand 1.0mm.	105
5.15. Geschwindigkeitsverteilung von Dithranol bei einer Ablationswellenlänge von 355nm. Mittlerer Abstand 1.31mm.	106
5.16. Geschwindigkeitsverteilung aus DHB ablatierter Chrysen-Moleküle bei einem mittleren Abstand von 1.08mm.	110
5.17. Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen-Molekülen bei Ablation aus Dithranol in 1.36mm mittlerer Entfernung.	112
5.18. Bei verringertem Abstand von 1.12mm detektierte Geschwindigkeitsverteilung von DHB. Ablationswellenlänge 337nm.	114
5.19. Bei geringstmöglichem Abstand von 0.93mm aufgezeichnete Geschwindigkeitsverteilung mittels 337nm ablatierter DHB-Moleküle.	115
5.20. Bei erhöhtem Druck in einem Abstand von 1.35mm aufgezeichnete Geschwindigkeitsverteilung von DHB bei Ablation mit 355nm.	118

Abbildungsverzeichnis

5.21. Geschwindigkeitsverteilung von Dithranol bei maximaler Laserleistung (355nm, $F=38.2\text{J}/\text{m}^2$.) in einem Abstand von 1.18mm vom Ablationsort.	120
5.22. Geschwindigkeitsverteilung von Dithranol bei mittlerer Laserleistung von $F=21.5\text{J}/\text{m}^2$	121
A.1. Schematische Darstellung des Laseralignments innerhalb der Quelle. Dargestellt (von links nach rechts): Probenträger, Repeller, Ablationslaser (blau), Postionisationslaser (violett), 1. Beschleunigungselektrode, Äquipotenzialelektrode, 0V-Platte.	139
A.2. Schematische Darstellung der optischen Postionisationsortbestimmung.	140
A.3. Optische Postionisationsortbestimmung bei Nichtparallelität des Postionisationslasers.	140
A.4. Simplifiziertes Gesamtschema des Experiments.	141
A.5. Schematischer Aufbau des modifizierten Jaguar C Dye-Lasers, Radiant Dyes.	142
A.6. Verdeutlichung des Laseralignments innerhalb der Quelle.	143
A.7. 3D-Ansicht der Quelle.	144
A.8. Triggerdiagramm für die Postionisation.	145
C.1. Bildschirmansicht des Programms get_MS_post.	156
C.2. Ablaufschema des Programms get_MS_post.	157
C.3. Ablaufschema des True/False-Bereichs während des Speicherns.	158

Tabellenverzeichnis

4.1. Ergebnisse aus der wellenlängenseparierten Detektion laserinduzierter Fluoreszenz verschiedener MALDI-Matrizes.	65
4.2. Ergebnisse erster Voruntersuchungen an drei verschiedenen Matrizes bezüglich Korrelation von LIF und Geschwindigkeitsverteilungen.	66
5.1. Leistungsdaten der verwendeten Lasersysteme.	72
5.2. Verwendete Lösungsmittel für die einzelnen Matrizes.	76
5.3. Flugzeit- und Distanzschwankungen der verschiedenen Matrizes.	86
5.4. Zusammenfassende Darstellung der Matrix- und Wellenlängenabhängigkeiten von Plumetemperatur und wahrscheinlichster Geschwindigkeit. . .	108
5.5. Analytgeschwindigkeiten und Plumetemperaturen bei Ablation aus verschiedenen Matrizes.	113
5.6. Zusammenfassende Darstellung der Entwicklung von Plumetemperatur und wahrscheinlichster Geschwindigkeit mit Abnahme des Abstandes. . .	116
5.7. Veränderung der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit und Plumetemperatur bei Laserleistungserhöhung.	122
B.1. Quellen- und Detektorregiondurchquerungszeiten.	150

1. Einleitung

Die Nachfrage nach modernen und damit zeit- und kostensparenden Analysemethoden ist größer denn je. Dies ist einerseits durch verändertes Forschungsverhalten (screening-Techniken), andererseits durch Bedarf an höherer Sensitivität (Sicherheitstechnik, Arbeitsschutz, Spurenanalytik, Kriminaltechnik) begründet. In den Biotechnologien hat sich ein hoher Bedarf an Verfahren zur schnellen Bestimmung von Substanzen entwickelt. Dies beinhaltet hinsichtlich der Anwendung von massenspektrometrischen Verfahren zwei Problematiken. Zum einen muss der Analyt möglichst zerstörungsfrei der Analyse zugeführt werden, zum anderen müssen Informationen über seine Struktur erhalten werden. Dies gilt insbesondere für unterschiedliche Proben, die aus identischen Untereinheiten aufgebaut sind (z.B. DNA). Zur Lösung des ersten Problems stellt die von Hillenkamp und Karas¹ sowie Tanaka² entdeckte Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) neben Electro Spray Ionisation (ESI) inzwischen eine der wichtigsten Techniken dar. In Kombination mit chromatographischen Trennmethode und unterschiedlichsten Massenspektrometrie-(MS)-Technologien ist sie aus der Analytik der Genetik kaum noch wegzudenken. Insbesondere wäre das "human genome"-Projekt ohne den Einsatz von automatisierten MALDI-MS-Geräten nicht mit solcher Rasanz durchführbar gewesen.

Einschränkend für die MALDI in vielen Anwendungsbereichen sind die bis heute eher empirisch begründeten Probenpräparationsmethoden. In einigen Bereichen konnten standardisierte Präparationsprotokolle erstellt werden. Dennoch ist die breite und erfolgreiche Anwendbarkeit an ein grundlegendes Verständnis der ursächlichen Prozesse gekoppelt.

Der MALDI-Prozess gliedert sich, wie der Name schon impliziert, in einen Desorptions*- und Ionisationsprozess. Dennoch überlappen sich die Zeitskalen beider Prozesse, so

*Der Begriff Desorption ist irreführend (vgl. Abschn.3.2), wird hier aber aus historischen Gründen

1. Einleitung

dass eine Trennung immer nur eine Simplifizierung darstellen kann. Die Verwendung unterschiedlicher Matrizes legt den Schluss nahe, dass Matrixeigenschaften sowohl die Ablation als auch die Ionisation beeinflussen. Einige von diesen Eigenschaften sind nur mit aufwendigen Experimenten ermittelbar. Die Ermittlung von Absorptionsspektren der festen Matrizes ist z.B. bisher nur für einige Matrizes gelungen. Wünschenswert wären möglichst einfach zugängliche, grundlegende Eigenschaften der Matrizes, insbesondere spektroskopische Daten, die mit dem Desorptions- und Ionisationsverhalten verknüpft werden können. Erkenntnisse aus der eigenen Diplomarbeit und der Zusammenarbeit mit Dipl. Chem. Dr. Carsten Zechmann bildeten den Startpunkt der dieser Arbeit zugrundeliegenden Forschung. Neben den generellen Unterschieden verschiedener Matrizes wurde die Korrelation von LIF-Spektren mit Initialgeschwindigkeiten ablatierter Neutraler untersucht. Weiterhin wurde die Entwicklung der Ablationswolke (Plume) beeinflusst und die Auswirkungen dieser Beeinflussung auf die Ablationsgeschwindigkeiten analysiert. Geschwindigkeit andererseits stellt den Quotienten zwischen Strecke und Zeit dar. Eine möglichst genaue Kenntnis der Strecke ist somit zur Ermittlung der Geschwindigkeit unerlässlich. Die zur MALDI-Analyse verwendeten Proben weisen dagegen meist eine sehr inhomogene Oberflächenstruktur auf. Es musste ein Verfahren gefunden werden, um die individuelle Probenbeschaffenheit berücksichtigen zu können. Aus diesen Ergebnissen können die sonst nur schwer zugänglichen Dicken einer Probenschicht abgeschätzt werden.

zunächst beibehalten.

2. Theorie der Massenspektrometrie

Grundlage aller massenspektrometrischer Methoden ist Beschleunigung und Trennung von geladenen Teilchen nach Impuls oder Energie. Dazu existieren unterschiedliche Konzepte. Allen gemein ist ein mindestens dreiteiliger Aufbau:

1. Ionenerzeugung und -beschleunigung,
2. Trennung
3. und Detektion.

Auf die Detektion soll im Folgenden nicht gesondert eingegangen werden. Sie erfolgt in vielen Geräten durch Multi-Channel-Plates (MCP) auch in Kombinationen mit Charged-Coupled-Devices (CCD) oder Photomultipliern (PMT). Für einige Standardanalyse-Geräte des alltäglichen Einsatzes (z.B. Restgasanalysatoren) werden auch Faraday-Cups eingesetzt. Daneben existieren Speziallösungen, die z.T. noch Gegenstand aktueller Forschung sind. Dazu gehören z.B. die Kryodetektoren. Sie sollen die Problematik der Detektion von großen Molekülen ($m > 1.5 \text{MDa}$) lösen. Bei diesen wird die Erwärmung eines auf 4K abgekühlten Detektors durch Aufschlagsenergie der Ionen registriert. Leider sind die Reaktions- und Regenerierungszeiten noch zu lang.

2.1. Massenseparatoren

Die ersten Massenspektrometer trennten die Ionen gemäß ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses mit Hilfe der Lorenz-Kraft in einem starken magnetischen (B-)Feld. Neben diesem nach Impuls auftrennenden Verfahren kann in Kombination oder allein durch ein elektrisches (E-)Feld auch nach Energie getrennt werden. Weitere Geräte, wie Quadrupol-Massenfilter oder Ion-Trap-Geräte, trennen durch den Aufbau statischer und/oder dy-

namischer E-Felder. Allen gemein ist die Detektion eines selektierten $\frac{m}{z}$ -Verhältnisses. Zum Generieren eines kompletten Spektrums müssen experimentelle Parameter variiert werden.* Neben einem Ionen-Cyclotron- (ICR) stellt das Flugzeitmassenspektrometer eine Methode zur Akquisition des kompletten $\frac{m}{z}$ -Bereichs mit einer Einstellung dar. Das einfachste Konzept, die simple Messung einer Flugzeit durch eine feldfreie Strecke, konnte erst durch Verwendung von Laserionisationsverfahren effizient realisiert werden. Der folgende Abschnitt soll eine kurze Einführung in das Konzept der Flugzeit-MS geben.

2.1.1. Flugzeitmassenspektrometer

Neben der Aufzeichnung eines kompletten Spektrums pro Ionisationsereignis hat ein Flugzeitmassenspektrometer (**T**ime-**O**f-**F**light-MS) auch den Vorteil des theoretisch unbegrenzten Massenbereichs. Besonders geeignet ist es daher für Untersuchungen hochmolekularer Substanzen. Daneben haben sich TOF-MS in der Forschung bei der Untersuchung laserinduzierter Prozesse etabliert. Ein TOF-MS besteht in seiner einfachsten Form aus einem evakuierten Rohr. An seinem einen Ende befindet sich die sogenannte Ionenquelle, am anderen der Detektor. Die in der Quelle gebildeten Ionen werden in der Regel auch dort durch elektrische Felder beschleunigt. Alle Ionen erhalten so im idealen Fall die gleiche kinetische Energie.

$$E_{el} = ezU_{Beschl} = E_{kin} = \frac{1}{2}m\vec{v}^2$$

E_{el} : potenzielle Energie des elektrischen Feldes, U_{Beschl} : anliegende Spannung

e : Elementarladung, z : Ladungszahl, E_{kin} : kinetische Energie der Ionen,

m : Masse der Ionen, \vec{v} : Geschwindigkeit der Ionen im Flugrohr (2.1)

Im Flugrohr trennen sich Ionen verschiedener $\frac{m}{z}$ -Verhältnisse nun nach ihrer Geschwindigkeit auf (Gl.2.1) und werden zeitlich getrennt am Detektor registriert. Die Güte dieser zeitlichen Trennung bestimmt maßgeblich das Auflösungsvermögen des TOF-MS. Je nach verwendetem Ionisierungsverfahren ist das Auflösungsvermögen dieser einfachen Form jedoch schlecht bis sehr schlecht. Für ein lineares TOF können Werte von $R = \frac{m}{\Delta m} = 500$ bis 1000 erreicht werden. Dies ist jedoch nur durch ein spezielles Arrangement der Beschleunigungsstrecke(n) in der Quelle möglich. Im idealen Fall würden

*Durch die Verwendung von CCD-Detektoren für B- und E- Feld-Geräte ist heute die Aufzeichnung eines größeren m/z -Bereichs mit einer Einstellung möglich.

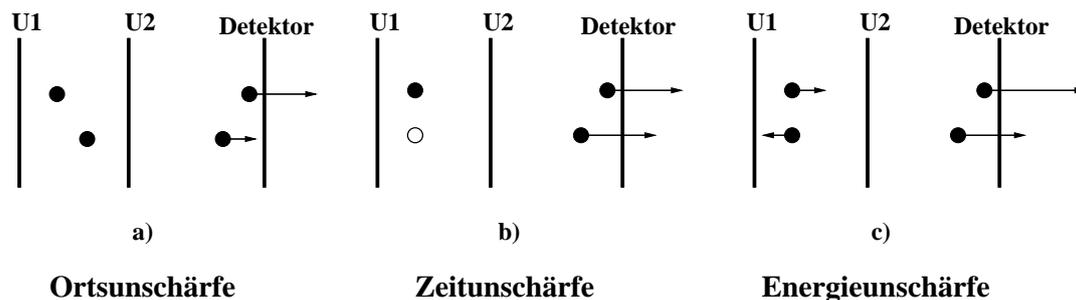


Abbildung 2.1.: Verschlechterung des Auflösungsvermögens in einem TOF.

die Ionen zu einem Zeitpunkt, an einem Ort und mit einer initialen Energie bzw. Geschwindigkeit gebildet. Dabei muss nicht nur der Betrag der Geschwindigkeit identisch sein, sondern auch noch ihre Richtung.

Nur wenige Ionisationsverfahren sind in der Lage, eben diese Forderungen zu erfüllen. Am nächsten kommt dem wohl die REMPI-Technik in einem Molekularstrahl (Abschn. 2.2.1). Trotzdem bleibt auch hier das Auflösungsvermögen begrenzt, z.B. durch die Größe des Laserspots und damit einer endlichen Ausdehnung des Ionisationsortes. Um nun den Fehler des Ionisationsortes kompensieren zu können, bedarf es einiger Eingriffe in die Beschleunigung der Ionen.

Bei einer einstufigen statischen Beschleunigung ist der Ortsfokus, der Punkt an dem Ionen eines $\frac{m}{z}$ -Verhältnisses nahezu zeitgleich eintreffen, festgelegt. Er liegt in einer Entfernung, die der zweifachen Quellenausdehnung entspricht.³ Eine Beeinflussung durch Variation der Spannungen ist nicht möglich. Zur Korrektur einer Varianz im Ionisationsort wird diese Beschleunigungsstrecke in mehrere Teilbereiche getrennt. Dabei hat sich vor allem der zweistufige Aufbau bewährt. Diese Anordnung wurde von Wiley und McLaren eingeführt, so dass sich als Synonym der Begriff „Wiley-McLaren-Quelle“ geformt hat.⁴ Bei dieser Anordnung kann der Ortsfokus durch geeignete Wahl der Geometrie oder der Spannungen weiter von der Quelle weg, hin zum Detektor verlagert werden. Erforderlich wird dies, um lange Flugstrecken zur besseren Auftrennung der Ionen einsetzen zu können. Maßgeblich sind die Potenzialgradienten in den Teil-Beschleunigungsstrecken. Für den oben geschilderten zweistufigen Fall wird in der ersten Beschleunigungsstrecke ein schwächerer Gradient als in der nachfolgenden benutzt. Hierzu sollen die Begriffe Repeller für die abstoßende Elektrode, 1. Beschleunigungsplatte für die Trennungselektrode der Teilbereiche und 0V- oder Erdplatte für die den Quellenbereich abschließende

2. Theorie der Massenspektrometrie

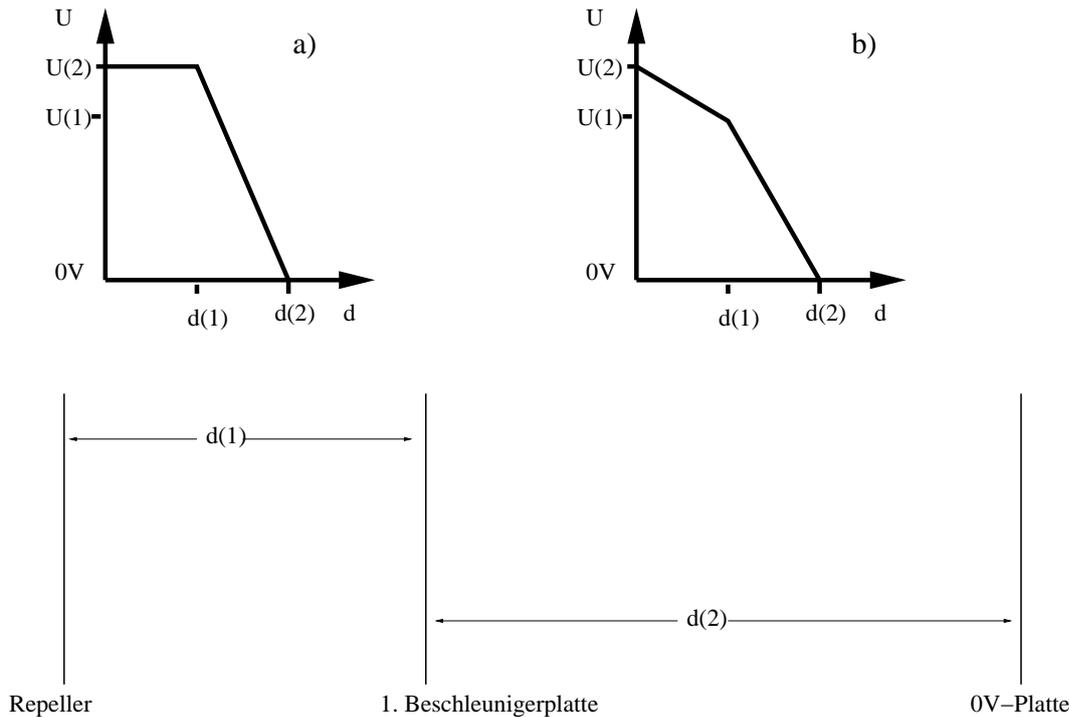


Abbildung 2.2.: Schematische Darstellung einer Wiley-McLaren-Anordnung. Fall a: „delayed extraction“ zum Zeitpunkt der Ablation. Fall b: Statischer Betrieb oder „delayed extraction“ zum Zeitpunkt des Ionenabzuges.

Elektrode eingeführt werden (siehe Abb.2.2, Fall b).

Abweichungen in der Anfangsgeschwindigkeit oder -energie können so jedoch nicht kompensiert werden. Prinzipiell existieren zwei Ansätze zu deren Korrektur: ein statischer Ionenreflektor oder eine gepulste Beschleunigung.

Der statische Ionenreflektor besteht aus einem Bremsfeld, das die potenzielle Energie der Quelle, namentlich das Potenzial am Ionisationsort, übersteigt. Im Reflektor werden Ionen abgebremst und meist in Gegenrichtung beschleunigt (0° -Reflektor). Hierdurch wird gleichzeitig eine Verkleinerung der Gerätedimensionen bei gleichbleibender Flugstrecke erreicht. Bei dem Ionenreflektor handelt es sich aber zugleich um einen sogenannten Energiefilter. Für Ionen einer kinetischen Energie existiert eine Flugbahn durch den Reflektor (unabhängig von ihrem m/z -Verhältnisses). Treffen nun Ionen mit höherer Energie auf den Reflektor, so dringen sie tiefer ein und verweilen so etwas länger in ihm. Ionen mit weniger als der idealen Energie werden früher reflektiert, verlassen den Reflektor somit früher und sparen Zeit auf dem Weg zum Detektor. Im idealisierten Fall werden Energieunterschiede so, zeitlich gesehen, ausgeglichen. Die Ionen eines m/z -Verhältnisses

2. Theorie der Massenspektrometrie

mit verschiedenen Anfangsenergien erreichen nun zeitgleich den Detektor. Wie überall spielt die Güte der elektrischen Felder eine wesentliche Rolle für die Effizienz der Korrektur. Deshalb werden Reflektoren meist aus vielen Elektroden aufgebaut (bis zu 80).⁵ Weiterhin wird sofort klar, dass das einfache Grundprinzip recht hohe Anforderungen an die geometrische Anordnung stellt. Für optimale Ergebnisse muss der Ortsfokus der Quelle am Beginn des Reflektors liegen und der Detektor genau im Energiefokus des Reflektors. Um nun die baulichen Dimensionen des Reflektors zu verkleinern und seine Eigenschaften individuell anpassen zu können, werden auch hier wieder mehrere Gradienten eingesetzt. Hierbei werden die Ionen zumeist auf ein Drittel ihrer Geschwindigkeit abgebremst und hernach in der letzten Stufe reflektiert. Die Abbremsung erfolgt in einer ein- oder zweistufigen Region. Neue Konzepte versuchen, diesen komplexen Aufbau zu umgehen. Hier besteht der Reflektor nur aus einem Stück.⁶ Aus der Form des Reflektors ergeben sich Feldlinien, die eine Korrektur ermöglichen.^{3,7} Das Auflösungsvermögen erreicht jedoch nicht die Werte der mehrstufigen Konzepte. Somit stellt diese Variante des Reflektors bisher eher eine Lösung für miniaturisierte TOF-MS im mobilen oder stationären Einsatz (sogenannte „embedded systems“) dar.

Eine Abweichung im Ionisationszeitpunkt kann jedoch durch keines der beschriebenen Verfahren kompensiert werden. Dafür bedarf es gepulster Felder. Hierunter fällt die delayed-extraction Methode (DE) und das post-source-pulse-focusing (PSPF).

Bei DE-Methoden werden in der Quellregion anstelle statischer gepulste Beschleunigungsfelder verwandt. Den Molekülen wird damit die Zeit sowohl zur Ionenbildung als auch zur räumlichen Verteilung je nach Initialgeschwindigkeit gegeben. Nach einer angemessenen Zeit wird das Beschleunigungsfeld angeschaltet (siehe Abb.2.2, Fall a vor, und Fall b nach Schalten der Beschleunigungsschaltung). Hierin liegen auch die Schwierigkeiten dieser Methode. Es müssen z.T. , insbesondere für die MALDI, sehr hohe Spannungen schnell geschaltet werden. Trotzdem muss eine hohe Feldhomogenität gewährleistet sein. Felddurchgriffe und Restfelder stellen bei mehrstufigem Aufbau und Pulsen der ersten Teilstrecke durchaus Fehlerquellen dar.

Wird eine statische Quelle benutzt, kann eine nachgelagerte, gepulste Beschleunigungsstrecke (PSPF) ähnliches leisten. Hier werden ebenfalls zeitliche Abweichungen aber auch die Energiedispersion kompensiert. Schnelle Teilchen und solche, die früh gebildet wurden, driften tief in diese Region hinein. Dagegen werden sich langsame und spät gebildete Ionen noch am Anfang der Region befinden, wenn die Beschleunigungsspannung angelegt wird. Somit erfahren die zu langsamen und die spät gebildeten Ionen eine

2. Theorie der Massenspektrometrie

höhere Zusatzbeschleunigung (siehe Abb.2.3). Hierbei werden wesentlich geringere Spannungen geschaltet. Zudem ist die Feldhomogenität in der recht langen, durch viele Elektroden realisierten Region leichter zu bewerkstelligen als bei den DE-Methoden. Nachteilig am PSPF-Verfahren ist die Auswertung der Massenspektren. Die Abhängigkeit der Flugzeit ist nun nicht mehr durch eine einfache Proportionalität zur Wurzel des m/z -Verhältnisses beschreibbar. Sie wird durch Gleichungen höherer Ordnung wiedergegeben. Werden die Teilbereiche einzeln analysiert, so erhält man für die Gesamtflugzeit die von Ioanovicu hergeleitete Formel in Abhängigkeit der Masse (Gl.2.2).⁸

$$t = a_0 + a_1\sqrt{m} \left[\sqrt{1 - \frac{a_2}{\sqrt{m}}} - a_3 + \frac{a_4}{\sqrt{1 - \frac{a_2}{\sqrt{m}}}} \right] \quad (2.2)$$

Im Arbeitskreis wurde dagegen experimentell eine andere Gleichung gefunden (2.3).⁹ Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie weniger Parameter benötigt und deshalb mit weniger Kalibrationspunkten auskommt.

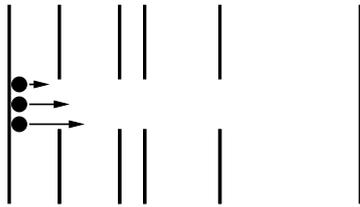
$$t = c_0 + c_1\sqrt[4]{m} + c_2\sqrt{m} + c_3\sqrt[4]{m^3} \quad (2.3)$$

Die Koeffizienten $a_{0..4}$ bzw. $c_{0..3}$ müssen für jede Einstellung von Spannungswerten und Schaltzeiten experimentell bestimmt werden. Weiterhin kann nur ein Teil des Massenspektrums ausgewertet werden. Leichte bzw. hochgeladene Ionen haben das PSPF bereits passiert, wenn es aktiviert wird. Ihre Flugzeit bleibt unbeeinflusst und Abweichungen in Energie und Zeit unkorrigiert. Dieser Bereich kann unter rechnerischem Aufwand mit erfasst werden. Langsame Ionen haben die Region noch nicht erreicht. Sie werden vom eingeschalteten PSPF-Feld abgebremst. Ihre Einbeziehung ist umso schwieriger. In der Praxis erweist sich das PSPF als sehr selektives Verfahren. Ein zuvor festgelegter Bereich kann wie mit einer Lupe ausgewählt werden. Im kommerziellen Bereich wird das PSPF im Gegensatz zur DE nicht in seiner hier beschriebenen Form eingesetzt. Es kommt jedoch als sogenannter „Ionenfahrstuhl“ in Geräten der Fa. Bruker Daltonics bei der Fragmentanalyse zum Einsatz.

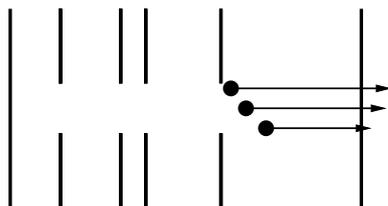
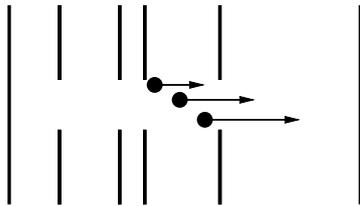
2.2. verschiedene Ionisationsverfahren für TOF-MS

Aus den obigen Ausführungen sind wesentliche Anforderungen an die Quellen für ein Flugzeitmassenspektrometer ersichtlich. Die Ionen müssen gepulst gebildet oder in das

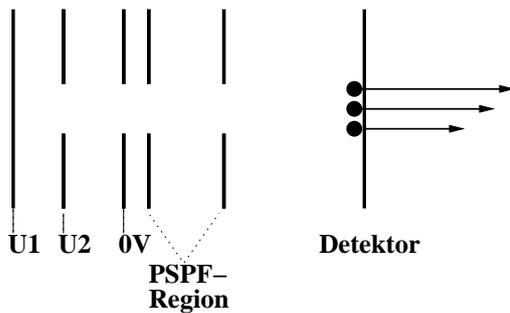
Energieunschärfe



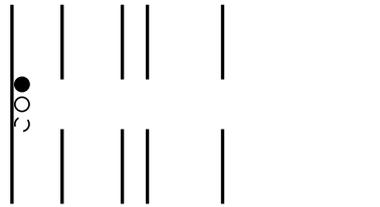
Ionen starten mit unterschiedlichen Energien und befinden sich zum Schaltzeitpunkt des PSPF an unterschiedlichen Orten im PSPF-System.



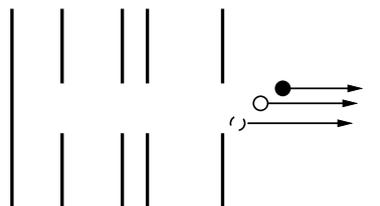
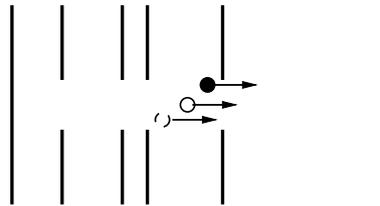
Aus der Nachbeschleunigung resultieren unterschiedliche Geschwindigkeiten in der Driftstrecke. Die Ionen erreichen zeitgleich den Detektor.



Zeitunschärfe



Die Ionen werden zu unterschiedlichen Zeiten gebildet. Sie befinden sich zum Schaltzeitpunkt an verschiedenen Orten in der PSPF-Region.



Nach dem PSPF sind aus identischen Energien durch die Nachbeschleunigungen verschiedene Geschwindigkeiten entstanden. Die Ionen erreichen zeitgleich den Detektor.

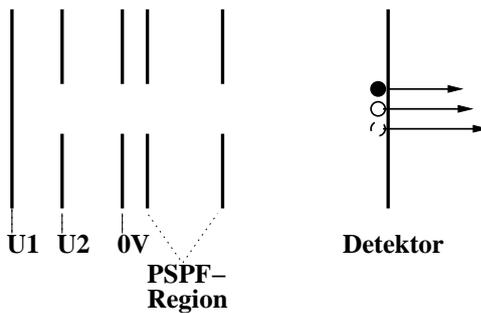


Abbildung 2.3.: Wirkungsweise des PSPF-Systems.

TOF eingelassen werden. Die Ionen müssen als möglichst kompaktes Paket, sowohl räumlich als auch zeitlich, der Beschleunigung ausgesetzt werden. Für kontinuierliche Ionisationsverfahren wie Elektronenionisation (EI), Elektrosprayionisation (ESI) und Chemischer Ionisation (CI) bleibt daher nur der gepulste Einlass oder Abzug der Ionen. Neben der etablierten DE-Methode stellt die Hadamard-Transformation¹⁰ eine interessante Alternative dar. Hierbei wird dem Ionenstrom eine Matrize aufmoduliert. Durch spätere Rückrechnung, ähnlich der Fourier-Transform-Modulation, gelingt es, Flugzeitmassenspektren zu erhalten. Dies ist insbesondere für Anwendungen mit kontinuierlicher Probenzuführung interessant. Hier sind insbesondere die Kopplungen der TOF-MS mit Flüssigkeits- (HPLC) und Gaschromatographie (GC) zu nennen.

In den folgenden Abschnitten soll auf die lasergestützten Verfahren näher eingegangen werden. Sie haben der Flugzeitmassenspektrometrie zum Aufschwung verholfen. Nicht zu verleugnen ist allerdings ihr Nachteil. Sie sind kostenintensiv und z.T. wartungsaufwendig. Jedoch ist zu erwarten, dass die zunehmende Halbleiterlaserentwicklung auch hier in Zukunft Abhilfe schaffen wird. Auf die in dieser Arbeit angewandte MALDI soll gesondert eingegangen werden (s. Abschn.3)

2.2.1. (Resonant enhanced) Multi Photon Ionisation ((RE)MPI)

Die Ionisation mit hochenergetischen Photonen ist in der Chemie seit langem bekannt. Das dazu nötige (V)UV-Licht wurde durch Hochdruck-Gasentladungslampen generiert. Jedoch sind die Photonendichten zum einen gering und zum anderen entstehen zeitlich breite Ionenpakete. Heute werden solch einfache Konzepte jedoch für den Bau von kompakten Geräten wieder aufgegriffen (z.B. Fa. Syagen Technology Inc., Tustin). Einen Innovationsschub erfuhr die TOF-MS mit dem Aufkommen der Laser. Sie generieren hohe Photonendichten in ggf. kurzer Pulsdauer. In der Spektroskopie werden dabei meist frequenzverdoppelte Farbstoff- oder Festkörperlaser eingesetzt. Diese bieten Pulsdauern von einigen ns und weisen spektrale Bandbreiten von 0.001 bzw. 0.01nm auf. So können selbst in Substanzgemischen selektiv einzelne Spezies angeregt werden. Allerdings kann mit einem Photon die Ionisationsgrenze der meisten Moleküle nur im VUV überschritten werden (bei 10eV wäre dazu eine Wellenlänge von ca. 124nm nötig). Nun kann Ionisation nicht nur durch einen solchen Einphotonen-Übergang, sondern auch durch Mehrphotonen-Übergänge realisiert werden. Hierbei unterscheidet man nach Anzahl der benötigten Photonen, ob diese eine Wellenlänge haben und ob dieser Übergang

resonant oder nichtresonant stattfindet. Für nichtresonante Multiphotonenionisationen (MPI) sind ungleich höhere Photonendichten nötig.

Zur Erklärung der Prozesse muss zuerst die Absorption verstanden werden. Diese bildet auch den ersten Schritt für die in Abschn.4.1 besprochene laserinduzierte Fluoreszenz. Ein Teilchen befindet sich bei Raumtemperatur zumeist im elektronischen Grundzustand. Jedoch sind höhere Schwingungs- und Rotationsniveaus gemäß der thermischen Verteilung besetzt. Wird diesem Molekül Energie zugeführt, z.B. durch Einstrahlung von Photonen geeigneter Wellenlänge, kann es in einen angeregten Zustand promoviert werden. Maßgeblich hierfür sind die Population von Schwingungs- und Rotationszuständen im Grundzustand, das Vorhandensein von resonanten Übergängen zum angeregten Zustand bei der jeweiligen Energie, hinreichend große Übergangswahrscheinlichkeiten und fehlende, schnellere Deaktivierungsprozesse. Gemäß der Born-Oppenheimer-Näherung können die Atomkerne der schnellen Anregung von Elektronen nicht folgen. Die Anregung erfolgt als sogenannter senkrechter Übergang. Ein Übergang ist umso wahrscheinlicher, je höher sein Franck-Condon-Überlappungsintegral ist. Daraus ergibt sich die Konsequenz, dass eine direkte Anregung in den Schwingungsgrundzustand unwahrscheinlich ist (Abb.2.4).

Wie im Abschn.4.1 gezeigt wird, erfolgen aus diesem Zustand mehr oder minder schnell Deaktivierungsprozesse. Wird ein zweites Photon innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustandes absorbiert, so kommt es zur Ausbildung eines höher angeregten Zustandes. Liegt dieser oberhalb der Ionisationsgrenze, treten Deaktivierung und Ionisation als konkurrierende Reaktionen auf. Andernfalls können alle oben skizzierten Vorgänge erneut stattfinden. Für die REMPI bedeutet die Existenz resonanter Übergänge eine vermehrte Population und vergleichsweise längere Lebensdauer. Ein nichtresonanter Übergang findet in virtuelle Zustände statt. Diese sind von extrem kurzer Lebensdauer und können nur im intensiven Laserfeld gebildet werden. In üblichen Experimenten wird zur MPI die Laserstrahlung daher stark fokussiert. Meist entstehen dadurch jedoch auch starke Fragmentationen, und das sogenannte „ladder-switching“ tritt vermehrt auf. Hierbei wird ein entstandenes Fragment erneut angeregt und zerfällt. Dieser Prozess kann sich mehrfach wiederholen. Die Namensgebung liegt in dem Wechsel zu jeweils einer neuen „Energieleiter“ begründet.*

Besonders geeignet für die Photoionisation sind Systeme mit ausgedehntem, konju-

*Natürlich ist „ladder-switching“ auch bei REMPI möglich. Wegen der dort verwendeten geringeren Leistungsdichten tritt es jedoch weit weniger häufig auf.

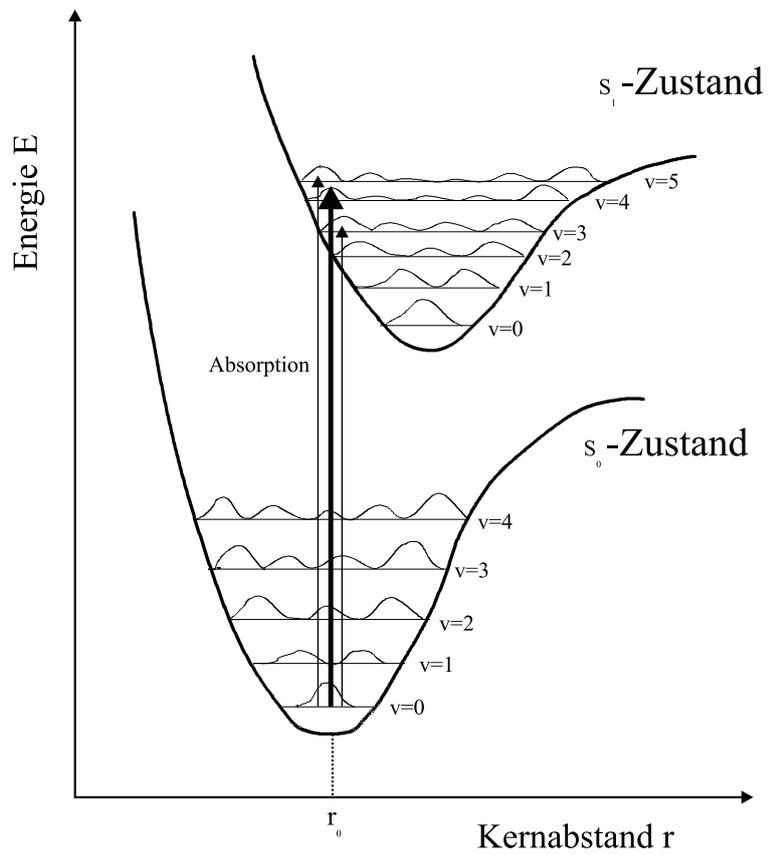


Abbildung 2.4.: Schematische Darstellung der Absorptionswahrscheinlichkeiten bei verschiedenen Überlappungsintegralen.

2. Theorie der Massenspektrometrie

gierten π -Elektronensystem. Der Chemiker bezeichnet solche als Chromophore, da sie bei langer Konjugation bereits Absorption im sichtbaren Licht aufweisen. Substanzen, die lediglich einen Benzolkern aufweisen, zeigen dagegen Absorptionsverhalten im UV-Bereich. Wird der Benzolkern funktionalisiert, so kommt es zu einer Verschiebung der Absorption zum längerwelligen (barthochrom) oder kürzerwelligen (hypsochrom) Bereich des Spektrums. Insbesondere mesomere Effekte (M-Effekt) erweisen sich als wirkungsvoll. Ein +M-Effekt führt meist zu ausgeprägter barthochromer Verschiebung. Hierdurch wird auch der Einfluss von Heteroatomen, insbesondere wenn sie in die aromatische Struktur integriert sind, ersichtlich.

Besondere Bedeutung hat die REMPI zur Ermittlung von Ionisationsenergien. Innerhalb eines gut gekühlten Molekularstrahls werden hier die Populationen des Grundzustands erreicht, die bezüglich der Rotation einer Temperatur von ca. 4-15K und bezüglich der Vibration einer Temperatur von ca. 50K entsprechen.¹¹ So kann durch Ionisation der darin enthaltenen Moleküle deren Ionisationsenergie untersucht werden. Häufig werden zur genaueren Bestimmung Photonen verschiedener Wellenlänge eingesetzt.

Bei der im Abschn.5 eingesetzten Postionisation befinden sich die Moleküle dagegen in einem expandierenden Plume, der teilweise jetähnliche Eigenschaften aufweist. Aufgrund der initialen „Aufheizung“ ist der Plume jedoch weit entfernt von einem kühlen Molekularstrahl. Im allgemeinen werden Temperaturen von 65K bis 1200K (s.Abschn.3) angenommen. Hier ist also von einer thermischen, relativ breiten Population des Grundzustandes auszugehen. Dies zeigt sich z.B. in der guten Ionisierbarkeit aller eingesetzten Substanzen bei 260.00nm.

3. Theorie der MALDI

Die MALDI erweist sich in zweierlei Hinsicht für große Biomoleküle und Polymere als besonders geeignet. Zum einen sorgt sie für die relativ zerstörungsfreie Überführung des Analyten in die Gasphase, zum anderen für dessen Ionisation. Bis zum heutigen Zeitpunkt existiert keine tiefere, detaillierte Einsicht in die während der Ablation des Festkörpers ins Vakuum, weit entfernt von jeglichem Gleichgewichtszustand, ablaufenden Prozesse. Es darf bezweifelt werden, dass es *den* MALDI-Mechanismus gibt. Zahlreiche Untersuchungen mit unterschiedlichsten Experimenten oder theoretischen Modellen kommen je nach Ausgangssituation zu differenten Ergebnissen. So müssen gerade in letzter Zeit Thesen, die nahezu als Grundbedingungen galten, neu überdacht werden. Untersuchungen mit verschiedenen Laserwellenlängen zeigen, dass die Matrix nicht notwendigerweise bei der verwendeten Laserwellenlänge ein Absorptionsmaximum aufweisen muss.¹² Vielmehr reicht auch eine mäßige Absorption aus. Berücksichtigt werden müssen dabei Effekte, die zur Verschiebung der Absorption führen, z.B. Fehlstellen im Kristall, wie sie naturgemäß in der MALDI häufig vorkommen werden. Weiterhin scheint eine Inkorporation des Analyten in den Matrixkristall nicht notwendig zu sein, da gute Spektren auch von lediglich fein gemahlten und aufgestäubten Proben generiert werden können. Gerade die breite Anwendbarkeit für verschiedene Analyt- und Matrix-Klassen zeigt auch die Vielfalt der ablaufenden Prozesse. Prozesse, die auf unterschiedlichen Protonenaffinitäten beruhen, sind z.B. auf relativ inerte Moleküle wie Polymere nicht anwendbar. So wird wohl eher für eine bestimmte Matrix-Analyt-Kombination eine Dominanz des einen oder anderen Prozesses existieren. Diese stehen aber dennoch stets in Konkurrenz zu anderen.

Ein grundlegendes Problem bei der Erforschung der MALDI ist die Vielzahl der gleichzeitig ablaufenden Prozesse. Zumindest für die UV-MALDI laufen Ablation und Ionisation parallel ab. Laserpulslänge, Lebenszeit des angeregten Zustandes und Ausbil-

derung der Ablationswolke finden auf der ns-Zeitskala, wenn nicht sogar teilweise auf der ps-Zeitskala statt. Ein Problem, auch in experimenteller Hinsicht, ist also die Trennung von Ablation und Ionisation, ohne die Startbedingungen jeweils außer Acht zu lassen. Im Folgenden sollen zunächst die unterschiedlichen, in der Literatur angeführten Modelle der Ionisation und anschließend der Desorption beschrieben werden. Da im wesentlichen die UV-MALDI verbreitet ist und Gegenstand dieser Arbeit war, werden die folgenden Ausführungen auch mit Schwerpunkt auf diese Variante gemacht.

3.1. Ionisationsmechanismen der MALDI

Üblicherweise werden MALDI-Spektren im positiv-Ion-Modus aufgezeichnet. Unabhängig vom Modus werden in der Regel wenig direkt photoionisierte Moleküle beobachtet. Insbesondere die Analytionen werden als protonierte, kationisierte oder Clusterionen detektiert. Bezogen auf einen Analyten und die meisten Matrixmoleküle muss also ein mehrstufiger Prozess stattfinden. Es wird deshalb die primäre Ionisation von der sekundären unterschieden. Während der primären Ionisation werden Ionen aus Neutrallen gebildet. Hierbei handelt es sich überwiegend um Matrixmoleküle, die ja auch im großem Überschuss vorliegen. Die Prozesse der sekundären Ionisation sind im wesentlichen Übertragungs- und Anlagerungsprozesse. Hier werden Ladungen, Protonen, Ionen oder Kationen auf neutrale Moleküle oder Cluster übertragen. Maßgeblich durch die Entwicklung der Desorptionswolke (Desorptionsplume, kurz: Plume) beeinflusst, finden zahlreiche Prozesse statt. Diese führen letztendlich zur Bildung vieler, ionisierter Spezies, darunter meist auch protonierte Analytmoleküle (AH^+).

Primäre Ionenbildung

In der Literatur wird eine Vielzahl von Modellen zur Ionenbildung diskutiert. Hierbei ist insbesondere die primäre Ionenbildung noch unverstanden. Die zunächst angenommene MPI (Abschn.2.2.1) erweist sich bei genauerer Betrachtung als eher unwahrscheinlich. Die Ionisierungsenergien (IE) der verwendeten Matrices liegen oberhalb 8eV. Unter UV-Anregung reichen hier zwei Photonen eines verdreifachten Nd:YAG-Lasers oder eines Stickstofflasers, die üblicherweise bei MALDI-Experimenten anzutreffen sind, nicht aus. Erst mit der vierten Harmonischen eines Nd:YAG wäre eine Zwei-Photonen-Ionisation möglich. Drei-Photonen-Prozesse erscheinen wegen der kurzen Lebenszeiten der ange-

regten Zustände^{13,14,15} und Laserleistungsdichten unwahrscheinlich. Sie wurden lediglich für 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) (IE=8.05eV¹⁶) als untergeordneter Prozess gefunden.¹⁶ Einschränkend muss festgestellt werden, dass die IE in der Gasphase gemessen wurden. So konnte bereits für das DHB-Dimer eine verringerte IE von 7.93eV festgestellt werden.¹⁷ Ebenso zeigen Beimengungen von Analyten in Clustern eine Verminderung der IE von 1eV.¹⁸ Dies wird durch Rotverschiebung der Absorptionsspektren von Einkristallen, dotierten Einkristallen¹⁹ sowie mikrokristallinen Proben^{20,21} ebenfalls gestützt. Aus selbigen Überlegungen ist auch die Ionisation mit 400nm¹² möglich, zumal bei dieser Untersuchung sogar nicht lineare Effekte aus der starken Anregung eines fs-Laserpulses nicht ausgeschlossen werden können.

Wird dagegen mit 266nm angeregt, so ist ein Überschreiten der IE mit 2-Photonen direkt möglich. Nach Absorptionsspektren von Allwood et al. wird bereits der S₂-Zustand populiert.²⁰ Für diesen wird ein repulsives Potenzial angenommen. In den MS-Spektren wurde dagegen keine Zunahme der Matrixradikalkationen beobachtet.¹² Dieser Effekt kann jedoch auch sekundären Ionisationsmechanismen zugeschrieben werden (vgl. Abschnitt 3.1.3).

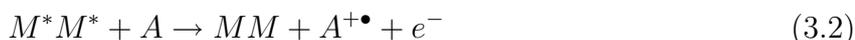
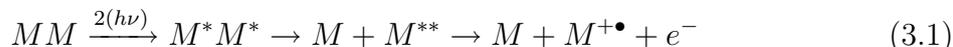
Die Existenz vorgebildeter Ionen war ein weiterer Mechanismus, der kontrovers diskutiert wurde.^{22,23} Dieser Weg ist nur für Verbindungen mit stark ionischem Charakter oder starken Komplexbildnern denkbar. Bei großen Ionen wäre dann nur relativ wenig Energie nötig, um sie aus dem Kristallverband zu lösen. Allerdings lägen diese Ionen nicht „nackt“ vor. Es müsste eine Trennung vom Gegenion erfolgen. Ihre Trennung im expandierenden Plume scheint möglich, da Geschwindigkeiten von 1000m/s und mehr für desorbierte Teilchen festgestellt wurden. Eine Kollision könnte demnach bis zu 0.8eV Energie einbringen. Bei einem Abstand von 0.5nm der Ladungsträger müssten mindestens zwei Stöße stattfinden, die ihre volle Energie übertragen.²⁴ Die Wahrscheinlichkeit dafür ist gering. Andererseits wäre die Wahrscheinlichkeit der Rekombination ebenfalls sehr niedrig, da in der MALDI zusätzlich ein hohes Abzugspotential anliegt.

Im Folgenden sollen einige Mechanismen vorgestellt werden, die derzeit in der Literatur als die dominierenden Reaktionswege der MALDI angesehen werden.

3.1.1. Energy pooling

Ein Modell, das zwar von mehrfacher Anregung durch Photonen, nicht aber von der unwahrscheinlichen direkten Ionisation ausgeht, ist das „energy pooling“-Modell. In die-

sem werden benachbarte Matrixmoleküle angeregt. Wie aus Gl.3.1 ersichtlich, entstehen aus zwei angeregten Matrixmolekülen (M^*) zunächst ein hochangeregtes (M^{**}). Von diesem ist dann sowohl die Bildung eines Matrixradikalkations ($M^{+\bullet}$) als auch die eines Analytations ($A^{+\bullet}$) möglich.



Dieser Mechanismus weist gegenüber der MPI schon allein aus geometrischen Gründen eine wesentlich höhere Wahrscheinlichkeit auf. Weiterhin lassen sich so Matrix-Suppression-Effekte, Fehlen von Matrixionen bei bestimmten Analyt/Matrixverhältnissen, und quenching (vgl. 4.1) von Fluoreszenz erklären. Kommt es zur reaktiven Begegnung zweier angeregter Teilchen wird in diesem Modell eines seine Energie abgeben. Der Anteil der Moleküle im S_1 -Zustand verringert sich. Aus diesem findet jedoch die Fluoreszenz statt. Das Auftreten von Quenching zeigt jedoch nur, dass ein Deaktivierungskanal existiert. Der Matrix-Suppression-Effekt ließe sich konsistent mit diesem Modell erklären. Entspricht die vorhandene Teilchenzahl an Analyten gerade der an hochangeregten Zentren, so kann es zur ausschließlichen Bildung von Analytionen kommen. Dies kann jedoch nur der Fall sein, wenn die Bildung von Analytionen energetisch oder kinetisch gegenüber der Bildung von Matrixionen begünstigt ist. Letzteres ist wegen dem immer noch vorliegenden Überschuss an Matrixmolekülen nur schwer vorstellbar. Allerdings kann der Matrix-Suppression-Effekt auch durch sekundäre Ionisationsmechanismen erklärt werden (vgl. 3.1.3).

