

Das Ablationsverhalten von
Matrix- und Analytneutralen
im UV-MALDI-Prozess

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

vorgelegt von

Dirk Walbrodt

Kiel, im Mai 2007

Kurzfassung

Der Prozess der MALDI ist in vielerlei Hinsicht noch mit Fragen behaftet. Weder der Prozess der Ionisation noch derjenige der Desorption der Teilchen von der Probenoberfläche sind bisher zufriedenstellend geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Ablationsverhalten verschiedener gängiger Matrizes unter UV-MALDI-Bedingungen untersucht. Dabei wurde das Augenmerk auf die Ablation der Neutralteilchen gerichtet. Sie machen den quantitativ umfangreichsten Teil des ablatierten Materials aus; das Verhältnis zu den erzeugten Ionen ist 10000:1. Die Neutralteilchen waren bisher jedoch kaum Gegenstand von Untersuchungen. In dieser Arbeit wurden das Ablationsverhalten der Matrizes SA, 2,5-DHB, α -CHCA, 2,5-DHAP und FA untersucht. Durch die Nachionisation mittels eines zweiten Lasers wurden die Neutralteilchen der massenspektrometrischen Analyse zugänglich, und aus den hier gewonnenen Daten konnten charakteristische Werte wie die wahrscheinlichste Geschwindigkeit und die Breite der Verteilung, die ein Maß für die Temperatur der Ablationswolke darstellt, erhalten werden. Weiterhin wurde die räumliche Entwicklung der Ablationswolke (*plume*) untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Entwicklung des *plume* bei einem Abstand zum Desorptionort von 0,7mm abgeschlossen ist.

Die Matrix selbst ist jedoch in der Anwendung der MALDI selten von Interesse, sie ist vielmehr Mittel zum Zweck der Untersuchung des Analyten. Der Einfluss unterschiedlicher Matrizes auf den Ablationsprozess des Modellanalyten Chrysen war deswegen ein Ziel weiterer Untersuchungen. In dieser Arbeit konnte der kühlenden Prozess der Matrix auf den Analyten experimentell gezeigt werden.

In diversen Untersuchungen wurde dargelegt, dass es durch die Einbettung des Analyten in Mischungen verschiedener Matrizes zu einer signifikanten Verbesserung des Auflösungsvermögens der MALDI-Spektren kommt. Über die Ursache dieses Verhaltens war bisher wenig bekannt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es durch den Einsatz von Matrixmischungen aus den oben genannten Matrizes zu einer verbesserten Kühlung des Analyten im Vergleich zum Einsatz singulärer Matrix-Systeme kommen kann. Dieser Effekt ist jedoch stark von der verwendeten Matrixmischung und der Desorptionswellenlänge (266nm und 355nm) abhängig.

Abstract

Although MALDI is a common method for the analysis of big organic molecules as peptides, proteins or polymers, various processes, e.g. ionization and ablation, are not very well understood until now. There have been some research of the ablated materials, especially the ions, but most of the ablated material are neutral molecules. The ratio between neutrals and ions is approx. 10000:1. But the neutral molecules have not been the aim of many analysis. In this work investigations of several common MALDI-matrices (SA, 2,5-DHB, α -CHCA, 2,5-DHAP and FA) were performed. As a result the most probably velocity of the molecules and the temperature of the ablated material (plume) were received. The distributions of velocity were obtained by postionisation of the ablated material by a second laser. These results could help to determine the ablation behaviour of different MALDI-matrices. Investigations on the *plume* at different distances from the location of desorption showed an independency in *plume*-evolution from a distance bigger than 0,7mm from the surface.

In most cases MALDI is used for obtaining informations about the analyt. In the third part of this work the influence for different matrix materials of the ablation behaviour of the analyte molecule Chrysen is shown. It was found the analyte molecules undergo a stronger thermal cooling compared to the matrix molecules. The protecting effects of the matrix can be proofed.

In several experiments it was shown the analyses of big molecules can be improved by adding auxiliary material to the matrix. In most cases a better resolution of mass spectra was found. These additional material could be a salt or small organic acid. But there were also attempts to use mixtures of MALDI-matrizes. In this work it is shown that mixtures of matrices partially lead to a better cooling of analyte molecules compared to using a single matrix system. This cooling effect depends strongly on the matrix mixture and the wavelength (266nm vs. 355nm) of the laser for desorption.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen und Theorie	3
2.1	Massenspektrometer	3
2.2	Ionisationsmethoden	8
3	Der MALDI-Prozess	11
3.1	Ionisationsmechanismen	12
3.2	Ablation/Desorption	17
3.2.1	Einfluss von Wellenlänge und Pulsdauer	18
3.2.2	Pressure-pulse-Modell	19
3.2.3	Ablationsgeschwindigkeiten	20
3.3	Die MALDI-Probe	21
3.3.1	Matrix-Suppression-Effekt (MSE)	22
3.3.2	Präparationsmethoden	23
4	Experimenteller Teil	27
4.1	Probeneinlasssystem	27
4.2	Ionenquelle	28
4.3	Umbau der Ionenquelle	30
4.4	Laser	31
4.5	Postionisation	31
4.5.1	Postionisationslaser	32
4.5.2	Einkopplung des Postionisationslasers	33
4.5.3	Justage des Postionisationsortes	35
4.5.4	Postionisationsleistung	37
4.5.5	Triggerung	39
4.5.6	Einstellung des <i>delays</i>	40
4.5.7	Signalverarbeitung	41
4.6	Probenpräparation	41

4.6.1	Verwendete Matrizes und Analyte	42
4.6.2	Lösungsmittelfreie Probenpräparation	47
4.7	Bestimmung des Postionisationsortes und der Probendicke	48
4.7.1	Abstandsbestimmung	51
4.7.2	Kalibration des Massenspektrometers und Bestimmung der Drift- streckenlänge	53
4.7.3	Normierung der Flächenintegrale	55
4.7.4	Anpassung der Verteilung	57
4.7.5	Experimentelle Bestimmung der Probendicke	58
5	Ablationsgeschwindigkeiten von Matrix- und Analytmolekülen	63
5.1	Das Ablationsverhalten der Matrizes	64
5.1.1	Geschwindigkeitsverteilungen aus einfachen Matrixsystemen	66
5.1.2	Geschwindigkeitsverteilungen der Matrizes	67
5.1.3	Abstandsabhängigkeit des <i>plume</i> am Beispiel von 2,5-DHB	78
5.1.4	Geschwindigkeitsverteilungen des Analyten	79
5.2	Duale Matrixsysteme	89
5.2.1	Geschwindigkeitsverteilungen des Analyten	89
6	Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick	97
	Literaturverzeichnis	101

Abkürzungsverzeichnis

2,5-DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
α -CHCA	α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure
BBO	β -Bariumborat
CID	Collision Induced Dissociation
dd	dried droplet
DHAP	2,5-Dihydroxyacetophenon
DE	Delayed Extraction
ESI	Electro-Spray-Ionisation
ESPT	Excited State Proton Transfer
FA	Ferulasäure
HABA	[2-(4-Hydroxyphenylazo)]-Benzoesäure
HPA	Hydroxy-Picolinsäure
IE	Ionisationsenergie
ILM	Ionic Liquid Matrix
Lin-ToF MS	lineares time-of-flight Massenspektrometer
LDI	Laserdesorption/Ionisation
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MD	Moleküldynamische Rechnung
MOPO	Master Oscillator Power Oscillator
MS	Massenspektrometer
MSE	Matrix Suppression Effect
OPO	Optical Parametric Oscillator
PSPF	Post Source Pulse Focusing
ReTOF MS	Reflectron time-of-flight Massenspektrometer
SA	Sinapinsäure
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoressigsäure
ToF-MS	time-of-flight Massenspektrometer

1 Einleitung

Die Bedeutung der Massenspektrometrie hat in den letzten Jahren insbesondere im Bereich der Analytik stark an Bedeutung gewonnen. Gerade die Untersuchung von großen, schwerflüchtigen Molekülen wie Proteinen, Polymeren oder Zuckern wurde erst durch die Entwicklung neuer Verfahren wie der Elektrosprayionisation (ESI) bzw. der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) [1] als Evaporations- und Ionisationsverfahren möglich. Die grundlegende Bedeutung dieser Verfahren wurde durch die Verleihung des Nobelpreises für Chemie in 2002 an Fenn (ESI) und Tanaka (MALDI) für die Anwendungen der Massenspektrometrie in der Analytik gewürdigt. Trotz ihrer mittlerweile weit verbreiteten Anwendung sind die grundlegenden Mechanismen dieser Prozesse bis heute nicht zufrieden stellend geklärt.

Grundsätzlich kann der MALDI-Prozess in zwei Schritte unterteilt werden. Durch den Laserpuls kommt es zum einen zur Ionisation von Matrix- und Analytmolekülen, zum anderen zur Ablösung von Material (Ablation) aus der Probenoberfläche. Die Probe wird dabei in die Gasphase überführt. Teilweise ungeklärt ist bis heute, warum es trotz der hohen Energie, die in die Probe eingebracht wird, zur Überführung unzerstörter Analytmoleküle in die Gasphase kommt. Vermutungen gehen dahin, dass die Matrix den größten Teil der Energie des Laserpulses aufnimmt und den Analyten dadurch vor Zersetzung schützt.

Dieser Prozess wird vor allem durch die kurze Pulsdauer der Laserstrahlung begünstigt. Direkt nach der Anregung der Probe erfolgt eine schnelle Umverteilung der elektronischen Energie innerhalb der Matrix. Dabei kommt es in Abhängigkeit zur Wellenlänge und Pulsdauer der verwendeten Laserstrahlung zum thermischen Verdampfen der Probe (*thermal confinement*) oder zu einem druckinduzierten Ablösen der Probenoberfläche (*stress confinement*). Der Übergang zwischen beiden Prozessen ist fließend. Weiterhin ist ungeklärt, warum es trotz der hohen Laserleistung gelingt, den Analyten weitgehend unzerstört in die Gasphase zu überführen, während die Matrix einer starken Fragmentation ausgesetzt ist.

Bisher existierende Untersuchungen zeigen, dass die Energieübertragung aus der Matrix auf den Analyten begrenzt ist (*bottle neck*-Modell) [2, 3]. Dies ist ein Hinweis auf die

1 Einleitung

schützende Funktion der Matrix für den Analyten. Daraus kann auf einen „Kühleffekt“ der Matrix auf den Analyten geschlossen werden. Dieser ist, so konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, ein Charakteristikum des Ablationsprozesses. Ziel dieser Arbeit war es, den Ablationsprozess in der UV-MALDI für unterschiedliche Matrizes zu untersuchen. Neben den apparativen Parametern wie Spotdurchmesser und Pulsdauer ist das Ablationsverhalten auch im starken Maße von der verwendeten Matrix abhängig. So konnte bereits gezeigt werden, dass die verschiedenen Matrizes unterschiedliche Ablations- und Ionisationsverhalten aufweisen [4]. Bereits in mehreren Arbeiten wurden die Startgeschwindigkeiten von Matrix- und Analytionen [5, 6, 7, 8] untersucht. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Initialgeschwindigkeiten der Analytionen gelegt; diese wurden aus verschiedenen Matrizes desorbiert. Weiterhin wurden auch Untersuchungen an Standard-Matrizes wie 2,5-DHB, Sinapinsäure, Ferulasäure, α -CHCA, HPA und HA-BA durchgeführt. Allerdings wurde der größte Anteil der desorbierten Teilchen nicht untersucht: der Anteil der Ionen am gesamten ablatierten Material liegt bei 10^{-3} bis 10^{-4} .

Um den Desorptionsvorgang untersuchen zu können, bedarf es also auch der Kenntnis des Ablationsverhaltens der Neutralteilchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Matrix- und Analyssysteme betrachtet. Für die Untersuchungen wurden verschiedene übliche MALDI-Matrizes (SA, 2,5-DHB, α -CHCA, 2,5-DHAP und FA) verwendet. Deren Ablationsverhalten wurde durch die Messung der Geschwindigkeitsverteilungen der ablatierten Neutralen untersucht. Zusätzlich war der Einfluss der Matrizes auf einen Modellanalyten (Chrysen) Gegenstand der durchgeführten Experimente. Aus den Ergebnissen wurden die charakteristischen Daten der Ablationswolke wie die häufigste Geschwindigkeit sowie die Breite der Geschwindigkeitsverteilungen als Maß für die Temperatur der Ablationswolke ermittelt.

2 Grundlagen und Theorie

2.1 Massenspektrometer

Die Prinzipien der Massenspektrometer (MS) haben sich seit ihrer Entwicklung in den 1950er Jahren nicht grundlegend geändert. Der Aufbau aller gängigen Massenspektrometer ist in folgenden vier Einheiten zu sehen [9]:

- Probeneinlasssystem
- Ionenquelle
- Analysator zur Massentrennung nach dem Masse-zu-Ladungszahl (m/z)-Verhältnis
- Detektoreinheit zum Nachweis der Ionen

Weitergehende Änderungen gab es vor allem im Bereich der Überführung des Analyten in die Gasphase, dort wurden durch die Entwicklung der ESI [10] und der MALDI [1] auch große Moleküle der massenspektrometrischen Untersuchung zugänglich gemacht. Auch für die Auftrennung der gebildeten Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis kann auf unterschiedliche Arten erfolgen. Einen kurzen Überblick geben die folgenden Seiten, wobei der Schwerpunkt auf der Flugzeitmassenspektrometrie liegt.

Massenanalysatoren

Das früheste Modell unter den Massenspektrometern stellt das **Sektorfeld-MS** dar. Diese Geräte machen sich die Wirkung von elektrischen und/oder magnetischen Feldern auf geladene Teilchen zunutze. Ihr Einsatzgebiet ist in erster Linie die Aufklärung von Fragmentierungsmechanismen. Sektorfeld MS werden vor allem wegen ihres guten Auflösungsvermögens in niedrigen Massenbereichen geschätzt.

Ein sehr häufig eingesetztes Massenspektrometer ist das **Quadrupol-MS**. Es zeichnet sich durch seine hohe Zuverlässigkeit und seine einfache, kompakte Bauweise aus. Quadrupol MS werden oft in Bereichen eingesetzt, in denen nur ein kleiner Massenbereich untersucht werden soll wie z. B. in der Prozessüberwachung, der Umweltanalytik oder

auch vielen Bereichen der Sicherheit. Auch in der Strukturaufklärung finden sie ihren Einsatzbereich, da sie theoretisch beliebig kaskadiert werden können.

Insbesondere in der Isotopenforschung sowie der Analytik großer Biomoleküle ist es notwendig, eine sehr hohe Auflösung der Massenspektren zu erhalten. Dies gelingt sehr gut durch den Einsatz von **Fourier-Transform-Ionen-Cyclotron-Resonanz MS** (FT-ICR MS) [11] unter Einsatz von starken Magnetfeldern (3-14Tesla) oder auch elektrischen Feldern (Hier ist auf die neueste, auch kommerziell angewandte Entwicklung, die *Orbitrap*-Technologie [12], hingewiesen).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war jedoch die absolute Flugzeit der direkten (diese werden im Folgenden als prompte Ionen bezeichnet) bzw. der durch die Nachionisation erzeugten Ionen (Postionisationsionen) notwendig, da aus diesen Werten der Ort der Nachionisation und daraus direkt die Geschwindigkeit der ablatierten Teilchen ermittelt werden konnte. Alternative Versuchsaufbauten wie z.B. der orthogonale Abzug der gebildeten Ionen und deren Abbildung auf einem orts aufgelösten *multi-channel-plate* (MCP) sind möglich, allerdings mit sehr hohem apparativen und finanziellen Aufwand verbunden. Auch die Analyse mittels zweier TOF-MS wurde beschrieben [13]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit einem linearen TOF-MS generiert. Auf die Eigenschaften dieser Apparatur soll in den nächsten Abschnitten eingegangen werden.

TOF, ReTOF Massenspektrometer

ToF-MS (time of flight Massenspektrometer) erlauben es, im Gegensatz zu Sektorfeld und Multipol Massenspektrometern, simultan den gesamten Massenbereich einer Probe zu analysieren. Weiterhin zeichnen sie sich durch ihren einfachen Aufbau, ihre Robustheit der Elektronik und einen geringen Wartungsaufwand aus und werden daher in einem breiten Feld der Analytik verwendet.

Die TOF- (entwickelt von Cameron [14] und weiterentwickelt von Wiley [15]) bzw. ReTOF (**R**eflectron **T**ime **O**f **F**light) Massenspektrometer [16] machen sich die unterschiedliche Flugzeit von Teilchen mit gleicher kinetischer Energie und unterschiedlicher Masse zunutze. In einem ToF-Spektrometer erfolgt die Auftrennung der unterschiedlichen Massen ausschließlich aufgrund der Flugzeit. Die kinetische Energie der Ionen ergibt sich aus der Beschleunigungsspannung U_B nach:

$$E_{kin} = z * e * U_B = \frac{1}{2} * m * v^2 \quad (2.1)$$

e: Elementarladung

z: Anzahl der Ladungen

m: Masse des beschleunigten Teilchens

v: Geschwindigkeit des Teilchens

Mit folgender Formel für die Geschwindigkeit

$$v = s/t \quad (2.2)$$

wird deutlich, dass die Höhe der Beschleunigungsspannung maßgeblich für die Flugzeit der Ionen im Massenspektrometer ist. Dies begründet auch die hohen Potentiale ($\approx 20\text{kV}$), die z.B. in der MALDI-Analyse verwendet werden.

Durch Kombination von Gl. 2.1 und Gl. 2.2, Umformen und Vereinfachen erhält man folgenden Zusammenhang:

$$t \sim \sqrt{m/(U_B * z * e)} \quad (2.3)$$

Die Flugzeit der Ionen ist somit direkt proportional zur Wurzel ihres m/z -Verhältnis.

Auflösungsvermögen eines TOF MS

Von besonderer Bedeutung in der Massenspektrometrie ist das Auflösungsvermögen des Gerätes. Es ist ein Maß dafür, wie genau unterschiedliche m/z -Verhältnisse getrennt werden können. Mathematisch lässt sich das Auflösungsvermögen A durch folgende Formel beschreiben:

$$A = \frac{m}{\Delta m} \quad (2.4)$$

Hierbei ist m das mittlere m/z -Verhältnis der betrachteten Substanzen, und Δm beschreibt die Differenz zwischen den beiden m/z -Verhältnissen. Die Verbesserung des Auflösungsvermögens hat immer mehr Bereiche der Analytik für die Massenspektrometrie erschlossen. Ein bekanntes Beispiel ist die Trennung der nahezu isobaren Massen von N_2 und CO . So besitzt ersteres Teilchen im einfach geladenen Zustand ein m/z -Wert von 28,02, während letzteres einfach geladenen Ion ein m/z -Wert von 28,011 aufweist. Um diese beiden Teilchen getrennt nachweisen zu können, muss das Massenspektrometer über ein Auflösungsvermögen von mindestens 3100 verfügen. In der Praxis muss dieser Wert noch höher liegen, da die Signalbreiten noch mit einbezogen werden müssen. Durch den Einsatz von höchstauflösenden Massenspektrometern wie FT-ICR MS ist es inzwischen möglich, Strukturaufklärung an großen Biomolekülen zu betreiben, da sich die m/z -Verhältnisse in Abhängigkeit von der Primärstruktur geringfügig ändern.

Lin-ToF Geräte haben jedoch selten ein Auflösungsvermögen von mehr als einigen 100 [17]. Sie werden trotz allem häufig in der Analytik und Grundlagenforschung verwendet, da sie theoretisch in einem unendlichen Massenbereich eingesetzt werden können.

Dieser ist in der Praxis durch die Beschleunigungsspannungen, die Länge des Flugrohres und die Empfindlichkeit des Detektors ¹. Ein weiterer Vorteil ist, dass mit diesem Gerät simultan alle auftretenden Ionen detektiert werden können. Dies ist gerade im Hinblick auf die Analyse großer Biomoleküle von Bedeutung (*Proteomics*). Allerdings ist in diesem Massenbereich das Auflösungsvermögen wieder von großer Bedeutung. Die Gründe, weshalb das Auflösungsvermögen in Lin-ToF Geräten so gering ist, sollen in den nächsten Absätzen dargelegt werden. Das Auflösungsvermögen wird vor allem durch vier Faktoren bestimmt:

- Zeitunschärfe
- Ortsunschärfe
- Energieunschärfe
- Geschwindigkeitsunschärfe

Die **Zeitunschärfe** ist damit zu begründen, dass die Ionen zu unterschiedlichen Zeiten gebildet werden. Dabei spielt die Dauer der Ionisation eine große Rolle. Ionisationsmechanismen, die chemischer Art sind oder durch Stöße induziert werden, weisen eine größere Zeitunschärfe als die Laserionisation auf. Hier liegt die Anregungszeit bei wenigen Nanosekunden, abhängig von der Länge des Laserpulses. Hinzu kommen allerdings noch Reaktionszeiten für die Ionisation und ggf. Fragmentierungsschritte. Den negativen Einfluss auf das Auflösungsvermögen kann durch die Nutzung von *delayed extraction* (DE) [19] oder den Einsatz eines PSPF-Systems (s. Kap. 2.1) verringert werden.

Zur **Ortsunschärfe** kommt es, wenn die Ionisation an unterschiedlichen Orten der Ionenquelle erfolgt. In Abhängigkeit vom Ionisationsort in der Quelle werden die Ionen durch das anliegende elektrische Feld unterschiedlich stark beschleunigt. Ein gutes Auflösungsvermögen erreicht man unter anderem, wenn der Bereich der Ionisation möglichst klein ist. Diese Voraussetzung erfüllt die Laserionisation am besten. Dort können Ortsauflösungen von einigen μm erreicht werden. Verringert werden kann der Einfluss der Ortsunschärfe dadurch, dass der Detektor im Ortsfokus der Ionenquelle liegt. Apparativ ist dies jedoch kaum zu realisieren, da dieser Punkt dem doppelten Abstand von der 0V-Elektrode zum Ionenentstehungsort entspricht. Eine quasi-Verlagerung des Ortsfokusses kann durch eine mehrstufige Beschleunigungsstrecke erreicht werden. Bei dieser

¹In den gängigen Detektoren löst das auftreffende Ion durch seinen Impuls eine Elektronenkaskade aus. Diese kann beliebig verstärkt werden, und liefert das eigentlich Messsignal. Sehr schwere Teilchen haben jedoch einen geringen Impuls, da ihre Geschwindigkeit niedrig ist. Daher ist es mit den gängigen Detektoren nicht möglich, Ionen mit einem m/z von mehr 100000 zu detektieren. Durch den Einsatz von sog. Kryodetektoren [18] kann die Nachweisgrenze erniedrigt werden.

Konstruktion erfolgt der größere Teil der Beschleunigung der Ionen im zweiten Teil der Ionenquelle [15] (Zweistufige Ionenquellen werden auch häufig als „Wiley-McLaren-Quellen“ bezeichnet). Dort erfahren alle Teilchen die gleiche Beschleunigung, und der Einfluss der Ortsunschärfe wird auf die erste Beschleunigungsstrecke begrenzt. Für die MALDI liegen die üblichen Differenzen der Beschleunigungsspannungen bei einigen 100V im ersten Teil der Ionenquelle, während der Großteil der kinetischen Energie den Ionen über eine Spannung von ca. 20kV im zweiten Teil der Ionenquelle zugeführt wird.

Die **Geschwindigkeitsunschärfe** wird durch unterschiedliche Beträge und Richtungen der Geschwindigkeitsvektoren der Neutralteilchen hervorgerufen. Dabei kann es dazu kommen, dass Ionen mit unterschiedlichen m/z -Verhältnissen identische Energien besitzen, die auf der Überschneidung der Geschwindigkeitsverteilungen beruhen.

Die **Energieunschärfe** ist ein Resultat aus den unterschiedlichen Geschwindigkeiten von Neutralteilchen, aus denen die Ionen generiert werden.

Um diese Fehler weiter zu minimieren, wurden verschiedene Methoden entwickelt. Zwei davon sollen kurz vorgestellt werden:

Reflektor Unterschiedliche Flugzeiten aus der Energieunschärfe der Ionen können durch einen *Reflektor* ausgeglichen werden. Geräte, in die ein Ionenreflektor eingebaut wurde, bezeichnet man im allgemeinen als *Reflektron* oder Re-ToF Massenspektrometer. Im Reflektor werden die Teilchen durch ein Feld, dessen Potential das des Beschleunigungsfeldes übersteigt, in ihrer Flugrichtung umgekehrt, und die Teilchen verlassen den Reflektor in Richtung Detektor. Der Ausgleich unterschiedlicher Geschwindigkeiten der Ionen erfolgt durch eine von der Eintrittsgeschwindigkeit abhängige Eindringtiefe in den Reflektor. Schnelle Teilchen haben eine größere Eindringtiefe und legen damit im gesamten Re-ToF MS einen längeren Weg zurück als langsamere Teilchen. Durch eine optimale Wahl der anliegenden Spannung und der Geometrie des Reflektors wird es möglich, ein zeitgleiches Eintreffen aller Teilchen eines m/z -Verhältnisses am Detektor zu erreichen.

PSPF Das *Post Source Pulse Focussing* System ermöglicht es, die Geschwindigkeits- sowie die Zeitunschärfe von Teilchen in einem bestimmten Massenbereich zu minimieren. Diese Methode wurde explizit für lineare ToF-Spektrometer entwickelt [20, 21, 22]. Das PSPF-System ist so konstruiert, dass in ihm ein homogenes elektrisches Feld aufgebaut werden kann, dessen Potenzialgradient in Richtung des Detektors abnimmt. Dieses Feld bewirkt, dass langsame Teilchen, die im PSPF-System eine kurze Flugstrecke zurückgelegt haben, stärker beschleunigt werden, als schnelle Teilchen, die schon eine längere Strecke im PSPF-System durchfliegen haben. Es erfolgt also eine gezielte Nachbeschleunigung.

nigung der Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses. Weiterhin ist es notwendig, das PSPF-System gepulst zu betreiben, da bei konstantem Betrieb die Ionen aus der Ionenquelle gegen ein Bremsfeld anfliegen würden. Das elektrische Feld wird nur angelegt, wenn die Teilchen des gewünschten Massenbereichs sich gerade im PSPF befinden. Leichtere Teilchen sollten das PSPF bereits durchflogen haben und werden daher nicht weiter beeinflusst. Schwerere Teilchen haben das PSPF noch nicht erreicht und fliegen dann gegen ein Bremsfeld an. Ihre Flugzeiten verlängern sich, und die Auswertung der Signale dieser Teilchen wird massiv erschwert. Apparativ muss vorausgesetzt werden, dass die Möglichkeit der sehr schnellen An- und Abschaltung des elektrischen Feldes besteht. Mittels moderner Elektronik sind heute jedoch auch hohe Potenzialdifferenzen präzise und schnell schaltbar. Inzwischen wird das PSPF auch in Re-ToF Geräten eingesetzt. Weitere Konzepte sehen neuartige Geometrien der Ionenquelle vor (Scout, Bruker Daltonics, Billerica, USA). Hier sorgen per Simulationsprogramm optimierte Elektrodenformen für eine Fokussierung der Ionenwolke auf die optimale Flugachse des TOF-MS. Durch die oben angesprochenen apparativen Verbesserungen konnte die Auflösung eines TOF-MS von zwei [16] bis auf mehrere 100000 verbessert werden. Höhere Auflösungen sind theoretisch möglich, allerdings nimmt der apparative Aufwand dafür exponentiell zu. Es erscheint dann bereits sinnvoll, andere etablierte Verfahren zu verwenden.

2.2 Ionisationsmethoden

Für die Massenspektrometrie ist es unumgänglich, dass die zu untersuchende Substanz zum einen in der Gasphase vorliegt, zum anderen muss sie zwingend in geladener Form vorhanden sein. In diesem Abschnitt soll nun die Überführung der Moleküle in geladene Teilchen diskutiert werden. Zur Ionisation der vorliegenden Analytmoleküle haben sich in den letzten Jahrzehnten mehrere Verfahren etabliert. Die älteste Methode ist die **Elektronenionisation**. Hier werden die Moleküle von Elektronen ($E_{kin} \approx 70\text{eV}$) beschossen und gehen durch elektrostatische Wechselwirkungen in der Elektronenhülle in ein geladenes Teilchen über. Als weitere Verfahren seien die **Chemische Ionisation** (CI) oder auch die für die Bioanalytik bedeutende **Elektrosprayionisation** (ESI) [23] genannt. Allen Verfahren ist gemein, dass sie für die Flugzeitmassenspektrometrie weniger geeignet sind, da in diesem Verfahren der Probeneinlass und/oder die Ionisation gepulst erfolgen muss. Daher sei für diese Verfahren auf weiterführende Literatur verwiesen [9, 24]. Vorgestellt werden soll hier noch die **(RE)MPI**-Methode (*Resonance enhanced*) *Multi Photon Ionisation*, da sie neben dem MALDI-Prozess bei den hier gezeigten Experimenten als weitere Ionisationsmethode zum Tragen kommt: die REM-

PI diene zur Ionisation der desorbierten Matrix- bzw. Analytmoleküle. Bei der Multiphotonenionisation erfolgt die Ionisation des Moleküls durch mehrere Photonen. Dies gelingt durch bei hochenergetischer UV-Strahlung durch zwei oder drei Photonen, mit IR-Strahlung werden dabei durchaus 60 Photonen benötigt, bis die Ionisationsgrenze überschritten werden kann (*ladderclimbing prozess*). Dabei wird das Molekül durch ein Photon in einen angeregten Zustand (real oder virtuell) gebracht. Durch die weiteren Photonen kommt es dann zur Ionisation.

3 Der MALDI-Prozess

Die Entwicklung der MALDI geht grundsätzlich auf die Einführung von Lasern in der Analytik zurück. Durch die besonderen Eigenschaften der Laser (hohe Energiedichte, Schmalbandigkeit der emittierten Strahlung, hohe zeitliche und räumliche Kohärenz des Lichtes) zeigte sich schon früh eine breite Einsatzfähigkeit im Bereich der Physikalischen Chemie [25]. So war es erst durch den Einsatz von Lasern einfach möglich, große Moleküle aus der kondensierten Phase in die Gasphase zu überführen, sie zu ionisieren und so der Massenspektrometrie zugänglich zu machen [26]. Relativ schnell wurden auch erste Versuche unternommen, die Laserdesorption auch für komplexere Strukturen wie organische Moleküle anzuwenden [27]. Organische Substanzen zeigen aufgrund ihrer vielen Freiheitsgrade und erlaubten Energiezuständen erwartungsgemäß eine höhere Empfindlichkeit gegenüber großen Energiemengen als anorganische Substanzen. Dadurch wird die Untersuchung derartiger Substanzen mittels der Laserdesorption erschwert, allerdings konnten Kistemaker et al. zeigen, dass es auch mittels dieser Methode möglich ist, große Biomoleküle unzerstört in die Gasphase zu überführen und massenspektrometrisch nachzuweisen [27]. Dieses Verfahren war grundsätzlich erfolgreich, konnte aufgrund seiner geringen Empfindlichkeit und dem hohen Probenbedarf jedoch nicht generell überzeugen. Der eigentliche Durchbruch gelang Hillenkamp et al. im Jahre 1985 durch den Beschuss von einer Mischung zweier Aminosäuren mit Laserstrahlung im UV-Bereich [1, 28]. Die Ergebnisse zeigten, dass das die Aminosäuren in Abhängigkeit zur Laserintensität zum großen Teil unzerstört in die Gasphase überführt und ionisiert werden konnte. Damals wurden wohl die ersten MALDI-Spektren publiziert, wobei hier nicht zwischen Matrix und Analyt unterschieden werden konnte. Tanaka zeigte 1988 erstmals durch die Mischung eines Analyten mit einer Matrix, dass der Analyt als einfach- und zweifach geladenes Ion nachgewiesen werden kann [29]. In diesem Fall diente eine Mischung aus Cobaltpulver und Glycerol als Matrix. Allerdings hat sich das Konzept der Partikelmatrices bisher nicht weiter durchsetzen können, da andere Matrixsysteme in der Anwendung erfolgreicher sind.

Bei der theoretischen Beschreibung der MALDI wirkt es sich als nachteilig aus, dass es innerhalb kürzester Zeit zu vielen verschiedenen Vorgängen kommt, die teilweise simul-

tan ablaufen. Daher ist es unwahrscheinlich, dass es ein Modell gibt, welches alle Aspekte der MALDI beinhaltet. Dazu sind die Ausgangsbedingungen zu unterschiedlich: In der IR-MALDI kommt es durch die große Wellenlänge zu einem sehr tiefen Eindringen der Photonen in das Substrat, während die Eindringtiefe bei der UV-MALDI mit 50-200nm um eine Größenordnung geringer ist [30]. Auch die unterschiedlichen Wellenlängen haben grundsätzlich verschiedene Auswirkungen auf Matrix und Analyt: IR-Strahlung regt in erster Linie die OH- und NH-Streckschwingungen an (dies erklärt auch den häufigen Einsatz von Glycerol oder auch Bernsteinsäure als Matrix), und die Probe wird direkt thermisch angeregt. In der UV-MALDI kommt es vor allem zu elektronischer Anregung der Matrix durch die gute Absorption der UV-Strahlung durch das aromatische System der Matrix (s.a. Kap. 3.3). In beiden Fällen kann der MALDI-Prozess allerdings in zwei grundlegende Vorgänge unterteilt werden: den Ablationsprozess und die Ionisation. Beide Prozesse sollen, auch wenn sie gemeinsam das MALDI-Phänomen beschreiben, hier getrennt behandelt werden.

3.1 Ionisationsmechanismen

Eine besondere Stärke der MALDI-Methode ist, dass die Ablation und die Ionisation durch einen Schritt initiiert werden. Bisher existieren mehrere Modelle, mit denen sowohl die Ionisation der Matrixmoleküle als auch das Vorliegen von Analytionen erklärt werden kann. Dabei können ganz unterschiedliche Prozesse zur Ionisation der Moleküle führen. Diese Prozesse werden im weiteren Verlauf diskutiert. Grundsätzlich soll noch vorweggestellt werden, dass eine Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer Ionisation getroffen werden muss. Diese Unterscheidung ist notwendig, da die Ionisationsmechanismen (ausgenommen sei die Multiphotonenionisation) sowohl zur Bildung der Ionen aus Neutralteilchen (primäre Ionisation) als auch über Intermediate (sekundäre Ionisation) erfolgen kann. Weiterhin wird in dieser Arbeit nur der Einfluss der Positiv-Ionen-MALDI berücksichtigt, da diese den Hauptteil der MALDI-Untersuchungen darstellt. Für die speziellen Aspekte der Negativ-Ionen-MALDI sei auf die entsprechende Literatur verwiesen [31, 32].

Ein Charakteristikum der MALDI ist, dass unabhängig von der Masse der betrachteten Ionen, nur einfach geladene Teilchen entstehen. Dies ist z. B. gegenüber der ESI ein großer Vorteil, da die dort auftretende Mehrfachladungen die Spektren relativ betrachtet unübersichtlicher und komplizierter aussehen.

Multiphotonenionisation

Durch die Verwendung von Lasern ist es gelungen, gezielt Moleküle mittels Licht im sichtbaren Bereich zu ionisieren. Die hohe Photonendichte des Lasers ermöglicht die Aufnahme von mehreren Photonen innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne und kann zur Ionisation des entsprechenden Moleküls führen.



Dieser Mechanismus erscheint bei genauerer Betrachtung jedoch als nicht ausreichend für die Erklärung der Ionisation. Im Falle einer Zwei-Photonen-Ionisation muss ein angeregtes Molekül innerhalb seiner kurzen Lebensdauer (wenige ns) von einem zweiten Photon getroffen werden. Aufgrund der hohen Leistungsdichten der Laser ist dieser Vorgang wahrscheinlich. Für die UV-MALDI wäre jedoch bei Betrachtung der gängigen Desorption mittels eines Stickstofflasers ($\lambda = 335\text{nm}$) oder eines frequenzverdreifachten Nd:YAG-Lasers ($\lambda = 355\text{nm}$) aufgrund der hohen Ionisationsenergien (IE) der verwendeten Matrices (2,5-DHB besitzt als einzelnes Molekül eine IE von 8.05 eV [33], im Cluster liegt die IE bei 7.82eV [34]) jedoch ein drei-Photonen-Prozess notwendig. Dieser Mechanismus ist zwar unwahrscheinlich, nicht jedoch ausgeschlossen [35]. Desweiteren ist nicht bekannt, wie die elektronischen Zustände im Festkörper sind, da sich die bisher durchgeführten Messungen auf die Gasphase bezogen. Für die Erklärung der Multiphotonenionisation schlagen Allwood et al. [36] eine zwei-Photonen-Anregung mit anschließender thermischer Ionisation vor. Experimente mit IR-Lasern zeigen, dass hier die Multiphotonenionisation möglich ist [37]. Hier kann aufgrund der sehr hohen Photonendichten ein „ladderclimbing multiphoton process“ postuliert werden.

Verwendet man jedoch Laserstrahlung mit geringeren Wellenlängen wie z. B. den frequenzvervierfachen Nd:YAG-Laser, erscheint eine Multiphotonenionisation als Prozess möglich. Speziell bei der häufig als Matrix verwendeten 2,5 -DHB ist dieser Prozess als sehr wahrscheinlich anzusehen. Hier kann mit einem Photon bereits der S_2 -Zustand populiert werden, und eine Ionisation mittels eines zweiten Photons ist möglich.

Energiepooling

Ein weiterer Ansatz zur Erklärung der Ionisation bei der MALDI ist das *energy pooling*. Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass es sich um eine Kombination aus Multiphotonenionisation und thermischen bzw. photochemischen Prozessen handelt. Knochenmuss und Zenobi [38] schlagen zwei Modelle vor. Beide basieren auf der Vorstellung,

dass die Energie eines angeregten Matrixmoleküls M auf ein zweites angeregtes Molekül nach folgendem Mechanismus übertragen wird:



Die Ionisation kann anschließend nach zwei Mechanismen erfolgen. Liegt die Ionisierungsenergie des Matrixmoleküls niedriger als die Energie des hoch angeregten Moleküls M^{**} , erfolgt eine direkte Ionisation nach:



Im häufigen Fall, dass die Energie des angeregten Moleküls unterhalb der Ionisationsenergie liegt, können folgende Mechanismen gültig sein:



Hierbei handelt es sich um eine stoßinduzierte Ionisation hochangeregter Moleküle.



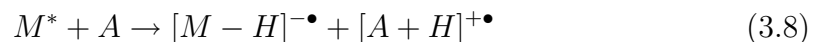
Eine weitere Reaktion kann nach obigem Mechanismus ablaufen: Das hochangeregte Matrixmolekül wird durch ein Photon oder auch durch thermischen Einfluss ionisiert. Die Ionisation des Analyten A erfolgt dann in einem zweiten Schritt nach:



Protonenübertragung

Die Rolle der Protonenübertragung als Ionisationsmechanismus wird stark diskutiert, zumal in der Ablationswolke (dem *plume*) aufgrund der zahlreichen energetisch bedingten Vorgänge verschiedene Reaktionen möglich sind. Allison et al. [39] schlagen mehrere Protonierungsreaktionen vor:

1. Säure-Base Reaktionen (*excited state proton transfer*, ESPT):

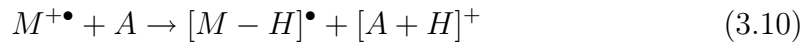
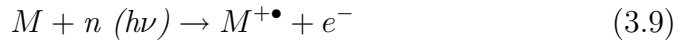


Dieser Mechanismus läuft kurz nach der Laseranregung und noch in der kondensierten Phase ab [39]. In dem Moment ist dort die Konzentration der angeregten Matrixmoleküle sehr hoch. Bei diesem Mechanismus spielt die Protonenaffinität der beteiligten Spezies eine Rolle. Noch ist unklar, welche Protonen übertragen

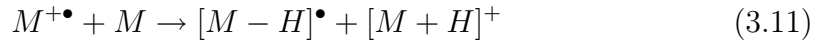
werden. So konnte Meffert [40] zeigen, dass nicht ein Carboxylproton übertragen wird, sondern die Protonierung des Analyten durch ein Hydroxylproton oder auch durch die Aminogruppe erfolgt. Aufgrund der oben genannten Erkenntnisse muss über eine Neubewertung der Säurestärke einzelner Protonen im energetisch angeregten und sich in der Gasphase befindenden Molekül nachgedacht werden.

