

Das Laserablationsverhalten von ionischen Flüssigkeiten verschiedener MALDI-Matrices

Dissertation

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

vorgelegt von Nils Hellwig

Kiel, 2012

Referent: Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer
Korreferent: Prof. Dr. Gernot Friedrichs

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.08.2012
Zum Druck genehmigt: 15.08.2012

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Kurzzusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Ablationsprozesses von ionischen Flüssigkeiten als Matrix in der UV-MALDI. Die Verwendung dieser sogenannten ionischen flüssigen Matrices ist eine recht neue Entwicklung und zeigt in einigen Bereichen Verbesserungen gegenüber konventionellen kristallinen Matrices. Da einige Vorteile der Flüssigmatrices auf einen gleichmäßigeren Ablationsvorgang zurückgeführt wurden, ist die Untersuchung der dabei zugrundeliegenden Mechanismen von großem Interesse für die zukünftige Entwicklung weiterer Verbesserungen dieser Methode.

Die erste Methode, die zur Charakterisierung der Ablation verwendet wurde, ist die Postionisation von neutralen Molekülen in der Ablationswolke. Diese stellen den Großteil des ausgestoßenen Materials dar und die Bestimmung der mit dieser Methode zugänglichen Parameter, die Geschwindigkeitsverteilung und die Translationstemperatur der Teilchen, ermöglicht eine quantitative Beschreibung des Ablationsprozesses. Hier konnte gezeigt werden, dass der Ablationsvorgang der verwendeten Matrices sehr gut reproduzierbar ist und diese Stoffe sich daher gut für die Untersuchung mit dieser Methode eignen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass für ionische Flüssigkeiten der häufig verwendeten Matrices 2,5-DHB und CHCA sehr ähnliche Ablationsparameter erhalten werden, die deutlich unter den Werten für die jeweiligen festen Stoffe liegen. Zusätzlich konnten Einflüsse der Lichtabsorption bei der verwendeten Ablationswellenlänge und der Energie der eingestrahnten Photonen gefunden werden.

In den Experimenten zeigte sich auch das Auftreten eines zweiten Ablationsvorganges neutraler Moleküle um einige 100 ns verzögert zur initialen Ablation. Die Charakterisierung dieses Prozesses und die Aufklärung seines Ursprungs war mit der Postionisationsmethode nicht möglich. Um dies zu erreichen, wurde ein neues Experiment entworfen und in Betrieb genommen. Dieses kombiniert ein Flugzeitmassenspektrometer mit der Fast Flash Imaging Methode, bei der Schattenbilder der ablatierten Teilchenwolke zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Ablationslaserpuls mit Hilfe sehr kurzer Lichtpulse im Nanosekundenbereich aufgenommen werden. Anhand der hiermit durchgeführten Messungen konnte ein Modell entworfen werden, welches das Auftreten der verzögerten Ablation durch die verspätete Freisetzung von einem Teil der Energie, die durch den Laserpuls in die Probe eingebracht wurde, erklärt und die auftretenden Änderungen im Ablationsvorgang bei Variation der *laser fluence* und der Ablationswellenlänge zufriedenstellend erklären kann.

Abstract

The subject of this work is the investigation of the ablation process of ionic liquids used as the matrix in the UV-MALDI. The utilization of these so called ionic liquid matrices is a recent development and has been shown to exhibit advantages in some areas of work in comparison to the conventional crystalline matrices. Because some of the advantages of the liquid matrices have been explained by an increase of the uniformity of the ablation event, the investigation of the underlying mechanisms is of great interest for prospective developments of further enhancements of the method itself.

The first method that has been used to characterize the ablation is the postionization of neutral molecules in the ablation plume. These neutrals constitute the vast majority of the expelled material and the determination of the ablation parameters accessible via this method, namely the velocity distribution and the translational temperature of the particles, allow for a quantitative description of the ablation process. With this it could be shown that the ablation of the employed matrices exhibits a good reproducibility and these substances are therefore well suited for investigations using this method. Furthermore, it was discovered that Ionic Liquids containing the often used matrices 2,5-DHB and CHCA display a strong similarity in the respective ablation parameters, which are also well below their values obtained in the crystalline state. Additionally, an impact of the absorption of the laser light at the used wavelength and the energy of the irradiated photons on these parameters was found.