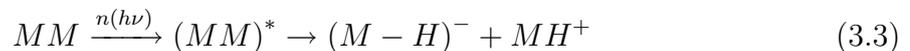
3.1.2. Excited State Proton Transfere (ESPT)

Nur ein Photon benötigt die Protonenübertragung aus dem angeregten Zustand. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Säurestärke eines angeregten Matrixmoleküls zunimmt. So kann daraus eine Protonenübertragung zu Matrix- oder Analytmolekülen stattfinden, sofern letztere eine höhere Protonenaffinität (PA) besitzen.²⁵ Gestützt wird dieser Mechanismus z.B. dadurch, dass Hydroxylgruppen einiger Matrices in der Gasphase eine höhere Acidität als die Carboxyfunktion aufweisen.^{26,27} Untersuchungen von Haglund et al. haben gezeigt, dass die Güte der Massenspektren unabhängig von der eingesetzten Wellenlänge ist.¹² Dies steht im Widerspruch zur Existenz eines Mechanismus, der stark von der Population des angeregten Zustandes abhängig ist. Eine

höhere Population ließe auch eine höhere Ausbeute an Ionen erwarten. Insbesondere, da es sich hierbei um einen einstufigen Prozess zu protonierten Ionen handelt. Diese bilden den überwiegenden Anteil der bei der MALDI gefundenen Ionen. Weiterhin problematisch erweist sich die kurze Lebenszeit des angeregten Zustandes. Sie stellt bei diesem Mechanismus die limitierende Größe dar. Nach neuen Untersuchungen liegt diese im sub-ns-Bereich.¹⁵ Berücksichtigt man die Dauer des Laserpulses, so verbleibt ein Zeitfenster von eben jener. Andererseits werden die folgenden Abschnitte zeigen, dass die Ablation bereits nach 250ps einsetzt und im Wesentlichen nach 150ns abgeschlossen ist. Die Anregung erfolgt also im Festkörper bzw. in der sehr dichten Gasphase. Berücksichtigt man die „Verdünnung“ des Analyten, so ist es wahrscheinlicher, dass zunächst Matrixmoleküle ionisiert werden. Zwischen Matrixion und Matrixmolekül ist jedoch kein so großer Unterschied in der PA zu erwarten, als es bei vielen Matrix-Analyt-Kombinationen der Fall ist. Zusätzlich erweisen sich in Diskrepanz zum ESPT in Lösung weder Substanzen mit bekannter ESPT-Aktivität als gute Matrices, noch zeigen MALDI-Matrices ESPT in Lösung.²⁴

3.1.3. Disproportionierungsmechanismen

Bei Disproportionierungsprozessen handelt es sich dagegen um Mehrzentrenmodelle. Ein vorgeschlagener Reaktionsweg geht wiederum von elektronischer Anregung aus (Gl.3.3). Dieser konzertierte Prozess benötigt weniger Energie als einige zweistufige Mechanismen, in denen letztendlich Protonenanlagerungen stattfinden. Die hierfür benötigten Energien liegen sowohl für DHB (5.24eV) als auch für 3-Hydroxypicolinsäure (HPA) (5.18eV) unterhalb denen der direkten IE.²⁴ Sie sind in jedem Fall durch die Energie zweier Photonen von 355 oder 337nm zugänglich. Auch ein Disproportionierungsmechanismus mit Elektronenübertragung ist denkbar. Es sind jedoch keinerlei Daten für die Elektronenaffinitäten der beteiligten Substanzen unter MALDI-Bedingungen bekannt. Daher sind Abschätzungen über die Existenz eines solchen Reaktionsweges schwierig.



Es gibt noch eine weitere Variante des Disproportionierungsprozesses. Diese bezieht die benötigte Energie nicht direkt aus der Strahlung des Lasers, sondern aus der erfolgten Aufheizung (Gl.3.4). Dieser auch „thermische Ionisation“ genannte Prozess trägt

jedoch den tatsächlich gefundenen Werten der auftretenden Temperaturen nicht Rechnung. In der MALDI werden die sonst bei Laserionisation gefundenen Temperaturen über 3000K^{13,28} nicht erreicht. Vielmehr liegen die Temperaturen bei 500K²⁹ bis 1200K.³⁰

Sekundäre Ionenbildung

Einmal gebildete Ionen werden durch einen anliegenden Potenzialgradienten der Quellenregion Richtung Flugrohr beschleunigt. Zusätzlich zu den ohnehin schon vorhandenen Expansionsgeschwindigkeiten im Plume wirkt also eine weitere beschleunigende Kraft auf diese. Häufige Stoßprozesse mit den im Überschuss von etwa 10^4 - bis 10^5 -fach vorkommenden Neutralen³¹ sind also im frühen Entwicklungsstadium der Desorptionswolke unvermeidlich. Die Dichte beträgt außerdem noch ca. 100ns nach dem Laserpuls einige Prozent der Festkörperdichte.³² In dieser sehr dichten Teilchenwolke kann es somit zu einer Vielzahl von Reaktionen kommen. Diese nachgelagerten Reaktionen erschweren die Erforschung der der MALDI zugrundeliegenden Initialreaktionen, da die detektierten Spezies nicht mehr mit den anfänglichen übereinstimmen müssen. Zu diesen Reaktionen gehören u.a. Kationisation, Protonen-, und Elektronentransfer.

3.1.4. Elektronentransfer

Der Elektronentransfer kann stattfinden, wenn das Ionisationspotenzial einer Spezies, z.B. des Analyten, unterhalb der der Matrix liegt. Wurden in einem Initialprozess Matrixradikalkationen gebildet, so ist eine Reaktion nach



denkbar. Dieser Mechanismus wurde zwar für Ferrozenderivate bestätigt,³³ ist sonst allerdings eher selten möglich, da die Matrizes meist die niedrigeren Ionisierungsenergien besitzen. Mit neutralen Reaktionspartnern entsteht jedoch ein Deaktivierungskanal, der zur Abschwächung von Signalintensitäten führen kann.³⁴

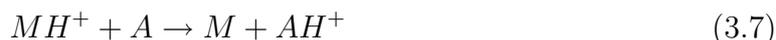
3.1.5. Protonentransfer

Dieser Mechanismus bietet sowohl für protonierte Matrixmoleküle als auch Analytmoleküle eine Erklärung. Initialionen stellen dabei Matrixradikalkationen dar. Aufgrund der üblicherweise hohen Matrixkonzentration ist ein Zusammentreffen von Matrixneutralen

und -radikalkationen am wahrscheinlichsten. Der in Gl.3.6 gezeigte Reaktionsweg wäre eine Erklärung für protonierte Molekülonen bei primärer Radikalkationbildung.



Vom entstandenen protonierten Molekül sind wiederum weitergehende Reaktionen denkbar. Im Falle einer höheren PA eines Analyten ist ein dissoziativer Protonentransfer auf diesen möglich.



So konnte bei Aminosäuren und Dipeptiden eine Abhängigkeit der Analytsignaldetektion von der PA der Matrix und der der Analyte festgestellt werden.^{18,26,35}

Wie im Abschnitt 3.2 gezeigt wird, machen Cluster bei üblichen Laserflüssen einen großen Anteil des ablatierten Materials aus. In diesen kann es zum Transport von Protonen wie in einem Medium mit Wasserstoffbrückenbindungen kommen. Nicht notwendigerweise muss es also zur direkten Begegnung von protonierten Matrixionen und Analyten kommen. Die Existenz von Clustern und die herabgesetzten Ionisierungsenergien von Matrix in Clustern oder bei Koordination mit Analytmolekülen²³ stützt die Existenz des Protonentransfers ebenso wie der Matrix-Suppression-Effekt. Bei geeigneter hoher Analytkonzentration werden kaum Matrixionen, dagegen umso so stärkere Analytsignale detektiert. Finden also Stöße zwischen gebildeten Radikalkationen mit Clustern statt, kann es aufgrund der herabgesetzten IE zum Transferprozess kommen. Einmal gebildete MH^+ -Ionen laufen Gefahr, ein Proton an Cluster oder Analyte zu verlieren bis der Plume durch Expansion „verdünnt“ und abgekühlt ist. Daher ist das Matrix-/Analytionenverhältnis vom Laserfluss abhängig.¹⁸

3.1.6. Adduktbildung

Ein für die Polymeranalytik wichtiger Ionisierungsweg ist die Anlagerung von Kationen. Die zumeist recht unpolaren Substanzen werden nur wenig oder gar nicht protoniert. Der massenspektrometrische Nachweis gelingt über Quasimolekülonen als Alkalikationenaddukt. Diese entstehen mit Hilfe von ubiquitären Verunreinigungen mit Alkalisalzen, durch deren gezielten Zusatz oder additive Kupfer- oder Silberkationen. In dieser Hinsicht war es von Interesse, ob die Anlagerung bereits in der Probe vorliegt oder in der Gasphase vonstatten geht. Durch geeignete Experimente, wie schichtweiser Präparation

bzw. getrennter Freisetzung von zusätzlichen Alkaliionen und DE, konnte die Existenz einer Gasphasenanlagerung nachgewiesen werden.^{36,37,38}

In der Proteinanalytik sind Fremdionen meist unerwünscht. Sie machen die Auswertung der Spektren insbesondere nach gewollter Fragmentierung oder enzymatischer Spaltung bedeutend komplizierter. Daher werden hier Reinigungsmethoden wie ZiP-, Nu-Tip* oder andere eingesetzt.

3.2. Ablationsmechanismen der MALDI

Historisch bedingt wird bei der MALDI die Ablösung von Matrix/Analyt aus der Probe mit Desorption bezeichnet. Dies ist hinsichtlich der tatsächlich ablaufenden Prozesse eine irreführende Bezeichnung. Die Desorption bezeichnet eher das Ablösen einzelner Teilchen als Pendant zur Adsorption. Dies findet umso mehr bei heißen Oberflächen statt. Tatsächlich wird die Laserablation je nach Mechanismus und Einstrahlungsstärke zum Teil von Desorption begleitet. Der dominierende Prozess bei den üblichen Laserenergien ist jedoch die Ablation. Bei dieser werden zum Teil recht große Aggregate aus der Probe herausgestoßen. Im Folgenden sollen die wichtigsten derzeit in der Literatur angeführten Modelle der Laserdesorption/-ablation vorgestellt werden. Dabei wird i. allg. der Begriff Ablation verwendet. Desorption wird nur dann gebraucht, wenn nur desorptive Prozesse beteiligt sind.

3.2.1. Initialparameter der Ablation

Auch wenn die Einflüsse bei den verschiedenen Ablationsmodellen unterschiedlich sind, so ist allen gemein der Einfluss der Laseranregungsbedingungen. Diese werden von Parametern wie Laserpulslänge, Spotgröße, Eindringtiefe, Wellenlänge, Photonendichte, etc. charakterisiert.

Für die Modellvorstellungen spielt der Einfluss der Wellenlänge eine zunächst eher untergeordnete Rolle. Sie geht jedoch in Parameter wie die Eindringtiefe (μ_A) ein. Zur Abschätzung dieser wird meist ein Lambert-Beer-Verhalten der Absorption angenommen. Unberücksichtigt bleiben dabei i. allg. Streuverluste. Für typische Bedingungen beträgt die Eindringtiefe demnach 50-150nm.^{39,40,41}

*ZiP- und Nu-Tip sind eingetragene Warenbezeichnungen der Fa. Millipore bzw. der Fa. Glygen.

3. Theorie der MALDI

Ein wesentliches Kriterium ist auch der Spotdurchmesser. Er ist hinsichtlich des Energieflusses und hinsichtlich der Prozesse innerhalb der Probe maßgeblich. Bei letzteren spielt häufig das angeregte Volumen der Probe eine wichtige Rolle, welches durch Spotgröße und Eindringtiefe definiert wird. Für den Energieeintrag sind zwei Größen wichtig. Die Laseranregung (irradiance, I_{laser}), also der Energieeintrag (W) pro Fläche (a) und Pulsdauer ($I_{laser} = \frac{W}{a\tau} = P/a$), ist vor allem für kinetisch kontrollierte Prozesse relevant. Bei energetisch kontrollierten Prozessen ist hingegen der Laserfluss (fluence, F_{laser}), die Energie pro Flächeneinheit ($F_{laser} = W/a$), entscheidend.

Wird der Laserspot verkleinert, so muss eine höhere Laserflussschwelle überwunden werden, um eine gleiche Gesamtionenausbeute zu erlangen.³¹ Werden hingegen die Neutralen durch Postionisation nachgewiesen, zeigt sich eine wesentlich schwächere Abhängigkeit von der Spotgröße. Hierbei werden jedoch meist nur Monomere erfasst, so dass eine Erklärung im Verhältnis von ablatierten Clustern zu Monomeren liegen könnte. In Simulationen bleibt die Monomerenmenge unabhängig von der Spotgröße, Clusteranteile nehmen mit ihr zu.⁴² Cluster spielen bei einigen Ionisationsmodellen eine maßgebliche Rolle, so dass die Ionisation bei geringerem Anteil gehemmt würde. Ein weiterer Erklärungsansatz geht von der Plumedynamik als Ursache aus. Bei kleinem Spotdurchmesser wird eine andere Plumeexpansion vorgefunden und das Auflösungsvermögen massenspektrometrischer Untersuchungen wird schlechter. Dies könnte auf eine schlechtere Kühlung hinweisen. Das Spotprofil scheint hingegen kaum Einfluss zu haben. Bei nicht zu harter Fokussierung wird kein Unterschied zwischen Gauss- und Flattop-Profil beobachtet.³¹

Der Vergleich der Zeitskalen von Energieeintrag und dissipierenden Prozessen gilt als Entscheidungskriterium für die Dominanz von Modelkategorien wie „thermal“ bzw. „stress confined“. Diese Begrifflichkeiten sollen in nachfolgenden Abschnitten noch eingehender besprochen werden. Hier sei nur erwähnt, dass dazu Kenntnisse von Materialcharakteristika wie Wärmeleitung und Transportzeiten einer akustischen Welle im Medium wichtig werden. Letztere kann über die Schallgeschwindigkeit (v_s) abgeschätzt ($\tau_{acc} = \mu_A v_s^{-1}$) werden.³¹

Eingesetzt werden in der MALDI meist Laser mit einigen ns Pulsbreite. Es wurden aber auch Experimente mit fs- und ps-Pulsen unternommen. Erstaunlich dabei ist, dass die Güte der MS-Spektren relativ wenig von der Anregungsdauer abhängt. So finden Haglund et al. ähnliche Spektren mit fs und ns Pulsen.¹² Unterschiede können allerdings bei der im folgenden Abschnitt beschriebenen Ablationsschwelle auftreten. Steigen die

Pulsängen dagegen in den zwei- oder gar dreistelligen ns-Bereich, nimmt die thermische Zerstörung insbesondere von Analyten zu.^{43,31}

Ein weiterer initialer Parameter, der allerdings auch von der Matrix und nicht nur vom Laser abhängt, ist die sogenannte Ablationsschwelle („ablation“ oder „desorption threshold“, kurz threshold). Experimentell beobachtet man ein plötzlich einsetzendes oder sprunghaft ansteigendes Signal, wenn eine bestimmte Laserintensität überschritten wird. Danach schließt sich oft ein Bereich an, in dem kaum Veränderungen durch mehr Laserintensität hervorgerufen werden. Schließlich nimmt bei weiterer Steigerung die Fragmentation zu und die Molekülsignalintensitäten werden schwächer. Diese Schwelle ist für Analyt und Matrix gleich, zeigt jedoch eine gewisse Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis in der Probe. Erst bei sehr hoher Analytkonzentration wird eine niedrigere Schwelle für den Analyten als für die Matrix vorgefunden.^{31,44,45} Dies könnte ein Erklärungsansatz für den Matrixsuppressioneffekt sein. Jedoch muss hierbei berücksichtigt werden, dass hier sowohl Ablation als auch Ionisation beteiligt sind und bei den experimentellen Daten eine klare Trennung der Prozesse nicht möglich ist. Ein weiteres Problem stellen die Experimente zur Ermittlung dieser Schwelle selbst dar. Wie schon angedeutet, werden häufig die Ionenausbeuten bestimmt. Neben der Abhängigkeit von Ionisationsmechanismen, die möglicherweise ebenfalls Abhängigkeiten vom Laserfluss aufweisen, sind auch experimentelle Parameter ein Hinderungsgrund. So kann z.B. die schlussendliche Signalunterdrückung durch Detektorsättigungen hervorgerufen werden. Des Weiteren können Ionenverluste durch die elektrostatischen und geometrischen Verhältnisse der verwendeten Geräte maßgeblich sein.⁴¹

Ebenso wurde auch eine Matrixabhängigkeit festgestellt. Dies verwundert nicht, da sowohl Absorptions-, Dissipations- und auch Materialeigenschaften (z.B. Kohäsion) eine entscheidende Rolle spielen. Experimentell wird für Spotgrößen von 50-200 μm eine Abhängigkeit der Ausbeute (Y) vom Laserfluss (F) nach $Y \sim F^m$ vorgefunden.⁴¹ Dabei liegen sinnvolle Werte für m zwischen 5 und 10.^{31,46}

Postionisierte Neutrale zeigen ebenfalls einen starken Anstieg mit Zunahme des Laserflusses, allerdings ist dieser etwas schwächer.

3.2.2. Simulationen der Ablation

Simulationsrechnungen tragen dazu bei, eine tiefere Einsicht in die ablaufenden Prozesse der Ablation zu erhalten. Auswirkungen der auslösenden Faktoren auf messba-

re Größen und beobachtbare Phänomene werden sichtbar. So sind z.B. vorgefundene Teilchengrößen ablatierten Materials für sich allein genommen wenig brauchbar, um Rückschlüsse auf den Ablationsprozess zu ziehen. Schließlich können Kondensationsprozesse zu beliebigen Zeitpunkten (z.B. auch noch auf der Detektionseinheit) zu großen und Evaporation zu kleinen Teilchen führen. Mit dem Wissen, dass in Simulationen aber eben solche Teilchengrößen für ein bestimmtes Ablationsmodell stehen, stellen sie Hinweise auf die Dominanz eines Pfades dar. Daher sollen im Folgenden die Simulationsmethoden kurz vorgestellt werden.

Auch heute reicht die Rechenkapazität nicht aus, um alle Parameter eines Atoms zu jedem beliebigen Zeitpunkt in einem großen Volumenverbund mit anderen Atomen zu berechnen. Daher müssen Vereinfachungen vorgenommen werden. Zu diesen zählen: Herabsetzung der Dimensionen und damit Beschränkung der Teilchenzahl, Simulationsdauer, Anzahl der Parameter je Atom usw.. Sehr komplexe Simulationen wurden durch Zhigilei und Garrison vorangetrieben.^{47,48,49,50,51,52,42} Um die Simulationsbedingungen den unterschiedlich schnell ablaufenden Prozessen möglichst gut anzupassen, wurden die Ablationsabläufe in drei Phasen unterteilt. Jede Phase wird durch unterschiedliche Simulationsmechanismen berechnet. Als Initialparameter werden ihr die Ergebnisse der vorherigen Phase übergeben. Die geschätzten Zeitskalen der einzelnen Phasen sind in Klammern angegeben.

Die drei Phasen sind:

1. Photonenabsorption und Energieumverteilung (ps),
2. Desintegration und Abstoßung einer Region (ns),
3. Plumeentwicklung (μ s).

Für die erste Phase werden Moleküldynamische (MD) Simulationen auf atomarer Ebene durchgeführt. Hier wird die Energieabsorption, -umverteilung berechnet. Diese Daten werden an MD-Rechenverfahren auf Molekülebene übergeben. Dazu wird jedes Molekül durch ein Teilchen mit einem internen Freiheitsgrad simuliert. Dieser Freiheitsgrad wird durch die Teilchengröße realisiert und repräsentiert die Photonenanregung und Schwingungsrelaxation. Interne Bewegungen können durch Veränderung des Potentials berücksichtigt werden. Die Anharmonizität des Potentials repräsentiert die Rate des Energietransfers und die Frequenzüberlappung von internen Moden des Moleküls und Gitterschwingungen, sogenannte Phononen.

Um Verfälschungen durch reflektierte Druckwellen zu vermeiden, bieten sich zwei Verfahren an. Einmal die sogenannte „finite element“-Methode und die sogenannte „dynamische Barriere“. Erstere bietet die Möglichkeit, die Fortpflanzung von Druckwellen in der Probe weiter zu verfolgen. Werden dagegen freie oder starre Barrieren eingesetzt, ergeben sich Artefakte aus Reflexionen der Druckwellen an eben diesen. Abhilfe schafft eine dynamische Barriere, die die Druckwelle quasi aufnimmt. Dadurch sinkt allerdings die Anzahl der Teilchen für den interessanten Bereich.

Die Plumeexpansion kann nicht mehr mit so vielen Parametern auf Zeitskalen von mehreren Mikrosekunden berechnet werden. Hier hat sich eine Simulation nach der „direct simulation monte carlo“-Methode (DSMC) bewährt. Es werden Stöße und daraus folgende Reaktionen von Ionen, Molekülen und Clustern berücksichtigt und verfolgt. Ebenso integriert sind Clusterwachstum, Beschleunigung durch ein E-Feld und aus allen Reaktionen folgende Änderungen von Winkel- und Geschwindigkeitsverteilungen. Hierbei repräsentiert jedes „echt“ berechnete Teilchen eine ganze Anzahl von identischen Teilchen im „virtuellen“ plume. Jedes dieser Teilchen enthält einen Parametersatz, der unter anderem umfasst: Koordinaten, Geschwindigkeitsvektor, innere Energie und Art des Teilchens (Ion, Radikal, etc.). Die Simulation ist dann mehrgliedrig. Zunächst werden die Teilchen gemäß externen Kräften und Geschwindigkeitsvektoren bewegt, ausgewählt einem Stoß unterworfen und schließlich innere Energie und Geschwindigkeit neu berechnet.

3.2.3. Photothermische Ablation

Die einfachste Form einer photothermischen Ablation besteht in der Energieumverteilung in das Aufheizen der Probe. Eine reine Desorption von hinreichend heißer Oberfläche wäre möglich. Bei den dazu notwendigen Temperaturen wären aber gerade die in der MALDI untersuchten Analyte nicht mehr stabil. Des Weiteren könnten solch hohe Temperaturen, wie sie nötig wären um entsprechend viel Material zu desorbieren, nicht gefunden werden. Zusätzlich würde eine Desorption relativ lange anhalten. Gerade dies wird jedoch nur selten beobachtet.⁵³ Die Desorption wird daher nur als begleitender Prozess angesehen. In Experimenten werden zwar widersprüchliche aber relativ niedrige Oberflächentemperaturen von 750K³⁹ bis 1200K³⁰ angegeben. Somit kann die Desorption für eine begleitende, schwache Teilchenablation verantwortlich sein. Diese wird vornehmlich beim Einsatz von IR-Lasern, teilweise noch bis zu μs nach Laserbeschuss gefunden.

3. Theorie der MALDI

Eine weitere Möglichkeit stellt eine Sublimation dar. Hier muss die stoffspezifische Sublimationsenthalpie aufgebracht werden. Gleichzeitig würde dies recht einfache Modell bereits eine Erklärung für das Auftreten einer Ablationsschwelle liefern. Entgegen der Vorstellung der Desorption wird keine kontinuierliche Zunahme der Ablation mit Zunahme der Laserintensität beobachtet. Es erfolgt vielmehr zunächst eine Zunahme nach Arrhenius, dann aber ein sprunghafter Anstieg. Diesem schließt sich i. allg. ein Plateau an. Dieser Verlauf ließe sich erklären, wenn zunächst von einem desorptiven Prozess und bei höherem Energieeintrag dann von Sublimation ausgegangen würde. Das angeregte Volumen wäre durch Spotgröße und Eindringtiefe definiert. Nach überschreiten der zur Sublimation notwendigen Energie würde die Desintegration des Festkörpers sprunghaft ansteigen. Das Plateau ließe sich dann durch die endliche Teilchenzahl des angeregten Volumens erklären. Voraussetzung wäre, dass die Wärmeleitung in den umgebenden Probenbereich wesentlich langsamer als die Ablation wäre. Dies entspricht der Vorstellung des „thermal confinement“, auf das beim explosiven Phasenübergang noch näher eingegangen wird. Gestützt wird dieser Mechanismus durch Untersuchungen der ablatierten Teilchen in Abhängigkeit der Sublimationstemperatur der verwendeten Matrix.⁴³ Es wurden umso mehr intakte Analyte detektiert, desto niedriger die Sublimationstemperatur der jeweiligen Matrix war.

Das Phänomen der intakten Analyte trotz notwendigem starken Aufheizen der Probe wird bei thermischen Modellen grundsätzlich durch zwei Vorstellungen erklärt. Der Analyt liegt stark verdünnt in der Matrix vor und wird nur selten direkt die Laserstrahlung absorbieren. Je nach Analyt und eingesetzter Wellenlänge sind die Absorptionskoeffizienten des Analyten gering. Dies wird im UV eher zutreffen als im IR. Weiterhin existiert bei einer Energieumverteilung in Gitterschwingungsmoden eine Diskrepanz zwischen denen der Matrix und denen des Analyten. Daher ist eine Kopplung zumindest weniger wahrscheinlich, die Ratenkonstante klein gegenüber der Kopplung ans Matrixkristallgitter und die Aufheizung geringer bzw. langsamer. Diese Vorstellung wird daher als „bottleneck-modell“ bezeichnet. Setzt eine Phasenumwandlung mit anschließender Expansion ins Vakuum ein, wird durch die Expansion schnelle Kühlung eintreten. Je mehr Material expandiert, desto stärker ist auch der Kühlungseffekt. Dadurch erklärt sich die Existenz intakter Analytmoleküle trotz starker Anregung.

Gegen eine Ablation durch Sublimation sprechen allerdings die Untersuchungen des ablatierten Materials. Es werden nicht die erwarteten einzelnen Moleküle gefunden. Vielmehr besteht ein großer Teil der Ablationswolke, insbesondere bei hohen Laserflüssen,

3. Theorie der MALDI

aus größeren Aggregaten. Das Absenken der Ablationsschwelle mit der Pulslänge lässt ebenfalls die Existenz weiterer Ablationsmechanismen vermuten.

Neben Sublimation wird sogar teilweise ein echtes Schmelzen und Verdampfen der Probe angenommen. Genährt wird diese Annahme durch Fotografien von Proben nach Laserbeschuss. Davon zeigen einige nur wenige scharfe Bruchstellen oder flache Ablationskrater. Es werden eher tiefe Krater mit „rundgeschmolzenen“ Kanten beobachtet.^{54,55} Weiterhin wird vermutet, dass sich innerhalb der überhitzten Flüssigkeiten viele Materialeigenschaften verändern. Unter anderem wird dies für die Absorptionskoeffizienten angenommen. Für einige Arbeitsgruppen stellt dieses Ablationsmodell die Grundlage für Ionisationsmechanismen dar. Eine Protonenübertragung in flüssiger Phase läge nahe und böte die Basis für ein einheitliches Modell für UV- und IR-MALDI.¹²

Viel wahrscheinlicher ist dagegen ein explosiver Phasenübergang. Hierbei spielen die Anregungsparameter eine bedeutende Rolle. Der Energieeintrag unter typischen Bedingungen, insbesondere bei IR-MALDI, ist höher als die zur Sublimation, Schmelzen/Verdampfung und Dissipation benötigte Energie. Die Phase kann bis zur Spinodalen überhitzt werden. An dieser setzt dann schlagartig die Phasenumwandlung ein. Zusätzlich kann ein Druckpuls (siehe Photomechanik 3.2.5) zur Herabsetzung der Spinodalen führen. Dies kann insbesondere für IR, wo die Eindringtiefen größer sind, von Bedeutung sein.

Leider wurden Untersuchungen bezüglich der UV-MALDI bisher nur an wenigen definierten Festkörpern und hauptsächlich an Flüssigkeiten unternommen. Dennoch wird vermutet, dass es zu einer räumlich ausgedehnten Bildung von Mikrokavitationen kommt.* Dieses Modell spielt auch in Simulationen für Laserpulslängen, die keine photomechanische Ablation zulassen, eine bedeutende Rolle. Hier entstehen unterhalb der Oberfläche durch Überhitzung Blasen aus flüssiger und gasförmiger Phase. Diese können je nach Bedingungen wachsen und zur Ablation von Tröpfchen, Clustern und einzelnen Molekülen oder sogar zur Spallation führen. Hierbei wird dann die darüber befindliche Probenschicht durch den entstehenden Druck vom Substrat getrennt. Schwach gebundene Analyte werden dabei häufig als Monomere vorliegen, stark gebundene dagegen in Clustern integriert sein.⁵⁶

Maßgeblich dafür ist jedoch, dass die Anregungsenergie schneller in der Probe deponiert wird, als durch Wärmeleitung abgeführt werden kann („thermal confinement“).

*Der Ausdruck Kavitation entstammt der Hydrodynamik. Darunter wird eine Blasenbildung in einer unter Spannung stehenden Flüssigkeit verstanden.

3. Theorie der MALDI

Dazu werden Laserpulslänge (τ_{laser}) und Transportzeit für die Wärmeleitung (τ_{th}) miteinander verglichen. Bei den MALDI-Experimenten liegen die Pulslängen häufig im einstelligen ns-Bereich. Für diese Fälle ist die Beziehung $\tau_{laser} < \tau_{therm}$ meist erfüllt. So wurde z.B. für DHB unter Einbeziehung einer Lasereindringtiefe $\mu_A = 110nm$, der Materialdichte ρ , der Wärmekapazität C_p und der Wärmeleitfähigkeit $\lambda_{th} \approx \lambda_{th}(H_2O)$ nach Gl.3.8 die Wärmetransportzeit zu 10ns abgeschätzt.³¹

$$\tau_{th} = \frac{\rho C_p}{4\lambda_{th}} \mu_A^2 \quad (3.8)$$

Der Faktor $\frac{1}{4}$ beruht hierbei auf geometrischen Überlegungen. Es wird ein zylindrisches Anregungsvolumen mit einem Durchmesser von $100\mu m$, nämlich dem Spotdurchmesser, angenommen.

Die Simulationen von Zhigilei et al. mit 150ps Pulsen bei einem Laserfluss vom 1.75fachen der Ablationsschwelle zeigen, dass 100ps nach Laserbeschuss eine homogene Expansion stattfindet. Es schließen sich Dichteschwankungen an. Diese führen schließlich zur Ausbildung von Clustern und Tropfen. Eine ns nach Laserbeschuss verbleiben noch wenige große Tropfen und zahlreiche Cluster in der simulierten Zelle. Bei diesen Simulationen wird davon ausgegangen, dass die ablatierte Materialmenge (N) davon abhängt, bis zu welcher Tiefe eine kritische Energiedichte (E_v^*) überschritten wird, sofern der Laserfluss oberhalb oder bei der Ablationsschwelle liegt. Sie kann somit nach Gl.3.9 beschrieben werden.³⁹

$$N = n_m \mu_A \ln \left[\frac{F_{laser}}{\mu_A (E_v^* - CT_0)} \right]$$

C: spezifische Wärmekapazität;
 n_m : Anzahldichte

(3.9)

Die Ablationsschwelle hängt daher von der Lasereindringtiefe, der kritischen Energiedichte und der vor Laserbeschuss gespeicherten thermischen Energie ab. Sie wird überschritten, sobald der Bruch des Logarithmusses größer eins wird. Unter den Bedingungen des „thermal confinement“ wird für die kritische Energiedichte ein Wert von 0.6eV gefunden. Dies entspricht den Kohäsionskräften des simulierten Festkörpers. Es wird nun erwartet, dass der Anteil an Gasphase am Ablationsplume größer wird, je größer die Überhitzung ist. Durch die Gasphase wird dann die Expansion vorangetrieben. Der Anteil an Monomeren beträgt in der Simulation bei max. Laserfluss 25% , dagegen nur 9% , wenn die Ablationsschwelle gerade erreicht wird. So scheint bei der Ablationsschwelle die Im-

pulsübertragung aus den Gasmolekülen nur zum Ausstoß weniger großer Cluster mit geringer Geschwindigkeit zu reichen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der „phase explosion“ ist die effiziente Kühlung. Dazu wurde die radiale Geschwindigkeitsverteilung der simuliert ablatierten Moleküle untersucht. Tatsächlich folgen diese einer Maxwell-Boltzmann-Verteilung. Das Temperaturmaximum wird dabei 150ps nach Laserbeschuss erreicht und beträgt bei einem Laserfluss, der genau der Ablationsschwelle entspricht, ca. 1100K. Wird dagegen die 1.75fache Energiedichte der Ablationsschwelle eingebracht, so steigt die Temperatur auf ca. 1500K. Bereits nach 200ps ist die stärkste Abkühlphase durchlaufen und die Temperaturen betragen 950 bzw. 1050K. Der anschließende fast lineare Abfall der Temperatur mit der Zeit ist für den Fall der stärkeren Anregung etwas steiler. Somit wird bei 400ps ein Kreuzungspunkt erreicht. Die schlechtere Kühlung wird dem Ergebnis zugeschrieben, dass bei der Ablationsschwelle in der simulierten Zelle nahezu nur ein großer Tropfen gebildet wird. Dagegen werden bei höherer Anregung eine ganze Anzahl von Clustern und Monomeren neben einigen Tropfen gebildet. Die Expansion dieser führt zu einer rascheren Kühlung des betrachteten Bereichs.

Für die IR-MALDI, in der auch flüssige Matrices eine Rolle spielen, wird als weiterer Ablationsmechanismus heterogenes Kochen angeführt. Hier kommt es zur Gasblasenbildung innerhalb der flüssigen Phase. Jedoch ist die räumliche Ausdehnung der Mikrokavitationen geringer.

3.2.4. Photochemische Ablation

Modelle dieses Typus tragen vor allem der Verwendung von UV-Lasern bei der Ablation Rechnung. Bindungsbrüche aus thermischer Anregung wären möglich und bei den Analytklassen der MALDI eigentlich zu erwarten. Im Gegensatz zur Laser Desorption/Ionisation (LDI)* werden bei der MALDI die Analyte aber durch die schnelle Kühlung mittels Expansion, die Verdünnung in einer Matrix und die ineffektive Einkopplung der Energie geschützt (vgl.3.2.3). Vornehmlich werden Photofragmente der Matrix gebildet. Hier kann es vermehrt zu Bindungsbrüchen und Fragmentbildungen kommen, wenn die Energie hinreichend schnell in entsprechenden Moden deponiert wird. Diese Bindungsbrüche wiederum können einen Beitrag zur Ausbildung des Plumes bil-

*Die zu analysierende Substanz wird hier direkt durch den Laser angeregt. Eine Matrix wird nicht verwendet.

den. Einen zusätzlichen Beitrag zur Gesamtenergie können exotherme Reaktionen der gebildeten, hochreaktiven Spezies liefern.

Besonders bei niedrigem Laserfluss werden nur Photofragmente und wenig Moleküle gefunden. Es liegt nahe zu vermuten, dass es sich dabei vor allem um elektronisch angeregte Moleküle der oberen Schichten handelt. Es zeigt sich, dass dieser Prozess linear vom Laserfluss abhängt. Dagegen wurde eine Unabhängigkeit der Translationsenergie vom Laserfluss attestiert.⁵⁶ Die Abhängigkeit vom Laserfluss überrascht allerdings, da die Photodissoziation eigentlich mehr von der Photonendichte und damit eher von der Irradiance abhängen sollte.

Würde ein rein photochemisches Modell angenommen, so müsste gefordert werden, dass intakte Moleküle kein Photon absorbiert haben. Nur diese könnten damit zur Plumeexpansion beitragen. Bei Untersuchungen an Indolfilmen absorbierten 16% der Moleküle ein Photon. Relaxation führte zur Aufheizung der Probe um 60K. Nur 0.001% absorbierten zwei Photonen und wurden ionisiert. Für einen Festkörper sind die Anteile wesentlich geringer. So können nur 0.1% der Moleküle ein Photon absorbieren und 0.00001% werden durch MPI ionisiert. Als alleinige Energiequelle scheint dieser Mechanismus nicht zu genügen, zumal Experimente zeigen konnten, dass Photodissoziation auch bei Einstrahlung geeigneter Wellenlänge nicht stattfinden muss. Weiterhin wirkt der expandierende Plume den Folgereaktionen der reaktiven Spezies entgegen.⁵⁶ Hierdurch kommt es recht schnell zu einer Verdünnung der Reaktionspartner und die Reaktionen kommen zum Erliegen. Reaktionen in der kondensierten Phase sind aufgrund der fehlenden Mobilität nur eingeschränkt möglich.³⁹

Die Auswirkung der Photodissoziation auf andere Prozesse ist indes nicht unerheblich. Durch die Reaktionsprodukte entsteht ein inhomogenes System. Hierdurch wird z.B. die Kohäsion der Probe herabgesetzt und die Ablationsschwelle sinkt. Ebenso werden durch kolligative Eigenschaften z.B. Sdp. und Schmp. verändert, die in anderen Ablationsmodellen eine bedeutende Rolle spielen.

3.2.5. Photomechanische Ablation

Gestützt durch das Vorkommen von größeren Aggregaten („chunks“) im Plume und die Existenz von flachen Ablationskratern mit scharfen Bruchkanten hat die Grundidee eines anderen Ablationstypus Bedeutung gewonnen. Eine druckinduzierte Spallation würde relativ wenig Energie benötigen, da hier nicht die Energie für einen Phasenübergang,

sondern zur Schaffung neuer Oberflächen aufgebracht werden muss. Dyer et al. führt in Beispielberechnungen an, dass diese Energie für 1mol Wasser bei der Generation von $10\mu\text{m}$ großen Tropfen um den Faktor $6 * 10^4$ niedriger liegt, als die für die Verdampfung benötigte.⁵⁷ Ein weiterer Vorteil liegt in dem nicht-thermischen Charakter dieser Modelle. Ein Aufheizen der Probe ist nicht nötig. Es erklärt somit zugleich auch die intakte Ablation von Analyten. Allerdings werden thermische Effekte durchaus einbezogen und liefern ihren Beitrag z.B. durch Herabsetzen von Zerreifestigkeiten der verwendeten Matrices. Diese Modelle sind Ergänzung und Alternative zu den thermischen Mechanismen. Ein für diese Modelle benötigter Druckpuls kann nämlich aus bereits stattfindender thermischer Ablation entstammen. Der Rückstoß der expandierenden Teilchen kann Druckwellen in der Probe hervorrufen. Diese treten dann erst nach Überschreiten der Ablationsschwelle auf.

„Echte“ photomechanische Ablation liegt jedoch nur vor, wenn die Druckpulse unterhalb thermischer Ablationsschwellen gebildet werden und zu Materialbruchen und -abtrag führen. Bereits 1964 wurde von Carome et al.⁵⁸ bei Anregung von Flüssigkeiten mit kurzen Laserpulsen Akustikwellen mit Kompressions- und Zugspannungsanteil gefunden. Diese begründen sich aus lokaler Erwärmung und Ausdehnung des Mediums. Folglich werden diese als thermoelastischer Druck bezeichnet. Der schnelle Abfall des thermoelastischen Drucks verursacht Schallwellen. Bei Festkörpern vollzieht sich dieser Abfall jedoch langsamer. Bei diesen spielen dafür Wärmeleitung in die Umgebung und Herabsetzen der Materialfestigkeit eine stärkere Rolle. Sowohl in Flüssigkeiten als auch in Festkörpern kommt es in Kombination dieser Effekte zur Ausbildung von Bruchen im Materialgefüge. Eine Spallation kann die Folge sein.

Insbesondere an Flüssigkeiten wurde die Spallation intensiv untersucht. Prinzipiell werden zwei Experimentarten unterschieden. Die sogenannte „front surface spallation“, bei der die Anregung von der Ablationsseite meist durch Laserbeschuss stattfindet, und die sogenannte „back surface spallation“. Bei dieser lässt man eine beschleunigte Prallplatte auf die Rückseite der Probe treffen. Hierbei wird ein nahezu rechteckiger Druckpuls erzeugt, der sich durch das Medium fortpflanzt, an dem Impedanzwechsel der freien Oberfläche reflektiert wird und knapp unterhalb dieser zum Auftreten von Zugspannung führt. Übersteigt diese die Zerreißfestigkeit des Materials, so kommt es zum Bruch und eine Ablation kann erfolgen. Bei der „front surface spallation“ dagegen baut sich im Falle der Laseranregung thermoelastischer Druck auf. Aus einem angeregten Volumen resultieren zwei Druckwellen, eine zur freien Oberfläche und eine ins Medium hinein.

Unterhalb der Oberfläche baut sich infolgedessen eine Zugspannung auf, die schließlich die Zerreißfestigkeit des Materials übersteigen kann. Dies gilt insbesondere, da die Zerreißfestigkeit durch die Aufheizung möglicherweise herabgesetzt ist. Wiederum kommt es zu Brüchen und eine Ablation wird möglich.

Auch hier kann so etwas wie eine Schwelle definiert werden. Das ist jener Punkt, an dem die Zugspannung die Zerreißfestigkeit des Materials übersteigt. Es werden im Festkörper also Brüche in der Tiefe auftreten, bei der dies der Fall ist. Die Druckwelle pflanzt sich fort. Wird die Materialfestigkeit erneut überschritten, so treten weitere Brüche auf. In „front surface spallation“-Experimenten wird eine Gesamtablationstiefe gefunden, die vergleichbar mit der optischen Eindringtiefe ist. Bei dieser werden noch 43% des initialen Drucks vorgefunden. Berücksichtigt man die thermische Materialaufweichung, so ist die Belastung des Materials bei halber optischer Eindringtiefe maximal.⁵⁷

Sofern der Spotradius groß gegenüber der Eindringtiefe ist, kann bei Flüssigkeiten mit eindimensionalen Lösungen gerechnet werden. Im Festkörper sind die Abläufe dagegen komplexer. Nicht nur, dass neben longitudinalen Wellen auch transversale Verläufe möglich sind, auch der Aufbau von quasistatischem Druck muss berücksichtigt werden. Für Festkörper können daher vier Bereiche der Ablation unterschieden werden:

- Aufheizphase. Erfolgt diese „stress confined“, so wird der maximale Druck erreicht.
- Ausbildung von thermoelastischem Druck. Dieser pflanzt sich als longitudinale und transversale Welle mit der Schallgeschwindigkeit fort.
- Zu einem bestimmten Zeitpunkt wird ein mechanischer Gleichgewichtszustand erreicht. Die Nettokrfte sind null, jedoch die ungleichmäßige Temperaturverteilung führt dazu, dass ein statischer Druck weiterhin existiert. Grundbedingung ist jedoch eine wesentlich größere Wärme- als Schallwellentransportzeit. Dies wird immer erreicht, sobald der Spotdurchmesser den sub-nm-Bereich überschreitet.
- Wärmeleitung aus dem angeregten Volumen führt zum Nachlassen des thermoelastischen Drucks.

Mit einem eindimensionalen Modell kann z.B. das Auftreten von sehr flachen Ablationskratern, wie sie manchmal vorgefunden werden, nicht erklärt werden. Dazu müssen radiale Druckanteile berücksichtigt werden. Weitere Fehlerquellen dieses Ansatzes liegen

in der fehlenden Berücksichtigung von Materialeigenschaften wie duktilen oder sprödem Verhalten. Daneben konnte festgestellt werden, dass auch die zeitliche Entwicklung des Druckaufbaus relevant ist.

Die Zeitabhängigkeit liegt darin begründet, dass das Wachstum von Lücken und Brüchen im Festkörper linear von der Größe bereits vorhandener Lücken und dem Druck abhängt. Es ergibt sich somit für kleine Lücken ein insgesamt exponentielles Wachstum mit der Zeit.⁵⁷ Daher muss der gesamte Ablauf des Druckaufbaus berücksichtigt werden und es kann kein absoluter Wert für den Druck, ab dem Ablation auftritt, beziffert werden.

Dieser Druck wird jedoch maximal, wenn die Bedingungen des „stress confinement“ erfüllt werden. Dazu muss der Laserpuls kürzer als die Ausbreitungskonstante von Druckwellen im jeweiligen Medium (vgl. 3.2.1) sein. Da die Eindringtiefe wellenlängenabhängig ist, verändert sich das Druckverlaufsprofil ebenfalls mit unterschiedlichen Laserwellenlängen bei identischen Pulsweiten.

Ausstoßung nach erfolgtem Bruch

Wird nun die Ablation durch Brüche verursacht, dann muss zwangsläufig ein Mechanismus für die Ausstoßung gefunden werden. Theoretisch steht die Differenz zwischen der Druckenergie und der nötigen Energie zur Bruchausbildung zur Verfügung. Für thermoelastischen Druck bedeutet dies, dass die Teilchen bis zu einer maximalen Geschwindigkeit beschleunigt werden. Kommt es zum Bruch innerhalb der Probe, wird sich das Material zwischen Bruch und freier Oberfläche mit eben jener Geschwindigkeit von der Probe entfernen.

Bei der „phase explosion“ dagegen ist die Expansion eines Gases die treibende Kraft. Die Translationsenergie der ablatierten Teilchen muss aus diesem Reservoir entnommen werden. Zighilei et al. haben in Simulationen beide Szenarien berechnet. Mit einer Pulslänge von 15ps wird „stress confinement“ erreicht. Tatsächlich bilden sich bereits nach 250ps Brüche und Lücken wachsen mit der Zeit. Es kommt schließlich zur Ausstoßung eines ganzen Probenbereichs.⁴²

Im „thermal confinement“-Bereich, der mit 150ps Pulsdauer simuliert wurde, wird dagegen das unter Abschn.3.2.3 („phase explosion“) bereits skizzierte Verhalten vorgefunden. Interessant ist in dieser Hinsicht auch, dass im Falle der photomechanischen Ablation in den Lücken die Dichte unterhalb der eines idealen Gases unter gleichen Bedingungen liegt. Es kann also für die Photomechanik zumindest die Existenz anderer

treibender Kräfte postuliert werden.

Dennoch stellt sich die Frage nach Unterscheidungsmerkmalen der verschiedenen Ablationsmodelle. Wie erwähnt, stellt die Teilchengröße eine Möglichkeit dar. Diese wird lange nach der Ablation detektiert. Kondensation in der Plume, wie in Simulationen aufgetreten, kann zur Verfälschung der Ergebnisse führen. Ein Unterscheidungsmerkmal der photomechanischen Ablation ist der nahe der Oberfläche stattfindende Bruch. Jedoch ist dies im Experiment, insbesondere bei Festkörpern und undurchsichtigen Proben, schwer festzustellen. Indirekte Hinweise bieten Druckprofile aus piezoelektrischen Messungen, die Entwicklung und Ausbreitung der Ablationsplume sowie die Existenz einer niedrigen Ablationsschwelle.

Druckwellenprofile bei der Ablation

Die photomechanische Ablation sollte ein charakteristisches Druckprofil zeigen. Nach dem Aufbau und der Ausbreitung des thermoelastischen Drucks sollten sich Brüche und Kavitationen im Profil bemerkbar machen, da nun die Spannung nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Ausgestoßenes Material erzeugt wiederum einen Rückstoß, der sich als Kompressionswelle bemerkbar macht. Kommt es nicht zum Materialausstoß nachdem Brüche oder Kavitationen aufgetreten sind, so macht sich dies in einer Dämpfung der Zugspannung und Verlängerung derselben bemerkbar. Das Zeitintegral über die gesamte Druckwelle wird Null.⁵⁷

Gewinnen Ablationsmechanismen wie „phase explosion“ an Relevanz, so kann der aus dem Rückstoß stammende Druck den thermoelastischen übersteigen. Aufgrund des ähnlichen Verlaufs ist die experimentelle Unterscheidung zwischen photomechanisch induziertem und rückstoßinduziertem Druck häufig schwierig. Eine Möglichkeit besteht in der Variation der Laserwellenlänge. Mit ihr verändert sich die Eindringtiefe und die Anregung erfolgt „stress confined“ oder nicht. Im Falle des „stress confinement“ und photomechanischer Mechanismen sollte sich auch unterhalb der Ablationsschwelle ein stark bipolarer Druckverlauf zeigen. Dagegen wird für den lediglich „thermal confined“-Bereich kein Druckaufbau unterhalb der Ablationsschwelle und mit Überschreiten dieser eine starke Kompressionswelle durch den Rückstoß erwartet.^{57,40}

Photomechanische Ablationsschwelle

Für die „echte“ photomechanische Ablation muss zusätzlich zur photomechanischen Schädigung des Materials noch die Energie für die Ausstoßung aufgebracht werden. Daher sollte die Schwelle der photomechanischen Ablation höher als diejenige für reine

3. Theorie der MALDI

Spallation liegen. Gleichzeitig soll sie aber niedriger als die der Phasenumwandlungsmodelle sein. Dies geht auf oben angeführte Überlegung der Schaffung neuer Oberflächen zurück. Dabei wird jedoch die relativ niedrige Energieeffizienz des thermoelastischen Drucks nicht berücksichtigt. So wird in theoretischen Berechnungen auch nur ein 1.2faches der Ablationsschwelle im „thermal confinement“ Bereich gegenüber dem „stress confinement“ Bereich gefunden.³⁹

Aufgrund der Abhängigkeit der Eindringtiefe von der Absorption kann für ns-Laser festgestellt werden, dass „stress confinement“ nur bei geringer Absorption erreicht werden kann. Nur dann wird die Amplitude der Zugspannung groß genug. Bei stark absorbierenden Proben kann photomechanische Ablation durch ps-Pulse hervorgerufen werden. Allerdings werden bei den notwendigen Energiedichten vermutlich bereits andere Ablationsmechanismen eingesetzt haben, so dass die photomechanischen Druckwellen durch die Kompressionswellen aus dem Rückstoß überlagert werden.

Die weite Anwendbarkeit der MALDI mit ganz unterschiedlichen Matrices, Laserwellenlängen, -pulsbreiten und -leistungen bereitet immer noch Schwierigkeiten, die Ablation zu charakterisieren. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass die Probenmorphologie der angewandten MALDI weit von der in theoretischen Modellen abweicht. So sind insbesondere die „dried-droplet“-Proben und die lediglich innigst gemahlene und aufgestäubte Proben fern von jeglichem Festkörpergefüge, das durch die Modelle erfasst wird. In einzelnen Fällen können Experimente, explizit zur Verifikation eines Modellteilaspekts ausgelegt, diesen auch bestätigen. Häufig sind aber Überlagerungen von durch die Ablation hervorgerufenen Effekten und sie selbst verursachende nicht vermeidbar. Ähnlich der Ionisation scheint, je nach Bedingungen und Matrixeigenschaften, das eine oder andere Modell zu überwiegen. In vielen Fällen koexistieren sie aber oder beeinflussen sich gegenseitig.