2. Primärer/sekundärer Protonentransfer:

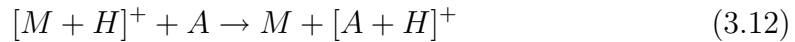
Als weiterer Protonenübertragungsmechanismus können folgende Reaktionen angesehen werden:



oder



Ausgehend vom protonierten Matrixmolekül kann noch ein zweiter Mechanismus eine Rolle spielen:



Dieser Mechanismus läuft analog zur chemischen Ionisation ab (die Ionisation erfolgt mittelbar über ein weiteres Molekül) und kann daher auch als *sekundäre Ionisation* angesehen werden. Für die MALDI spielt dieser Prozess eine wichtige Rolle. Experimente [41] und theoretische Berechnungen [42] geben sehr starke Hinweise darauf, dass dieser Prozess unter den üblichen MALDI-Bedingungen (ausgewogenes Matrix-zu-Analyt-(M/A)-Verhältnis, moderate Laserflüsse knapp oberhalb des *fluence threshold*¹) der dominierende Ionisationsmechanismus ist (s.a. Kap. 3.3.1). Die Übertragung von Protonen auf Neutralteilchen scheint angesichts zahlreicher Stoßprozesse innerhalb des sich gerade entwickelnden *plume* als sehr wahrscheinlich; die Ionen werden direkt nach ihrer Erzeugung durch die hohen statischen Felder in der Ionenquelle beschleunigt und durchqueren die zum größten Teil aus Neutralen bestehenden Ablationswolke (Verhältnis $\frac{Neutrale}{Ionen} \approx 10^4-10^5$).

¹Dieser Begriff bezeichnet die minimale Menge der eingebrachten Laserstrahlung, die notwendig ist, um den MALDI-Prozess zu starten. Siehe dazu auch Kap. 3.2

Ionisation in Clustern

Bei der *Ablation* (s. Kap. 3.2) werden große Mengen an Molekülen, Ionen, Fragmenten und auch Atomen [43] in die Gasphase überführt. Eine einfache Erklärung für das Auftreten von Ionen kann daher nicht gegeben werden. Durch die Erkenntnis, dass es sich bei den typischen MALDI-Bedingungen um eine Ablation handelt, muss auch die Ionisation innerhalb von Clustern in die Überlegungen zum Ionisationsprozess mit einbezogen werden. Wie bereits beschrieben, liegen die IE von Matrixmolekülen in Clustern niedriger als die IE von isolierten Molekülen [35]. Allerdings reicht auch in diesem Fall die Energie der Photonen aus dem häufig verwendeten Stickstofflaser (Photonenenergie: 3.68 eV) noch nicht für eine zwei-Photonenionisation aus. Weitere Ionisationsmechanismen müssen diskutiert werden:

Als einfachsten Mechanismus zum Erhalt von geladenen Clustern schlagen Karas et al. [44] vor, dass es zu einer statistischen Ladungsverteilung während des Ablationsprozesses kommt. Die Ionisation kommt durch Ladungstrennung zustande, wobei in dem abstrahierten Cluster ein Überschuss an Ionen vorliegt. Die für die Ladungstrennung erforderliche Energie stammt aus der Ablation. Die Ionisationsenergie wird außerdem durch Wechselwirkungen der Moleküle/Ionen untereinander herabgesetzt. Die Effizienz dieser Ionisation wird durch die Säure-Base Eigenschaften der beteiligten Spezies bedingt. Als Ausgangsbedingung für diesen Mechanismus wird vorausgesetzt, dass das Analytmolekül nicht als Neutralteilchen, sondern in seiner vom pKs-Wert des Systems abhängigen Form im Cluster vorliegt.

Kationisierung

Als weiteres Modell zur Ionenbildung muss die Adduktbildung mit Kationen diskutiert werden. So können von unpolaren Substanzen wie Polymeren [45] in der Regel keine protonierten Molekülionen nachgewiesen werden, hier dominieren i. d. R. die Alkalisalzaddukte. Daher wird in diesen Fällen oftmals ein Alkali- oder auch Silbersalz hinzugegeben, um die Nachweisempfindlichkeit zu erhöhen. Für Proteine (hier Gramicidin S) konnten Belov et al. [46] zeigen, dass die Kationisierung eine Gasphasenreaktion ist. Die Kationen werden von der Oberfläche desorbiert und gehen dann mit den neutralen Analytmolekülen eine Reaktion ein.

3.2 Ablation/Desorption

Ein wichtiger Aspekt für die MALDI ist der Prozess der **Ablation** bzw. der **Desorption**. Obwohl die Begriffe häufig synonym gebraucht werden, unterscheiden sich beide Prozesse [47]: Als Desorption bezeichnet man das Herauslösen eines einzelnen Teilchens aus der oberen Schicht der kondensierten Phase. Die Desorption von Oberflächen ist speziell für anorganische Verbindungen und Elemente bereits seit langem Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen und kann sehr gut als thermischer Prozess beschrieben werden. Desorption wird sehr einfach erreicht, indem einer Oberfläche thermische Energie zugeführt wird. Dann lösen sich aus ihr einzelne Moleküle oder Atome heraus und gehen in die Gasphase über. Dieser Prozess ist für den Einsatz in der organischen Analytik jedoch nicht erfolgversprechend, da der Dampfdruck der zu untersuchenden Substanzen meistens zu gering ist, um das Molekül bei moderaten Temperaturen in die Gasphase zu überführen. Dabei ist zusätzlich die Temperaturempfindlichkeit der meisten organischen Moleküle zu beachten. Daher erscheint dieses Modell nicht ausreichend, um den Übergang der Matrix- und Analytmoleküle in die Gasphase zu erklären. Für die MALDI zeigte sich jedoch, dass neben einzelnen Molekülen auch ganze Molekülverbände (Cluster) oder auch Oberflächenbruchstücke (*chunks*) auftreten können. Dieser Prozess lässt sich dann nicht mehr nur mit einem Modell beschreiben und wird dann als Ablation bezeichnet. Die Definitionen grenzen beide Prozesse sehr deutlich voneinander ab, und der Übergang von der Desorption zur Ablation konnte sowohl theoretisch als auch im Experiment gezeigt werden: Bis zu einer bestimmten Energiemenge (*fluence threshold*) ist der Prozess der Desorption vorherrschend. Außerdem zeigt sich, dass die optimalen Ergebnisse einer MALDI-Analyse knapp oberhalb des *fluence threshold* erzielt werden. Dabei ist dieser Grenzwert sehr stark von der jeweiligen Matrix abhängig und muss, wenn man sich aufwändige *molecular dynamic* (MD)-Simulationen ersparen will, für jede Matrix empirisch bestimmt werden. Wird der Wert der eingebrachten Energie zu groß, kommt es zu starken Fragmentationen von Matrix und Analyt. Weiterhin ist die Anzahl der Ionen dann so groß, dass der sogenannte *chemical noise* (vergl. Kap 3.3.1) stark ansteigt und die untere Nachweisgrenze des Analyten steigt [48]. Unterhalb der *threshold fluence* Grenze findet keine Ablation statt, und im Falle der MALDI wird es nicht gelingen, ausreichend viele Analytmoleküle in die Gasphase zu überführen, um diese zufriedenstellend nachzuweisen. Oberhalb des *fluence threshold* findet dann sowohl Ablation als auch Desorption statt. Trotz dieser starken Abgrenzung der beiden Prozesse ist der Übergang von der Desorption zur Ablation in realen Fällen fließend. Dies wird auch in den Ursprüngen der MALDI deutlich, bei der Benennung des Verfahrens wurde der Ablöseprozess aus der Oberfläche noch als Desorption angesehen. Die nähere

Untersuchung dieses Prozesses aber zeigte, dass diese Beschreibung zur Erklärung der Vorgänge nicht ausreichte. Daher werde in dieser Arbeit die beiden Begriffe synonym verwendet.

Der gesamte Ablationsprozess ist bis heute nicht richtig verstanden und schon lange Gegenstand mehrerer experimenteller [49] als auch theoretischer [50] Untersuchungen gewesen. Inzwischen existieren mehrere Ideen für die Erklärung dieses Vorgangs. Die Prozesse werden in den Modellen als thermisch, photothermisch, photochemisch, photomechanisch oder auch als Kombination daraus beschrieben. Dabei müssen viele Parameter beachtet werden. So hängt die Ablation u. a. von der Anregungswellenlänge, der Laserspotgröße, der Laserpulsenergie und der Wärmekapazität sowie -leitfähigkeit des Substrates ab. Die heute als grundlegend geltenden Prozesse sollen im weiteren beschrieben werden.

3.2.1 Einfluss von Wellenlänge und Pulsdauer

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass der Ablationsprozess in Abhängigkeit von der verwendeten Anregungswellenlänge zu sehen ist. So ist bei der Verwendung von IR-Strahlung von einem eher thermischen Prozess auszugehen, während durch den Einsatz von VIS- und insbesondere UV-Strahlung bereits photochemische Prozesse dominieren. Auch die Pulsdauer der anregenden Strahlung spielt eine große Rolle. So sollte es bei sehr kurzen Anregungspulsen eher zu einer mechanischen Ablation kommen [51], während sehr lange Pulse (mehrere 100ns) zur Zerstörung von Matrix und Analyt führen und deshalb für die MALDI keine Rolle spielen. Aus verschiedenen Experimenten, u. a. mit Wasser weiß man [52], dass es beim Beschuss mit Laserstrahlung zum schlagartigen Verdampfen der Substanz kommen kann. Ausschlaggebend hierfür ist die Menge der eingebrachten Energie, die Dauer der Exposition, der Absorptionskoeffizient und damit die Eindringtiefe der Strahlung in das Substrat. Gerade bei den in der MALDI üblichen Laserpulsen mit einer Dauer von wenigen ns treten Heizraten von ca. $10^9 K s^{-1}$ auf. Die thermische Relaxationszeit $t_{therm} \approx 10 \mu s$ der Probe ist im Vergleich zur Laserpulsdauer extrem lang (t_{therm} ist eine Materialkonstante, die sich aus der Dichte, der Wärmekapazität und der Wärmeleitfähigkeit bestimmen lässt), daher ist die räumliche Verteilung der Energie lokal stark begrenzt (*thermal confinement*). Das thermodynamische Gleichgewicht in dem Substrat ist nachhaltig gestört, die Spinodale wird überschritten, und es kommt zu einer Blasenbildung innerhalb des Festkörpers. Sind die Blasen groß genug, treten schlagartig gasförmige Moleküle aus. Dabei tritt augenblicklich eine Kühlung der Oberfläche und der Expansionswolke auf. Die starke thermische Belastung der Probe sollte das Austreten intakter Analytmoleküle aus der Probe unmöglich machen. Dies wird

in den Modellen jedoch durch weitere Ergänzungen berücksichtigt. Die oben beschriebene Kühlung kann einen ersten Grund für das Vorhandensein intakter Analytmoleküle in der Gasphase darstellen. Dies würde jedoch voraussetzen, dass der Ablationsprozess sehr viel schneller als die Fragmentierung des Analyten abläuft. Da die Fragmentierungsreaktion i. Allg. jedoch auf einer ähnlichen Zeitskala ablaufen, muss noch eine weitere Ergänzung des Modells der Phasenexplosion vorgenommen werden: Durch die geringe Konzentration des Analyten in der Matrix wird von diesem die Laserstrahlung nur in geringem Maße absorbiert. Zusätzlich sind die Absorptionskoeffizienten der Analytmoleküle im Vergleich zu dem der Matrix relativ gering. Desweiteren ist die Umverteilung der Energie auf den Analyten mittels Gitterschwingungen erschwert, da Matrix und Analyt in den meisten Fällen keinen optimalen Kristall bilden bzw. eine Kristallisation bei bestimmten Probenpräparationsmethoden [53] nicht stattfinden kann. Diese Limitierung bei der Energieumverteilung wird auch als *bottle neck*-Modell bezeichnet.

3.2.2 Pressure-pulse-Modell

Eine weitere Vorstellung für den Ablationsvorgang bietet das *pressure-pulse*-Modell. Wird auf einen Festkörper ein Impuls übertragen, setzt sich dieser innerhalb des Festkörpers in Form einer Druckwelle fort. Es entsteht in der Probe ein Kompressions- und ein Spannungspuls. Die Pulse laufen sowohl in die Probe hinein als auch in Richtung der Probenoberfläche. An den Grenzflächen kommt es jeweils zu Reflexionen der Pulse. In der MALDI entsteht dieser Druckpuls durch die lokale Erwärmung und die daraus resultierende thermische Ausdehnung des Substrates (Theoretische Berechnungen von Zhigilei [54] zeigen, dass der Spannungspuls bei der Eindringtiefe des Lasers ein Maximum erreicht). In der Probe tritt ein Spannungspuls auf, der sich durch das Substrat bewegt. Falls dieser die Reißfestigkeit des Materials (die bereits durch die thermische Einwirkung herabgesetzt sein kann) überschreitet, führt dies zum Ablösen eines Teils der Oberfläche. In der Probe selbst kommt es durch den Kompressions- bzw. Spannungspuls zu einer starken mechanischen Belastung des Substratgefüges. Es treten Risse und Spalten auf (Spallation). Diesen Prozess bezeichnet man als *stress confinement*. Das Auftreten dieser Druckpulse konnte bereits früh experimentell gezeigt werden [55]. Die theoretische Beschreibung für die UV-MALDI gelang Zhigilei [54] mittels MD-Rechnungen. Weiter konnten Rohlfing [30] und Dreisewerd [56] mittels photoakustischer Experimente nachweisen, dass dieser Druckpuls sich im Fall der Ablation aus zwei Komponenten zusammensetzt: Einem thermoelastischem Puls, der sinusförmig durch die Probe läuft, sowie einem durch die Ablation induzierten Puls, der glockenförmig ist und durch den Rückstoß des ablatierten Materials induziert wird. Durch eine

Überlagerung beider Pulse erhält man den photoakustischen Puls, der schlussendlich das Messergebnis der o. g. Arbeit darstellte.

3.2.3 Ablationsgeschwindigkeiten

Die Untersuchung der Geschwindigkeit der ablatierten Teilchen ist von grundlegender Bedeutung für das Verständnis des Ablöseprozesses und ist ein Hauptmerkmal des Ablationsvorganges. Untersuchungen des Desorptionsprozesses von Oberflächen haben gezeigt, dass die Geschwindigkeitsverteilung mittels einer Maxwell-Boltzmann-Verteilung beschrieben werden kann [47]:

$$g(v)dv \approx \left(\frac{m}{kT}\right)^2 * v^3 * \exp\left(\frac{-mv^2}{kT}\right) dv \quad (3.13)$$

mit

v: Geschwindigkeit k: Boltzmannkonstante M: Masse T: Temperatur N: Teilchenzahl

Dabei ist die Menge des ablatierten Materials stark von der eingebrachten Energie abhängig, und die Dichte des *plume* verhält sich bei der Laserdesorption umgekehrt proportional zur Pulsdauer des Lasers. Je höher die Dichte des *plume* wird, desto häufiger kommt es zu Stößen. Dabei wird die Expansion der Ablationswolke stark vorwärtsgerichtet und immer jetähnlicher [57]. Die starke Ausrichtung in eine Vorzugsrichtung konnte in mehreren Experimenten und Simulationen gezeigt werden. Dabei wurde eine Winkelabhängigkeit der Teilchenverteilung q gefunden [58], sie wird oftmals mit $q = \cos^n\theta$ dargestellt, wobei θ hier den Winkel zur Hauptflugrichtung darstellt. Diese steht orthogonal zur der Probenoberfläche. Mathematisch kann eine solche stark gerichtete Geschwindigkeitsverteilung mit einer verschobenen Maxwell-Boltzmann-Verteilung beschrieben werden, dabei sollen hier die Geschwindigkeit v in drei räumliche Komponenten v_x , v_y und v_z zerlegt werden:

$$g(v)dv \approx \left(\frac{m}{kT}\right)^2 * v^3 * \exp\left(\frac{-m * (v_x^2 + v_y^2 + (v_z - v_{stream}))^2}{kT}\right) dv \quad (3.14)$$

wobei v_{stream} als Strömungsgeschwindigkeit in Jetrichtung angesehen werden kann. v_{stream} beschreibt die Geschwindigkeit der ablatierten Schicht. Diese Beschreibung erfolgt analog zum Molekularstrahl aus [59]. Unter der bereits beschriebenen Annahme einer jetähnlichen Ausbreitung kann die Verteilung der Teilchen durch eine Abhängigkeit von Winkel und Geschwindigkeit ausgedrückt werden. Man erhält dann folgende Funktion:

$$I(v, \theta) \propto v^3 * \exp\left(-\frac{m}{2k_B} \left[\frac{(v \cos\theta - v_{stream})^2}{T_z} + \frac{v^2 \sin^2\theta}{T_{xy}} \right]\right) \quad (3.15)$$

Dabei werden zwei unterschiedliche Temperaturen, T_{xy} für die Bewegung der Teilchen parallel zur Probenoberfläche, sowie T_z als Wert für die Bewegung entlang der Flugachse erhalten. Die Temperatur in diesem Fall nicht als absoluter Wert für die Energie der Teilchen anzusehen, sondern beschreibt in dieser Arbeit die Breite der Verteilung der Translationsenergie der ablatierten Teilchen. Die gesamte Energie ablatierter Moleküle setzt sich jedoch aus den Rotations-, Vibrations- und Translationsenergien zusammen. Die ersten beiden Beträge können jedoch in diesen Experimenten nicht bestimmt werden und sind daher auch nicht Ziel der hier getätigten Untersuchungen.

Die weiter oben beschriebenen Rechnungen zur Entwicklung des *plume* zeigten dann, dass mit zunehmender Stoßzahl v_z und T_z ansteigen werden, wohingegen der Wert für T_{xy} abnehmen wird. Daraus lässt sich schließen, dass sich in den Randbereichen des *plume* langsamere Teilchen befinden, während in der Kernzone vorwiegend schnelle Teilchen auftreten. Diese schnellen Teilchen waren primär Ziel der Untersuchungen in dieser Arbeit. Aus den Werten der Geschwindigkeiten in Flugrichtung können noch weitere Schlussfolgerungen gezogen werden: Der Quotient aus v_{stream} zu v_z beschreibt den jetähnlichen Charakter der Ablation. Je näher dieser an dem Wert 1 liegt, desto jetähnlicher ist die Expansion. Dabei kommt es dann zur Kühlung der Ablationswolke. Ein Maß für die Abkühlung des *plume* liefert die Differenz von v_z und v_{stream} . Sie beschreibt den thermischen Anteil der Desorption. Eine große absolute Differenz zeigt, dass die Ablationswolke eine hohe Temperatur aufweist, wohingegen eine (theoretische) Differenz von Null eine optimale Kühlung der desorbierten Teilchen bedeuten würde. Von daher können beide Geschwindigkeiten zur Charakterisierung des ablatierten Materials, im Falle der MALDI der Matrix, dienen. Für die MALDI kann dies mehrere Bedeutungen besitzen: So kann die thermische Verteilung innerhalb der Ablationswolke trotz eines hohen Geschwindigkeitsquotienten groß sein, dies würde auf eine sehr starke Ablation und eine schlechte Kühlung des *plume* hindeuten. Hierbei käme es zur verstärkten Fragmentation des Analyten. Niedrige Ablationsgeschwindigkeiten müssen hingegen nicht zwangsläufig für eine „sanfte“ Ablation sprechen. Entscheidend für die Fragmentierung des Analyten ist eher die Differenz zwischen v_z und v_{stream} .

3.3 Die MALDI-Probe

Geeignete Matrices in der MALDI müssen mehrere Eigenschaften erfüllen:

- Die Matrixsubstanz soll unter den Bedingungen der Massenspektrometrie (Vakuum, hohe Energiedichte) noch ihre Aufgaben erfüllen können. Gerade die Vakuumbeständigkeit spielt eine große Rolle für die Verwendung von flüssigen Matrices.

- Sie soll die eingesetzte Laserstrahlung absorbieren können, damit der Ablationsprozess eingeleitet werden kann.
- Sie soll mit dem Analyten keine anderen Reaktionen als Protonierung oder Kationisierung eingehen und darf nicht zur Zersetzung des Analyten führen.
- Eine weitere Eigenschaft soll die Fähigkeit sein, auf den Analyten ein Proton übertragen zu können. Dies gelingt durch die Anwesenheit einer Säure- oder auch Hydroxylfunktion [60] (Ausnahme: Polymere, hier tritt oft eine Adduktbildung mit Alkali- oder auch Silberionen auf).
- Die früher postulierte gute Kristallisationsfähigkeit konnte durch Müllen und Trimpin [61, 53] widerlegt werden. Es ist ausreichend, wenn Analyt und Matrix innig miteinander vermischt werden.

Als Desorptionslaser dienen in der MALDI in den meisten Fällen UV-Laser, als Standard werden i.d.R. Stickstoff- (337nm) oder frequenzverdreifachte Nd:YAG-Laser (355nm) verwendet. Die IR-MALDI spielt eine untergeordnete Rolle, und VIS-Strahlung wird aus Mangel an geeigneten Matrices [62] bis heute nicht eingesetzt. Daher sollen an dieser Stelle nur Matrices für die UV-MALDI vorgestellt werden. Ihnen gemein ist der Benzolring, welcher die UV-Strahlung relativ gut absorbieren kann sowie mindestens eine Hydroxyl-Funktion, durch die die Protonierung des Analyten erfolgen kann. In der Regel handelt es sich bei diesen Matrices um Derivate der Benzoesäure oder der Zimtsäure. Aber es werden auch annellierte Benzolringe verwendet wie z. B. Dithranol (1,9,10-Trihydroxyanthracen). Aber nicht alle Substanzen, die diese Kriterien erfüllen, eignen sich in der Praxis als Matrix. So gilt 2,5-DHB als gut funktionierende Matrix, die für viele Fragestellungen geeignet ist, während 3,5-DHB für die MALDI [62] nicht geeignet ist. Ein Kriterium für die Verwendbarkeit einer Substanz für lösungsmittelbasierte MALDI 3.3.2 kann z. B. das Kristallisationsverhalten mit dem Analyten sein [63]. Weiterhin sollen die Matrices auch azide Protonen besitzen, damit eine Protonierung des Analyten leicht möglich ist. Allerdings zeigte sich, dass auch von anderen Systemen wie Anthracen grundsätzlich MALDI möglich ist [63]. Der Ionisationsmechanismus in diesem Fall muss noch aufgeklärt werden.

3.3.1 Matrix-Suppression-Effekt (MSE)

Die Anwendbarkeit der MALDI für große und sehr große Biomoleküle (bis $m/z=100.000$) konnte schon hinreichend gezeigt werden. Wünschenswert wäre jedoch auch die Möglichkeit, kleine Ionen ($m/z \leq 1000$) untersuchen zu können. Gerade in den sog. „Life Sciences“

spielen diese kleinen Biomoleküle oft eine sehr große Rolle. Allerdings finden sich systembedingt im niedermolekularen Bereich der Massenspektren vor allem die Signale der Matrix wieder. Vor allem die Fragmente, aber auch Matrixcluster treten mit einer hohen Intensität auf [41]. Die Matrixmoleküle und -fragmente können sich an die Analytmoleküle (und auch deren Fragmente) anlagern und sorgen so für eine Verbreiterung der Massensignale. Dieses wird u. a. als *chemical noise* bezeichnet [64, 65]

Ziel soll es daher sein, das Auftreten der Matrixsignale zu reduzieren. Erste Untersuchungen wurden dazu von Chan et al. [66] durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass sich bei bestimmten Matrix-zu-Analyt-Verhältnissen (M/A) (hier Nicotinsäure/Insulin, 600:1) das Matrixsignal stark verringert. Weitere Untersuchungen [67] zeigten, dass der MSE auch als Standard-Verfahren verwendet werden kann. Als Grund für das Auftreten des Effektes gilt, dass die primär gebildeten Matrixionen mit den Analytmolekülen reagieren [42] und ihr Proton auf diese übertragen (Sekundäre Ionisation). Ist das M/A nun so gewählt, dass für alle protonierten Matrixmoleküle ein Analytmolekül zur Verfügung steht, kommt es zum nahezu vollständigen Verschwinden des Matrixsignals.

3.3.2 Präparationsmethoden

Die wichtigste Methode zur Probenpräparation ist immer noch die *dried-droplet* (dd)-Präparation. Dieses Verfahren ist noch immer sehr weit verbreitet, da es mit Abstand die am wenigsten aufwändige Probenpräparation darstellt. Dabei wird die Matrixlösung mit der Lösung des Analyten vermischt (alternativ wird auch die Matrixlösung vorgelegt, und in diese eine geringe Menge der Analytlösung injiziert, *droplet-in-droplet*-Präparation) und eine kleine Menge (0.1-2 μ L) der Lösung auf den Probenträger aufgebracht. Dann wird das Lösungsmittel an der Luft oder im warmen Luftstrom vertrocknet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels kann die Probe dann analysiert werden. Als besonders nachteilig hat sich jedoch die starke Inhomogenität der so gewonnenen Proben erwiesen. Gerade bei der Präparation aus wässrigen Lösungen zeigt sich durch das langsame Verdampfen des Lösungsmittels die Bildung von großen Kristallen, an denen sich der Analyt nur anlagert, nicht jedoch einlagert. Dies führt zu Konzentrationsschwankungen in der Probe, und optimale Matrix-Analyt-Verhältnisse (*sweet spots*) werden nur selten erreicht. Gerade die Suche nach diesen Stellen auf der Probenoberfläche ist sehr zeitaufwändig und erfordert eine gewisse Erfahrung des Operators. Weiterhin führt diese Art der Probenpräparation dazu, dass quantitative Messungen nur unter besonderen Bedingungen durchzuführen sind. Dazu gab es in den letzten Jahren einige Untersuchungen [68, 69]. Allerdings musste hierzu

1. ein interner Standard zugesetzt werden, der ähnliche Kristallisationseigenschaften

wie der Analyt aufweist. Dies bedarf dann wiederum vieler empirischer Untersuchungen für die zahlreichen neuen Proteine, die dank der MALDI-Methode laufend gefunden werden.

2. die Anzahl der Laserschüsse auf die Probe stark erhöht werden, um aus dem Mittelwert aller Spektren das korrekte Analyt-zu-Standard Verhältnis ermitteln zu können. Dieser Vorgang ist zeitaufwändig.
3. die Zahl der verwendeten Matrizes stark eingeschränkt werden. Es zeigte sich [68], dass von den Standardmatrizes eigentlich nur α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (α -CHCA) für eine erfolgreiche Analyse in Frage kommt. Dies wird mit der feinkristallinen Struktur dieser Matrix begründet.

Gerade der letzte Punkt zeigt, dass die Probenpräparation von großer Bedeutung ist. Inzwischen wurden einige Verbesserungen des Verfahrens vorgeschlagen: durch die Verwendung von leichtflüchtigen Lösungsmitteln kann die Größe der Kristalle verringert werden. Garcia et al. [70] schlagen eine neue Methode vor, die *thin layer*-Präparation. Dabei wird der Analyt aus wässriger Lösung auf den Probenträger vorgelegt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wird die Matrixlösung (organisches Lösungsmittelgemisch aus Ethanol und Acetonitril) auf die Probe aufgetragen. Es bildet sich eine Matrix-Analytmischung mit erheblich verbesserter Reproduzierbarkeit.

Nicht nur die Wahl des Lösungsmittels kann zu einer Verbesserung der Probenhomogenität beitragen, auch durch Additive in der Matrix kann ein ähnlicher Effekt erzielt werden. Gängige Zusatzstoffe sind Ammoniumsulfat (Celluloseanalyse) [71] oder -citrat (DNA) [70]. Hier wird durch den Zusatz der Salze eine verbesserte Oberflächenstruktur erhalten. Oft wird dieses Verfahren auch in Kombination zur *thin layer*-Präparation eingesetzt.

Ein grundsätzlich anderes Verfahren wurde von Zenobi [72] eingeführt. Hier wird die Matrix mit dem Analyten gemischt und zu einem Pellet gepresst. Dieses als *pressed pellet*-Methode bezeichnete Verfahren wird vorwiegend für schwerlösliche Polymere wie Dendrimere, Polyamide oder auch polyzyklische Kohlenwasserstoffe (PAH) verwendet. Horneffer et al. [73] konnten die Anwendbarkeit dieses Verfahrens auf Proteine erweitern. Trimpin et al. [74, 53, 75] griffen die Idee der lösungsmittelfreien Probenpräparation auf und verbesserten die Homogenisierung der Probe durch den Einsatz einer miniaturisierten Kugelmühle. Durch Aufstäuben der erhaltenen Mischung auf den Probenträger konnten relativ reproduzierbare Massenspektren erhalten werden.

Flüssige/ionische Matrices

Die meisten verwendeten Matrices liegen systembedingt im festen Zustand vor (Ausnahme: Glycerol in der IR-MALDI). Dieses führt, wie bereits beschrieben, zu zahlreichen Problemen, vor allem bei quantitativen Messungen. Ideal wäre es, wenn das Matrix-zu-Analytverhältnis über die gesamte Probe relativ konstant wäre. Alternativ zu den oben beschriebenen Verbesserungen der Kristallisationseigenschaften wurde von Armstrong et al. [76] die Verwendung von Ionischen Flüssigkeiten (IL) [77] als Matrix beschrieben. IL sind schon seit langem bekannt und haben heute einen weiten Anwendungsbereich in der Elektrochemie, Katalyse/Synthese und nicht zuletzt der Analytik erschlossen. Zur Verwendung in der MALDI wird eine Standard-Matrix wie 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5--DHB) oder auch CHCA (die Verwendung von anderen Anionen war wenig erfolgreich) mit einer Base wie Tributylamin (TBA) oder Pyridin gemischt. Dabei entsteht eine hochviskose Flüssigkeit, die oft auch als *Ionic Liquid Matrix* (ILM) bezeichnet wird. Tholey et al. [78] konnten in ihren Experimenten zeigen, dass die Reproduzierbarkeit der Massenspektren signifikant verbessert werden konnte. Weiterhin wurde der Anteil von Matrix-Ionen zumindest im Bereich der Positiv-Ionen-MALDI stark verringert, da die eigentliche Matrix als Anion vorliegt. Die Gegenionen zeigen i. d. R. nur wenig Tendenz zu Fragmentierungen unter den gegebenen Bedingungen.

Duale Mischungen

Vereinzelt ist in den letzten Jahren das Konzept von Matrixmischungen ausprobiert und angewendet worden. Die erste Matrixmischung wurde von Karas et al. 1993 [44] vorgeschlagen und ist unter dem Namen „Super-DHB“(sDHB) bekannt. Bei dieser Mischung aus 2,5--DHB und 2-Hydroxy-5-methoxy-Benzoesäure im Verhältnis 9:1 konnte eine erheblich verbesserte Empfindlichkeit gegenüber der Verwendung von reiner 2,5-DHB als Matrix erreicht werden. Weitere Untersuchungen mit Matrixmischungen wurden erst später durch Laugessen et al. [79] durchgeführt. Die untersuchten Mischungen von 2,5-DHB und CHCA (Massenverhältnis 1:1) zeigten eine vergleichsweise große Homogenität der Oberfläche. In den aus ihnen erzeugten MALDI-Spektren zeigte sich im Vergleich zur Verwendung der einzelnen Matrices ein sehr stark verbesserte Auflösungsvermögen sowie Signal-zu-Rausch (S/N)-Verhältnis. Weiterhin konnte die Sensitivität der Nachweise verdoppelt werden. Neue Untersuchungen von Gou et al. [80] zeigen, dass durch die Verwendung von Matrix-Mischungen die Fragmentbildung der Matrix stark reduziert werden kann, und damit der Nachweis von Ionen mit $m/z \leq 500$ möglich wird. In dieser Arbeit wurden diese und weitere Mischungen gängiger MALDI-Matrices verwendet, um das Ablationsverhalten der Neutralen zu untersuchen und daraus Rückschlüsse

auf die Effekte der Matrixmischungen ziehen zu können.

Weitere Materialien

Weitere Matrizes sind z.B. die Partikelmatrizes, wie sie Tanaka [29] 1988 verwendete und damit die Grundlage für den massenspektrometrischen Nachweis von sehr großen Molekülen legte. Hier wird ein ultrafeines Material (Metall oder auch (nano)-Partikel) in einer Flüssigkeit (z.B. Glycerol) dispergiert. Durch den Beschuss mit Laserstrahlung werden die Partikel innerhalb kürzester Zeit aufgeheizt, und es erfolgt ein schlagartiges Verdampfen, bei dem die Analytmoleküle mit in die Gasphase überführt werden. Allerdings zeigte sich schon bald, dass die Nachweisgrenze bei Molekülen mit einer Masse von ca. 30kDa erreicht ist und bisher auch nicht überschritten werden konnte. Auch ist das Auflösungsvermögen etwas schlechter als bei den üblichen organischen MALDI-Matrizes [62].

Den aktuellen Trends der Materialwissenschaften geschuldet ist sicherlich der Einsatz von *Carbon Nano Materials* [81], wobei hierzu sowohl Fullerene als auch Nanoröhrchen gehören. Ein Pluspunkt dieser recht ungewöhnlichen Matrizes ist die Verfügbarkeit in reiner Form sowie die relativ hohe Masse, die auch die Untersuchung kleiner Peptide ($M \leq 500$ Da) aufgrund der fehlenden Matrixsignale in diesem Massenbereich möglich macht. Nachteilig ist sicherlich die schlechte Verfügbarkeit dieser Substanzen.

4 Experimenteller Teil

Bei dem verwendeten linearen Flugzeitmassenspektrometer (Lin-ToF MS) handelte es sich um eine Eigenkonstruktion. Der schematische Aufbau ist in Abb.A.1 gezeigt. Das Gehäuse der Ionenquelle war aus Aluminium gefertigt. Bei den Einkoppelfenstern handelte es sich um runde Quarzglasfenster, die für die verwendete UV-Strahlung durchlässig waren. Die Evakuierung erfolgte durch eine doppelflutige Turbomolekularpumpe (TPU330, Pfeiffer Vacuum, Wetzlar, Deutschland). Der Druck konnte über ein Präzisionsnadelventil stufenlos im Bereich von 8×10^{-7} mbar bis ca. 2.0×10^{-5} mbar variiert werden. An die Ionenquelle schloss sich ein 2,034m langes Flugrohr (zur Bestimmung des exakten Wertes sei auf Kap. 4.7.2 verwiesen) aus Edelstahl an. Die Kenntnis der exakten Länge der Flugstrecke der Ionen im Flugrohr war für die Auswertung von großer Bedeutung. Das Flugrohr wurde durch eine Turbomolekularpumpe (Turbovac 151C, Leybold, München, Deutschland) bis zu einem Druck von 1.0×10^{-6} mbar evakuiert. Mittels eines Schiebers (VAT Vakuumventile, Haag, Schweiz) zwischen Ionenquelle und Flugrohr konnte das System vakuumtechnisch in zwei Einheiten unterteilt werden. Dadurch war es nach Wartungs- und Justagearbeiten in der Quelle möglich, das Vakuum binnen weniger Stunden wieder herzustellen. Am Ende des Flugrohrs war als Detektor ein Multi-Channel-Plate (El Mul, Yavne, Israel) montiert. Als Besonderheit ist hier anzumerken, dass im Detektor eine Nachbeschleunigung der Ionen stattfand. Diese musste in der Berechnung der Flugstrecken (s. Kap. 4.7.1) berücksichtigt werden. Der Detektor wurde mit einer Spannung von -2300V betrieben. Diese wurde von einer Hochspannungsquelle (FUG HCN 35-12500, Rosenheim, Deutschland) bereitgestellt.

4.1 Probeneinlasssystem

Das Probeneinlasssystem bestand aus einer Schleuse, die mittels zweier Kugelkopfventile abgesperrt werden konnte. Die Schleuse wurde durch eine Drehschieberpumpe evakuiert, der minimale Druck lag bei 1×10^{-2} mbar. Wurde die Schubstange in die Schleuse eingeführt, erfolgte die vakuumtechnische Abdichtung gegenüber der Umgebung über einen Viton-Quetschring, der mittels einer Überwurfmutter zusammengedrückt wurde.

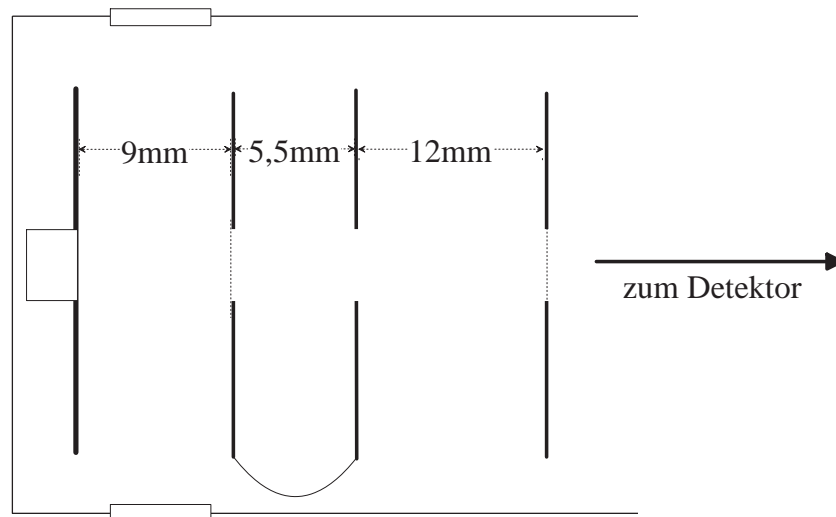


Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau und Bemaßung der Ionenquelle. Gezeigt sind die maßstabsgerechten Abstände zwischen den Elektroden. Die Elektroden selbst sowie die Abstände zum Gehäuse sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben.

Probenträger

Die Proben wurden auf einem Probenträger ($d=9\text{mm}$) aus V2A Stahl präpariert (Abb. A.15). Dieser war federnd in der elektrisch isolierten Halterung der Schubstange gelagert. Dadurch wurde erreicht, dass der Probenträger eine sichere elektrische Verbindung zum Repeller erhielt, gleichzeitig aber die mechanische Belastung der gesamten Ionenquelle durch die Schubstange minimiert werden konnte. Die Befestigung des Probenträgers auf der Schubstange erfolgte durch das Langloch mittels einer Schraube. Über eine Fräskante rastete der Probenträger in den Repeller ein und bildete mit diesem eine plane Oberfläche, und es konnte sichergestellt werden, dass das Feld in der ersten Beschleunigungsstrecke möglichst homogen war. Die nutzbare Oberfläche des Probenträgers betrug 50mm^2 , wobei effektiv für das Experiment ein Ring von ca. 19mm Umfang zugänglich war. Der Probenträger wurde manuell über die Schubstange gedreht.

4.2 Ionenquelle

Die Ionen wurden in einer zweistufigen Ionenquelle generiert und beschleunigt (Abb. 4.1). Die Bemaßung der Ionenquelle ist von besonderer Bedeutung, da aus ihr die theoretischen Flugzeiten der Ionen sehr exakt bestimmt werden konnten. Die Ionenquelle bestand aus vier Platten: dem Repeller, einer ersten und zweiten Beschleunigungsplatte sowie einer

0V-Elektrode. Die Dicke der Elektroden betrug jeweils 1mm. Die Beschleunigungsplatten waren als Ringelektroden mit einem inneren Durchmesser von ca. 50mm gefertigt. Der äußere Durchmesser der Elektroden war 100mm, dadurch konnte eine gute Homogenität der elektrischen Felder in der Ionenflugachse sichergestellt werden. Die beiden Beschleunigungsplatten waren durch eine Drahtbrücke kurzgeschlossen. Dadurch wurde zwischen ihnen eine feldfreie Driftstrecke gebildet. An dieser Stelle könnte beispielsweise eine zusätzliche Fragmentation der Ionen durch die Einkoppelung eines weiteren Lasers erfolgen. Von grundlegender Bedeutung für das Experiment war die Homogenität der elektrischen Felder. Um Durchgriffe dieser in andere Bereiche des Massenspektrometers zu vermeiden, waren die erste Beschleunigungsplatte und die 0V-Elektrode mit jeweils einem Gitter versehen. Zur Beschleunigung wurden in der Massenspektrometrie eigentlich unübliche Potenziale bzw. elektrische Felder verwendet: In der ersten Beschleunigungsstrecke ergaben sich mit $U_{Rep} = 12884(\pm 3)V$ und $U_{1.Pl.} = 7700(\pm 4)V$ für das erste elektrische Feld $E_1 = 545(\pm 6.5)V/mm$. In der zweiten Beschleunigungsstrecke ergab sich mit der Spannung an der zweiten Elektrode mit $U_{1.Pl.} = 7700(\pm 4)V$ und der 0V-Elektrode ein Feld von $E_2 = 642(\pm 5.7)V/mm$. Allgemein wird in der Massenspektrometrie viel Wert auf eine hohe Auflösung gelegt. Diese wird im einfachsten Fall durch den sog. „Wiley-McLaren“-Aufbau der Quelle erreicht. Dort ist das Feld in der ersten Beschleunigungsstrecke sehr gering, um u. a. die Ortsauflösung zu verbessern. In diesem Experiment sollte hingegen der Ortsfehler möglichst groß werden, damit aus ihm die Position der Nachionisation bestimmt werden kann. Dies führte jedoch dazu, dass mit diesen Parametern nur ein Auflösungsvermögen von ca. 100 erreicht werden konnte. Dieser Wert war für die durchgeführten Experimente jedoch ausreichend. So war es durch die Wahl der Felder zum einen möglich, den Abstand zwischen der Probenoberfläche und dem Positionisationsort sehr präzise zu bestimmen (s.a. Kap. 4.7.1), und zum anderen war es möglich, wie schon in früheren Experimenten gezeigt wurde, den Abtrag der Probe im Verlauf der Messung zu beobachten [82]. Ergänzend dazu konnte der Startpunkt der Ionen auch als Maß für die Probendicke angesehen werden. Dieser Punkt wird im Kap. 4.7.5 noch diskutiert.