These experiments also pointed towards the occurrence of a second ablation event expelling neutral molecules with a time delay of a few hundred nanoseconds to the initial ablation. A characterization of this process and the elucidation of its origin was not possible by the employment of the postionization method. To achieve this, a new experiment was designed and set up, combining fast flash imaging, in which shadowgraphy pictures of the ablated particle cloud are obtained at varying times after the ablation laser pulse via the illumination by short lightpulses in the nanosecond range, and time-of-flight mass spectrometry. Based on the measurements carried out on this instrument, a model of the ablation was postulated, which explains the delayed ablation event by the release of a part of the absorbed energy after the initial ablation is finished. The observed changes of the ablation process arising from a change in the laser fluence or the ablation wavelength can be explained by this model in a satisfactory manner.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	XII
Abbildungsverzeichnis	XIV
1. Einleitung	1
1.1. Motivation	1
1.2. Methoden	2
2. Theoretischer Hintergrund	5
2.1. Massenspektrometrie	5
2.1.1. Massenseparatoren	6
2.1.2. Flugzeit-MS	7
2.1.3. Ionisationsmethoden	14
2.1.4. Photonenionisation	16
REMPI	17
2.2. MALDI	18
2.2.1. Ionisation	19
2.2.2. Desorption	24
Desorptionsgeschwindigkeiten	28
2.2.3. Die Matrix	33
2.3. Fast Flash Imaging	39
2.3.1. Grundprinzip des Fast Flash Imaging	39
2.3.2. Fast Flash Imaging zur Visualisierung der Laserablation	41
3. Experimenteller Teil	45
3.1. Synthese und Probenpräparation	45
3.1.1. Synthese der ionischen Flüssigkeiten	46
3.1.2. Probenpräparation	46

3.2. MALDI-Postionisationsexperimente	49
3.2.1. Experimenteller Aufbau	49
Lin-TOF	49
Ablationslaser	52
Postionisationslaser	53
3.2.2. Datenverarbeitung	60
3.2.3. Ergebnisse	65
Dihydroxybenzoesäure	67
α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure	83
3.2.4. Stoßwellenmodell	92
3.2.5. Zusammenfassung und Fazit	96
3.3. Fast Flash Imaging/Massenspektrometrie	99
3.3.1. Experimenteller Aufbau	100
Fast Flash Imaging	101
Massenspektrometrie	105
Zeitliche Steuerung des Experimentes	108
Datenverarbeitung	113
Messung	116
3.3.2. Ergebnisse	121
<i>Laser fluence</i> -Abhängigkeit	124
Veränderung der Probendicke	128
Wellenlängenabhängigkeit der Ablation	132
3.3.3. Fazit und Vergleich der Messmethoden	134
4. Zusammenfassung und Ausblick	137
4.1. Zusammenfassung	137
4.2. Ausblick	139
A. FFI-Aufnahmen	i

Abkürzungsverzeichnis

CCD	charge coupled device
CHCA	α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
CI	Chemische Ionisation
dd	dried-droplet
DE	delayed extraction
DHB	Dihydroxybenzoesäure
EI	Elektronenionisation
ESI	electrospray ionisation
ESPT	excited state proton transfer
FFD	field free drift
FT	Fourier-Transform
FWHM	full width half maximum
ICR	Ionen-Zyklotron-Resonanz
IL	ionic liquid
ILM	ionic liquid matrix
LDI	laser desorption/ionization
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
PSPF	post source puls focussing
REMPI	resonance enhanced multi photon ionization
RTIL	room temperature ionic liquid
TOF	time-of-flight