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrizes

Die Beteiligung von elektronischen Zuständen sowohl bei der Ablation und der Ionisation legen es nahe, diese genauer zu untersuchen. Dazu wurden bereits 1995 von Ehring und Sundquist⁵⁹ sowie weiteren Gruppen Ansätze gesucht, Absorptions- und Emissionsspektren mit der Effizienz von Matrixsubstanzen zu korrelieren. Umso überraschender sind daher Hinweise, dass der MALDI-Prozess in seiner Gesamtheit relativ unabhängig von den Absorptionskoeffizienten der Matrixsubstanzen bei den jeweiligen Wellenlängen ist. So konnten Haglund et al. MS-Spektren bei den verschiedensten Wellenlängen generieren, ohne gravierende Unterschiede in Güte oder Intensität feststellen zu können. Mit DHB konnten selbst bei 400nm noch Spektren aufgezeichnet werden. Bei dieser Wellenlänge sollte aber eine Absorption nur noch in untergeordneter Weise stattfinden und zum Erreichen des 0-0-Übergangs nicht ausreichen.^{12,16}

Ein Manko der spektroskopischen Daten sind allerdings die Experimentbedingungen, unter denen sie zustande gekommen sind. Diese weichen meist in gravierender Weise von denen der MALDI ab. So sind Absorptions- und Emissionsspektren aus Lösungen allenfalls Ausgangsdaten für weiterreichende Untersuchungen. Auch aus der Gasphase erhaltene Daten lassen sich nur schwer übertragen. Dies wird besonders deutlich, wenn man den durch Knochenmuss et al. ermittelten 0-0-Übergang für DHB in einem Molekularstrahl (357.69nm)¹⁶ mit den experimentellen Daten von Allwood et al.^{20,21} und Böckelmann et al.¹⁹ vergleicht (s.a. Abschn.3). Hier wird eine starke Rotverschiebung des Kreuzungspunktes von Absorption und Emission gefunden. Ebenfalls weisen die Absorptionsspektren eine Verschiebung zum langwelligen Bereich auf, wenn statt eines Einkristalls eine mikrokristalline Probe untersucht wird. Dies wird umso bedeutender, wenn auch noch die zusätzliche Rotverschiebung durch Analytbeimengung berücksichtigt

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrizes

wird. Naturgemäß wird eine herkömmliche MALDI-Probe nicht aus einem Einkristall bestehen. Vielmehr wird ein ggf. eingebetteter Analyt zu einer zusätzlichen Störung des Kristallgitters führen. Unter diesen Gesichtspunkten sind auch die Ergebnisse von Haglund et al. neu zu bewerten.

Bisher existieren nur wenige Daten bezüglich der Festkörperabsorption von verschiedenen Matrizes. Derzeit sind die Daten von Allwood et al. diejenigen, die den MALDI-Bedingungen am ehesten gerecht werden. Hier wurden auf Quarzträger sublimierte Proben verwendet. Analytbeimengungen wurden jedoch nicht berücksichtigt.

Ebenso wie Absorptionsspektren Substanz- und Substanzklassenspezifisch sind, weisen auch Emissionsspektren Charakteristika auf. So werden für die verwendeten Carbonsäuren mit aromatischem Kern ähnliche Spektren aufgezeichnet. Sie unterscheiden sich deutlich vom Spektrum des mehrkernigen, hydroxy- und ketosubstituierten Anthracenderivats Dithranol. Teilweise können Seitenbanden oder Schulterformationen Schwingungszuständen der funktionellen Gruppen zugeordnet werden.¹³ Einige heteroaromatische Systeme (IAA, HPA) zeigen wiederum andere Charakteristika. Obwohl stickstoffhaltige Heteroaromaten auch zur Phosphoreszenz neigen, konnte dies für HPA nicht vorgefunden werden.^{13,14,60} Die Untersuchungen in dieser Hinsicht bei Trans-Indol-3-acrylsäure (IAA) stehen noch aus.

Emissionsspektren sind deshalb von besonderem Interesse, da sie Erkenntnisse über die Energieverteilung nach Laseranregung liefern. Die durch den Laser eingestrahlte Energie ist durch die Wellenlänge und den Laserfluss klar begrenzt. Durch die im Folgenden aufgezeigten Vorgänge kann diese Energie auf verschiedenen Wegen abgegeben werden. Die energetische Lage des ersten angeregten Zustandes wird dann besonders wichtig, wenn von Ionisation aus eben diesem ausgegangen wird. Dies ist, wie unter Abschn.3.1 gezeigt, häufig der Fall. Weiterhin gibt die Rotverschiebung der Fluoreszenz einen Anhaltspunkt für die Energie, die durch nicht strahlende Prozesse in der Probe umverteilt werden. Dies kann durch Gitterschwingungen, Exciton-Bildung, Molekülschwingungen, etc. erfolgen. Neben anderen Prozessen wird auch die Energie für Ablation und Expansion der Teilchen aus dem Reservoir abgezogen. Wird dagegen die gesamte Energie nutzbar, so wird die Plumeentwicklung eher von den Absorptionskoeffizienten als dem Stokes'-Shift, der Rotverschiebung der Emission gegenüber der Absorption (vgl. 4.1), abhängen.

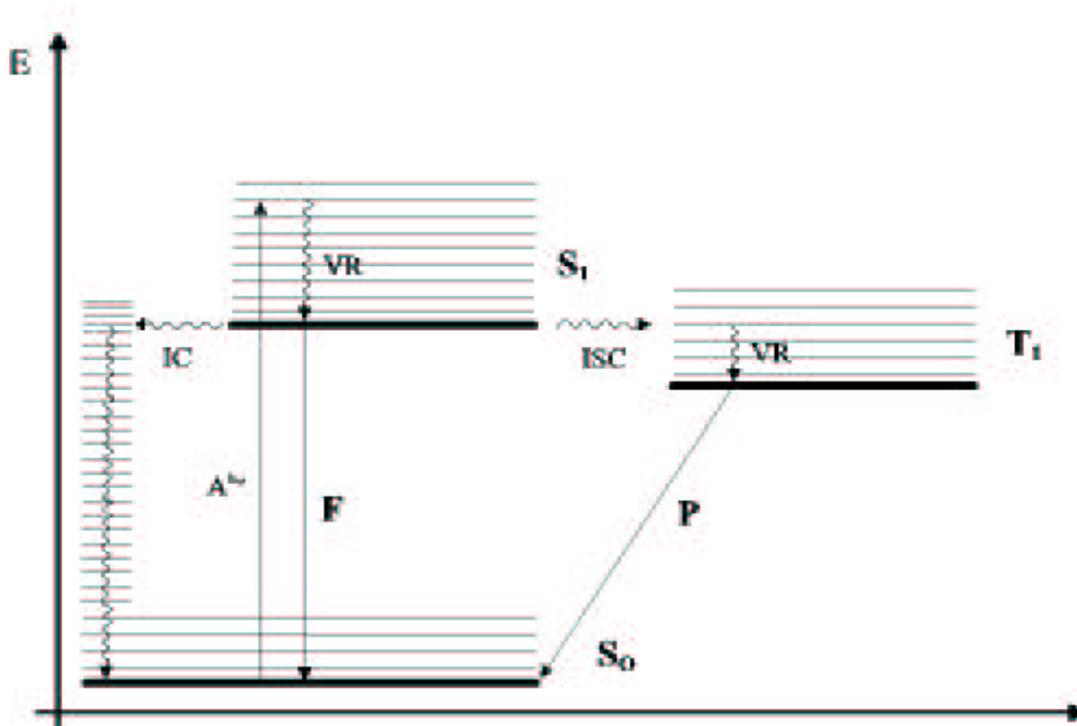


Abbildung 4.1.: Jablonski-Diagramm zur Verdeutlichung der Umwandlungsprozesse im angeregten Molekül. A: Anregung; F: Fluoreszenz; P: Phosphoreszenz; S_i : Singulett- und T_i : Triplett-Zustand.

4.1. Theorie der Lumineszenz

Da die Anregungsmechanismen im Wesentlichen den bei der MPI bzw. REMPI ablaufenden Prozessen entsprechen, wird auf eine weitere Darstellung verzichtet (s. 2.2.1). Wird ein elektronisch angeregter Zustand populiert, so werden meist höher angeregte Schwingungs- und Rotationsniveaus des jeweiligen Zustandes besetzt. Diese ergeben sich aus den Franck-Condon-Überlappungsintegralen (s.2.2.1,2.4). Der elektronische Zustand weist dabei die gleiche Multiplizität wie der Grundzustand auf. Gemäß „Kasha’s-Rule“ findet schnelle Deaktivierung zum Grundzustand des S_1 -Zustandes durch sogenannte „vibrational relaxation“ (VR) bzw. „intramolecular vibrational redistribution“ (IVR) statt. Bei der Ersteren verbleibt das Teilchen innerhalb eines elektronischen Zustandes, bei der Letzteren dagegen kommt es zum Übergang in einen anderen elektronischen Zustand gleicher Multiplizität (siehe auch Abb.4.1). Von „internal conversion“, IC, spricht man, wenn es zu einem strahlungslosen Übergang aus dem Schwingungsgrundzustand des jeweiligen

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrizes

elektronischen Zustandes zu höheren Schwingungsniveaus eines tieferliegenden elektronischen Zustandes gleicher Multiplizität kommt. Dazu muss ein Schwingungsniveau des tieferliegenden Zustandes isoenergetisch mit dem Grundzustand des aktuellen Zustandes sein. Übergänge mit Änderung der Multiplizität sind quantenmechanisch verboten. Existieren energetisch tieferliegende Triplettzustände mit isoenergetischen Niveaus, können diese jedoch durch einen strahlungslosen Übergang, dem sogenannten „intersystem crossing“ (ISC), ebenfalls erreicht werden. Nach ggf. erfolgter VR bzw. IVR kann es aus dem untersten Schwingungsniveau des T_1 -Zustandes nun zu Lumineszenz kommen. Dies setzt natürlich voraus, dass der Energieunterschied zwischen T_1 und S_0 im sichtbaren Bereich liegt. Diese Lumineszenz ist vergleichsweise lang, da der Übergang zum S_0 -Zustand wiederum quantenmechanisch verboten ist. Zur Quantifizierung der Lumineszenz wird i. allg. die Lebensdauer benützt. Sie gibt an, wieviel Zeit verstreicht, bis die Intensität (I) der emittierten Strahlung auf $1/e * I_{max}$ abgefallen ist (s.a.Gl.4.1). Diese Lebenszeit liegt bei Phosphoreszenz üblicherweise bei $10^{-4}s$ bis 10^2s .

Fluoreszenz findet wegen der schnell ablaufenden IVR- und VR-Prozesse meist aus dem untersten Schwingungsniveau des S_1 -Zustandes statt. Dazu müssen wiederum entsprechende Franck-Condon-Überlappungsintegrale mit Schwingungsniveaus des Grundzustandes existieren. Da es sich hierbei allerdings um einen erlaubten Übergang handelt, ist dieser Prozess schnell. Die Lebenszeit (τ) von Fluoreszenz liegt meist zwischen $10^{-9}s$ und $10^{-6}s$.

Liegen die Moleküle jedoch nicht isoliert in der Gasphase vor, sondern in Lösungen oder gar Festkörpern, so müssen einige weitere Aspekte berücksichtigt werden. Es kann zu einer Vielzahl von Wechselwirkungen mit der Umgebung kommen, die hier nicht im einzelnen besprochen werden können. Es sei daher auf Bücher der Fluoreszenzanalyse verwiesen. Je nach beeinflusstem Zustand und Umgebung kann es sowohl zu Verschiebungen der Emissionsspektren als auch verändertem Abklingverhalten kommen. Weiterhin ist eine inhomogene Verbreiterung der Schwingungsbanden zu beobachten. Sie ist umso stärker, je unterschiedlicher die Umgebungen verschiedener Anregungszentren sind.⁶¹

Neben diesen Prozessen ist auch das „quenching“, das teilweise oder vollständige Ausbleiben der Fluoreszenz, zu berücksichtigen. Hierfür gibt es vielfältige Ursachen. Allen gemein ist eine schnelle Deaktivierung des S_1 -Zustandes. Hervorgerufen werden kann dies durch Temperatur, Stöße, Reaktion mit anderen Reaktionspartnern, etc.. So gilt „quenching“ im expandierenden Plume als Hinweis der Beteiligung des S_1 -Zustandes an Ionisationsprozessen sowie der Beteiligung mehrerer Zentren am Ionisationsprozess (vgl.

3.1). Um die Effizienz der Fluoreszenz beurteilen zu können, wird die sogenannte Quantenausbeute (Φ) benutzt. Sie stellt den Quotienten aus emittierten und absorbierten Photonen dar.

In Festkörperproben aus organochemischen Verbindungen kann aufgrund fehlender Bandüberlappung ein Zeitverlauf 1. Ordnung angenommen werden (Zentrenmodell). Auf eingehendere Betrachtung des sogenannten Bändermodells, bei dem delokalisierte Ladungsträger maßgeblich sind und die Abklingkonstante von der Anregungsintensität abhängig wird, kann daher verzichtet werden. Das Abklingverhalten wird somit durch Gl.4.1 beschrieben.⁶²

$$I(t) = I_{max} * e^{-\frac{t}{\tau}}$$

t : Zeit; τ : Lebenszeit

I : Intensität (4.1)

Durch Messungen zugänglich ist diese intrinsische Größe jedoch nicht. Bestimmt werden kann jeweils nur eine apparente Lebenszeit (τ_a), die mit Hilfe der Quantenausbeute (Φ) nach Gl.4.2 Aussagen über die intrinsische (τ_i) erlaubt.⁶³

$$\tau_a = \tau_i * \Phi \tag{4.2}$$

Die experimentelle Ermittlung der intrinsischen Lebensdauer gestaltet sich im Falle der MALDI-Matrizes dagegen schwierig. Lediglich die Existenz von über den Anregungslaserpuls von 6ns hinaus andauernde Lumineszenzprozesse konnte in eigenen Arbeiten ausgeschlossen werden.^{14,60} Neuere Ergebnisse zeigen, dass die Lebenszeit der laserinduzierten Fluoreszenz (LIF) von MALDI-Matrixsubstanzen im sub-ns-Bereich liegen.¹⁵

4.2. Versuchsaufbau zur Detektion von laserinduzierter Fluoreszenz (LIF)

Die spektrale Untersuchung der Fluoreszenz wurde mit einem Gitter-Spektrometer der Firma Spectroscopy & Instruments (S&I) mit einer fokalen Länge von 0.275m durchgeführt. Dieses Spektrometer ist mit zwei Gittern bestückt, einem mit 2400 Linien/mm und einer Blaze-Wellenlänge von 240nm und einem mit 600 Linien/mm und einer Blaze-Wellenlänge von 500nm. Letzteres wurde für alle hier vorgestellten Messungen verwendet. Die Verstellung der Gitter erfolgt über einen Spectra-Pro-Scan-Controller, der mit-

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrizes

tels PC über eine RS232-Schnittstelle gesteuert und ausgelesen wird. Die Detektion erfolgt über eine mit Flüssigstickstoff gekühlte CCD-Kamera vom Typ LN-CCD EEV-15. Dieser Kamerateyp enthält einen $6.9\text{mm} \cdot 27.6\text{mm}$ großen Detektorchip. Er besteht aus $256 \cdot 1024$ Pixeln der Größe $27\mu\text{m} \cdot 27\mu\text{m}$. Der Chip ist so angebracht, dass Dispersion des einfallenden Lichts entlang der langen Achse erzielt wird.

Diese CCD-Kamera wird durch einen Controller ST138 (S&I) gesteuert. Für die hier angeführten Messungen wurde die „free-run“-Methode gewählt.* Hierbei wirken sich alle Ereignisse innerhalb der Messzeit additiv auf die registrierte Intensität aus. Für die Experimente wurde eine Akquisitionszeit von 15s pro Gitterposition gewählt. Während dieser Zeit wurden 150 Einzelaufnahmen akkumuliert. Die Probe wurde dabei vom Experimentator gleichmäßig gedreht.

Da nur ein Teil des Chips wirklich ausgeleuchtet wird, wurde auch nur dieser Teil, 100 Pixelreihen, ausgelesen. Dies beschleunigt die benötigte Auslesezeit und die Spektren werden nicht durch das Dunkelrauschen der restlichen 156 Pixelreihen beeinflusst. Diese Methode wird durch die sogenannte „binning“-Routine der verwendeten WinSpec-Software (Version 1.6.2.24) bereitgestellt. Ebenso wurde die Möglichkeit genutzt, den Detektor bei geschlossenem Shutter auszulesen und vor jeder Messung eine elektronische „Reinigung“ des Chips durchzuführen. An jeder Gitterposition wurden 5 Aufnahmen gemacht und gemittelt. Der gesamte Spektralbereich setzt sich typischerweise aus drei bis fünf Abschnitten zusammen. Für Übersichtsspektren wurden diese von der Software sofort aneinandergesetzt („step-and-glue“). Für die abgebildeten Spektren dagegen wurde dieser Schritt nachträglich und besser kontrolliert durchgeführt.

Zur Lichtsammlung wurde ein 1.5m langer Lichtwellenleiter (LWL) mit einem 1.25mm starken, UV-transparenten Kern eingesetzt (Optran UV, Fa. Ceram Optec, Bonn). Die numerische Apertur beträgt 0.22 und der Brechungsindex verläuft stufenförmig in radialer Richtung. Aus der numerischen Apertur NA ergibt sich nach Gl.4.3 der Akzeptanzwinkel zu $\Theta = 12.71^\circ$.

$$\sin \frac{1}{NA} = \Theta \quad (4.3)$$

Unter diesem Winkel kann Licht in den LWL eingekoppelt werden. Andernfalls wird es entweder totalreflektiert oder durch Mehrfachbrechung an Brechungsindexübergängen, also zwischen Kern und Ummantelung, bis zur Vernichtung der Intensität abgeschwächt.

*Für zeitaufgelöste Untersuchungen erwies sich dieses setup für unbrauchbar. Sowohl im Shutter- als auch in anderen Betriebsmodi können maximal Prozesse auf der ms-Zeitskala analysiert werden.

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrizes

Beide Enden des LWL sind plan poliert. Zum besseren Schutz des Materials sind die Enden mit sogenannten Stahlferruls versehen. Ansonsten wird der LWL durch einen Nylonmantel geschützt. Das Sammelende wird durch eine von Dipl. Chem. Dr. Carsten Zechmann entwickelte, vakuumdichte Zuführung, in alle drei Raumrichtungen (in Maßen) verstellbar, nahe an den Probenträger gebracht. Die Aufnahme geschieht orthogonal zur Flugrichtung und Einfallsebene des Lasers. Bei allen Messungen lag der LWL am Repeller an und befand sich ca. 6mm oberhalb des Laserspots.

Die unter dem Akzeptanzwinkel eingekoppelten Lichtwellen werden als geführte Moden durch den LWL transportiert und verlassen ihn stark divergent. Um eine parallele Einkopplung ins Spektrometer zu gewährleisten, wird der LWL im Brennpunkt eines Achromaten ($f=20\text{mm}$) plziert. Hierbei wurde je nach Anregungslaser eine Linse mit bzw. ohne UV-Transmission gewählt. Dies dient dem Schutz der CCD-Kamera. Für die Aufzeichnung von LIF-Spektren mit 355nm-Anregung wurde eine Linse gewählt, die gute Transmission nur für $\lambda > 380\text{nm}$ (Durchmesser $d=10\text{mm}$) gewährleistet. Dagegen findet unter Anregung mit 337nm eine Suprazil-Linse mit $d=22.4\text{mm}$ Verwendung. Diese zeigt auch hohe Transparenz für $\lambda < 380\text{nm}$.

Der Eintrittspalt des Spektrometers befand sich in doppelter Brennweite der Linse. Für die Messungen wurde eine Öffnung von 0.25mm eingestellt.

Beide Aufbauten wurden mit einer Quecksilberdampfampe und dem WinSpec-Programm kalibriert. Für das eingesetzte 600Linien/mm-Gitter wird ein spektrales Auflösungsvermögen von 0.12nm erhalten.

4.3. Emissionsspektren verschiedener MALDI-Matrizes

Es wurden Emissionsspektren der auch später verwendeten Matrizes, sowie einiger noch in Untersuchung befindlichen, aufgezeichnet. Hierbei konnten einige nur mit 337nm zu Fluoreszenz mit höherer Intensität angeregt werden. Zugleich bot die Anregung mit 337nm die Möglichkeit, den aufgezeichneten Spektralbereich zu kürzeren Wellenlängen zu verschieben, ohne Gefahr zu laufen, die Laserlinie auf dem Detektor abzubilden. Eine größere Verschiebung der Maxima ergab sich jedoch nicht.* Alle, auch die von Dipl. Chem. Dr. Carsten Zechmann aufgezeichneten Spektren, werden also durch den

*Berücksichtigt werden muss, dass Festkörper-Emissionsspektren meist breitbandig sind und keine scharfen Peaks zeigen. Die exakte Bestimmung der Peak-Position ist daher eher durch die Auswertung, denn durch den experimentellen Aufbau limitiert.

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrices

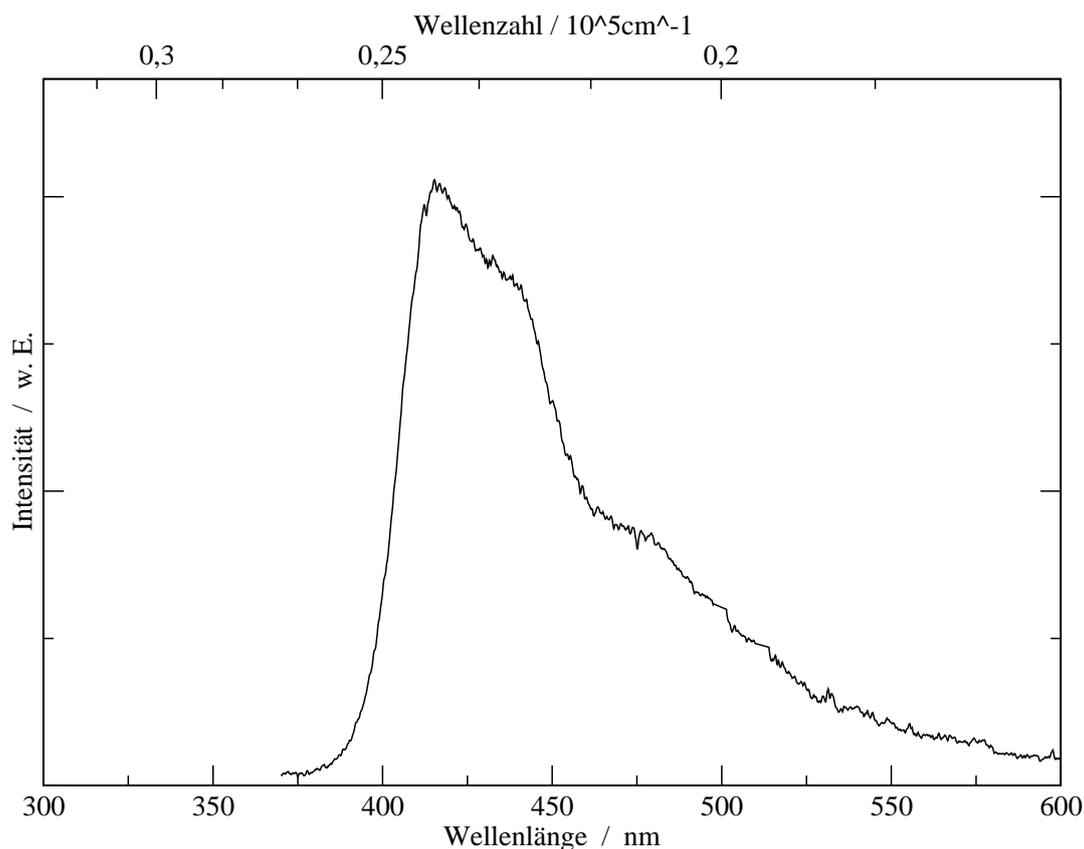


Abbildung 4.2.: Laserinduzierte Fluoreszenz von 2,5-DHB.

Achromaten des ersten Aufbaus nicht verändert. Dies ist insbesondere für DHB von Bedeutung, da hier eine steile Flanke genau bei der Absorptionskante des Achromaten sichtbar wird. Weiterhin können in den Spektren einige Nebenmaxima aufgefunden werden, die Schwingungsfrequenzen funktioneller Gruppen zugeordnet werden können.¹³ Die erhaltenen Spektren der verschiedenen Matrices sollen im Folgenden kurz dargestellt werden. Eine eingehende Betrachtung einiger verwendeter Substanzen kann entnommen der Literatur¹³ werden.

Die häufig eingesetzte Matrix-Substanz DHB weist ein Emissionsmaximum im blauen Spektralbereich bei 415 nm auf. Es wird weiterhin eine Schulter im Bereich von 430 bis 440 nm und von 461 bis 483 nm vorgefunden. Die gesamte Emissionsbande weist eine Halbwertsbreite (FWHM) von 54 nm auf. Dabei wird die Halbhintensität bei 403,7 bzw. 457 nm erreicht (Abb.4.2).

HPA stellt eine weitere Matrix dar, die derzeit weniger häufig eingesetzt wird. Dies

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrices

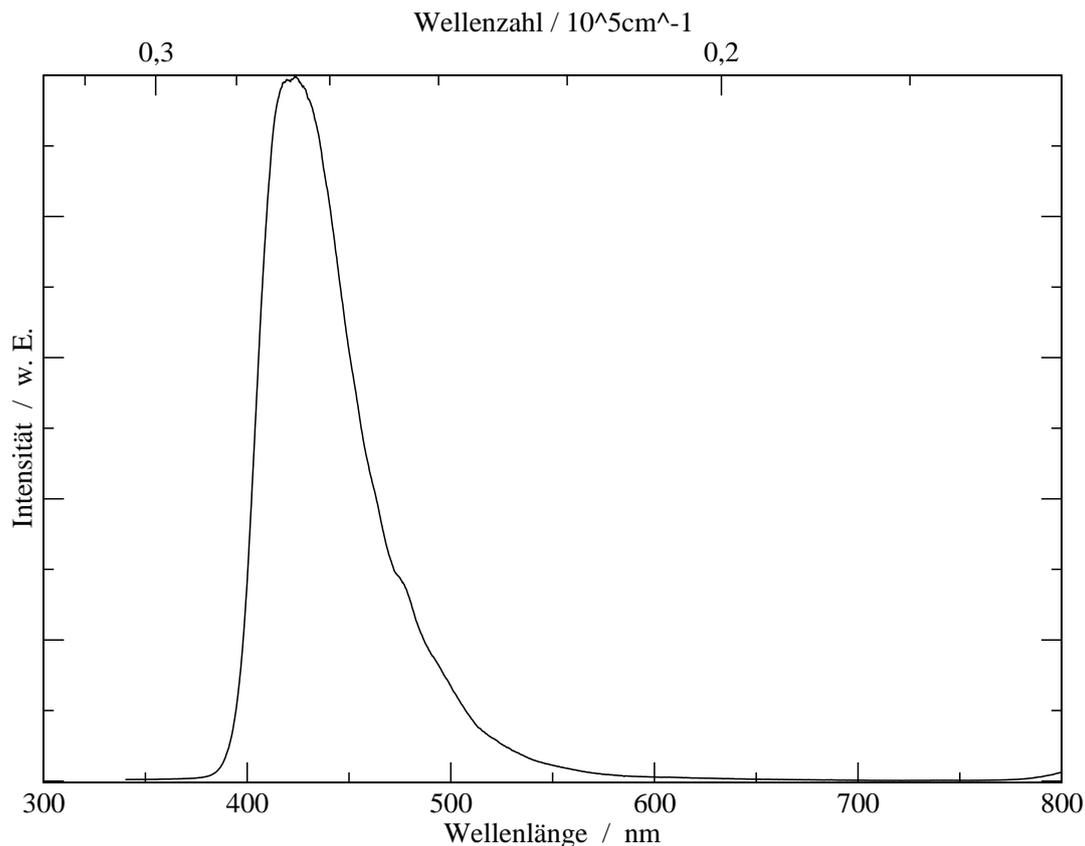


Abbildung 4.3.: Emissionsspektrum von 3-HPA.

liegt vermutlich z.T. an ihrem ungünstigen Kristallisationsverhalten. Sie bildet hauptsächlich grobkristalline Festkörper. Nach Knochenmuss stellt sie jedoch eine weiche Matrix dar. Sollten die Präparationsprobleme irgendwann gelöst sein, so liegt gerade in dieser Matrix für die Peptid- und Proteinanalyse großes Potenzial, da sie vermutlich den idealen Kompromiss zwischen Sinapinsäure (SA) und 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure (CCA) darstellt. Diese Matrix emittiert ebenfalls vornehmlich im blauen Spektralbereich. Das Emissionsmaximum liegt bei 423.7nm. Eine Schulterbande wird bei 430nm und ein Nebenmaximum bei 475nm gefunden. Die FWHM der Hauptbande beträgt 53nm und wird durch die Wellenlängen 404nm und 456.7nm begrenzt (Abb.4.3).

Die im vorigen Abschnitt schon angesprochene SA wird als stark ionisierende Matrix bei Proteinen mittlerer Größe eingesetzt. Während die Emission unter Anregung von 355nm häufig ausbleibt, kann sie leicht durch 337nm hervorgerufen werden. Dies ist umso erstaunlicher, da Festkörperabsorptionsspektren von Allwood et al.²⁰ durchaus

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrices

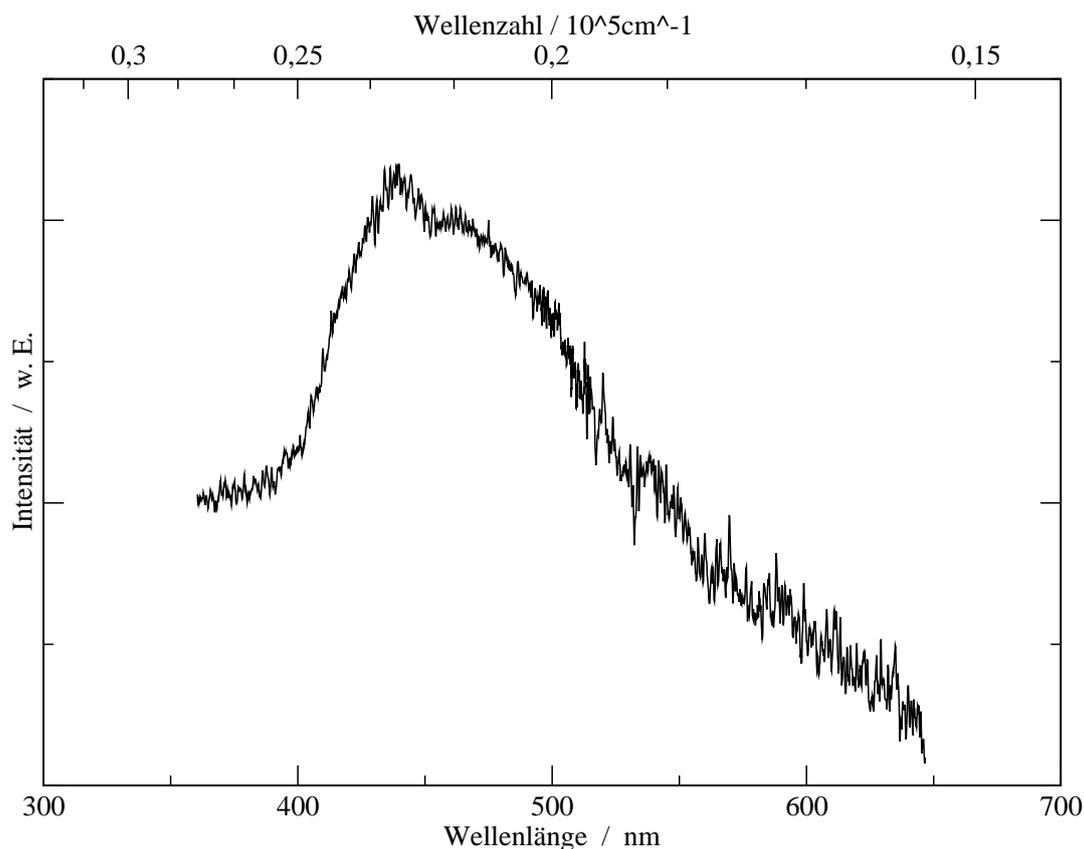


Abbildung 4.4.: Emissionsspektrum von SA.

Der Einbruch bei 532nm kommt aus der Korrektur durch ein Hintergrundspektrum zustande.

einen höheren Absorptionskoeffizienten bei 355nm als bei 337nm finden. Andererseits wird SA üblicherweise bei Geräten mit Stickstofflasern eingesetzt*. Insgesamt bleibt die Gesamtintensität jedoch gering. Das Emissionsmaximum liegt bei 439nm. Bei halber Intensität erstreckt sich die Emissionsbande von 413nm zu 503nm und ist somit 90nm breit. Eine Schulterbande wird bei 461nm gefunden (Abb.4.4).

Ein weiteres Derivat der Zimtsäure stellt Ferulasäure (FA) dar. Sie kristallisiert in Aggregaten aus langen, feinen und häufig am Rand der Probe hochstehenden Nadeln. Dies erschwert die Generation von homogenen Proben selbst unter gleichbleibenden Bedingungen. Darin mag die Begründung für den selteneren Einsatz im kommerziellen Bereich liegen. Für diese Zwecke spielen nicht nur gute Matrixeigenschaften, sondern

*Dies mag aber auch an dem ohnehin häufigen Einsatz von N₂-Lasern im kommerziell, analytischen Bereich liegen

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrices

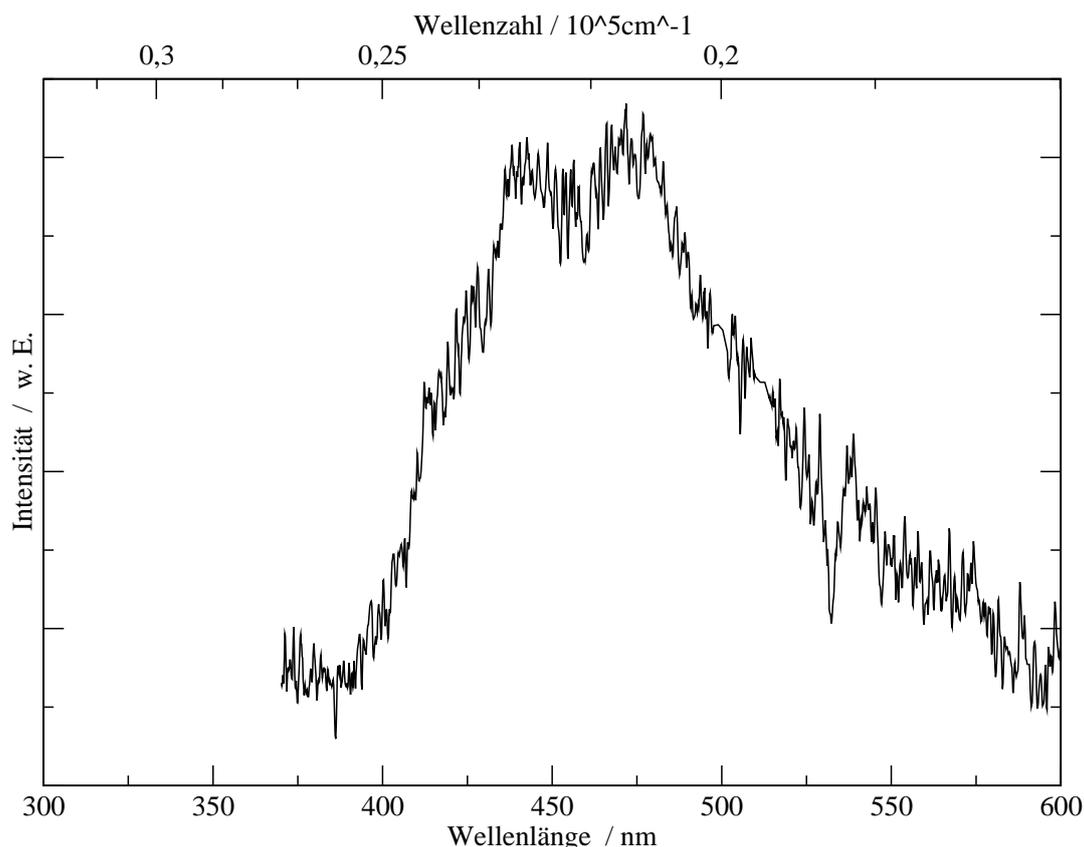


Abbildung 4.5.: Fluoreszenzspektrum von FA.

Der Einbruch bei 532nm kommt aus der Korrektur durch ein Hintergrundspektrum zustande.

natürlich auch gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter Einsatz automatischer Pipettierroboter u.ä. eine bedeutende Rolle. Hier aber liegt, wie bei HPA, ein gravierender Nachteil dieser mittelstark ablatierenden und ionisierenden Matrix. Diese Matrix zeigt unter Anregung mit 337nm ebenfalls Fluoreszenz geringer Intensität. Das Maximum der Emission liegt bei 473.7nm. Es wird begleitet von einem Nebenmaximum bei 443.9nm. Schulterbanden werden bei 421,510 und 555nm gefunden. Bei halber Intensität wird eine Fluoreszenz in einem Bereich von 410.3nm bis 545.5nm vorgefunden, was einer FWHM von 135.2nm entspricht (Abb.4.5).

Als letzter Vertreter der von der Zimtsäure ausgehenden Matrix soll die schon erwähnte CCA dienen. Sie wird in der kommerziellen MALDI-Analytik wegen ihrer homogenen Kristallisation und Eignung für verschiedene Präparationstechniken (z.B. dried-droplet, thin-layer) am häufigsten eingesetzt. CCA emittiert am stärksten bei 443.1nm, womit

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrices

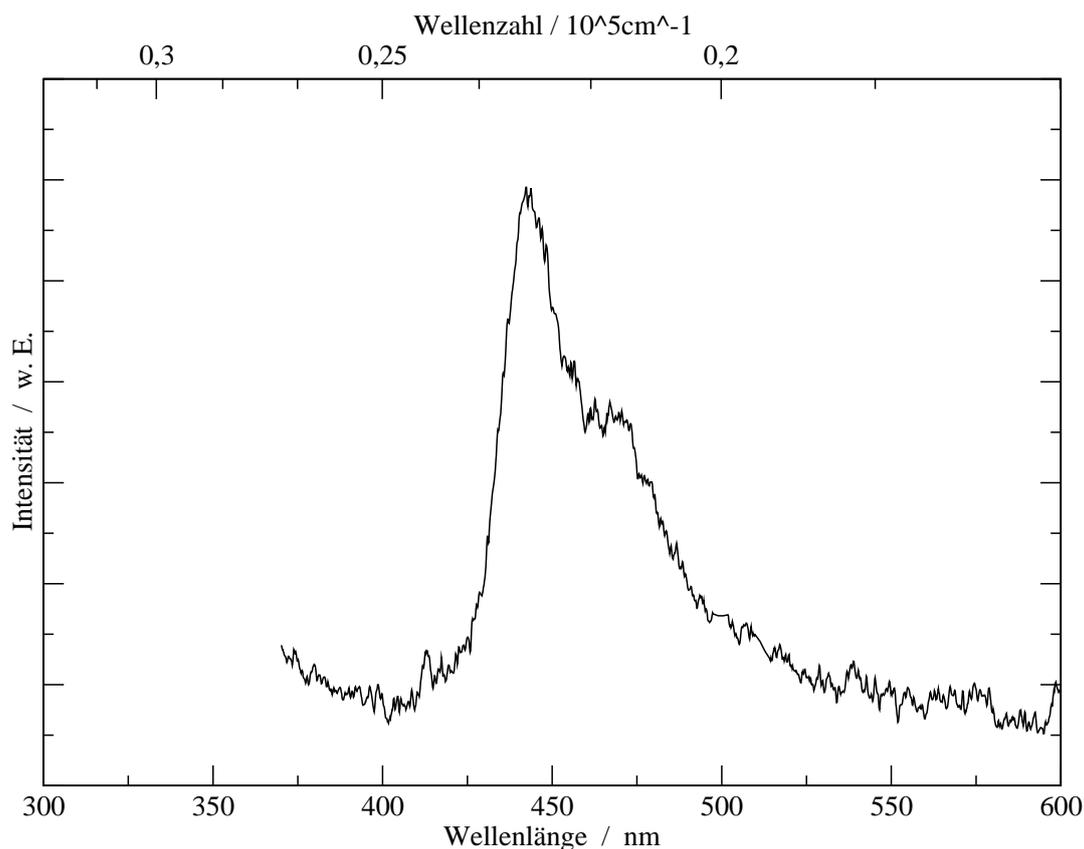


Abbildung 4.6.: Laserinduzierte Fluoreszenz von CCA.

das Emissionsmaximum zwischen denjenigen von FA und SA liegt. Die Breite der Emissionsbande bei halber Intensität beträgt 47nm, ausgehend von 433nm zu 480nm hin. Ein Nebenmaximum wurde bei 473nm gefunden (Abb.4.6).

Relativ selten findet man Hinweise auf IAA (Trans-Indol-3-Acrylsäure). Diese Matrix kann in der Polymeranalytik eine Alternative zum noch nachfolgenden Dithranol darstellen. Erste Erfahrungen zeigten eine höhere Ionisierungstendenz bei relativ guten Kristallisations- und Ablationseigenschaften. Weiterhin positiv fiel die geringere Anfälligkeit bezüglich Oxidation auf.* Die Emission von IAA durchläuft das Hauptmaximum bei 439nm und Nebenmaxima bei 478 und 609nm (Abb.4.7). Für den Bereich von 419nm bis 498nm liegt die Intensität dabei oberhalb von 50% (FWHM 79nm).

*SA, CCA und Dithranol zeigen recht schnell Alterungserscheinungen, so dass Lagerung unter Ar oder Vakuum sowie häufiges Umkristallisieren zumindest für den erfolgreichen Einsatz in der Proteinanalytik unvermeidbar sind.

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrices

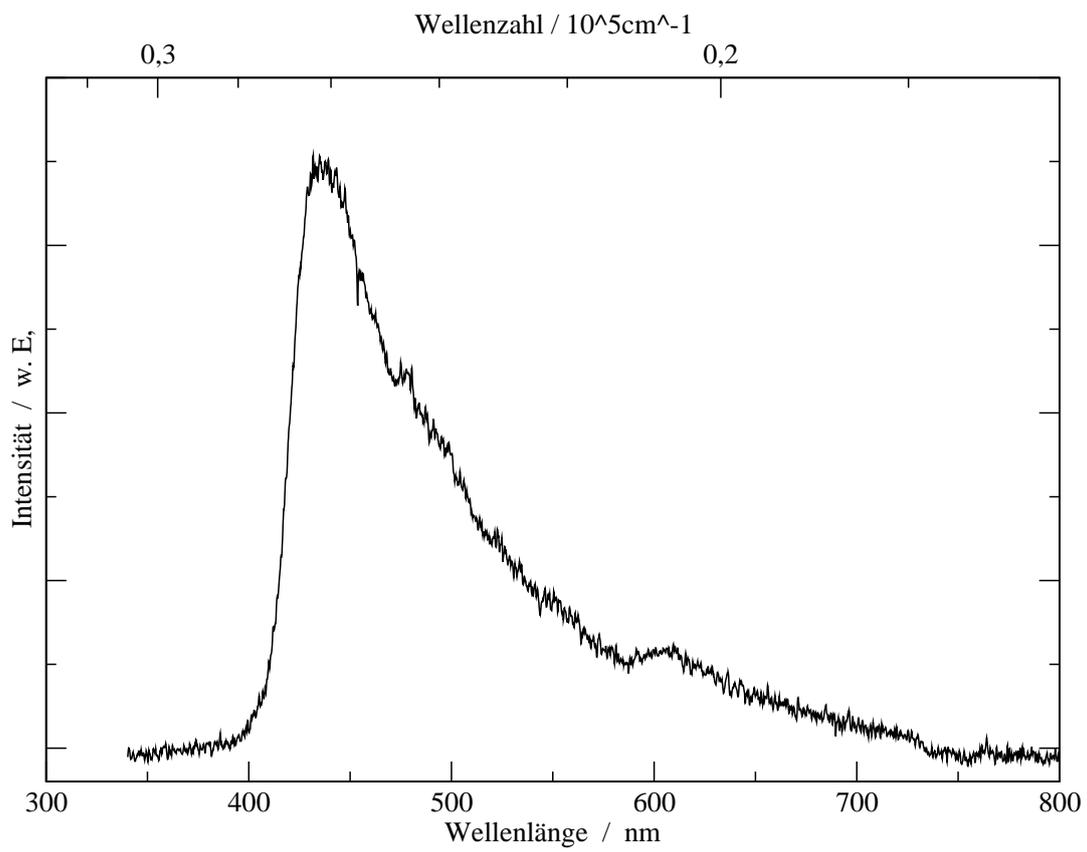


Abbildung 4.7.: Emissionsspektrum von IAA.

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrices

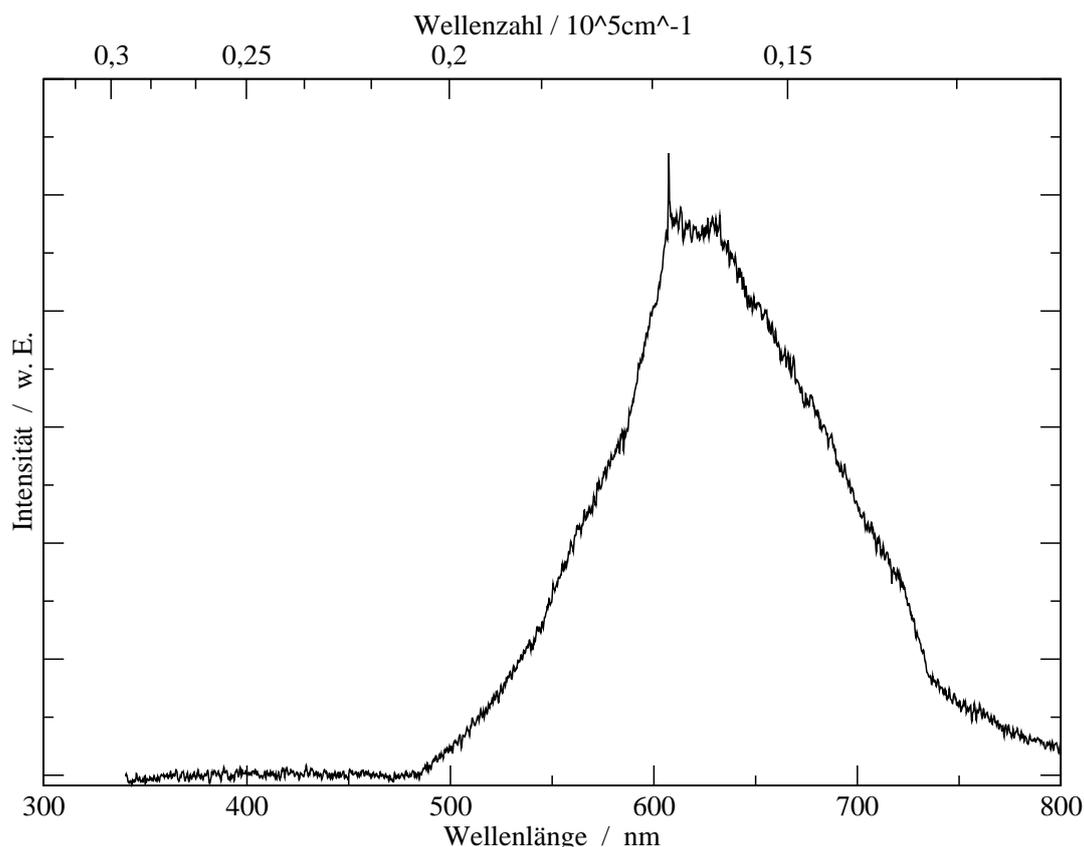


Abbildung 4.8.: Laserinduzierte Festkörperfluoreszenz von Dithranol.

Dithranol wird, wie zuvor schon erwähnt, im Wesentlichen in der Polymeranalytik eingesetzt. Da die Analyte meist nur schwer protonierbar sind, fällt die relativ schwache Ionisierungstendenz nicht weiter ins Gewicht. Positiv auf die Probenpräparation wirkt sich die homogene Kristallisation aus organischen Lösungsmitteln wie THF, Cyclohexan, Benzol und -derivate aus. Die Ionen werden meist als Kationenaddukte nachgewiesen, weshalb oft zusätzliche Reagenzien wie Alkali, Kupfer oder Silbersalze zugesetzt werden. Die starke Energiedissipation in strahlungslose Prozesse äußert sich durch eine starke Rotverschiebung der Emission. Die maximale Intensität wird bei 620nm* erreicht. Eine Schulterbande existiert bei 718nm. Ebenso auffällig ist die recht große FWHM von 127nm (572nm, 698nm).

Die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchung der verschiedenen Matrices sind

*Es handelt sich um ein Plateau, dass beidseits von gleich hohen Spitzen (607 und 632nm) begrenzt wird (Abb.4.8). Der Wert entspricht dem Mittelwert des Plateaus.

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrizes

Matrix	Emissionsmaximum / nm	FHWM / nm	hochenergetische Begrenzung der FHWM / nm	niederenergetische Begrenzung der FHMW / nm	lokale Maxima / nm
DHB	415	54.7	403.7	457	440*, 483*
HPA	423.7	53	404	456.7	475, 430*
IAA	439	79	419	498	478, 609
SA	439	90	413	503	461.2
CCA	443.1	47	433	480	473*
FA	473.7	135.2	410.3	545.5	443.9, 421*, 510*
Dithranol	620**	127	572	698	607**, 632**, 718

Tabelle 4.1.: Ergebnisse aus der wellenlängenseparierten Detektion laserinduzierter Fluoreszenz verschiedener MALDI-Matrizes.