Die Spannungsversorgung der Ionenquelle erfolgte über zwei Hochspannungsnetzgeräte (HCN35M-35000, FUG, Rosenheim, Deutschland), wobei sowohl der Repeller als auch die Beschleunigungsplatten eine eigene Versorgungsspannung erhielten. Die letzte Elektrode war über eine Drahtbrücke mit dem Gehäuse verbunden und lag mit diesem auf dem gleichen Potential.

4.3 Umbau der Ionenquelle

Die ursprünglich im Gerät eingebaute Ionenquelle war so konzipiert, dass der Proben-träger zentrisch in den Repeller einrastete und mit seiner Mitte exakt auf der Achse des Flugrohrs und des Detektors lag. Das hatte zur Folge, dass der optimale Ablationsort der Probe im Zentrum des Probenträgers war. Allerdings ist in diesem Zustand die zur Untersuchung stehende Probenmenge so gering, dass sie nur für wenige Massenspek-tren (max. 10) ausreichte. Daher musste der Ablationsort ca. 3mm verschoben werden mit der Folge, dass Ablationsort und die geometrische Achse des Massenspektrometers nicht mehr übereinstimmten. Dieses Problem wurde durch einen Neubau der Ionenquel-le gelöst. Dabei wurde der Repeller so gefertigt, dass das Zentrum des Probenträgers 4mm unterhalb der geometrischen Achse des TOF-MS lag. Die absolute Geometrie der Ionenquelle wurde dabei jedoch nicht verändert, um die Vergleichbarkeit zu vorheri-gen Messungen zu erhalten. Der Umbau erforderte weiterhin eine Neukonstruktion der Frontplatte der Ionenquelle, da auch der Probeneinlass an die veränderte Position des Probenträgers im Repeller angepasst werden musste. Weiterhin war im vorherigen Auf-bau ein PSPF-System [83, 82] (s.a. Kap. 2.1) hinter der Ionenquelle vorhanden. Dieses wurde bei der Neukonstruktion auf separate Gewindestangen aufgebaut. In der Ba-sisplatte der Ionenquelle wurden Bohrungen zur Aufnahme des Systems vorgesehen. Ein Einbau erfolgte jedoch nicht, da es für die in dieser Arbeit gezeigten Messungen nicht erforderlich war. Die Beschleunigungsplatten waren auf metallenen Gewindestan-gen montiert, die Isolation erfolgte durch Distanzhülsen. In Experimenten mit höheren Spannungen als 14kV zeigte sich allerdings, dass diese Isolation nicht ausreichte, und es zu Spannungsüberschlägen kam. Aus diesem Grund wurden die Metallstangen durch Polyethylen(PE-)stangen ersetzt. Die PE-Stangen zeigten allerdings eine geringere Fes-tigkeit und es konnte nicht gewährleistet werden, dass die Position der Ionenquelle sich nicht durch ihr Eigengewicht änderte. Daher wurde für die Befestigung der Beschleu-nigungsplatten ein neues Konzept entworfen. Die Distanzstücke wurden so aus PVC gefertigt, dass an einem Ende ein Innengewinde und auf dem anderen Ende ein Gewin-destift vorhanden war. Dieser Aufbau ermöglichte ein einfaches Zusammenschrauben der Ionenquelle. Durch die nun vollständig aus einem guten elektrischen Isolator bestehen- den Haltestangen der Ionenquelle wurde eine Spannungsfestigkeit der Konstruktion von mindestens 20kV erreicht.

4.4 Laser

Für die Ablation diente ein Nd:YAG-Laser (GCR-150, Spectra Physics, Darmstadt, Deutschland). Das Lasersystem war in der Lage, mittels Frequenzmischung sowohl die Wellenlänge von 266nm als auch von 355nm zu generieren. Für die Ablation wurde der Laserstrahl mittels einer Linse ($f=+200\text{mm}$) auf einen Durchmesser von $50\mu\text{m}$ fokussiert. Dabei wurde der Fokuspunkt so gewählt, dass er direkt auf der Probenoberfläche lag. Weiterhin war es notwendig, den Strahl durch eine Iris ($d=1\text{mm}$) abzuschwächen, da die Pulsenergie bei 266nm ansonsten zu einer Zerstörung der Probe führte. Zusätzlich wurde durch den Einsatz der Blende das Strahlprofil verbessert, da die durch Inhomogenitäten im Laserkristall auftretenden Intensitätsunterschiede aufgrund der Verwendung eines sehr kleinen Ausschnittes des Strahles minimiert werden konnten. Den Einfluss der Laserleistung auf die Ablation wurde in Kap. 3.2 bereits beschrieben und konnte auch experimentell gezeigt werden [84]. Daher wurde in den Experimenten darauf geachtet, dass die Leistung des Ablationslasers immer knapp oberhalb der *fluence threshold* der untersuchten Matrix eingestellt war. So konnte auch die bei der Wellenlänge von 266nm auftretende übermäßige Fragmentation von Matrix und Analyt minimiert werden, und es konnte sichergestellt werden, dass in die Proben eine reproduzierbare Energiemenge eingebracht wurde. Dadurch konnten die mittleren Strömungsgeschwindigkeiten v_{stream} unter vergleichbaren Bedingungen bestimmt werden. Bei einer matrixunabhängigen, konstanten Laserleistung wäre dies nicht möglich, da hierbei die Überschussenergie, die zu einer vermehrten Fragmentation der Matrix führte, nicht hätte bestimmt werden können. Erschwerend käme hinzu, dass der Einfluss der eventuell vorhandenen Überschussenergie auf die Strömungsgeschwindigkeit nicht bekannt wäre.

Die weiterhin auftretende grüne Streustrahlung wurde mittels eines 3mm dicken UG500-Filters (Schott, Mainz, Deutschland) absorbiert und so aus der Ionenquelle herausgehalten. Dieser Filter führte zu weiteren Intensitätsverlusten des Desorptionslasers, dies war in diesem Fall allerdings auch erwünscht. Die eingestrahlte Ablationsenergie am Ort der Postionisation lag dann bei ca. $100\mu\text{J}$. Bei einem mittleren Durchmesser der Laserspots von $70\mu\text{m}$ lag der Laserfluss bei $2,6\text{J}/\text{cm}^2$.

4.5 Postionisation

Um die ablatierten Neutralteilchen massenspektrometrisch nachweisen zu können, mussten sie nach der Ablation zeitverzögert ionisiert werden (Postionisation). Weiterhin sollte es möglich sein, den *plume* in einem großen räumlichen Bereich untersuchen zu können.

Dazu musste der Ort der Positionierung bis zu einer Entfernung von 3mm in Ausbreitungsrichtung und ober- bzw. unterhalb der ToF-Achse ca. 1mm senkrecht dazu einstellbar sein. Dies gelang mit dem in Abb. 4.2 beschriebenen Aufbau. Durch Verschieben der gesamten Schiene gelang es, den *plume* im Abstand von 0.5mm bis 1.5mm zur Probenoberfläche zu untersuchen. Bei höheren Abständen waren die Positionierungssignale aufgrund der geringen Dichte der Ablationswolke so klein und vor allem unstetig, dass eine Auswertung schwer möglich war und nur in wenigen Fällen gelang. Bei noch geringeren Abständen streifte der Positionierungslaser bereits den Repeller, und es kam zu Störsignalen, die aus Photoeffekten des Repellers stammten. Auch muss die Frage gestellt werden, ob eine Untersuchung des *plume* bei noch geringeren Abständen mit diesem Versuchsaufbau sinnvoll möglich wäre, da in diesem Fall die *delay*-Zeiten (mit diesem Begriff wird der zeitliche Unterschied zwischen dem Desorptions- und Positionierungspuls bezeichnet) bereits im sub- μ s Bereich liegen müssten. Dabei wird systembedingt die Geschwindigkeitsauflösung immer geringer, da die minimalen Änderungen des *delay* auf ca. 50ns begrenzt ist. Dies ist damit zu begründen, dass die zeitlichen Schwankungen zwischen den beiden Laserpulsen (der *jitter*) bereits nicht mehr klein gegenüber den Verzögerungszeiten sind. Die Folge wäre ein stark zunehmender Fehler in der Abstandsberechnung. Auch ist der Durchmesser des Positionierungslaserspots mit ca. $70\mu\text{m}$ endlich. Daraus ergibt sich eine Ortsunschärfe der Positionierung, die bei sehr geringen Abständen bereits signifikant wird. Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Fehler tritt durch die Probendicke (s.a. Kap. 4.7.5) auf. Durch die mittleren Probendicken von ca. $100\pm 50\mu\text{m}$ kommt es bei geringen Abständen zur mittleren Probenoberfläche bereits zu sehr starken Fehlern in der Abstandsbestimmung für die jeweilige Messung. Dies führt im Extremfall dazu, dass der Messfehler der Abstandsbestimmung 100% beträgt. Aus diesen Gründen wurde der Untersuchungsbereich auf den o.a. Abstand begrenzt.

4.5.1 Positionierungslaser

Für die Positionierung wurde ein MOPO-System (MOPO 730 mit FDO, Pumplaser: GCR230, beide Spectra Physics, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Bei diesem durchstimmbaren Festkörperlaser wurde allerdings nur eine Wellenlänge (260nm) eingesetzt. Die Wahl fiel auf diesen Wert, da diese Wellenlänge für viele Matrizes und Analyte zur Ionisation geeignet ist. Für die Positionierung des *plume* war es essenziell, dass die ausgekoppelte Laserleistung (gemessen direkt am Auskoppelfenster des MOPO) 0,7mJ nicht unterschritt. Durch den Aufbau der Einkoppelschiene (s.a. Kap. 4.5.2) und die für den Aufbau des Strahlenganges notwendigen Optiken war dieser Wert notwendig, um am Positionierungsort eine Leistung von 80-100 μ J zu erreichen.

Von besonderer Bedeutung für das Experiment war die Leistungsstabilität des Lasers: das Gesamtsystem ist extrem abhängig von der Geräte- und der Umgebungstemperatur. Selbst kleinste Änderungen dieser Parameter führten zu langsamen über den Tag andauernden Leistungsabnahmen. Diese konnten durch eine neue Einstellung der BBO-Kristalle innerhalb der OPO-Cavity sowie einer erneuten Abstimmung der Frequenzverdoppler-Einheit (FDO) kompensiert werden. Veränderungen der Kristallpositionen führten jedoch zu einer leicht veränderten Lage des ausgekoppelten Laserstrahles, und die Lage des Postionisationsortes änderte sich signifikant. Daher musste ein Weg gefunden werden, um den Postionisationsort reproduzierbar wiederherstellen zu können. Dies soll in Abschnitt 4.5.3 näher beschrieben werden.

4.5.2 Einkopplung des Postionisationslasers

Von besonderer Bedeutung für das Experiment war die Einkopplung des Postionisationslaserpulses in die Ionenquelle. Die Fragestellung bedingte, dass der *plume* bei verschiedenen Abständen vom Probenträger abgetastet werden sollte. Dazu musste der Fokus des Lasers senkrecht zur Probenträgeroberfläche verschoben werden können, ohne dass sich dabei die Höhe des Laserstrahles änderte. In früheren Experimente [84, 82] wurde die den Laserstrahl fokussierende Linse verschoben. Durch die sphärische Abberation kam es dann zur Veränderung des Postionisationsortes. Da dieser Versuchsaufbau sehr empfindlich auf die Justage der Spiegel reagierte, und das MOPO-System es erforderlich machte, die Position der nichtlinearen Optiken nachzuregeln, war eine stabile Einstellung des Postionisationsortes mit diesem Aufbau schwer zu gewährleisten. Eine Idee war daher, den Postionisationspuls mittels eines Lichtwellenleiters (LWL) in die Ionenquelle einzukoppeln. Dies erwies sich jedoch aus dreierlei Hinsicht als problematisch:

- Bedingt durch das Rechteckprofil des Postionisationslasers (ca. 8mm*15mm) musste vor der Einkopplung in den LWL eine Verkleinerung des Strahlprofils mittels eines Teleskops erfolgen. Vor allem hinsichtlich der erforderlichen Postionisationsleistung war es notwendig, den Laserstrahl möglichst vollständig in den LWL einzukoppeln. Erste Versuche mittels eines Teleskops zeigten zufriedenstellende Ergebnisse, der Strahldurchmesser konnte hinreichend verringert werden.
- Für die Verwendung eines LWL war es eine grundlegende Voraussetzung, dass der ausgekoppelte Laserstrahl gut fokussiert werden konnte. Nach den optischen Gesetzmäßigkeiten war es notwendig, dass die Austrittsöffnung des LWL einen möglichst geringen Durchmesser aufwies. Nur dann war es möglich, sowohl den Großteil des austretenden Laserlichtes zu nutzen, als auch den Laserstrahl wieder

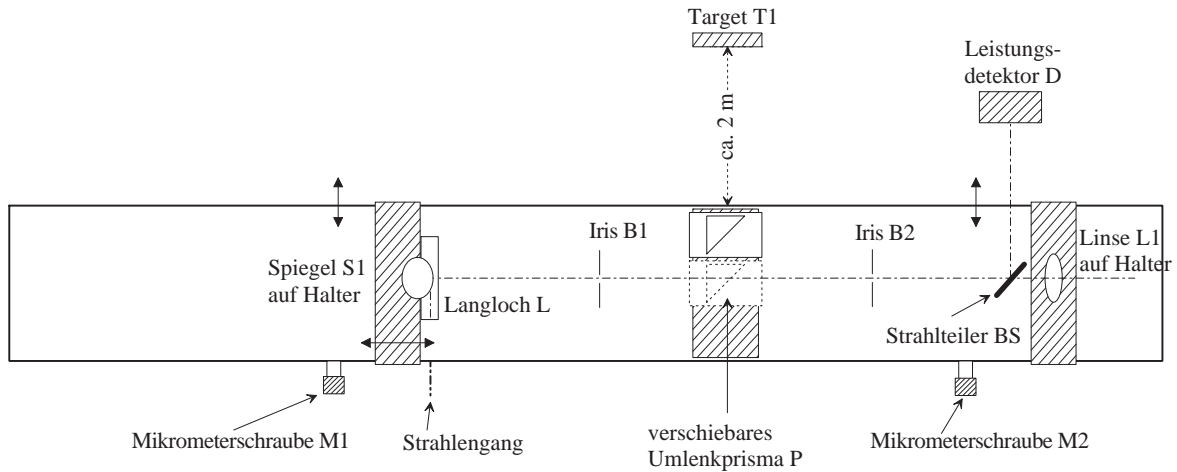


Abbildung 4.2: Aufbau der Postionisationslasereinkopplung (Aufsicht)

ausreichend zu fokussieren. Experimente mit einem LWL ($d=1\text{mm}$) zeigten, dass das Bild nur mittels einer kurzbrennweitigen Linse ($f=+35\text{mm}$) ausreichend klein zu fokussieren war, um die Leistungsdichte zur Postionisation zu erreichen. Der experimentelle Aufbau machte es jedoch erforderlich, dass die Linse eine Brennweite von mindestens $+150\text{mm}$ aufweisen musste, da der Abstand zwischen Linse und Postionisationsort innerhalb der Ionenquelle nur durch eine komplette Neukonstruktion signifikant hätte verringert werden können. Um einen möglichst kleinen Fokuspunkt bei einer großen Brennweite zu erreichen, war es erforderlich, den Durchmesser des LWL zu minimieren. Dazu wurde ein LWL mit $d=100\mu\text{m}$ verwendet. Der Fokuspunkt konnte so auf einen ausreichend geringen Wert verringert werden.

- Die geringe Oberfläche des LWLs setzte voraus, den Laserstrahl vor der Einkopplung mittels eines Teleskops sehr stark zu verkleinern. Allerdings wurde die Leistungsdichte durch diesen Vorgang so hoch, dass die Zerstörschwelle des Schutzmantels (*cladding*) um den Quarzkern (*core*) überschritten wurde, und der LWL als solcher unbrauchbar wurde.

Aufwändiger, aber allen Anforderungen hinsichtlich der Strahllage gerecht werdend, war der folgende Aufbau (Abb. 4.2): Auf einer 1m langen Aluminiumschiene wurde ein optisches System, bestehend aus einem Spiegel S1, zwei Blenden B1 und B2, einem Prisma P, ein Strahlteiler BS (100:1) und einer Quarzglaslinse L1 ($f=+200\text{mm}$) aufgebaut. Die Aluminiumschiene konnte über zwei höhenverstellbare Halter (minimale Höhenänderung ca.

0.1mm, Einstellbereich ± 20 mm) und zwei Verschiebetische (M1, M2) (minimale Einstellbarkeit $10\mu\text{m}$, Einstellbereich ± 10 mm) in allen drei Raumrichtungen verschoben werden. Daher wäre es möglich, den *plume* in einem großen Bereich zu untersuchen. In den hier durchgeführten Messungen wurden die Untersuchungen jedoch auf den Bereich der Flugachse der Teilchen und somit auf die Abstandsabhängigkeit von der Probenoberfläche beschränkt. Die Einkopplung des Laserstrahls in die Ionenquelle wurde folgendermaßen durchgeführt: Der aus dem MOPO austretende Laserstrahl wurde über mehrere Spiegel und Prismen und ein Periskop unter die Schiene geführt. Dort erfolgte eine Reflexion des Strahls über ein Prisma und durch das Langloch L ($30\text{mm} \times 6\text{mm}$) zum Spiegel S1 auf der Schiene. Das Prisma war mittels eines Verschiebetisches (Einstellbarkeit $10\mu\text{m}$) senkrecht zur Schiene beweglich. Dieser Aufbau war notwendig, um in jeder Position der optischen Schiene den Spiegel S1 im Zentrum zu treffen. Über den Spiegel S1 ging der Lichtweg durch die erste Blende B1. Dahinter war auf einer kleineren optischen Schiene ein senkrecht zum Strahlengang verschiebbar gelagertes Umlenkprisma P angebracht, welches zur groben Vorjustierung des Laserstrahls dienen sollte (s.a. Kap. 4.5.3). Im weiteren Verlauf gelangte der Laserstrahl durch eine zweite Blende B2 auf einen Strahlteiler BS, der einen kleinen Teil des Laserstrahls zur Leistungsüberprüfung auf einen externen Detektor D auskoppelte. Über eine Quarzglaslinse L1 ($f=+200\text{mm}$) wurde der Laserstrahl schließlich in der Ionenquelle fokussiert. Der Fokuspunkt wurde so gewählt, dass er nahe des Zentrums des *plume* lag. Dies war notwendig, um den durch die Ortsunschärfe (der Fehler für die Energieunschärfe spielt eine stark untergeordnete Rolle und wurde daher vernachlässigt) verursachten Fehler möglichst gering zu halten. Auf der anderen Seite durfte der Fokuspunkt auch nicht zu klein werden, damit die Anzahl der nachionisierten Teilchen noch für eine Detektion ausreichte. Weiterhin durfte die Leistungsdichte durch die Fokussierung auch nicht so groß werden, dass es zur übermäßigen Photofragmentation der ablatierten Moleküle kam (dies war der Fall, wenn die Pulsenergie vor der Linse den Wert von $250\mu\text{J}$ überschritt). Der Laserstrahl konnte nach dem Durchgang durch die Ionenquelle auf einem zweiten Target (nicht gezeigt) beobachtet werden. Dieses diente vor allem der Kontrolle der Justage, konnte aber auch zum visuellen Leistungsmonitoring genutzt werden.

4.5.3 Justage des Postionisationsortes

Die Justage des Postionisationslasers ist von besonderer Bedeutung gewesen, da im *plume* immer der Kernbereich untersucht werden sollte. Dabei sollte es nach Möglichkeit weder zu unerwünschten Änderungen der vertikalen noch in der horizontalen Lage des Postionisationsortes kommen. Die horizontale Position des Postionisationsortes sollte erst für

4 Experimenteller Teil

die abstandsabhängige Untersuchung des Ablationsverhaltens zum Tragen kommen. Um die Stabilität der Strahlage gewährleisten zu können, wurden mehrere Referenzpunkte im Strahlengang aufgebaut. Hier sollen sie jetzt ausgehend vom Positionierungslaser beschrieben werden:

- Der erste Kontrollpunkt der Justage befand sich auf einem Querträger (ca. 1,30 m oberhalb der optischen Schiene). Über das Prisma unter der Schiene wurde der Laserstrahl senkrecht nach oben geleitet. Wurde der Spiegel (S1), der zu diesem Zweck zusammen mit seiner Halterung auf der optischen Schiene beweglich angebracht war, aus dem Strahlengang geschoben, konnte die Position des Laserspots über das Periskop korrigiert werden.
- Um die korrekte Position des Spiegels S1 zu überprüfen, konnte das Umlenkprisma P in den Strahlengang geschoben werden. Mittels des Prismas war es möglich, den Laserspot auf eine ca. 2 m entfernte Kontrollmarkierung (T1) zu leiten und den Spiegel zu justieren.
- Die wichtigste Justage fand mit Hilfe eines neuentwickelten Justagewerkzeugs statt (Abb. 4.3): Den Grundkörper dafür bildete ein Standard-Probenhalter, in diesem Falle wurde er aus Aluminium gefertigt. Allerdings war die Oberfläche nicht plan, er wurde so gefertigt, dass zwei parallele Nasen stehen blieben. Durch beide Nasen wurde in 4mm Abstand von der Probenträgeroberfläche ein sehr feines Loch gebohrt ($d \leq 100 \mu\text{m}$). Dadurch wurde erreicht, dass beide Löcher nur eine optische Achse bilden konnten, wenn die Justagehilfe exakt ausgerichtet war. Dieses Werkzeug wurde dann in die Ionenquelle eingeschleust. Der Probenträger wurde so eingestellt, dass die beiden Nasen senkrecht zum Strahlengang standen. Durch maximales Öffnen der beiden Blenden auf der Schiene konnte erreicht werden, dass die Nasen komplett bestrahlt wurden. Langsames Drehen der Justagehilfe brachte die beiden Bohrungen auf eine Achse, und das durch sie hindurchtretende Laserlicht konnte als Fluoreszenz auf einem Blatt Papier beobachtet werden. Durch Einstellung der beiden Blenden auf ihren minimalen Durchmesser wurde die Feinjustage der Schiene vorbereitet. Nur wenn in diesem Fall der Spiegel S1, beide Blenden, die Linse sowie die Justagehilfe auf einer optischen Achse lagen, konnte der Laserstrahl hinter der Ionenquelle beobachtet werden. Durch Veränderung der Lage des Tisches in der Ebene durch die beiden Mikrometerschrauben M1 und M2 sowie in der Höhe konnte eine sehr präzise Justage des Laserstrahls erfolgen. So führte bereits ein Verschieben der Schiene von $30 \mu\text{m}$ dazu, dass der Laserstrahl nicht mehr durch die Justagehilfe treten konnte. Auch Höhenänderungen von weniger

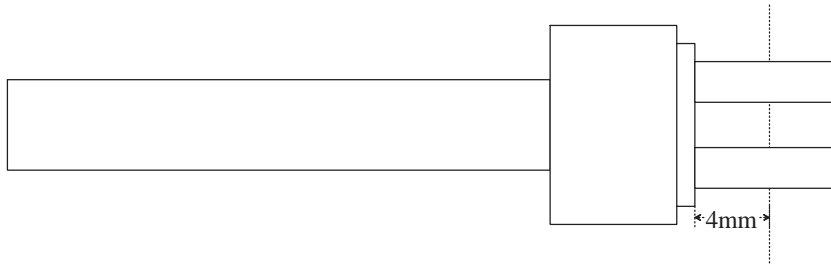


Abbildung 4.3: Justagehilfe (Seitenansicht) mit Achse der Bohrung

als $100\mu\text{m}$ hatten bereits sichtbare Auswirkungen auf den Strahlengang.

- Den letzten Referenzpunkt bildete ein Target am Ende des Strahlenganges. Mit diesem konnte sichergestellt werden, dass die optische Schiene waagrecht verlief.

Diese Justage gewährleistete, dass der Postionisationsstrahl parallel zur Probenträgeroberfläche verlief und die Nachionisation in einer Ebene parallel zur Probenoberfläche stattfand.

4.5.4 Postionisationsleistung

Für die Gewinnung einer aussagekräftigen Geschwindigkeitsverteilung war es wichtig, dass das Verhältnis zwischen den ablatierten Neutralteilchen und den prompten Ionen näherungsweise bestimmt werden konnte. Die ablatierten Neutralteilchen konnten nach der Postionisation detektiert werden. Die Menge der nachionisierten Teilchen hing zum einen von der ablatierten Menge, aber auch in einem sehr starken Maße von der eingebrachten Postionisationsenergie ab. Das Optimum wäre erreicht, wenn jedes Neutralteilchen durch die eingebrachten Photonen nachionisiert werden könnte. Dies ist jedoch nahezu ausgeschlossen, da es neben dem Zwei-Photonen-Prozess der Ionisation noch zu weiteren Vorgängen wie z.B. der Fragmentation oder auch der strahlungslosen Desaktivierung einfach angeregter Moleküle kommen kann. Eingehende Voruntersuchungen und frühere Arbeiten [84, 82] an diesem Gerät haben gezeigt, dass die Postionisationsleistung einen großen Einfluss auf die Qualität der Geschwindigkeitsverteilungen ausübt. Daher musste die Postionisationsleistung mit in die Auswertung eingehen. In dem nun folgenden Abschnitt soll auf die Kontrolle der Postionisationsleistung eingegangen werden.

Neben den von der Justage des MOPO-Systems abhängigen Leistungsschwankungen, die im Mittel durch die Anpassung der Kristallparameter kompensiert werden konnten, kam es zu nicht kontrollierbaren Schwankungen im Schuß-zu-Schuß-Vergleich. Verursacht wurden diese durch die starke Abhängigkeit der nichtlinearen Optiken von der Eingangsleistung. Angegeben werden die Leistungsschwankungen des MOPO-Systems mit 23%

[85] nach der Frequenzverdoppelung (FDO). Dieser Wert bezieht sich jedoch auf eine Mittelung über 1s, was bereits zwanzig Laserschüssen entspricht. Eigene Messungen zeigten ein anderes Bild (s. Abb. 4.4). Hier ist die Instabilität der Leistung zwischen zwei Schüssen gut zu sehen. Durch die Normierung der Leistungsdaten auf den höchsten gemessenen Wert kann die Schwankung der Pulsleistung in Abhängigkeit von der Experimentdauer beobachtet werden. Die Leistung der Pulse unterscheidet sich um maximal den Faktor 5. Allerdings ist in der Langfristbetrachtung dieser Leistungssignale eine Verbesserung der Pulsstabilität sowie der absoluten Leistung zum Ende der Messreihe zu beobachten. Dies kann damit begründet werden, dass die hier gezeigte Messung direkt nach der Optimierung des MOPO-Systems stattfand. Daher zeigte sich über die Messzeit eine Stabilisierung des Lasersignals. Unter der Annahme, dass jede Messung inklusive der Speicherung des Spektrum 90s dauerte, kann davon ausgegangen werden, dass der Laser in diesem Fall 90 Minuten nach der Neujustage seine optimale Leistung erzielte. In vielen Fällen kam es dann auch wieder zu einer starken Abnahme der Pulsenergie und ihrer Schuß-zu-Schuß-Stabilität binnen weiterer 120min. Um diese Schwankungen in die Auswertung mit einzubeziehen, wurde von jedem Laserpuls des MOPO die Leistung protokolliert. Dies gelang mit Hilfe eines externen Detektors, der über die Kontrolleinheit des MOPO-Systems ausgelesen werden konnte. Die Daten wurden anschließend an den Messrechner weitergeleitet, wo sie mit dem zugehörigen Massenspektrum unter Verwendung eines Labview-Programms [84] gespeichert werden konnten. Die Kenntnis der Leistungsdaten eines jeden Laserpulses war unbedingt notwendig, da die Postionisation sehr stark von der Laserleistung abhängt. Während bei sehr geringen Laserleistungen davon auszugehen ist, dass nahezu alle Photonen im *plume* absorbiert werden und zur Ionenbildung beitragen, ist der Zusammenhang bei höheren Leistung nicht mehr so einfach zu beschreiben. In erster Näherung ist ab einer bestimmten Photonendichte mit Sättigungserscheinungen zu rechnen, und die Anzahl der gebildeten Ionen ist nicht weiter zu steigern. Dies kann damit begründet werden, dass die Photonen binnen eines sehr kurzen Zeitraumes (hier: $t_{Puls} \approx 6\text{ns}$) in den *plume* eindringen. Dort werden die Photonen von den ablatierten Neutralteilchen absorbiert und regen diese elektronisch an. Allerdings wird es auch Moleküle geben, die kein Photon absorbieren, da sie von anderen Molekülen abgeschirmt werden. Zudem kann es zum Auftreten von Fragmenten kommen, da zusätzlich zur Photoionisation noch die Fragmentierung bereits hoch angeregter Moleküle und Ionen eintreten wird [22]. Dieser Prozess wird durch das *ladder switch*-Modell beschrieben und kann für die hier verwendeten ns-Pulse angenommen werden. Fragmentationen wurden jedoch nicht beobachtet, da die Leistung des Postionisationslasers dafür nicht ausreichte. Die oben vorgestellten Prozesse führen jedoch beide dazu, dass nicht al-

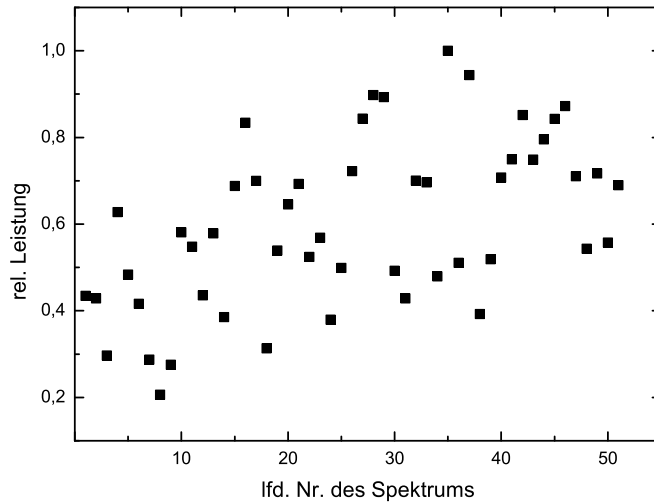


Abbildung 4.4: Leistungsschwankungen des Postionisationslasers (normiert)

le ablatierten Neutralteilchen als Ion nachgewiesen werden können. Um eine Normierung der Postionisationssignale zu erreichen, musste neben den Signalstärken der prompten Ionen auch die Leistungsdaten des MOPO in die Auswertung miteinbezogen werden. Eine genaue Beschreibung der Normierung befindet sich in Kap. 4.7.3.

Die Ausgabe der Leistungsdaten erfolgte in willkürlichen Einheiten (*counts*), diese konnten mit Hilfe der absoluten Pulsleistung jedoch in absolute Werte umgerechnet werden. Die Leistungsmessung des Postionisationslasers erfolgte mit einem thermischen Messkopf (407A, Spectra Physics, Mountain View, USA).

4.5.5 Triggerung

Um den Postionisations- und den Ablationslaser optimal aufeinander abzustimmen, war eine genaue Triggerung der beiden Laserpulse notwendig. Typischerweise war der zeitliche Abstand zwischen dem Ablationslaserpuls und dem Postionisationspuls wenige μs . Eine schematische Darstellung des Aufbaus der Triggerung ist in Abb. 4.5 dargestellt. Von besonderer Bedeutung war, dass die zeitlichen Schwankungen der beiden Laserpulse zueinander (der *jitter*) möglichst gering ist, um eine möglichst hohe Abtastrate des *plume* zu erreichen. Experimentell konnte ermittelt werden, dass die Verwendung der MOPO-Steuereinheit als Triggereinheit die besten Ergebnisse lieferte. Hierbei war es möglich, den *jitter* auf maximal 10ns zu reduzieren, was ein Auflösungsvermögen des *delay* von 50ns möglich machte. Dadurch konnte auch bei niedrigen Verzögerungszeiten eine ausreichende Anzahl an Spektren erhalten werden. Der Start der Triggerkaskade wurde durch das *lamp-sync-out*-Signal des MOPO-Lasers initiiert. Das Signal

lief in einen hier im Hause gefertigten Frequenzhalbierer (Dipl.-Ing. U.Eggers, Universität Kiel) und wurde dort auf eine Frequenz von 10Hz reduziert. Anschließend wurde über den Delay-Generator (DG535, Stanford Research, Sunnyvale, USA) das Zünden der Blitzlampen und der *q-switch* im GCR gesteuert. Mit dem *q-switch* wurde gleichzeitig das Oszilloskop gestartet, um die Spektren zu aquirieren. Zeitverzögerungen in der Signalübertragung durch die Signallaufzeiten waren in diesem Versuchsaufbau von geringer Bedeutung, da die Zeitverzögerung zwischen den Laserpulsen über eine separate Kontrollschaltung überwacht werden konnte. Diese soll im folgenden Kapitel beschrieben und diskutiert werden.

4.5.6 Einstellung des *delays*

Die zeitliche Verzögerung zwischen den beiden Lasern (*delay*) wurde mit Hilfe des Signalverzögerungsgenerator DG535 eingestellt. Damit konnte der zeitliche Abstand zwischen den beiden Lasern theoretisch im Bereich von 1ns verändert werden. Diese Option wurde jedoch nicht genutzt, für die hier durchgeführten Untersuchungen war es ausreichend, die zeitliche Differenz zwischen den Laserpulsen in 50ns-Schritten zu verändern. Dieser Wert wurde gewählt, da die Laser immer leichte zeitliche Schwankungen zueinander (*jitter*) aufwiesen. Diese Schwankungen lagen im Bereich von ± 5 ns. So konnte sichergestellt werden, dass die Änderungen des *delay* signifikant größer als der *jitter* waren. Das *delay* wurde mittels zweier Photodioden überwacht, die jeweils das frequenzverdoppelte grüne Streulicht des Desorptionslasers sowie das grüne Streulicht aus der Frequenzverdopplereinheit der MOPO der beiden Laser registrierten. Über ein Oszilloskop konnte dann der zeitliche Abstand zwischen beiden Lasersignalen bestimmt werden. Bedingt durch den Aufbau des gesamten Experimentes waren die Signalleitungen der beiden Photodioden nahezu gleichlang, daher mussten unterschiedliche Signallaufzeiten nicht berücksichtigt werden. Die Wege der beiden Laserstrahlen unterschieden sich in ihrer Länge um ca. 1m, dies machte jedoch nur einen zeitlichen Fehler von ca. 3ns aus. Dieser wurde aufgrund des *jitters* zwischen den beiden Lasersystemen jedoch nicht weiter berücksichtigt. Die genaue Kenntnis des *delays* für jedes Spektrum war von besonderer Bedeutung, da aus den Flugzeiten und der Verzögerung die genaue Position des Nachionisationsortes bestimmt werden musste (s. a. Kap. 4.7.1). Aus diesem Grunde wurde die Zeitverzögerung der beiden Laser permanent über das Oszilloskop überwacht und ggf. nachgeregelt. So konnte das *delay* für jedes Massenspektrum auf 10ns genau bestimmt werden.

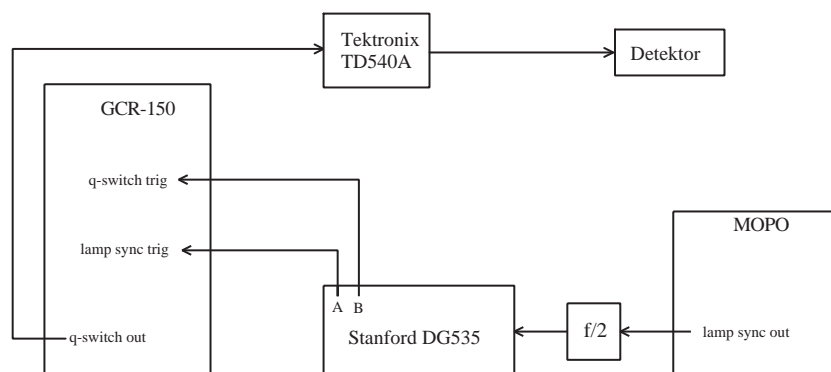


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der Triggerung

4.5.7 Signalverarbeitung

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte über ein Speicheroszilloskop (TDS 520A, Tektronix, USA), welches von einem Personal Computer mit Hilfe eines LabViewTM-Programms [84] ausgelesen wurde. Die Massenspektren und die Leistungsdaten des MOPO wurden als ASCII-Datei gespeichert.

4.6 Probenpräparation

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden nach der *dried-droplet* (dd)-Methode präpariert. Nachteilig an dieser Methode ist die Inhomogenität der Probenoberfläche, die die Einstellung des Abstandes (s. Kap. 4.7.1) erschwert. Weiterhin ist anzumerken, dass die Lebensdauer der Probe durch die Art der Präparation limitiert ist. Aus den hier verwendeten sehr dünnen Proben konnten nicht mehr als 50-60 Massenspektren erhalten werden, da die Probe dann schon stark abgetragen war. Die Verwendung von dickeren Proben sollte jedoch ausgeschlossen werden, da diese eine schlechtere Homogenität der Oberfläche aufwiesen. Abhilfe hätte die Präparation von Matrix-Analyt-Einkristallen schaffen können, durch die Untersuchung von binären (Matrix/Analyt, Matrix1/Matrix2) bzw. ternären (Matrix1/Matrix2/Analyt) Systemen war die Wahl der Präparationsmethoden durch das stark unterschiedliche Kristallisationsverhalten der verwendeten Substanzen jedoch massiv eingeschränkt. Auch sollte es das Ziel sein, den Ablationsprozess unter nahezu Standard-MALDI-Bedingungen zu untersuchen. Dafür war dd-Verfahren gut geeignet, da es sich in der Analytik als Standard-Verfahren etabliert hat und in den meisten Fällen zum gewünschten Ergebnis führt. Im Rahmen eines Fortgeschrittenen-Praktikums wurde allerdings noch die *solvent-free*-Methode ausprobiert. Die Probenpräparation und die Ergebnisse sind in Abschn. 4.6.2 kurz beschrieben.

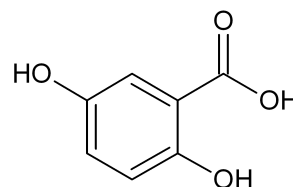
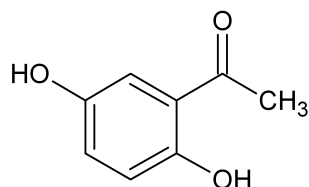


Abbildung 4.6: 2,5-Dihydroxybenzoesäure Abbildung 4.7: 2,5-Dihydroxyacetophenon

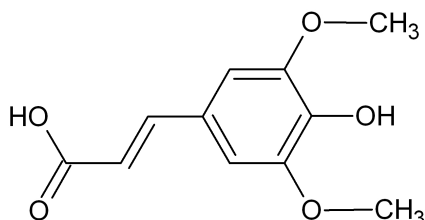


Abbildung 4.8: Sinapinsäure

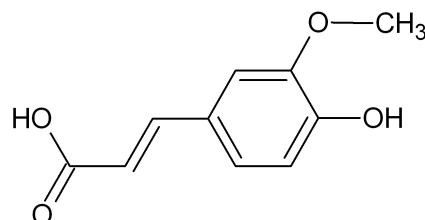


Abbildung 4.9: Ferulasäure

4.6.1 Verwendete Matrizes und Analyte

Für die durchgeführten Experimente wurden verschiedene gängige MALDI-Matrizes verwendet:

- 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 2,5-DHB (Sigma GmbH, Steinheim, Deutschland) (Abb. 4.6)
- Ferulasäure, FA (Fluka AG, Buchs, Schweiz) (Abb. 4.9)
- Sinapinsäure, SA (Abb. 4.8)
- α -4-Cyano-hydroxy-Zimtsäure, α -CHCA (Fluka AG, Buchs, Schweiz) (Abb. 4.10)
- 2,5-Dihydroxyacetophenon, DHAP (Fluka AG, Buchs, Schweiz) (Abb. 4.7)
- ferner wurden weitere Matrizes ausprobiert: Tryptophan, 9,10-Dihydroxyanthracen (Dithranol) und ATT. Diese Matrizes zeigten bei der verwendeten Laserwellenlänge jedoch keine Postionisationssignale des Moleküls, da sie sehr stark fragmentierten. Daher wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet.