Abbildungsverzeichnis

2.1. Schematische Darstellung des Grundprinzips eines TOF-MS.	7
2.2. Darstellung der Fehlerquellen bei der Ionenbildung.	11
2.3. Verschiedene Varianten des Photonenionisations-Prozesses.	18
2.4. Schematische Darstellung des MALDI-Prozesses.	20
2.5. Das Grundprinzip der Postionisationsmethode.	30
2.6. Prinzipieller Aufbau eines FFI-Schattenphotographieexperiments.	40
3.1. Schematischer Aufbau des für die Messungen verwendeten linearen Flugzeit- massenspektrometers.	50
3.2. Einkoppelung der beiden Laser in die Ionenquelle.	53
3.3. Prinzip der Justagehilfe zur Einkoppelung des Postionisationslasers.	54
3.4. Schaltplan des verwendeten Triggerschemas für die Postionisation.	55
3.5. Pulsdiagramm der Triggerkaskade für die Postionisationsexperimente.	57
3.6. Verlauf der Beschleunigungsfelder in der verwendeten Ionenquelle.	59
3.7. Zusammenhang zwischen Delay und errechneter Geschwindigkeit	64
3.8. Flugzeitspektren bei unterschiedlichen Postionisationsdelays.	66
3.9. Intensitätsverteilung des postionisierten Radikalkations von 3,5-DHB in Abhängigkeit des Delays.	68
3.10. Intensitätsverteilung von 3,5-DHB/Butylamin mit einer Geschwindigkeits- verteilung.	70
3.11. Vergleich einer singulären und einer binären Geschwindigkeitsverteilung.	71
3.12. Vergleich einer singulären und einer binären Geschwindigkeitsverteilung einer zweiten Probe.	73
3.13. Ankunftszeitverteilungen der 3,5-DHB/Butylaminproben.	75
3.14. Intensitätsverteilung der 2,5-DHB/Triethylamin-Probe mit binärer Ge- schwindigkeitsverteilung.	78
3.15. Ankunftszeitverteilung der 2,5-DHB/Triethylamin-Probe.	79
3.16. UV-Absorptionsspektren der verwendeten DHB-Matrices.	82

3.17. Binäre Geschwindigkeitsverteilung von CHCA/Tributylamin bei 266 nm.	83
3.18. Ankunftszeitverteilung von CHCA/Tributylamin bei einer Ablationswellenlänge von 266 nm.	85
3.19. UV-Absorptionsspektrum der verwendeten Matrix CHCA/Tributylamin.	86
3.20. Binäre Geschwindigkeitsverteilung von CHCA/Tributylamin bei 355 nm.	87
3.21. Ankunftszeitverteilung von CHCA/Tributylamin bei einer Ablationswellenlänge von 355 nm.	88
3.22. Intensitätsverteilung des Radikalkations bei unterschiedlichen Abständen von Ablationsort.	91
3.23. Geschwindigkeitsverteilungen von CHCA/Tributylamin bei unterschiedlichen Abständen vom Ablationsort.	93
3.24. Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Stoßwellenmodells.	94
3.25. Einkoppelung der Farbstofffluoreszenz zur Beleuchtung des Ablationsvorganges.	102
3.26. Schematische Darstellung des verwendeten Aufbaus, Vorderansicht.	106
3.27. Schematische Darstellung des verwendeten Aufbaus, Aufsicht.	107
3.28. Flugzeitspektrum verschiedener Alkalikationen zur Bestimmung der Driftstrecke des Flugzeitmassenspektrometers.	108
3.29. Schaltplan des verwendeten Aufbaus für die FFI/TOF-Kopplung.	110
3.30. Pulsdiagramm der Triggerkaskade für die FFI-Experimente.	111
3.31. Schematische Darstellung der erhaltenen Aufnahmen.	115
3.32. Aufnahmen mehrerer Schattenbilder bei festem Delay zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit.	119
3.33. Schattenbildaufnahmen des gesamten Ablationszeitraumes mit ansteigendem Delay zum Ablationslaserpuls.	122
3.34. Flugzeitmassenspektren bei den verwendeten <i>laser fluence</i> -Werten.	124
3.35. Schattenbildaufnahmen bei einer <i>laser fluence</i> von 0,8 und 1,8 J/cm ²	126
3.36. Schattenbildaufnahmen bei einer <i>laser fluence</i> von 4,6 und 7,5 J/cm ²	127
3.37. Schattenbildaufnahmen einer Probe mit 10 µl Matrixlösung.	130
3.38. Schattenbildaufnahmen einer Probe mit 50 µl Matrixlösung.	131
3.39. Schattenbildaufnahmen der Ablation bei einer Wellenlänge von 266 nm.	133
4.1. Schattenbildaufnahmen bei unterschiedlichen Drücken in der Ionenquelle.	141
A.1. Schattenbildaufnahmen einer Probe mit 10 µl Matrixlösung und 0,8 J/cm ² <i>laser fluence</i>	i