Bei den mit * gekennzeichneten Werten wird kein lok. Maximum durchlaufen. Es handelt es sich um eine Schulterausbildung.

** : Dithranol zeigt zwei gleich hohe Spitzenwerte. Als Maximum wurde ein Mittelwert angegeben.

in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

4.4. Stokes-Shift zur Charakterisierung der Desorption?

Die aus den LIF-Spektren gefundenen Emissionsmaxima und den daraus folgenden individuellen Energieunterschieden zur Laserlinie der jeweiligen Anregung ergeben eine Reihenfolge der Matrizes, die auch empirisch mit dem Ablationsverhalten der Matrizes übereinstimmt. So weist Dithranol einen hohen Energieunterschied auf und gilt als stark ablatierende Matrix. Die zwar wesentlich besser ionisierende, aber mit schwächeren Ablationseigenschaften behaftete 2,5-DHB weist auch im LIF-Experiment einen kleineren Energieunterschied auf. In ersten Untersuchungen der Ablationsgeschwindigkeiten Neutraler wurde neben diesen beiden Matrizes noch FA untersucht. Aus den LIF-Daten wurde eine Geschwindigkeit zwischen 2,5-DHB und Dithranol erwartet. Dies wurde auch in ersten Experimenten vorgefunden. Diese experimentellen Ergebnisse sind in der Ta-

4. Spektroskopische Informationen verschiedener Matrices

Matrix	Fluoreszenz- maximum / nm	wahrscheinlichste Geschwindigkeit / ms^{-1}
DHB	415	468
FA	474	637
Dithranol	620	708

Tabelle 4.2.: Ergebnisse erster Voruntersuchungen an drei verschiedenen Matrices bezüglich Korrelation von LIF und Geschwindigkeitsverteilungen.

belle 4.2 zusammengefasst. Für spätere Messungen mussten die Strahlengänge der Laser verändert werden. Daher sind diese Daten nicht mehr mit den nachfolgenden vergleichbar. Des Weiteren waren die ersten Messungen großen Fehlern unterworfen. Dies wird in den nachfolgenden Abschnitten ausführlich dargelegt. Hier sei nur angemerkt, dass insbesondere auch die unterschiedlichen Probendicken, die bei der Auswertung wegen fehlender Daten unberücksichtigt bleiben mussten, große Unsicherheiten beinhalten. Qualitativ kann gesagt werden, dass zwar Dithranol dadurch am ehesten unbeeinflusst bleibt, jedoch z.B. FA eine sehr dicke Probe ausbildet. Ebenso liegen die Werte für DHB eher zu hoch. Eine Inversion des Trends bei diesen beiden Matrices kann unter diesen und anderen Gesichtspunkten nicht ausgeschlossen werden.

5. Positionierung zur Ermittlung von Geschwindigkeitsverteilungen ablatierter Neutraler aus verschiedenen Matrizes

Ein Charakteristikum der Ablation ist die Geschwindigkeitsverteilung des ablatierten Materials. Da sie jedoch nicht zeitlich nah der Ablation detektiert werden kann, wird die Expansion mit charakterisiert. Bei der MALDI handelt es sich um ein gepulstes Verfahren, anders als bei einem gepulsten Molekularstrahl wird jedoch nicht ein Ventil mit kleiner Düsenöffnung und Staudrücken von teilweise bis zu 10bar geöffnet. Vielmehr findet eine „freie“ Expansion ins Vakuum statt. Begrenzt wird diese durch den Ort der Ablation. Dieser liegt bei den meisten Experimenten und Ablationsmechanismen in der Größe des Laserspots. Weiterhin stellt der Probenkörper bzw. -träger eine Begrenzung der Expansionsrichtung dar.

Für thermisch hervorgerufene Ablationsvorgänge, die überwiegend von der Oberfläche ausgehen, würde man eine thermische Verteilung der Geschwindigkeiten erwarten. Dies gilt insbesondere für die reine Desorption und ggf. die Sublimation und Evaporation. Hier sollte eine Beschreibung der Geschwindigkeitsverteilungen durch die Maxwell-Boltzmann-(MB)-Verteilung nach Gl.5.1 möglich sein.

$$dN(\vec{v}, T) = N * \left(\frac{m}{2 * \pi * k_B * T} \right)^{\frac{3}{2}} * e^{\left(-\frac{m}{2 * k_B * T} (v_x^2 + v_y^2 + v_z^2) \right)} d^3v$$

v_i : Geschwindigkeit in Richtung x,y,z; m: Masse;
 k_B : Boltzmann-Konstante; T : Temperatur; N : Teilchenzahl

(5.1)

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Je mehr Material pro Zeiteinheit ablatiert wird, desto dichter wird der Plume, desto häufiger kommt es zu Stößen. Die Expansion wird Jet-ähnlicher und stark vorwärts gerichtet. Tatsächlich kann dieses Verhalten in Experimenten und Simulationen gefunden werden. Ein Maß dafür ist die Winkelverteilung (q). Viele Gruppen finden Verteilungen nach Gl.5.2.^{56,64,65}

$$q = \cos^n \theta \quad (5.2)$$

θ stellt dabei den Winkel zur Hauptflugrichtung, also der Orthogonalen zur Ablationsoberfläche dar. Für n werden Werte bis zu 25 angenommen. Selbst bei nur drei Kollisionen pro Teilchen werden noch Verteilungen mit $n = 4$ angenommen. Es wird also immer noch eine jetähnliche Expansion erwartet.⁵⁶

Für die Ablation von NO-Filmen werden in Einklang mit der Ausbildung eines Überschallgasstrahls hohe Translationsenergien aber schmale Rotationsenergieverteilungen gefunden. Ebenso zeigt sich eine Kühlung hinsichtlich der Besetzung von Vibrationsmoden. Dieses mit VUV-Ablation bei 193nm vorgefundene Ergebnis konnte auch bei IR-Ablationen ($10.6\mu\text{m}$) von Anilin aus einer CO_2 -Matrix und Benzimidazol aus Glycerol/Wasser bestätigt werden. Dabei wurde eine Abhängigkeit der Kühlung von der Matrix festgestellt. Die Kühlung war umso besser, je weniger interne Freiheitsgrade die Matrix aufwies.⁵⁶

Die mathematische Beschreibung einer solchen, stark vorwärts gerichteten Geschwindigkeitsverteilung gelingt mit „verschobenen“ Maxwell-Boltzmann-Verteilungen. Hierin wird eine Strömungsgeschwindigkeit (v_{flow}) in Jetrichtung angenommen. Von dieser Geschwindigkeit weichen die tatsächlichen Fluggeschwindigkeiten in Flugrichtung ab. Die Abweichung wird stärker, je schlechter der Jet ausgebildet ist. Die Ausbildung des Plumes kann dann nach Gl.5.3 bezüglich der Geschwindigkeitsverteilungen beschrieben werden.

$$dN(\bar{v}T, v_{flow}) = N * \left(\frac{m}{2 * \pi * k_B * T} \right)^{\frac{3}{2}} * e^{\left(-\frac{m}{2 * k_B * T} (v_x^2 + v_y^2 + (v_z - v_{flow})^2) \right)} d^3v \quad (5.3)$$

Während in adiabatischen Expansionen ein Überschallgasstrahl vorliegt, kann die Strömungsgeschwindigkeit in Ablationsexperimenten häufig mit der Schallgeschwindig-

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

keit (v_{sonic}) angenähert werden.

$$v_{sonic} = \sqrt{\gamma k_B T / m}$$

γ : Adiabatenkoeffizient C_p/C_V (5.4)

Die Flussgeschwindigkeit kann auch als Vielfaches der Schallgeschwindigkeit, der sogenannten Machzahl M ausgedrückt werden. Im Fall der einfachen Schallgeschwindigkeit wird diese also eins. Wird sehr viel Material ablatiert, kann es ähnlich der Jetausbildung in gepulsten Molekularstrahlexperimenten zu Überschallgeschwindigkeiten im Plume kommen. Die Winkelverteilung wird in diesem Fall sehr schmal und n aus Gl.5.2 nimmt Werte von $(1 + M)^2$ an.

Die Verteilung der Teilchen kann demnach auch in Abhängigkeit von Geschwindigkeit und Winkel ausgedrückt werden (Gl.5.5).⁵⁶ Simulationen haben gezeigt, dass die besten Ergebnisse mit zwei Temperaturen, einer in radialer Richtung und einer in axialer Richtung, erhalten werden. Im Abschn.3.2 wurde bereits auf die Existenz von unterschiedlichen Ausbreitungen von thermoelastischem Druck bzw. Wärme in die Umgebung hingewiesen.

$$I(v, \theta) \sim v^3 e^{-\frac{m}{2k_B} \left[\frac{(v \cos \theta - v_{flow})^2}{T_{axial}} \right] + \frac{v^2 \sin^2 \theta}{T_{radial}}}$$

I : Intensität (5.5)

Dabei nimmt T_{axial} und v_{flow} mit Anzahl der Kollisionen zu, wohingegen T_{radial} abnimmt. In Berechnungen konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Kollisionen stark zunimmt, sobald die Pulsweiten des Lasers unter 10ns sinken. Aufgrund der vielen Kollisionen werden sich schnelle Moleküle in der Mitte des Jets befinden und langsame eher in den Randbereichen.

Ein weiteres Charakteristikum einer jetähnlichen Expansion ist die Massenunabhängigkeit der Geschwindigkeitsverteilung. In vielen Experimenten konnten keine Unterschiede zwischen Matrix und Analytmolekülen bezüglich der Geschwindigkeiten festgestellt werden. In manchen Untersuchungen dagegen werden für schwerere Analyte eine schmälere Verteilung gegenüber der der Matrix festgestellt. Dies gilt insbesondere bei der radialen Verteilung und wird als "plume-sharpening"-Effekt bezeichnet.^{66,67} Hierin liegt vermutlich auch die gute Kühlung der Analyten begründet. Sie befinden sich im bestgekühlten Teil des Plumes. Photochemische Prozesse dagegen können zur Aufweitung sowohl der Winkel- als auch der Geschwindigkeitsverteilung führen.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Im Fall der photomechanischen Ablation haben Zighilei et al. in Simulationen eine Abhängigkeit der Ablationsgeschwindigkeit von der Ursprungsposition der ablatierten Teilchen festgestellt. Ein Teilchen ist demnach umso schneller, je näher es sich an der Probenoberfläche befunden hat. In diesem Fall wird die Plumecharakteristik nicht mehr durch eine Strömungsgeschwindigkeit, sondern ein ganzes set von Geschwindigkeiten beschrieben.⁵² Obere Grenze stellt die Geschwindigkeit der Oberflächenmoleküle dar. Interessant sind einige experimentelle Befunde, die eine niedrige Strömungsgeschwindigkeit erbrachten bzw. diese auf 0m/s abfiel. Hier müssen die Experimentbedingungen auf die Existenz einer photomechanischen Ablation neu geprüft werden.

Mathematisch kann dies durch ein Produkt aus einer Maxwell-Boltzmann-Verteilung für den radialen Anteil und der Differenz zweier Verteilungen für den axialen Anteil beschrieben werden. Eine dieser Verteilungen stellt den Anteil ohne Strömungsgeschwindigkeit, die andere denjenigen mit maximaler Strömungsgeschwindigkeit dar (Gl.5.6).⁵² Wobei erf die Fehlerfunktion bezeichnet.

$$\begin{aligned}
 dN(\vec{v}, T, v_{flow,max}) = N * & \left(\frac{m}{4\pi k_B T v_{flow,max}} \right) * e^{-\frac{m(v_x^2 + v_y^2)}{2k_B T}} \\
 & * \left[erf\left(\sqrt{\frac{m}{2k_B T}} v_z\right) - erf\left(\sqrt{\frac{m}{2k_B T}} (v_z - v_{flow,max})\right) \right] \\
 & * dv_x dv_y dv_z \tag{5.6}
 \end{aligned}$$

Wie in den vorangehenden Abschnitten aufgezeigt wurde, ist für die Analyse der Ablation die Bestimmung der Teilchengeschwindigkeit wichtig. Anders als bei der Anwendung von delayed-extraction-^{64,68} und field-free-drift-length-Methoden⁶⁹ werden bei der Postionisation nicht Ionen sondern Neutrale untersucht. Diese sind von besonderer Bedeutung, da sie den größten Anteil der Ablationswolke ausmachen. So stellen sie z.B. Reaktionspartner bei Stößen oder Anlagerungs- oder Abspaltungprodukte von Clustern dar. Auch müssen bereits gebildete Ionen, die durch das starke E-Feld beschleunigt werden, durch diese Wolke hindurchkommen. Ihr Einfluss dürfte also ein erheblicher sowohl auf die Ionenbildung als auch das -überleben sein. Somit ist die Kenntnis der Neutralenverteilung wünschenswert, um ggf. Verbesserungen hinsichtlich der Ionisierungs- und Beschleunigungsbedingungen zu erzielen. Des Weiteren sollte die Geschwindigkeit eines Großteils der Neutralen, unbeeinflusst von Ionisierungsprozessen, die Ablationseigenschaften der jeweiligen Matrix widerspiegeln. Die Bestimmung der Ionengeschwindigkeiten hingegen kann zusammen mit der Kenntnis der Neutralengeschwindigkeiten Aufschluss über

die ablaufenden Prozesse der Ionisierung geben. So werden sekundäre Ionisationsprozesse, deren Reaktionszeit im μs -Bereich liegen dürfte, in jedem Fall durch die Ionen­geschwindigkeit mitdetektiert. Die Korrelation beider Geschwindigkeiten bleibt jedoch weiteren Experimenten vorbehalten, bei denen Neutralengeschwindigkeiten noch genauer bestimmt werden. Vorzugsweise müsste dann ein Experiment mit der Möglichkeit beides zu bestimmen, aufgebaut werden. Gegenstand dieser Arbeit war jedoch die Untersuchung der Ablationseigenschaften der Matrizes.

5.1. Aufbau Positionierung

Der Gesamtaufbau kann dem Schema A.4 im Anhang A entnommen werden. Die einzelnen Bereiche werden im Folgenden separat behandelt.

5.1.1. Ablationslaser

Zur Ablation wurden die Laserwellenlängen 355nm, 337nm oder 270nm genutzt. Zur Erzeugung von 355nm wurde die dritte Harmonische eines Nd:YAG-Lasers (DCR-11, Spectra Physics,) genutzt. Ein Stickstofflaser (VSL 337ND, Laser Science, Newton) lieferte die Wellenlänge 337nm. 270nm wurden durch einen modifizierten Jaguar C-Farbstofflaser (Radiant Dyes, Wermelskirchen) (Fluoreszin 27 in alkal. EtOH, Radiant Dyes, mit einem verdoppelten Surelite I (Continuum, Santa Clara) gepumpt, Aufbau: siehe A.5 im Anhang A) erzeugt. Die Wellenlängenseparation wurde beim Farbstofflaser und beim Nd:YAG jeweils durch ein Pellim-Broka-Prismensystem* realisiert. Im Falle des DCR-11 wurde der Laser durch zweifaches Umspiegeln mit einem Spiegel und einem 1% Beamsplitter (BS) abgeschwächt. Eine Iris zwischen den beiden Umlenkoptiken begrenzte den Strahldurchmesser auf 3mm. Die beiden anderen Wellenlängen wurden mittels zweier Aluspiegel umgelenkt und durch den obigen Beamsplitter hindurch mit dem 355nm-Laserstrahl zum Überlappen gebracht (s. Abb.A.6 im Anhang A). Der Laserstrahl des N_2 -Lasers wurde zusätzlich mit einer Iris auf 0.9mm Durchmesser begrenzt.

Nach einer Fokussierung mittels einer aus BK7 gefertigten Linse ($f = +200\text{mm}$)[†] betrug der Spotdurchmesser auf der Probenoberfläche ca. 0.15mm . Die Laserleistungs-

*Beim DCR-11 durch Blenden und inversem Strahlengang modifiziert.

[†]Bei den Messungen mit dem Dye-Laser wurde für 355nm und 270nm ein Aufbau mit Suprazil I Linse gewählt

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Laser	Stickstoff	DCR-11	Dye-Laser
Irradiance / GWm^{-2}	75	3.8	309
Fluence / Jm^{-2}	164	38.2	1856
Pulsdauer / ns	3	6	6

Tabelle 5.1.: Leistungsdaten der verwendeten Lasersysteme.

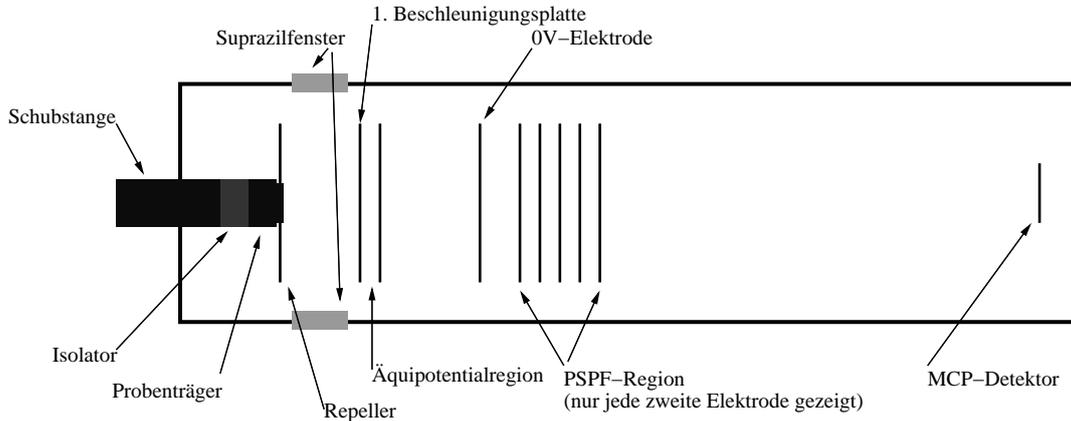


Abbildung 5.1.: Schematischer Aufbau des linearen TOF-MS.

daten können der Tabelle 5.1 entnommen werden. Die Desorptions-Laserstrahlen wiesen zur Targetoberfläche einen Winkel von 12° auf.

5.1.2. Massenspektrometer

Für die Experimente wurde ein lineares Flugzeitmassenspektrometer verwendet (Abb.5.1). Die Ionenquelle wurde über eine doppelflutige Turbomolekularpumpe (Balzer TPU330) evakuiert. In der Regel betrug der Druck $2.0 \cdot 10^{-6} mbar$ (Balzer TPG300). Die Quelle enthält ein 2-stufiges Beschleunigungsfeld, welches durch Edelstahlringelektroden (95mm Durchmesser) in einer Keramikhalterung realisiert wurde. Die Probe wurde in elektrischen Kontakt mit der Repellerplatte gebracht. Das angelegte Potenzial lag bei 12890V. Hierfür stand ein Hochspannungsnetzteil FUG HCN35M-35000 zur Verfügung. Für die zweite Beschleunigerstufe betrug das Potenzial 7710V. Dieses wurde durch ein identisches Netzteil bereitgestellt. Das folgende Abzugsgitter war geerdet. Das sich anschließende PSPF-Feld wurde ebenfalls geerdet. Nach einem evakuierten Flugrohr (Turbomolekularpumpe Leybold Turbovac 150; $p = 8 \cdot 10^{-7} mbar$) von 2m Länge wurden die

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Ionen durch einen Doppel-Channel-Plate-Detektor (El-Mul, Durchmesser 33mm) nachgewiesen. Dieser lag auf negativem Potenzial von -2.3kV, bereitgestellt durch ein FUG HCN 35-12500 Netzteil. Durch ein Erdungsgitter am Ende des Flugrohres und 1cm vor dem Detektor wurden Felddurchgriffe vermieden. Gleichzeitig erfuhren die Ionen so eine Nachbeschleunigung.

Das erhaltene Signal wurde von einem digitalen Speicheroszilloskop TDS 540A von Tektronix aufgezeichnet. Via GPIB-Schnittstelle wurden die akquirierten Daten an einen PC übergeben. Dort sorgte ein Labview-Programm (National Instruments, Version 5.1 für Windows95) für die Speicherung des Spektrums. Dieses Programm wurde während der Diplomarbeit erstellt und um einige Funktionen, insbesondere der Speicherung von Laserleistungsdaten, erweitert (s.C.1).

5.1.3. Zeitliche Synchronisation und Steuerung

Zur Synchronisation der Laser und des Speicheroszilloskops wurde ein Delaygenerator der Firma Stanford Research Systems Inc. Typ DG535 eingesetzt. Die Triggerkaskade wurde durch den Blitzlampentrigger des zur Postionisation eingesetzten Lasersystems ausgelöst. Da dieses System mit 20Hz betrieben werden muss, der DCR-11 und Surelite I aber mit 10Hz, wurde der Takt durch eine von Dipl. Ing. Uwe Eggers entwickelte Schaltung halbiert. Diese stellte den Eingangstrigger für den DG535 bereit. Je nach Desorptionslaser wurden ein oder zwei Rechteckpulse zur Triggerung benötigt. Diese wurden durch eine logische Und-Verknüpfung zweier Kanäle des DG535 erhalten.*

Der Stickstofflaser und der Surelite I kamen mit einem Triggersignal aus. Im Fall des Surelite betrug der Jitter des Triggers zur Detektion des Laserpulses mittels Photodiode (PD) 3ns. Für den Stickstofflaser lagen die Schwankungen bei 5ns. Beim DCR-11 waren weder der Jitter noch die Leistungsschwankungen vertretbar, wenn nur der Blitzlampenzeitpunkt gesteuert wurde. Wurde jedoch auch der Zeitpunkt der Pockelszellenschaltung gesteuert, so betrug der Jitter zu einer PD nur 1ns und die Leistungsschwankungen lagen innerhalb der Gerätespezifikationen.

Das Speicheroszilloskop wurde über die Sync-Ausgänge der Pockelszellen bzw. im Fall des Stickstofflasers über den DG535 synchronisiert. Erneutes Überprüfen der Jitter

*Insbesondere die Nd:YAG-Laser benötigen Triggersignale mit einer festgelegten Pulsdauer. Wird nur ein Kanal des DG535 verwendet, so wird mit zunehmendem Delay die Pulsbreite immer geringer. Die Laser antworten darauf mit einer Leistungsabhängigkeit vom Delay.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

zwischen Laseransteuerung und Oszilloskopansteuerung zeigte, dass keine Abweichungen zu den oben angeführten Werten auftraten.

Die Jitter der Laser zueinander wurden mittels zweier Photodioden überprüft. Wurden lediglich Nd:YAG-Laser eingesetzt, so wurde ein maximaler Jitter von 5ns festgestellt. In Kombination mit dem N₂-Laser wurde jedoch ein Jitter von 10ns registriert.

5.1.4. Nachionisation

Bei dem Postionisationslaser handelte es sich um ein MOPO-System (MOPO 730 mit FDO, gepumpt durch GCR230 Nd:YAG, beides Spectra Physics, Darmstadt). Dieser durchstimmbare Festkörperlaser wurde festfrequent bei 260nm betrieben. Dadurch konnte eine stabile Strahlage gewährleistet werden. Voraussetzung dafür ist jedoch jegliche Deaktivierung der integrierten Leistungsoptimierungsalgorithmen. Der Laserstrahl konnte parallel zur Targetoberfläche an beliebigen Positionen zwischen Repeller und 1. Beschleunigungsplatte ins Gerät eingekoppelt werden (Abb.A.6, A.1). Dieser Laserstrahl wurde durch eine Suprazil I Linse ($f = +100mm$) auf einen Spotdurchmesser von ca. $0.1mm$ fokussiert. Der Fokuspunkt lag dabei ca. $1.5cm$ vor der TOF-Achse*. Dadurch wurde eine übermäßige Fragmentierung bei der Postionisation weitestgehend vermieden. Lediglich bei Dithranol waren ausschließlich sehr starke Fragmentierungen zu beobachten.

5.1.5. Gewichtung mit Laserleistung und Matrix-Integral

Die Leistung des Postionisationslasers wies eine geringe Schuss-zu-Schuss-Stabilität auf. Zudem ließ über Zeitintervalle im Stundenbereich die Leistung häufig stetig nach. Daher bestand die Notwendigkeit, die MOPO-Leistung mitzuschreiben. Es existierte sowohl ein interner als auch ein externer Detektor, der auch durch den Controller ausgelesen werden konnte, jedoch ließ sich der externe Detektor nicht mittels GPIB-Schnittstelle auslesen[†]. Der interne Detektor genügte den Ansprüchen nicht, da die Leistung hernach durch eine Iris noch einmal eingeschränkt wurde. Die Inhomogenitäten des Spots sorgten dafür, dass die Anzeige des internen Detektors dann nicht mit der tatsächlich genutzten Leistung korreliert werden konnte. Daher wurde ein Beamsplitter vor der fokussierenden Linse

*Variierbar von 10mm zu 31mm in 0.1mm Schritten

[†]Auch die Abfragemöglichkeiten der internen Schnittstelle sind undokumentiert und wurden von Dipl. Phys. Dr. F. Gunzer und Dipl. Chem. D. Walbrodt im „try-and-error“-Verfahren ermittelt.

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

angebracht und der externe Detektor zur Registrierung dieser Leistung eingesetzt. Um nun die Leistung mitprotokollieren zu können, wurde der externe Detektor am internen Port betrieben und via GPIB-Steuerung des Controllers ausgelesen. Dazu wurde das bereits während der Diplomarbeit erarbeitete Labview-Programm erweitert (s. C.1). Die Leistungswerte wurden in ein Array von z.B. 300 Datensätzen geschrieben. Dies war für eine Aufnahme einer Mittelung von 30 Einzelspektren gedacht. Da nun der DCR-11 mit 10Hz getaktet ist, der MOPO aber mit 20Hz, wurden die letzten 60 Werte des Arrays gemittelt und zur Gewichtung des Signales herangezogen. Hierbei zeigte sich, dass es unerheblich war, ob 30 Werte der geraden oder ungeraden Datensätze allein oder alle 60 Werte gemittelt wurden. Die mittlere Leistung der 30 genutzten Laserschüsse wurde von allen Varianten adäquat wiedergegeben.*

Ein weiterer Punkt waren die, wenn auch im ersten Fall geringeren, Schwankungen des Ablationslasers und der Probenbeschaffenheit. Hierzu wurde das Integral des prompten Matrix- und/oder Analytsignals herangezogen. Damit wurden beiden Effekte zeitgleich berücksichtigt. Eine direkte Gewichtung mit dem normierten Matrixintegral erwies sich als zu stark. Daher wurde die 9. Wurzel des Normierungsfaktors zur Gewichtung herangezogen. Dies trägt einer Sättigung Rechnung, wenn mehr Neutrale angeboten werden als der Positionierungslaser zu ionisieren vermag.

Die Inhomogenität der Probe macht sich allerdings nicht nur in Intensitätsschwankungen, sondern auch in Änderungen der zurückgelegten Strecke relativ zum Positionierungslaser bemerkbar. Diese Abweichungen werden im Abschnitt der Oberflächenabtastung (vgl. 5.3) ausführlich behandelt.

5.1.6. Probenpräparation

Alle Proben wurden im sogenannten „dried-droplet“-Verfahren hergestellt. Dabei wurde die Matrixsubstanz in einem Lösungsmittel (Lsgm.) gelöst. Die für die einzelnen Matrizes verwendeten Lsgm. können der Tab.5.2 entnommen werden. Zur Auswahl standen Ethanol (EtOH), Tetrahydrofuran (THF), Acetonitril (AcCN) und Wasser. Sollte ein Analyt zugefügt werden, so musste dieser in dem gleichen oder in einem mit der Matrixlösung mischbaren Lösungsmittel gelöst werden. Nach ggf. durchgeführter Mischung der Lösungen wurde ein Tropfen auf einen Stahlprobenträger gebracht. Nach Verdampfen

*Die genaue Zuordnung zu den genutzten Laserpulsen ist indes nicht möglich. Sie unterliegt allein der Stochastik des Startpunktes.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Matrix	DHB	FA	SA	Dithranol
Lösungsmittel	EtOH	EtOH	H ₂ O, AcCN 2:1	THF

Tabelle 5.2.: Verwendete Lösungsmittel für die einzelnen Matrizes.

des Lösungsmittels blieb eine mikrokristalline Probe zurück. Die aus wässrigen Lösungen auszukristallisierenden Matrizes wurden bereits am Vortrag präpariert und über Nacht i. vac. getrocknet. Bei den leichter flüchtigen Lösungsmitteln Ethanol (EtOH) und Tetrahydrofuran (THF) reichte mehrstündiges Trocknen aus, um einen Einfluss von eingeschlossenem Lösungsmittel auszuschließen. Es konnten keine Effekte zwischen frischen oder mehrtägig i. vac. gelagerten Proben festgestellt werden.

Der Probenträger bestand aus V2A-Stahl. Es handelte sich um einen runden Stempel mit 9.5mm Durchmesser. Dieser konnte auf der Teflonspitze einer Schubstange durch eine Vakuumschleuse in das MS eingebracht werden. Diese Schleusenvorrichtung wurde jeweils mit einem Kugelhahnventil zum MS bzw. zu einer Öldrehschieberpumpe (Vacuumbrand, Wertheim, Typ RZ 2) verschlossen. Der Probenträger rastete mit einer Fräskante (ca. 1mm Breite und Tiefe) in den Repeller ein. Somit lag der Probenträger auf Repellerpotenzial. Des Weiteren bildeten Repeller und Probenträger eine nahezu ebene Oberfläche. Durch das isolierende Teflonstück konnte der Probenträger mit der Schubstange verbunden bleiben. Vor jeder Messung wurde der Probenträger mit Hilfe dieser gedreht, bis ausreichend Signalintensität beobachtet wurde. Während der Signalerfassung wurde der Probenträger dann nicht mehr gedreht. So verändert sich der Ablationsort nur durch Probenabtrag.

5.2. Bestimmung des Postionisationsortes

Zur Ermittlung der Geschwindigkeit werden Delayzeit und zurückgelegte Strecke benötigt. Unter Vernachlässigung einer etwaigen Position des Neutralteilchens unterhalb der Probenoberfläche, wird die Strecke durch die Position der Probenoberfläche und dem Postionisationsort begrenzt. Die Vernachlässigung erscheint zulässig, da die gefundenen Ablationstiefen max. 100nm betragen, die Strecke bis zur Postionisation relativ groß ist und die Genauigkeit der Streckenermittlung nicht ausreicht, um diese Varianz erfassen zu können (vgl.3.2, 5.3 und B.1). In ersten Experimenten von Dipl. Chem. Dr. C. Zechmann wurde die Position mit einem auf einen Probenträger aufgebracht, gewinkelten

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Millimeterpapier bestimmt. Dieses Verfahren erwies sich für die Messung verschiedener Proben als ungeeignet. Die Probenträger weisen eine Fräskante zum Einrasten im Repeller auf. Diese ist jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Dieser Ungenauigkeit wurde begegnet, indem nur zwei bestimmte Probenträger verwendet wurden. Allerdings war auch die Befestigung des Millimeterpapiers auf dem Probenträger nicht optimal. Daher konnten bei wiederholten Messungen recht große Abweichungen auftreten. Ein weiterer Aspekt, der auch bei dem im folgenden Abschnitt vorgestellten Verfahren gilt, muss weiterhin berücksichtigt werden. Es ist nicht möglich, den Abstand exakt am Ort der Ionisierung zu bestimmen. Vielmehr kann optisch nur die Parallelität des Strahlengangs zum Repeller einigermaßen erreicht werden. Anschließend kann der Abstand des Fokuspunktes zum Repeller bestimmt werden. Eine große Unsicherheit stellt auch die Entfernung des Betrachters vom Bild (baulich bedingt mindestens 20cm) dar. Daher wurde der Fokuspunkt bestmöglich auf eine Linie des Millimeterpapiers eingestellt. Unter dem Aspekt der gewünschten Variation des Abstandes weist das verwendete Millimeterpapier jedoch zu wenig Teilungen auf. Ein neues Verfahren musste gefunden werden.

5.2.1. Optische Postionisationsortbestimmung

Eine Alternative wurde aus den Erfahrungen mit Laserjustagen abgeleitet. Für jede Messserie wurde die Postionisationsposition mit einem sogenannten "burn" auf entwickeltem aber unbelichtetem Polaroidbildmaterial (Typ 667) verifiziert.* Für diese Messungen wurde ein Winkelmetall an einem Probenträger befestigt und ein Stück Fotomaterial daran angeklebt (Abb.A.2 im Anhang A). In das MS eingeschleust, riefen wenige Laserpulse eine Verfärbung auf dem Fotomaterial hervor. Ein Ausmessen mittels einer Messlehre unter einer 10fach-Lupe ergab dann den Abstand des Postionisationslasers vom Target mit einer Ungenauigkeit von 0.4mm. Dieser Fehlerwert setzt sich zusammen aus der unbekanntem Probendicke (vgl.5.3.1, SA als Sonderfall ausgenommen) und der Ablesungenauigkeit der Schieblehre. Dies führte zu einer Ungenauigkeit der Geschwindigkeitswerte von durchschnittlich 100m/s am Verteilungsmaximum. Dieses Verfahren ist daher für die Bestimmung von Absolutwerten ungeeignet. Für die relative Veränderung des Abstandes und zur Überprüfung der Laserjustage ist es jedoch ausreichend. Hier geht die Probendicke nicht in den Fehler ein.

Die Unterschiede bei Variation der zum Postionisationsort zurückgelegten Strecke

*An dieser Stelle sei Dipl. Ing. S. Tömmes, Spectra Physics, für den Entwicklungsservice gedankt.

konnten nachvollzogen werden. Dennoch konnte der reale Positionierungsort nicht bestimmt werden. Durch nicht exakte Parallelität konnte es leicht zu Abweichungen von bis zu 0.1mm kommen, die nicht erfasst werden konnten (siehe Abb.A.3 im Anhang A). Zusätzlich erwies sich der Positionierungsort als sehr empfindlich bezüglich Laserjustagen jeglicher Art. Diese sind bei dem MOPO-System jedoch hin und wieder notwendig, da sonst die erforderliche Leistung nicht mehr erreicht wird. Ein Verfahren, das für die jeweilige Serie den Positionierungsort aus massenspektrometrischen Daten ermittelt, soll im Abschn.5.2.2 vorgestellt werden.

5.2.2. Berechnung des Positionierungsortes aus Flugzeitdaten

Zur Ermittlung des Positionierungsortes bietet sich noch ein anderes Verfahren an. Wie im Abschn.2.1.1 erläutert, machen sich Ortsunschärfen in Flugzeitabweichungen bemerkbar. An einem Ort zwischen Repeller und 1. Beschleunigungsplatte gestartete Ionen erhalten weniger kinetische Energie als direkt am Repeller gestartete. Wird keine Korrektur vorgenommen, so treffen diese in einem linearen TOF später auf den Detektor. Die korrigierende Wirkung einer mehrstufigen Quellenanordnung muss dabei natürlich außer Kraft gesetzt oder gemindert werden. Hierzu wurde statt des üblichen schwachen Potenzialgradienten in der ersten Stufe und einem starken in der zweiten Stufe ein fast linearer Verlauf in der gesamten Quelle gewählt. Im Experiment betragen die Potenzialgradienten 545.3V/mm bzw. 571.1V/mm. Zwischen diesen befindet sich noch eine Äquipotenzialregion (6.8mm). Diese war für frühere Experimente notwendig geworden und wurde nicht entfernt. Durch den geänderten Potenzialgradient sollte es nun möglich sein, aus der Flugzeit den Startort eines jeden Ions festzustellen. Für die Verwirklichung dieses Prinzips ist allerdings die Kenntnis einiger weiterer Daten notwendig.

- Es muss die feldfreie Flugstrecke möglichst exakt bekannt sein.
- Das Delay der Laserpulse muss möglichst exakt bestimmt werden.
- Die Potenzialverhältnisse müssen bekannt sein und dürfen keinen Schwankungen unterliegen.
- Unterschiede in den Quellendurchquerungszeiten zwischen positionierten Neutrals und prompten Ionen müssen berücksichtigt werden.
- Die Nachbeschleunigung durch das Detektorfeld muss berücksichtigt werden.

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Zur Bestimmung der feldfreien Flugstrecke wurden aus mehreren Messserien mit Dithranol, das relativ dünn und homogen auskristallisiert (vgl.5.3), die Minima der Flugzeiten bestimmt. Dem lag die Überlegung zu Grunde, dass die registrierten Ionen möglichst nahe am Repeller gestartet wären. Sie hätten somit nahezu die volle potenzielle Energie des E-Feldes erfahren. Hierin liegt ein Unsicherheitsfaktor, der noch nicht ausgeglichen werden konnte. Etwaige Unebenheiten des Probenträgers und die Probendicke von Dithranol verfälschen den Wert der Flugstrecke. Dieser Fehler kann nur abgeschätzt werden, da weder die Probendicke noch der individuelle Abstand der Probenträgeroberfläche von der Repelleroberfläche bekannt ist. Wird eine beispielhafte Rechnung mit identischen Parametern, aber einem geschätzten Abstand von 0.05mm in Flugrichtung durchgeführt, so wird ein Wert von 2.015m für das Flugrohr erhalten. Dieser liegt um 28mm unter dem aus vorherigen Berechnungen erhaltenem Wert von 2.043m. Letzterer konnte mit Daten einer CCA-Probe, ebenfalls homogen auskristallisierend, auf 1mm genau reproduziert werden.

Zur möglichst genauen Bestimmung des Delays wurden die Pulse beider Laser über Photodioden registriert und an einem weiteren Oszilloskop (Tektronix, TDS 520A) detektiert. Dies war insbesondere für den N₂-Laser von Bedeutung, da hier der Jitter der Laser zueinander bedeutend höher war (vgl.5.1.3). Um die Auswirkungen des Laserjitters auf die Positionierungsbestimmung zu vermindern, wurde für jede Messserie ein gemittelter Ort aus allen Einzelmessungen berechnet. Weiterhin wurden diese Berechnungen ggf. für weitere detektierte Spezies durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Mit diesem Mittelwert wurden die Abstandberechnungen durchgeführt.

Die verwendeten Netzgeräte besitzen eine integrierte Spannungs- und Stromanzeige. Deren Genauigkeit wurde mit einem Hochspannungsmesskopf Voltcraft HVP-40 und einem Keithley Multimeter 2000 überprüft. Die ausgegebene Spannung variiert nur um $\pm 1V$. Nach einer Aufwärmzeit von 20min zeigen die Anzeigen der Netzteile die anliegende Spannung zuverlässig an. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Werte durch Ein- und Ausschalten des Netzteils nicht verändert werden. Somit wurden alle Messreihen unter identischen Bedingungen vorgenommen, solange die Spannungswerte oder die Geometrie der Quelle nicht verändert wurden. Solche Änderungen wurden bei den im Folgenden dargestellten Messungen nicht vorgenommen.

Die detektierten ionisierten Teilchen weisen unterschiedliche Massen auf. Daher ergeben sich für jede Spezies verschiedene Geschwindigkeiten im MS. Der beschleunigende Einfluss der E-Felder muss daher individuell nachvollzogen werden. So müssen sowohl

die Nachbeschleunigungsstrecke vor dem Detektor als auch die Quellendurchquerungszeit berücksichtigt werden.

Eine weitergehende Beschreibung dieses Verfahrens erfolgt im Anhang B.1.

5.3. Abtastung der Probenoberfläche

Um den Fehler in der Abstandsbestimmung zu minimieren, wurden die Proben der jeweils verglichenen Serien auf einem Probenträger präpariert. Weiterhin wurden Anstrengungen unternommen die Probendicke zu untersuchen. Von Dipl. Chem. Dirk Walbrodt wurden zahlreiche Untersuchungen mit Atomic Force Microscop (AFM), Environmental Scanning Electron Microscop (ESEM) sowie Lichtmikroskopen unternommen. Der Messbereich aller Methoden erwies sich nicht geeignet bzw. es konnte lediglich eine Aufsichtaufnahme erstellt werden.

Aufgrund der LIF erweist sich auch das LaserScanningMicroscop als nur bedingt geeignet. Hier müssen aufwendige Rechenverfahren eingesetzt werden, um diese Störungen zu eliminieren.*

Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Untersuchung mittels Elektronenrastermikroskop. Hierzu müsste die Probe mit Au bedampft werden. Dies konnte bisher noch nicht realisiert werden (s.a. Abschn.7).

All diese Verfahren können allerdings nur Anhaltswerte liefern, da bisher jede Probe individuelle Oberflächencharakteristika aufwies. Lediglich die standardisierte Präparation in einer gleichbleibenden Atmosphäre (wie z.B. in einer Glov-Box) unter jeweils identischen Bedingungen kann hier Verbesserungen erbringen. Zwar werden für einige Matrices Spray-Techniken mit erhitzten Probenträgern eingesetzt, jedoch besitzen die so erzeugten Proben nicht die nötige Mächtigkeit der Probenschicht, um längeren Messungen unter den hier angewandten Bedingungen standzuhalten. Derzeit werden von Dipl. Chem. Dirk Walbrodt Untersuchungen an Probenpräparationen unter quasistandardisierten Bedingungen in einem Exsikkator unternommen. Hierbei wird ein Molsieb (Porengröße 3\AA) eingesetzt, um die Lösungsmittelsättigung der Atmosphäre herabzusetzen. Ein wichtiger Parameter, die Temperatur, wird jedoch bislang nicht weiter berücksichtigt. Erste Ergebnisse deuten auf ein minimal verändertes Kristallisationsverhalten zu feineren, längeren

*Vielen Dank an Dipl. Phys. J. Schwänzel, Tech.-Fak. der CAU zu Kiel, für die Bemühungen. Leider reichten die Ergebnisse nur für eine qualitative Aussage per email. Daraufhin wurden die Experimente eingestellt.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Nadeln hin. Da diese häufig in Richtung der Flugachse hochstehen, und somit der Startpunkt der Neutralen nicht festgelegt ist, kann eine wirkliche Verbesserung bisher nur in der Reproduzierbarkeit gesehen werden. Sollte es gelingen, die Probenbedingungen günstiger zu gestalten, kann der recht hohe Probenausschuss so in Zukunft vermieden werden.

Auch hier ist also ein Verfahren wünschenswert, mit dem die Oberfläche zum Zeitpunkt der Ablation festgestellt werden kann. Die Flugzeit bietet hier wieder einen Ansatzpunkt. Die in den Abschnitten 5.2 und B.1 vorgestellten Verfahren können dazu übernommen werden. Für die prompten Ionen gelten jedoch etwas andere Startbedingungen. Das „onset“ der Ionisation wurde aus Werten von Vertes et al.⁵³ aus 2-Pulsexperimenten übernommen. Je nach Matrix wird eine maximale Ionenbildung nach 2 bis 10ns vorgefunden. Dieser onset wurde bei den Berechnungen berücksichtigt. Bis zu diesem Zeitpunkt fliegen die Teilchen mit der Neutralengeschwindigkeit. Aus ersten Geschwindigkeitsverteilungen konnte hier ein Initialwert festgelegt werden. Diese Initialgeschwindigkeit muss sowohl bei der Berechnung der Durchquerungszeit und der Endgeschwindigkeit nach dem ersten Abschnitt berücksichtigt werden (vgl.B.1).

Im Gegensatz zu den Berechnungen des Postionisationsortes muss ein Laserjitter nicht berücksichtigt werden. Für die Triggerung des aufzeichnenden Oszilloskops ist der jeweilige Desorptionslaserpuls maßgeblich. Aus dem gemittelten Postionisationsort und dem individuellen Desorptionsort kann also die jeweils zurückgelegte Strecke berechnet werden. Somit fließt auch die Oberflächenbeschaffenheit der jeweiligen Matrix mit ein.

5.3.1. Probendicke

Das in Abschn.5.3 gezeigte Verfahren, den individuellen Ablationsort zu berechnen, bietet neue Möglichkeiten zur Abschätzung der Probendicke. Auf die Flugzeiten wirken sich allerdings die Inhomogenität der Probe und die des Probenträgers additiv aus. Es kann jedoch ein Vergleich verschiedener Matrizes durchgeführt werden, wenn nur ein Probenträger verwendet wird.

Es konnten für die verschiedenen Matrizes charakteristische Schwankungen der Flugzeiten prompter Ionen festgestellt werden. Je nach Matrix wurden Flugzeitschwankungen von 82 bis 369ns festgestellt (Tab. 5.3). In der Abb.5.2 bzw. Abb.5.3 wurden die Flugzeitschwankungen für eine Ferulaprobe⁷⁰ und eine Dithranolprobe mit Experimentfortschritt dargestellt.

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

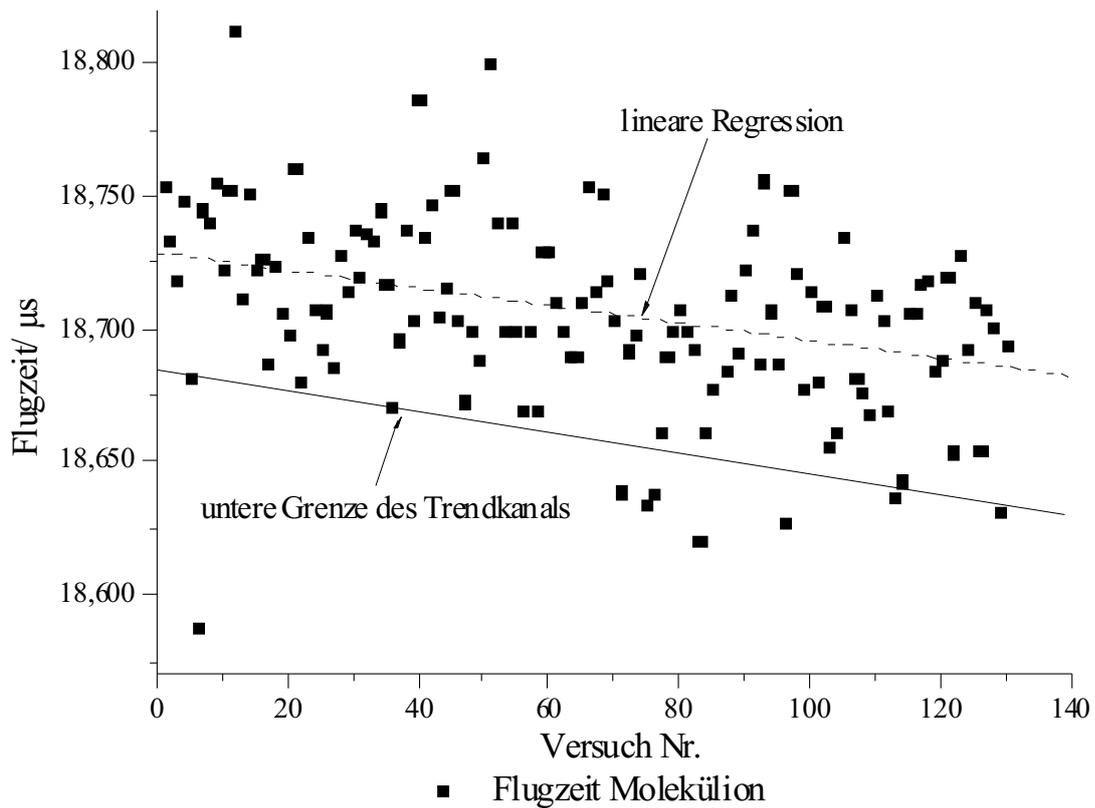


Abbildung 5.2.: Flugzeitveränderung vom FA-[M+H]⁺-Peak mit zunehmendem Probenabtrag.

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

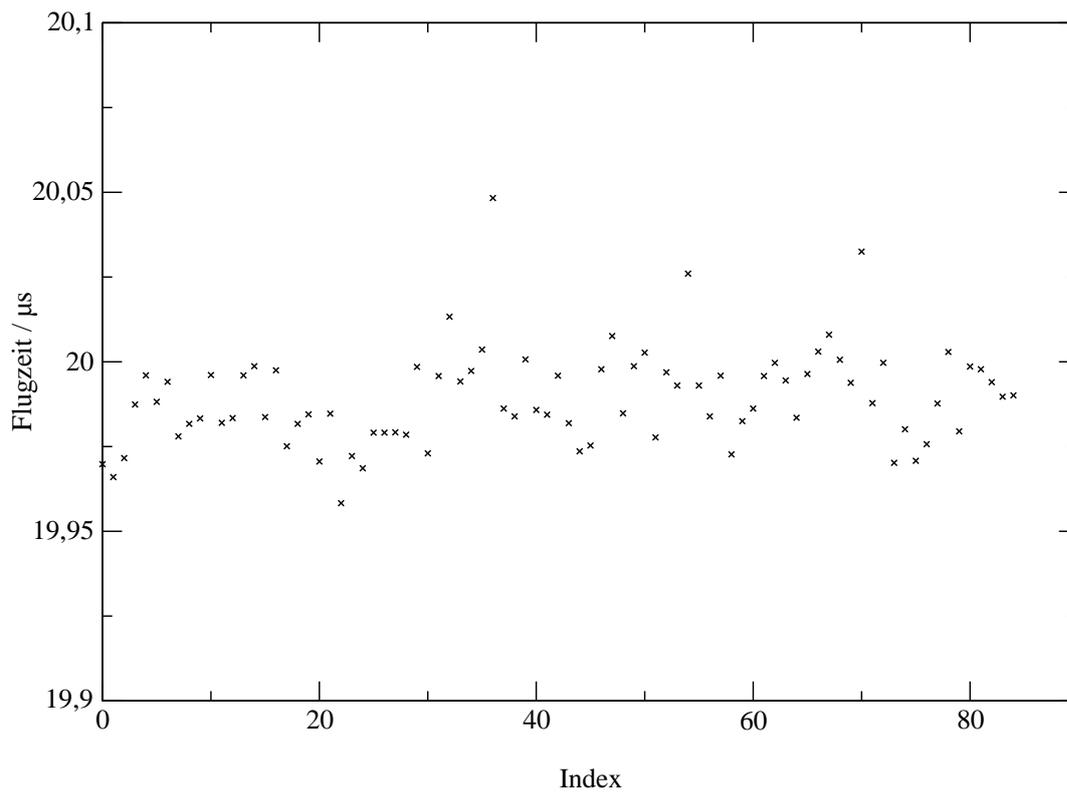


Abbildung 5.3.: Flugzeitvariation vom Dithranol-[M+H]⁺-Peak mit Fortschritt des Experiments.