Die Lösungsmittel und Matrizes wurden bis auf α -CHCA ohne weitere Reinigung verwendet. Bei α -CHCA erfolgte eine Umkristallisation aus Ethanol.

Als Lösungsmittel diente in den meisten Fällen THF, in wenigen Fällen wurde auch Ethanol verwendet. In den Experimenten zeigte sich, dass THF zwei Vorteile aufwies: zum einen wurde der Analyt Chrysen dort gut gelöst, zum anderen wurden die Proben

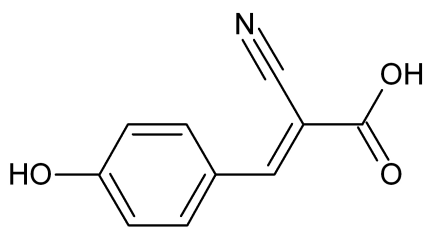


Abbildung 4.10: α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure

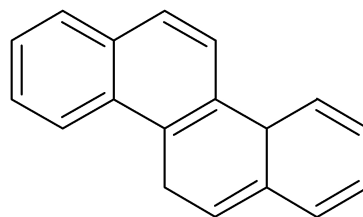


Abbildung 4.11: Chrysen

durch das sehr schnelle Verdampfen des Lösungsmittels homogen und dünn. Dies war aus in Kap. 4.7.1 beschriebenen Gründen wünschenswert. Negativ wirkte sich hingegen der rasche Verbrauch der Probe aus, dadurch waren Langzeitmessungen einer Probe nicht möglich.

In der Regel wurden von der Matrix 10-15mg Substanz eingewogen und mit 300 μ L Lösungsmittel versetzt. Die dualen Matrixsysteme wurden in einer äquimolaren Mischung hergestellt. Dazu wurde je 0.1mmol Matrix in ein Probengefäß eingewogen und mit 300 μ L THF versetzt. Je nach Löslichkeit der Matrizes wurde die Probe durch Schütteln per Hand oder Behandlung mit einem Schüttler („Vortexer“ VX100, Labnet, Woodbridge, USA) vollständig gelöst. Von der erhaltenen Stammlösung wurden dann 45 μ L auf den Probenträger pipettiert. Die Probe trocknete anschließend an der Luft und konnte nach ca. 15 min in das Massenspektrometer eingeschleust werden. Aufgrund der hohen Verdampfungsrate des Lösungsmittels ergab sich eine sehr feinkristalline, dünne und homogene Probenoberfläche. Als Beispiel ist hier die Matrixmischung aus 2,5-DHB und α -CHCA gezeigt (Abb. 4.14). Eine Ausnahme bildete die Mischung DHB/FA, die unabhängig von der Auswahl verschiedener Lösungsmittel eine starke Inhomogenität aufwies. Abb. 4.13 zeigt das duale Matrixsystem 2,5-DHB/FA aus THF kristallisiert. Diese Probe zeigte im Gegensatz zu den anderen Matrix-Mischungen eine sehr langsame Kristallisation, und konnte erst nach mindestens 1h Trocknungsdauer untersucht werden. Aus Ethanol zeigte die Probe ein ähnliches Kristallisationsverhalten (o. Abb.), hier dauerte die Kristallisation aufgrund des anderen Lösungsmittels naturgemäß noch länger. Die Inhomogenität der Probe erschwerte die Untersuchung dieses Matrixsystems, die daraus erhaltenen Geschwindigkeitsverteilungen sind fehlerbehaftet (s.a. Kap. 5.2).

Analytbeimischung Die MALDI dient in erster Linie der Untersuchung großer Moleküle. Die verwendeten Matrizes sind dabei nur Mittel zum Zweck und spielen in der Regel für den Anwender nur eine Nebenrolle. Um jedoch zum Verständnis des MALDI-Prozesses beitragen zu können, muss sowohl das Ablationsverhalten der Matrixsubstan-

zen als auch das Verhalten der Analytmoleküle untersucht werden. Dafür wurden zusätzlich zu den oben beschriebenen Matrizes verschiedene Modellanalyte untersucht. Als Analyte wurden u.a. Tryptophan und Salmeterol ausprobiert. Tryptophan fragmentierte jedoch bei der Nachionisation, und es war nicht möglich, das Molekülion zu erhalten. Ein Spektrum ist in Abb. 4.12 gezeigt. Dabei sei insbesondere auf die starken Positionierungssignale im Flugzeitbereich von 10-15 μs hingewiesen. Diese stammen zum überwiegenden Teil aus dem Tryptophan. Dabei kann jedoch nicht unterschieden werden, ob die Signale aus der Fragmentation durch den Positionierungslaser stammen, oder ob es sich hierbei um nachionisierte Fragmente, die bereits während der Desorption entstanden sind, handelt. Des Weiteren konnte in den Spektren nur geringe Signale der prompten Matrixionen bzw. deren Fragmente beobachtet werden. Im gezeigten Beispiel sind nur das mit m/z 130 bezeichnete Signal des Tryptophanfragments und das mit m/z 177 bezeichnete, mit mehreren Massensignalen überlagerte prompte Ionensignal des Ferulasäurefragments $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ zu erkennen. Allerdings ist das Vorhandensein der prompten Matrix-Signale für die Auswertung und Normierung der Spektren von großer Bedeutung (s.a. Kap. 4.7), dazu sollen nach Möglichkeit die Signale der prompten Ionen nicht durch nachionisierte Fragmente überlagert werden. Aus diesem Grund wurde von der Verwendung Tryptophans als Analytsubstanz abgesehen. Die geringe Intensität der Massensignale aus der Ferulasäure bzw. das fehlende DHB-Signal lässt den Schluss zu, dass die Ablationsschwelle der Matrix noch nicht erreicht ist. Dass es trotzdem zur Ablation und Ionisation der Analytmoleküle in großer Menge kam, ist wohl dem Umstand geschuldet, dass Tryptophan selbst auch als Matrix dienen kann [1]. Als Begründung für das Fehlen von Matrix-Signalen kann hier neben dem auftretenden *Matrix Suppression Effekt* (s.a. 3.3.1) auch die Gasphasenbasizitäten herangezogen werden. Diese ist für Tryptophan mit -1380kJ/mol [86] etwas höher als für 2,5-DHB mit 1329kJ/mol [87]. Daher wird die Protonenübertragung von 2,5-DHB auf das Tryptophan bevorzugt ablaufen. Die Anionen von 2,5-DHB konnten im hier verwendeten Positiv-Modus des Massenspektrometers nicht nachgewiesen werden. Bei höheren Laserflüssen würde die Probe nicht mehr im thermodynamischen Gleichgewicht stehen, und der Protonenübertrag funktioniert auch in einem hohen Maße in die entgegengesetzte Richtung. Allerdings kommt es dann durch die hohen Energien auch zu einer massiven Fragmentation des Tryptophans, die die Spektren für die in dieser Arbeit verfolgten Ziele unbrauchbar macht.

Salmeterol hingegen zeigte trotz der beiden aromatischen Systeme an beiden Molekülen kein messbares Ionensignal, es konnte weder das prompte Ionensignal gemessen werden, noch gelang es, Neutralteilchen nachzuionisieren. Dies könnte mehrere Ursachen gehabt haben: zum einen wäre es möglich, dass die Protonenaffinität von Salmeterol zu

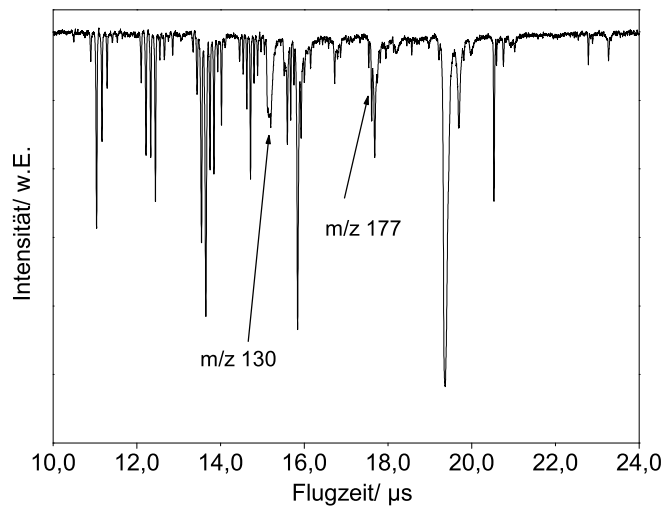


Abbildung 4.12: Postionisationsmassenspektrum von Tryptophan, $delay = 4.0\mu s$, ablatiert aus DHB/FA bei einer Wellenlänge von 266nm. Gezeigt sind neben den Postionisationssignalen im Flugzeitbereich zwischen 10 und $15\mu s$ die prompten Signale der Tryptophanfragmentes (m/z 130) und des FA-Fragmentes (m/z 177). Das starke nicht bezeichnete Signal bei $19,6\mu s$ wird durch das $[M+Na]^+$ -Ion von FA erzeugt.

gering ist, als dass eine Protonierung durch die Matrix stattfinden kann, zum anderen könnte es auch sein, dass die Präparation der Probe ungenügend gewesen ist. Es wurden mehrere M/A-Verhältnisse in der Lösung ausprobiert, allerdings zeigten alle Proben kein promptes Salmeterol-Signal. Auch wurden weder prompte Fragmentationen, noch Fragmente aus der Nachionisation gefunden. Bis jetzt konnte kein plausibler Grund für das schlechte Ionisationsverhalten des Salmeterols gefunden werden. Wünschenswert wäre der Einsatz dieses Analyten gewesen, da er mit 428Da über eine Masse verfügt, bei der es zu keinerlei Überlagerungen mit den Signalen der verwendeten Matrices gekommen wäre. Allerdings zeigten die oben beschriebenen Probleme, dass der Analyt als universell einsetzbare Modellsubstanz nicht geeignet war.

Als Analyt fungierte Chrysen (Abb. 4.11). Diese Substanz hat sich schon früher [84] als geeignete Modellsubstanz für einen Analyt herausgestellt, da sie zum einen sehr leicht zu ionisieren ist und eine Masse aufweist, die es erlaubt, ihn gut in dem oben beschriebenen Massenspektrometer nachzuweisen. Nachteilig ist seine Toxizität und aus experimenteller Sicht die sehr ähnliche Masse wie die verwendeten Matrices. Insbesondere die Matrix Sinapinsäure (SA:224Da, Chrysen:228Da) zeigte im Massenspektrum ein Signal $[M+H]^+$ in unmittelbarer Nähe des geladenen Analytmoleküls $[A]^{\bullet+}$. Die Signale der beiden einfach geladenen (im Falle der Matrix protonierten) Teilchen konnten noch erfolgreich



Abbildung 4.13: Kristallisationsverhalten von DHB/FA aus THF

aufgelöst werden. Dies war für die Auswertung wichtig, damit beide Signale unabhängig voneinander integriert werden konnten.

Die Präparation der Proben wird im folgenden beschrieben: ca. 7mg Chrysen wurden in 300 μ L THF gelöst. Anschließend wurden aus der Lösung 10 μ L abpipettiert und mit 90 μ L Matrixlösung versetzt. Von dieser Mischung wurden dann 45 μ L auf den Proben-träger aufgebracht und das Lösungsmittel verdampft. Das Matrix-zu-Analyt-Verhältnis lag dann in der Lösung bei ca. 60, dieses wird auch in der Literatur für die Unter-suchung von kleinen Biomolekülen vorgeschlagen [67, 88]. Keine Rückschlüsse können hingegen auf die wirkliche Konzentrationsverteilung des Analyten in der getrockneten Probe gezogen werden. Hier spielen die Kristallisationseigenschaften von Matrix und Analyt eine gewichtige Rolle. Es konnte im Verlauf der Experimenten immer wieder beobachtet werden, dass es auf dem Probenträger Bereiche gab, in dem das Positionis-ationssignal des Analyten stark anstieg, wohingegen es in anderen Bereichen kaum zur Positionierung des Analyten kam. Dieses Phänomen trat bei allen untersuchten Matrix-system auf. Dabei war es unerheblich, ob einfache oder duale Matrix-Analyt-Systeme untersucht wurden. Deutlich wird dadurch, dass die Probenpräparation mit THF bezüg-lich der Oberflächenhomogenität Vorteile aufwies, die Verteilung des Analyten innerhalb der Matrixmischung jedoch nicht homogen erfolgte. Erklärt werden kann dies z.B. durch unterschiedliches Kristallisationsverhalten von Chrysen in Bezug auf die beiden un-terschiedlichen Matrices. Präparativ konnte dieses Problem nicht gelöst werden, allerdings konnte es minimiert werden, indem die Massenspektren nach Möglichkeit immer in der selben Region auf dem Probenträger aufgenommen wurden



Abbildung 4.14: Kristallisationsverhalten von DHB/CCA aus THF

4.6.2 Lösungsmittelfreie Probenpräparation

Neben den aus einem Lösungsmittel präparierten Proben wurden auch Versuche unternommen, aus nach der *solvent free*-Methode [53] präparierten Matrix-Mischungen Geschwindigkeitsverteilungen zu erhalten. Durch die Verwendung dieser Präparationsmethode sollte der Einfluss der Kristallisationseigenschaften der einzelnen Matrices und des Analyten ausgeschlossen werden, da hier die Vermengung der Substanzen ausschließlich mechanisch erfolgte.

Für die Probenpräparation wurden äquimolare (jeweils 1mmol) Mengen der Matrix in ein 1.5mL fassendes Reaktionsgefäß eingewogen. Nach Hinzugabe von zwei Stahlkugeln (aus Kugellager $d=1\text{mm}$) wurde die Probe mittels eines Schüttlers (VX100, Labnet, Woodbridge, USA) mehrere Minuten bei mittlerer Drehzahl (ca. 1000 min^{-1}) behandelt. Bei Mischung farblich unterschiedlichen Proben wie DHAP und 2,5-DHB konnte die zunehmende homogene Verteilung der Probe mit steigender Schütteldauer gut beobachtet werden. Die so entstandenen Mischung wurde dann mit Hilfe eines Mikrospatels auf den Probenträger aufgestäubt. Es entstand ein sehr dünner, inhomogener Besatz der Oberfläche aus fein verteiltem Matrixpulver. Die daraufhin erfolgenden Messungen im Lin-ToF MS zeigten, dass grundsätzlich die Ablation und Postionisation aus derart präparierten Proben möglich ist. Allerdings war die aufgebrauchte Probenmenge zu gering, um eine ausreichende Anzahl von Massenspektren für die Bestimmung der Geschwindigkeitsverteilungen zu erhalten. Daher wurden diese Versuche eingestellt.

4.7 Bestimmung des Positionierungsortes und der Probendicke

Ziel dieser Arbeit war es, die Geschwindigkeitsverteilungen unterschiedlicher Matrix- und Analyt-Systeme zu untersuchen. In den vorherigen Abschnitten wurde beschrieben, wie der experimentelle Aufbau ausgeführt wurde. In den folgenden Kapiteln soll nun die Auswertung der Spektren und der Weg zu den Geschwindigkeitsverteilungen gezeigt werden.

Die von jeder Probe erzeugten Spektren wurden mit der Software Origin 6.0 (Microcal, Northampton, USA) ausgewertet. Dazu wurden die im ASCII-Format vorliegenden Spektren mittels eines Scripts (s. [82]) eingelesen und weiterverarbeitet. Da das Speicheroszilloskop die Spektren mit einem leichten Offset zur Nulllinie ausgab, mussten diese noch angepasst werden. Dies war für die spätere Integration der Fläche über den Signalen unumgänglich. Gleichzeitig erfolgte noch eine Glättung der Spektren. Dabei wurde jeder Datenpunkt aus den umliegenden 5 Punkten neu berechnet. Dies hatte den Vorteil, dass die Auswertung der Spektren vereinfacht wurde, da die Flanken der Signale deutlicher zu erkennen waren. Nachteilig war jedoch, dass es durch die Glättung zu einem Verlust an Auflösungsvermögen in den Signalminima kam (das Oszilloskop stellte das Messsignal mit negativem Vorzeichen dar, da der Detektor eine negative Steuerung ausgab). Da die Kanalbreite des Oszilloskopes 2ns betrug, war ein Verlust der Information über die genaue Lage des Signals nicht auszuschließen. Dies war allerdings nur für die Kalibrationsmessungen relevant; bei den ansonsten untersuchten Proben war die Dicke so groß, dass dieser Fehler nicht weiter ins Gewicht fiel. Hier dominierte der durch die Probendicke verursachte Flugzeitunterschied der prompten Ionen von bis zu 20ns und verursachte weitaus größere Fehler. Die Lage der Positionierungssignale war durch die Glättung auch nicht mehr eindeutig zu bestimmen, sie waren in der oben genannten Größe fehlerbehaftet. Hier kam jedoch der *jitter* zum Tragen. Durch dessen Schwankungen von $\pm 5\text{ns}$ war das exakte *delay* nicht mit einer Genauigkeit feststellbar, in der der Fehler aus der Glättung eine signifikante Rolle spielte. In diesen Fällen konnte der Fehler aus der Glättung der Signale vernachlässigt werden. Für die Kalibration musste die Ungenauigkeit in der Flugzeitbestimmung jedoch berücksichtigt werden, da aus den Kalibrationsmessungen direkt die Flugrohrlänge berechnet wurde. Und dieser Wert musste aufgrund seiner Bedeutung für die Abstandsbestimmung (s. Kap. 4.7.1) mit größtmöglicher Präzision bestimmt werden.

Die Leistungsdaten des Positionierungslasers wurden mit Hilfe eines von Dr. F. Gunzer geschriebenen Programmes extrahiert. Anschließend wurde aus den letzten 60 Leis-

tungswerten jedes Spektrums der Mittelwert gebildet. Diese Daten repräsentierten die Postionisationsleistung der 30 Spektren, die von dem Speicheroszilloskop aufgenommen wurden. Durch eine gewichtete Addition und Mittelwertbildung der Einzelspektren wurde das Gesamtspektrum erhalten, welches dann vom Oszilloskop an den Messrechner übergeben wurde. Ein Postionisationsspektrum von α -CHCA ist in Abb.4.15 gezeigt. Neben den prompten Signalen des Molekülions $[M]^+$ bzw. der protonierten Moleküls $[MH]^+$ bei einer Flugzeit (ToF) von $18,33\mu s$ (diese beiden Signale konnten aufgrund des großen Feldgradienten und dem damit verbundenen schlechten Auflösungsvermögen des Lin-ToF nicht weiter getrennt werden) sind auch die Signale der Fragmente $[M-H_2O+H]^+$ (TOF= $17,46\mu s$) sowie $[M-H_2O-CN+H]^+$ (TOF= $16,28\mu s$) zu erkennen. Die beiden Alkaliionensignale bei $6,46\mu s$ (Na^+) bzw. $8,37\mu s$ (K^+) stammen aus der Matrix bzw. dem Lösungsmittel. Deutlich wird das relativ schlechte Auflösungsvermögen des Massenspektrometers an der Überlagerung der Signal des Molekülions $[M]^+$ und dem protonierten Molekül ($[M+H]^+$ ($m/\Delta m \leq 100$)). Diese laufen ineinander, für die Auswertung spielte es jedoch keine Rolle, da das Signal als Ganzes integriert wurde. Es konnte davon ausgegangen werden, dass das Auftrettsverhältnis der beiden Ionen zueinander über die gesamte Messung im Mittel konstant war. Neben den prompten Ionen, die für die Bestimmung der Probendicke, des Abstandes des Postionisationsortes von der Probenoberfläche und die Normierung der Massenspektren von Bedeutung waren, mussten auch die Postionisationssignale betrachtet werden. Aus ihnen sollte schlussendlich die Geschwindigkeitsverteilung der Neutralteilchen bestimmt werden. Die Postionisationssignale besitzen im Vergleich zu den prompten Signalen eine geringe Halbwertsbreite (60ns vs. 250ns). Dies ist sehr deutlich in Abb. 4.15 zu erkennen. Dass dieser Wert nicht noch weiter verringert werden konnte, ist vor allem auf die Ortsunschärfe (verursacht durch die Spotgröße des Postionisationslasers) von ca. $100\mu m$ zurückzuführen. Dieser Wert konnte aus bereits beschriebenen Gründen (s.a. Abschn. 4.5.2) nicht weiter verringert werden. Ein weiterer Fehler könnte in der Anregungsdauer des Postionisationslasers ($t_{Puls} \approx 6ns$) liegen, diese scheint jedoch nicht maßgeblich für die Signallbreite verantwortlich zu sein. Werden mehrere Spektren übereinandergelegt, erkennt man deutlich die Abhängigkeit der Peakflächen des Postionisationssignals vom *delay*. Die Überlagerungen sind in Abb. 4.16 dargestellt. Die Signale wurden manuell integriert. Diese Vorgehensweise war notwendig, da es immer wieder zu Überlagerungen von direkten (prompten) und Postionisationssignalen (die durch Veränderungen des *delay* ständig andere Positionen annahmen, s.a. Abb. 4.15) kam. Dies machte eine permanente Prüfung der Spektren notwendig. Bei der Auswertung wurde jedoch nur die Molekülpeaks (soweit vorhanden), das $[M-H_2O+H]^+$ -Ion und das Postionisationssignal betrachtet. Die prompten Ionen

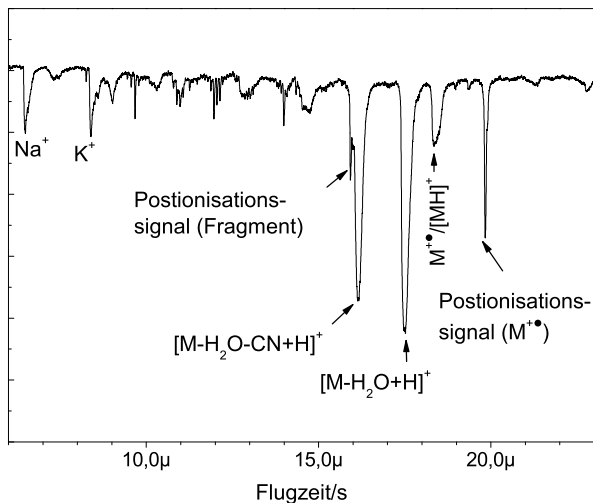


Abbildung 4.15: Massenspektrum mit Postionisationssignal von α -CHCA (*delay* 1,1 μ s). Neben dem prompten Ion bei einer Flugzeit von 18,33 μ s sind auch die Signale der prompten Fragmente $[M-H_2O+H]^+$ (TOF=17,46 μ s) sowie $[M-H_2O-CN+H]^+$ (TOF=16,28 μ s). Das Postionisationssignal ist bei einer Flugzeit von 19,6 μ s zu erkennen. Deutlich wird der Unterschied der Halbwertsbreiten der Signale. Dies ist mit dem geringen Ortsfehler der Nachionisation zu begründen.

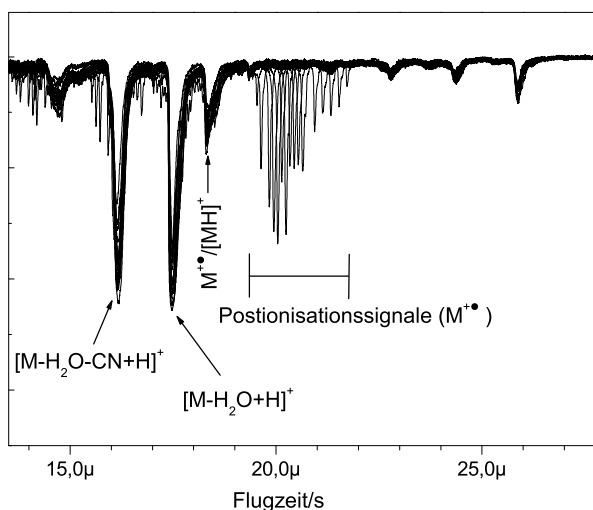


Abbildung 4.16: Überlagerung von Massenspektren: FA mit Postionisationssignalen. Man beachte die verschiedenen *delay*-Zeiten.

waren gleichzeitig ein Maß für die Leistung des Desorptionslasers und waren daher für die Auswertung von unmittelbarer Bedeutung (s.a. Kap. 4.7.3).

4.7.1 Abstandsbestimmung

Für die Bestimmung der Ablationsgeschwindigkeit war es notwendig, den Abstand zwischen der Probenoberfläche und dem Postionisationsort präzise zu bestimmen. Die in einer früheren Arbeit [82] beschriebene Abstandsbestimmung erzeugte relativ große Fehler von mindestens 0.1mm. Dies entspricht einer Ortsunsicherheit von ca. $\pm 20\%$ bei den eingestellten Abständen von 0.5-1.1mm. Daher musste die Bestimmung des Abstandes auf eine andere Weise geschehen. Aus den Postionisationspektren wurde schnell deutlich, dass die zeitliche Differenz zwischen dem prompten und dem Postionisationssignal größer war als das eingestellte *delay*. Dies kann durch die unterschiedlichen Ionisationsorte der beiden Spezies erklärt werden (Abb. 4.19). Das prompte Ion (1) wird direkt auf der Probenoberfläche ionisiert. Das Potential beträgt dort U_1 , liegt also etwas unterhalb der Repellerspannung U_{Rep} . Die Auswirkungen der Probendicke auf die Massenspektren sind in Abschnitt 4.7.2 gezeigt. Die ablatierten Neutralen bewegten sich nach der Laserdesorption nun vorzugsweise in Richtung des Detektors (s.a. 3.2.3). Nach wenigen μs erfolgte dann die Ionisation in einem räumlichen Abstand d von der Probenoberfläche, es entstand das mit (2) bezeichnete Ion. Durch das an dieser Stelle anliegende Potenzial U_2 erhielt dieses Teilchen eine geringere kinetische Energie als das Ion 1, und die Flugzeit verlängerte sich zusätzlich zum *delay* um den durch das niedrigere Potenzial verursachten Wert. Daher war es möglich, den Abstand aus den absoluten Flugzeiten der Ionen zu bestimmen. Dazu müssen die Geräteparameter jedoch alle genau bekannt sein:

- Die Probendicke beeinflusst die Flugzeit der prompten Ionen (s.a. Kap. 4.7.2) sowie den Abstand zwischen Ablations- und Postionisationsort.
- Die Länge der feldfreien Driftstrecke im Flugrohr muss präzise bestimmt werden. Dies erfolgte in dieser Arbeit durch die Aufnahme mehrerer Kalibrationsspektren und deren Korrelation mit den theoretisch zu erwartenden Flugzeiten der betrachteten Ionen.
- Die Geometrie der Ionenquelle bestimmt maßgeblich die Flugzeiten der einzelnen Ionen und muss in die Berechnung mit einbezogen werden
- Der Detektor verfügt über ein zusätzliches Beschleunigungsfeld, mit dem eine

4 Experimenteller Teil

Nachbeschleunigung der Ionen bewirkt wird. Diese muss in den Berechnungen berücksichtigt werden.

Die Bestimmung der theoretischen Flugzeiten erfolgte dann rechnerisch. Hierzu wurde eine einfache Addition der Flugzeiten innerhalb der einzelnen Bereiche (dazu sei auf Kap. 4.2 ff. verwiesen) des Massenspektrometers vorgenommen:

$$t_{ges} = t_1 + t_2 + t_3 + t_4 + t_5 \quad (4.1)$$

wobei t_1 die erste Beschleunigungsstrecke, t_2 die feldfreie Driftstrecke zwischen beiden Beschleunigungsstrecken, t_3 die zweite Beschleunigungsstrecke, t_4 die Driftzeit durch das Flugrohr und t_5 schließlich die Flugzeit durch den Detektor beschreibt. Reduziert wird die Flugzeit der Ionen durch ihre Initialgeschwindigkeit v_0 . Diese nimmt nach Juhasz et al. [6] Werte zwischen 270ms^{-1} und 540ms^{-1} an. Diese Werte variieren leicht mit der Ablationswellenlänge und der Matrix. Bei den hier verwendeten Beschleunigungsspannungen kam es zu einer Verringerung der Flugzeiten im sub-ns Bereich, daher können die Startgeschwindigkeiten der Ionen vernachlässigt werden.

Die Flugzeit t_1 kann über Gl. 2.1 und 2.2 beschrieben werden. Damit ergibt sich für t_1 :

$$t_1 = 2 * s_1 / \sqrt{\frac{2 * e * z * \Delta U}{m}} \quad (4.2)$$

wobei für ΔU gilt:

$$\Delta U = U_{I(\text{ionisationsort})} - U_{1.Platte} \quad (4.3)$$

Der Faktor 2 vor dem Wurzelterm ergibt sich daraus, dass für die Durchquerung des Bereiches die mittlere Geschwindigkeit des Ions bestimmt werden muss, da es sich um eine linear beschleunigte Bewegung handelt. Von besonderer Bedeutung ist hierbei, dass die Potenzialdifferenz am Desorptions- bzw. Ionisationsort aufgrund der Probendicke nicht identisch mit der Repellerspannung ist (s.a. Abb. 4.20). Dies war auch für die zweite Beschleunigungsstrecke s_3 und den Bereich vor dem Detektor s_5 zu beachten. In den feldfreien Driftstrecken s_2 und s_4 sind Eintritts- und Austrittsgeschwindigkeiten identisch. Zur Verdeutlichung dieses Zusammenhanges sei auf Abb. A.2 im Anhang verwiesen.

Die Gesamtdriftzeit ergab sich nun nach

$$t_{ges} = \frac{2 * s_1}{v_1} + \frac{s_2}{v_1} + \frac{s_3}{\frac{v_3}{2} + v_1} + \frac{s_4}{v_1 + v_3} + \frac{s_5}{v_1 + v_3 + \frac{v_4}{2}} \quad (4.4)$$

Dabei gilt für die Geschwindigkeiten v_n :

- v_1 ist die Austrittsgeschwindigkeit aus der ersten Beschleunigungsstrecke

4.7 Bestimmung des Postionisationsortes und der Probendicke

- v_2 entspricht hierbei v_1 , da die Ionen in der feldfreien Driftstrecke keinerlei Beschleunigung erfahren. Daher wurde v_2 bereits in der obigen Gleichung substituiert
- v_3 beschreibt die Geschwindigkeitszunahme der Ionen nach der zweiten Beschleunigungsstrecke.
- Die Geschwindigkeit, die die Ionen beim Auftreffen auf den Detektor haben, ist durch v_4 gekennzeichnet.

Ersetzt man die einzelnen Geschwindigkeiten nun durch den Zusammenhang von Beschleunigungsspannung, Masse und Anzahl der Ladungen nach Gl. 2.1, erhält man folgenden Zusammenhang:

$$t_{ges} = 2 * s_1 / \sqrt{\frac{2 * z * e * \Delta U}{m}} + s_2 / \sqrt{\frac{2 * z * e * \Delta U}{m}} + s_3 / \sqrt{\frac{2 * z * e * U_{1.Platte}}{m}} \\ + s_4 / \sqrt{\frac{2 * z * e * U_I}{m}} + s_5 / \left[\sqrt{\frac{2 * z * e * U_I}{m}} + \sqrt{\frac{z * e * U_D}{2 * m}} \right]$$

Hierbei bezeichnet U_I das Potenzial am Desorptionsort, und U_D bezeichnet die Beschleunigungsspannung am Detektor. Nun können die Werte für t_1 , t_2 , t_3 und t_5 sehr einfach bestimmt werden, da für die ersten drei Teilflugzeiten die nur Quellengeometrie sowie die Beschleunigungsspannungen maßgeblich waren. Die in Abb. 4.1 angegebenen Maße für die Plattenabstände wurden durch eigene Messungen überprüft und konnten bestätigt werden. Auch die Flugzeit t_5 konnte anhand der Arbeit von T. Muskat [84] bestimmt werden. Nur die Driftzeit t_4 im Flugrohr bedurfte, bedingt durch den Umbau der Ionenquelle, einer neuerlichen Prüfung. Um diesen Wert präzise bestimmen zu können, musste das Massenspektrometer kalibriert werden. Dies soll im folgenden Kapitel beschrieben werden.

4.7.2 Kalibration des Massenspektrometers und Bestimmung der Driftstreckenlänge

Zur Kalibration des Massenspektrometers wurden sehr dünne Proben aus α -CHCA und 2,5-DHB hergestellt. Dabei wurden durch die Zugabe einer geringen Mengen Kalium- wie auch Cäsiumchlorid zu der Probenlösung zusätzlich zu den Signalen der protonierten Matrix- und Fragmentionen die Signale der Alkali-Ionen detektiert. Ein Massenspektrum von 2,5-DHB ist in Abb. 4.17 gezeigt.

Verschiedene Massenspektren wurden an mehreren Stellen des Probenträgers gemessen. Aus den Flugzeiten konnte dann ein Mittelwert erhalten werden, aus dem dann die Länge des Flugrohres mit 2,034m berechnet werden konnte. Für diese Messungen war

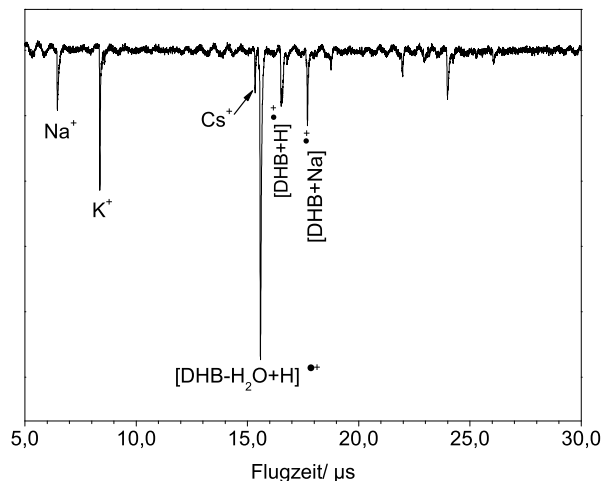


Abbildung 4.17: Massenspektrum von 2,5-DHB zur Kalibration des Spektrometers unter Zusatz von Alkalisalzen. So sind neben den prompten Ionen aus der Matrix auch die Signale der Ionen von Cäsium und Kalium zu erkennen.

es von besonderer Bedeutung, dass die Proben sehr dünn waren. Ersichtlich ist dies aus Abb. 4.18. Schematisch ist hier die Probenoberfläche dargestellt, und mit den Ziffern 1 und 2 sind zwei unterschiedliche Ablationsorte dargestellt. Aufgrund des höheren Potentials wird das Ion an Punkt 1 eine kürzere Flugzeit besitzen als wenn es an Punkt 2 gestartet wäre. Verlagert sich der Ablationsort des Ions $20\mu\text{m}$ in Richtung des Repellers, verändert sich z.B. die Flugzeit des $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ -Kations von 2,5-DHB (m/z 137) bereits um 14ns . Aus den Kalibrationsmessungen ergaben sich auch Flugzeitunterschiede in dieser Größenordnung, die Messung ergab einen maximalen Flugzeitunterschied von 16ns bei einer Standardabweichung von 6ns . Diese Fehler können schon in der Größenordnung der Fertigungstoleranzen der Probenträger liegen. Weiterhin können hier schon die Messgeräte selbst und die Auswertungsmethode der Spektren zu nicht mehr vernachlässigbaren Fehlern führen. So ist die Kanalbreite des verwendeten Speicheroszilloskops 2ns , und für die Auswertung wurden die Spektren geglättet, indem jeder Datenpunkt aus dem Mittelwert der umliegende Datenpunkte neu berechnet wurde.

Nun konnte der Ablationsort der prompten Ionen aus den Flugzeiten für alle Proben sehr genau bestimmt werden. Die Bestimmung des Postionisationsortes war weniger schwankungsanfällig, da er nur von der Position des Lasers abhängig war. Diese konnte mit Hilfe des oben beschriebenen Aufbaus jedoch leicht variiert werden. Die Bestimmung des Postionisationsortes erfolgte über die Flugzeit des nachionisierten Teilchens. Da die Parameter des Massenspektrometers durch die Kalibrationsmessungen sehr genau bekannt waren, konnte der Ort der Postionisation auf $50\mu\text{m}$ genau bestimmt werden.

4.7 Bestimmung des Postionisationsortes und der Probendicke

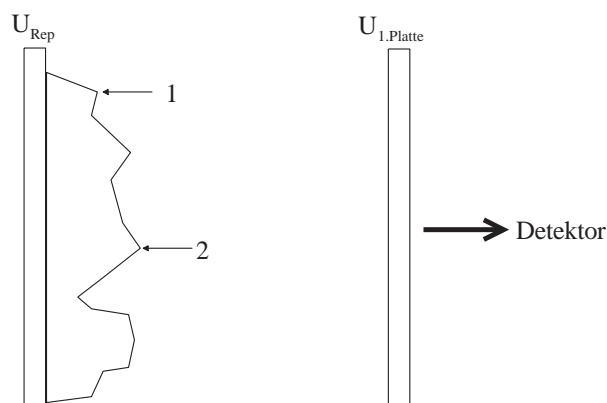


Abbildung 4.18: Abhängigkeit der Flugzeit vom Ablationsort. Das an der Stelle 1 erzeugte Ion erhält aufgrund des höheren Potentials eine größere Energie als das an der mit 2 gekennzeichneten Position erzeugte Ion.

Dabei war zu beachten, dass dies ein rechnerischer Wert war; die reale Genauigkeit der Postionisationsortbestimmung lag, bedingt durch die Ausdehnung des Postionisationslaserspots ($d \approx 70 \mu\text{m}$), bei ungefähr 100μ . Diese Annahme darf getroffen werden, da der wahrscheinlichste Ort der Postionisation immer im Zentrum der Laserspots liegen wird. Allerdings kann nicht exakt bestimmt werden, in welchem Bereich des Laserspots und damit in welchem Abstand von der Probenoberfläche genau die Nachionisation stattgefunden hat. Daher ist die Annahme des oben genannten Fehlers des Postionisationsort zulässig.

Allgemein war bei den Berechnungen zu beachten, dass es sich bei den in der MALDI entstehenden Ionen meist um protonierte Moleküle/Fragmente ($[\text{MH}]^+$ bzw. $[\text{M-X+H}]^+$) handelt, die Photoionisation jedoch Radikalkationen die $[\text{M}]^{\bullet+}$ bzw. $[\text{M-X}]^{\bullet+}$ (ob es sich bei letzteren nicht doch um $[\text{M-X}^{\bullet}]^+$ handelt, kann in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Daher soll für die fragmentierten Radikalkationen hier erstere Schreibweise angewandt werden) erzeugt. Dies muss in der Kalkulation des Abstandes berücksichtigt werden.

4.7.3 Normierung der Flächenintegrale

Die Leistung der Laser wies, wie bereits beschrieben, teilweise starke Schuß-zu-Schuß-Schwankungen auf. Insbesondere das MOPO-System zeigte eine starke Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen wie Umgebungstemperatur und Kühlwassereigenschaften. Diese Leistungsschwankungen konnten durch die Aufzeichnung der Leistungsdaten des Postionisationspulses gut detektiert werden und waren damit einer Auswertung zu-

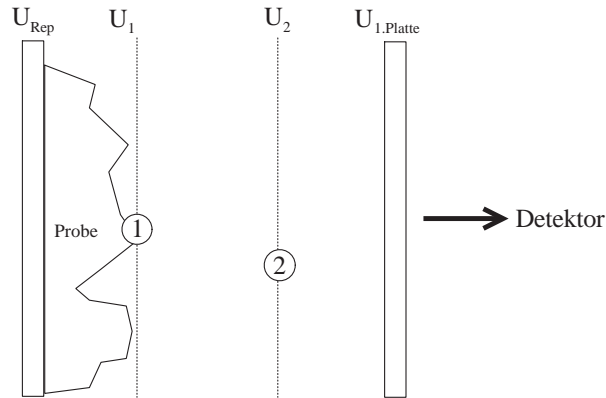


Abbildung 4.19: Flugzeitunterschiede zwischen prompten und nachionisierten Ionen. Die direkt von der Probenoberfläche desorbierten Ionen (1) erhalten aufgrund des höheren Potentials eine größere kinetische Energie. Daraus ergibt sich automatisch eine verringerte Flugzeit im Vergleich zu den im *plume* erzeugten Ionen (hier mit (2) bezeichnet). Diese Flugzeitunterschiede liegen in Abhängigkeit zum Abstand bei bis zu mehreren 100ns.