A.2. Schattenbildaufnahmen einer Probe mit 10 μl Matrixlösung und 4,6 J/cm^2 <i>laser fluence</i>	ii
A.3. Schattenbildaufnahmen einer Probe mit 50 μl Matrixlösung und 0,8 J/cm^2 <i>laser fluence</i>	ii
A.4. Schattenbildaufnahmen einer Probe mit 50 μl Matrixlösung und 4,6 J/cm^2 <i>laser fluence</i>	iii
A.5. Schattenbildaufnahmen bei einer Ablationswellenlänge von 266 nm und einer Signalintensität der Flugzeitspektren entsprechend Abb. 3.36 oben.	iv
A.6. Schattenbildaufnahmen bei einer Ablationswellenlänge von 266 nm und einer Signalintensität der Flugzeitspektren entsprechend Abb. 3.36 unten.	v

Einleitung

1.1. Motivation

Die *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI)^[1] ist neben der *electrospray ionization* (ESI)^[2] eine der beiden weitverbreiteten Methoden zur Ionisation großer Biomoleküle bei der massenspektrometrischen Untersuchung dieser Stoffe. Die hierbei stattfindenden Prozesse zur Ionisation der Matrix und des Analyten und die Mechanismen der Überführung der Probe in die Gasphase sind allerdings noch nicht vollständig verstanden. In dieser Arbeit soll der letztgenannte Prozess, allgemein auch als Ablation bezeichnet, genauer untersucht werden. Hierfür wird eine relativ neue Klasse an Matrices verwendet, die ionischen flüssigen Matrices (ILM).^[3] Im Gegensatz zu konventionellen kristallinen Matrices weisen diese sehr gleichmäßige und reproduzierbare Signalintensitäten auf, was neben einer besseren Verteilung des Analyten in der flüssigen Matrix auf einen gleichmäßigeren Ablationsvorgang zurückgeführt wurde^[4]. Untersuchungen zum Ablationsprozess dieser Matrixklasse wurden im Vorfeld dieser Arbeit allerdings noch nicht durchgeführt.

Die verbesserte Gleichmäßigkeit des Ablationsvorganges macht diese Stoffe auch zu einem sehr gut geeigneten System zur Untersuchung des MALDI-Prozesses, da die entscheidenden Phänomene in einem sehr kurzen Zeitraum ablaufen und die verwendeten Messmethoden nur jeweils den Zustand zu einem bestimmten Zeitpunkt nach dem Start der Ablation darstellen können. Von daher muss eine Vielzahl an Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden, um den gesamten Ablationsprozess beschreiben zu können. Ein Vorgang wie die Ablation, an dem eine Großzahl von Molekülen beteiligt ist, unterliegt immer gewissen Schwankungen, die sich in den Messungen widerspiegeln.

Daher verspricht die angenommene erhöhte Reproduzierbarkeit der Ablation hier eine Verbesserung der Messungen zur Untersuchung dieses Prozesses.

Die Qualität der MALDI-Untersuchungen konnte in den letzten Jahren durch die Weiterentwicklung der verwendeten experimentellen Aufbauten stark verbessert werden. Ohne genaue Kenntnisse der im Ablations- und Ionisationsprozess stattfindenden Mechanismen sind die erhaltenen Signale aber weiterhin mit einer gewissen Unsicherheit verbunden, da nicht sichergestellt sein kann, dass die erhaltenen Massenspektren auch wirklich den vorliegenden Zustand der Probe wiedergeben. Hier stellt die erhöhte Gleichmäßigkeit bei der Verwendung der ILMs eine signifikante Verbesserung dar, auch vor dem Hintergrund der immer weiter fortschreitenden Automatisierung der in der Analytik durchgeführten Messungen. Zusätzlich ist auch die bessere Verteilung des Analyten in der Matrix hier vorteilhaft.