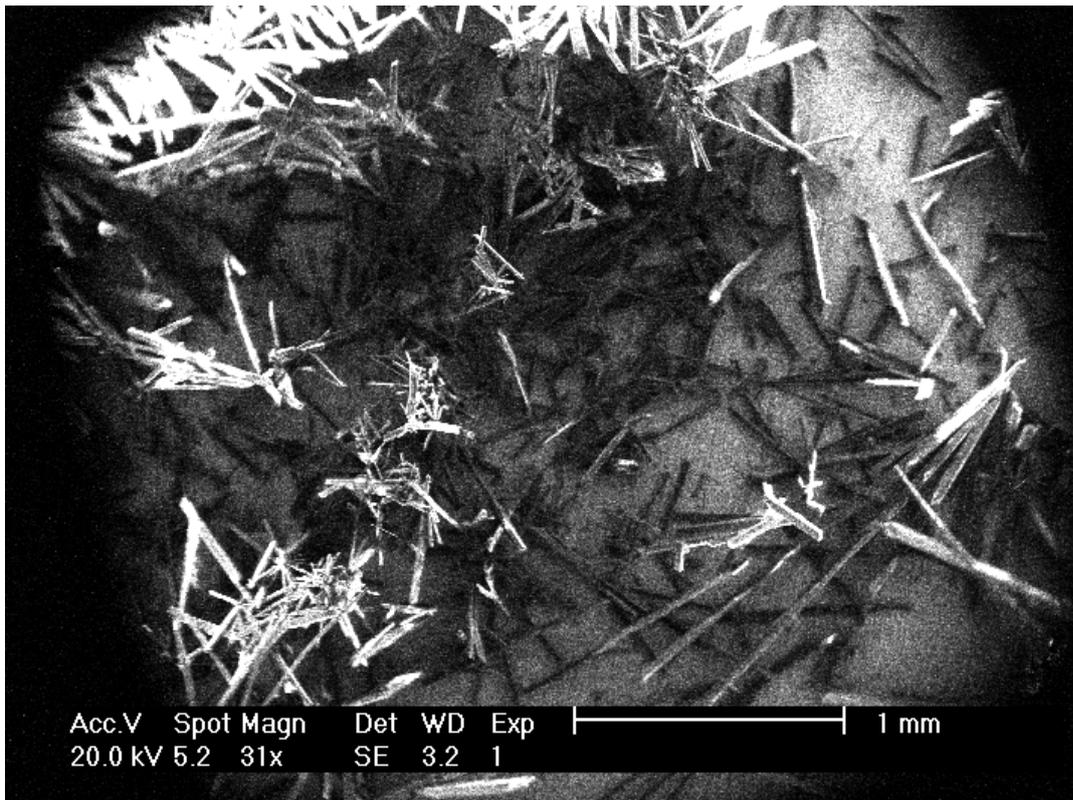


Abbildung 5.4.: ESEM Abbildung einer „dried-droplet“-Probe von Ferulasäure auf einem Stahlprobenträger.

Deutlich sind die wesentlich höheren Schwankungen der Ferulasäure erkennbar. Dies entspricht dem Verhalten einer inhomogenen Probe. Weiterhin wird für FA ein Trend zu immer kürzeren Flugzeiten sichtbar. Dagegen scheint die Begrenzung zu langen Flugzeiten schwächer zu sein. Die untere Begrenzung der Flugzeit wurde kleinen Kristalliten nahe der Probenträgeroberfläche zugeschrieben. Lange Flugzeiten sind eher großen Kristalliten oder Unebenheiten des Probenträgers zuzuschreiben. Zum Vergleich ist in Abb.5.4 eine ESEM-Aufnahme von FA zu sehen.⁷⁰

Die ESEM-Aufnahme einer Dithranolprobe (Abb.5.5)⁷⁰ sieht wesentlich homogener aus. In Übereinstimmung damit wurden weniger und geringere Flugzeitschwankungen prompter Ionen festgestellt. Die hier auftretenden Ausreißer zu hohen Flugzeiten wurden entweder durch den Probenträger oder durch vereinzelt vorhandene Kristallitansammlungen verursacht.

Bei Sinapinsäure wurden Flugzeitschwankungen von 369ns festgestellt. Es ergab sich daraus eine Ablationsortänderung von maximal 0.89mm. Dieser Wert erscheint un-

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

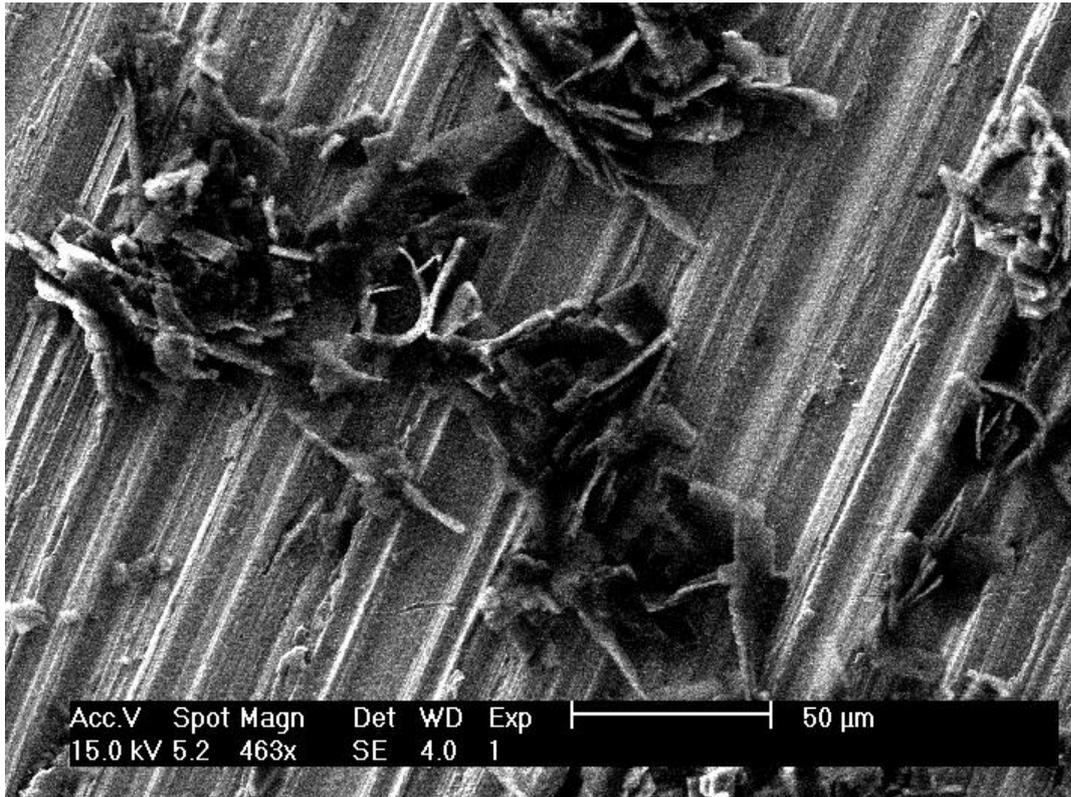


Abbildung 5.5.: ESEM-Aufnahme einer „dried-droplet“-Probe von Dithranol auf einem Stahlprobenträger.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Matrix	Masse(M+H) ⁺ / Da	Flugzeit -schwankung / ns	Distanz- schwankung / mm
Dithranol	227	82	0.21
DHB	155	135	0.33
FA	195	127	0.35
SA	226	369	0.89

Tabelle 5.3.: Flugzeit- und Distanzschwankungen der verschiedenen Matrizes.

gewöhnlich hoch, jedoch ist die Probe aus kubischen Kristalliten recht hohen Ausmaßes aufgebaut.* Rein visuell scheinen solche Proben eine maximale Dicke von mehr als einem Millimeter aufzuweisen. Somit erscheinen die berechneten Werte von ca. 0.9mm glaubwürdig. Berücksichtigt werden muss, dass es sich hierbei um additive Werte aus Proben- und Probenträgerunebenheiten handelt. Jedoch wurden für die abgebildete Tabelle Flugzeiten von Proben herangezogen, die auf einem bestimmten Probenträger präpariert wurden. Aus diesen Daten kann nun ein Relativbezug hergestellt werden. Eine DHB-Probe ist im Mittel mindestens 0.12mm dicker als eine Dithranol-Probe. Ferulasäure weist eine um 0.14mm und Sinapinsäure eine um 0.68mm größere Mächtigkeit der Probenschicht auf.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der visuellen Einschätzung der Probenbeschaffenheit. Hier zeichnet sich Dithranol durch feinkristalline Proben, DHB durch mikrokristalline und FA und SA durch sehr grobkristalline bzw. von langen z.T. hochstehenden Nadeln durchsetzte Proben aus. Ebenso wird die gleiche Entwicklung der Probendicke durch Abschätzungen aus ESEM-Bildern erhalten.⁷⁰

5.4. Geschwindigkeitsverteilungen verschiedener Matrizes

Zur Akquisition der Postionisationsspektren wird ein gewöhnliches Flugzeitmassenspektrum aufgezeichnet. Gestartet wird die Akquisition durch den Ablationslaser. In Abb.5.6 wird ein solches Flugzeitspektrum von 2,5-DHB gezeigt. Neben dem Molekülpeak bei 155Da ist noch ein Fragmentpeak bei 137Da erkennbar. Dies entspricht dem $[M + H]^+$ -

*Die Probe ist vergleichbar mit der Schicht aus einem Würfelzucker.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

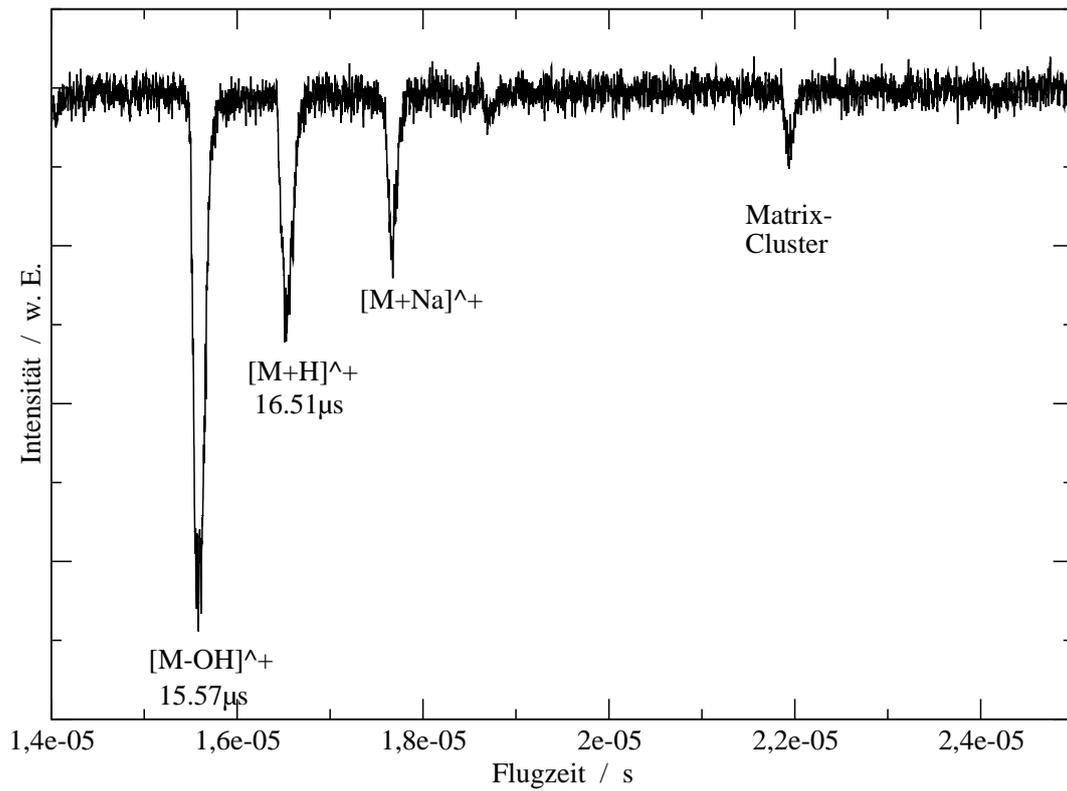


Abbildung 5.6.: Flugzeitspektrum von 2,5-DHB.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

und dem $[M - OH]^+$ -Peak. Das schlechte Auflösungsvermögen wird im Wesentlichen durch zwei Faktoren bestimmt. Ohne das PSPF wird weder eine Korrektur der Zeit- noch der Geschwindigkeits- und Energieunschärfe vorgenommen. Der zweite Faktor ist die limitierte Korrektur der Ortsunschärfe. Um sowohl Ablations- als auch Postionisationsort bestimmen zu können, wird ein fast linearer Potenzialgradient in der gesamten Quelle verwendet (vgl. 5.2.2 und 5.3). Die hier gezeigten Spektren sind bezüglich des Detektor-Offsets korrigiert (Basislinienkorrektur). Zur Glättung wurde eine Mittelung über 5 Messpunkte, die einen Abstand von jeweils 1ns aufwiesen, durchgeführt. Eine Inversion wurde dagegen nicht vorgenommen. Für die spätere Auswertung ist lediglich die jeweilige Peakposition und der Betrag der Fläche von Interesse. Zur Postionisation wird zeitgesteuert an einem bestimmten Ort durch einen weiteren Laser eine Photoionisation (vgl. 2.2.1) hervorgerufen. In den aufgezeichneten Spektren werden nicht nur die üblichen MALDI-Peaks, in der Regel $[M + H]^+$, sondern zusätzlich i. allg. Radikalkationen M^+ detektiert. Bei DHB werden z.B. nicht zeitversetzte $\frac{m}{z} = 155$ und $\frac{m}{z} = 137$, sondern $\frac{m}{z} = 154$ und $\frac{m}{z} = 136$ Signale erzeugt. Dies entspricht dem Molekülpeak und einem unter H_2O -Abspaltung entstandenen Fragment. Wird nun die zeitliche Verzögerung verändert, so kann bei feststehendem Ort die Geschwindigkeitsverteilung abgetastet werden (Abb. 5.7). Limitierende Faktoren sind einerseits die Ortsunsicherheit (siehe Ortsbestimmung 5.2) und die Genauigkeit der Lasersynchronisation (Jitter). Das denkbare inverse Vorgehen, die Variation der Strecke bei festem Delay, kann nur zur partiellen Reproduktion der Geschwindigkeitsverteilung dienen. Dies begründet sich in der groben Rasterung und unzureichenden Genauigkeit der Ortseinstellung. Die Versuche dahingehend wurden eingestellt. Sinnvolle Abstufungen hätten 0.2mm oder mehr betragen, da der Laserspotdurchmesser bereits eine Ausdehnung von 0.1mm aufwies. Andererseits sind der Verschiebbarkeit des Postionisationsortes Grenzen gesetzt. Bei Abständen größer 2.0mm konnten keine Signale mehr detektiert werden. In Bereichen zwischen 1.8 und 2.0mm war nur bei DHB und wenigen Delayeinstellungen noch ausreichend Signalintensität vorhanden. Bei anderen Matrices wurden bei diesen Abständen kaum Signale gefunden. Hinsichtlich der weitesten auswertbaren Entfernung vom Ablationsort wurde für die verwendete Laserjustage 1.45mm eingesetzt (optisch bestimmt). In die andere Richtung, zum Repeller, wurde der Einsatzbereich durch das Auftreffen des Postionisationslasers auf eben diesen festgelegt. Dieses induzierte starke Störsignale durch photoelektrische Effekte. Eine Auswertung des Massenspektrums war dann nicht mehr möglich. Die Breite des Laserstrahls vor der Fokussierung (ca. 2-2.5mm) führte zu einem

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

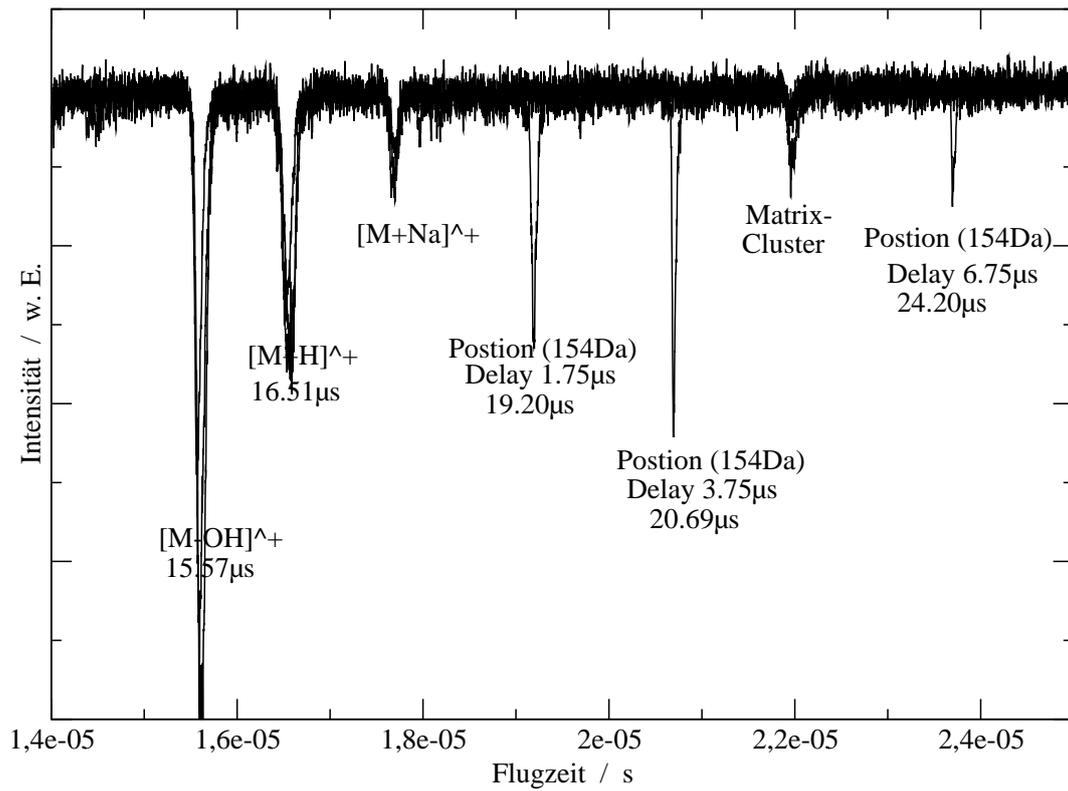


Abbildung 5.7.: Flugzeitspektrum von DHB mit Postionisation zu drei verschiedenen Zeitpunkten.

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Strahlkegel. Dieser berührte den Repeller, wenn der Fokuspunkt entlang der Flugachse noch einen Abstand von ca. 0.8mm vom Repeller aufwies. Leichte Störsignale waren bereits ab 1.0mm Abstand feststellbar. Hierbei streiften vermutlich bereits schwächere Randbereiche des Laserstrahls den Repeller.

Der maximal nutzbare Entfernungsbereich lag daher zwischen 1.0 und 2.0mm. Zusammen mit dem Laserspotdurchmesser ergaben sich also nur höchstens 5 unterschiedliche Positionen, an denen der Plume abgetastet werden konnte. Eine weitere Einschränkung, die auf die in Abschn.5.6 dargestellte Abstandsabhängigkeit Einfluss hat, war die Justage des Positionierungslasers. Der unsichtbare Plume sollte möglichst mittig getroffen werden. Dazu wurde bei maximalem Abstand auf maximale Intensität justiert. Leistungsschwankungen des Positionierungslasers konnten dabei nicht berücksichtigt werden. Diese können erst bei der rechnerischen Auswertung erfasst werden. Naturgemäß unterlagen die Positionierungssignale großen Schwankungen. Als Richtlinie für das Delay wurden Werte aus anfänglichen Voruntersuchungen genommen. Des Weiteren wurde versucht, das minimale Delay bei maximalem Abstand zu finden. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die schnellsten Moleküle detektiert werden. Diese sollten sich in der Mitte des Plumes befinden.

Problematisch u.a. war der Aufbau der Quelle. Die Elektrodenanordnung wurde analog optischen Haltern durch eine Dreipunkt-Lagerung gehalten. Sie konnte daher in zwei Richtungen verkippt werden und wurde auf maximales MS-Signal einjustiert. Nun wurde der Probenträger nicht mittig getroffen (s.Abb.A.1), sondern in der Randzone. Die Begründung hierfür lag in dem Probenabtrag. Würde der Probenträger mittig getroffen, so wären nur wenige MS-Spektren von einer Probe möglich. Daher traf der Ablationslaser ca. 3mm vom Mittelpunkt entfernt auf die Probe. Dies ermöglichte eine recht lange Ausnutzung der Probe. Andererseits musste die Ausrichtung der Quellregion angepasst werden, um den Detektor optimal zu treffen. Probenoberfläche und TOF-Achse standen also nicht mehr orthogonal zueinander.

Ein weiterer Aspekt liegt möglicherweise in der Plumeentwicklung. Es gibt Hinweise, dass die Hauptausbreitungsrichtung nicht orthogonal zur Probenoberfläche erfolgt, sondern der Plume leicht in Richtung Laser geneigt ist. Die Experimentbedingungen wurden so gewählt, dass diese Effekte sich ggf. ausgleichen. Ihr Einfluss kann aber nicht abgeschätzt werden.

Die Konsequenz einer möglichen Abweichung der Plumeachse von der Parallelität zur TOF-Achse ist, dass bei oben beschriebener Justage des Positionierungslasers und

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

anschließender Verringerung des Abstandes nicht mehr die innere Plumeregion, sondern Randbereiche abgetastet werden. Diese enthalten eher die langsamen Moleküle. Zudem ist die Ausbildung dieser Randzone evtl. matrixabhängig. Stark ablatierende Matrizes sollten eine engere Winkelverteilung hervorrufen. Gerade bei diesen werden die Plumerandzonen besonders langsame Moleküle enthalten.

Es war nicht möglich, diese Effekte zu berücksichtigen oder zu korrigieren. Die dafür notwendigen Ergebnisse konnten erst nach der Auswertung mehrerer Matrizes erhalten werden. Andererseits hat sich die Justage mehrfach als anfällig erwiesen. Sowohl etwaige Wartungen an dem Positionierungslaser als auch andere unglückliche Umstände führten dazu, dass Messreihen nicht mehr untereinander vergleichbar waren. Daraufhin wurden alle hier vorgestellten Messungen en bloc vorgenommen. Das heißt die Laserjustagen, inkl. aller Umlenkoptiken, wurden einmal hergestellt und nicht mehr verändert. Leistungsschwankungen des Positionierungslasers wurden in Kauf genommen und weitestgehend durch die Gewichtung mit den registrierten Detektorwerten ausgeglichen. Die Strahlage des Positionierungslasers wurde mittels zweier Aperturen (Pinholes) vor jeder Messreihe überprüft. Die Strahlage wurde allenfalls durch das im MOPO integrierte Pellim-Broka-Prisma (PB-Prisma) angeglichen.* So konnte eine gewisse Vergleichbarkeit der Matrizes untereinander, mit obigen Einschränkungen bezüglich der Randzone des Plumes, erreicht werden. Insbesondere hinsichtlich dieser Aspekte werden Verbesserungen durch die derzeit begonnenen, im Abschn.7 vorgestellten Umbauten erhofft. Im Folgenden werden die Geschwindigkeitsverteilungen der einzelnen Matrizes bei Ablation mit 355nm und 337nm besprochen. Dies sind die beiden gebräuchlichsten Wellenlängen für UV-MALDI-Analysen. Nicht alle Matrizes lassen sich bei allen Wellenlängen einsetzen. So kann CCA nicht mit 355nm, Dithranol dagegen nicht mit 337nm verwendet werden. Dies ist für CCA, wo Festkörperabsorptionsspektren bekannt sind, insoweit überraschend, da beide Anregungswellenlängen in der gleichen Absorptionsbande liegen. Für 355nm wird sogar ein höherer Absorptionskoeffizient gefunden.²⁰

Für die kommerzielle MALDI sind diese Wellenlängen ebenfalls gut geeignet. Sie sind verhältnismäßig kostengünstig durch kleindimensionierte Nd:YAG- bzw. durch Stickstoff-Gaslaser bereitstellbar. Bei ersteren werden mit Verdoppler-(SHG) und Verdreifacher-

*Der Ausgleich des Strahlversatzes von den Verdoppler-Kristallen (FDO-Cryst) ist u.a. temperaturabhängig. Des Weiteren zeigen die verwendeten Schrittmotoren eine Ungenauigkeit von 9 Schritten. Daher wurde bei jeder Inbetriebnahme des Systems der FDO-Cryst und das PB-Prisma von einer Seite an die optimalen Werte herangefahren.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Kristallen (THG) 355nm aus der fundamentalen IR-Strahlung erzeugt. Dies ist heutzutage mit kleinen Aufbauten möglich. Zusätzlich bieten YAG-Laser den Vorteil, dass im Idealfall nur die vergleichsweise günstigen Blitzlampen in regelmäßigen Abständen zu tauschen sind. Der Einsatz von Diodenarrays als Pumpquelle ist derzeit noch nicht stark verbreitet.

Vereinzelt werden auch 266nm angewendet. Diese Wellenlänge, für die ein weiterer SHG anstatt des THG benötigt wird, stand zur Experimentierzeit nicht zur Verfügung. Derzeit wird diese Option nachgerüstet. Anstelle dessen wurden bei DHB einige Experimente mit 270nm aus einem Farbstofflaser durchgeführt. Die Ergebnisse lassen eine Population des S_2 -Zustandes vermuten. Dieses wurde bei den Ionisationsmechanismen bereits postuliert (vgl. 3.1). Die Geschwindigkeitsverteilungen der einzelnen Matrizes werden allesamt in der gleichen Art dargestellt. Die Datenpunkte werden durch ein „x“ repräsentiert. Ein Fit mit einer verschobenen Maxwell-Boltzmann-Verteilung (vgl. Abschn.5 und Gl.5.3) wird durch eine durchgezogene Linie und ein Fit, der eine Schar von Strömungsgeschwindigkeiten berücksichtigt (vgl. Gl.5.6), durch eine unterbrochene Linie dargestellt.

5.4.1. Ferulasäure

Ferulasäure, ein Zimtsäurederivat, wurde bereits 1991 von Huth-Fehre et al.⁷¹ zu Postionisationsexperimenten verwendet. Hierbei wurden Matrix und eingebetteter Analyt mittels VUV nachionisiert. Im kommerziellen MALDI-Einsatz spielt FA dagegen eine untergeordnete Rolle. Dies liegt vermutlich vor allem am Kristallisationsverhalten. FA bildet lange feine Nadeln, die sich zu einer sehr mächtigen Probe arrangieren. Ein ESEM-Bild einer Probe ist im Abschn.5.3.1 zu finden (man beachte hier insbesondere den Randbereich). Ein weiteres Problem bei der Präparation stellt der Lösungsmiteinschluss dar. Huth-Fehre et al. entdeckten Unterschiede bei einer 3 Tage i. vac. verbliebenen Probe. In eigenen Experimenten konnte dagegen kein Unterschied festgestellt werden, wenn die Probe zuvor ausreichend getrocknet wurde. Eine Probe wurde bereits am Vortag präpariert und nach einigen Stunden Trocknung an RTemp. über Nacht i. vac. aufbewahrt. Es konnten keine Unterschiede zu Proben festgestellt werden, die lediglich einige Stunden an RTemp. getrocknet wurden. Dagegen traten sehr wohl Unterschiede auf, wenn die Probe nicht ausreichend getrocknet wurde. Trotz der Evaporation des Lsgm. i. Hochvakuum des MS scheinen Reste in der Probe zu verbleiben. Über den Einfluss

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

eingeschlossenen Lsgm. wurde bereits von anderen Gruppen berichtet. Hier wurde das Lsgm. allerdings zur Erklärung von Ionisierungsmechanismen herangezogen. Indes kann eingeschlossenes Lsgm. auch die Ablation beeinflussen. Seine Evaporation kann zur Expansion beitragen und zusätzliche Stoßpartner liefern. Letzteres würde zu einer besseren Kühlung des Ablationsplume führen.

Huth-Fehre et al. fanden bei einer frischen Probe für Matrix und Analyt eine identische Geschwindigkeitsverteilung. Bei Ablation mit 266nm wurde das Maximum der Verteilung bei ca. 400m/s erreicht. Aufgrund der unterschiedlichen Massen wiesen Analyt und Matrix also unterschiedliche Energieverteilungen auf. Analysen mittels angefiteter verschobener Maxwell-Boltzmann-Verteilungen zeigten für den Analyten eine rein thermische Verteilung ($v_{flow} = 0$) mit einer Temperatur von 5179K. Die Verteilung der Matrix konnte einer schwach jetförmigen Expansion mit einer Temperatur von 734K und einer Flussgeschwindigkeit von 65.5m/s zugeordnet werden. Die ältere Probe dagegen zeigte eher identische Energieverteilung für Analyt und Matrix. Die Geschwindigkeiten waren unterschiedlich und für die Matrix wurde eine höhere wahrscheinlichste Geschwindigkeit von ca. 650m/s gefunden. Dies wurde einem Übergang zu einer eher thermischen Verteilung zugeordnet. Visuell scheinen die abgebildeten Daten ein etwas anderes Bild zu zeichnen. Die Geschwindigkeit der Matrix nimmt bei der älteren Probe zu, jedoch nimmt die des Analyten eher ab oder bleibt gleich. Es verschiebt sich also die Energieverteilung des Analyten von recht hohen Werten der frischen Probe zu niedrigeren Werten einer gealterten Probe. Die Werte der Matrix werden nur leicht zu höheren Werten verschoben. Dies könnte auf einen kompakteren, besser kühlenden Plume bei der gealterten Probe schließen lassen. Die Expansion von evtl. eingeschlossenem Lsgm. scheint sich also eher verschlechternd auszuwirken. Dies entspricht auch experimentellen Erfahrungen.

Ein begünstigender Einfluss der Ablation durch die Evaporation sollte dazu führen, dass weniger Energie benötigt wird. Das Lsgm. ist unter den Hochvac.-Bedingungen nicht stabil und wird, einmal freigesetzt, unmittelbar verdampfen. Ein Herabsetzen der Ablationsschwelle könnte beobachtet werden. Leider liegen dazu keinerlei Untersuchungsergebnisse vor.

In eigenen Experimenten wurde die Ablation von FA mit 355nm und 337nm hervorgerufen. Die Nachionisation wurde mit 260nm bewerkstelligt. Die direkt detektierten MALDI-Ionen sind protonierter Natur. Es werden die Massen 195Da und 177Da als dominierende Peaks vorgefunden. In Abb.5.8 wird ein TOF-Spektrum unter Postionisationsbedingungen gezeigt, also mit limitierter Ortskorrektur der Quelle.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

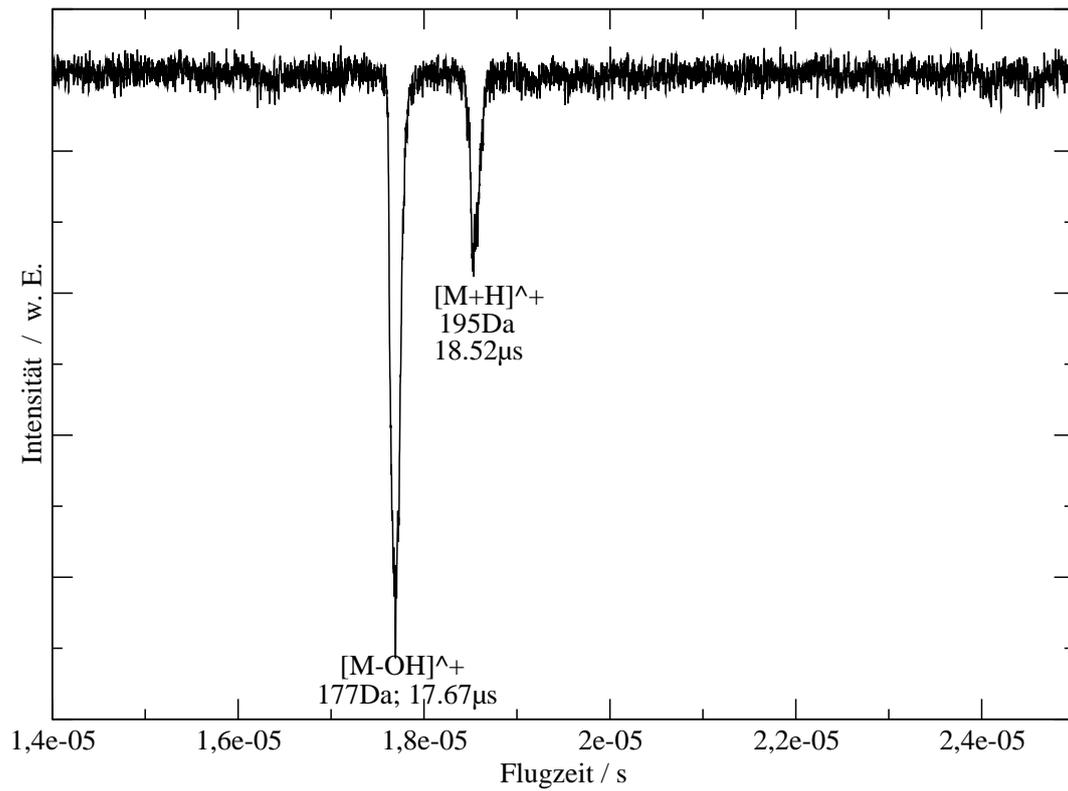


Abbildung 5.8.: Flugzeitspektrum von FA.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Bei einer Ablation mit 337nm wird die Geschwindigkeitsverteilung der Neutralen durch Variation des Delays von $1.1\mu\text{s}$ bis $5.1\mu\text{s}$ in 100ns Schritten analysiert. Dabei wurden mehrere Serien aufgenommen. Für jede Matrix waren es mindestens drei. Bei einer wurde das Delay schrittweise erhöht, bei einer weiteren schrittweise erniedrigt und schließlich Abschnitte von $2\mu\text{s}$ aufgenommen. In diesen Abschnitten wurde ein Postionisationsspektrum aufgenommen, das Delay um 100ns verändert, ein Postionisationsspektrum aufgenommen, das Delay um $1\mu\text{s}$ verändert und wieder ein Postionisationsspektrum aufgenommen. Diese Prozedur wurde wiederholt, bis der Abschnitt in 100ns Schritten abgetastet war. Dann wurde eine neuer Abschnitt gewählt und ebenso verfahren. Qualitativ konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Es sollte damit ausgeschlossen werden, dass Hysterese-Effekte durch Abhängigkeiten von Delay oder Probenträgerposition auftraten und sich systematisch in den Ergebnissen niederschlugen.

Trotz der in den vorherigen Abschnitten vorgestellten Gewichtungsmechanismen weisen die Messwerte eine hohe Streuung auf. Dies ist sicher den inhomogenen Probeneigenschaften zuzuordnen. So sind Abhängigkeiten der Plumeexpansion von der Ausrichtung der Kristalloberflächen möglich. Des Weiteren wirken sich jegliche Schwankungen vermutlich besonders stark auf die Randzone des Plumes aus. Wie zuvor bereits angemerkt, kann sich hier eine Photoionisation entfernt von der Plumemitte nachteilig auswirken.

In Abb.5.9 werden die gefundenen Signalintensitäten der Postionisation, gewichtet mit Matrixintegral und FDO-Leistung des MOPOs (siehe 5.1.5, 5.3, B.2), gegen die berechneten Geschwindigkeiten aufgetragen. Diese ergeben sich aus dem gemittelten Postionisationsort und jeweiligen Ablationsort (vgl.5.2.2, B.1). Ausgewertet wurde das Molekülradikalkation mit einer Masse von 194Da. Ein Fragment-Peak bei 176Da trat nur unstetig auf. Die Anzahl der verwertbaren Datenpunkte für dieses Signal war gering, eine Auswertung in gleicher Art war daher nicht möglich. FA fragmentiert sehr stark, so dass bei der Auswertung der Matrixintegrale Abweichungen entstehen können. Tendenziell wird die gefundene Signalintensität des Postionisationssignals dann durch einen zu hohen Matrixwert gedämpft. Dominierten die Fragmentpeaks das Matrixintegral, so wurde dieser Datensatz verworfen. Eine weitere Möglichkeit das Matrixintegral zu beeinflussen, besteht in der Sättigung des Detektors durch kurz vorher auftretende starke Fragmentensignale. Ein Postionisationssignal würde dann durch fehlende Dämpfung stärker berücksichtigt.

Das Maximum der Verteilungsfunktion (verschobene MB-Verteilung) wird bei der

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

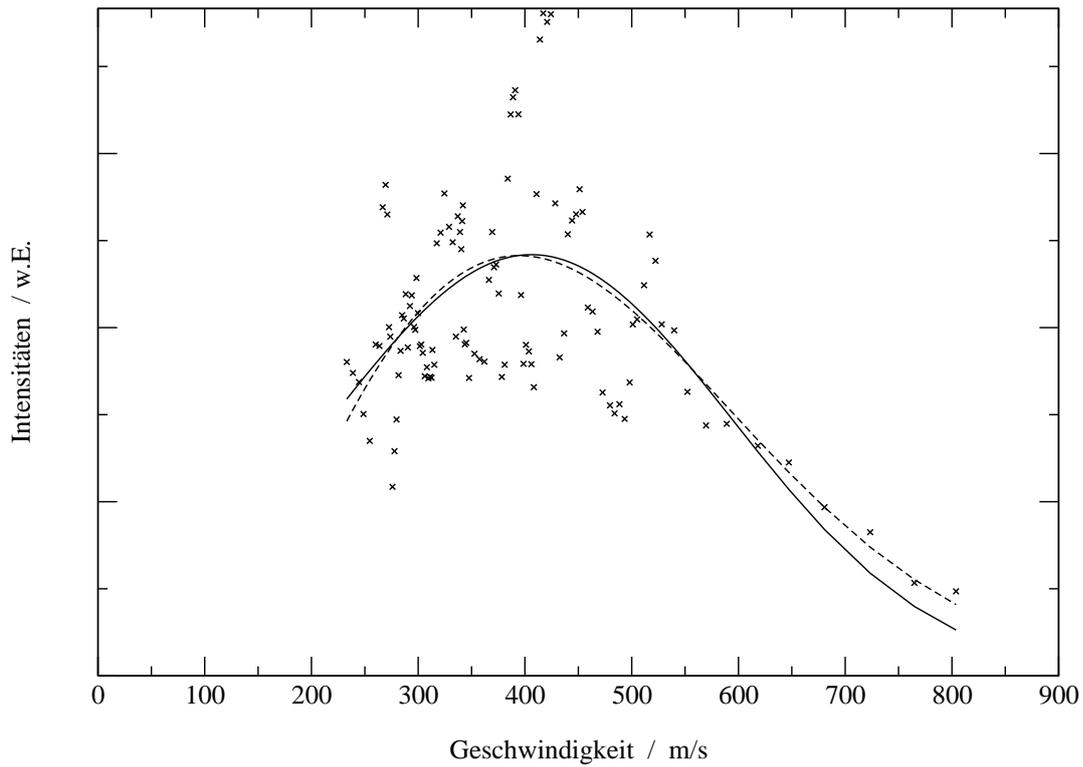


Abbildung 5.9.: Geschwindigkeitsverteilung des Ferulasäuremoleküls bei einer Ablation mit 337nm. Mittlere durchflogene Strecke 1.1mm.

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Ablation mit dem Stickstofflaser bei 406m/s gefunden. Der Fehler beträgt 38m/s bezüglich des Geschwindigkeitswertes. Dieser setzt sich zusammen aus einem ortsabhängigen, dominanten Anteil (36m/s, vgl.B.1) und einem zeitabhängigen Anteil. Dieser macht nur 2m/s vom Fehlerwert aus.*

Aus der Fitfunktion, die durch die starke Streuung der Messwerte einen Korrelationskoeffizienten von 0.62 aufweist, können weitere Werte entnommen werden. So wird dieser Fit bei einer Temperatur von 833K und einer Flussgeschwindigkeit von 406m/s gefunden. Aus einem Fit mit einer Schar von Strömungsgeschwindigkeiten (Korrelationskoeffizient 0.61) werden eine wahrscheinlichste Geschwindigkeit von 394m/s, eine maximale Strömungsgeschwindigkeit von 253m/s und eine Plume-Temperatur von 1547K erhalten.

Das Maximum der verschobenen MB-Verteilungsfunktion liegt in etwa bei dem Wert, den auch Huth-Fehre et al. bei einer frischen FA-Probe finden.⁷¹ Dieser wurde von ihnen jedoch bei der Ablation mit 266nm erhalten. Da die verwendeten Proben verhältnismäßig lange getrocknet wurden, ist ein Vergleich eher mit jenen Werten der drei Tage alten Proben vorzunehmen. Hier wird die wahrscheinlichste Geschwindigkeit bei ca. 650m/s vorgefunden. Absorptionsuntersuchungen von Allwood et al.^{20,21} legen nahe, dass mit 266nm der S₁-Zustand von FA populiert wird. Es kann daher vermutet werden, dass mehr Energie in der Probe umverteilt wird, wenn eine Anregung mit 266nm erfolgt. Dies sollte sich in einer Zunahme der Ablationsgeschwindigkeit äußern.

Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurden weitere Untersuchungen mit 355nm unternommen. Die Abb.5.10 zeigt die erhaltenen Ergebnisse und die angepasste Fitfunktion. Die Zunahme der Streuung hat zweierlei Ursachen. Zum einen weist das Strahlprofil des DCR-11-Lasers weniger Homogenität als das des Stickstofflasers auf, zum anderen ist die Gesamtintensität der ablatierten Teilchen geringer.

Hier zeigte sich eine Verschiebung zu noch niedrigeren Geschwindigkeiten. Das Maximum der verschobenen Maxwell-Boltzmann-Verteilung wurde, wie auch die Strömungsgeschwindigkeit, bei 279m/s (± 21 m/s) gefunden.[†] Der Temperaturwert bei diesem Fit lag bei 1347K. Dies entspricht dem 1.7fachen der Plumetemperatur bei einer Ablation

*Der Ortsfehler schlägt sich durch den Laserjitter vornehmlich im Positionierungsort nieder. Aufgrund der präzisen Potenziale ist der Fehler des Ablationsortes vergleichbar gering (vgl.B.1).

[†]Die Fehlerwerte sind hier beispielhaft für FA berechnet worden. Sie beziehen sich auf den Fehler der Geschwindigkeitsberechnung. Ein Intensitätsfehler ist nur schwer abschätzbar. Da die Fehlerwerte lediglich von der Lage des Verteilungsmaximums abhängig sind, wird bei folgenden Darstellungen auf die Angabe verzichtet.

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

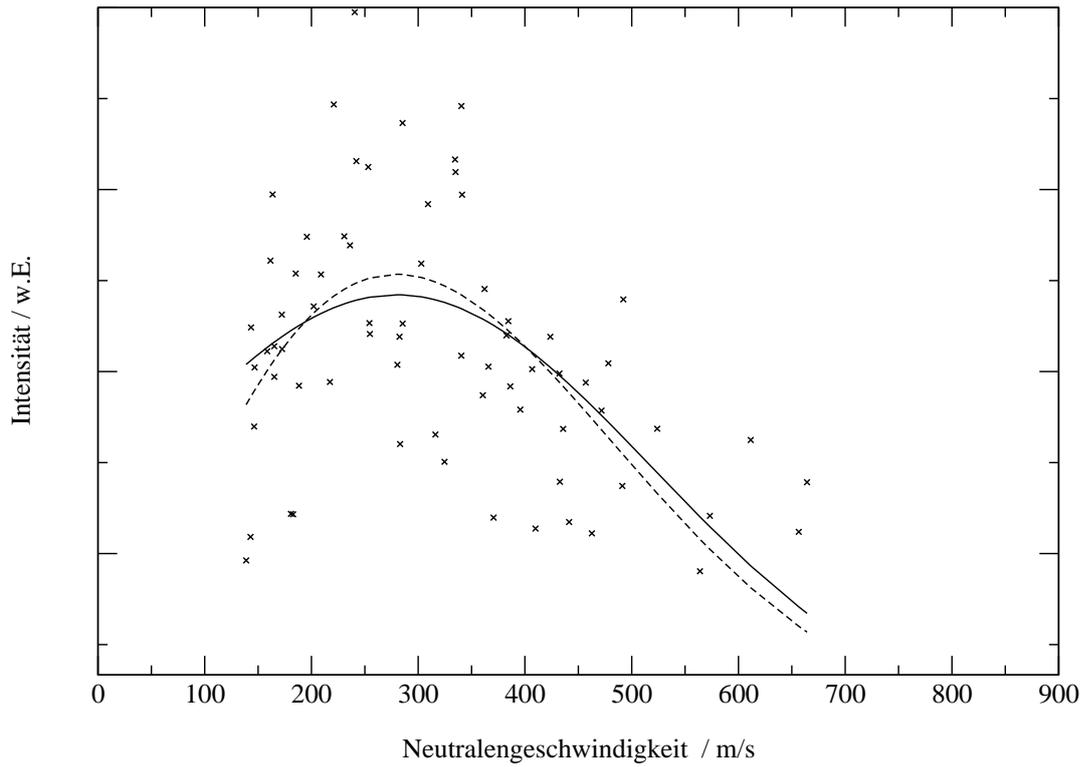


Abbildung 5.10.: Neutralengeschwindigkeiten der Ferulasäure bei einer Ablationswellenlänge von 355nm (mittlerer Abstand 1.24mm).

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

mit 337nm. Aus einem Fit mit einer Schar von Strömungsgeschwindigkeiten (Korrelationskoeffizient 0.55) werden eine wahrscheinlichste Geschwindigkeit von 280m/s, eine maximale Strömungsgeschwindigkeit von 7m/s und eine Plume-Temperatur von 1778K erhalten. Huth-Fehre et al. geben leider nur Temperaturwerte für eine frische Probe an. Diese lagen bei 734K für eine verschobene Maxwell-Boltzmann-Verteilung und bei 930K für eine rein thermische Verteilung. Für jetähnliche Verteilungen wäre also mit Abnahme der Ablationwellenlänge eine Abnahme der Temperatur im Plume anzunehmen. Da die Daten aber nicht einem Experiment entstammen, ist dies allenfalls als Hinweis tauglich. Bei der Betrachtung der anderen Matrizes werden Ablationen mit 355nm und 337nm jeweils gegenübergestellt.

5.4.2. 2,5-Dihydroxybenzoesäure

Eine der gebräuchlichsten MALDI-Matrizes stellt 2,5-Dihydroxybenzoesäure dar. Erstaunlicherweise stellen die Isomere der Verbindung eher schlechte Matrizes dar. Dies stützt Ionisierungsmechanismen ausgehend vom Proton der ortho-ständigen Hydroxylgruppe. Diese sind bei 2,5-DHB begünstigt. Unterschiede in den Sublimationsenthalpien der Isomere und sich daraus ergebende Unterschiede während der Ablation werden kontrovers diskutiert.^{72,18}

DHB gehört zu den Matrizes, die in guter Ausbeute protonierte Signale liefern. In Übereinstimmung damit ist das dominierende Signal des Matrix-Flugzeitspektrums der MH^+ -Peak. DHB wird als mittelstark ionisierend von Knochenmuss eingestuft.²⁴ Verwendung findet sie vor allem für kleinere Proteine und Peptide. Diese werden durch DHB leicht protoniert. Bei größeren dagegen werden häufig nur Fragmente vorgefunden. Dies spricht dafür, dass es nicht zu einer ausreichenden Kühlung kommt. Ein Hinweis stellt der Stokes-Shift dar. In den vorgestellten LIF-Spektren weist DHB die kleinste Rotverschiebung auf. Die Energieumverteilung liefert also möglicherweise nur verhältnismäßig wenig Energie für die Ablation. Erwartet wurden daher niedrige Werte für die Geschwindigkeiten.

Tatsächlich zeigen die unter Ablation mit 337nm erlangten und in Abb.5.11 dargestellten Messwerte im Vergleich zu FA eine Verschiebung zu niedrigen Geschwindigkeiten. Das Maximum der Verteilung wird bei 384 m/s erreicht. Für eine verschobene Maxwell-Boltzmann-Verteilung (Korrelationskoeffizient 0.44) ergibt sich eine Plumetemperatur von 187K. Aus einem Fit mit einer Schar von Strömungsgeschwindigkeiten (Korrela-

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

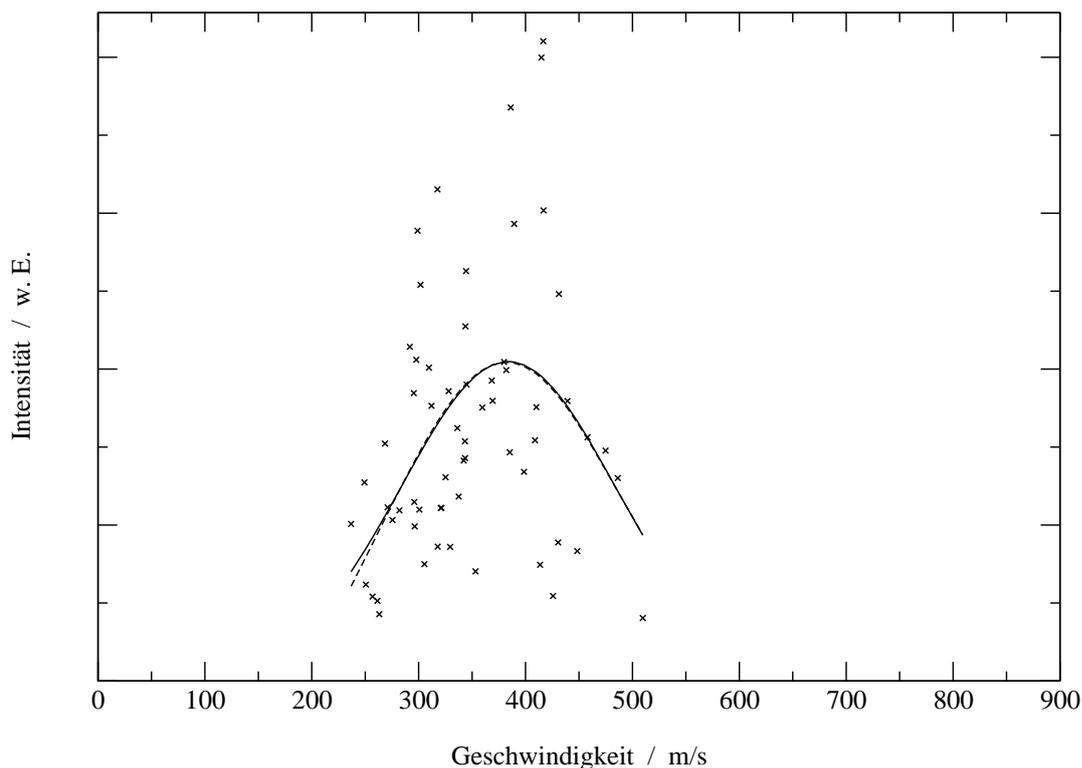


Abbildung 5.11.: Geschwindigkeitsverteilung des DHB-Moleküls bei einer Ablationswellenlänge von 337nm und einem mittleren Abstand von 1.38mm.

tionskoeffizient 0.44) werden eine wahrscheinlichste Geschwindigkeit von 382m/s, eine maximale Strömungsgeschwindigkeit von 382m/s und eine Plume-Temperatur von 194K erhalten. Im Falle einer Ablation mit 337nm kann also kein Hinweis auf eine schlechtere Kühlung gefunden werden. Die Ursache einer starken Fragmentierung von Analyten müsste demnach anders begründet sein.