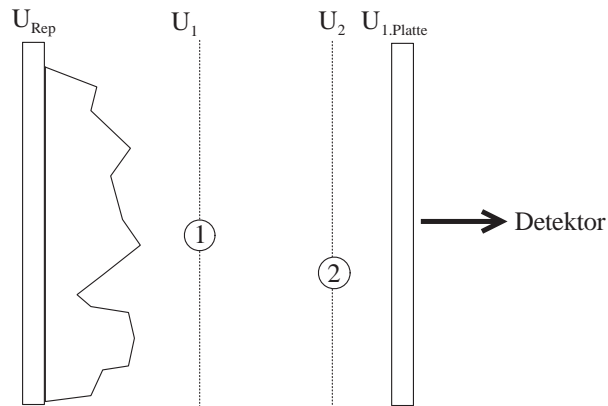


Abbildung 4.20: Hier ist das Potenzial in Abhängigkeit zum Positionierungsort dargestellt. Durch das höhere Potenzial erhalten die mit (1) bezeichneten Ionen eine größere kinetische Energie als die weiter vom Repeller entfernten Ionen (2). Aus diesen Flugzeitunterschieden kann über die in 4.7.1 diskutierten Formeln der jeweilige Positionierungsort bestimmt werden.

gänglich. Aber auch der Desorptionslaser lief nicht mit konstanter Leistung, auch hier kam es zu Leistungsschwankungen innerhalb einer Messreihe. Diese waren allerdings um den Faktor 10 geringer als die Leistungsschwankungen des Postionisationslasers. Einen weiteren Unsicherheitsfaktor stellte die Probe an sich dar. Durch die gewählte *dried droplet*-Methode kam es zu der Ausbildung von inhomogenen Proben. Dies führte dazu, dass die Ablation ein sehr unstetes Verhalten aufwies. So konnten starke Schwankungen der Intensitäten der Massenspektren beobachtet werden, wenn die Zahl der Spektren, über die gemittelt wurde, auf 4 oder 5 reduziert wurde. Diese Unsicherheiten machten es erforderlich, die Massensignale einer Gewichtung zu unterziehen. Als geeignet erwies sich eine Vorgehensweise, die im Folgenden beschrieben werden soll:

Die Anzahl der nachionisierten Teilchen hängt in einer gewissen Näherung von der Anzahl der prompten Matrixionen ab. Unter der Voraussetzung, dass das Verhältnis zwischen den gebildeten Matrixionen und der Gesamtzahl der ablatierten Teilchen konstant bleibt, kann aus dem prompten Signal der Matrixionen und -fragmente auf die Zahl der ablatierten Analytmoleküle geschlossen werden. Daher wurden die Postionisationssignale auf die Fläche der Signale der prompten Matrixionen und -fragmente normiert. Hinzu kam die Abhängigkeit der Nachionisation von der Leistung des MOPO-Systems. Daher mussten die Postionisationssignale noch um diesen Einfluss bereinigt werden. Hier erwies sich eine lineare bzw. logarithmische Gewichtung der Laserleistung als sinnvoll: vor Beginn der Messungen wurde die Leistung des Postionisationslaser mittels eines Messgerätes (407A, Spectra Physics, Mountain View, USA) absolut bestimmt. Mit diesen Daten wurden dann die vom externen Detektor (s.a. Kap. 4.5.2 ausgegebenen Werte korreliert. Dabei zeigte sich, dass es sinnvoll ist, die Laserleistung bei einem Wert von über 800 *counts* (dies entsprach einer Leistung des MOPO am Auskoppelfenster von ca. 1mJ) mit dem Logarithmus naturalis zu gewichten. So konnten auftretende Sättigungseffekte mit berücksichtigt werden. Unterhalb dieses Wertes wurden die Leistungsdaten linear miteinbezogen.

4.7.4 Anpassung der Verteilung

Aus den oben beschriebenen Flächenintegralen und den zugehörigen Geschwindigkeiten konnte die Verteilung der Geschwindigkeiten erhalten werden. Die Geschwindigkeit der Teilchen am Postionisationsort ergab sich durch den Abstand zwischen Postionisationsort und der Probenoberfläche und dem jeweiligen *delay*. Für die Ermittlung der Verteilung wurden die Flächenintegrale über die Geschwindigkeiten aufgetragen. Die entsprechenden Grafiken sind in Kap. 5 dargestellt. Mit dem Programm Origin 6.0 erfolgte dann eine Anpassung der Funktion aus Gl. 3.14 an die Messwerte. Dabei wurde

zur Vereinfachung angenommen, dass der Winkel Φ 0° beträgt. Diese Annahme ist zulässig, da der Anteil der sich in radialer Richtung zur Probenoberfläche bewegenden Teilchen bei den hier untersuchten Abständen bereits sehr gering ist. Bedingt durch den Versuchsaufbau lag der minimale Abstand zwischen Probenoberfläche und Positionierungsstelle bei 0,6mm, und daraus kann mit den Daten für die Spotdurchmesser des Desorptions- und Positionierungslasers von jeweils $50\mu\text{m}$ der geometrisch maximal mögliche Winkel für Φ bestimmt werden. Er betrug hier 4° bzw. $\sin\Phi=0,08$. Der sich daraus ergebende Messfehler für die Verteilungsfunktion kann vernachlässigt werden. Gleichzeitig liegt der Wert für $\cos\Phi$ bei dem oben angegebenen Winkel bei nahezu 1. Aus der Funktion wurde dann nach mehrfacher Iteration der Wert für die Temperatur der Verteilung gefunden. Dabei wurde die Strömungsgeschwindigkeit $v_{stream}=0$ gesetzt. Aus der so erhaltenen Temperatur konnte dann die wahrscheinlichste Geschwindigkeit v nach Gl. 4.5 bestimmt werden:

$$v = \sqrt{\frac{2 * k * T}{m}} \quad (4.5)$$

mit

- k : Boltzmannkonstante
- T : Temperatur
- m : Masse des betrachteten Teilchens

Die Temperatur des *plume* konnte in einer zweiten Rechnung ermittelt werden. Dort wurde eine Variation von v_{stream} zugelassen. Durch Iteration ergaben sich dann die Werte für die Strömungsgeschwindigkeit und die Temperatur. Die Fehler wurden automatisch mitberechnet und sind in den jeweiligen Übersichtstabellen für die jeweiligen untersuchten Systeme angegeben.

4.7.5 Experimentelle Bestimmung der Probendicke

Neben den Geschwindigkeitsverteilungen konnte aus den Massenspektren auch die relative Probendicke erhalten werden. Dieser Wert war für die Abstandsbestimmung von großer Bedeutung. Aber auch zur Überprüfung der Probenpräparation kann die Probendicke als Maß für die Güte der Proben herangezogen werden. In diesen Experimenten war eine homogene Probenoberfläche stark erwünscht, bedingt durch das Kristallisationsverhalten der Matrices und des Analyten konnte dieses Ziel jedoch nur partiell erreicht werden. Bei Kenntnis der absoluten Probendicke wäre es möglich, den Präparationsprozess noch weiter zu optimieren und zu vereinheitlichen. Des Weiteren wäre es

4.7 Bestimmung des Positionsortes und der Probendicke

Probenträger	min. Flugzeit/ μs	Max. Flugzeit/ μs
1	15,563	15,640
1	15,556	15,683
1	15,558	15,674
1	15,558	15,662
1	15,553	15,721
2	15,587	15,740
2	15,577	15,661

Tabelle 4.1: Abhängigkeit der minimalen Flugzeit des $[\text{M-H}_2\text{O+H}]^+$ -Ions von 2,5-DHB vom Probenträger und Darstellung der maximal auftretenden Flugzeiten der untersuchten Proben

möglich, aus der Probendicke bei Kenntnis der aufgebrauchten Substanzmenge direkt auf das Kristallisationsverhalten zu schließen und darauf aufbauend z.B. die Matrixmischungen optimieren.

Die Bestimmung der Probendicke wurde bereits in der Diplomarbeit [82] diskutiert. Dort gelang es, die Probendicke mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen abzuschätzen. In diesem Kapitel soll die Bestimmung der Probendicke aus den Flugzeiten der prompten Ionen gezeigt werden. Dazu wird in Abb. 4.18 das Zustandekommen der unterschiedlichen Flugzeiten in Abhängigkeit zum Ablationsort gezeigt. So erhalten Ionen, die an Pos. 1 entstehen, eine höhere kinetische Energie, da sie einer größeren Potentialdifferenz ausgesetzt als die an Pos. 2 gebildeten Ionen. Zwar ist die gesamte Flugstrecke der Ionen aus Pos. 2 etwas kürzer, dieser Vorteil wird jedoch durch das geringere Potenzial überkompensiert. Der Zeitvorteil durch die geringere Flugstrecke beträgt bei einem Abstandsunterschied von $100\mu\text{m}$ ca. 2ns , während der sich durch die hier anliegenden unterschiedlichen Potenziale ergebende Flugzeitunterschied bei 30ns liegt. Folglich kann aus den Flugzeitunterschieden der prompten Ionen auch der genaue Ablationsort bestimmt werden. Allerdings kann aus den relativen Veränderungen der Flugzeiten noch nicht auf die Probendicke geschlossen werden. Um die absolute Dicke der Probe bestimmen zu können, muss die Flugzeit der Ionen, die direkt von der Probenträgeroberfläche starten, bekannt sein. Aus den in Abschn. 4.6 beschriebenen Proben zur Kalibration des Massenspektrometers konnten die Flugzeiten dieser Ionen sehr genau bestimmt werden. Die Auswertung weiterer Proben (in diesem Falle handelte es sich um 2,5-DHB) zeigte ein interessantes Bild: die minimale Flugzeit der Ionen ist nicht von der Probe selbst, sondern nur vom verwendeten Probenträger abhängig. Dies ist in Tab. 4.1 gezeigt.

Bei Betrachtung eines Probenträgers ergeben sich Schwankungen der Flugzeiten im

4 Experimenteller Teil

Bereich von ± 5 ns. Dieser Wert liegt bereits in der Größenordnung der Auflösung des Speicheroszilloskops (2 ns) und dem durch die Glättung der Spektren verursachten Fehler. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Signale von Ionen stammen, die direkt von der Probenträgeroberfläche desorbiert worden sind. An dieser Stelle kann die Dicke der Probe mit 0 mm angesetzt werden. Betrachtet man hingegen die maximalen Flugzeiten, ist keinerlei Korrelation zu erkennen. Diese Flugzeiten hängen auch nur von der Art der Probe ab. So zeigten sich Unterschiede im Vergleich von Proben, bei denen die Zugabe der Matrix empirisch erfolgte, und denen nach dem in Kap 3.3.2 beschriebenen Verfahren hergestellten Proben. Während erstere bei der Flugzeit des $[M-H_2O+H]^+$ -Ions von 2,5-DHB eine Standardabweichung von 34 ns zeigten, lag diese bei den standardisiert hergestellten Proben bei 27 ns. Diese Unterschiede sind jedoch nicht experimententscheidend.

Ausgehend von den Daten der minimalen, maximalen und mittleren Flugzeit kann nun die absolute Probendicke bestimmt werden. Eine Übersicht der untersuchten Proben zeigt Abb. 4.21. Die schwarzen Balken bezeichnen die mittlere Probendicke, diese wurde aus dem Medianwert aller Flugzeit berechnet und beschreibt daher die am häufigsten gemessene Flugzeit. Somit liegt die Probendicke in einem Bereich von $50 \mu\text{m}$ und $200 \mu\text{m}$. Die minimale Probendicke entspricht damit auch den in der Diplomarbeit abgeschätzten Werten. Deutlich erkennbar ist, dass es auch gelang, sehr dünne Proben aus 2,5-DHB zu präparieren. Allerdings ist die Homogenität der Proben noch nicht ausreichend hergestellt. Der Fehlerbalken beschreibt die längste gemessene Flugzeit. Dieser Wert bezeichnet die maximale Höhe der Probe. Die großen Abweichungen von der häufigsten Flugzeit ergeben sich aus dem kristallinen Charakter der Proben. Oft war schon mit dem bloßen Auge zu erkennen, dass einzelne Kristalle aus der Probenoberfläche herausragten. Diese wurden beim Beschuss der Probe jedoch relativ schnell zerstört, und die Probenoberfläche wurde etwas homogener. Dies konnte auch anhand der Massenspektren bestätigt werden. Oft gab es nur einen oder zwei Spektren, in denen die Flugzeit signifikant verlängert war. Für diese These spricht auch, dass die maximale Probendicke stark vom gewichteten mittleren Wert abweicht. Exemplarisch sind die starken Flugzeit-schwankungen in Abb. 4.22 gezeigt, hier wurde das $[M-H_2O+H]^+$ -Signal von 2,5-DHB beobachtet. Zu Beginn der Experimente gibt es noch mehrere Signale mit relativ langer Flugzeit, diese treten später nicht mehr auf. Mit zunehmender Ablationsdauer nahm die Streuung der Flugzeiten ab. Die Abnahme der mittleren Flugzeit der Ionen beschreibt den zunehmenden Abtrag der Probe. Interessant ist die angedeutete Zweiteilung der Flugzeitbereiche ab dem 17. Experiment. Dies könnte aus einer inhomogenen Analytverteilung herrühren. Da bei der Aufnahme der Massenspektren in erster Linie auf ein

4.7 Bestimmung des Positionierungsortes und der Probendicke

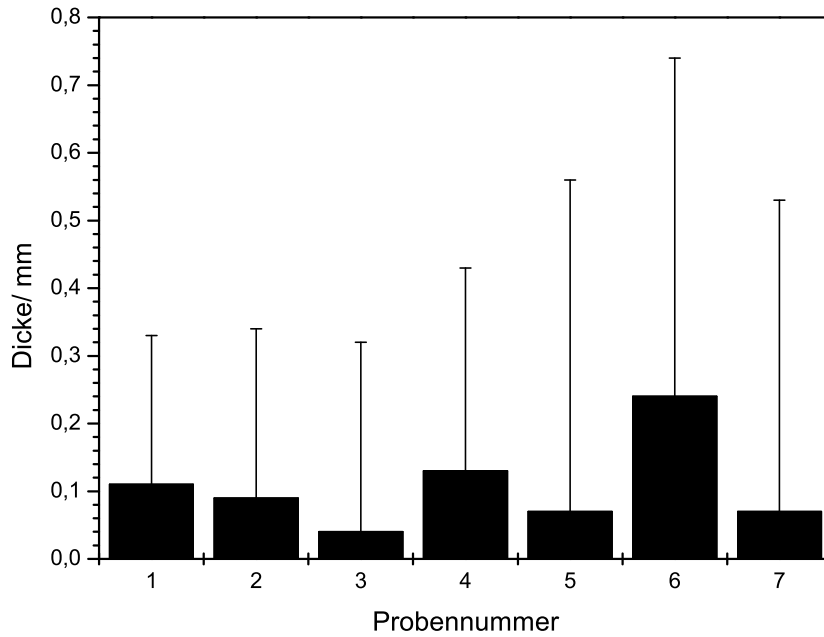


Abbildung 4.21: Dicke verschiedener Proben von 2,5-DHB. Die Linie bezeichnet die maximale Dicke, durch den Balken wird die mittlere Höhe der Probe bezeichnet. Die Probenhöhe wurde auf die minimale Flugzeit der prompten Ionen bezogen. Bei den minimalen Flugzeiten ist bei den verwendeten Probendicken davon auszugehen, dass eine Ionisation direkt auf der Probenträgeroberfläche erfolgte.

starkes Positionierungssignal des Analyten geachtet wurde, ist es möglich, dass dieser in zwei Bereichen der Probe in einem besonders gut ablatiert werden konnte. Durch Inhomogenitäten der Oberfläche kam es zu unterschiedlichen Flugzeiten. Durch das Drehen des Probenträgers kam es dann dazu, dass die Ablation an unterschiedlichen Stellen des Probenträgers stattgefunden hat. Dies erklärt auch die starken Schwankungen bei direkt nacheinander durchgeführten Messungen.

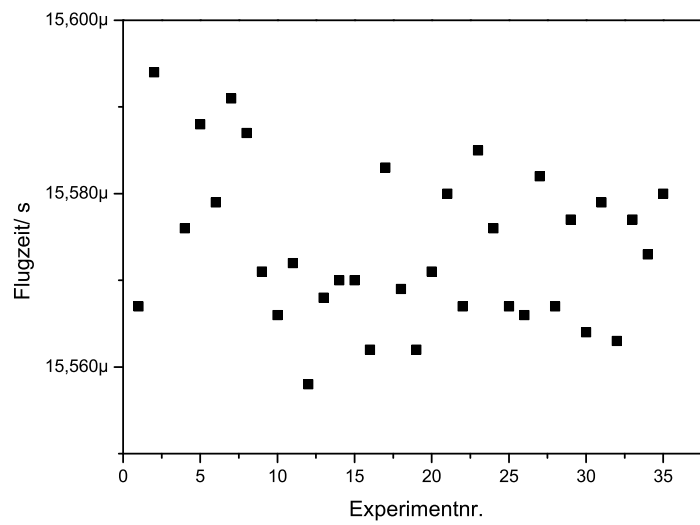


Abbildung 4.22: Flugzeitabnahme des $[M-H_2O+H]^+$ -Ions von 2,5-DHB. Erkennbar ist eine leichte Abnahme der Flugzeit mit zunehmender Experimentnummer. Diese ist jedoch im Vergleich zur Inhomogenität der Probe gering.

5 Ablationsgeschwindigkeiten von Matrix- und Analytmolekülen

Das Ablationsverhalten in der MALDI ist neben den apparativen Parametern Wellenlänge des verwendeten Lasers, Spotdurchmesser und Pulsdauer auch in einem starken Maße von der verwendeten Matrix abhängig. So konnte bereits gezeigt werden, dass sich das Ablations- und Ionisationsverhalten verschiedener Matrizes stark unterscheidet [4]. In mehreren Arbeiten wurden bisher die Startgeschwindigkeiten von Matrix- und Analytione[n] [5, 6, 7, 8] untersucht. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Initialgeschwindigkeiten der Analytione[n] gelegt, diese wurden aus verschiedenen Matrizes desorbiert. Weiterhin wurden auch Untersuchungen an Standard-Matrizes wie 2,5-DHB, Sinapinsäure, Ferulasäure, α -CHCA, HPA (Hydroxy-Picolinsäure) und HABA([2-(4-Hydroxyphenylazo)]-Benzoessäure) durchgeführt. Dazu wurden unterschiedliche Verfahren verwendet. In der Methode der feldfreien Driftstrecke [13] legen die Ionen nach der Desorption eine Strecke von wenigen cm zurück und treten dann in ein Lin-ToF MS ein. Dort erfolgt nach einer kurzen Zeitspanne (einige μ s) durch das Anlegen eines elektrischen Feldes eine Beschleunigung der Ionen in Richtung eines Detektors. Aus der im feldfreien Raum zurückgelegten Strecke und dem zeitlichen Versatz zwischen Ionisation und Beschleunigung im Massenspektrometer kann auf die Startgeschwindigkeit der Ionen geschlossen werden. Nachteilig an dieser Methode ist, dass die messbaren Geschwindigkeitsintervalle durch die Länge der feldfreien Flugstrecke begrenzt werden. Damit ist das Auflösungsvermögen für die Geschwindigkeiten begrenzt. Ein weiterer Nachteil ist in dem nicht auszuschließenden Eindringen der elektrischen Felder in die feldfreie Driftstrecke zu sehen. Hierbei werden insbesondere leichte Ionen beeinflusst. Sie erfahren durch die geringen elektrischen Felder eine Beschleunigung, und ihre Geschwindigkeit kann nicht mehr als konstant angesehen werden. Eine weitere Methode zur Bestimmung der Initialgeschwindigkeiten der ablatierten Ionen bietet die *delayed extraction* (DE)-Methode [6]. Bei dieser Messmethode expandieren die Ionen nach der Ablation in die erste Stufe einer zweistufigen Ionenquelle. Dabei liegt im Moment der Ablation noch kein elektrisches Feld an. Dieses wird erst nach einer kurzen Verzögerungszeit (200-600ns) durch das Anlegen einer Hoch-

spannung erzeugt. Aus der Flugzeit der Ionen und der jeweiligen Verzögerungszeit kann dann auf den Ort geschlossen werden, an dem das Ion zum Beginn der Beschleunigung zugegen war. (Zur Abhängigkeit der Flugzeit vom Ionisationsort sei zur Verdeutlichung auf Abb. 4.20 verwiesen). Mittels dieser Methode kann die mittlere Ablationsgeschwindigkeit der Ionen bestimmt werden. Eine Messung der Geschwindigkeitsverteilung sollte jedoch schwierig werden, da diese nur über die Breite der Ionensignale auf dem Detektor bestimmt werden kann.

Die vorgenannten Untersuchungen bezogen sich alle auf die Analyse der Ionengeschwindigkeiten. Allerdings wird der größte Anteil der desorbierten Teilchen nicht berücksichtigt: der Anteil der Ionen am gesamten ablatierten Material liegt bei 10^{-3} bis 10^{-4} . Um den Desorptionsvorgang genau untersuchen zu können, bedarf es also der Kenntnis des Ablationsverhaltens der Neutralteilchen. Diese wurden in dieser Arbeit mittels Postionisation nachgewiesen. Es wurden unterschiedliche Matrix- und Analytsysteme betrachtet. Dabei werden die Eigenschaften der Matrices und deren Einfluss auf einen Modellanalyten in den folgenden Kapiteln beschrieben und interpretiert.

5.1 Das Ablationsverhalten der Matrices

Es wurden bisher schon Versuche unternommen, die verschiedenen Matrices zu charakterisieren. Dies kann nach ihren chemischen Eigenschaften wie der pK_a -Werte oder auch ihrer Ionisationsenergien geschehen. Für die Korrelation der chemischen Eigenschaften und deren Einfluss auf die MALDI konnten bisher noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Eine weitere Klassifizierung der Matrices kann durch ihr Verhalten während der Ablation erfolgen. Vertes et al. [4] schlugen vor, die Matrices nach ihrer inneren Energie zu charakterisieren. Dabei wurden sog. Thermometermoleküle (TM, hier substituierte Benzylpyridinium-Salze) zur Hilfe genommen. Bei diesen Molekülen ist der einfache Zerfallsmechanismus bzw. sind die sehr genau bekannten thermodynamischen Eigenschaften von großem Vorteil für die Untersuchung der energetischen Verhältnisse innerhalb der Gasphase. So ist das Auftreten von Fragmenten der Thermometermoleküle ein Indiz für die übertragenen Energien. Bezogen auf die MALDI können mit diesen Molekülen die Eigenschaften der Matrix charakterisiert werden. So zeigten Vertes et al., dass sich eine Einteilung der Matrices nach kalt, medium und heiß bezogen auf ihre innere Energie vornehmen lässt. Hierbei wird angenommen, dass heiße Moleküle mehr Energie auf den Analyten übertragen als kalte. Folglich kommt es bei ersteren zu einer stärkeren Fragmentation des Analyten. Dies kann allerdings in einigen Fällen, z.B. für die Strukturaufklärung, auch erwünscht sein.

Mit Hilfe der oben beschriebenen Thermometermoleküle fanden Vertes et al. für die „Temperatur“ folgende Reihenfolge: CHCA < Sinapinsäure < 2,5-DHB. Dies widerspricht allerdings den von Medzihradsky et al. gefundenen Ergebnissen [89]. Dabei wurden Proteine aus verschiedenen Matrices desorbiert und über *collision induced dissociation* (CID) fragmentiert. In jener Arbeit wurde α -CHCA als „heiße“ Matrix klassifiziert, und 2,5-DHB als „kalt“ bezeichnet, da es bei der Verwendung letzterer zu geringerer Fragmentbildung des Analyten kam. Ähnliche Ergebnisse konnten Karas et al. [48] präsentieren. In ihren Experimenten wurden die Matrices auf ihr Fragmentationsverhalten auf Peptide und Nukleotide untersucht. Anstelle von „hot“ und „cold“ wurde hier die seit langem eingeführte Nomenklatur von „hard“ für stark fragmentierende Matrices und „soft“ für Matrices, die eher eine Desorption des intakten, protonierten Moleküls zulassen, verwendet. Es wurde eine nach abnehmender „Härte“ sortierte Reihenfolge der Matrices ermittelt: α -CHCA » 2,5-DHB > SA \approx THAP > ATT > HPA. Dabei wurde für jede Matrix der Anteil der nachgewiesenen Analytionen im Verhältnis zu den auftretenden Fragmenten untersucht.

Erklären lassen sich die starken Unterschiede in den Ergebnissen über die unterschiedlichen Ionenbildungsmechanismen der Analytmoleküle. Die TM liegen nach der Desorption bereits als Ion vor und können so nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung des matrixabhängigen Fragmentierungsverhaltens mittels der CID müssen die Analytmoleküle vorher noch protoniert werden. Dieser Protonentransfer verläuft energetisch nicht neutral, sondern ist exothermer Natur. Die frei werdende Energie wird zusätzlich auf das Analytion übertragen und führt dort zu einer höheren Gesamtenergie. Für die Untersuchung des Ablationsverhaltens und der dann auf die Analytmoleküle übertragenen Energie sollte das Verfahren der Thermometermoleküle besser geeignet sein, da hier die Ionisationsprozesse keine bedeutende Rolle mehr spielen.

Um den Ablationsprozess besser zu verstehen und die entsprechenden Charakteristika wie z.B. den Kühleffekt auf den Analyten der einzelnen Matrices bestimmen zu können, soll in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die Matrices bezüglich ihres Ablationsverhaltens unterscheiden. Hierbei soll, im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Einordnungen weder auf die Stärke der Fragmentierungen noch auf die Ionenbildung eingegangen werden. Im Folgenden werden die Geschwindigkeiten der ablatierten neutralen Matrix- und Analytionen im Anschluss an den Desorptionprozess beschrieben.

5.1.1 Geschwindigkeitsverteilungen aus einfachen Matrixsystemen

Das einfachste mögliche System zur Untersuchung der MALDI ist die Matrix selbst. Sie ist in erster Linie für den Ablationsprozess verantwortlich. Untersuchungen bezüglich der Ablationsgeschwindigkeiten der Neutralteilchen wurden bisher nur in geringem Maße an Ferulasäure durchgeführt [7]. Weitergehende Untersuchungen führte Muskat [84] an verschiedenen Matrices bei Ablationswellenlängen von 355nm, 337nm und 270nm durch. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen an verschiedenen Standard-MALDI-Matrices durchgeführt. Auch die Eigenschaften der noch relativ unbekannt Matrix DHAP wurden untersucht. In diesem Abschnitt wird das Ablationsverhalten der Matrix bei einer Ablationswellenlänge von 266nm und einem Druck von 1.0×10^{-6} mbar gezeigt. Dabei erfolgt ein Vergleich der Matrices untereinander. Im zweiten Teil dieses Abschnittes wird die Ablation des Analyten Chrysen aus den hier behandelten Matrices gezeigt und der Einfluss unterschiedlicher Matrices auf den Analyten diskutiert.

Die hier dargestellten Geschwindigkeitsverteilungen wurden durch die bereits beschriebene Aufnahme von Massenspektren der Matrix-Substanzen bzw. des Analyten durch die zeitversetzte Nachionisation der Neutralteilchen generiert. Die jeweiligen Maxima der Verteilungen wurden über eine verschobene Maxwell-Boltzmann-Verteilung ermittelt. Dazu wurde diese nach Gl. 3.15 an die Messwerte angepasst, und erhalten wurde das Maximum der Verteilung sowie die Temperatur der ablatierten Teilchen. Diese spiegelt die Breite der Verteilung wieder und kann daher als Maß für die Kühlung innerhalb des *plume* angesehen werden. Die Werte für die radialen Geschwindigkeiten und Temperaturen sind in diesem Fall nicht von Bedeutung, da in diesem Versuchsaufbau nur die Geschwindigkeitsverteilungen in Flugrichtung der Ablationswolke aufgenommen wurden. Dies konnte sichergestellt werden, indem die Nachionisation nur in der Normalen des Ablationsortes durchgeführt wurde. Dadurch wurden nur Moleküle untersucht, deren radialen Geschwindigkeiten einen Wert nahe Null annahmen.

Es sei noch darauf hingewiesen, dass mit dem Terminus der Ablationsgeschwindigkeit in allen Fällen das Maximum der Geschwindigkeitsverteilung gemeint ist. Bei der Temperatur von Matrix und Analyt ist in allen Fällen die Breite der Verteilung gemeint und nicht, wie angenommen werden könnte, die Temperaturen der Rotation, Schwingung oder auch Translation der Moleküle. Diese Nomenklatur wurde gewählt, um den Textfluss zu verbessern.

5.1.2 Geschwindigkeitsverteilungen der Matrices

Für die Untersuchung des Ablationsverhaltens wurden fünf gängige MALDI-Matrices ausgewählt: 2,5-DHB, α -CHCA, SA, FA sowie DHAP. Insbesondere die ersten beiden Matrices gelten als die Arbeitspferde der MALDI und werden für zahlreiche Analysen eingesetzt. Daher war das Ablationsverhalten dieser Matrices von besonderem Interesse. Gemäß dem in Kap. 3.3.2 beschriebenen Verfahren wurden die Proben aus dem Lösungsmittel THF präpariert und anschließend vermessen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Abstände zwischen Ablations- und Postionisationsort immer gleich blieben. Dies konnte i. Allg. auch gewährleistet werden (s. Tab. 5.1), allerdings kam es durch die nicht vermeidbaren Schwankungen in der Probendicke zu leicht unterschiedlichen Abständen. Die Leistung des Desorptionslasers wurde dabei in allen Fällen so gewählt, dass die Ablationsschwelle der Matrix knapp überschritten wurde. Wäre die Ablation mit konstanter Leistung erfolgt, hätte dies aufgrund der unterschiedlichen Ablationsschwellen der Matrices einen starken Einfluss auf das Ablationsverhalten gehabt. Die Leistungsabhängigkeit der Maxima der Geschwindigkeitsverteilungen ist in [84] gezeigt. Außerdem konnte durch diese Wahl der Leistung des Desorptionslasers vermieden werden, dass es zu starken Fragmentationen der Matrixmoleküle bei zu hohen Leistungen kommt. Dies würde ebenfalls die Auswertung der Massenspektren stark erschweren und musste daher vermieden werden.

α -CHCA

Die Matrix α -CHCA wird in vielen Fällen für die Peptidanalyse verwendet. Sie wirkt im Vergleich zu anderen Matrices stärker fragmentierend auf den Analyten [48]. Die Bildung von Fragmenten ist insbesondere für die Strukturaufklärung gewünscht und wird z. B. durch die Zugabe von Stoßgas (CID) erreicht. Dazu bedarf es jedoch einer Stoßzelle im Massenspektrometer selbst. Dies erhöht den apparativen Aufwand. Von daher ist es von Vorteil, wenn die Matrix diese Aufgabe partiell mit übernehmen kann. Die Matrix selbst zeigt moderate Fragmentierungen unter den Bedingungen der MALDI. Als stärkstes promptes Ionensignal war das $[M-H_2O+H]^+$ -Fragment zu beobachten. Mit geringerer Intensität traten die Signale des prompten bzw. protonierten Molekülions (diese konnten, wie bereits beschrieben, aufgrund des geringen Auflösungsvermögens der Massenspektrometers nicht unterschieden werden) und das $[M-H_2O-CN+H]^+$ -Fragmentes auf. Die Intensitäten dieser Signale relativ zueinander waren sehr ähnlich und mit nur geringen Schwankungen behaftet. Für die Auswertung wurden jedoch nur die Signale von $[MH]^+$ und $[M-H_2O+H]^+$ sowie der Postionisationspeak berücksichtigt. Die Geschwindigkeitsverteilung von α -CHCA ist in Abb. 5.1 gezeigt. Hier fällt die sehr gute Korrelation der

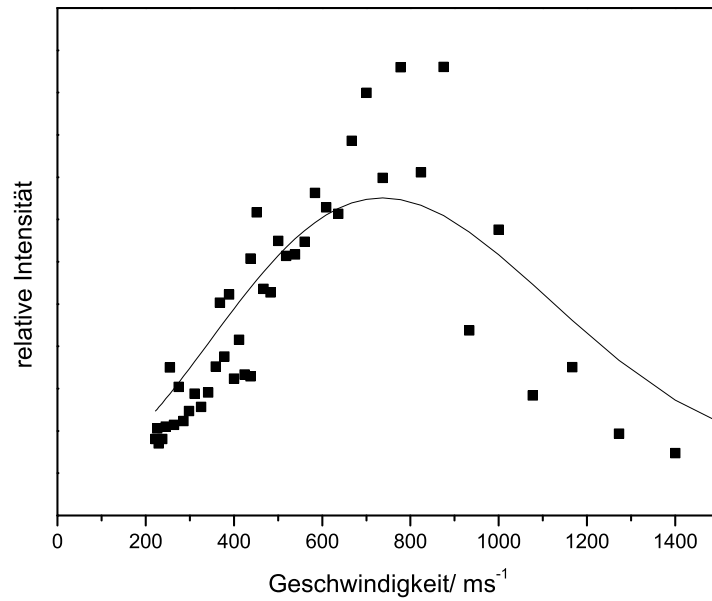


Abbildung 5.1: Geschwindigkeitsverteilung von α -CHCA ($p=1\times 10^{-6}$ mbar, $d=0,7$ mm). Das Maximum der Verteilung konnte mit $737\pm 29\text{ms}^{-1}$ bestimmt werden, und die Temperatur betrug laut angepasster Funktion $2080\pm 241\text{K}$. Für die Strömungsgeschwindigkeit wurde ein Wert von $484\pm 35\text{ms}^{-1}$ bestimmt.

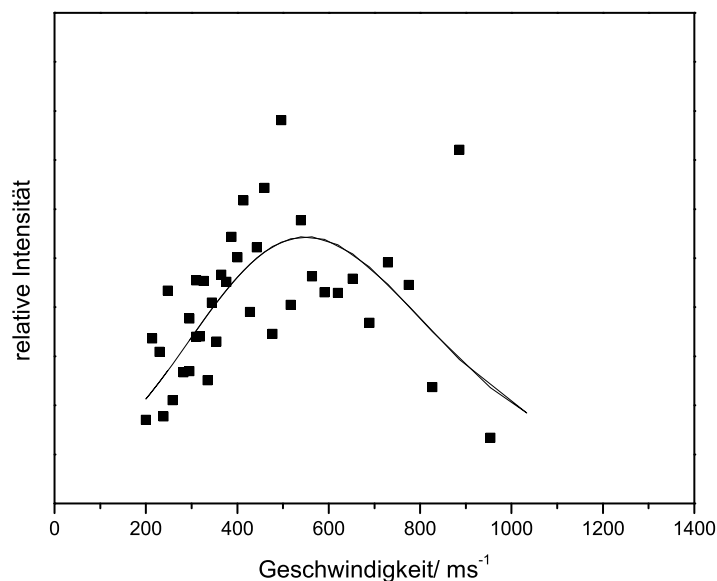


Abbildung 5.2: Geschwindigkeitsverteilung von Sinapinsäure ($p=1\times 10^{-6}$ mbar, $d=0,62$ mm). Das Maximum der Verteilung konnte mit $551\pm 63\text{ms}^{-1}$ bestimmt werden, und die Temperatur betrug laut angepasster Funktion $2082\pm 775\text{K}$. Die Strömungsgeschwindigkeit für diese Verteilung war $189\pm 111\text{ms}^{-1}$.

verschobenen Maxwell-Boltzmann-Funktion mit den Messwerten auf. Als häufigste Geschwindigkeit ergab diese Funktion den Wert von $737\pm 29\text{ms}^{-1}$. Als Temperatur ergab sich für den *plume* ein Wert von $2080\pm 241\text{K}$. Dieser erscheint vor der dem Hintergrund der hohen Photonenenergie plausibel, durch diese Temperatur wird deutlich, dass die Matrixmoleküle in der Lage sind, die innere Energie durch eine Zunahme der Translationsenergie abzubauen (der Abbau über elektronische oder vibronische Moden soll hier nicht diskutiert werden). Anhand dieses Spektrums lässt sich die stark vorwärtsgerichtete Expansion erkennen. Aus der angepassten Funktion ergibt sich eine Strömungsgeschwindigkeit v_{stream} von $484\pm 35\text{ms}^{-1}$.

SA

Sinapinsäure ist, wie α -CHCA und die weiter unter besprochene Ferulasäure, ein Derivat der Zimtsäure. Ihr Molekulargewicht wies mit $224,22\text{g/mol}$ den höchsten Wert der hier verwendeten Matrices auf. Sie findet ihre Anwendung vor allem bei der Analyse von Proteinen. Die Massenspektren (s.a. Abb. A.4 im Anhang) zeigten auch bei dieser Substanz in erster Linie die Signale von $[\text{MH}]^+$ und $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$. Weitere Fragmentationen waren hier nur wenig zu beobachten und hatten einen geringen Einfluss auf die Auswer-

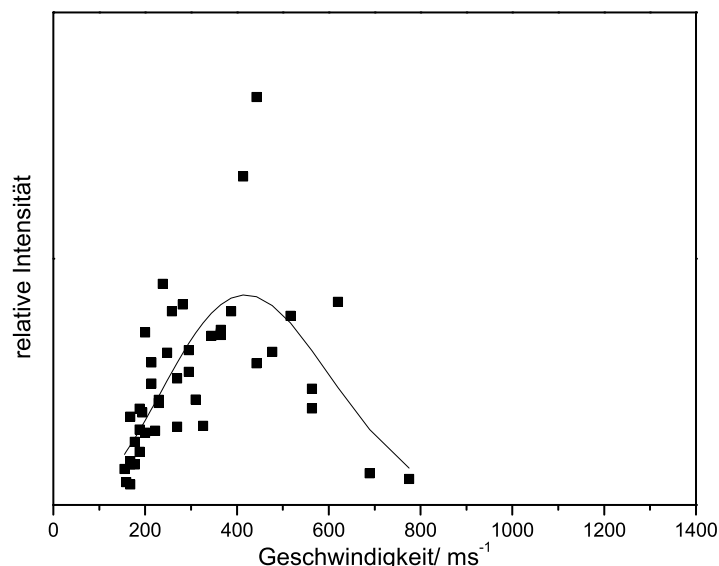


Abbildung 5.3: Geschwindigkeitsverteilung von 2,5-DHB ($p=1\times 10^{-6}$ mbar, $d=0,7$ mm). Das Maximum der Verteilung konnte mit $421\pm 54\text{ms}^{-1}$ bestimmt werden, und die Temperatur betrug nach angepasster Funktion $926\pm 356\text{K}$. Für die Strömungsgeschwindigkeit wurde ein Wert von $180\pm 83\text{ms}^{-1}$ bestimmt.

tung. Eine geringe Fragmentierung der Matrix unter den üblichen MALDI-Bedingungen ist wünschenswert, da auf diese Weise die Anlagerung von Matrixfragmenten an den Analyten verringert wird und der sog. *chemical noise* reduziert werden kann (s.a. Kap. 3.3.1). Die Auswertung dieser Massenspektren erfolgte durch die Integration der Signale des o.g. Fragmentes und des protonierten Molekülions sowie des Postionisationssignal des Matrixmolekülions. Die aus diesen Daten erhaltene Geschwindigkeitsverteilung von Sinapinsäure ist in Abb. 5.2 gezeigt. Das Maximum der Verteilung liegt mit $551\pm 63\text{ms}^{-1}$ deutlich unterhalb dem für α -CHCA ermittelten Wert. Die Temperatur des *plume* liegt mit $2082\pm 775\text{K}$ unterhalb des hohen Wert für α -CHCA. Die mittlere Strömungsgeschwindigkeit dieser Verteilung war $189\pm 111\text{ms}^{-1}$.