Gerade im Bezug auf des wachsende Feld der bildgebenden Massenspektrometrie ist ein gleichmäßiger Ablationsprozess eine wichtige Voraussetzung, da hier die Verteilung bestimmter Moleküle über einen größeren Bereich bestimmt wird. Dies kann nur dann mit ausreichender Genauigkeit erfolgen, wenn die Analyten immer im gleichen Maße ablatiert werden. Auch in anderen Fragestellungen ist eine Quantifizierung der Analyten aus dem MALDI-Prozess wünschenswert, hier besitzen ionische Flüssigkeiten anhand ihrer Eigenschaften in der Ablation ebenso ein großes Potential.

1.2. Methoden

Neben der Reproduzierbarkeit der Ablation sind auch andere Parameter hier von Interesse; so ist die Geschwindigkeit und die Temperatur der Probe nach der Ablation eine wichtige Größe, die eine Aussage über die energetischen Zustände von Matrix und Analyt und folglich auch die Neigung zu Fragmentierungen nach dem MALDI-Vorgang zulässt. Diese Parameter können mit der hier verwendeten Positionierungsmethode bestimmt werden. Da die festen Matrices zu einem großen Teil mit dieser Methode charakterisiert wurden, ist schließlich ein Vergleich der Ablation der Flüssigmatrices mit den konventionellen Matrices möglich.

Eine weitere Methode, die zur Charakterisierung der Ablation verwendet werden kann, ist die Darstellung des Ablationsprozesses mit Hilfe der Schattenphotographie bei sehr

kurzen Belichtungszeiten, das sogenannte Fast Flash Imaging. Hiermit kann ergänzend zur Positionierung auch der Einfluss anderer Parameter wie z.B. der *laser fluence* auf die Ablation bestimmt werden.

Theoretischer Hintergrund

In diesem Kapitel soll zunächst eine Einführung in den theoretischen Hintergrund der MALDI und ihrer Bedeutung innerhalb der Massenspektrometrie gegeben werden. Außerdem werden die in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsmethoden detailliert vorgestellt und vorherige Arbeiten zu verwandten Fragestellungen erläutert.

2.1. Massenspektrometrie

Der Begriff Massenspektrometrie fasst eine Vielzahl von Methoden zusammen, deren Ziel es ist, die physikalische Grundgröße der Masse von Atomen und Molekülen zu bestimmen. Der Ursprung der Massenspektrometrie ist in den Experimenten von J.J. Thomson und Francis Ashton Anfang des 20. Jahrhunderts zu sehen, denen es erstmals gelang, Isotope von Elementen aufgrund ihrer unterschiedlichen Massen zu trennen.

Alle Massenspektrometer beruhen auf demselben grundlegenden Prinzip, der Erzeugung von geladenen Teilchen in der Ionenquelle, der Trennung dieser nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z -Verhältnis) und der anschließenden Detektion. Die beiden letzten Schritte erfolgen üblicherweise im Hochvakuum, die Erzeugung von Ionen kann im Vakuum oder bei erhöhten Drücken erfolgen. Daher ist entweder eine Überführung der neutralen Probe zur Ionisation in das Vakuum oder der Einlass von vorher erzeugten Ionen in den evakuierten Analysator notwendig. Auf die Detektion folgt die Datenverarbeitung, heutzutage fast ausschließlich per Computer, um so zum Massenspektrum zu gelangen. Im Massenspektrum ist im Allgemeinen die detektierte Signalintensität des jeweiligen m/z -Verhältnisses aufgetragen.

Seit Anfang der 1950er Jahre wurde eine Vielzahl von Methoden zur Ionisation und Massenseparation entwickelt, im folgenden Teil sollen einige etablierte Techniken vorgestellt werden. Die für diese Arbeit wichtigen Methoden (MALDI (siehe 2.2), REMPI (siehe 2.1.4) und TOF (siehe 2.1.2)) werden hierbei ausführlicher beschrieben.