Überraschenderweise gilt dies nicht für eine Anregung mit 355nm. Zwar zeigt DHB bei 355nm eine Verteilung mit niedrigeren Geschwindigkeiten als bei einer Anregung mit 337nm, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. So wird hier bei 383 m/s das Verteilungsmaximum durchlaufen (Abb.5.12). Dieser Wert liegt zudem deutlich über dem Wert von Ferulasäure bei gleicher Ablationswellenlänge. Eine Erklärung kann die bereits erwähnte, evtl. nicht im Plumezentrum stattfindende Anregung darstellen. Gerade Matrizes, die stark ablativen Charakter besitzen, würden sich durch tendenziell niedrigere Werte in der Randzone bemerkbar machen, da die Expansion immer jet-ähnlicher wird (vgl.3.2). Diese Argumentation würde aber wegen der wachsenden Geschwindigkeiten erwarten lassen, dass dieser Effekt bei 337nm ausgeprägter vorgefunden würde als bei

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

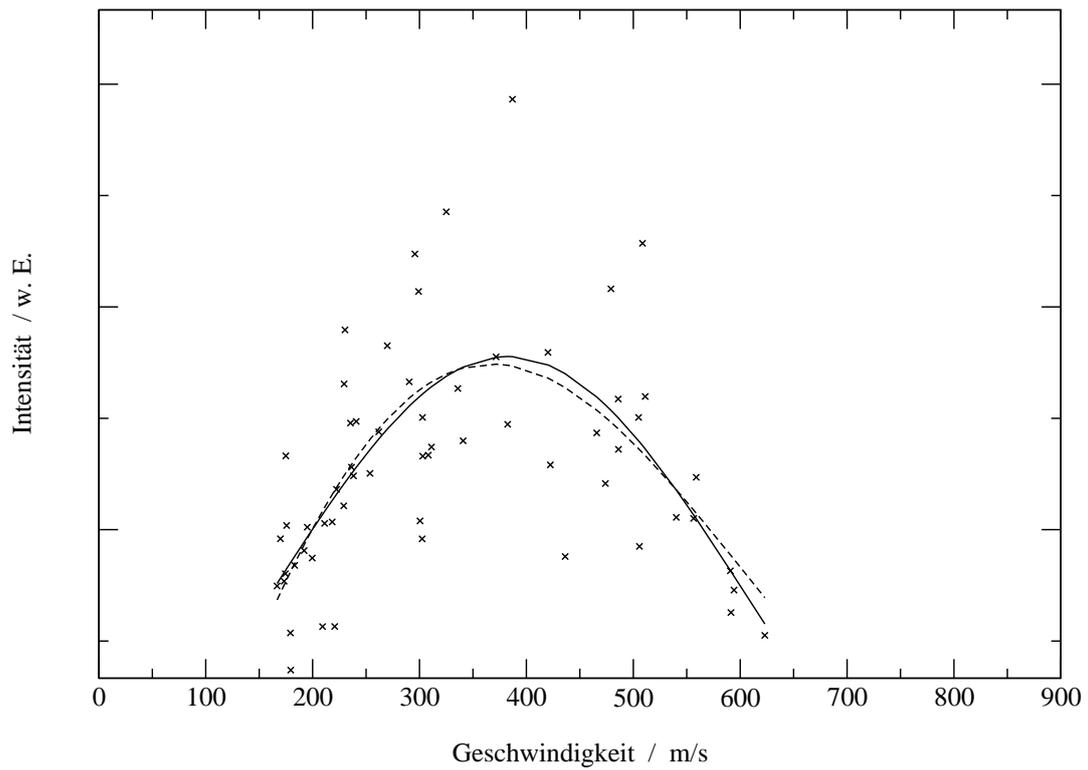


Abbildung 5.12.: Neutralengeschwindigkeit von DHB bei einer Ablation mit 355nm und 1.32mm mittlerem Abstand.

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

355nm. Das Gegenteil ist der Fall.

Weiterhin wird bei einer verschobenen MB-Verteilung (Korrelationskoeffizient 0.67) eine Plumentemperatur von 946K gefunden. Aus einem Fit mit einer Schar von Strömungsgeschwindigkeiten (Korrelationskoeffizient 0.67) werden eine wahrscheinlichste Geschwindigkeit von 372m/s, eine maximale Strömungsgeschwindigkeit von 61m/s und eine Plume-Temperatur von 2099K erhalten.

Für DHB wurde in einer früheren Messreihe auch die Verschiebung der Verteilung bei einer Anregung mit 270nm untersucht. Hier zeigte sich eine Verschiebung zu deutlich niedrigeren Geschwindigkeiten. Zu einer Ablation mit 355nm betrug der Unterschied mehr als 150m/s. Dieses Ergebnis läßt sich mit Hilfe von Festkörper-Absorptionsspektren erklären.²⁰ 270nm liegen in der Absorptionsbande zur Population des S_2 -Zustandes. Dieser wird in der Literatur als repulsiv angenommen. Die Ionisierung kann direkt aus diesem Zustand erfolgen. Die Überschussenergie ist dann vergleichsweise gering und kann durch die Fluoreszenz, die aus dem S_1 -Zustand erfolgt, nicht ermittelt werden. Die Daten können aufgrund unterschiedlicher Laserjustagen nicht mit den anderen hier vorgestellten verglichen werden. Auf eine eingehendere Betrachtung wird daher verzichtet.*

In Verbindung mit der in Abschn.5.8 gemachten Untersuchung kann aber auch die höhere Laserenergie maßgeblich an der Verschiebung des Verteilungsmaximums beteiligt sein.

Vorgreifend auf die noch folgenden Darstellungen zeigt sich hier bereits eine Abweichung in der Vorhersagbarkeit des Ablationsverhaltens aus den LIF-Daten. FA zeigt nicht die erwartete höhere Geschwindigkeit bei einer Anregung mit 355nm. Ferner ist der Unterschied der Geschwindigkeitsverteilung bei DHB unter Anregung mit 355nm bzw. 337nm nicht signifikant.

Wie im Folgenden gezeigt wird, weicht auch SA bei einer Anregung mit 337nm vom durch LIF-Spektren prognostizierten Trend ab. Diese Abweichung ist ebenfalls nicht signifikant. Der Wert des Verteilungsmaximums liegt nahe am Wert von FA, so dass unter Berücksichtigung der zu erwartenden Fehler keine klare Verletzung festgestellt werden kann.

Bei Anregung von 355nm weisen sowohl SA als auch FA eine deutlich niedrigere Geschwindigkeit auf. Eine Erklärung dafür steht noch aus. Vorherige Ergebnisse, die für FA bei Anregung mit 355nm deutlich höhere Geschwindigkeiten ergaben, müssen unter

*Der hierzu verwendete Laser entstammte ebenso wie der Stickstoff-Laser einem anderen Experiment und stand nur für kurze Zeit zur Verfügung.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

dem Aspekt der Probendicke, die zu der Zeit nicht berücksichtigt werden konnte, neu überdacht werden.

Bei DHB wird noch ein weiterer Effekt beobachtet. Bei der Postionisation wird insbesondere bei geringem Delay auch ein Teilchen mit 136Da aufgefunden. Dies entspricht einer Eliminierung von Wasser aus dem Matrixmolekül. Ähnlich FA reichen die Daten nicht, um eine Verteilung analysieren zu können. Das Ausbleiben des Fragments bei langer Verzögerung der Photoionisation lässt aber auf höhere Geschwindigkeiten schließen. Die Datendichte ließ keine Aussagen zu, ob dies unter Energieerhaltung geschieht. Weiterhin kann derzeit nicht geklärt werden, ob dieses Fragment aus dem Ablationsprozess stammt oder ein Photofragment darstellt. Auf geplante Experimente in dieser Hinsicht wird im Abschnitt 7 eingegangen.

5.4.3. Sinapinsäure

In den Postionisationsspektren von SA werden aus dem MALDI-Prozess der protonierte Molekülpeak bei 226Da und ein Fragment bei 208Da detektiert. Dieses kann durch eine Wasserabspaltung aus dem MH^+ -Peak stammen. Formal stellt es einen $[M-OH]^+$ -Peak dar. Aus der Photoionisation kann nur der Molekülpeak mit einem m/z von 225 verwertet werden. Die Verteilung der mit 337nm ablatierten Neutralen wurde in einem Delaybereich von 1.9 bis $5.0\mu s$ ermittelt (Abb.5.13). Starke Photofragmentationen beeinträchtigten die Auswertung der Matrixintegrale. So erklärt es sich, dass im Geschwindigkeitsbereich oberhalb 425 m/s nur wenige Punkte verwendet werden konnten. Des Weiteren bildet SA eine sehr mächtige Probe, die aus kleinen, kubischen Kristalliten aufgebaut ist (vgl.5.3.1). Die Inhomogenität der Probe führt dazu, dass die ermittelten Geschwindigkeiten stark von den theoretisch eingestellten abweichen. Die mittlere durchflogene Strecke beträgt 1.17mm, die individuellen Strecken weichen jedoch wegen der Probenbeschaffenheit um bis zu 0.2mm davon ab.*

Der Fit mit einer verschobenen Maxwell-Boltzmann-Verteilung liefert bei einem Erfüllungskoeffizienten von 0.51 eine Strömungsgeschwindigkeit von 439 m/s. Für die Temperatur wird ein Wert von 755K gefunden. Für einen Fit mit einem Set von Strömungsgeschwindigkeiten wird ein Erfüllungskoeffizient von 0.44 erhalten. Hier würde eine Tem-

*Für die Bestimmung der Probendicke wurden die Maximalwerte herangezogen. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den anderen Matrizes wurden für die Geschwindigkeitsverteilung diese jedoch ausgelassen.

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

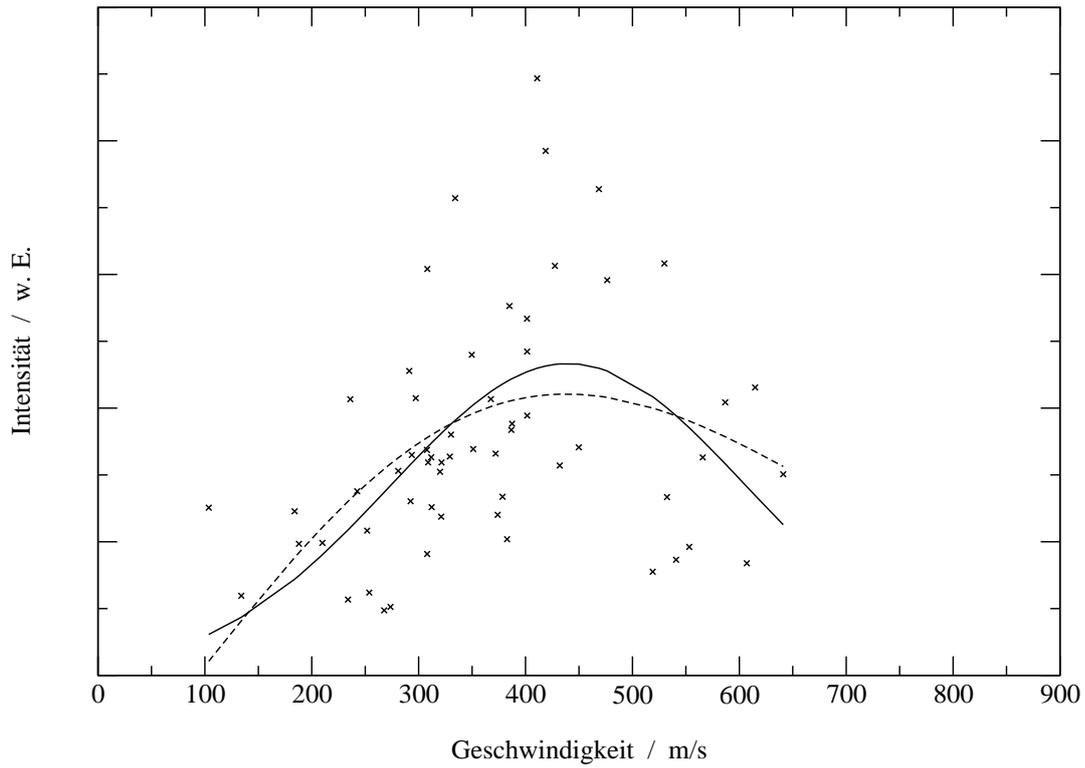


Abbildung 5.13.: Geschwindigkeitsverteilung von SA bei Ablation mit 337nm in einem mittlerem Abstand von 1.17mm.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

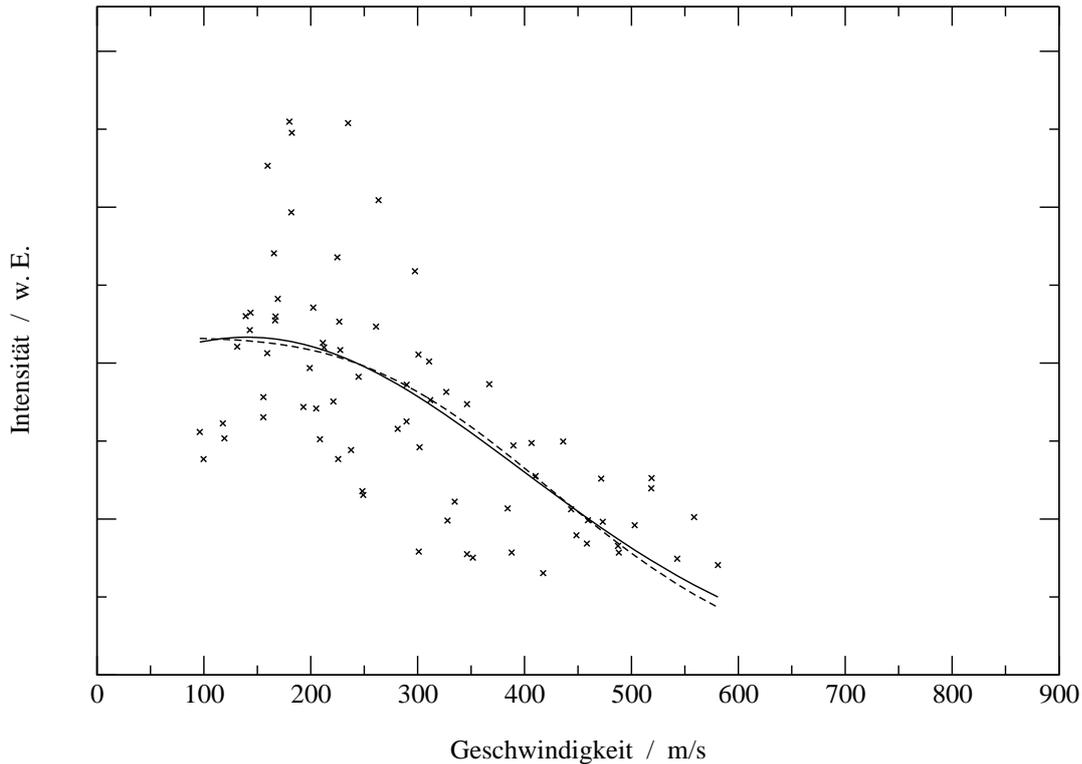


Abbildung 5.14.: Bei 355nm Ablationswellenlänge hervorgerufene Neutralengeschwindigkeitsverteilung von Sinapinsäure. Mittlerer Abstand 1.0mm.

peratur von 3147K und eine Strömungsgeschwindigkeit von 186 m/s erreicht.

Wird die Ablation mit 355nm hervorgerufen, so verschiebt sich die Verteilung erwartungsgemäß zu niedrigen Geschwindigkeiten (Abb.5.14), jedoch weitaus stärker als aus den Fluoreszenzdaten erwartet wurde. Eine verschobene Maxwell-Boltzmann-Verteilung liefert einen Maximalwert der Geschwindigkeit von 140 m/s bei einem Erfüllungskoeffizienten von 0.67. Die Temperatur liegt bei 1791K. Auch hier muss berücksichtigt werden, dass die zurückgelegte Strecke geringer als bei den anderen Matrices ist (1.0mm). Der mittlere Ablationsort liegt 0.28mm vom Repeller entfernt und weist Schwankungen in eben jener Größenordnung auf.

Für einen Fit, der verschiedene Strömungsgeschwindigkeiten berücksichtigt, wird nur ein leicht schlechterer Korrelationskoeffizient von 0.65 gefunden. Die Strömungsgeschwindigkeit sinkt von 140 m/s auf 8 m/s und die Temperatur fällt auf 1756K.

Bei den Daten von SA muss berücksichtigt werden, dass durch die mächtige Probe ggf. andere geometrische Verhältnisse vorliegen. Die Ausbildung des Plumes und eine Ionisierung entfernt von der Plumeachse führen hier zu einem Postionisationsort in den

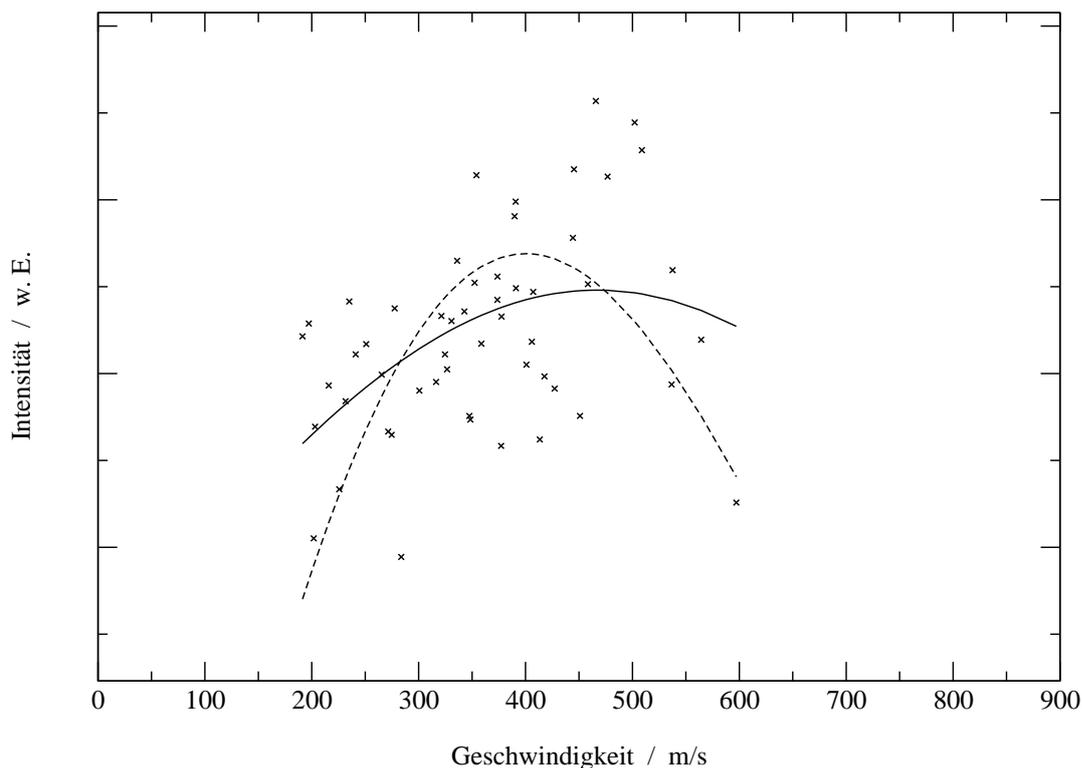


Abbildung 5.15.: Geschwindigkeitsverteilung von Dithranol bei einer Ablationswellenlänge von 355nm. Mittlerer Abstand 1.31mm.

dünnen Plumerandbereichen. Es ist durchaus möglich, dass im Plumezentrum der aus LIF-Daten erhaltene Trend eingehalten wird. Dies kann nur durch Änderungen im Experimentaufbau ermittelt werden (vgl. 7).

5.4.4. Dithranol

Dithranol ließ sich nur mit 355nm ablatieren. Absorptionsspektren von Festkörpern sind nicht bekannt. Die in Lösung aufgenommenen Absorptionsspektren¹³ lassen für das Ausbleiben der Ablation bei 337nm keine Ursache erkennen. 337nm liegen dort innerhalb der Absorptionsbande des S_1 -Zustandes. Dennoch konnten keinerlei Signale erhalten werden, insbesondere auch nicht bei der Postionisation, die sonst bereits vor der Detektion prompter Ionen einsetzt.

Es konnte daher nur eine Verteilung bei einer Ablationswellenlänge von 355nm erhalten werden (Abb.5.15). Dithranolproben zeichneten sich durch eine große Homogenität aus. So wurde aus THF eine feinkristalline Bedeckung des Probenträgers erhalten.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Gleichzeitig wurde dadurch die Verwendbarkeit der Probe begrenzt. Sie wurde schnell aufgebraucht und komplette Serien konnten nur durch viele Proben erstellt werden.

Die Angleichung der Teilerien dieser Proben gestaltete sich schwierig. Diese Verhältnisse resultierten in einem sehr schlechten Korrelationskoeffizienten von 0.46 für eine Geschwindigkeitsverteilung unter Berücksichtigung einer Strömungsgeschwindigkeit. Diese wurde ebenso wie das Maximum der Verteilung bei 467 m/s gefunden. Die Temperatur betrug demnach 1562K. Aus einem Fit mit einer Schar von Strömungsgeschwindigkeiten (Korrelationskoeffizient 0.36) werden eine wahrscheinlichste Geschwindigkeit von 401m/s, eine maximale Strömungsgeschwindigkeit von 0m/s und eine Plume-Temperatur von 967K erhalten.

Eine weitere Besonderheit lag darin, dass trotz leichter Defokussierung des Postionisationslasers kein Molekülradikalkation aufgefunden wird. Es konnten nur Ringfragmente der Benzolkerne analysiert werden. Andererseits wurden im MALDI-Spektrum kaum niedermolekulare Anteile, sondern der protonierte Molekülpeak und ein Natriumaddukt vorgefunden. Dies lässt darauf schließen, dass die Fragmente aus der Photoionisation stammen und nicht bei der Ablation gebildet werden. Der sonst übliche Einsatz von Kationenagenzien hilft hier nicht. Die Anlagerung von Kationen ist zum Zeitpunkt der Nachionisierung bereits abgeschlossen und würde durch die Photoionisation nicht begünstigt.

Trotz der aufgezeigten Schwierigkeiten kann zusammenfassend festgestellt werden, dass Matrix-abhängige Unterschiede festgestellt wurden. Weiterhin wurde übereinstimmend eine Zunahme der Geschwindigkeit mit Abnahme der Ablationswellenlänge festgestellt. Der Unterschied bei DHB ist allerdings nicht signifikant. Mit Ausnahme von SA zeigten sich übereinstimmend mit den Vorhersagen aus theoretischen Berechnungen die Fits mit einer Strömungsgeschwindigkeit besser geeignet als diejenigen, die durch mehrere Strömungsgeschwindigkeiten charakterisiert werden.* Es ist daher eher von einer Ablation im „thermal confinement“-, nicht aber im „stress confinement“-Regime auszugehen. Dies wurde für ns-Laser auch vermutet (vgl.3.2). Rein thermische Verteilungen versagten gänzlich und wurden daher nicht dargestellt.

Weiterhin zeigen die Daten eine Abnahme der Temperatur mit Abnahme der Ablationswellenlänge. In der Regel nimmt sie auch mit Zunahme der Geschwindigkeit ab. Dithranol weist dagegen eine recht hohe Temperatur bei vergleichsweise hoher Geschwin-

*Im Folgenden wird daher die Darstellung auf Ergebnisse aus der Fitfunktion mit einer Strömungsgeschwindigkeit beschränkt.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Matrix	355nm		337nm	
	Max. der Verteilung / m/s	T(Plume) / K	Max. der Verteilung / m/s	T(plume) / K
DHB	383	946	384	187
SA	140	1791	439	755
FA	279	1347	406	833
Dithranol	467	1562		

Tabelle 5.4.: Zusammenfassende Darstellung der Matrix- und Wellenlängenabhängigkeiten von Plumetemperatur und wahrscheinlichster Geschwindigkeit.

digkeit auf. Hier äußert sich der hohe Anteil dissipierter Anregungsenergie deutlich. Keine Erklärung konnte für die sehr niedrige Plume-Temperatur von mittels 337nm ablatierten DHB-Molekülen gefunden werden.

Die erhaltenen Daten aus verschobenen MB-Verteilungen für Ablationen mit 355 und 337nm der einzelnen Matrizes können der Tabelle 5.4 entnommen werden.

5.5. Einbettung von Analyten

Das Augenmerk der kommerziellen MALDI-Analyse richtet sich auf den Analyten. Eine Fragestellung war daher, wie sich das Ablationsverhalten der Matrix auf den Analyten auswirkt. In ersten, hier nicht gezeigten Voruntersuchungen wurde für DHB eine der Matrix ähnliche Geschwindigkeitsverteilung gefunden. Bei FA dagegen wurden niedrigere Analytgeschwindigkeiten und eine schmalere Verteilung vorgefunden. Diese Untersuchungen wurden mit Tryptophan als Analyten gemacht. Tryptophan hat die negative Eigenschaft, unter Photoionisation stark zu fragmentieren. Hier konnte nur ein Ringfragment von 130Da ausgewertet werden. Dieses liegt nahe dem M-H₂O-Fragment von DHB. Dies bereitete allerdings weniger Schwierigkeiten als die weiteren Fragmente des Tryptophans, die eine Auswertung der Matrixintegrale in weiten Bereichen unmöglich machten. Weiterhin war eine Präparation nur aus wässriger Lösung möglich. Die daraus entstehenden inhomogenen Proben erschweren die Messungen erheblich.

Es musste also ein Analyt gefunden werden, der möglichst in organ. Lsgm. löslich ist und gut photoionisiert werden kann. Andererseits sollte die Photoionisation nicht zu ausgedehnter Fragmentation führen. Der ideale Analyt ist bisher nicht gefunden. Ein

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Analyt, der zumindest einige der Anforderungen erfüllt, ist Chrysen. Chrysen läßt sich in organ. Lsgm. gut lösen, kann mit 260nm gut ionisiert werden und hat ein hohes Molekulargewicht. Letzteres erleichtert die Auswertung. Die Ionisation mit 260nm gelingt jedoch so gut, dass auch hier Photofragmente auftreten, die u.a. die im Folgenden dargestellten Messreihen mit DHB erschweren.

Zur Untersuchung der Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen aus DHB wurde eine dried-droplet-Probe aus THF präpariert. Eine Probe aus EtOH erwies sich als schlechter geeignet. Dies könnte an der Kristallisation gelegen haben. Es ergaben sich aus EtOH wesentlich größere Kristallite. Die Analytverteilung wurde dadurch ungleichmäßiger. Dies stellte ein Hauptproblem dieser Untersuchung dar. Die Analytkonzentration am Ort blieb unbekannt, da Chrysen kaum protoniert wurde. Ein Analytsignal aus dem MALDI-Prozess war allenfalls unstetig vorhanden und die Signalintensitäten schwach.

Eine Möglichkeit, die Signalintensitäten der nachionisierten Neutralen mit Matrixintegral zu gewichten, war im Fall von DHB ebenfalls nicht möglich. Die Integrale wurden häufig durch Fragmentensignale des nachionisierten Chrysens dominiert. Es erstaunt daher nicht, dass die in Abb.5.16 dargestellte Verteilung ebenfalls großen Schwankungen unterliegt. Dies äußert sich auch in einem Korrelationskoeffizienten von 0.45 einer verschobenen Maxwell-Boltzmann-Verteilung. In dieser wird das Maximum bei 294m/s durchlaufen. Die Temperatur des Plume beträgt 698K. Diese Werte liegen unterhalb derjenigen, die für die Geschwindigkeitsverteilung der Matrix gefunden werden (383m/s, 946K). Es zeigt sich hier ein etwas anderes Verhalten als bei den Untersuchungen mit Tryptophan. Nun handelt es sich um stark unterschiedliche Analytklassen. Chrysen stellt einen unpolaren, Tryptophan dagegen einen polaren Analyten mit hoher PA dar. Matrix-Analyt-Wechselwirkungen könnten im Fall von Tryptophan zur Präsenz in Matrix-Nähe führen.

Dadurch lässt sich jedoch nicht das veränderte Verhalten zu Tryptophan in FA erklären. Hier sollten ebenfalls Analyt-Matrix-Wechselwirkungen vorliegen. Da FA andererseits in Voruntersuchungen als stärker und mit höheren Geschwindigkeiten ablatierend eingestuft wurde, wurden weitere Untersuchungen mit der bisher am stärksten ablatierenden Matrix durchgeführt.

Weitere Untersuchungen wurden mit Dithranol gemacht. Dieses kristallisiert sehr homogen aus THF. Probleme mit Löslichkeit oder Kristallisation traten daher nicht auf. Weiterhin vorteilhaft ist, dass Dithranol ein ebenfalls hohes Molekulargewicht aufweist, beim MALDI-Prozess kaum, dagegen im Photoionisationsprozess ausschließlich fragmen-

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

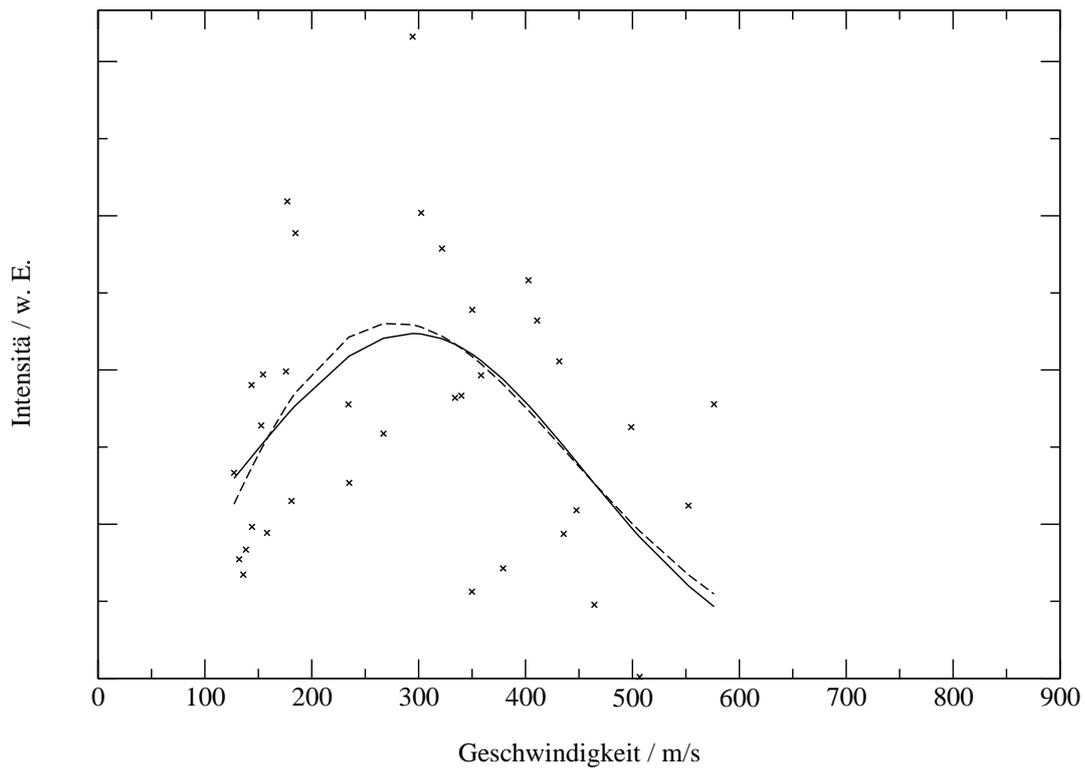


Abbildung 5.16.: Geschwindigkeitsverteilung aus DHB ablatierter Chrysen-Moleküle bei einem mittleren Abstand von 1.08mm.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

tiert. Analyt- und Matrixsignale beeinflussen sich daher kaum. Auch hier ist jedoch kein promptes Analytsignal zugänglich. Die schwachen Ionisationstendenzen von Dithranol lassen eine Detektion von protoniertem Analytsignal nicht zu. Theoretisch bestünde die Möglichkeit, Adduktbildung zur Analytdetektion zu nutzen. Die Quasimoleküle dominieren dann das TOF-Spektrum. Die Postionisation wird hingegen kaum beeinflusst, da die Anlagerung bereits vor der verzögerten Ionisation erfolgt ist und die Ionen den Quellbereich verlassen haben (vgl.B.1).

Zwei Problematiken verhindern aber den erfolgreichen Einsatz. Die Präparation wird wesentlich anfälliger gegenüber Alterungsprozessen. Sowohl die Probenlösung, und bei ungünstigen Bedingungen auch die aufgetragene Probe, verfärbt sich innerhalb von Minuten bräunlich. Dithranol wird offensichtlich durch einen säurekatalysierten Prozess verändert. Dies konnte in Untersuchungen der Probenpräparation festgestellt werden. Einfluss haben das Lösungsmittel THF, das zugesetzte Silbersalz (AgTFA) und ggf. weitere Additive. Anfänglich wurde der Alterungsprozess dem zugesetzten Silbersalz zugeschrieben. Eine frische Charge AgTFA induzierte den Alterungsprozess der Probenlösung und der Probe aber besonders schnell. Der auf den Probenträger gebrachte Tropfen verfärbte sich noch vor vollständiger Trocknung. Diese Proben ergaben zudem schlechte Spektren. Da das AgTFA keine auffällige Verfärbung zeigte und die AgTFA-Lösung selbst wesentlich langsamer als die Probenlösung reagierte, wurde das Lsgm. über basischem ALOX gesäult. Die Reaktion konnte dadurch verlangsamt werden. Ein oxidativer Effekt lag nahe. Zugabe von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel dagegen brachte genau den gegenteiligen Effekt. Es ist daher von einer säurekatalysierten Reaktion auszugehen. Dafür spricht auch, dass die frische Charge im Gegensatz zu früher verwendetem AgTFA nicht feinpulverig ist, sondern große Kristalle enthält und ihr ein saurer Geruch anhaftet. Sie scheint von Resten der HTFA verunreinigt zu sein.

Neben diesen präparativen Problemen, die durch Reinigung der Chemikalien z.T. behoben werden konnten, existiert noch eine weitere Problematik. Auch der Kationenzusatz verteilt sich nicht unbedingt homogen in der Probe. Dies wird umso bedeutender, da THF nicht gerade ein ideales Lösungsmittel für ein Salz darstellt. Es würde eher ein weiterer Unsicherheitsfaktor hinzugefügt denn eliminiert. Zusätzlich ist das Matrixaddukt nicht dominant. Es macht nur etwa 1/5 der Matrixintensität aus. Eine Korrelation mit der eingesetzten Kationenmenge ist nur schwer möglich. Die Affinität von Dithranol zu Kationen muss verständlicherweise relativ gering sein. Diese Matrix wird bei Polymeranalysen zur Detektion von kationisierten, sonst unpolaren Verbindungen eingesetzt.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

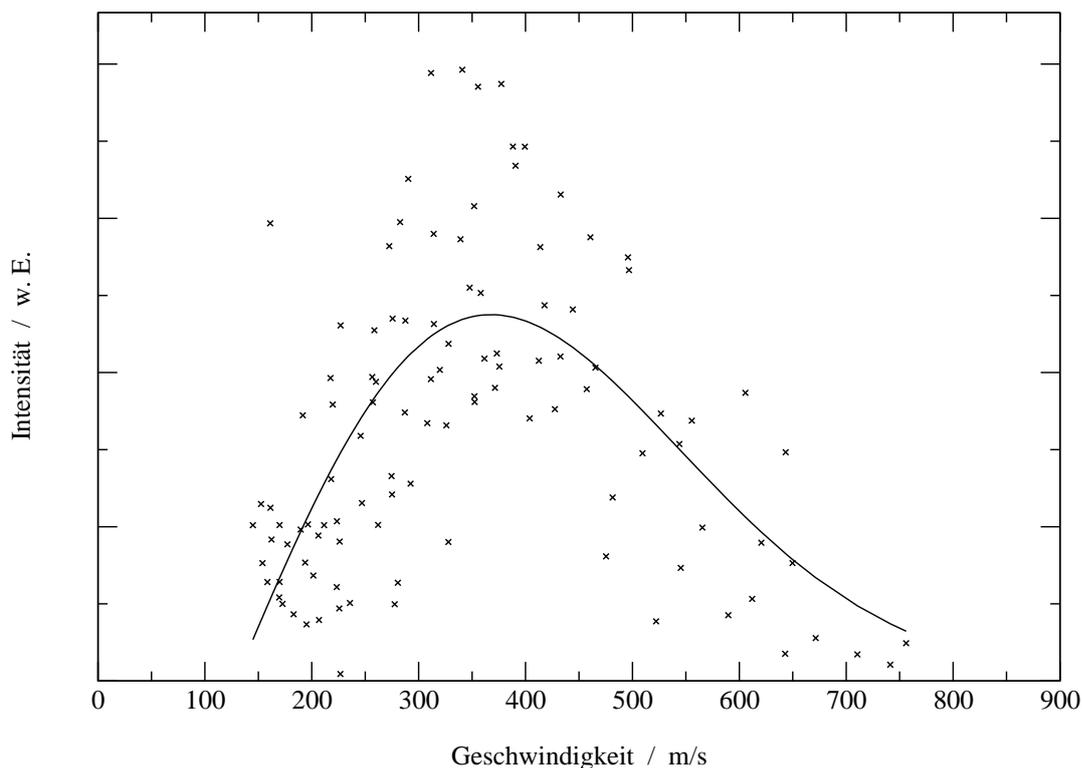


Abbildung 5.17.: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen-Molekülen bei Ablation aus Dithranol in 1.36mm mittlerer Entfernung.

Sie soll daher nicht in Konkurrenz zu diesen bei der Kationenadduktbildung auftreten. Nach Zenobi et al.⁷³ weist sie zudem eine niedrige Na-Affinität auf. Die Vermutung liegt nahe, dass ähnliches für Ag^+ -Ionen gilt.

Die Untersuchungen bezüglich der Geschwindigkeitsverteilung aus Dithranol ablatierten Chrysens wurden also mit dem Manko der unbekanntem Chrysenkonzentration am Ablationsort gemacht. Dennoch weist die in Abb.5.17 dargestellte Verteilung eine recht hohe Qualität auf. Dies liegt zum einen an der homogenen Probenbeschaffenheit von Dithranol und zum anderen an den vermutlich sehr ähnlichen Eigenschaften von Chrysen und Dithranol. Es kommt also zu einem weniger stark ausgeprägten Verdrängungsprozess bei der Kristallisation. Inwieweit Mischkristallbildung vorliegt, wurde jedoch nicht untersucht.

Die Anpassung einer verschobenen MB-Verteilung liefert für die wahrscheinlichste Geschwindigkeit einen Wert von 388 m/s. Hier wird also ebenso eine Verschiebung zu niedrigeren Geschwindigkeiten, verglichen mit der reinen Matrix, vorgefunden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen bei DHB wird auch eine Erniedrigung der Plu-

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Matrix	Verteilungsmaximum / m/s	Plumetemperatur / K
DHB	294	698
Dithranol	388	541

Tabelle 5.5.: Analytgeschwindigkeiten und Plumetemperaturen bei Ablation aus verschiedenen Matrices.

metemperatur gefunden. Der ermittelte Wert liegt bei 541K.

Mit beiden Matrices wird eine Geschwindigkeitserniedrigung um etwa 100m/s vorgefunden. Die Temperaturabnahme ist bei Dithranol wesentlich stärker, was im Einklang sowohl mit der höheren Geschwindigkeit als auch mit der Ablationsmenge steht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe sind in Tab.5.5 zusammengefasst.

Die Untersuchung der Analyteinbettung ist aus mehreren Gesichtspunkten lohnenswert. Für die kommerzielle Analytik liegt das Interesse eher an Auswirkungen auf den Analyten als an den reinen Matrixeigenschaften. Weiterhin scheint die Untersuchung von Analyten durch die Vermeidung von Sättigungseffekten bei der Photoionisation leichter auswertbar. In typischen Proben liegt das Verhältnis von Matrix zu Analyt bei 100:1 bis 10000:1. Nachteilig ist die Unkenntnis der Analytkonzentration am Ablationsort. Diese kann abgeschätzt werden, wenn im prompten MALDI-Spektrum Analytsignale in ausreichender Intensität und stetig auftreten. Ggf. müssen hier die Ionisierungsmechanismen in die Gewichtung mit einbezogen werden.

Es gilt also, weiter nach geeigneten Analyten zu suchen. Chrysen kann hier erste Hinweise liefern. Abhängig von der eingesetzten Matrix sind Unterschiede im Kristallisationsverhalten und damit in der Konzentrationsverteilung in der Probe sowie Analyt-Matrix-Wechselwirkungen zu erwarten. Weitere Analyten anderer Substanzklassen sollten untersucht werden.

5.6. Abstandsabhängigkeit

Die Plumeentstehung findet sowohl in Bezug auf zeitlicher und räumlicher Dimension weit vor der Analyse statt. Um trotzdem Aussagen über die Plumeentstehung machen zu können, können prinzipiell drei Parameter verändert werden. Der Energieeintrag wurde in vorherigen Abschnitten durch die Wellenlänge variiert. Es kann weiterhin die Photonenanzahl verändert werden. Diese Möglichkeit wird im Abschnitt 5.8 besprochen. Eine

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

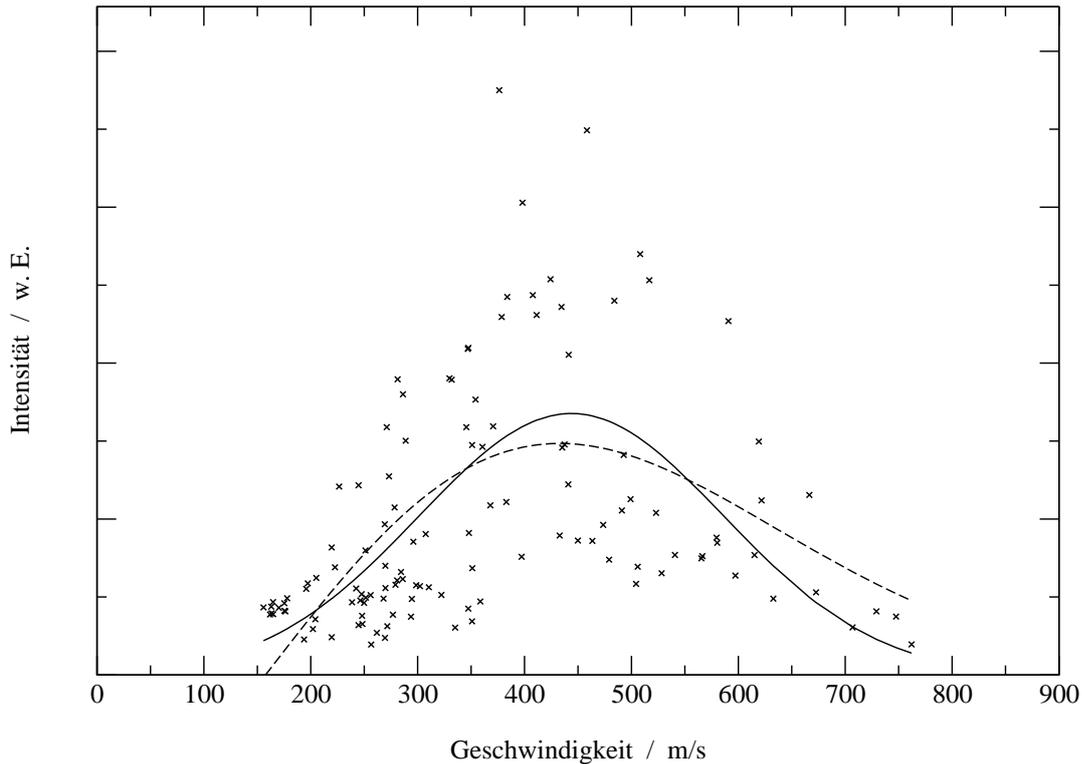


Abbildung 5.18.: Bei verringertem Abstand von 1.12mm detektierte Geschwindigkeitsverteilung von DHB. Ablationswellenlänge 337nm.

weitere Möglichkeit besteht darin, die Auswirkung des Hintergrunddruckes auf die Plumestehung zu analysieren. Untersuchungen mit erhöhtem Druck in der Quellregion werden in Abschn.5.7 angeführt. Im Folgenden sollen zunächst die Geschwindigkeitsverteilungen bei verschiedenen Abständen vom Ablationsort untersucht werden.

Die Variation des Abstandes ist jedoch starken Beschränkungen unterworfen (vgl. 5.4) Bei dem benutzten Aufbau konnten drei Abstände bei einer Ablationswellenlänge von 337nm realisiert werden. Untersucht wurde DHB. Im Abschnitt 5.4.2 wurde die Verteilung für den Abstand von 1.38mm bereits besprochen. Der Maxwell-Boltzmann-Fit lieferte eine wahrscheinlichste Geschwindigkeit von 384 m/s und eine Plume-Temperatur von 187K. Bei einem geringeren Abstand vom Ablationsort, hier für ca. 1.12mm dargestellt (Abb.5.18), nahm sowohl die Temperatur, als auch die Geschwindigkeit zu. Es wurden für die Plumetemperatur 379K und für die wahrscheinlichste Geschwindigkeit 444 m/s in einem verschobenen Maxwell-Boltzmann-Fit gefunden.

Der Abstand konnte noch weiter verringert werden. Bei einer Flugstrecke der ablatierten Teilchen von ca. 0.93mm setzte sich der Trend fort. Die in Abb.5.19 dargestellte

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

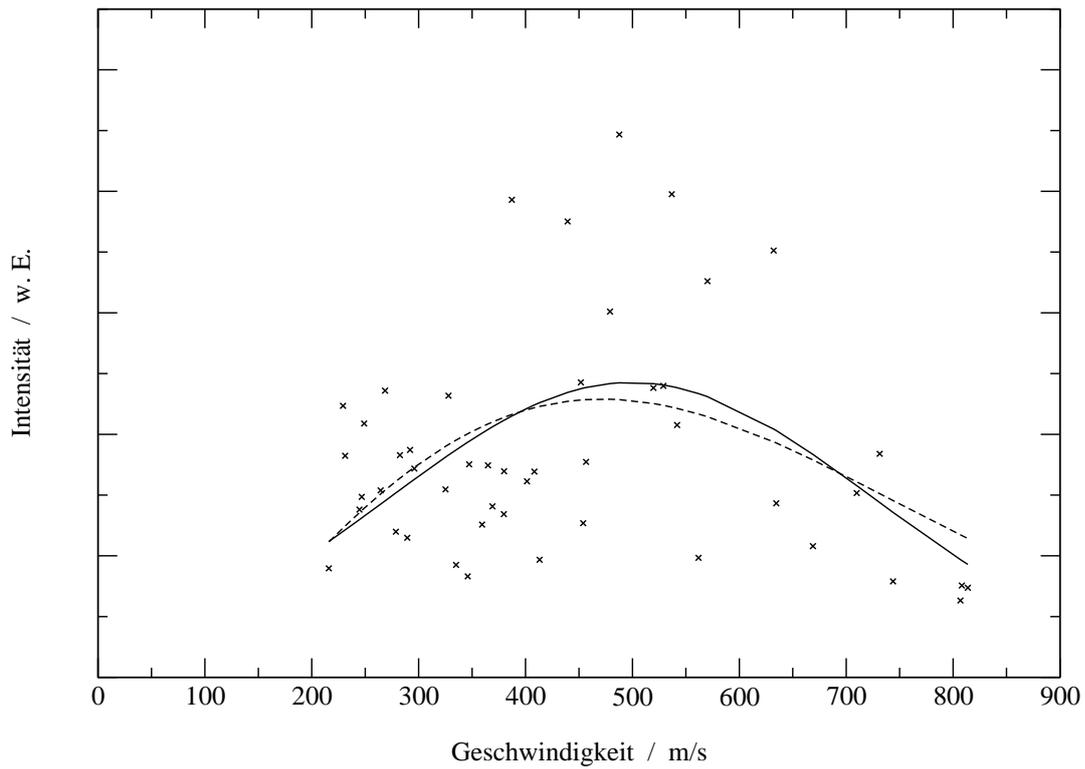


Abbildung 5.19.: Bei geringstmöglichem Abstand von 0.93mm aufgezeichnete Geschwindigkeitsverteilung mittels 337nm ablatierter DHB-Moleküle.