2,5-DHB

2,5-DHB ist neben α -CHCA und SA die Standardmatrix für die MALDI. Durch ihre universelle Einsetzbarkeit für verschiedene Fragestellungen wird sie von vielen Anwendern geschätzt. Daher war es naheliegend, diese Substanz tiefergehend zu untersuchen. Die Massenspektren von 2,5-DHB sind relativ einfach auszuwerten, da es unter typischen Analysebedingungen (moderate Flussdichte knapp oberhalb des *fluence threshold*) zu

geringer Fragmentbildung kommt. Im Allgemeinen treten nur der $[\text{MH}]^+$ bzw. der $[\text{M-H}_2\text{O+H}]^+$ -Peak auf. Eine weitere Fragmentbildung trat nur bei hohen Laserleistungen auf. Dies mag mit ein Grund für den verbreiteten Einsatz dieser Matrix in der MALDI sein. Durch die geringe Fragmentationsneigung ist es möglich, den Nachweis des Analyten durch Veränderungen der Ablationsleistung in einem vergleichsweise weiten Bereich zu verbessern. So kann es dem Anwender gelingen, durch Optimierung der Desorptionsleistung die Nachweisgrenze des Analyten herabzusetzen und so eine erfolgreiche Analyse durchzuführen.

Eine Besonderheit wiesen die Massenspektren von 2,5-DHB auf: Im Gegensatz zu den anderen hier verwendeten Matrizes kam es auch zu der Postionisation des Fragmentes mit $m/z=137$. Das Postionisationssignal trat jedoch nur bei geringen delay-Zeiten (max. $1,5\mu\text{s}$) auf und wurde mit zunehmendem Abstand schwächer. Ab einem Abstand von mehr als ca. 1,2mm war es nicht mehr nachzuweisen. Der Grund für das zeitlich wie räumlich begrenzte Auftreten diese Signals soll nicht weitergehend in dieser Arbeit diskutiert werden. Aufgrund des kleinen zeitlichen Bereiches, in dem diese Signal nachgewiesen werden konnte, wurde auf sein Auswertung verzichtet. Die aus den für die Auswertung verwendeten üblichen Signalen gefundene Geschwindigkeitsverteilung ist in Abb. 5.3 dargestellt. Mit Hilfe einer verschobenen Maxwell-Boltzmann-Verteilung konnte für 2,5-DHB das Maximum der Verteilung bei $421\pm 54\text{ms}^{-1}$ und einer Temperatur des *plume* von $926\pm 356\text{K}$ bestimmt werden. Für die mittlere Strömungsgeschwindigkeit ergab sich ein Wert von $180\pm 83\text{ms}^{-1}$.

DHAP

2,5-DHAP ist eine seit längerem bekannte [90], jedoch erst seit kurzem kommerziell verwendete Matrix [91]. Sie zeichnet sich durch hohe Sensitivität für den Nachweis des Analyten und gutes Kristallisationsverhalten aus. Daher sollte diese Substanz auch Gegenstand der in dieser Arbeit untersuchten Matrizes sein. Diese Matrixsubstanz unterscheidet sich von denen in dieser Arbeit untersuchten weiteren Proben dadurch, dass sie keine Säurefunktion besitzt. Gleichwohl eignet sie sich als Matrix für die Proteinanalyse. Leider zeigte sich bereits bei ersten Versuchen, dass das Molekül bei der verwendeten Wellenlänge von 266nm zu einer starken Fragmentierung neigt (ein Massenspektrum findet sich im Anhang unter Abb. A.5). So zeigt das Massenspektrum starke Signale, bei denen es sich um ein Fragment analog zur abgespaltenen Acetylgruppe handeln könnte. Das protonierte Molekülion $[\text{MH}]^+$ zeigt sich als relativ starkes Signal. Weiterhin tritt bei DHAP noch ein kleines Signal des $[\text{M-CH}_3+\text{H}]^+$ -Fragmentes auf. Dies zeigt, dass die Abspaltung von Wasser bei den anderen untersuchten Matrizes in erster

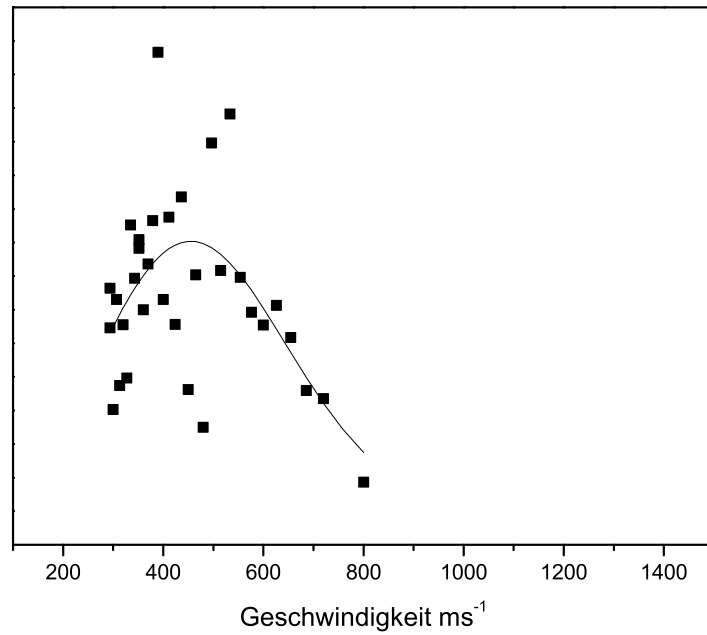


Abbildung 5.4: Geschwindigkeitsverteilung von DHAP ($p=1\times 10^{-6}$ mbar, $d=0,71$ mm). Das Maximum der Verteilung konnte mit 464 ± 49 ms⁻¹ bestimmt werden, und die Temperatur betrug laut angepasster Funktion 1085 ± 516 K. Für die Strömungsgeschwindigkeit wurde ein Wert von 222 ± 124 ms⁻¹ bestimmt.

Linie aus der Carboxylfunktion stammen könnte. Allerdings ist das Fragmentierungsverhalten der Matrizes unter MALDI-Bedingungen bisher kaum Gegenstand von Untersuchungen gewesen. Untersuchungen des Fragmentierungsverhaltens erfolgten z.B. mittels der MIKES-Technik [92]. Die Ergebnisse lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf den MALDI-Prozess übertragen, da hier andere Prozesse eine Rolle spielen. So konnte in der o.g. Arbeit für FA die Abspaltung einer Methylgruppe als dominierende Fragmentierungsreaktion gefunden werden, während die Fragmentbildung durch Abspaltung einer Hydroxyl-Gruppe eine untergeordnete Rolle spielt. Die Abspaltung einer Methylgruppe kann aus den MALDI-Spektren für diese Matrix jedoch nicht gefunden werden.

Durch die starke Fragmentierung auch zu kleinen Bruchstücken war die Auswertung der Massenspektren dieser Substanz stark fehlerbehaftet. Von daher wurde von DHAP nur eine brauchbare Geschwindigkeitsverteilung (s.a. Abb. 5.4) erhalten. Auf die Einlagerung eines Analyten (s.a. Abschn. 5.1.4) wurde für diese Matrix verzichtet.

Für 2,5-DHAP wurde ein Maximum der Geschwindigkeitsverteilung von $464 \pm 49 \text{ms}^{-1}$ erhalten. Die Temperatur des *plume* betrug $1085 \pm 516 \text{K}$. Die für diese Probe bestimmte mittlere Strömungsgeschwindigkeit betrug $222 \pm 124 \text{ms}^{-1}$. Die Daten für die Ablationsgeschwindigkeit unterscheiden sich nicht stark von den für 2,5-DHB erhaltenen Werten (s. dort). Auch die Strömungsgeschwindigkeiten sowie die Temperaturen sind im Rahmen der Fehlergenauigkeit ähnlich. Die geringen Abweichungen aller drei Parameter können mit der starken strukturellen Ähnlichkeit beider Substanzen begründet werden. Ein Hauptgrund für die schlechte Korrelation und die damit verbundenen großen Fehler von Geschwindigkeit und Temperatur ist in der starken Fragmentation der Matrix zu sehen. Diese Eigenschaft unterscheidet sie von 2,5-DHB. DHAP zeigte bereits bei einem niedrigen Laserfluss eine starke Fragmentationsneigung. Diese war auch knapp oberhalb der Ablationsschwelle vorhanden. Die Auswertung wurde erschwert, da aus den vorhandenen prompten Ionensignalen nicht auf die Gesamtmenge der ablatierten Teilchen geschlossen werden konnte. Hier war die Anzahl der kleinen Fragmente nicht zu ermitteln und es kam vermutlich zu großen Fehlern in der Bestimmung der Integrale der prompten Matrixsignale. Die Unterschiede von 2,5-DHB und DHAP bezüglich des Fragmentationsverhaltens müssen in den leicht unterschiedlichen chemischen Strukturen zu sehen sein. Ein Vergleich der zeigt (s.a. Kap. 3.3.2), dass DHAP eine Carbonylfunktion besitzt. Dadurch kommt es zu unterschiedlichen Absorptionsmaxima der Substanzen, und es könnte zu unterschiedlichen Relaxationswegen für die eingebrachte Energie kommen. Auf die Aufnahme von UV-Spektren der einzelnen Matrixsubstanzen wurde verzichtet, da diese Daten nur begrenzt aussagefähig werden. Die Untersuchung hätte in Lösung erfolgen müssen (UV/VIS-Absorptionsspektren der festen Matrix-Substanzen sind für

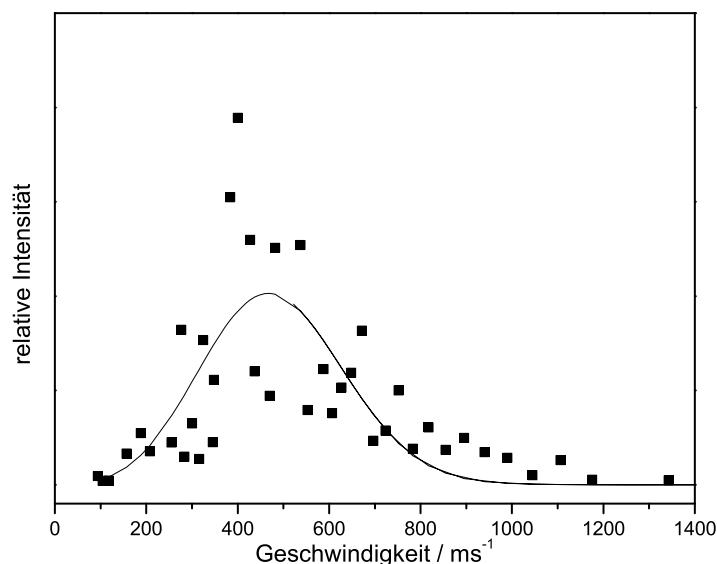


Abbildung 5.5: Geschwindigkeitsverteilung von Ferulasäure ($p = 1 \times 10^{-6}$ mbar, $d = 0,7$ mm). Das Maximum der Verteilung konnte mit $497 \pm 38 \text{ ms}^{-1}$ bestimmt werden, und die Temperatur betrug nach angepasster Funktion $738 \pm 275 \text{ K}$. Für die Strömungsgeschwindigkeit wurde ein Wert von $333 \pm 58 \text{ ms}^{-1}$ bestimmt.

DHAP nicht bekannt), und dabei kommt es zu Verschiebungen der Absorptionsmaxima durch die Lösungsmittelleffekte. Diese Methode ist daher mit Fehlern behaftet und für die Rückschlüsse auf Feststoffe weniger geeignet.

Die großen Fehler für die Temperatur und die Strömungsgeschwindigkeit sind vermutlich auf die Struktur der Probe selbst zurückzuführen, da hier das Auftreten von starken Fragmenten die Auswertung stark erschwerte. Die Mess- und Präparationsmethoden für die anderen untersuchten Matrixsubstanzen zeigten signifikant geringere Unsicherheiten für die Temperatur- und Geschwindigkeitswerte, daher ist davon auszugehen, dass die hier gefundene Unsicherheiten in erster Linie auf die untersuchte Probe selbst zurückzuführen sind.

Ferulasäure

Ferulasäure als Derivat der Zimtsäure wird seit langem in der MALDI eingesetzt. Ein Charakteristikum dieser Matrix ist ihre stark amorphe Konsistenz der reinen Substanz. Sie weist im Vergleich zu anderen üblichen Matrices ein sehr geringe Dichte auf und zeigt ein vergleichsweise ungewöhnliches Kristallisationsverhalten. Während die anderen hier untersuchten Substanzen in Abhängigkeit zum verwendeten Lösungsmittel sehr

homogene Proben ergaben, zeigte Ferulasäure in den allen Fällen eine sehr inhomogene Probenstruktur. Auch in Matrixmischungen ist dies deutlich zu erkennen, dazu sei auf die Abbildung der Mischung mit 2,5-DHB in Kap. 4.13 verwiesen. Die Geschwindigkeitsverteilung von Ferulasäure ist in Abb. 5.5 gezeigt. Das Maximum der Geschwindigkeitsverteilung konnte mit $497 \pm 38 \text{ms}^{-1}$ bestimmt werden. Die Temperatur der Ablationswolke beträgt nach Auswertung der verschobenen Maxwell-Boltzmann-Verteilung $738 \pm 275 \text{K}$. Für die mittlere Strömungsgeschwindigkeit wurde ein Wert von $v_{stream} = 333 \pm 58 \text{ms}^{-1}$ erhalten.

Zusammenfassung

Die Verteilungen zeigen, dass es im Vergleich zwischen den einzelnen Matrizes zum Teil gravierende Unterschiede gibt. α -CHCA zeigt eine signifikant höhere Ablationsgeschwindigkeit als die anderen untersuchten Matrizes. Auch für SA findet sich eine hohe Ablationsgeschwindigkeit, während die häufigsten Geschwindigkeiten der drei Matrizes FA, 2,5-DHB und DHAP relativ nahe beieinander liegen. Für die beiden strukturell recht ähnlichen Substanzen SA und FA ergibt sich ein etwas anderes Bild für die Maxima der Geschwindigkeitsverteilungen. Hier liegen die Werte schon signifikant auseinander, wobei die schwerere SA eine höhere Ablationsgeschwindigkeit aufweist. Dies würde bedeuten, dass die eingebrachte Energie der Photonen bei SA eher in Translationsenergie umgewandelt wird als bei FA. Für die Ablationsgeschwindigkeiten wurde folgende Reihe erhalten: α -CHCA > SA > FA > DHAP > 2,5-DHB. Der Vergleich der Strömungsgeschwindigkeiten zeigt eine andere Reihenfolge: α -CHCA > FA > DHAP > SA > 2,5-DHB. Hier weist auch wieder α -CHCA den größten Wert auf, gefolgt von FA und DHAP. Überraschend sind die niedrigen Werte für 2,5-DHB und SA. Diese könnten darauf hinweisen, dass hier die Ablation eher thermischer Natur ist. Insbesondere für SA ergibt sich dabei eine starke Abweichung von der wahrscheinlichsten Ablationsgeschwindigkeit. Die charakteristischen Werte der Geschwindigkeitsverteilungen sind in Tab. 5.1 zusammengefasst. Hierbei wurden die einzelnen Matrizes nach dem Maximum der Geschwindigkeitsverteilung mit zunehmender Geschwindigkeit sortiert. Eine Charakterisierung der Ablation kann über den Quotienten aus den Geschwindigkeiten v_{stream} und $v_{ablation}$ erfolgen. Dieser sollte, sofern eine stark jetähnliche Expansion vorliegt, den Wert 1 annehmen. Bei einer rein thermischen Verteilung wäre dieser Quotient Null, da in diesem Fall keine Strömungsgeschwindigkeit auftritt. Die Betrachtung der Quotienten aus den Geschwindigkeiten v_{stream} und $v_{ablation}$ zeigt, dass die Ablation von FA und α -CHCA die stärkste Ähnlichkeit mit einer jetähnlichen Expansion aufweist. Bei 2,5-DHB ist diese Eigenschaft weniger stark ausgeprägt. Die Ablation von SA zeigt nur eine geringe Ähnlichkeit mit einem

Matrix	Abstand/ mm	Max. d. Vert./ ms ⁻¹	Δv / ms ⁻¹	T/ K	ΔT / K	v_{stream} / ms ⁻¹	Δv_{stream} / ms ⁻¹
2,5-DHB	0,70	421	54	926	356	180	83
DHAP	0,71	464	49	1085	516	222	124
Ferulasäure	0,70	497	38	738	275	333	58
Sinapinsäure	0,62	551	63	2082	775	189	111
α -CHCA	0,70	737	29	2080	241	484	35

Tabelle 5.1: Vergleich der Ablationsgeschwindigkeiten verschiedener Matrizes bei einer Ablationswellenlänge von 266nm. Die Matrizes sind nach ansteigender Ablationsgeschwindigkeit sortiert. Zu beachten ist dabei die geringe Korrelation zwischen der wahrscheinlichsten Ablationsgeschwindigkeit und der Strömungsgeschwindigkeit

Überschallmolekularstrahl. DHAP wurde aufgrund des großen Fehlers des Quotienten von über 90% nicht in diese Auswertung mit einbezogen. Der Vergleich von DHAP und 2,5-DHB zeigt, dass sich die beiden Matrizes in der Ablationsgeschwindigkeit im Rahmen der Fehler nicht unterscheiden. Dies war in Anbetracht der sehr ähnlichen Struktur zu erwarten, war aber nicht zwingend. Immerhin unterscheiden sich beide Matrizes signifikant in ihrem Absorptionsverhalten. Bei DHAP handelt es sich um eine Substanz gelber Farbe, wobei 2,5-DHB weiße Kristalle bildet (die Gründe, aus denen auf die Aufnahme von UV-Absorptionsspektren verzichtet wurde, sind bereits diskutiert worden). Vor diesem Hintergrund könnte geschlossen werden, dass die Lage des Absorptionsmaximums für die Ablationsgeschwindigkeiten von untergeordneter Rolle ist. Dies zeigt auch ein Vergleich mit den Daten von Allwood et al. [93] für einige der hier untersuchten Matrizes. Wird die Differenz von v_{stream} und $v_{ablation}$ betrachtet, findet sich die von Allwood et al. gefundenen Reihenfolge nahezu (der hier gefundenen Wert für SA fällt aus der Reihe) wieder. Dort wurde folgende Reihung gefunden: FA>SA> α -CHCA \approx 2,5-DHB. Dabei liegt das Absorptionsmaximum von FA mit ca. 340nm zur kürzeren Wellenlängen, während bei 2,5-DHB und α -CHCA eine Verschiebung in den Bereich von 375-380nm zu beobachten ist. Unter Berücksichtigung des Stokes-shift [94]¹ und der dazugehörigen „Spiegelbildregel“ ergibt sich, dass die Differenz zwischen Anregungswellenlänge und Emissionsmaxima für α -CHCA und 2,5-DHB den größten Wert annimmt. Eine Anregung der Matrix mit Photonen der Wellenlänge von 266nm führt zu einer rotverschobenen Emission im

¹Der Stokes-shift beschreibt die Rotverschiebung der Emissionswellenlänge im Vergleich zur Anregungswellenlänge

Matrix	$v_{ablation} - v_{stream}$ ms^{-1}	$\Delta(v_{ablation} - v_{stream}) /$ ms^{-1}	$\frac{v_{stream}}{v_{ablation}} /$	$\Delta \frac{v_{stream}}{v_{ablation}}$
α -CHCA	253	64	0,66	0,08
2,5-DHB	241	137	0,43	0,28
DHAP	242	174	(0,48)	0,40
SA	362	174	0,34	0,27
FA	164	96	0,67	0,19

Tabelle 5.2: Differenzen von Strömungs- und Ablationsgeschwindigkeiten verschiedener Matrices. Gezeigt sind weiterhin der Quotient aus der Strömungs- und Ablationsgeschwindigkeit. Er ist ein Maß für die jetähnliche Ausbreitung der Ablationswolke. Details dazu finden sich in Kap. 5.1.2.

Vergleich zum Absorptionsmaximum. Dabei wird der Anteil der über die Fluoreszenz wieder abgegebene Energie an der Gesamtenergie mit zunehmender Differenz zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge immer geringer. Dieser Energieüberschuss muss anderweitig abgebaut werden. Dies erfolgt in der Regel über strahlungslose Übergänge wie *internal conversion* (IC), und dabei wird der Anteil der thermischen Energie im Molekül erhöht. Diese Energieumwandlung schlägt sich in der großen Differenz zwischen der Ablationsgeschwindigkeit und der Strömungsgeschwindigkeit nieder. Dies kann durch den Vergleich der Differenz aus Emissionsmaximums mit der Anregungswellenlänge bestätigt werden. Die hohe Differenz bei α -CHCA führt zu einer hohen Differenz von Ablationsgeschwindigkeit und der Strömungsgeschwindigkeit, bei FA zeigt sich hingegen für beide Differenzen ein niedriger Wert.

Fraglich bleibt noch, wie genau die Umwandlung der Energie aus den elektronischen Zuständen in die translatorische Dimension vonstatten geht. Das Modell der MALDI lässt mehrere Vorstellungen zu (s.a. Kap, 3.2: Bei kurzen Anregungspulsen (15ps) kommt es vornehmlich zur druckinduzierten Ablation der Oberfläche. Der durch die Probe wandernde Druckpuls führt zu einem Zerreißen des Materials, dass dann aus der Oberfläche ausgestoßen wird [54]. Dabei ist die Geschwindigkeit des ablatierten Materials in erster Linie von der Amplitude des Druckpulses abhängig. Dieser Prozess kann für die hier dargestellten Untersuchungen jedoch als zweitrangig angesehen werden, da der Desorptionslaserpuls mit ca. 8ns verhältnismäßig lang war. Ein Modell für längere Laserpulse und eine bietet die Vorstellung der Phasenexplosion [54]. Hier erfolgt aufgrund der Anregung der Probe ein starkes Aufheizen der Moleküle. Dabei kommt es zu einem schlagartigen Verdampfen der Matrix, und es folgt ein Übergang von Matrix- und Analytmolekülen sowie deren Cluster in die Gasphase. Hier wird die Geschwindigkeit der

Abstand/ mm	Maximum. d. Verteilung/ ms^{-1}	Δv / ms^{-1}	Temperatur/ K	ΔT / K	v_{stream} ms^{-1}	Δv_{stream} ms^{-1}
0,70	421	49	925	454	180	83
0,81	494	85	493	190	369	46
0,90	529	73	1752	213	214	136
0,97	519	80	2433	311	0	-
1,20	467	65	1014	175	228	218
1,93	470	48	1063	249	229	129

Tabelle 5.3: Abstandsabhängige Messungen von 2,5-DHB bei einer Desorptionswellenlänge von 266nm

ablatierten Teilchen vor allem durch die Menge des Verdampfenden Materials und die daraus resultierende starke Druckzunahme in der Probe verursacht. Dieser Prozess ist in erster Linie für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen anzunehmen. Die erhaltenen Geschwindigkeitsverteilungen lassen in erster Linie einen thermischen Prozess vermuten. Dabei kann es sich jedoch nicht um einen rein thermischen Prozess handeln, da an die Geschwindigkeitsverteilungen keine reine Maxwell-Boltzmann-Verteilung angepasst werden konnte.

Die Überlegung, dass ein Teil der Translationsenergie aus dem *kinetic energy release* (KER) stammt, konnte Kulle [92] widerlegen. Die dort gefundenen Werte für die bei der Dissoziation des Moleküls freiwerdende Energie liegen um zwei bis drei Größenordnungen unterhalb der kinetischen Energie der ablatierten Neutralteilchen. Eine Übertragung der aus der Dissoziation stammenden Energie auf die neutralen Matrixmoleküle scheint daher eine vernachlässigbare Rolle zu spielen.

5.1.3 Abstandsabhängigkeit des *plume* am Beispiel von 2,5-DHB

Die Prozesse in der Ablationswolke der Matrix waren Gegenstand der bisherigen Untersuchungen. Allerdings wurde ein Großteil der Messungen in einem relativ geringem Abstand zwischen dem Ablations- und dem Postionisationsort durchgeführt. Zu weiteren Untersuchung der Ablationswolke wurde diese in Abhängigkeit zum Abstand der vom Desorptionort untersucht. Damit konnte die Abhängigkeit der Teilchengeschwindigkeit vom Abstand zur Probenoberfläche bestimmt werden. Dazu wurde eine Probe von 2,5-DHB bei verschiedenen Abständen des Postionisationsortes vermessen. Der Versuchsaufbau ermöglichte es, den *plume* in Abstandsintervallen von ca. $100\mu\text{m}$ zu untersuchen. Bedingt durch den Aufbau war es nicht möglich, den Postionisationsort näher

als auf 0,6mm an die Probenoberfläche zu verlagern. Die gewählten Abstände sind in Tab. 5.3 angegeben. In einem höheren Abstand als 1,2mm sollte es aufgrund des Mangels an Wechselwirkungen zwischen den Teilchen aufgrund der nun schon relativ großen Abstände zueinander zu keinen starken Änderungen der Eigenschaften des *plume* kommen. Die Daten für den Abstand von 1,93mm betätigten diese Vermutung. Auf die nähere Untersuchung der Abstände zwischen 1,2mm und 1,93mm wurde daher verzichtet. Für die Untersuchung wurden Proben von 2,5-DHB aus THF präpariert. Die Ablationswellenlänge war in diesem Fall 266nm und der Druck war 1×10^{-6} mbar. Das Maximum der Ablationsgeschwindigkeitsverteilung bewegt sich in einem Bereich von 421ms^{-1} bei einem Abstand von 0,70mm von der Probenträgeroberfläche bis zu 529ms^{-1} bei einem Abstand von 0,9mm. Die Ergebnisse sind in Tab. 5.3 gezeigt. Im Rahmen der Fehler für die einzelnen Geschwindigkeitswerte kann davon ausgegangen werden, dass sich die Geschwindigkeit der ablatierten Neutralteilchen nicht signifikant ändert. Es ist allenfalls eine leichte Abnahme der Geschwindigkeiten bei geringen Abständen zu beobachten. Dies kann jedoch auch auf einen Fehler in der Abstandsbestimmung zurückzuführen sein. Dieser verursacht bei geringen Abständen einen weitaus größeren Fehler als bei hohen Abständen. Die Ausbreitung des *plume* in Flugrichtung der Moleküle erfolgt unter Betrachtung der Messungenauigkeiten homogen. Ein etwas anderes Bild liefert die Temperatur der Ablationswolke. Sie steigt mit zunehmendem Abstand von der Probenoberfläche an und erreicht bei einem Abstand von ca. 1.0mm mit 2433K ein Maximum, um dann wieder auf Werte um 1000K abzusinken. Unter der Voraussetzung, dass der *plume* bei einem Abstand von 0,7mm vom Ablationsort keine Veränderungen während der Expansion mehr erfährt, kann dieses Ergebnis nur durch eine unzureichende Messung bei diesem Messwert erklärt werden. Ein Indiz dafür könnte das Fehlen einer Strömungsgeschwindigkeit sein. Diese konnte aus den anderen Geschwindigkeitsverteilungen erhalten werden. Die Untersuchung von v_{stream} zeigt, dass diese bei geringen Abständen (0,70mm und 0,81mm) Schwankungen unterlegen ist, während sie sich mit zunehmenden Abstand von der Probenoberfläche auf den Wert von ca. 220ms^{-1} einpendelt. Über den gesamten Abstand betrachtet ist die Strömungsgeschwindigkeit jedoch gleichbleibend. Dies spricht dafür, dass sich der *plume* bereits in geringer Entfernung von der Probenoberfläche ausgebildet hat und keinen Veränderungen unterzogen wird. In diesem Fall wäre auch keine weitere Kühlung innerhalb der Ablationswolke zu erwarten.

5.1.4 Geschwindigkeitsverteilungen des Analyten

Die Bedeutung der MALDI liegt in erster Linie in ihrer breiten Anwendung für die Analyse großer Molekülen. Daher ist das Verhalten des Analyten während der Ablation

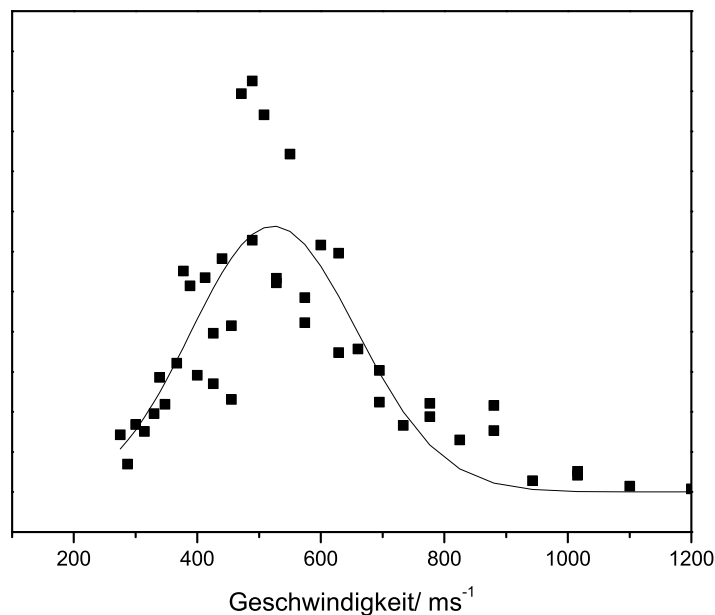


Abbildung 5.6: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen, ablatiert aus α -CHCA ($p=1 \times 10^{-6}$ mbar, $d=0,66$ mm). Das Maximum der Verteilung wurde mit $528 \pm 72 \text{ ms}^{-1}$ bestimmt. Für die Temperatur der ablatierten Chrysenmoleküle konnte ein Wert von $568 \pm 75 \text{ K}$ ermittelt werden.

von besonderem Interesse. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit neben den Ablationsgeschwindigkeiten der Matrixmoleküle auch die Geschwindigkeitsverteilungen des Analyten Chrysen aufgenommen. Chrysen selbst zeigt kein bzw. nur ein sehr schwaches promptes Ionensignal. Die Verteilungen und die jeweils angepassten Ausgleichskurven sind in den Abb. 5.6 bis 5.9 gezeigt. Dabei entspricht auch hier wieder eine Verteilung einer Messserie, d.h. die Verteilung wurde aus einer Probe generiert. Bei den Untersuchungen wurde aus den bereits beschriebenen Gründen auf die Verwendung von DHAP als Matrix verzichtet. Daher wurden nur die Matrizes 2,5-DHB, FA, SA und α -CHCA weiter untersucht.

Chrysen aus α -CHCA

Die Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen aus α -CHCA in Abb. 5.6 zeigt. Aus der Verteilungsfunktion konnte für die häufigste Geschwindigkeit der Analytmoleküle der Wert von $528 \pm 72 \text{ ms}^{-1}$ ermittelt werden. Die Temperatur der Ablationswolke konnte zu $568 \pm 75 \text{ K}$ bestimmt werden. Verglichen mit der reinen Matrixsubstanz konnte hier eine vergleichsweise starke Abnahme der Ablationsgeschwindigkeit um 209 ms^{-1} festgestellt werden (s.a. Tab. 5.4). Für die sich aus der relativ schmalen Geschwindigkeitsverteilung

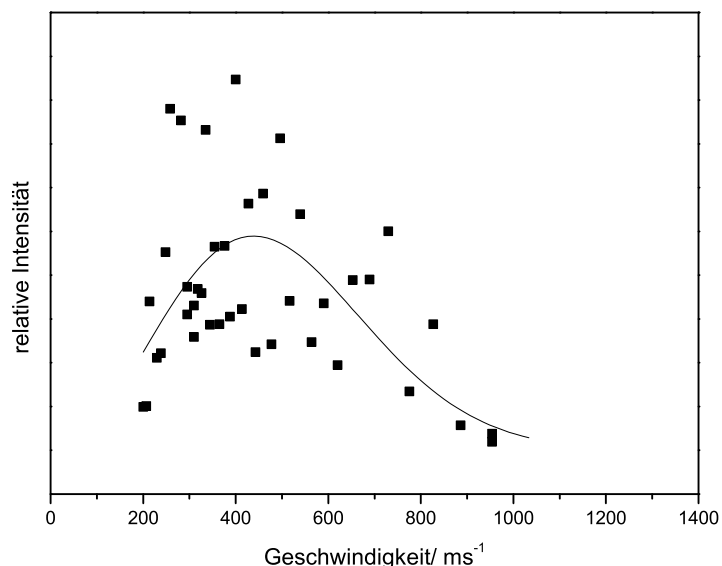


Abbildung 5.7: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen, ablatiert aus Sinapinsäure ($p=1 \times 10^{-6}$ mbar, $d=0,62$ mm). Das Maximum der Verteilung wurde mit $439 \pm 55 \text{ ms}^{-1}$ bestimmt. Für die Temperatur der ablatierten Chrysenmoleküle konnte ein Wert von $882 \pm 266 \text{ K}$ ermittelt werden.

lung ergebende niedrige Temperatur kann es folgende Erklärungsmöglichkeit geben: Die geringe Temperatur des Analyten lässt sich über die Vorstellung der Kühlung im Molekularstrahl begründen. Die Analyt- und Matrixmoleküle werden durch den Desorptionspuls beide stark angeregt. Durch die jetähnliche Expansion der Ablationswolke und der für α -CHCA gefundenen Strömungsgeschwindigkeit kommt es zu einer starken Kühlung der hoch angeregten Analytmoleküle. Deren innere Energie geht in Translationsenergie über. Dies würde auch die hohe Ablationsgeschwindigkeit der Analytmoleküle erklären. Dieser Kühlungseffekt tritt auch bei den Matrixmolekülen auf, ist dort aber aufgrund des hohen Energieeintrages aus der Laserdesorption nur schwer zu beobachten. Hier müsste der *plume* bei sehr geringen Abständen von der Probenoberfläche untersucht werden. Dann könnte im Falle einer Kühlung durch Stöße die Abnahme der Temperatur mit steigendem Abstand beobachtet werden. Allerdings war mit dem hier untersuchten Abstand von 0,66 mm bereits ein Abstand erreicht, der nahe dem apparativ möglichen minimalen Abstand lag. Daher konnten keine weiteren Untersuchungen vorgenommen werden.

Chrysen aus Sinapinsäure

Die Probe von Chrysen aus Sinapinsäure zeigte die in Abb. 5.7 dargestellte Verteilung, deren Maximum bei einer Geschwindigkeit von $439 \text{ ms} \pm 55 \text{ ms}^{-1}$ liegt. Die für den *plume*

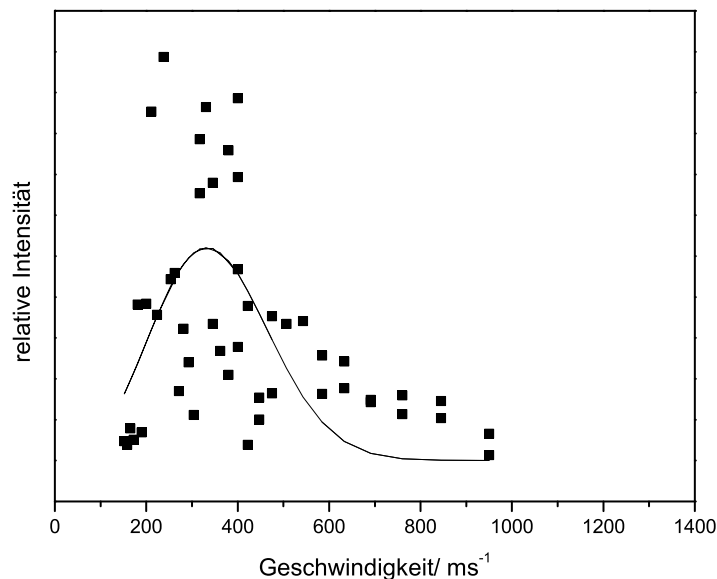


Abbildung 5.8: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen, ablatiert aus 2,5-DHB ($p=1 \times 10^{-6}$ mbar, $d=0,68$ mm). Das Maximum der Verteilung wurde mit $333 \pm 50 \text{ ms}^{-1}$ bestimmt. Für die Temperatur der ablatierten Chrysenmoleküle konnte ein Wert von $692 \pm 127 \text{ K}$ ermittelt werden.

ermittelte Temperatur nahm den Wert von $882 \text{ K} \pm 266 \text{ K}$ an. Der Vergleich der wahrscheinlichsten Ablationsgeschwindigkeit des Analyten mit dem Wert für die verwendete Matrix weist eine Differenz von 112 ms^{-1} auf.

Chrysen aus 2,5-DHB

Das dritte hier untersuchte Matrix-Analyt-System war die Kombination 2,5-DHB mit Chrysen. Dieses war als Modellsystem von besonderem Interesse, da 2,5-DHB als universell einsetzbare Matrix gilt und eine häufige Verwendung in der MALDI erfährt. Die Geschwindigkeitsverteilung ist in Abb. 5.8 gezeigt. Für das Maximum der Verteilung konnte die Geschwindigkeit mit $333 \pm 50 \text{ ms}^{-1}$ bestimmt werden. Für die Temperatur der ablatierten Chrysenmoleküle wurde ein Wert von $696 \pm 127 \text{ K}$ ermittelt. Besonders auffällig an dieser Geschwindigkeitsverteilung ist der scheinbar zweigeteilte Verlauf der Signalintensitäten. Dies kann mit der ungenügenden Homogenität der Probe und den Leistungsschwankungen der beiden Laser erklärt werden. Näheres dazu kann dem Anhang in Abb. A.3 entnommen werden.

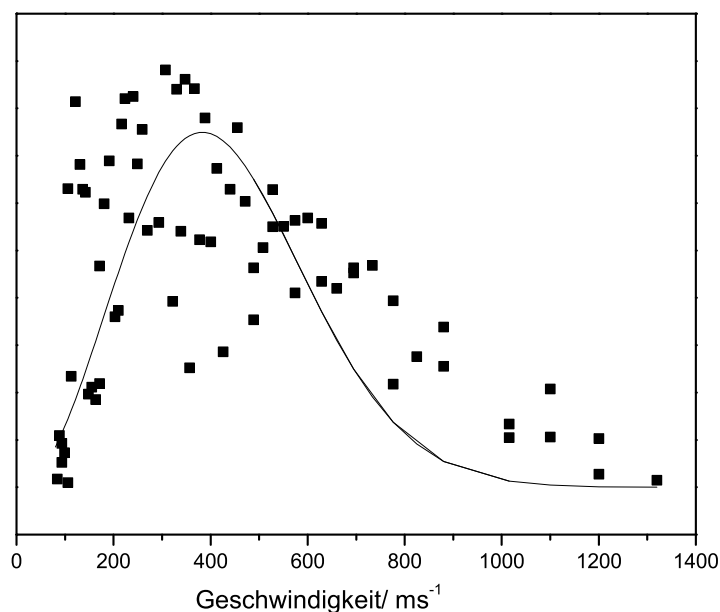


Abbildung 5.9: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen, ablatiert aus Ferulasäure ($p=1 \times 10^{-6}$ mbar, $d=0,66$ mm). Das Maximum der Verteilung wurde mit $421 \pm 26 \text{ ms}^{-1}$ bestimmt. Für die Temperatur der ablatierten Chrysenmoleküle konnte ein Wert von $693 \pm 127 \text{ K}$ ermittelt werden.

Chrysen aus FA

Als charakteristisches Merkmal für die hier untersuchten Proben von FA lässt sich zeigen, dass diese Proben eine ausgesprochen lange Lebensdauer aufweisen. In diesem Beispiel ist es gelungen, aus einer Präparation mehr als 120 einzelne Massenspektren zu erzeugen, bevor die Probe verbraucht war. Dieses Verhalten konnte nur für FA beobachtet werden. Als Erklärung dieses Verhaltens könnte die Oberflächenstruktur der Probe dienen. FA bildet, wie bereits an anderer Stelle beschrieben, eine sehr poröse und voluminöse Struktur aus. Dies konnte in gewissem Maße unabhängig vom Lösungsmittel beobachtet werden, subjektiv betrachtet war die Oberflächenstruktur bei der Verwendung von THF (wie in diesen Experimenten geschehen) etwas homogener als bei den aus Wasser² kristallisierten Proben. Die so erhaltenen Messwerte und die dazugehörige Geschwindigkeitsverteilung sind in Abb. 5.9 gezeigt. Als häufigste Ablationsgeschwindigkeit ergab sich für diese Probe $421 \pm 26 \text{ ms}^{-1}$, und für die Temperatur wurde aus der Verteilung der Wert von $693 \pm 127 \text{ K}$ errechnet.

²Wasser dient für diese Matrix häufig als Lösungsmittel, da sich Matrix und gewöhnliche Analyte wie Proteine in diesem verhältnismäßig gut lösen. In diesem Fall sind die erhaltenen Proben sehr dick. Um dieses Problem zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit auf das Lösungsmittel THF ausgewichen

Matrix	Abstand/ mm	Maximum. d. Verteilung/ ms^{-1}	$\Delta v/ \text{ms}^{-1}$	Temperatur/ K	Δ Temperatur/ K
2,5-DHB	0,75	333	50	696	127
FA	0,66	421	26	693	127
SA	0,62	439	55	882	266
α -CHCA	0,66	528	72	568	75

Tabelle 5.4: Vergleich der Ablationsgeschwindigkeiten des Analyten aus verschiedenen Matrices bei einer Wellenlänge von 266nm. Gezeigt ist das Maximum der Verteilung, die Temperatur der ablatierten Analytmoleküle sowie die Fehler der Werte. Die Sortierung der Matrices erfolgte nach aufsteigender Ablationsgeschwindigkeit des Analyten

In dieser Verteilung zeigt sich sehr deutlich der starke Abfall der Signalintensitäten bei sehr geringen Geschwindigkeiten. Dies lässt den Schluss zu, dass es auch in dieser Probe zu einer vorwärtsgerichteten Expansion in das Vakuum kommt.