2.1.1. Massenseparatoren

Die ersten Massenanalysatoren waren sogenannte Sektorfeldmassenspektrometer^[5]; diese beruhen darauf, dass die Ablenkung eines geladenen Teilchens in einem Magnetfeld abhängig von seinem m/z -Verhältnis ist. Die Ionen werden in das Magnetfeld beschleunigt und in diesem von der Lorentzkraft auf eine Kreisbahn gezwungen. Der Radius dieser Kreisbahn ist einerseits abhängig vom m/z -Verhältnis, andererseits von der Stärke des Magnetfeldes. Daher kann ein Detektor an einem festen Ort durch Veränderung der Feldstärke Ionen unterschiedlicher m/z -Verhältnisse detektieren. Zusätzlich zum Magnetfeld kann hier noch ein elektrisches Feld verwendet werden^[6,7], um zusätzlich zur Impulsfokussierung durch das Magnetfeld auch eine Energiefokussierung zu erreichen.

Auf der Ablenkung geladener Teilchen in elektrischen Feldern beruht der Quadrupol-Analysator^[8-10], in dem die Ionen in ein elektrisches Quadrupolfeld, welches aus einem Gleich- und einem hochfrequentem Wechselfeld besteht, beschleunigt werden. Je nach eingestellten Parametern (Frequenz und Spannungen) können nur Ionen eines wählbaren Bereiches von m/z -Verhältnissen das Quadrupolfeld passieren. Alle anderen Ionen werden so stark abgelenkt, dass sie den Detektor nicht erreichen. Durch die Variation der Spannungen (bei gleichem Verhältnis der Spannungen zueinander, entlang der sogenannten Arbeitslinie) kann so ein komplettes Massenspektrum aufgenommen werden. Wird das Quadrupolfeld durch ein Randfeld begrenzt oder durch einen ringförmigen Aufbau in sich geschlossen, so können Ionen in diesem Feld gespeichert werden; man spricht dann von Quadrupol-Ionenfallen^[11].

Eine weitere Möglichkeit, Ionen zu speichern ist das Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS)^[12], in dem sich die Ionen in einem starken, homogenen Magnetfeld auf einer Kreisbahn mit massenspezifischer Umlauffrequenz bewegen. Nach Anregung durch ein elektrisches Feld ändert sich der Zyklotronradius der Ionen; dieser kann über die Winkelgeschwindigkeit der Ionen mit Detektorplatten registriert werden. Durch Fourier-Transformation der erhaltenen Signale in Abhängigkeit

der elektrischen Feldstärke wird ein Massenspektrum erhalten. Hiermit ist die Orbitrap-Technik^[13] verwandt, bei der ein speziell angeordnetes elektrisches Feld anstelle des Magnetfeldes verwendet wird. Diese beiden Techniken zeichnen sich gegenüber den vorher genannten durch ihr außerordentlich hohes Auflösungsvermögen aus. Die in dieser Arbeit verwendete Time-of-Flight-Technik wird in 2.1.2 näher erläutert.

Es sind auch Kopplungen der Analysatoren möglich, sowohl gleicher Art (z.B. zwei aufeinander folgende Quadrupol-MS), was als Tandem-MS bezeichnet wird, als auch untereinander (z.B. die Kopplung eines Magnetsektorfeldes mit einem elektrischen Sektorfeld oder das Vorschalten eines Quadrupol-MS vor ein FT-MS oder TOF zur Massenfilterung), was als Hybrid-MS bezeichnet wird. Hierdurch können z.B. Fragmentierungen in feldfreien Räumen oder Stoßzellen zwischen den Analysatoren untersucht werden.