5. Postionisation zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

mittlerer Abstand / mm	1.34	1.12	0.93
Verteilungsmaximum / m/s	384	444	499
Plumetemperatur / K	187	379	958

Tabelle 5.6.: Zusammenfassende Darstellung der Entwicklung von Plumetemperatur und wahrscheinlichster Geschwindigkeit mit Abnahme des Abstandes.

Verteilung weist ein Maximum bei 499 m/s auf. Laut Fit betrug die Temperatur im Plume 958K. Die Ergebnisse sind in der Tab.5.6 zusammengefasst. Sie entsprachen allerdings nicht voll den Erwartungen. Eine gegebene Fehljustage und dadurch bedingte Abtastung der Randzone hätte sich durch eine Abnahme der Geschwindigkeit mit Abnahme des Abstandes äußern sollen. Je weiter der Postionisationsort vom optimalen Justageort entfernt wird, desto weiter sollte auch die Entfernung von der Plumeachse werden. In der Randzone sollten dann vor allem die langsameren Moleküle angetroffen werden. Andererseits sollte bei allen Abständen die Plumeausbildung weitestgehend abgeschlossen sein. Der geringe Hintergrunddruck lässt Auswirkungen von Stößen bis zu 1.4mm unwahrscheinlich erscheinen.

Die Zunahme der Temperatur dagegen widerspricht keinem Szenario. Findet tatsächlich eine ausgedehnte Plumeentwicklung statt, so führt zunehmende Kühlung zur Abnahme der Temperatur. Dies sollte mit zunehmendem Abstand der Fall sein. Wird hingegen die Randzone abgetastet, so werden diese Bereiche schlechter gekühlt. Je mehr man sich der Plumeachse nähert, desto besser wird die Kühlung, die Temperatur nimmt ab. Dies sollte unter den gegebenen Bedingungen ebenfalls bei zunehmendem Abstand der Fall sein. Dieser Effekt steht also in Übereinstimmung mit den Erwartungen.

Eine Klärung des Sachverhalts kann erst durch weitere Experimente erbracht werden (vgl. 7). Sollten in der Plumemitte abnehmende Geschwindigkeiten mit Zunahme des Abstandes gefunden werden, so muss von einer fortgesetzten Plumeentwicklung auch noch μs nach Ablation ausgegangen werden. Dies hätte auch Auswirkungen auf Ionisationsmechanismen. Stoßaktivierte Prozesse könnten bei hinreichend niedriger Aktivierungsenergie somit noch verhältnismäßig lange nach der Laseranregung erfolgen. Dies kann jedoch nur auf eine Minderheit der detektierten Ionen zutreffen, da sonst eine starke Herabsetzung des Auflösungsvermögens durch die Geschwindigkeits- bzw. Zeitunschärfe (vgl.2.1.1) die Folge wäre. Solche langandauernden Prozesse schlagen sich vermutlich also eher als Rauschen nieder. In dieser Hinsicht sind auch Untersuchungen von Chait et

al. von Interesse, die gerade Matrixfragmente in Clustern als Ursache von „Verunreinigung“ der MS-Spektren ausmachten. Dieses Phänomen wird als sogenannter „chemical noise“ bezeichnet.⁷⁴

5.7. Druckabhängigkeit

Eine weitere Möglichkeit die Plumeentwicklung zu untersuchen, stellt die gezielte Veränderung der Umgebungsbedingungen dar. Die augenscheinlich einfachste Möglichkeit besteht in der Variation des Umgebungsdrucks. Experimentell ist nur ein erhöhter Druck möglich. Weitere Anschlussflansche für zusätzliche Turbomolekularpumpen im Quellbereich existieren nicht.

Möglich ist die gezielte Druckerhöhung. Dafür werden in der Literatur sogenannte „default leakages“, also gezielt einstellbare Öffnungen, angeführt. Diese Möglichkeit stand ebenfalls nicht zur Verfügung. Desweiteren existieren keine Möglichkeiten, weitere Anschlüsse an der Quellregion vorzunehmen, da bereits viele Durchführungen u.a. für das PSPF-System und die verstellbare Dreipunkt-Lagerung der Quelle vorhanden sind. Die Möglichkeit, ein Suprazilfenster durch Fokussierung des Laserstrahls gezielt zu beschädigen wurde verworfen, da eine Ausbildung eines Risses und ggf. Brechen des Fensters befürchtet wurde.

Zur Erzielung unterschiedlicher Drücke in der Quelle erwies es sich vorteilhaft, dass das verwendete Kugelhahn-Ventil des Vorevakuierungs-Bypasses der Schubstangenschleuse nicht absolut vakuumdicht war. Wurde dieser Bereich belüftet, so brach der Druck in der Quelle auf $1 - 5 * 10^{-5} mbar$ ein. Jedoch stieg dann der Druck in der Driftstrecke, und somit auch in Nähe der MCP, langsam zu diesem Wert an. Zum Schutz der MCP wurde unter diesen Bedingungen nicht gemessen, zumal das zunehmende Rauschen die Auswertung erschwert hätte. Wurde die Bypass-Leitung jedoch belüftet und anschließend wieder verschlossen, so stellte sich alsbald ein Druck von weniger als $5 * 10^{-6} mbar$ in der Driftstrecke und von $1.1 * 10^{-5}$ bis $7.8 * 10^{-6} mbar$ in der Quellregion, je nach Wartezeit, ein. In diesen Druckbereichen konnten nun Messungen vorgenommen werden.

Die in Abb.5.20 gezeigte Verteilung wurde in diesem Druckbereich für DHB unter Ablation mit 355nm erhalten. Sie wird charakterisiert durch ein Verteilungsmaximum bei 338m/s. Dies stellt eine Abnahme der Geschwindigkeit gegenüber Normalbedingungen dar (383m/s). Erwartungsgemäß führt also ein erhöhter Hintergrunddruck zur vermehrten Anzahl von Stößen. Dies wird erhärtet durch die Abnahme der Plumetemperatur.

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

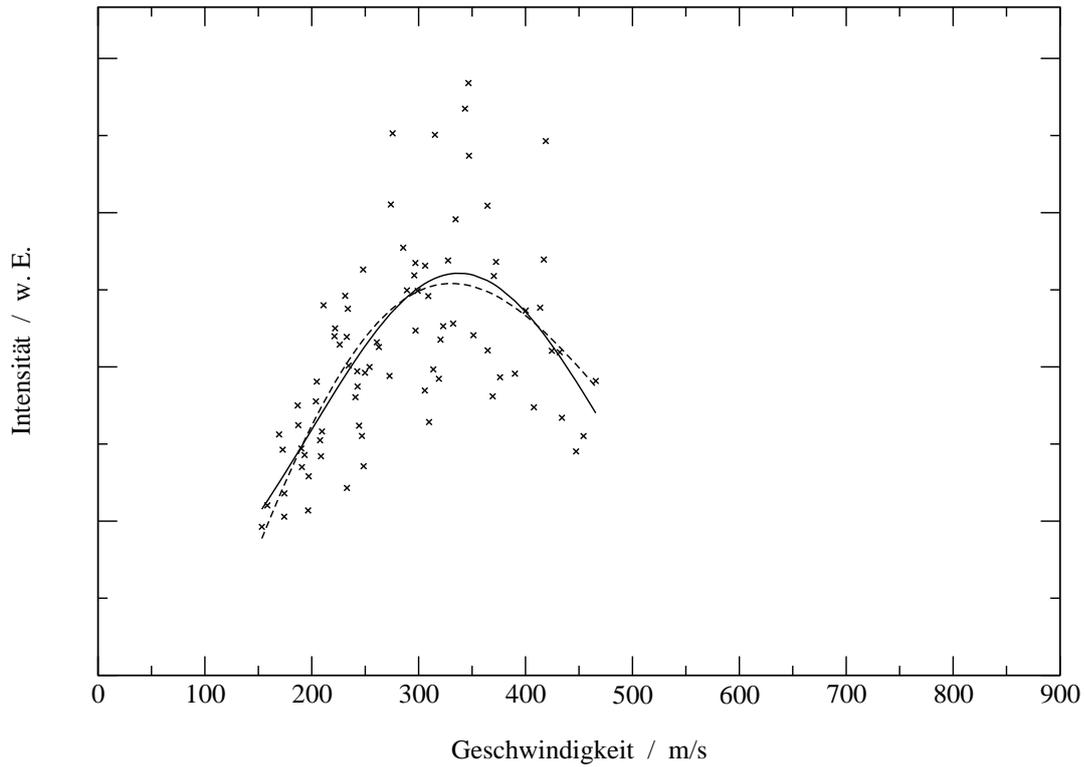


Abbildung 5.20.: Bei erhöhtem Druck in einem Abstand von 1.35mm aufgezeichnete Geschwindigkeitsverteilung von DHB bei Ablation mit 355nm.

Sie betrug 358K (946K, vgl. Tab. 5.4).

Dadurch, dass nur ein anderer Druckbereich eingestellt werden konnte, kann dies nur als Hinweis auf eine vermehrte Zunahme von Stößen mit Hintergrundgas gedeutet werden. Durch diese werden die ablatierten Teilchen offensichtlich abgebremst und gekühlt. Dies erklärt die zunehmende Anzahl an MALDI-Experimenten unter Atmosphärendruck. Auch hier wird eine bessere Kühlung der Analyte angenommen.

Grundsätzlich überrascht die gute Qualität der akquirierten Daten. Diese Untersuchungen sollten unbedingt fortgeführt werden, da sie vermutlich auch von kommerziellem Interesse sind. Hierzu sollte bei einer Neukonstruktion der Quellregion der Einbau einer „default-leakage“ berücksichtigt werden (siehe 7).

5.8. Einfluss der Laserleistung

Die Plumeentwicklung kann auch über die Veränderung der Laserleistung beeinflusst werden. Der einzige Laser, der sich ohne Veränderung des Spotdurchmessers bzw. der Spotcharakteristik in dieser Hinsicht beeinflussen ließ, war der DCR-11. Über die Lampenspannung kann hier in Maßen die Laserleistung variiert werden. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Variation des Q-Switch-Delay. Hier sind die erreichbaren Laserleistungsunterschiede jedoch ungeeignet. In einem schmalen Delay-Intervall ändert sich die Leistung nur minimal, danach dafür umso stärker.

Die meisten der eingesetzten Matrizes können jedoch nur bei maximaler bzw. leicht abgeschwächter Laserleistung untersucht werden. Dithranol ließ sich bei insgesamt drei unterschiedlichen Laserleistungen untersuchen. Diese stark ablatierende Matrix erwies sich allerdings bei der Auswertung nicht als optimal (vgl. 5.4.4). In Folge mangelnder Alternativen wurde die Untersuchung dennoch mit dieser Matrix durchgeführt.

Bei dem höchstmöglichen Laserfluss von $38.2\text{J}/\text{m}^2$ wurde die in Abb.5.21 dargestellte Verteilung für ablatierte Neutrale gefunden. Wie in Abschn.5.21 beschrieben, konnte nur ein Fragment ausgewertet werden. Für dieses wird bei einem Abstand von 1.18mm eine wahrscheinlichste Geschwindigkeit bei 363m/s und eine Plumetemperatur von 283K gefunden. Diese Werte liegen unterhalb der in Abschn.5.4.4 gefundenen Werte ($F=11.4\text{J}/\text{m}^2$, 467m/s, 1562K). Wird die Laserleistung weiter erniedrigt, so steigt die wahrscheinlichste Geschwindigkeit auf einen Wert von 372 m/s. In einer verschobenen Maxwell-Boltzmann-Verteilung wird bei einer Strömungsgeschwindigkeit von gleichem Wert eine Plumetemperatur von 501K gefunden (Abb.5.22).

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

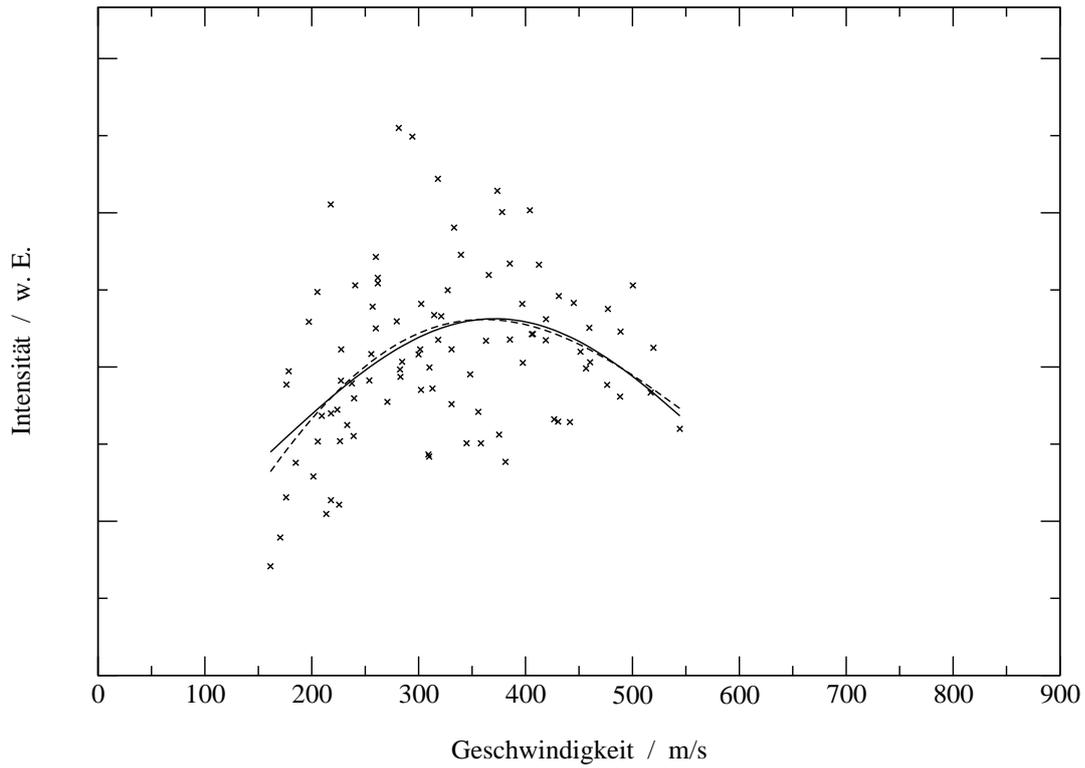


Abbildung 5.21.: Geschwindigkeitsverteilung von Dithranol bei maximaler Laserleistung (355nm, $F=38.2\text{J/m}^2$) in einem Abstand von 1.18mm vom Ablationsort.

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

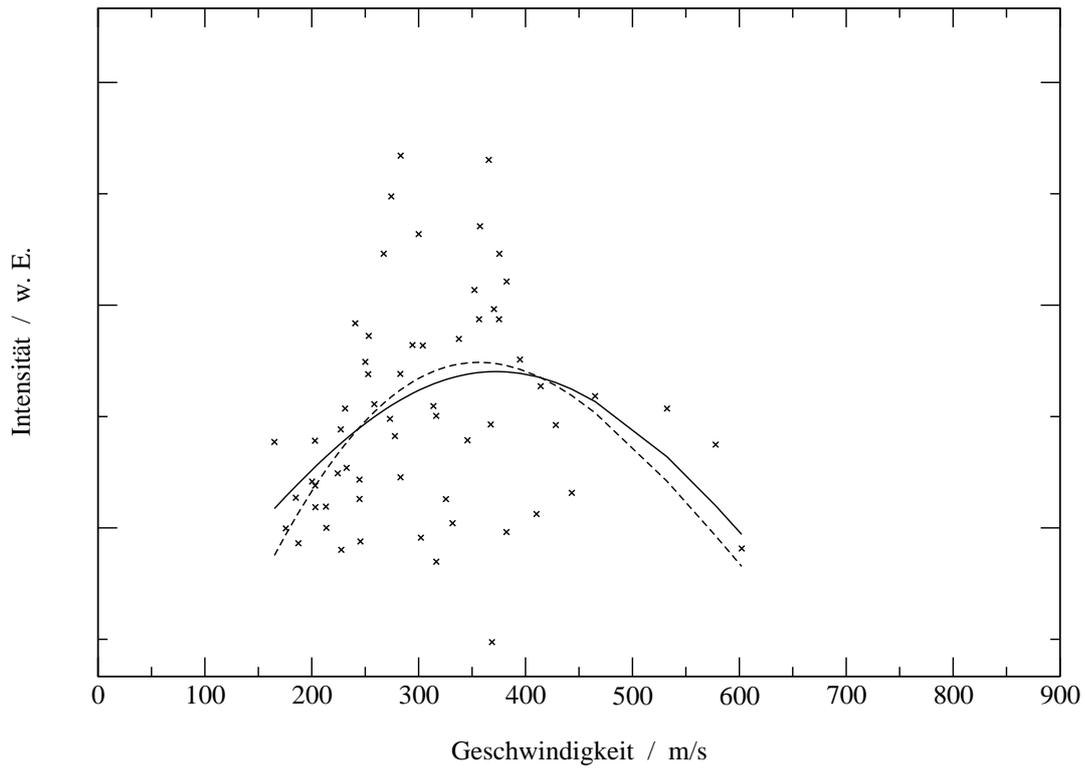


Abbildung 5.22.: Geschwindigkeitsverteilung von Dithranol bei mittlerer Laserleistung von $F=21.5\text{J/m}^2$.

5. Positionierung zur Ermittlung von Neutralengeschwindigkeiten

Laserfluss / J/m^2	38.2	21.5	11.4
Plumetemperatur / K	283	501	1562
Verteilungsmaximum / ms^{-1}	363	372	467

Tabelle 5.7.: Veränderung der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit und Plumetemperatur bei Laserleistungserhöhung.

Insgesamt wurde also mit Zunahme der Laserleistung eine Abnahme der Geschwindigkeiten und Temperaturen vorgefunden. Eine Zusammenfassung der laserleistungsabhängigen Plumedaten können der Tabelle 5.7 entnommen werden.

6. Zusammenfassung

Die erhaltenen Daten geben neue Hinweise zum Verständnis der Ablation, werfen allerdings auch einige Fragen auf. Manche Ergebnisse müssen vor dem Hintergrund der Experimentbedingungen noch mit einem Fragezeichen versehen bleiben. Hier können die im Ausblick vorgeschlagenen, und zum Teil bereits begonnenen Experimente weitere Einsichten verschaffen.

Für die Matrixabhängigkeit der Ablationsgeschwindigkeiten konnte der aus LIF-Daten stammende Trend nicht zweifelsfrei verifiziert oder falsifiziert werden. Bei einer Ablation mit 355nm weisen sowohl SA als auch FA niedrigere Geschwindigkeiten als DHB auf. Diese Matrizes zeigen in LIF-Spektren dagegen Zunahme der Rotverschiebung. Bei einer Ablation mit 337nm weicht SA ebenfalls vom erwarteten Verhalten ab. Es wurde hier eine höhere Geschwindigkeit detektiert, als erwartet werden konnte. Allerdings liegen die wahrscheinlichsten Geschwindigkeiten der untersuchten Matrizes in einem sehr begrenzten Bereich. In Anbetracht des Geschwindigkeitsfehlers (ca. 38 m/s) kann hier weder eine klare Verletzung noch eine teilweise Erfüllung des Trends festgestellt werden. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass der individuelle Abstand vom Ablationsort von der jeweiligen Matrix abhängt. Da ebenfalls Abhängigkeit der Ablationsgeschwindigkeit vom Abstand festgestellt wurde, diese sich aber auch aus einer Laserfehljustage des Positionisationsortes ergeben könnten, kann der Einfluss nicht abgeschätzt werden.

Der Vergleich der jeweiligen Matrix bei verschiedenen Ablationswellenlängen zeigt einen einheitlichen Trend. Die wahrscheinlichste Geschwindigkeit nimmt mit Abnahme der Wellenlänge zu. Für DHB muss die Einschränkung gemacht werden, dass dies durch den zu erwartenden Fehler nicht signifikant ist. Weiterhin wird eine Abnahme der Plumentemperatur mit Abnahme der Ablationswellenlänge festgestellt. Dies gilt in der Regel auch bei Zunahme der Geschwindigkeiten. Hier treten im Gesamtbild zwei Ausnahmen auf. Dithranol weist die höchste Geschwindigkeit am Verteilungsmaximum auf. Dennoch

6. Zusammenfassung

übertrifft diese Matrix, mit Ausnahme von SA (Ablation 355nm), hinsichtlich der Plumetemperatur alle anderen. Ebenso weist Dithranol die höchste Rotverschiebung der LIF aus. Es kann daher ein hoher Anteil an dissipierter Energie vermutet werden. Hinsichtlich SA ist das Ergebnis insoweit überraschend, dass hier die geringsten Geschwindigkeiten vorgefunden wurden. Ebenso war dies die einzige Matrix, bei der die Korrelationskoeffizienten für Verteilungen mit mehreren Strömungsgeschwindigkeiten höher als für solche mit einer Strömungsgeschwindigkeit sind. Da SA besonders mächtige Proben-dicken erzeugt, sind die Ergebnisse ggf. unter anderen Erklärungsansätzen zu betrachten. Bezüglich der Temperaturentwicklung mit der Geschwindigkeit stellt DHB bei einer Anregung mit 337nm eine Ausnahme dar. Es wird hier die niedrigste Plumetemperatur festgestellt. Ein Erklärungsansatz konnte hierfür noch nicht gefunden werden.

Für die meisten Matrices werden Hinweise auf thermal confinement, nicht aber auf stress confinement gefunden. Dies steht in Übereinstimmung mit theoretischen Betrachtungen der Anregung mit ns-Laserpulsen.

Bei einer Einbettung von Analyten wurde bei Dithranol und DHB übereinstimmend eine Erniedrigung des Verteilungsmaximums um ca. 100m/s gegenüber den reinen Matrices festgestellt. Dies steht in Einklang mit einem sogenannten plume-sharpening-Effekt. Die Erniedrigung der Geschwindigkeit stellt aber keine Energieerhaltung dar, da reines Dithranol annähernd das gleiche Molekulargewicht aufweist wie der untersuchte Analyt.

Wird der Abstand der Postionisation vom Ablationsort vergrößert, so nimmt die Geschwindigkeit ab. Eine mögliche Erklärung wären Stöße im Plume. Diese müssten aber noch μs nach der Ablation und in einer Entfernung von mehr als einem Millimeter stattfinden. Des Weiteren wurde eine Abnahme der Temperatur bei Vergrößerung des Abstandes festgestellt. Nach obiger Erklärung würde dies einer zunehmenden Kühlung gleichkommen. Eine andere Erklärung läge in einer Fehljustage des Postionisationslasers. Bei Annäherung an den weit entfernten Justagepunkt, würde der Postionisationsort näher an die Plumemitte rücken. Dieser Teil ist besser gekühlt. Es würde also ebenso eine Abnahme der Temperatur bei größerem Abstand erwartet.

Voll den Erwartungen entsprach die Abnahme der Geschwindigkeiten und der Plumetemperatur mit Erhöhung des Geräteinnendruckes. Hier konnte allerdings nur ein weiterer Druckbereich eingestellt werden. Ursächlich hierfür sind zunehmende Stöße mit den Teilchen des Hintergrundgases. Würde der Plume dadurch lediglich kompakter ausgebildet und somit eine Postionisation in dem vergrößerten Randbereich stattfinden, so wären zwar auch niedrigere Geschwindigkeiten aber eher höhere Temperaturen zu

6. Zusammenfassung

erwarten. Dieser Bereich würde dann schlechter gekühlt.

Ein Einfluss der Laserleistung kann ebenfalls festgestellt werden. Sowohl die Geschwindigkeiten als auch die Plumetemperatur nehmen bei Erhöhung der Laserleistung ab. Eine Zunahme der ablatierten Materialmenge scheint hier ursächlich. Durch diese kommt es zu vermehrten Stößen im Plume. Würde lediglich die kinetische Energie erhöht, so würde zwar durch eine erhöhte Stoßrate eine Kühlung bewirkt, aber die Strömungsgeschwindigkeiten sollten ebenfalls zunehmen, keinesfalls jedoch abnehmen.

7. Ausblick

Die Untersuchung des Ablationsprozesses und insbesondere der Neutralen wird inzwischen von vielen Gruppen als ein entscheidender Punkt zur Ausweitung des Einsatzgebietes der MALDI und der Verbesserung bestehender Methoden angesehen. Die begonnenen Experimente sollten daher fortgeführt und ausgeweitet werden. Dafür sollten jedoch einige Veränderungen am Experimentaufbau vorgenommen werden. Diese wurden in letzter Zeit bereits von Dipl. Chem. Dirk Walbrodt nach meinen Vorschlägen begonnen. Auffällig ist die Ungewissheit der Laserjustage. Dies gilt sowohl für den Positionisationslaser bezüglich der Ausrichtung zum Plume, als auch für die Ablationslaser. Um für alle eingesetzten Ablationswellenlängen eine möglichst gleiche Strahlage zu gewährleisten, wird derzeit ein LWL in die Einkopplung integriert. Dieser ersetzt z.Z. einen Teil des Lichtweges außerhalb des Vakuums. Ggf. muss später eine Durchführung ins Vakuum nachgerüstet werden. Gleiches gilt für den Positionisationslaser. Die Anfälligkeit des MOPO-Systems und der Wunsch nach dem Einsatz verschiedener Wellenlängen machen auch hier einen anderen Aufbau unabdingbar. Ein LWL soll hier ebenfalls eine genaue Strahlage innerhalb des Plumes gewährleisten. Dieser Aufbau sollte bezüglich aller Raumrichtungen positionierbar sein. Dadurch könnte die Plumedichte zweidimensional abgetastet werden. Sollte die vertikale Positionierung, die aus Experimentdaten nicht erfassbar ist, nicht verbesserbar sein*, so bleibt der Einsatz einer Zylinderlinse als letzter Ausweg. Es würde dann ein Plumbereich orthogonal zur Flugrichtung integral erfasst.

Die Neu-Konstruktion der Ionisationsquelle bietet sich ebenfalls an. Nicht nur, dass die geometrische Anordnung der Elektroden auf den Einsatz mit dem PSPF-System optimiert ist, ist hinderlich. Die Elektroden des PSPF haben ggf. auch negativen Einfluss

*Dies kann der Fall sein, wenn die Neigungen der Kristalloberflächen der Matrices z.B. einen maßgeblichen Einfluss auf die Neigung der Plumeachse haben.

auf die Signalintensität. Das PSPF sollte daher als optionaler Einsatz vorgesehen werden. Weiterhin muss der Einfluss der Äquitpotenzialregion und die gewünschte Fokussierung auf den Detektor untersucht werden. Bei der Positionierung müssen zudem zahlreiche Spektren aufgenommen werden. Dafür ist es unerlässlich, dass die Probe möglichst lange hält. Deshalb wurde der Probeträger nicht zentrisch, sondern am Rand getroffen. Für zukünftige Experimente sollte die Zuführung der Probe exzentrisch geplant werden, so dass der Ablationsort nahe der TOF-Achse liegt. Dadurch könnten die Signalintensitäten verbessert und ein bisher notwendiges Verkippen der Quelle vermieden werden. Für die fortgesetzte Untersuchung des Einflusses von Hintergrunddrücken sollte eine sogenannte default-leakage eingeplant werden.

Nach diesen konstruktionellen Verbesserungen sollten Untersuchungen bei mehreren Abständen vom Ablationsort, bei verschiedenen Druckbereichen und mit verschiedensten Ablations- und PositionierungsLasern möglich sein. Ob die Laserleistung durch einen Attunator besser regulierbar und die Strahlage dadurch nicht verändert wird, kann ebenfalls nur das Experiment zeigen.

Einige weitere Untersuchungen ergeben sich aus den im Auswertungsteil dargestellten Ergebnissen. Insbesondere die Analyteinbettung und der Vergleich von Matrix- und Analytgeschwindigkeiten ist untersuchenswert. Hier müssen weitere brauchbare Analyte gefunden werden. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen des Kristallisationsprozesses bzw. das Ausweichen auf andere Präparationstechniken wie thin-layer oder Aufstäuben von feingemahlenem Pulver voranzutreiben. Die Schaffung einer Ablation, die den Analyten nicht nur zum Schutz vor Fragmentierung kühlt, sondern zu möglichst schmalen Geschwindigkeitsverteilungen führt, würde einen peak-sharpening-Effekt und Herabsetzen der Geschwindigkeitsunschärfe hervorbringen. Solch ein Effekt wird gerade für hohe Matrixgeschwindigkeiten postuliert. Die Kontrolle über diese Eigenschaften durch Matrix und/oder Ablationswellenlänge wäre sicher auch von kommerziellen Interesse. Hier wirkt es sich günstig aus, dass die Untersuchungsergebnisse bezüglich Analyteinbettung, ebenso wie diejenigen bei erhöhtem Geräteinnendruck von besserer Qualität waren.

Der Einfluss von Lösungsmiteleinfluss auf eine Herabsetzung der Ablationschwelle sollte untersucht werden.

Die Untersuchungen des Einflusses der Ablationswellenlänge sind weiterhin von großer Bedeutung. Die Fragestellung, ob der 0-0-Übergang von DHB mit 400nm überschritten wird und wie sich die Massenspektren bei Unterschreiten dieser Energieschwelle ggf.

7. Ausblick

ändern, ist weiterhin aktuell. Der Einfluss der Laserwellenlänge auf die Ablationsgeschwindigkeit ist erkennbar, seine Ursache aber noch nicht geklärt. Inwieweit die Absorptionskoeffizienten oder der Stokes'-Shift die Ablation beeinflussen, konnte nicht abschließend geklärt werden. Dies sollte nach den erfolgten Umbauten besser möglich sein.

Bei einigen Matrizes konnten teilweise bei der Postionisation Fragmente beobachtet werden. Es konnte nicht geklärt werden, ob diese aus dem Ablationsprozess oder der Photo-Postionisation selbst stammen. Die Klärung wäre möglich, wenn bei festem Ort und Delay die Postionisationswellenlänge verändert würde. Der Vergleich mit REMPI-Spektren aus Molekularstrahl-Experimenten kann dann vermutlich Aufschluss geben. Berücksichtigt werden muss, dass beim Ablationsprozess die Temperaturen im Plume wesentlich höher liegen.

In dieser Hinsicht sind Beobachtungen von Dipl. Chem. Dirk Walbrodt interessant, dass sich die Plumezusammensetzung bei unterschiedlichen Abständen bei FA ändert. Möglich wären aber auch „Quasi“-MALDI-Effekte im „dünnere“ Plume oder stoßaktivierte Prozesse. Die Ergebnisse dieser Arbeit schließen Stöße bei den vergleichsweise großen zeitlichen wie örtlichen Abständen vom Ablationsort nicht aus.

Entstammen die Fragmente der Ablation, bleibt zu klären, wie sich die Geschwindigkeiten zu denen der Matrix- oder Analytmoleküle unterscheiden. Beobachtungen deuten auf höhere Geschwindigkeiten hin. Sollte dies der Fall sein, so muss analysiert werden, ob es sich hierbei um Energieerhaltung handelt. Andernfalls müssen die Quellen für Zusatzenergien ausgemacht werden. Die kinetische Energie der postionisierten Teilchen könnten natürlich auch mit Ionenreflektoren oder Bremsfeldern näher bestimmt werden.

Die Kooperation mit der TU-Harburg (AK Prof. Dr. Müller), die aus einem anderen Projekt stammt, sollte genutzt werden, um weitere Aussagen über die Probendicke zu erhalten. Dort bestünde die Möglichkeit Elektronenrasteraufnahmen von Au-bedampften Proben anzufertigen. Solche Werte können dann mit denen aus Flugzeiten verglichen und ggf. eine Kalibration vorgenommen werden. Dies ist insoweit etwas schwierig, da einerseits die Probe durch die Postionisation verändert, andererseits durch das notwendige Bedampfen mit Au für die Postionisation unbrauchbar wird. Ein direkter Vergleich ist also nicht möglich. Lediglich eine mittlere Probendicke kann ermittelt werden.

Aus heutiger Sicht würde die gleichzeitige Detektion von Ionen- und Neutralengeschwindigkeiten aus einer Ablation die Untersuchungen abrunden. Der experimentelle Aufbau müsste dazu abermals verändert werden. Es sind allerdings zahlreiche technische Schwierigkeiten zu erwarten, so dass dieses Experiment zurückgestellt werden sollte.

7. *Ausblick*

Abschließend seien mir noch ein paar Worte gestattet. Die Untersuchungen mögen aufwendig sein, die Ergebnisse manchmal spärlich gesät,* dennoch ist es aber eine sehr interessante Thematik. Die Länge dieses Abschnitts macht (hoffentlich) mein nachhaltiges Interesse deutlich. Viele Ideen, die durch die experimentellen Erfahrungen entstanden sind, führen hoffentlich dazu, dass ich eines Tages mir doch noch eine Kartografie des Ablationsplumes über's Bett hängen darf. Über eine entsprechende email, wenn der Durchbruch geschafft ist, würde ich mich sehr freuen.

*Wenn der Laser mal wieder rumzickt, dann war da so mancher Sternenhimmel dabei, nicht Dirk?

Danksagung

Es gibt viele, denen Dank gebührt. Dennoch wird mancher vielleicht ungenannt bleiben. Sorry, im Vorraus!

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Grottemeyer, der mir den nötigen Freiraum zur Planung und Gestaltung der Experimente gelassen hat und mich immer unterstützt hat. Um es mit einem Werbeslogan auf den Punkt zu bringen: „Geht nicht, gibt’s nicht.“ Alles was vorhanden war konnte voll und frei genutzt werden. Der Rest wurde besorgt. Besonders möchte ich ihm auch für das große Vertrauen bei der Vergabe von vielen, verschiedenen Aufgaben danken. So war immer für „Spannung, Spaß und Spiel“ gesorgt, auch wenn der Zeitplan dadurch manchmal durcheinander gebracht, und das eine oder andere Mal auch eng wurde. Gerade in letzter Zeit wurde mir dafür der Rücken freigehalten.

Einen wichtigen Beitrag haben auch die technischen Mitarbeiter des Hauses zum Gelingen dieser Arbeit geleistet. Allen voran Uwe Eggers, Michael Karstens und Klaus Warns. Von allen kann ich sagen, dass sie nicht nur hilfsbereit und kompetent waren, sondern nicht nachgelassen haben, bis die Problemlösung gefunden war. Daneben halten sie unseren „wilden Haufen“ in sozio-kultureller Hinsicht zusammen und sorgen für die nötige Konstanz in der AK.

Vielen Dank allen Mitarbeitern der Werkstatt für die Anfertigungen (manchmal auch kurzfristig!) und die hohe Flexibilität.

Carsten Grun möchte ich für die Kleinigkeiten, die es nunmal zu erledigen gibt, und für die Beschaffung von Kaffee und Getränken danken. Letztere kamen zwar manchmal nicht unbedingt zeitnah mit dem Bedarf, dafür lief der „Heißdampfextraktor“ stets auf vollen Touren.

Dr. Bäther (Dräger Werke, Lübeck) möchte ich für die Unterstützung, die vielen Diskussionen, den Einblick in industrielle Abläufe und Forschung und manche Beköstigung im Oblomov danken. Dass das mit ihm durchgeführte Projekt sich hier nicht niederschlägt, hat lediglich thematische Gründe.

Nun wären eigentlich die Mitarbeiter der AK dran. Die müssen sich aber noch einen Absatz gedulden, denn zunächst möchte ich einigen Ehemaligen danken. Dr. Frank Gunzer für manch markigen Spruch, der zwar immer wieder Kopfschütteln hervorrief, aber die Atmosphäre doch stark aufgelockert hat. Dr. Marco Ehlers für manch entspannte Stunde, bevor er so unentspannt wurde. ;-) Ich kann es in letzter Zeit jedoch nachemp-

Danksagung

finden! Jetzt ist er auch noch in meiner Heimat gelandet, tsss! Dr. Bon Jun Lee, der mich nach meinem Diplom sofort versklaven wollte. Dabei habe ich nie Zweifel daran gelassen, dass das M in Microsofts MS zwar auf user-Seite läge, ich aber deshalb mit Linux arbeite. Ohne Dr. Osama Abbdel Raman wäre die Berechnung des Positionisationsortes viel später (vielleicht auch dann zu spät) realisiert worden. Dr. Andreas Uphoff danke ich für rege Diskussionen („Warum?“), den nahezu englischen, zumindest aber bissigen Humor, der uns verbindet, und das „Erbe“. Andreas, es waren ja nicht alles Nieten. Das Mini-TOF funktioniert!;-) Dr. Carsten Zechmann danke ich für den „Virus“ MALDI, die freundschaftliche Zusammenarbeit und vor allem für die zahlreichen inspirierenden Diskussionen zu späten, respektive frühen, Stunden in den gastlichen Häusern Kiels. Sie sorgten meist für die schlagartige Rückkehr aus dem artgerechten Zustand, so dass wir zur Dienstbesprechung dann leidlich fit waren. Er hat sich natürlich meist ins Praktikum verzogen. Weise Tat! Doch zeigt sein Angebot, diese Arbeit zu lesen, dass er der Wissenschaft verbunden bleibt. Leider kam es aus zeitlichen Gründen nicht mehr dazu. Ich hoffe, wir diskutieren demnächst mal wieder. Aber eher auf flüssigem Niveau:-)

Nun sind dann endlich auch die aktuellen Mitarbeiter dran. Hier gilt mein besonderer Dank Dirk Walbrodt. Weder konnte ihn das F3-Praktikum noch die Diplom-Arbeit von der MALDI abschrecken. Nebenbei hat es viel Spaß gemacht, mit ihm zu arbeiten. Ich hoffe, ich habe ihm nichts vorenthalten und genügend Ansätze für die Fortsetzung geliefert. Vielen Dank auch, für seine Erst-Filter-Funktion bei dieser Arbeit und stete Hilfe in letzter Zeit. Ach ja, und nicht dass ich irgendwann „Investment-Berater Dr. Dirk Walbrodt“ lesen muss! ;-) Zeckeriya Altug danke ich, dass er sich der Konzentration des Kaffees allmählich angepasst hat und ansonsten die Betreuung eines MOPOs selbständig in die Hand genommen hat. Letzteres gilt auch für Angela Gaber, die sich durch den Einsatz des 13er-Maulschlüssels am Mini-TOF nicht abschrecken ließ. (Wenn's ganz dumm läuft, fallen ja drei Feiern des Hauses zusammen?!) Mikko Riese danke ich vor allem für die Geduld im August 2003 (als der GCR-100 sich einfach nicht überzeugen ließ) und Januar 2004 (der Lumonics sollte ja dann bald wieder laufen!) und das Engagement, mit dem er sich in seine Projekte hineinkniet. Er hat das, was Frank vielleicht manchmal gefehlt hat: den Biss und den Willen, es wirklich von Grund auf in Ordnung zu bringen, auch wenn es dadurch zunächst evtl. etwas länger dauert. Alexandra Kulle und Timo Liebig haben ihre Experimente fernab meines Arbeitsbereiches aufgezogen, so dass die Überschneidungsbereiche auf Kaffeerunden und Veranstaltungen außerhalb der Universität meist beschränkt blieb. Diese waren aber extrem spaßig. Timo verdanken Dirk und ich die (Neu-)Einführung des Feierabendbierchens. Wenn es auch nur in einem Semester und dort nur dienstags celebriert wurde.

Tja, und dann fehlen da noch ganz viele außerhalb der Universität, denen hier Dank zu sagen wäre. Zunächst einmal danke ich meinem Vater, dass er sich nicht nur an die Materie MALDI, ToF, etc. herangewagt hat, sondern auch noch mit TeX auseinandergesetzt hat. Seine Korrekturen haben neben vielen Tippfehlern auch manch schlecht formulierten und missverständlichen Satz zu Tage gebracht. Meiner Mutter sei dafür gedankt, gerade noch in den letzten Tagen alles Störende von ihm ferngehalten zu haben. Daneben danke ich der gesamten Familie für Unterstützung in allen Lebenslagen und Verständnis für die sowohl mentale, wie auch physikalische Abwesenheit der letzten

Danksagung

Zeit.

Stellvertretend für die IT-Branche sei Malte Schmidt (CTS-Unna) erwähnt, der mich stets mit Hardware zu Sonderkonditionen versorgt hat (häufig genug per DHL, danke!). Leider ist der Kontakt so schwierig. Geh' doch mal ans Telefon oder beantworte Deine Mail! Daneben gilt es den vielen unbekanntenen Programmierern der TeX- und Linux-Community zu danken. Durch deren Software verlief zumindest die Arbeit am PC meist stress- weil absturzfrei.

Einen Teil der bisher Vergessenen (s.o.) sehe ich hoffentlich auf dem Altbierabend in UN (igitt!) oder der KiWo 2005.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1987**, *78*, 53.
- [2] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151.
- [3] A. Uphoff, *Planung und Aufbau von Flugzeitmassenspektrometern und Verwendung der Massenspektrometrie zur Konformationsanalyse*, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2002**.
- [4] W. Wiley, I. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, *26*(12), 1150.
- [5] M. M. Cordeo, T. J. Cornish, R. J. Cotter, I. A. Lys, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1356-1361**, *9*.
- [6] T. J. Cornish, R. J. Cotter, *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 4615.
- [7] A. Uphoff, T. Muskat, J. Grotemeyer, *Eur. Mass Spectrom.* **2004**, *10*, 163.
- [8] D. Ioanoviciu, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6*, 889.
- [9] E. R. Rower, R. C. Beavis, C. Köster, J. Lindner, J. Grotemeyer, E. W. Schlag, *Z. Naturforsch.* **1988**, *43a*, 1151.
- [10] A. Brock, N. Rodriguez, R. N. Zare, *Review of Scientific Instruments* **2000**, *71*(3), 1306.
- [11] W. Demtröder, *Laser Spectroscopy, Basic Concepts and Instrumentation*, 2nd enlarged edition, Springer Verlag, Heidelberg, **1996**.

- [12] R. Michael, J. Kim, W. P. Hess, R. F. J. Haglund, *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37*(6), 639.
- [13] C. Zechmann, *Spektroskopische Untersuchung der Lumineszenzerscheinungen beim UV-MALDI-Desorptionsprozeß*, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2001**.
- [14] C. Zechmann, T. Muskat, J. Grotemeyer, *Eur. Mass Spectrom.* **2002**, *8*(4), 287.
- [15] H.-C. Lüdemann, R. W. Redmond, F. Hillenkamp, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*(13), 1287.
- [16] V. Karbach, R. Knochenmuss, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 968.
- [17] M. Karas, *Chem. Rev.* **2003**, *103*(2), 395.
- [18] R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Chem. Rev.* **2003**, *103*(2), 441.
- [19] V. Bökelmann, B. Sprengler, R. Kaufmann, *Eur. Mass Spectrom.* **1995**, *1*, 81.
- [20] D. A. Allwood, R. W. Dreyfus, I. K. Perera, P. E. Dyer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1575.
- [21] D. A. Allwood, P. E. Dyer, *Chem. Phys.* **2000**, *261*, 457.
- [22] K. Krüger, *Anal Chem* **2001**, *73*(24), 5812.
- [23] R. Knochenmuss, *Analytical Chemistry* **2003**, *75*(10), 2199.
- [24] R. Zenobi, R. Knochenmuss, *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 337.
- [25] H.-C. Lüdemann, F. Hillenkamp, R. W. Redmond, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 3884.
- [26] A. Meffert, Dissertation, Universität Würzburg, **1998**.
- [27] A. Meffert, J. Grotemeyer, *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *210*(1-3), 521.
- [28] F. Claeysens, S. J. Henley, M. N. R. Ashfold, *J Appl Phys* **2003**, *94*(4), 2203.
- [29] C. D. Mowry, M. V. Johnston, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 1904.

- [30] A. Koubenakis, V. Frankevich, J. Zhang, R. Zenobi, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*(13), 2405.
- [31] K. Dreisewerd, *Chem. Rev.* **2003**, *103*(2), 395.
- [32] A. A. Puretzky, D. B. Geohegan, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *286*, 425.
- [33] T. D. McCarley, R. L. McCarley, P. A. Limbach, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4376.
- [34] A. E. Giannakopoulos, U. N. Andersen, J. R. Christie, D. J. Reynolds, P. J. Derrick, *Eur. Mass Spectrom.* **1996**, *2*, 15.
- [35] O. A. Elrahman, *Peptidcluster in der Gasphase*, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2003**.
- [36] B. H. Wang, K. Dreisewerd, U. Bahr, M. Karas, F. Hillenkamp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 393.
- [37] M. E. Belov, C. P. Myatt, P. J. Derrick, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *284*, 412.
- [38] E. Lehmann, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1483.
- [39] L. V. Zhigilei, E. Leveugle, B. J. Garrison, Y. G. Yingling, M. I. Zeifman, *Chem. Rev.* **2003**, *103*(2), 321.
- [40] A. Rohlfing, C. Menzel, L. M. Kukreja, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*(44), 12275.
- [41] G. Westmacott, W. Ens, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd, M. Schurenberg, *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *221*(1), 67.
- [42] L. V. Zhigilei, B. J. Garrison, *J. Appl. Phys.* **2000**, *88*(3), 1281.
- [43] A. Vertes, R. Gijbels, R. D. Levine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1990**, *4*, 228.
- [44] R. Knochenmuss, F. Dubois, M. J. Dale, R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 871.
- [45] R. Knochenmuss, V. Karbach, U. Wiesli, K. Breuker, R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 529.

- [46] B. Sprengler, M. Karas, U. Bahr, F. Hillenkamp, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6502.
- [47] B. J. Garrison, R. Srinivasan, *J. Appl. Phys.* **1984**, *57*, 2909.
- [48] L. V. Zhigilei, B. J. Garrison, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 1273.
- [49] L. V. Zhigilei, P. B. S. Kodali, B. J. Garrison, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 2028.
- [50] L. V. Zhigilei, P. B. S. Kodali, B. J. Garrison, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *276*, 269.
- [51] L. V. Zhigilei, P. B. S. Kodali, B. J. Garrison, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 1273.
- [52] L. V. Zhigilei, B. J. Garrison, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2845.
- [53] E. Moskovets, A. Vertes, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 3301.
- [54] T. Lippert, J. T. Dickinson, *Chem. Rev.* **2003**, *103*(2), 453.
- [55] P. Dyer, G. A. Oldershaw, J. Shidhu, *Appl. Phys. B* **1989**, *48*, 489.
- [56] S. Georgiou, A. Koubenakis, *Chem. Rev.* **2003**, *103*(2), 349.
- [57] G. Paltauf, P. E. Dyer, *Chem. Rev.* **2003**, *103*(2), 487.
- [58] E. F. Caromeand, N. A. Clark, C. E. Moeller, *Appl. Phys. Lett.* **1964**, *4*, 95.
- [59] H. Ehring, B. U. Sundqvist, *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 1303.
- [60] T. Muskat, *Untersuchungen zur Fluoreszenzdetektion bei der Matrix-unterstützten Laserdesorptions-Ionisation*, Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2001**.
- [61] G. G. Guilbault, *Practical Fluorescence*, 2 edition, Marcel Dekker Inc., New York, **1990**, pp. 148–153.
- [62] L. Bergmann, C. Schaefer, *Aufbau der Materie*, Bd. IV, Teil1, Walter de Gruyter, New York, **1975**, pp. 726–752.
- [63] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1994**, pp. 223–224.
- [64] M. Glückmann, M. Karas, *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 467.

- [65] M. Karas, U. Bahr, I. Fournier, M. Glückmann, A. Pfenniger, *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *226*(1), 239.
- [66] A. A. Puzosky, D. B. Geohegan, G. B. Hurst, M. V. Buchanan, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*(2), 444.
- [67] B. S. Luk'yanchuk, N. A. Kirichenko, A. A. Puzosky, D. B. Geohegan, *Conference on Advanced Laser Technologies*, V. I. Pustovoy, V. I. Konvov (eds.), 4070, Proceedings of SPIE, **1999**, pp. 166–181.
- [68] B. Spengler, D. Kirsch, *Int. J. Mass. Spectrom.* **2003**, *226*(1), 71.
- [69] Berkenkamp, Hillenkamp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*(3), 209.
- [70] D. Walbrodt, *Untersuchung zur Laserdesorption großer Biomoleküle*, Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2003**.
- [71] T. Huth-Fehre, C. H. Becker, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 378.
- [72] D. M. Price, S. Bashir, P. R. Derrick, *Thermochimica Acta* **1999**, *327*, 167.
- [73] J. Zhang, E. Dyachokva, T.-K. Ha, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*(35), 6891.
- [74] A. N. Krutchinsky, B. T. Chait, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*(2), 129.

Anhang

A. Aufbau-Skizzen und Triggerdiagramm

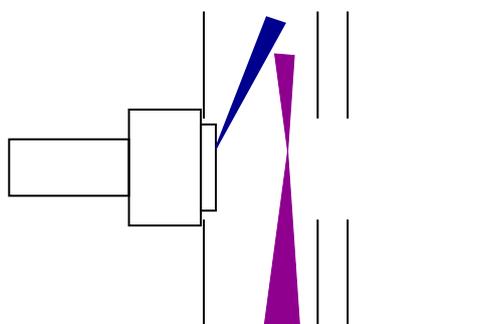


Abbildung A.1.: Schematische Darstellung des Laseralignments innerhalb der Quelle. Dargestellt (von links nach rechts): Probenträger, Repeller, Ablationslaser (blau), Positionierungslaser (violett), 1. Beschleunigungselektrode, Äquipotenzialelektrode, 0V-Platte.

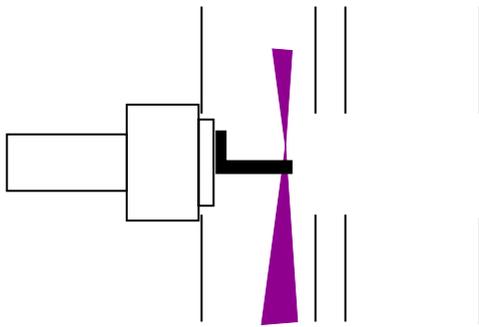


Abbildung A.2.: Schematische Darstellung der optischen Positionierungsbestimmung.