Zusammenfassung

Der Vergleich der Ablationsgeschwindigkeiten der Matrix- und Analytmoleküle lässt einen klaren Trend (s. Tab. 5.4) erkennen: Die Geschwindigkeit des Analyten ist in allen Fällen geringer als die der Matrixmoleküle. Erklärungsmöglichkeiten dafür sollen im Folgenden gegeben werden: Die Analyse der Geschwindigkeitsverteilungen der Matrix-Moleküle hat gezeigt, dass diese alle eine mehr oder minder stark ausgeprägte Strömungsgeschwindigkeit vorweisen können (s.a. Tab. 5.1). Diese Strömungsgeschwindigkeit kann, wie auch in [59] gezeigt wurde, als Geschwindigkeit des ablatierten Materials angesehen werden. Unter der Annahme, dass diese in gewisser Weise eine Untergrenze für die Ablationsgeschwindigkeiten darstellt (Teilchen, die signifikant geringere Geschwindigkeiten aufweisen, zeigen nur noch thermisches Desorptionsverhalten), wäre zu erwarten, dass die Ablationsgeschwindigkeit der Analytmoleküle mindestens den Wert der Strömungsgeschwindigkeit annimmt. Dies kann auch für alle hier untersuchten Matrix-Analyt-Systeme bestätigt werden. In Tab. 5.5 sind diese Werte gegenübergestellt. Für α -CHCA und eingeschränkt auch FA fällt auf, dass die Werte der beiden Geschwindigkeiten eine ähnliche Größe aufweisen. Damit könnte vor allem für die erstgenannte Matrix geschlossen werden, dass die Analytmoleküle ihre kinetische Energie nahezu vollständig aus der Ablation der Matrixmoleküle erhalten haben und quasi von diesen in der Ablationswolke „mitgerissen“ worden sind. Für 2,5-DHB und SA zeigt sich

Matrix	$v_{stream}/$ / ms^{-1}	v_{Analyt} ms^{-1}	$\Delta(v_{Analyt}-v_{stream})$ ms^{-1}
2,5-DHB	180	333	153
FA	333	421	108
SA	189	439	250
α -CHCA	484	528	40

Tabelle 5.5: Vergleich der Strömungsgeschwindigkeiten der Matrices und den Ablationsgeschwindigkeiten des Analyten. Ersichtlich ist die zum Teil deutliche Differenz der beiden Werte zueinander.

hingegen eine starke Abweichung der Ablationsgeschwindigkeiten von den Strömungsgeschwindigkeiten der Matrices. Daraus könnte geschlossen werden, dass in diesen Fällen die Analytmoleküle ihre Translationsgeschwindigkeit nicht nur aus dem Ablationsprozess als solchem bezogen haben, sondern dass es hier noch zu weiteren Prozessen wie z. B. Stößen in der Gasphase gekommen ist. Dieses Verhalten müsste weiterhin eine niedrige Temperatur der Analytmoleküle nach sich ziehen. Die Korrelation der Temperaturdaten ist in Tab. 5.6 gezeigt und wird im nächsten Abschnitt diskutiert werden. Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass die kinetische Energie vor allem aus dem Ablationsprozess stammt, in geringem Maße jedoch auch aus den Fragmentierungsprozessen der Matrixmoleküle stammen kann.

Kühlung des Analyten

Neben den Ablationsgeschwindigkeiten von Matrix und Analyt und deren Differenzen kann auch die Temperatur von Matrix und Analyt für die Charakterisierung des Ablationsprozess herangezogen werden. Dazu konnte durch Kombination der Matrix- und Analyttemperaturen auf die Kühlungseffizienz der einzelnen Matrices geschlossen werden. In Tab. 5.6 wurden die neben den Ablationsgeschwindigkeiten auch die Temperaturen der unterschiedlichen Moleküle im *plume* dargestellt. Aus den Temperaturdifferenzen können Rückschlüsse auf die Kühlung des Analyten durch die Matrix geschlossen werden. Deutlich wird der starke Kühleffekt von α -CHCA. Hier ist ein Temperaturunterschied von 1512K zu beobachten. Die Geschwindigkeitsverteilung weist eine relativ geringe Breite auf. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es zu zahlreichen Stößen kommt, der Anteil der Fragmentierungen jedoch gering bleibt. Im Falle der starken Fragmentbildung während des Ablationsvorganges sollte die Breite der Geschwindigkeitsverteilung größer werden, da es hier viele Teilchen mit unterschiedlichen Massen und Impulsen gibt. Al-

lerdings kann über die späteren Fragmentierungen im räumlich weit entwickelten *plume* keine Aussage getroffen werden, da hier die aus einem Molekül gebildeten Fragmente alle die gleiche Geschwindigkeit aufweisen würden. Die Kühlungseffizienz der Matrix sollte dann abnehmen. Auch bei der Untersuchung von Chrysen aus SA zeigt im Vergleich zur Temperatur der Matrix einen stark kühlenden Einfluss auf den Analyten. Die hier auftretenden Temperaturdifferenz liegt mit 1200K noch immer sehr hoch. SA selbst zeigt jedoch eine ähnlich hohe *plume*-Temperatur wie α -CHCA, weist allerdings eine erheblich geringere Ablationsgeschwindigkeit auf. Der relative Kühlungseffekt auf den Analyten ist deshalb erheblich geringer. Deutlich geringere Unterschiede der Temperaturen zwischen Matrix und Analyt finden sich bei 2,5-DHB mit 230K sowie FA mit 45K. Für 2,5-DHB ist die absolute Kühlung des Analyten noch deutlich erkennbar. Allerdings sollte dieser Effekt keine große Auswirkung auf den Analyten haben, da die Ablationswolke selbst mit 926K eine im Vergleich zu den Matrizes α -CHCA und SA um die Hälfte reduzierte Temperatur aufweist. Für FA zeigt sich, dass Matrix und Analyt nahezu die gleichen Temperaturen vorweisen. Eine Kühlung durch Stöße findet hier kaum statt, wie die Temperaturdifferenz von 45K zeigt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich für die absolute Kühlung des Analyten durch die Matrix folgende Reihenfolge ergibt (nach abfallender Kühleffizienz sortiert) α -CHCA > SA > 2,5-DHB > FA. Die absoluten Temperaturwerte zeigen ein etwas anderes Bild. Hier ergibt sich folgendes, nach ansteigender Analyttemperatur sortiertes, Ranking: α -CHCA < FA \approx 2,5-DHB < SA. Hier zeigen die aus α -CHCA ablatierten Neutralen die geringste thermische Anregung, während es bei SA zu der Ablation relativ heißer Analytmoleküle kommt. FA und 2,5-DHB zeigen für die neutralen Analytmoleküle keine starken Abweichungen der Temperaturen von denen der Matrixmoleküle. Dies weist auf eine moderate Kühlung des Analyten hin, wobei die kühlende Eigenschaft der Matrix von 2,5-DHB als größer angesehen werden muss, da hier noch ein signifikanter Unterschied der Temperaturen auftritt. FA selbst zeigt keinen Einfluss auf den Analyten, hier weisen sowohl die Ablationsgeschwindigkeiten als auch die Temperaturen der beiden untersuchten Moleküle keine signifikanten Abweichungen voneinander auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass FA einen sehr geringen MALDI-Effekt auf Chrysen besitzt. Dieser könnte mit der Methode der dd-Präparation begründet werden. Hier wurden zwei Substanzen vermischt, die ein grundsätzlich unterschiedliches Lösungsverhalten zeigen. So ist FA, wie bereits weiter oben beschrieben, in Wasser löslich, wohingegen dieses Lösungsmittel für Chrysen denkbar ungeeignet ist. Zusätzlich ist hier noch das bereits beschriebene Bestreben von FA, möglichst voluminöse und grobporige Aggregate während der Kristallisation zu erzeugen. In diesen könnte es zu sehr schlechter Inkorporation des Analyten kommen. Weiterhin war THF als Lösungsmittel

Matrix	$v_{Matrix}/$ ms^{-1}	$v_{Analyt}/$ ms^{-1}	Temperatur d. Matrix/ K	Temperatur d. Analyten/K	$(T_{Matrix}-T_{Analyt})$ /K
2,5-DHB	421	333	926	696	230
FA	497	421	738	693	45
SA	551	439	2082	882	1200
α -CHCA	737	528	2080	568	1512

Tabelle 5.6: Vergleich der Ablationsgeschwindigkeiten von Matrix und Analyt. Erkennbar ist die Korrelation zwischen den Ablationsgeschwindigkeiten beider Substanzen. Der Vergleich der Temperaturen zeigt einen weniger eindeutigen Trend.

für diese Mischung wahrscheinlich nicht sehr geeignet, wurde jedoch verwendet, um zum einen möglichst homogene Probenstrukturen zu erhalten und zum anderen den Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf die Geschwindigkeitsverteilungen zu vermeiden.

Schlussfolgerungen für den Ablationsprozess

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Ablationsgeschwindigkeiten und die Temperaturen der Matrix- und Analytmoleküle ausgiebig diskutiert. Für den Ablationsprozess können aus den Ergebnissen mehrere Schlüsse gezogen werden. So zeigt α -CHCA von allen untersuchten Matrices die höchste Ablationsgeschwindigkeit für der Neutralteilchen (Matrix und Analyt). Weiterhin ist der Kühleffekt auf den Analyten sehr hoch. Dies kann aus der hohen Differenz zwischen der Temperatur der Matrixmoleküle und der Temperatur der Chrysenmoleküle geschlossen werden. Dieser Fakt spricht dafür, dass diese Matrix einen großen Energiebetrag aus der Desorption in Translationsenergie umwandeln kann und diese dann teilweise auf den Analyten überträgt. Dabei ist sie weiterhin in der Lage, den Analyten durch Stöße zu kühlen, ohne dass es zu Fragmentierungen kommt. Der Analyt ist daher auch in der Lage, eventuelle zu Beginn des Desorptionsprozesses durch elektronische Anregung aufgenommene Energie zu dissipieren und an die Matrix abzugeben. Dadurch ist die schützende Funktion der Matrix auf den Analyten bei α -CHCA besonders groß. Diese Matrix kann, bezogen auf ihren Einfluss auf den Analyten bezüglich dessen Temperatur, als „kalt“ bezeichnet werden. Zieht man allerdings nur das Ablationsverhalten der Matrix zu Rate, zeigt diese eine sehr hohe Ablationsgeschwindigkeit. Die Temperatur in der Ablationswolke ist im Vergleich zu den anderen Matrices auch als sehr hoch anzusehen. Vor diesem Hintergrund wäre α -CHCA als „heiße“ Matrix zu klassifizieren.

Matrix	Klassifizierung für		Kühleffizienz
	Matrix	Analyt	
2,5-DHB	kalt	kalt	medium
FA	kalt	medium	gering
SA	heiß	heiß	hoch
α -CHCA	heiß	kalt	sehr hoch

Tabelle 5.7: Klassifizierung der Matrizes nach ihren Ablationseigenschaften und den jeweiligen Einfluss auf den Analyten

Die Anwendung dieses Prinzips auf die weiteren Matrizes ergibt dann folgendes Bild: Die Ablationsgeschwindigkeit und die *plume*-Temperatur von SA zeigen auch hohe Werte, wobei die Ablationsgeschwindigkeit hier etwas geringer ist als bei α -CHCA. Die Temperaturwerte unterscheiden sich jedoch kaum. Daher wäre SA auch als „heiße“ Matrix zu klassifizieren. Die Kühleffizienz dieser Matrix ist gut, da sich die Temperaturen von Matrix und Analyt doch signifikant unterscheiden. Aufgrund der vergleichsweise hohen absoluten Temperatur der Analytmoleküle wäre der Einfluss auf den Analyten jedoch auch mit „heiß“ zu bezeichnen.

FA zeigt eine etwas geringere Ablationsgeschwindigkeit der Matrixneutralen als SA, es kommt jedoch zu einer weitaus geringeren Temperatur des *plume*. FA weist von allen hier untersuchten Matrizes die geringste Temperatur der Ablationswolke auf. Auch unter der Berücksichtigung der Höhe der Ablationsgeschwindigkeiten würde diese Matrix eher als „kalt“ eingestuft werden. Der Einfluss auf den Analyten ist nicht ganz so stark wie der von α -CHCA, daher erfolgt diesbezüglich eine Einstufung als „medium“. Die Kühleffizienz dieser Matrix ist gering, da sich die Temperaturen der ablatierten Matrix- und Analytmoleküle kaum unterscheiden. Für 2,5-DHB zeigt sich eine ähnliche Einstufung bezüglich der Eigenschaften des *plume*. Die hier beobachtete Ablationsgeschwindigkeit ist die geringste der untersuchten Matrizes, die Temperatur der Matrixmoleküle ist jedoch etwas höher als die bei FA. Von daher ist diese Matrix auch eher als „kalt“ anzusehen, wobei der Einfluss auf den Analyten im Vergleich zu FA größer ist. Auch ist die Kühleffizienz der Matrix besser, daher erfolgt eine Einstufung als „kalt“ für die Wirkung auf den Analyten. Eine Übersicht der Ergebnisse wird in Tab.5.7 gegeben.

5.2 Duale Matrixsysteme

Seit Anbeginn des Einsatzes der MALDI für die Analyse großer Moleküle ist versucht worden, die Ablationseigenschaften sowie die Ionisationseigenschaften der Matrix zu verbessern. So zeigte sich, dass durch den Einsatz geringer Mengen Trifluoressigsäure (TFA) in der Probenpräparationslösung [95] die Ionenausbeute des Analyten sowie das Signal-zu-Rausch-Verhältnis signifikant erhöhen kann. Diese Eigenschaft wird auf den durch die TFA im Überschuss vorhandenen Protonen in der Probe zurückgeführt. Aber auch andere Stoffe werden häufig als Zusatz in die Mischung aus Matrix und Analyt gegeben. So hat sich in der Polymeranalyse die Zugabe von Alkali- oder auch Silberionen bewährt, es kommt zu signifikanten Intensitätsverbesserungen der analysierten Polymere [45]. Aber nicht nur durch die Zugabe von Ionen konnten Verbesserungen in der Auflösung und Empfindlichkeit gezeigt werden, auch die Mischung von unterschiedlichen Matrix-Substanzen ist bereits seit langem angewandt worden. So erzeugten Tanaka et al. [29] ihre ersten MALDI-Spektren aus einer Mischung von Glycerol (für die Protonenübertragung) und feinst verteiltem Cobaltpulver (Absorption der Laserstrahlung). Die erste „echte“ Matrixmischung führten Karas et al. 1993 [96] mit der Mischung von 2,5-DHB und 2-Hydroxy-5-methoxy-Benzoessäure ein. Diese Mischung ist als „Super-DHB“ (sDHB) bekannt. Mit dieser Mischung gelang es, das Auflösungsvermögen und die Sensitivität für den Nachweis von Peptiden und den in der MALDI relativ schwierig, da schlecht protonierbaren, nachzuweisenden Oligosacchariden signifikant zu verbessern. Weitere Untersuchungen von Matrixmischungen haben Roepstorff et al. durchgeführt [79]. Hier gelang es, durch die Mischung von 2,5-DHB mit α -CHCA (Massenverhältnis 1:1) Molekülionen von Proteinen mit einem stark verbessertem Auflösungsvermögen im Vergleich zum einfachen Matrixsystem nachzuweisen. Dadurch drängt sich geradezu die Fragestellung auf, weshalb es mittels Mischungen verschiedener MALDI-Matrizes gelingt, das Auflösungsvermögen und die Sensitivität gegenüber der Verwendung singulärer Matrizes zu erhöhen. So soll gezeigt werden, dass aus den im vorherigen Abschnitt erhaltenen Daten bezüglich des Ablationsverhaltens singulärer Matrizes auf die Eigenschaften der Matrixmischungen geschlossen werden kann. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den folgenden Kapiteln gezeigt.

5.2.1 Geschwindigkeitsverteilungen des Analyten

Für die Untersuchung des Ablationsverhaltens des Analyten Chrysen aus verschiedenen Matrixmischungen wurden die bereits verwendeten MALDI-Substanzen verwendet. Dazu wurden aus je zwei der verwendeten Matrizes FA, 2,5-DHB, SA und α -CHCA äquimo-

5 Ablationsgeschwindigkeiten von Matrix- und Analytmolekülen

Matrix	Abstand/ mm	Maximum. d. Verteilung/ ms^{-1}	$\Delta v/ \text{ms}^{-1}$
FA/2,5-DHB	0,62	240	25
α -CHCA/2,5-DHB	0,54	341	65
FA/ α -CHCA	0,66	397	25
FA/SA	1,12	447	71
SA/ α -CHCA	0,95	530	104

Tabelle 5.8: Vergleich der Ablationsgeschwindigkeiten des Analyten aus verschiedenen dualen Matrixsystemen bei einer Wellenlänge von 266nm. Die unterschiedlichen Abstände zwischen Positionierungs- und Ablationsort zeigen, wie in Kap. 5.1.3 gezeigt wurde, keinen Einfluss auf die Geschwindigkeitsverteilung.

lare Mischungen hergestellt. Diese Präparationsmethode wurde gewählt, um die Anzahl der unterschiedlichen Matrixmoleküle relativ zueinander konstant zu halten und eventuell auftretende Effekte durch Konzentrationsunterschiede zu vermeiden. Die Präparation der Proben erfolgte nach dem in Kap. 4.6 beschriebenen Verfahren. Auch für diese Experimente erfolgte die Lösung der Matrices in THF. Diese wurden dann mit einer Lösung des Analyten Chrysen in selbigem Lösungsmittel versetzt. Die Geschwindigkeitsverteilungen der Analytmoleküle wurden analog zu der bereits beschriebenen Methode für die einfachen Matrix-Analyt-Mischungen erhalten und mit dem bereits im Abschnitt 4.7 eingehend beschriebenen Verfahren ausgewertet. Es wurden die charakteristischen Daten der ablatierten Analytneutralen wie das Maximum der Geschwindigkeitsverteilung und die Temperatur des Analytmoleküle im *plume* bestimmt. Die Geschwindigkeitsverteilungen sind im Anhang (Abb. A.6 bis Abb. A.10) gezeigt; die Daten der Verteilungen sind in Tab. 5.8 zusammengefasst. Diese sollen im Folgenden diskutiert werden. Für die Ablationsgeschwindigkeiten ergibt sich im Vergleich zu den singulären Matrices ein etwas weiterer Geschwindigkeitsbereich. Während bei den singulären Matrices die Ablationsgeschwindigkeiten des Analyten im Bereich von 333ms^{-1} (2,5-DHB) und 528ms^{-1} (α -CHCA) lagen, wurde bei den Matrixmischungen für die Kombination FA/2,5-DHB mit $240\pm 25\text{ms}^{-1}$ eine signifikant geringere Ablationsgeschwindigkeit gefunden. Die höchste Geschwindigkeit wies die Mischung SA/ α -CHCA mit $530\pm 104\text{ms}^{-1}$ auf. Diese entspricht sehr genau dem Maximalwert des in den singulären Matrices gefundenen Ergebnisses. Bei näherer Analyse der Ergebnisse lässt sich feststellen, dass die Kombination der Matrices mit den höchsten Ablationsgeschwindigkeiten (α -CHCA und SA) auch in der Mischung

eine sehr hohe Ablösegeschwindigkeit erzeugt. Allerdings ist hier die häufigste Analytgeschwindigkeit vergleichbar mit der aus dem für die reine α -CHCA ermittelten Wert. Hier kann ein Einfluss der Mischung auf die Ablationsgeschwindigkeit nicht festgestellt werden. Für die geringste Ablationsgeschwindigkeit aus den Matrixmischungen ist ein etwas anderes Verhalten zu beobachten gewesen. Hier konnte für die Mischung von 2,5-DHB/FA mit einer Ablationsgeschwindigkeit von $240 \pm 25 \text{ms}^{-1}$ ein Wert gefunden werden, der noch weit unter dem Betrag für singulär verwendete Matrizes liegt. Es scheint durch die Verwendung von einer Matrixmischung eine signifikante Abnahme der Analytgeschwindigkeit einzutreten. Die Mischung von FA/SA zeigt wiederum ein wieder anderes Bild. Hier war eine häufigste Geschwindigkeit von $447 \pm 71 \text{ms}^{-1}$ zu finden. Diese entspricht einem Wert, der nahe der Ablationsgeschwindigkeit aus den einzelnen Matrizes liegt. Eine Abnahme der Ablösegeschwindigkeit durch diese Matrixmischung ist nicht zu beobachten. Nach der Analyse dieser drei Mischungen könnte vermutet werden, dass durch die Kombination der verschiedenen Geschwindigkeiten der Analyten aus den einfachen Matrixsystemen auf die Tendenz der Ablationsgeschwindigkeit aus Matrixmischungen geschlossen werden kann. Durch einfache Addition der Ablationsgeschwindigkeiten aus singulären Matrizes sollte sich eine Tendenz für die Mischungen ergeben. Dieser lässt sich jedoch für die weiteren untersuchten Mischungen nicht direkt fortschreiben. So erhält man aus der Mischung FA/ α -CHCA mit $397 \pm 25 \text{ms}^{-1}$ eine sehr niedrige Geschwindigkeit, obwohl die Ablationsgeschwindigkeit des Analyten aus den singulären Matrizes sehr viel höher ist. Bei Berücksichtigung der Daten aus den Messungen der einfachen Systeme sollte diese Mischung eine höhere Ablationsgeschwindigkeit als die Mischung FA/SA aufweisen. Dies konnte jedoch nicht gefunden werden. Aufgrund der vorliegenden Daten können die Mischungen im Vergleich zu den einzelnen Matrizes in vier charakteristische Eigenschaften eingeteilt werden. Eine Gruppe, bestehend aus 2,5-DHB/FA und FA/ α -CHCA, zeigt eine verringerte Ablationsgeschwindigkeit des Analyten. Hier ist auffällig, dass in beiden Fällen FA beteiligt ist. Dies ist um so erstaunlicher, da FA alleine den geringste Erniedrigung der Analytgeschwindigkeit gegenüber der Matrixgeschwindigkeit im singulären System zeigt. Bei der Mischung aus α -CHCA/2,5-DHB liegt die Ablationsgeschwindigkeit bei dem für 2,5-DHB gefundenen Wert, wohingegen in der Mischung von SA/ α -CHCA die Geschwindigkeit der Analytmoleküle aus letzterer Matrix dominiert wird und an diese heranreicht. Für die Mischung FA/SA lässt sich aufgrund der sehr ähnlichen Ablationsgeschwindigkeiten der einzelnen Matrizes kein Trend erkennen. Hier tritt der in den anderen Mischungen beobachtete Effekt der Geschwindigkeitsreduktion nicht auf. Dafür kann die strukturelle Ähnlichkeit beider Substanzen von maßgeblicher Bedeutung sein. Ganz im Gegensatz dazu steht die

Mischung 2,5-DHB/FA. Wie bereits an anderer Stelle gezeigt werden konnte (s.a. Abb. 4.13), ist das Kristallisationsverhalten dieser Mischung sehr schlecht. Ein Einfluss auf die Ablation kann daher nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund sind die Daten der Matrixmischungen mit FA, bei denen eine schlechte Kristallisation zu beobachten war, nur eingeschränkt mit den weiteren Geschwindigkeitsverteilungen vergleichbar. Von daher werden nur die Matrixmischungen FA/SA, SA/ α -CHCA und α -CHCA/2,5-DHB näher ausgewertet. Bei der Betrachtung der Matrixmischungen, die SA beinhalten, fällt auf, dass es zu keiner signifikanten Verringerung der Ablationsgeschwindigkeit gegenüber der reinen Partner-Matrix kommt. Der Einfluss von Sinapinsäure auf die Ablationsgeschwindigkeit ist allem Anschein nach in Matrixmischungen gering. Dies wird insbesondere an der Mischung SA/ α -CHCA deutlich. Hier liegt die wahrscheinlichste Ablationsgeschwindigkeit des Analyten mit $530 \pm 104 \text{ms}^{-1}$ in der gleichen Größe wie für die Ablation aus reiner α -CHCA (s.o.). Für die letzte der hier untersuchten Mischungen (α -CHCA/2,5-DHB) findet sich eine von 2,5-DHB dominierte Ablationsgeschwindigkeit. Diese liegt sehr nahe an dem für die Ablation aus reiner 2,5-DHB gefundenem Wert. Korreliert man nun die dominierende Matrix für den Trend der Ablationsgeschwindigkeit des Analyten, erhält man folgende Reihenfolge: 2,5-DHB > α -CHCA > SA. Hier zeigt 2,5-DHB den stärksten und SA keinerlei Einfluss auf die Lage des Maximums der Geschwindigkeitsverteilung.

Wie in der Betrachtung der singulären Matrix-Analyt-System bereits gezeigt werden konnte, reicht die Analyse der Geschwindigkeiten für eine Charakterisierung des Ablationsverhaltens jedoch nicht aus. Von daher muss die Modellvorstellung der Abhängigkeit der Ablationsgeschwindigkeit aus den Mischungen von denen der aus den einfachen Systemen erzeugten Geschwindigkeitsverteilungen erweitert werden. Dies kann durch die Miteinbeziehung der Temperaturen des Analyten in der Ablationswolke geschehen. Diese Daten sind in Tab. 5.9 zusammengefasst. Deutlich erkennbar ist die starke Abhängigkeit der *plume*-Temperatur von der Wahl der Matrixmischung. So findet sich für die Mischung FA/2,5-DHB eine Temperatur des *plume* für Chrysen von $278 \pm 61 \text{K}$. Die Mischung FA/SA $1087 \pm 318 \text{K}$ weist den höchsten Wert für die Temperatur der ablatierten Chrysenmoleküle auf. Eine weitere Analyse der Daten zeigt, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen den Kühlungseffekten der einzelnen Matrizes und den Matrixmischungen gibt. Vergleicht man die Kühlungseffekte der einzelnen Matrizes (s.a. Tab. 5.6) miteinander und kombiniert diese zu den unterschiedlichen Matrixmischungen, erhält man für die Kühlungseffekte der Matrixmischungen folgende, nach sinkender Kühleffizienz sortierte Reihenfolge: SA/ α -CHCA < α -CHCA/2,5-DHB < FA/ α -CHCA < FA/SA < FA/2,5-DHB. Die Daten dazu sind in Tab. 5.9 zusammengefasst. Aus diesen Daten wird ersicht-

Matrix	Temperatur /K	Fehler /K	Kühleffekt (Matrix1+Matrix2) /K
FA/2,5-DHB	278	61	275
SA/ α -CHCA	298	84	2712
α -CHCA/2,5-DHB	459	165	1730
FA/ α -CHCA	973	166	1564
FA/SA	1087	318	1245

Tabelle 5.9: Vergleich der Temperaturen des Analyten aus verschiedenen dualen Matrixsystemen bei einer Ablationswellenlänge von 266nm. In der Spalte ganz rechts ist der Kühleffekt der Matrixmischung angegeben. Dieser Wert wurde aus der Addition der Temperaturdifferenzen von Matrix und Analyt aus Tab. 5.6 für beide singuläre Matrizes ermittelt.

Matrixmischung	Abstand /mm	Maximum. d. Verteilung/ ms^{-1}	Δv / ms^{-1}	T/K	ΔT /K
FA/ α -CHCA	0,59	247	49	512	198
2,5-DHB/ α -CHCA	0,58	419	60	525	145
2,5-DHB/FA	0,58	318	42	538	160
FA/SA	0,57	393	54	847	260

Tabelle 5.10: Vergleich der Ablationsgeschwindigkeiten des Analyten aus verschiedenen Dual-Matrizes bei einer Wellenlänge von 355nm und einem Abstand von ca. 0.6mm

lich, dass die Kühlungseffizienz der einzelnen Matrizes durch optimale Kombination selbiger stark verbessert werden kann. Eine Ausnahme davon bildet die Kombination FA/2,5-DHB. Hier ist für die einzelnen Matrizes eine sehr geringe Kühleffizienz zu beobachten, wohingegen es bei dem Einsatz der Matrixmischung zu einer äußerst effektiven Kühlung kommt. Allerdings zeigt die Mischung ein schlechtes Kristallisationsverhalten und die Probe ist äußerst inhomogen (s. a. Abb. 4.13). Daher kann nicht sicher unterschieden werden, ob der Kühleffekt aus der Probenpräparation stammt, oder ob die Ursache in der Matrixmischung selbst liegt. Dazu müsste eine Methode gefunden werden, um die Homogenität dieser Probe zu verbessern.

Wellenlängenabhängigkeit

Die Abhängigkeit der Analytkühlung von der Ablationswellenlänge konnte bereits in [84] gezeigt werden. Hier wurden die Ablationswellenlängen von 355nm und 337nm verwendet. Die Geschwindigkeitsverteilungen der untersuchten Matrixmoleküle 2,5-DHB, FA und SA zeigten hierbei eine teilweise stark erhöhte wahrscheinlichste Geschwindigkeit mit abnehmender Desorptionslaserwellenlänge, wohingegen die Temperatur des *plume* stark abnahm. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit dieser Effekt in Matrixmischungen zu beobachten ist. Dazu wurde für die Ablationswellenlänge der Wert von 355nm gewählt. Diese konnte durch einen einfachen Wechsel des Kristalls im Ablationslaser erhalten werden. Eine Änderung der Strahlage des Desorptionspulses konnte dabei nicht beobachtet werden. Daher konnte sichergestellt werden, dass der Ablations- und Positionierungsart relativ zueinander keinen Änderungen unterworfen waren. Exemplarisch wurden vier der oben untersuchten Matrixmischungen ausgewählt: FA/ α -CHCA, 2,5-DHB/ α -CHCA, 2,5-DHB/FA und FA/SA. Die Probenpräparation erfolgte nach der bereits beschriebenen Methode der dd-Präparation aus THF. Die Geschwindigkeitsverteilungen des Analyten aus diesen Matrixmischungen sind im Anhang (Abb. A.11 bis A.14) dargestellt. Eine Übersicht der aus den Verteilungen erhaltenen Daten ist in Tab. 5.10 gezeigt. Die Daten sind nach ansteigender Temperatur des *plume* sortiert. Dabei ist zu erkennen, dass diese für die Mischungen FA/ α -CHCA, 2,5-DHB/ α -CHCA und 2,5-DHB/FA in einem engen Bereich von 512K-538K zu finden ist. Die starken Unterschiede, wie sie bei der Ablation bei 266nm noch zu erkennen waren, haben sich in diesem Fall nivelliert. Es ist keine signifikante Abhängigkeit der *plume*-Temperatur für Chrysen von der verwendeten Matrixmischung zu erkennen. Ein anderes Ergebnis zeigt der Vergleich der Temperaturen einzelner Mischungen bei den verschiedenen Ablationswellenlängen. FA/2,5-DHB zeigt mit 538K eine im Vergleich zur Ablation bei 266nm eine um 260K erhöhte Temperatur. Diese Matrixmischung zeigt hier nicht mehr die im Vergleich optimale Kühlung des Analyten. Die beste Kühlung des Analyten wurde bei der Desorptionswellenlänge von 355nm für die Mischung von FA/ α -CHCA mit einer *plume*-Temperatur von 512 ± 198 K gefunden. Im Vergleich zu der Ablation mit 266nm liegt die Temperatur mit 973K erheblich über dem hier erhaltenen Wert. Für die Mischung 2,5-DHB/ α -CHCA wurde aus der Verteilung für die Ablationswellenlänge von 355nm ein Temperaturwert von 525 ± 145 K ermittelt, dieser ist vergleichbar mit dem im vorherigen Experiment gefundenen Wert von 459K. Die letzte hier untersuchte Mischung stellt die Kombination aus FA und SA dar. Zeigte diese in dem vorherigen Experiment die schlechteste Kühlung mit einer Temperatur von 1087K, wurde dieser Wert für die Ablation mit 355nm bei 847 ± 260 K ermittelt. Der Vergleich mit der im vorherigen Abschnitt gefun-

denen Reihenfolge für die Kühleffizienz kann nicht auf die für die Ablation bei 355nm Daten übertragen werden. Es findet sich folgende, nach abnehmender Kühlung sortierte Folge: FA/ α -CHCA > 2,5-DHB/ α -CHCA > 2,5-DHB/FA > FA/SA. Hierbei fällt auf, dass die Mischungen aus 2,5-DHB/FA und FA/ α -CHCA im Vergleich zu der Ablation mit 266nm die Reihenfolge vertauscht haben. Dabei zeigt erstere Mischung eine sehr starke Verschlechterung der Kühlung, wohingegen letzte Mischung eine starke Verbesserung der Kühlung des Analyten bei einer Ablationswellenlänge von 355nm aufweist. Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die Kühleffizienz auf den Analyten durch den Einsatz von Matrixmischungen verbessert werden kann und sich dahingehend eine schmalere Geschwindigkeitsverteilung des Analyten ergibt. Dies würde für die MALDI-ToF-Analyse bedeuten, dass die ablatierten Analytmoleküle eine geringe Ortsunschärfe aufweisen. Bei Übertragung dieses Ergebnisses auf die Analytionen kann die Verbesserung des Auflösungsvermögens für die MALDI-Proben in [79] bei der Verwendung einer Matrix-Mischung erklärt werden. Insbesondere bei der Analyse großer Moleküle macht sich die Geschwindigkeitsverteilung selbiger stark bemerkbar, da hier die Startgeschwindigkeit nicht mehr vernachlässigbar gegenüber der Gesamtflugzeit im Massenspektrometer ist.

Allerdings ist nach den hier gefundenen Ergebnissen nicht zu erwarten, dass dieser Effekt für alle Mischungen in gleicher Stärke gefunden wird. Hier zeigte sich, dass die Abnahme der Temperatur nicht mit der verwendeten Ablationswellenlänge korreliert. So wurde für die Mischung 2,5-DHB/FA eine schlechtere Kühlung mit zunehmender Wellenlänge beobachtet, während sich für die Mischung FA/SA ein umgekehrter Einfluss bestimmen ließ.

6 Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das Ablationsverhalten der MALDI-Matrizes α -CHCA, 2,5-DHB, FA, SA und DHAP bei einer Desorptionswellenlänge von 266nm untersucht. Da die MALDI in erster Linie der Untersuchung von großen Molekülen dient, war zusätzlich das Ablationsverhalten des Modellanalyten Chrysen aus den bereits beschriebenen Matrizes Gegenstand der hier durchgeführten Experimente. Im Gegensatz zu vorhergehenden Untersuchungen stand bei diesen Experimenten die Untersuchung der ablatierten Neutralteilchen im Vordergrund. Diese dominieren quantitativ den Prozess der MALDI, das Verhältnis zwischen auftretenden Ionen und ablatierten Neutralteilchen liegt zwischen 1:1000 und 1:10000. Die Analyse der Neutralteilchen erfolgte über eine zeit- und orts aufgelöste Nachionisation der Ablationswolke (*plume*). Durch eine neue Konzeption der Postionisationslasereinkopplung gelang es, die Position des Postionisationsortes sehr präzise einzustellen. Der größte Fehler der Abstandsbestimmung zwischen Probenoberfläche und dem Postionisationsort ergab sich aus der inhomogenen Oberfläche. Die Dicke der Proben konnte für 2,5-DHB exemplarisch mit durchschnittlich $100\mu\text{m}$ bestimmt werden. Diese Untersuchungen zeigten jedoch auch, dass die Proben eine starke Inhomogenität aufwiesen. Diese könnte durch weitere Optimierung der standardisierten Probenpräparation wie z.B. der Verwendung anderer Lösungsmittel oder auch Anwendung anderer Präparationsmethoden durch Fortführung der *solvent free*-Präparation, und die Untersuchung ionischer flüssiger Matrizes (ILM) verbessert werden. Dadurch könnte die Genauigkeit der Abstandbestimmung verbessert werden.

Aus den erhaltenen Massenspektren konnte die wahrscheinlichste Ablationsgeschwindigkeit sowie die Temperatur des *plume* bestimmt werden. Für die Maxima der Geschwindigkeitsverteilungen wurde folgende, nach abnehmenden Werten sortierte, Reihe ermittelt: α -CHCA > FA > DHAP > SA > 2,5-DHB. Die Temperatur der Matrizes wies eine sehr ähnliche Reihung nach absteigenden Werten auf: α -CHCA > DHAP > SA > 2,5-DHB > FA. Aus diesen Daten (s. Tab. 6.1) kann eine Einstufung der Matrizes nach ihren Ablationseigenschaften erfolgen: α -CHCA wies eine sehr hohe Ablationsgeschwindigkeit sowie

eine hohe Temperatur des *plume* auf und wurde daher als „heiß“ klassifiziert. Das Pendant dazu bildeten die Matrizes FA und 2,5-DHB. Die Beträge der wahrscheinlichsten Ablationsgeschwindigkeiten bzw. der Temperaturen des *plume* lagen am unteren Bereich der gemessenen Werte, und damit wurden diese Matrizes als „kalt“ eingestuft. Das Verhalten der Matrizes ist jedoch noch von anderen Faktoren abhängig. So wurde bei der Verwendung von UV-Laserpulsen mit einer Pulsdauer von 8ns vor allem eine Ablation im *thermal confinement* gefunden. Die Theorie sagt für Desorptionslaserpulsdauern im unteren ps-Bereich das vornehmliche Auftreten des *stress confinement* voraus. Dies müsste experimentell durch Einsatz sehr kurzer Laserpulse zur Ablation bestätigt werden.

In der vorliegende Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen dem thermischen Anteil der Ablationsgeschwindigkeit ($v_{ablation-v_{stream}}$) und dem *Stokes shift* gezeigt. Diese Untersuchungen könnten durch Ausweitung auf weitere Matrixsysteme und die bisher diesbezüglich überhaupt nicht untersuchten dualen Matrixsysteme fortgeführt werden. Neben den Untersuchungen des Ablationsverhaltens der Matrixmoleküle konnte im zweiten Teil dieser Arbeit die Abhängigkeit der Entwicklung des *plume* von dem Abstand zwischen Ablations- und Positionisationsort bestimmt werden. Aus diesen Daten konnte die Entwicklung der Ablationswolke bis zu einer Entfernung von 1.9mm vom Ablationsort untersucht werden. Dabei wurde festgestellt, dass die Entwicklung des *plume* bei dem geringsten hier untersuchten Abstand von 0.7mm bereits abgeschlossen ist und es zu keinen signifikanten Veränderungen der Ablationswolke mehr kommt.