2.1.2. Flugzeit-MS

Die Flugzeit-Massenspektrometrie wurde 1948 durch A.E. Cameron begründet, der das erste auf diesem Prinzip beruhende TOF-MS verwendete.^[14] Eine größere Bedeutung erlangte die Flugzeit-MS erst durch die Entwicklung von laserbasierten Photoionisationsmethoden, da diese, im Gegensatz zu den vorher entwickelten, kontinuierlichen Ionisationsmethoden, einen gepulsten Ionenstrom erzeugen. Ein Flugzeit-Massenspektrometer bietet hier aufgrund seiner Funktionsweise den großen Vorteil, dass aus jedem Laserschuss ein komplettes Massenspektrum erhalten werden kann. Gleichzeitig ergeben sich aus der Verwendung der Photoionisation mit Lasern Verbesserungen bezüglich einiger Fehlerquellen, die bei der Ionenerzeugung auftreten können. Diese Funktionsweise wird im Folgenden erläutert und ist in Abb. 2.1 skizziert.

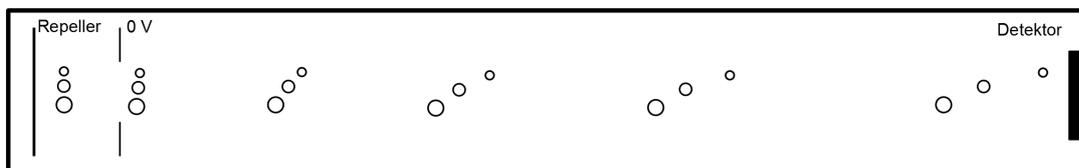


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung des Grundprinzips eines TOF-MS.

In einem Flugzeit-Massenspektrometer werden die in der Ionenquelle gebildeten Ionen durch ein elektrisches Beschleunigungsfeld U in Richtung des Detektors in das sogenannte Flugrohr beschleunigt. Durch die Beschleunigung erhalten alle Ionen gleicher

Ladungszahl z dieselbe kinetische Energie E_{kin} , die sich durch folgende Formel ausdrücken lässt:

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 = zeU. \quad (2.1)$$

Aus Gleichung 2.1 kann durch Umformen ein Ausdruck für die Geschwindigkeit v der Ionen erhalten werden:

$$v = \sqrt{\frac{2zeU}{m}}. \quad (2.2)$$

Hier ist die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Ionenmasse, der Beschleunigungsspannung und der Ionenladung (ze) zu erkennen. Wird der Einfachheit halber nur von einfach geladenen Ionen und einer für alle Ionen gleichen Beschleunigungsspannung ausgegangen, ergibt sich folgende Proportionalität zwischen Geschwindigkeit und Masse:

$$v \propto \sqrt{\frac{1}{m}}. \quad (2.3)$$

Leichtere Ionen haben nach der Beschleunigung also eine höhere Geschwindigkeit als schwere Ionen. Im Flugrohr, in dem keine Kräfte auf die Ionen wirken, findet dann eine Trennung aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeiten statt. Die leichteren Ionen durchqueren das Flugrohr schneller und treffen als erste auf den Detektor. Nachfolgend werden dann die weiteren, schwereren Ionen ihrer Masse/Flugzeit entsprechend detektiert. Die Flugzeit der Ionen durch ein Flugrohr mit der Driftstecke D lässt sich aus Gleichung 2.4 errechnen.

$$t = \sqrt{\frac{m}{2zeU}}D \quad (2.4)$$

Eine längere Flugstrecke bewirkt folglich eine längere Flugzeit und damit auch eine bessere Trennung der Ionen nach ihrer Masse. Die Flugzeit durch das Flugrohr ist aber noch nicht die Gesamtflugzeit der Ionen, hier müssen noch die Flugzeit in der Ionenquelle und ggf. eine Nachbeschleunigung im Detektor berücksichtigt werden.¹

¹Eine ausführliche Betrachtung der Flugzeiten des in Teilen dieser Arbeit verwendeten TOF-MS ist bei Walbrodt^[15] zu finden.