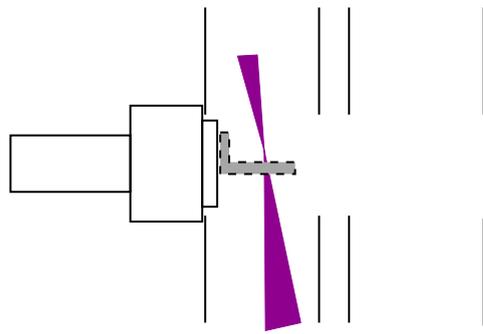


Abbildung A.3.: Optische Positionierungsbestimmung bei Nichtparallelität des Positionierlasers.

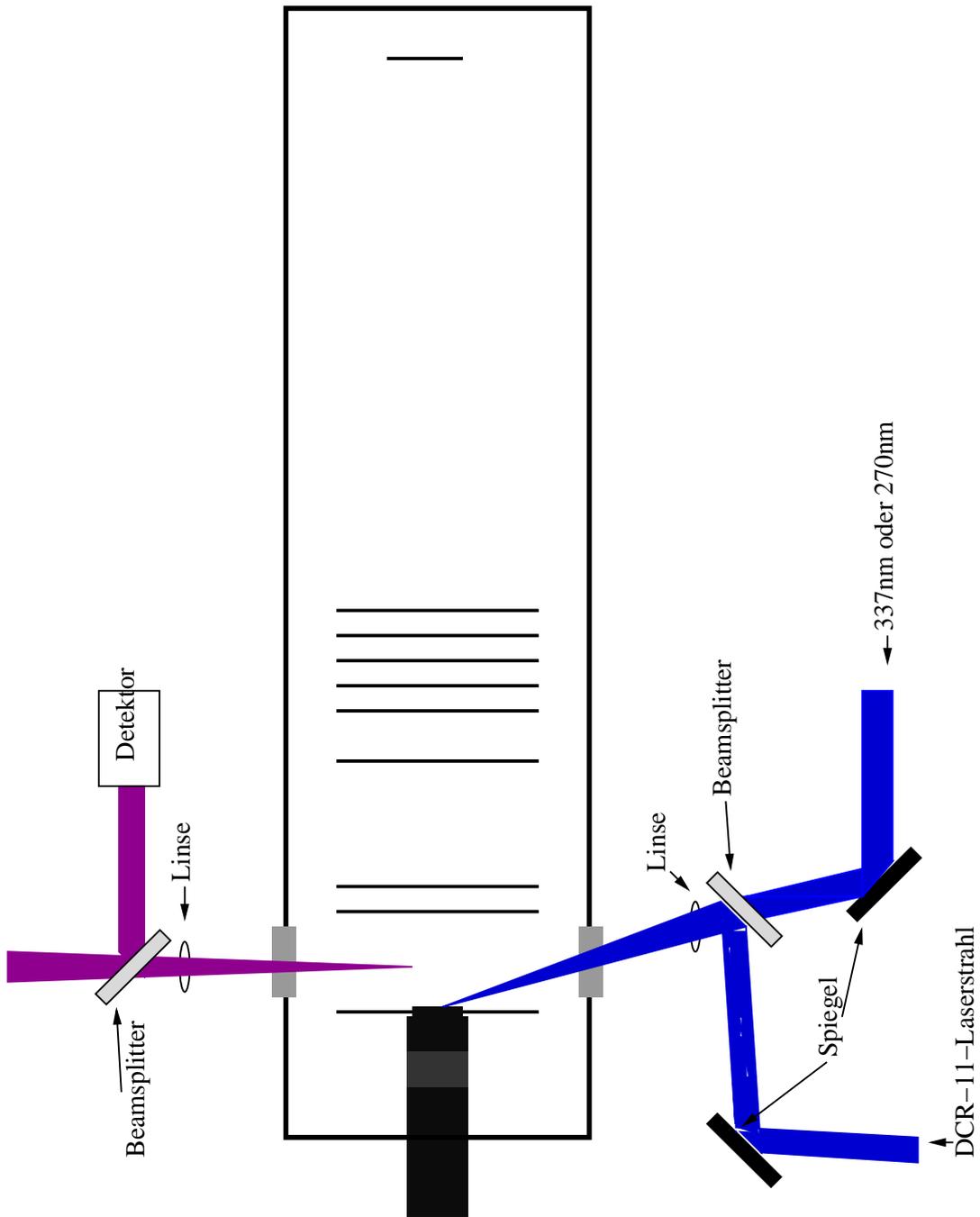


Abbildung A.6.: Verdeutlichung des Laseralignments innerhalb der Quelle.

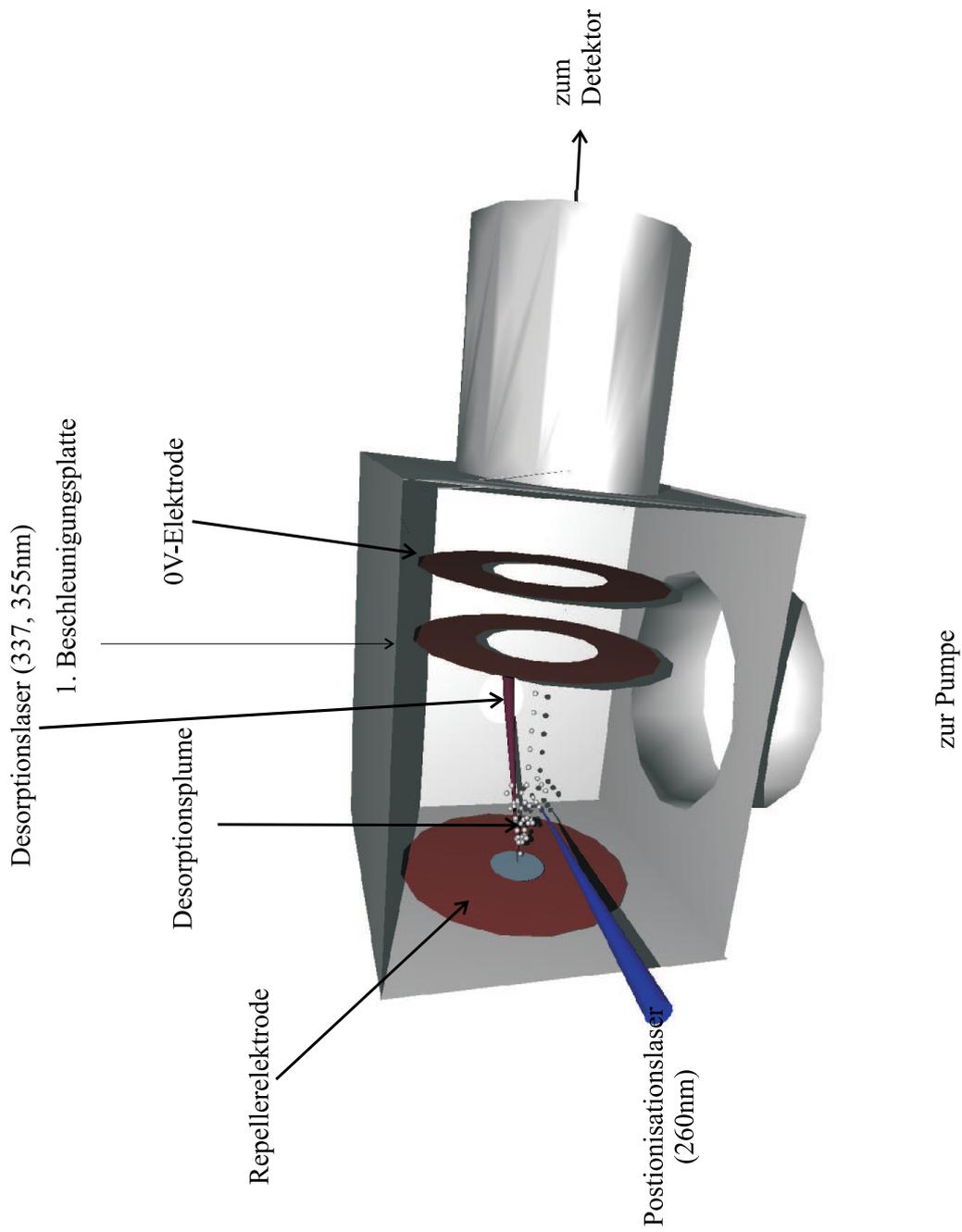
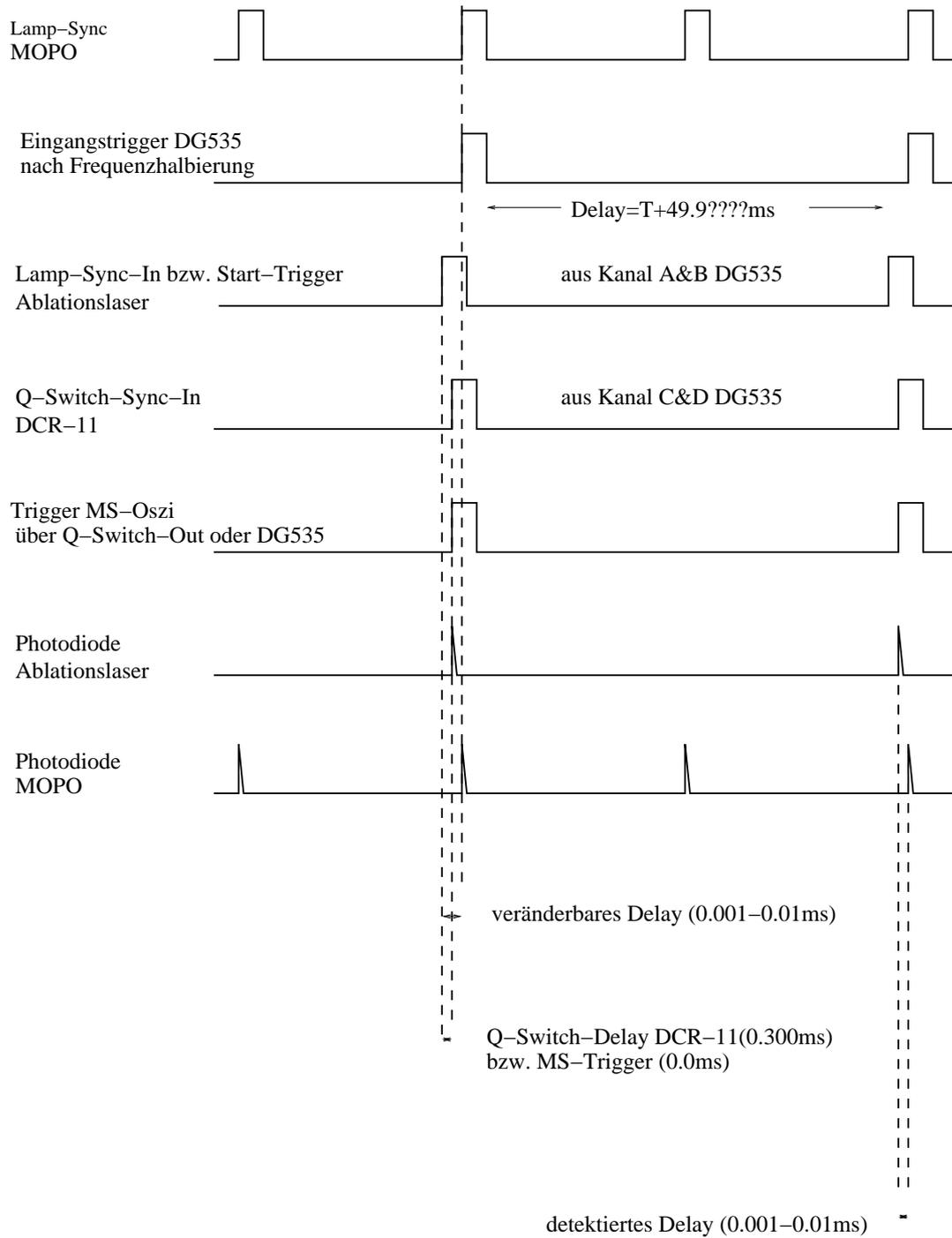


Abbildung A.7.: 3D-Ansicht der Quelle.

A. Aufbau-Skizzen und Triggerdiagramm



Achtung: Surelite I braucht negative Flanke und gibt auch eine solche als Trigger aus!

Abbildung A.8.: Triggerdiagramm für die Positionierung.

B. Datenbearbeitung

B.1. Ortsberechnung und Fehlerbetrachtung derselben

Zur Bestimmung von Positionen anhand der Flugzeit müssen die Flugzeiten und -geschwindigkeiten der Teilchen in allen Teilbereichen des TOF berechnet werden. Nur dann kann aus der Flugzeit die kinetische und damit auch die potenzielle Energie berechnet werden (Gl.B.1-B.7).

$$E_{kin} = ezU = \frac{1}{2}mv^2 \quad (B.1)$$

$$\frac{2ezU}{m} = v^2 = \left(\frac{s}{t}\right)^2 \quad (B.2)$$

$$\sqrt{\frac{2ezU}{m}} = \frac{s}{t} \quad (B.3)$$

$$t * \sqrt{\frac{2ezU}{m}} = s \quad (B.4)$$

$$\frac{s}{\sqrt{\frac{2ezU}{m}}} = t \quad (B.5)$$

$$\frac{s\sqrt{m}}{\sqrt{2ezU}} = t \quad (B.6)$$

$$U = \left(\frac{s\sqrt{m}}{t\sqrt{2ez}}\right)^2 = \frac{s^2m}{t^22ez}$$

E_{kin} : kinetische Energie; e : Elementarladung; z : Ladungszahl

U : elektrisches Potenzial; m : Masse; v : Geschwindigkeit; t : Zeit (B.7)

Im einfachen Fall startet ein Teilchen direkt am Repeller. Die Initialgeschwindigkeit hat zwar nur geringe Auswirkungen auf die Flugzeit, wurde aber mit 400m/s berücksichtigt. Iterationen diesbezüglich wurden wegen des geringen Einflusses vernachlässigt. Ein weiterer Parameter ist die Ionenbildungszeit. Hierfür wurde auf Untersuchungen von Ver-

B. Datenbearbeitung

tes zurückgegriffen.⁵³ Für DHB wurden z.B. 2ns angenommen. Der Einfluss ist vernachlässigbar, wurde aber ebenso berücksichtigt, da dadurch am Ionenentstehungsort ein minimal anderer Gradient (das Teilchen fliegt in dieser Zeit mit der Initialgeschwindigkeit, also $0.8\mu\text{m}$) herrscht. Die Berücksichtigung dieses Effekts ergibt für die Quellen- und Detektionsbereichsdurchquerung jedoch Flugzeitschwankungen unterhalb von 1ns. Damit liegen die Schwankungen unterhalb der Kanalbreite des Oszilloskops. Der Einfluss der Genauigkeit der Initialgeschwindigkeit und der Ionisationszeit auf den Fehler in der Bestimmung des Positionsortes ist somit gering. Durch den Potenzialgradienten in der ersten Beschleunigungsstufe werden die gebildeten Ionen beschleunigt und erreichen eine Endgeschwindigkeit v_1 . Zur Durchquerung dieses Bereichs benötigen sie die Zeit t_1 . Aus der Beziehung zwischen potenzieller, elektrischer und kinetischer Energie im TOF (vgl. 2.1.1, Gl.B.1-B.7) können durch Umstellung und Lösung der quadratischen Gleichungen für die Zeit die Gl.B.8 und für die Geschwindigkeit die Gleichung Gl.B.9 gefunden werden.

$$t_1 = -v_0 * \frac{d_1 * m}{ezG_1 * d_1} + \sqrt{\left(\frac{v_0 * d_1 * m}{ezG_1 * d_1}\right)^2 + 2 * \frac{d_1^2 * m}{ezG_1 d_1}} \quad (\text{B.8})$$

$$v_1 = v_0 + \sqrt{\frac{2ezG_1 d_1}{m}}$$

v_0 : Initialgeschwindigkeit; d_1 : Abstand Ionisationsort \rightarrow Beschleunigungsplatte 9.5-xmm
 G_1 : Potenzialgradient 545.3V/mm (B.9)

Der zweite Abschnitt stellt idealisiert eine feldfreie Flugstrecke dar. Sie ist Repellerseitig mit einem Gitter versehen, wird jedoch auf der zum Flugrohr zugewandten Seite nur durch eine Ringelektrode begrenzt. Beide Elektroden liegen auf gleichem Potential. Diese Region wird im rechnerischen Verfahren als feldfreie Strecke behandelt. Die Geschwindigkeit in dieser Strecke ist somit gleich der Endgeschwindigkeit in der ersten Region. Die Zeit (t_2) errechnet sich aus dem Quotienten der Strecke (6.8mm) und der Geschwindigkeit. Für den letzten Abschnitt wird Gl.B.8 mit der Endgeschwindigkeit der ersten Region als v_0 berechnet und es ergibt sich t_3 . Dabei sind der andere Gradient und die anderen geometrischen Verhältnisse in dieser Region zu berücksichtigen ($G_2=571.1\text{V/mm}$; $d_2=13.5\text{mm}$). Die Summation der Einzelzeiten liefert die Quelledurchquerungszeit t_{ges} . Diese Zeit muss bei der Ablationsortberechnung von der Gesamtflugzeit abgezogen werden. Die Zeiten für die einzelnen Matrizes sind in Tabelle B.1 ($\text{M}+\text{H}^+$) zusammengefasst. Da zu diesem Zeitpunkt der Ablationsort ungewiss ist,

B. Datenbearbeitung

sind diese Werte allerdings fehlerbehaftet. Eine Verlagerung des Ionisationsortes um 0.2mm in Richtung Beschleunigungselektrode schlägt sich in einer Änderung der Quelledurchquerungszeit von 0.6ns nieder.

Die Geschwindigkeit nach der Quelle kann dagegen einfacher aus der gesamten potenziellen Energie und der Initialgeschwindigkeit nach Gl.B.10 berechnet werden.

$$v_2 = v_0 + \sqrt{\frac{2ezG_1d_1 + G_2d_2}{m}}$$

G_2 : Gradient in der 2. Beschleunigungsstrecke
 d_2 : Länge der zweiten Beschleunigungsstrecke (B.10)

Für die Postionisation muss noch die andere Ionisationsart berücksichtigt werden. Daher weisen diese Ionen zumeist eine andere Masse als die prompten Ionen auf. Dieser Effekt überwiegt den Abstandseffekt.

Initial wurde von 1.5mm Postionisationsabstand ausgegangen. Jedoch waren dies zunächst nur Abschätzungen aus optischen Daten und ersten rechnerischen Näherungen. Die damit berechneten Quelledurchquerungs- und im Folgenden noch beschriebenen Detektionsbereichsdurchquerungszeiten wurden genutzt, um Ablations- und Postionisationsort näherungsweise zu bestimmen. Der ermittelte mittlere Abstand der jeweiligen Messserie wurde dann zur erneuten Berechnung der Zeiten benutzt. Ebenso wurde mit den Zeiten zur Durchquerung des Detektionsbereichs verfahren. Dieser schließt sich der feldfreien Flugstrecke an. Zum Flugrohr wird diese Region durch ein geerdetes Gitter begrenzt. Abschluss bildet die auf hohem negativen Potenzial liegende MCP. Daher erfolgt in dieser Region ebenfalls eine Beschleunigung. Mit Gl.B.8 kann die Zeit für die Durchquerung berechnet werden. Hierzu wird die Endgeschwindigkeit nach der Quellenregion als Initialgeschwindigkeit eingesetzt. Wiederum sind der Abstand und der Potenzialgradient entsprechend einzusetzen ($G_D * d_D = 2300V$). Für die einzelnen Spezies können auch diese Daten der Tabelle B.1 entnommen werden.

Sind nun Quelledurchquerungszeit, Zeit zur Durchquerung der Beschleunigungsregion vor dem Detektor und Länge des Flugrohres bekannt, kann aus den Flugzeiten der Massensignale der jeweilige Ort der Ionisation berechnet werden. Im Falle der prompten Signale ist dies annähernd auch der Ort der Ablation (s.o.). Bei den Postionisationsignalen dagegen handelt es sich um den Postionisationsort. Bei diesen Daten muss natürlich das Delay der Laser berücksichtigt werden. Ein durch das Ansteuern der Laser und des Oszilloskops bedingter Laufzeitunterschied muss ebenfalls jeweils abgezogen

B. Datenbearbeitung

werden. Im Fall des DCR-11 und des Surelite sind es 100ns und im Fall des N₂-Lasers 600ns. Mit Gl.B.7 kann dann der Ablationsort bzw. der Positionierungsort berechnet werden. Dazu wird zunächst die Flugzeit in der freien Driftstrecke berechnet (Abzug aller angeführten Zeiten von der Flugzeit). Als Quotient aus Flugrohrlänge und dieser bereinigten Flugzeit wird die Geschwindigkeit erhalten. Mit Gl.B.7 wird dann das Potenzial, das zum Zeitpunkt der Ionisation herrschte, berechnet. Zusammen mit dem Potenzialgradienten der ersten Beschleunigungsstrecke sind dann die Ionisationsorte zugänglich. Da der Positionierungsort durch den Laserjitter von Ablations- und Positionierungslaser beeinträchtigt wird, wurde hier, wie schon erwähnt, eine Mittelung über die jeweilige Messserie durchgeführt. Für den Ablationsort gilt dies nicht, da hier die Aufzeichnung des Massenspektrums durch den Laserpuls gestartet wird.

Für die Untersuchung bei verschiedenen Abständen mussten selbstverständlich alle Zeiten für jeden Abstand neu berechnet werden. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle B.1 dargestellt.

Wie schon erwähnt sind einige Fehlerquellen in den Berechnungen zu berücksichtigen. Die Potentiale sind hinreichend genau bekannt. Die Berechnung der Flugrohrlänge allerdings wurde ohne Berücksichtigung der Probendicke durchgeführt. Diese war zu dem damaligen Zeitpunkt nicht bekannt. Hier ergibt sich ein systematischer Fehler. Weiterhin sind die Strecken der einzelnen Abschnitte den technischen Daten des Massenspektrometers entnommen. Während dies auf die Gesamtgeschwindigkeit keinen Einfluss hat, kann es sehrwohl zu Abweichungen in den Quellendurchquerungszeiten kommen. Weitere Fehlerquellen sind zum Beispiel die ermittelten Peakzeiten. Die Kanalbreite des Oszilloskops ist ausreichend schmal, da durch die limitierende Ortskorrektur ohnehin recht breite Peaks erhalten werden. Die Auswertung stellt hier den größten Unsicherheitsfaktor dar. Eine Fehleranalyse kann also nur eine Abschätzung sein. Dennoch ist der grundsätzliche Ansatz nach Gl.B.12 gegeben.

Zur Berechnung des Positionierungsortes wird zunächst die Spannung berechnet, die an diesem Ort zur Zeit der Ionisation geherrscht hat. Der Fehler dieser Berechnung setzt sich aus einem zeitlichen und einem örtlichen zusammen.

$$F(U) = \left[\left(\frac{\partial U}{\partial t} \right) \Delta t + \left(\frac{\partial U}{\partial s} \right) \Delta s \right] \quad (\text{B.11})$$

$$\frac{\partial U}{\partial t} = -2 \frac{s^2 m}{t^3 2 e z} = -1462852920 \frac{m^2 kg}{s^3 C} = \frac{V}{s} \quad (\text{B.12})$$

$$\frac{\partial U}{\partial s} = 2 \frac{s m}{t^2 2 e z} = 11866 \frac{m kg}{s^2 C} = \frac{V}{m} \quad (\text{B.13})$$

B. Datenbearbeitung

Matrix	Abstand / mm	Spezies	m/z	$t_{ges} / \mu s$	$t_{Detektor} / \mu s$
DHB	1.4	[M+H] ⁺	155.15	0.4429	0.0823
		M ⁺	154.14	0.4375	0.0842
		[M-OH] ⁺	137.13	0.4167	0.0774
		[M-H ₂ O] ⁺	136.12	0.4113	0.0791
	1.14	M ⁺	154.14	0.4386	0.0836
		[M-H ₂ O] ⁺	136.12	0.4123	0.0786
	0.94	M ⁺	154.14	0.4392	0.0832
		[M-H ₂ O] ⁺	136.12	0.4128	0.0782
SA	1.4	[M+H] ⁺	226.23	0.5345	0.0993
		M ⁺	225.23	0.5283	0.1017
		[M-OH] ⁺	208.22	0.5129	0.0953
		[M-H ₂ O] ⁺	207.21	0.5068	0.0976
Dithranol		[M+Na] ⁺	249.22	0.5608	0.1042
		[M+H] ⁺	227.24	0.5356	0.0995
		M ⁺ prompt	226.23	0.5345	0.0993
		M ⁺ Postion	226.23	0.5294	0.1019
FA		[M+H] ⁺	195.19	0.4967	0.0923
		M ⁺	194.19	0.4908	0.0945
		[M-OH] ⁺	177.18	0.4733	0.0879
		[M-H ₂ O] ⁺	176.17	0.4676	0.09
Chrysen	1.4	[M+H] ⁺	229.30	0.5389	0.0996
		M ⁺ prompt	228.29	0.5377	0.0994
		M ⁺ Postion	228.29	0.5318	0.1024

Tabelle B.1.: Quellen- und Detektorregiondurchquerungszeiten.

B. Datenbearbeitung

Verfolgt man diesen Ansatz, so kommt man mit einer Flugrohrlänge von 2.043m, den Flugzeiten aus einem DHB-Spektrum und einem zeitlichen Fehler von 20ns auf einen Spannungsfehler von 29V aus dem ersten Term. Dabei setzt sich die Abschätzung des zeitlichen Fehlers aus der Summation von Laserjitter (10ns), Peakbestimmungsfehler (5ns) und etwaiger Fehler in den Berechnungen der Durchquerungszeiten (5ns) zusammen. Der zweite Term ergibt mit einem Fehler von 3mm einen Wert von 36V. Der Ortsfehler wurde abgeschätzt. Berücksichtigt wurde, dass die Flugrohrlänge mit einer Genauigkeit von 1mm aus verschiedenen Datensätzen (mehrere Proben von Dithranol und CCA) berechnet werden konnte, aber dabei die Probendicke unbekannt blieb. Die Erhöhung des Fehlers ergibt sich aus einer Beispielrechnung unter Abschätzung der Probendicke. Der Gesamtspannungsfehler beläuft sich somit auf 65V.

Die am Ort der Ionisation herrschende Spannung ergibt sich aus Potenzialgradient und Strecke. Der Fehler der Strecke ist daher nach Gl.B.15 vom Spannungsfehler abhängig.*

$$s = \frac{U(s)}{G} \quad (\text{B.14})$$

$$F(s(U)) = \left[\frac{\partial s}{\partial U(s)} \right] \Delta U \quad (\text{B.15})$$

$$\frac{\partial s}{\partial U(s)} = \frac{1}{G} = 1.834 * 10^{-6} \frac{m}{V} \quad (\text{B.16})$$

Mit dem obigen Fehler für die Spannung ergibt sich somit ein Fehler von 0.12mm für den Ort. Würde nur der Ortsfehler der berechneten Spannung auf die Varianz der Flugrohrlänge beschränkt, so ergäbe sich ein Fehler von 0.08mm. Für die Bestimmung der von den Neutralen durchflogenen Strecke schlägt sich eine fehlerhafte Flugrohrlänge in beiden Berechnungen (Ablationsort und Positionisationsort) nieder. Der Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit, und damit Energie, und Zeit ist reziprok. Dennoch erscheint es auch auf Grund der ansonsten großzügigen Ansetzung von Fehlerwerten zulässig, mit dem kleineren Fehler zu rechnen. Dies gilt insbesondere, da der Fehler aus der Streuung der Intensitäten nicht abgeschätzt werden kann und der wirkliche Fehler der Verteilungsmaxima ohnehin größer ist. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte und dem fehlenden Jitter bei der Ablationsortbestimmung ergibt sich der ortsbedingte Fehleranteil am Geschwindigkeitswert zu 36 m/s.†

*Maßgeblich sind hier nur der Gradient und die Strecke der ersten Beschleunigungsregion. Die Potenzialdifferenz der zweiten wird von der berechneten Gesamtspannung am Ionisationsort abgezogen.

†Berechnet für FA bei einem Positionisationsabstand von 1.4mm und einem Verteilungsmaximum

B.2. Datenverarbeitung

Die Datenaufbereitung muss derzeit noch durch zahlreiche Einzelschritte erfolgen. Der automatischen Verarbeitung steht auch deren fehlender, bewertender Charakter entgegen. Einige Arbeitsschritte entstehen durch die Verwendung spezieller Programme wie z.B. xmgrace. Die vom Labview-Programm „getMS_post“ abgespeicherten Daten müssen daher für die Verwendung mit xmgrace konvertiert werden. Exponenten dürfen kein „+“-Zeichen enthalten. Des Weiteren wird eine englische Notation der Dezimalstellen erwartet. Der Export aus dem Labview-Programm erfolgt jedoch gemäß den Systemeinstellungen meist in deutscher Notation. Weiterhin müssen FDO-Daten von den Massenspektren getrennt werden. Sie werden in getrennten Dateien gespeichert. Die FDO-Daten erhalten dafür das Prefix „m“ für MOPO. Zur Reduzierung der Daten können die ersten $10\mu\text{s}$ verworfen werden. Lediglich bei Dithranol wird dadurch der Delay-Bereich auf Werte von größer $2\mu\text{s}$ -Delay begrenzt. Diese Schritte werden von dem batch-Skript „mstrans_post1“ (C.2.1) geleistet. Sollen die ersten 10000 Zeilen erhalten bleiben, so kann das Skript „mstrans_post“ (C.2.2) verwendet werden. Beide konvertieren die Rohdatendateien zunächst vom Windows-PC in das Unix-Format (LF+CR \rightarrow CR). Die Massenspektren werden in die Ursprungsdateien geschrieben. Es empfiehlt sich daher, vor der Bearbeitung Sicherungskopien anzufertigen.

Wird eine Auflistung aller Rohdatendateien mit Leerzeichen oder Tabulator als Trenner xmgrace übergeben, so werden diese gesammelt eingelesen. Dazu bieten sich Ausgabeumleitung und Kommandos wie ls und tr unter linux an. Unter xmgrace kann nun der Wert des Detektoroffsets mit der Funktion „Feature-extraction—y-median“ ermittelt und der erhaltene Datensatz in eine Datei exportiert werden. Das Projekt sollte jetzt gespeichert werden. Für das Skript „xmgr_base_kor“ (C.2.3) muss die letzte Zeile, eine Leerzeile, gelöscht werden. Dieses Skript ermittelt aus der Anzahl der Zeilen die Identifikationsnummer des Datensatzes mit den offsets. Anschließend wird eine Batch-Datei für xmgrace geschrieben und eine Befehlssequenz zum richtigen Aufruf ausgegeben. Hier muss lediglich noch der Name der gespeicherten Projekt-Datei angegeben werden. Nach Absetzen dieser Kommandozeile berechnet xmgrace die korrigierten Spektren. Es empfiehlt sich, diese zu speichern. Es ist dabei durchaus möglich, die Datei mit gzip zu komprimieren. Theoretisch wäre xmgrace auch zuvor in der Lage mit komprimierten Daten umzugehen. Jedoch steigt dann CPU und Speicherbedarf immens. Selbst auf gut

von 406m/s.

B. Datenbearbeitung

ausgestatteten Rechnern ist aber die Konvertierung von 200 und mehr Spektren auf einen Zug bereits sehr speicherintensiv.

Die eigentliche Datenauswertung muss nun von Hand geschehen. Dazu werden feste Regionen für die prompten Peaks definiert. Für die Postionisationsignale dagegen müssen die Regionen jeweils neu festgelegt werden. Der Einsatz von zwei Grafen nebeneinander ermöglicht ein effizientes Arbeiten. Zunächst wird das jeweilige Spektrum durch den integrierten Algorithmus gemittelt. Eine adäquate Glättung wird durch eine Mittelung von 5 Werten erhalten. Mit der Funktion „evaluate Expression“ können die Daten aus einer Region des Spektrums in den zweiten Grafen übertragen werden. Nach Autoskalierung desselben und ggf. Verwendung des Zooms kann die Peakposition mit dem Fadenkreuz aufgefunden werden. Eine automatische Suche empfiehlt sich weder unter Zeit- noch Genauigkeitsaspekten, da keine Peak-Pattern oder Spikes berücksichtigt werden. Anschließend kann das Integral des Bereichs ermittelt werden. All diese Daten müssen für alle interessanten Peaks separat ermittelt und in eine Tabelle transferiert werden. Meist werden der MH^+ , ein weiterer prompter Peak und zwei Postionisationssignale (möglichst darunter der M^+) ausgewertet.

Abschließend müssen noch die FDO-Daten aufbereitet werden. Es werden bis zu 300 Werte gespeichert. Davon repräsentieren aber die letzten 60 in etwa die FDO-Leistung während der Aufzeichnung von 30 Einzelmassenspektren. Diese werden im TDK540 gemittelt. Das Skript „mopo.leist“ (C.2.4) extrahiert diese und schreibt sie, für xmgrace lesbar, in eine Datei mit dem Prefix „p“. Diese können analog den MS-Rohdaten in xmgrace eingelesen werden. Mit der Funktion „Feature-extraction—y-average“ wird ein Mittelwert erhalten.

Unter Verwendung der in Abschn.B.1 aufgezeigten Formeln können aus den Positionen der prompten Signale der jeweilige Startort und aus der Differenz der Peakpositionen von postionisierten Teilchen und dem Delay die Postionisations-Laserposition erhalten werden. Letztere wird zur Abschwächung des Laserjitters über alle Daten gemittelt. Aus dem Mittelwert der Postionisationslaserposition und dem jeweiligen Desorptionort wird die individuell zurückgelegte Strecke der Neutralen berechnet. Daher ist es auch nicht sinnvoll, bei der Akquisition mehr als 30 Einzelspektren zu mitteln. Die Signale werden breiter und eine Bestimmung der Peakposition wird ungenauer. Andererseits sind bei 20 Spektren die Leistungsschwankungen des MOPO noch recht stark.

Die Integrale der einzelnen Signale werden auf 1 normiert. Ebenso wird mit den FDO-Werten verfahren. Diese relativierten Daten können in xmgrace eingelesen werden. Eine

B. Datenbearbeitung

direkte Normierung erwies sich als ungünstig. Die Effekte wurden überkompensiert und die Daten eher schlechter denn besser. Der Einfluss der FDO lässt sich gut durch eine Normierung mit der Wurzel des Normierungsfaktors erfassen. Für das Matrixintegral dagegen erwies sich die 9. Wurzel als geeigneter.

C. Programme und Skripte

C.1. Labview-Program „getMS_post,,

Das in Abb.C.1 dargestellte Programm ging aus dem während der Diplomarbeit erstellten hervor. Es werden im Folgenden nur die Änderungen beschrieben. Außerhalb der während des Programmablaufs permanent laufenden Schleife werden zusätzlich eine GPIB Session für den MOPO-Controller und ein Array (Standard sind 300 Datensätze) initialisiert (Abb.C.2). Die innere Schleife fragt, solange der Boolean-Taster nicht aktiviert wird, den MOPO-Controller immer wieder mit dem Kommando „read:fdo-pwr?“ ab. Der zurückgegebene Wert wird an die nächste Position des Arrays übergeben. Sind alle Datensätze des Arrays gefüllt, wird ein neues erzeugt. Dies wird dadurch realisiert, dass die Schleife nach 300 Zyklen endet. Durch die äußere Schleife wird eine neue innere gestartet. Jeder Zyklus der inneren kann durch den Abgleich mit einem Timer nicht vor 49ms beginnen. Wird der Boolean-Taster „speichern“ aktiviert (er erhält damit den Wert FALSE), wird das Array an die äußere Schleife übergeben. Hier befindet sich im FALSE-Bereich (s.Abb.C.3) der Inhalt der inneren Schleife des Programmvorgängers. Hier wird jetzt das Oszilloskop abgefragt und ein Array geschrieben. Dieses Array wird in eine ASCII-Datei umgewandelt. An diese wird das ebenfalls umgewandelte Array der MOPO-Leistungsabfrage als letzte Zeile angehängt. Die einzelnen Leistungswerte werden durch TAB getrennt.

C. Programme und Skripte

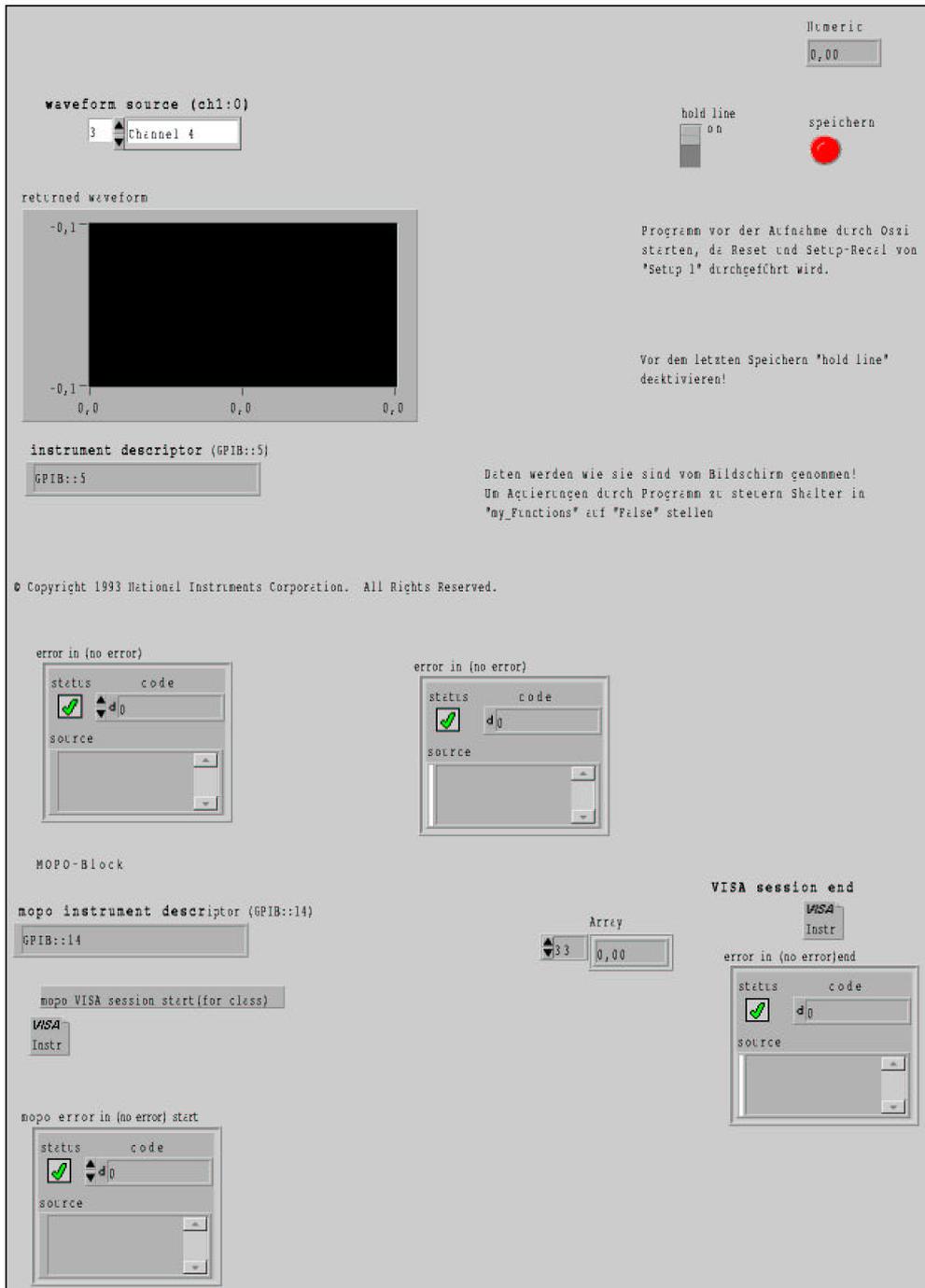


Abbildung C.1.: Bildschirmansicht des Programms `get_MS_post`.

C. Programme und Skripte

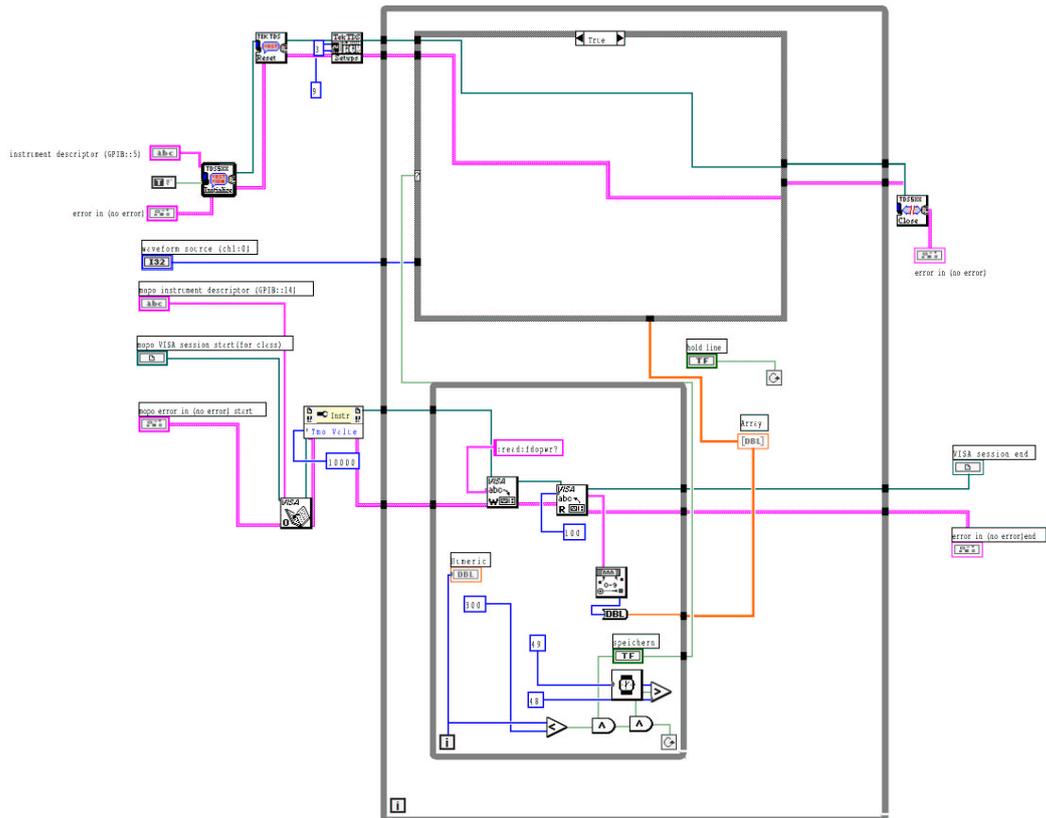


Abbildung C.2.: Ablaufschema des Programms get_MS_post.

C.2. Batchprogramme

C.2.1. Rohdatenaufbereitung durch „mstrans_post1“

```
#!/bin/bash
#maldi-postion-spektrenbearbeitung
dir=$PWD
#umsetzung dos nach unix, plus wird weggeschnitten
for i in `ls *.txt`
{
echo $i
chmod ugo+w $i
cp $i ../tmp1/$i
recode ibmpc..latin1 ../tmp1/$i
tr -d "+" < ../tmp1/$i > ../tmp2/$i
rm ../tmp1/$i
}
cd ../tmp2

#schneidet erste 10000 Zeilen weg!
for i in `ls *.txt`
{
echo $i
sed -n -e '10000,49999 p' $i > ../tmp3/$i
sed -n -e '$ p' $i > ../tmp3/m$i
rm $i
}

cd ../tmp3
for i in `ls *.txt`
{
echo $i
tr ", " "." < $i > $dir/$i
rm $i
```

```
}
```

C.2.2. Rohdatenaufbereitung durch „mstrans_post“

```
#!/bin/bash
#maldi-postion-spektrenbearbeitung
dir=$PWD
#umsetzung dos nach unix, plus wird weggeschnitten
for i in `ls *.txt`
{
echo $i
chmod ugo+w $i
cp $i ../tmp1/$i
# rm ../$i
recode ibmpc..latin1 ../tmp1/$i
tr -d "+" < ../tmp1/$i > ../tmp2/$i
rm ../tmp1/$i
}
cd ../tmp2

#letzte Zeile wird in "m"-Datei geschrieben, Rest behaelt alten Namen
for i in `ls *.txt`
{
echo $i
sed -n -e '1,49999 p' $i > ../tmp3/$i
sed -n -e '$ p' $i > ../tmp3/m$i
rm $i
}

cd ../tmp3
for i in `ls *.txt`
{
echo $i
```

```
tr "," "." < $i > $dir/$i
rm $i
}
```

C.2.3. Skript „xmgr_base_kor“ zur Basislinienkorrektur durch xmgrace

```
#!/bin/bash
#Diese Skript soll aus einem aus xmgrace exportierten Ascci-Sheet,
#das die Baseline-Daten enthält, eine Batch-Datei generieren,
#die dann mittels
# xmgrace Datei -batch erzeugte_batch_Datei
# automatisch die Sets um den Basis-Wert korrigiert
# Ascii-Sheet mittels Feature-extraction, y-median,
#letztes Set exportieren
#generieren;
#
#
echo "Bitte geben Sie den Pfad des Baseline-ASCII-Sheets an!"
read base;
i=0; #Laufvariable;
j='wc -l $base | cut -d" " -f6' #Anzahl der Zeilen im Base-;
#line-Ascci-sheet;
while 'test $i != $j'; #Schleife solange Laufvariable<Anzahl Zeilen;
do
echo "s$i.y = s$i.y - s$j.y[$i]" >> $base.bat #Batch;
# Befehl für jede Zeile in Batch-Datei schreiben;
i='expr $i + 1' # Laufvariable um eins erhöhen
done;
echo "Die Batch Datei befindet sich unter $base.bat !"
echo "Bitte geben Sie an der Kommandozeile
%xmgrace <agr-File> -batch $base.bat% ein."
# TODO: Anzahl Zeilen ums eins vermindern,
```

```
#Ende im echo-Befehl durch diese  
# ersetzen, Baseline-sheet und Batchdatei per Eingabe abfragen
```

C.2.4. Skript zur Extraktion der MOPO-Leistungsdaten.

```
#!/bin/bash  
echo "script zur extraktion der letzten Leistungsdaten"  
  
##einlesen des Verzeichnisses  
  
echo "Bitte geben Sie das Verzeichnis mit den Leistungsdaten an!"  
  
read verz  
  
echo $verz  
## einlesen des Datei-Suchmusters  
  
echo "Bitte geben Sie den Datei-Suchschlüssel an (z.B m260802??.txt)!"  
  
read pattern  
  
### einlesen der Anzahl zu extrahierender Daten  
  
echo "Bitte geben Sie die Anzahl der einzulesenden Daten an!"  
  
read anz  
  
echo "Es werden die temporären Verzeichnisse /home/muskat/postion/  
tmp/tmp1..tmp3 benötigt."  
  
tdir1=/home/muskat/postion/tmp/tmp1  
tdir2=/home/muskat/postion/tmp/tmp2
```

C. Programme und Skripte

```
tdir2=/home/muskat/postion/tmp/tmp3

path='echo $PWD'
cd $verz
for i in `ls $pattern`;##Begin Schleife für alle Suchergebnisse
{
echo $i
tr '\t' '\n' < $i > /home/muskat/postion/tmp/tmp1/$i;
##Austausch tab gegen linefeed
words='wc -w $i | tr -s " " | cut -d" " -f2';
##Anzahl der Datensätze extrahieren
echo $words
lines='expr $words - $anz';
##Differenz aus Anzahl vorhandener und gewünschter DS
if `test $lines -gt 0`;##sind genügend vorhanden?
then
sed -n -e '$lines',$ p' $tdir1/$i > $verz/p$i;
##gewünschte DS in Ursprungsdatei schreiben
else
sed -n -e '1,$ p' $tdir1/$i > $verz/p$i;
## sed -n -e '$words',$ p' $tdir1/$i > $verz/p$i;
##alle vorhandenen DS in Ursprungsdatei schreiben (könnte auch unterbleiben!)
fi
}
```

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Tassilo Muskat, dass die Dissertation „Matrixabhängiges Ablationsverhalten von Neutralen und Oberflächencharakteristika bei der Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation“, abgesehen von der Beratung meines Betreuers Prof. Dr. Dr. J. Grotemeyer, in Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Diese Arbeit war bisher weder teilweise noch ganz Gegenstand eines Prüfungsverfahrens. Teile diese Arbeit wurden an folgenden Stellen veröffentlicht:

- Tassilo Muskat, Carsten Zechmann und Jürgen Grotemeyer, Energiedissipation bei MALDI-Matrizes und Geschwindigkeitsverteilung daraus desorbierter neutraler Species, *Posterbeitrag 35. DGMS Diskussionstagung*, Heidelberg, **2002**.
- Tassilo Muskat, Carsten Zechmann und Jürgen Grotemeyer, Spektroskopische Untersuchung am MALDI-Desorptionsprozess, *Posterbeitrag Bunsentagung*, Postdam 2002.
- Tassilo Muskat, Dirk Walbrodt, Carsten Zechmann und Jürgen Grotemeyer, Untersuchungen der Desorptionsgeschwindigkeiten von Neutralen aus verschiedenen UV-MALDI-Matrizes, *Posterbeitrag 36. DGMS Diskussionstagung*, Münster, **2003**.
- Tassilo Muskat, Dirk Walbrodt, Carsten Zechmann und Jürgen Grotemeyer, Desorptionsverhalten einiger MALDI-Matrizes und die Korrelation mit spektroskopischen Daten aus LIF-Experimenten, *Posterbeitrag Bunsentagung*, Kiel, **2003**.
- Tassilo Muskat, Dirk Walbrodt und Jürgen Grotemeyer, Wavelength and time-resolved luminescence spectroscopy for investigation of matrix-assisted laser desorption process (MALDI), *Posterbeitrag 51th ASMS conference*, Montreal, **2003**.
- Tassilo Muskat, Dirk Walbrodt und Jürgen Grotemeyer, Desorptionswellenlängenabhängigkeit der Geschwindigkeiten aus verschiedenen UV-MALDI-Matrizes desorbierter Moleküle, *Posterbeitrag 36. DGMS Diskussionstagung*, Leipzig, **2004**.