Neben dem Einfluss der Wellenlänge und der Pulsdauer des Ablationslasers auf die Entwicklung des *plume* konnten bereits Hinweise auf die Abhängigkeit der Entwicklung des *plume* vom Umgebungsdruck gefunden werden [84]. Auch der Erfolg der Atmosphären-druck (AP)-MALDI deutet auf eine solche Abhängigkeit hin. Daher sollten systematische Untersuchungen des *plume* bei erhöhtem Umgebungsdruck durchgeführt werden. Die in dieser Arbeit verwendete Apparatur ist für derartige Versuche im Druckbereich von $1,0 \times 10^{-6}$ mbar- $2,5 \times 10^{-6}$ mbar durch die vorhandene *default leakage* bereits vorbereitet. In der Anwendung der MALDI steht jedoch der Analyt im Mittelpunkt des Geschehens. Daher wurde im dritten Teil dieser Arbeit der Einfluss unterschiedlicher Matrizes auf die Ablation des Modellanalyten Chrysen untersucht. Für den Analyten wurde eine identische Reihenfolge der Ablationsgeschwindigkeiten wie für die ablatierten Matrixneutralen gefunden (s.o.), allerdings lagen die wahrscheinlichsten Ablationsgeschwindigkeiten in allen untersuchten Matrizes signifikant unterhalb des Wertes für die Matrixneutralen. Dies ist ein starker Hinweis auf die schützende Funktion der Matrix für den Analyten. Dabei nimmt die Matrix einen Großteil der durch den Laser eingebrachten Energie auf und ver-

Matrix	$v_{Matrix}/$ ms^{-1}	$v_{Analyt}/$ ms^{-1}	Temperatur d. Matrix/ K	Temperatur d. Analyten/K
2,5-DHB	421	333	926	696
FA	497	421	738	693
SA	551	439	2082	882
α -CHCA	737	528	2080	568

Tabelle 6.1: Vergleich der Ablationsgeschwindigkeiten von Matrix und Analyt sowie die Temperaturen der jeweiligen Teilchen.

teilt diese bis in Translationsfreiheitsgrade um. Der Analyt selbst erfährt eine geringere energetische Anregung als die Matrix selbst. Ein Maß für die thermische Anregung des Analyten ist seine Temperatur innerhalb der Ablationswolke. Diese ist bestimmt durch die Breite der Geschwindigkeitsverteilung der ablatierten Analytmoleküle. Dabei zeigt eine schmale Verteilung, dass der Analyt sehr stark gekühlt wird und entweder aus dem Laserpuls wenig Energie aufgenommen hat oder seine Energie auf die umgebenden Matrixmoleküle abgeben konnte. Die starke Kühlung ist von Bedeutung, um den Analyten unzerstört in die Gasphase überführen zu können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Temperaturen des Analyten signifikant unter den Temperaturen der Matrix liegen. Dies zeigt den starken kühlenden Einfluss der Matrix auf den Analyten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 6.1 zusammengefasst. Neben der Ablation aus den reinen Matrixsubstanzen wurde im vierten Teil dieser Arbeit das Ablationsverhalten aus unterschiedlichen Mischungen gängiger MALDI-Matrizes untersucht. Dies erfolgte vor dem Hintergrund, dass die Mischung der Matrix mit Additiven und auch die Verwendung dualer Matrixsysteme eine signifikante Verbesserung des Auflösungsvermögens von MALDI-Spektren bedingte. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Temperatur des Analyten in den hier untersuchten Dualmatrixsystemen im Vergleich zu einfachen Matrixsystemen abnahm. Dies gab einen Hinweis darauf, dass die Initialgeschwindigkeiten des Analyten nach der Ablation einer engen Verteilung unterlagen und es daher zu einer geringen Ortsunschärfe der Analytteilchen kam. Dadurch erhöht sich das Auflösungsvermögen des Spektrums. Der beschriebene Effekt war jedoch nicht für alle Matrixmischungen von gleicher Stärke. Für die Ablation bei einer Desorptionswellenlänge von 266nm wurde die nach zunehmender Kühleffizienz sortierte Reihe gefunden: SA/ α -CHCA < α -CHCA/2,5-DHB < FA/ α -CHCA < FA/SA < FA/2,5-DHB.

Die Untersuchung des Ablationsverhaltens dualer Matrixmischungen bei einer Wellenlänge des Desorptionslasers von 355nm wies eine etwas abweichende Reihung auf:

FA/ α -CHCA > 2,5-DHB/ α -CHCA > 2,5-DHB/FA > FA/SA. Dies zeigt, dass die Kühlung des Analyten zum einen von der verwendeten Matrixmischung, zum anderen jedoch auch von der Ablationswellenlänge abhing. Für gut kristallisierende Matrixmischungen konnte weiterhin ein Zusammenhang zwischen der Kühleffizienz der einzelnen Matrizes und dem Kühleffekt der Matrixmischung gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Kühleffizienz der Mischungen additiv aus den Kühleffekten der jeweiligen Matrizes zusammensetzt. Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass die Verwendung von dualen Matrixmischungen Vorteile für die MALDI-Analyse bringen kann. Allerdings bedarf es für das genaue Verständnis des Einflusses dieser Mischungen auf den Ablationsprozess noch weiterer Untersuchungen, hier sei insbesondere auf die große Anzahl von Matrixkombinationen und deren unterschiedlichen Mischungsverhältnisse hingewiesen. In den Bereich der Matrixmischungen fallen auch die oben bereits angesprochenen ILM.

Literaturverzeichnis

- [1] F. Hillenkamp, M. Karas, D. Bachmann, *Analytical chemistry* **1985**, 57(14), 2935.
- [2] A. Vertes, R. Gijbels, R. D. Levine, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1990**, 4, 228.
- [3] A. Bencsura, V. Navale, M. Sadeghi, A. Vertes, *Rapidi Comm. Mass Spectrom.* **1997**, 11, 679.
- [4] G. Luo, I. Marginean, A. Vertes, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 6185.
- [5] S. Berkenkamp, C. Menzel, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, 13, 209.
- [6] P. Juhasz, M. Vestal, S. A. Martin, *Am. J. Mass Spectrom.* **1997**, 8, 209.
- [7] T. Huth-Fehre, C. Becker, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1991**, 5, 378.
- [8] M. Glückmann, M. Karas, *J. of Mass Spectrom.* **1999**, 34, 467.
- [9] Budzikiewicz, *Massenspektrometrie - Eine Einführung*, VCH, **1992**.
- [10] C. Whitehouse, R. Dreyer, M. Yamashite, J. Fenn, *Analyt. Chem.* **1985**, 57(3), 675.
- [11] M. Comisarow, *Hyperfine Interactions* **1993**, 81, 171.
- [12] M. Scigelova, A. Makarov, *Practical Proteomics* **2006**, 1, 16.
- [13] B. Spengler, V. Boekelmann, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **1993**, 8, 379.
- [14] A. Cameron, D. Eggers, *Rev. Sci. Instr.* **1948**, 19, 605.
- [15] W. Wiley, J. McLaren, *Rev. Sci. Instr.* **1955**, 26, 1150.
- [16] B. Mamyrin, *Int. J. Mass Spetrom.* **2001**, 206, 251.

- [17] J. Grundwürmer, *Entwicklung, Aufbau und Einsatz eines linearen Flugzeitmassenspektrometers für die Matrixunterstützte Laser Desorption/Ionisation*, Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **1996**.
- [18] S. Uchaikin, F. Probst, W. Seidel, *Physica C* **2001**, 350(3), 177.
- [19] S. Colby, T. King, J. Reilly, *Rapid Comm. mass Spectrom.* **1994**, 8, 865.
- [20] G. Kinsel, M. Johnston, *Int. J. Mass Spectrom.* **1989**, 91, 157.
- [21] G. Kinsel, C. Mowry, P. McKeown, *Int. J. Mass Spectrom.* **1991**, 104, 35.
- [22] G. R. Kinsel, J. M. Grundwürmer, J. Grotemeyer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, 4, 2.
- [23] P. Kebarle, T. Liang, *Ana. Vhem.* **1993**, 65, 972 A.
- [24] J. Gross, *Mass Spectrometry*, Springer, **2004**.
- [25] A. F. Haught, *Annual Review of Physical Chemistry* **1968**, 19, 343.
- [26] Honig, J. R. Woolston, *Appl. Phys. Appl. Phys. Lett.* **1963**, 2, 138.
- [27] M. A. Posthumus, P. Kistemaker, H. L. C. Meuzelaar, M. Ten Noever de Brauw, *Anal. Chem.* **1978**, 50, 985.
- [28] F. Hillenkamp, M. Karas, *IJMS* **2000**, 200, 71.
- [29] K. Tanaka, K. Waki, Y. Ido, S. Akita, *Rapid Communications Mass Spectrometry* **1988**, 2(8), 151.
- [30] A. Rohlfing, K. Dreisewerd, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 12275.
- [31] G. Bacher, R. Korner, A. Atrih, S. J. Foster, P. Roepstorff, G. Allmaier, *J. Mass Spectrom.* **2001**, 36, 124.
- [32] W. C. Chang, L. C. L. Huang, W.-P. Wang, Yi-Sheng Peng, H. C. Chang, N. Y. Hsu, W. B. Yang, C. H. Chen, *Anal. Chim. Acta* **2007**, 582, 1.
- [33] R. Knochenmuss, *J. Mass Spectrometry* **2002**, 37, 867.
- [34] R. Knochenmuss, Q. Lin, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2001**, 15, 1422.
- [35] R. Knochenmuss, V. Karbach, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1998**, 12, 969.

- [36] D. Allwood, P. Dyer, R. Dreyfus, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 499.
- [37] D. Ermer, M. Baltz-Knorr, R. J. Haglund, *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*(5), 538.
- [38] R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Mass Spetrom. Rev.* **1998**, *17*, 337.
- [39] J. Allison, P.-C. Liao, *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 408.
- [40] A. Meffert, *Untersuchungen zu Ionisation und Reaktionen bioorganischer Cluster in der Gasphase*, Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **1998**.
- [41] I. P. Smirnov, X. Zhu, T. Taylor, Y. Huang, P. Ross, I. Papayanopoulos, S. Martin, D. Pappin, *Anla. Chem.* **2004**, *76*, 2958.
- [42] R. Knochenmuss, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2199.
- [43] C. Scott, C. Kosmidis, W. Jia, K. Ledingham, R. Singhal, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1994**, *8*(829-832).
- [44] M. Karas, R. Krüger, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 427.
- [45] C. Creaser, *EJMS* **2003**, *9*, 33.
- [46] M. Belov, C. Myatt, P. Derrick, *J. Chem. Phys* **1998**, *248*, 412.
- [47] R. Levis, *Annual Review of Physical Chemistry* **1994**, *45*, 483.
- [48] E. Schulz, M. Karas, F. Rosu, V. Gabelica, *Am. J. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 1005.
- [49] K. Riahi, G. Bolbach, a. Brunot, F. Breton, M. Spiro, J.-C. Blai, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 242.
- [50] L. Zhigilei, P. Kordali, B. Garrison, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2845.
- [51] L. Zhigilei, B. Garrison, *J. App. Phys.* **2000**, *88*, 1281.
- [52] K. Hiraoka, M. Konosuke, K. Aizawa, F. Matsushita, H. Fukasawa, T. Sato, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 47.
- [53] S. Trimpin, M. Deinzer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 542.
- [54] L. Zhigilei, E. Leveugle, B. Garrison, Y. Yingling, M. Zeifman, *Chem. Rev.* **2003**, *102*, 321.

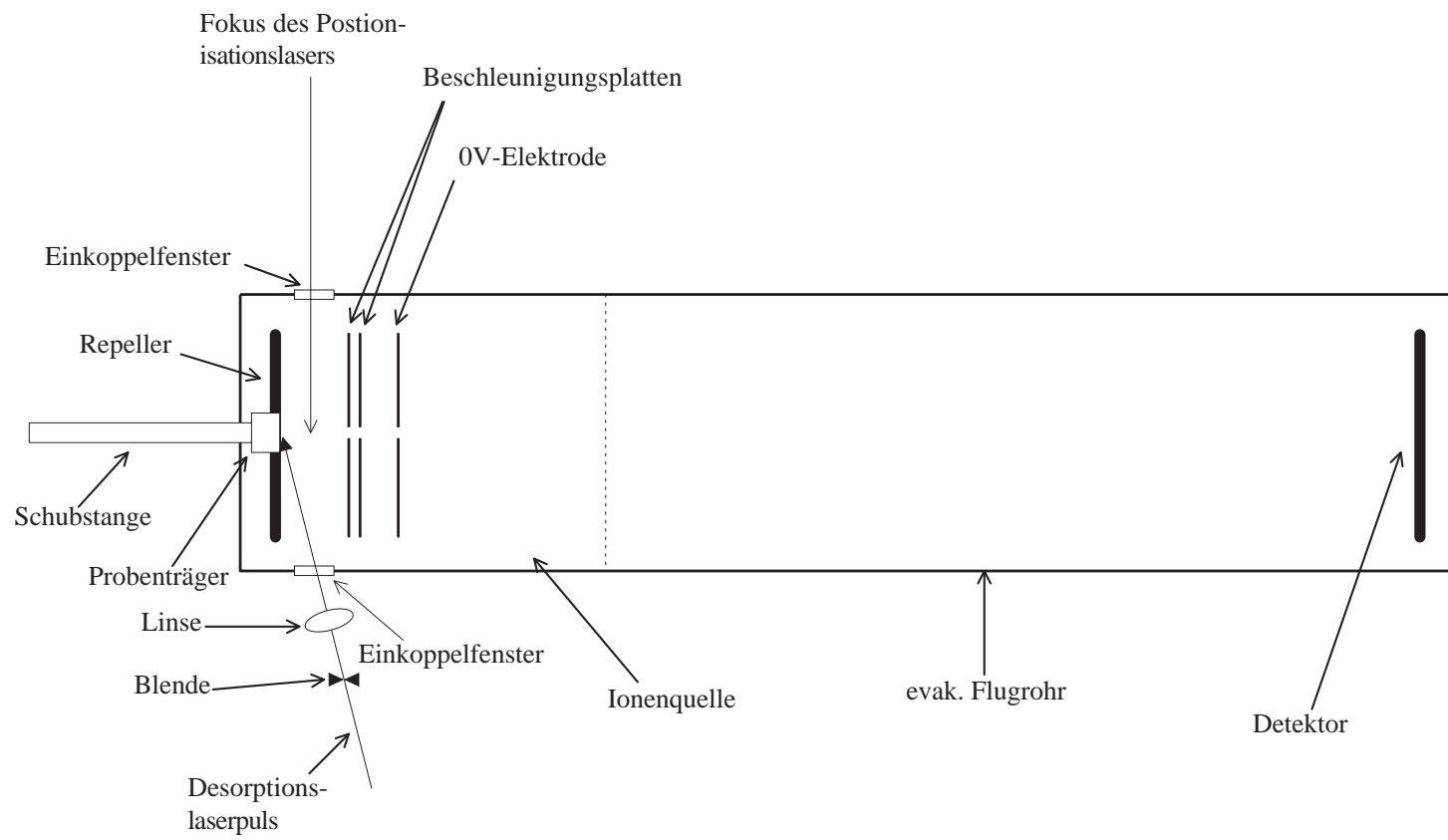
- [55] E. Carome, N. Clark, C. Moeller, *Appl. Phys. Lett.* **1964**, *4*, 95.
- [56] K. Dreisewerd, S. Berkenkamp, A. Leisner, A. Rohlfing, C. Menzel, *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *226*, 189.
- [57] W. Demtröder, *Laserspektroskopie*, Springer, **2000**.
- [58] S. Georgiou, A. Koubenakis, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 349.
- [59] P. Wu, b. Ringeisen, D. M. Bubb, R. C. Y. Auyeung, E. J. Horwitz, J. and Houser, A. Pique, R. A. McGill, D. B. Chrisey, *J. Appl. Physics* **2001**, *90*, 3623.
- [60] A. Meffert, J. Grotemeyer, *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *210/211*, 521.
- [61] L. Przybilla, J. D. Brand, Y. Kimihiro, H.-J. Räder, K. Müllen, *Anl. Chem.* **2000**, *72*, 4591.
- [62] J. Krause, M. Stoeckli, U. P. Schlunegger, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1927.
- [63] S. Trimpin, H. J. Raeder, K. Muellen, *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *253*, 13.
- [64] A. N. Krutchinsky, B. Chait, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 129.
- [65] P. Vestal, M. L. and Juhasz, S. A. Martin, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1044.
- [66] T. Chan, A. Colburn, D. P.J., *Org. Mass Spectrom.* **1991**, *26*, 342.
- [67] G. McCombie, R. Knochenmuss, *Anal. Chem* **2004**, *76*, 4991.
- [68] A. Tholey, M. Zabet-Moghaddam, E. Heinzle, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2006**, *19*, 1928.
- [69] J. Gobom, K. Kraeuter, R. Persson, H. Steen, P. Roepstorff, R. Ekman, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3320.
- [70] B. Garcia, P. J. Heaney, K. Tang, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2083.
- [71] J. Enebro, S. Karlsson, *Rapid Comm. mass Spectrom.* **2006**, *20*, 3693.
- [72] R. Skelton, F. Dubois, R. Zenobi, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1707.
- [73] V. Horneffer, R. Glueckmann, M. and Krueger, M. Karas, K. Strupat, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *249-250*, 426.

- [74] S. Trimpin, A. Rouhanipour, R. Az, H. Räder, K. Müllen, *Rapid. Comm. Mass. Spectrom.* **2001**, *15*, 1364.
- [75] S. Trimpin, S. Keuen, H. Räder, K. Müllen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 661.
- [76] D. Armstrong, L. Zhang, H. L., M. Gross, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3679.
- [77] P. Wasserscheid, *Nachr. a. d. Chemie* **2001**, *49*, 12.
- [78] A. Tholey, E. Heinzle, *Anal Bioanal Chem* **2006**, *386*, 24.
- [79] S. Laugesen, P. Roepstorff, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 752.
- [80] Z. Guo, L. He, *Anal. and Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 1939.
- [81] M. Ugarov, A. Woods, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6734.
- [82] D. Walbrodt, *Untersuchungen zur Laserdesorption großer Biomoleküle*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2003**.
- [83] T. Muskat, *Untersuchungen zur Fluoreszenzdetektion bei der Matrix-unterstützten Laserdesorptions-Ionisation*, Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2001**.
- [84] T. Muskat, *Matrixabhängiges Ablationsverhalten von Neutralen und Oberflächencharakteristika bei der Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation*, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, **2004**.
- [85] *Handbuch, Quanta Ray MOPO-730 FDO*.
- [86] R. O'Hair, J. Bowie, S. Gronert, *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Proc.* **1992**, *117*, 23.
- [87] K. Breuker, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *84*, 25.
- [88] M. Kang, A. Tholey, E. Heinzle, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 1972.
- [89] K. Medzihradzky, M. Campbell, J.M. and Baldwin, P. Falick, M.A. Juhasz, M. L. Vestal, A. Burlingame, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 552.
- [90] J. Pitt, J. Gorman, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1786.

- [91] T. Wenzel, K. Sparbier, T. Mieruch, M. Kostrzewa, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 785.
- [92] A. Kulle, *Untersuchung zur Freisetzung kinetischer Energie bei Dissoziationsreaktionen multifunktionaler Systeme*, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, **2006**.
- [93] D. Allwood, R. Dreyfus, I. Perera, P. Dyer, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1575.
- [94] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York and London, **1983**.
- [95] P. Kumarathasan, S. Mohottalage, P. Goegan, R. Vincent, *Analytical Biochemistry* **2005**, *346*, 89.
- [96] M. Karas, *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1476.

Anhang

Abbildung A.1: Schematischer Aufbau des Lin-ToF MS



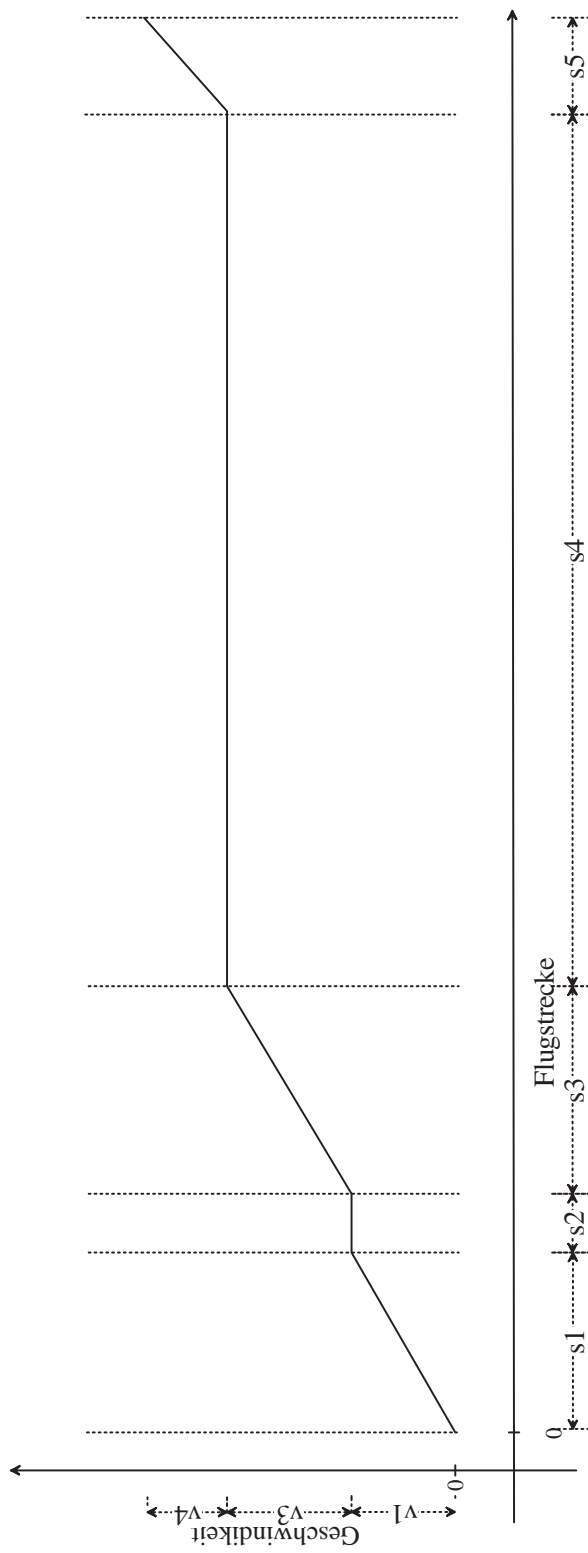


Abbildung A.2: Schematisches Geschwindigkeitsdiagramm der Ionen im Lin-ToF-MS

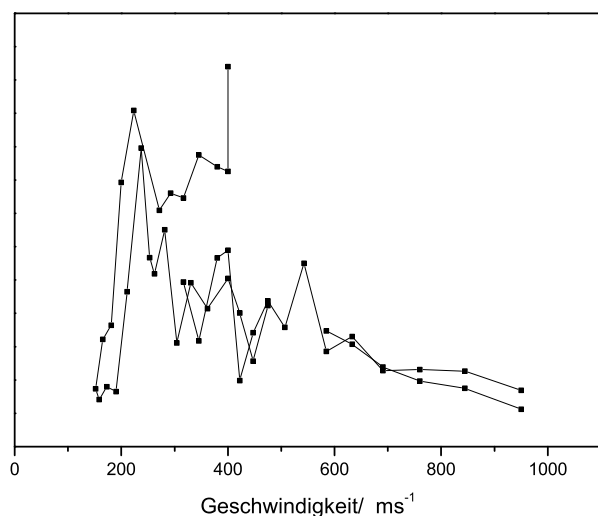


Abbildung A.3: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen aus 2,5-DHB. Hier sind die Daten chronologisch nach ihrer Messung verbunden. Die gestrichelte Linie bezeichnet die fit-Funktion. Der Einfluss des zeitlichen Verlaufes der Messung auf die Geschwindigkeitsverteilungen kann in Abb. A.3 gezeigt werden. In dieser Abbildung wurden die einzelnen Messpunkte im zeitlichen Ablauf ihrer Generierung verbunden. Deutlich sichtbar sind die starken Schwankungen des Positionierungssignals im Verlauf der Messungen. Auch ist die starke Abnahme der Signalintensitäten bei sehr hohen bzw. niedrigen Geschwindigkeiten zu erkennen. Der Intensitätsverlauf bei niedrigen Ablationsgeschwindigkeiten spricht stark für das Vorhandensein einer Mindestgeschwindigkeit der Ablation, aus der sich dann die Strömungsgeschwindigkeit ermitteln lässt. Die Signalintensitäten bei hohen Geschwindigkeiten zeigen die klar thermische Verteilung dieser ablatierten Teilchen. Zu den starken Schwankungen im mittleren Bereich der Geschwindigkeitsverteilungen kommt es, da hier viele Teilchen detektiert werden. Durch Konzentrationsschwankungen in der Probe ist hier die Zahl der ablatierten Teilchen starken absoluten Schwankungen unterworfen. Hinzu kommen die Leistungsschwankungen des Positionierungslasers. Diese beiden Fehler addieren sich zu den hier beobachteten starken Fehlern der Geschwindigkeitsverteilungen. Die Problematik der Signalabhängigkeit von der Positionierungsleistung konnte auf mathematischem Wege begegnet werden, für die Schwankungen der Analytkonzentration konnte bisher keine probate Lösung gefunden werden.

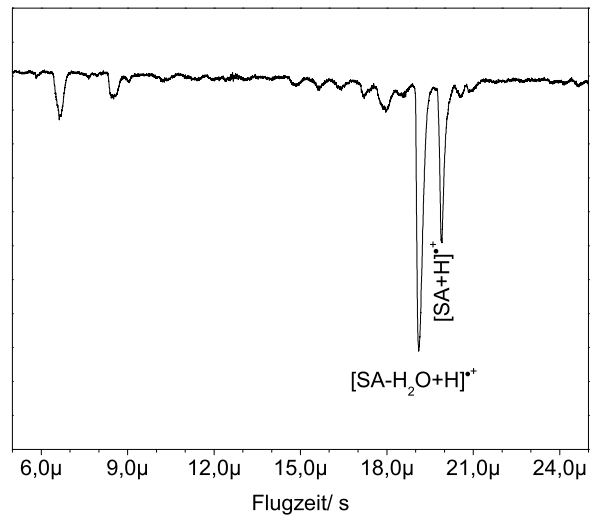


Abbildung A.4: Ausschnitt eines MALDI-ToF-Massenspektrums von SA, ablatiert bei einer Wellenlänge von 266nm. Erkennbar ist die geringe Fragmentierung. Es bilden sich nur die Massensignale von $[SA+H_2O+H]^+$ und $[SA+H]^+$ aus.

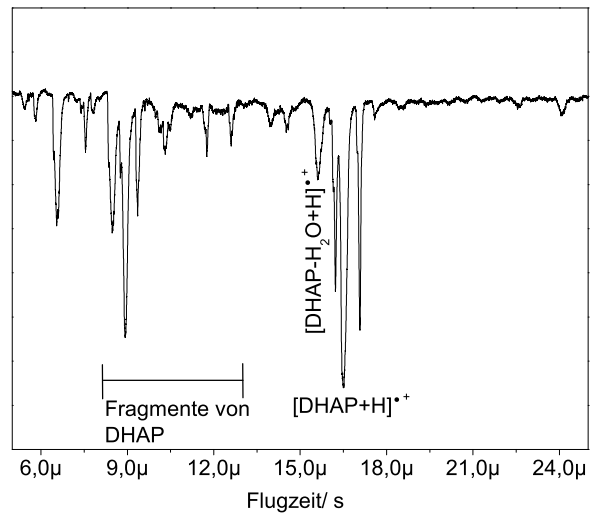


Abbildung A.5: Ausschnitt eines typischen Flugzeit-Massenspektrums von DHAP. Deutlich zu erkennen ist die massive Fragmentbildung der Matrix. Dadurch wurde die Auswertung der prompten Signale stark erschwert.

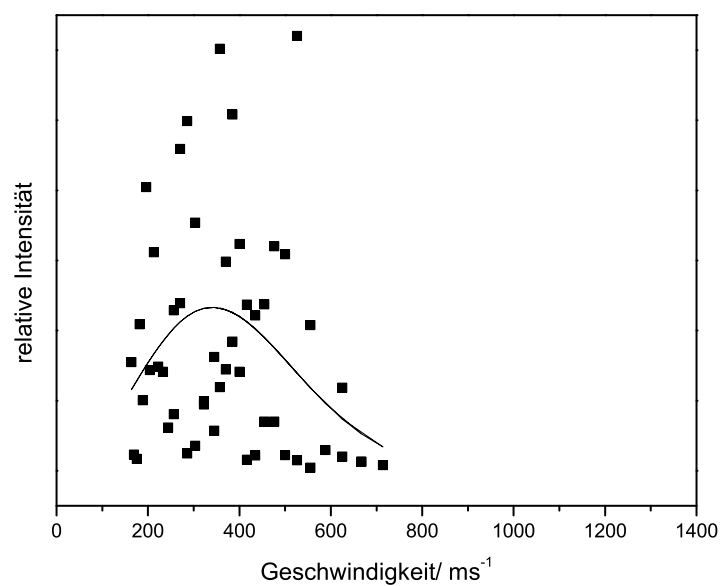


Abbildung A.6: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen, ablatiert aus der Mischung von α -CHCA und 2,5-DHB bei einer Wellenlänge von 266nm

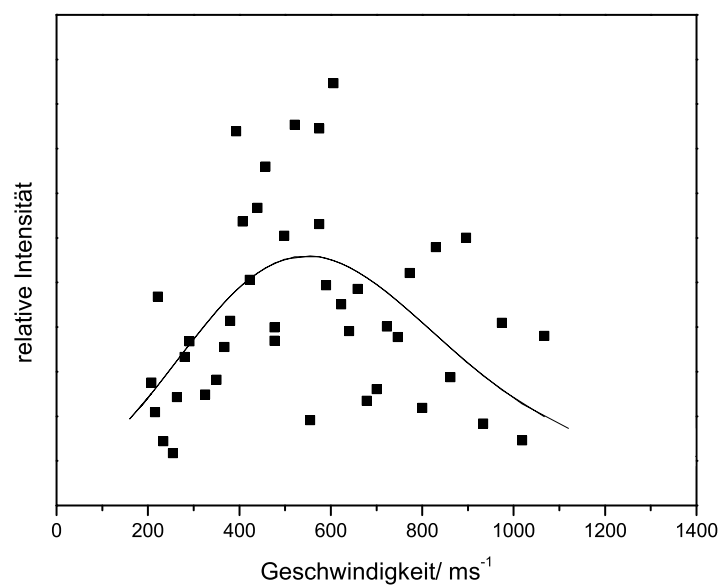


Abbildung A.7: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen, ablatiert aus der Mischung von FA und SA bei einer Wellenlänge von 266nm

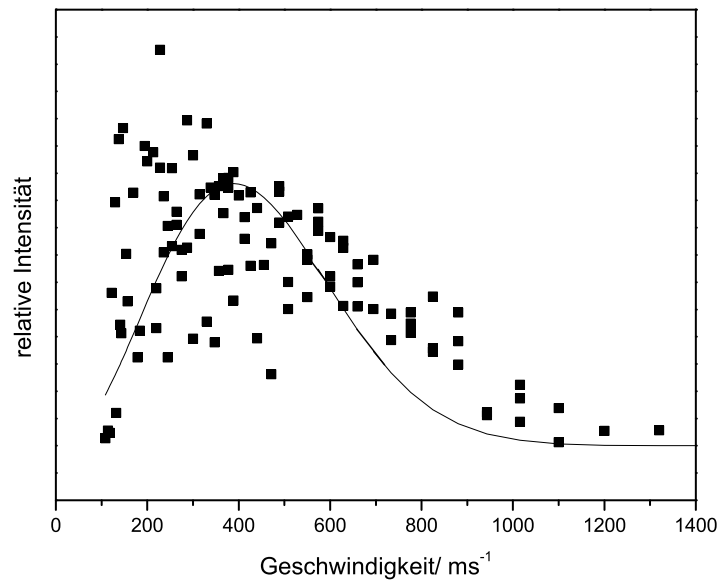


Abbildung A.8: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen, ablatiert aus der Mischung von α -CHCA und FA bei einer Wellenlänge von 266nm

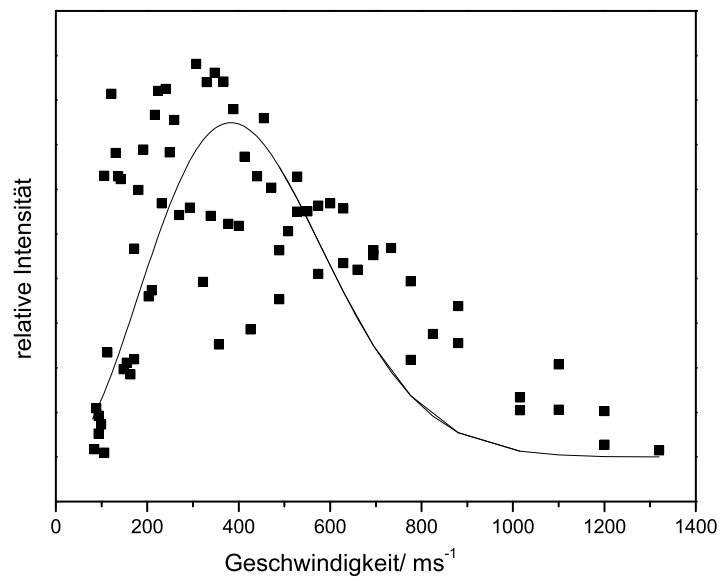


Abbildung A.9: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen, ablatiert aus der Mischung von 2,5-DHB und FA bei einer Wellenlänge von 266nm

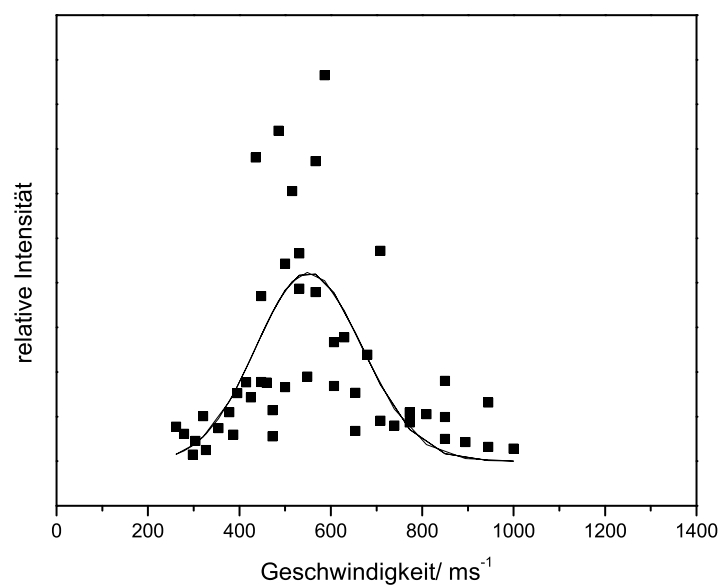


Abbildung A.10: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen, ablatiert aus der Mischung von α -CHCA und SA bei einer Wellenlänge von 266nm

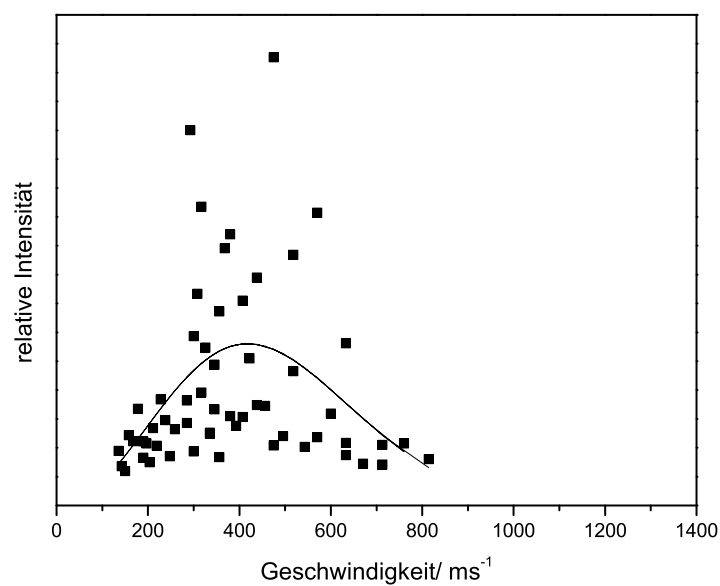


Abbildung A.11: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen, ablatiert aus der Mischung von α -CHCA und 2,5-DHB bei einer Wellenlänge von 355nm

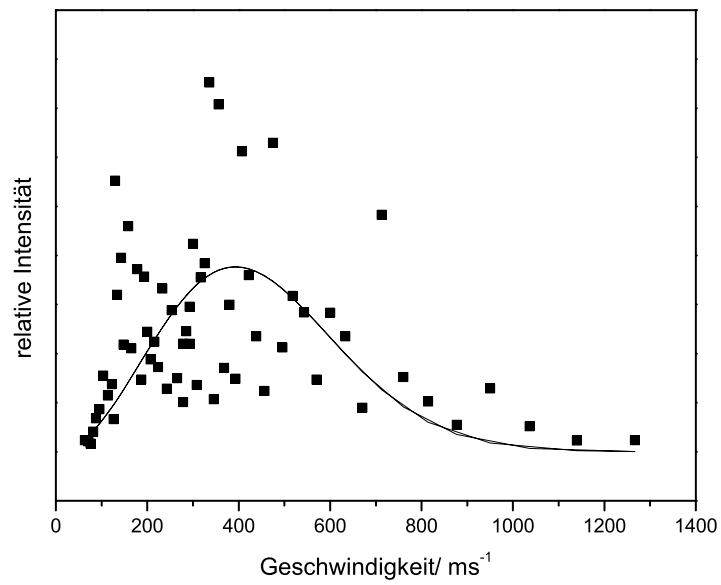


Abbildung A.12: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen, ablatiert aus der Mischung von FA und SA bei einer Wellenlänge von 355nm

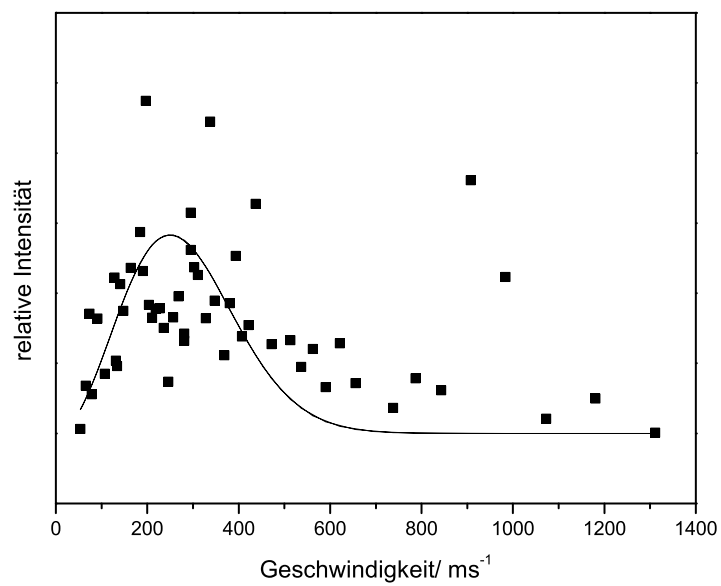


Abbildung A.13: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen, ablatiert aus der Mischung von α -CHCA und FA bei einer Wellenlänge von 355nm

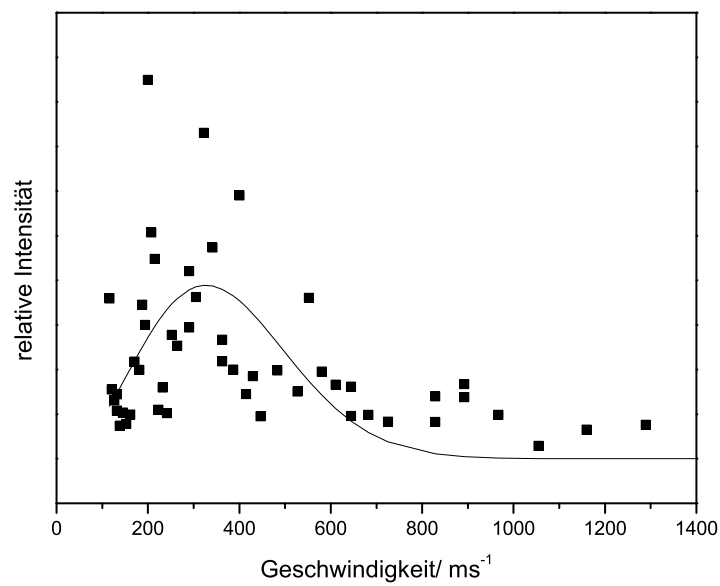


Abbildung A.14: Geschwindigkeitsverteilung von Chrysen, ablatiert aus der Mischung von 2,5-DHB und FA bei einer Wellenlänge von 355nm

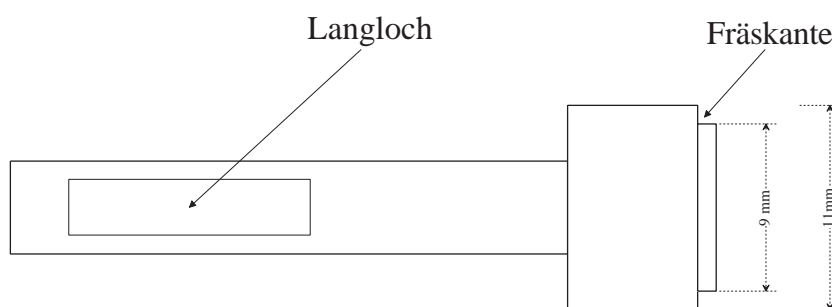


Abbildung A.15: Der Probenträger

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Dirk Walbrodt, erkläre, dass die vorliegende Arbeit „Das Ablationsverhalten von Matrix- und Analytneutralen im UV-MALDI-Prozess“ abgesehen von der Beratung meines Doktorvaters Prof. Dr. J. Grotemeyer und den weiteren genannten Hilfsmitteln in Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist. Sie wurde bisher weder in dieser noch einer abgewandelten Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dirk Walbrodt