Auflösungsvermögen Das Auflösungsvermögen eines Massenspektrometers ist durch die Gleichung

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (2.5)$$

gegeben, Δm ist hierbei der Massenunterschied, bei dem zwei Signale noch eindeutig voneinander unterschieden werden können.^[16]

Hier ist auch auf den Unterschied zwischen Auflösungsvermögen und Auflösung hinzuweisen, obwohl beide Begriffe oft synonym verwendet werden. Das Auflösungsvermögen ist die Eigenschaft des Massenseparators, Ionen unterschiedlicher Massen voneinander zu trennen. Die Auflösung hingegen beschreibt die Möglichkeit, die im Massenspektrum erhaltenen Signale voneinander unterscheiden zu können. Nach der Definition in Gl. 2.5 ist das Auflösungsvermögen eines Massenseparators abhängig von der Masse des betrachteten Ions. Dies führt zu einer abnehmenden Auflösung für höhere Massen im resultierenden Massenspektrum. Dieser Zusammenhang ist auch für die Flugzeit-Massenspektrometrie gegeben. Ein Quadrupol-Massenspektrometer hingegen wird im Allgemeinen bei Einstellungen betrieben, die in einer konstanten Auflösung im Massenspektrum resultieren, hier ändert sich folglich das Auflösungsvermögen des Analysators mit der Masse.

Es gibt verschiedene Definitionen, bei welchem Abstand der Peaks eine Unterscheidung noch möglich ist. Die Wichtigsten sind die FWHM-Definition (*full width half maximum*), bei der zwei Peaks noch als getrennt zu betrachten sind, wenn sie bei der halben Höhe des Signalmaximums unterscheidbar sind, und die 10% Tal-Definition, bei der die Peaks bei einer Höhe von 10% des Maximums getrennt sein müssen. Die Auflösung nach der 10% Tal-Definition ist folglich geringer als nach der FWHM-Definition.

Das einfachste Flugzeit-Massenspektrometer, mit einem linearen Flugrohr und einer einstufigen Beschleunigungsstrecke, erreicht nur ein Auflösungsvermögen von maximal 500.^[17] Die Faktoren, die das Auflösungsvermögen begrenzen und Möglichkeiten, die Auflösung zu verbessern, sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Zeitunschärfe Damit alle Ionen gleicher Masse zum selben Zeitpunkt auf den Detektor auftreffen können, müssen sie auch zum selben Zeitpunkt gestartet sein. Ist dies nicht der Fall, so ergibt sich ein Fehler in der Flugzeit: Später gebildete Ionen treffen auch

später auf dem Detektor auf. In Abbildung 2.2 ist dieser Fall unter a) dargestellt. Zum Zeitpunkt t_1 ist das obere Teilchen schon ionisiert und wird in Richtung des Detektors beschleunigt. Zum Zeitpunkt t_2 wird das untere Teilchen ionisiert und wird um diese Zeitdifferenz später detektiert werden, da beide Teilchen dieselbe Beschleunigung erfahren. Dieser kann mit der *delayed extraction*-Methode^[18] (auch *time-lag focussing* genannt) abgeschwächt oder sogar komplett umgangen werden, da das Beschleunigungsfeld hier erst nach Abschluss der Ionenbildung angelegt wird. Während der Ionisierung herrscht im Ionisierungsbereich kein, oder nur ein sehr geringes, elektrisches Feld. Nach einer bestimmten Zeit (typischerweise im unteren ns-Bereich) wird das Beschleunigungsfeld angeschaltet, wobei sich die Ionen mit höherer Initialgeschwindigkeit zu diesem Zeitpunkt weiter in das Feld bewegt haben, und so eine geringere Beschleunigung in Richtung des Detektors erfahren als die langsameren Teilchen. Dadurch wird auch der unten näher beschriebene Ortsfehler verringert.

Die Ionen mit geringerer Startgeschwindigkeit holen die schnelleren dadurch an einem bestimmten Punkt der Flugstrecke ein; dieser Ort kann durch das angelegte Potential und die Verzögerungszeit eingestellt werden (man spricht hier von *space focussing*). Werden diese Parameter so gewählt, dass dieser Punkt auf der Detektoroberfläche liegt, so kann eine deutliche Verbesserung des Auflösungsvermögens auf bis zu 20.000 erzielt werden.^[19]

In einem bestimmten Massenbereich kann die Zeitunschärfe auch durch die *post source puls focussing*-Methode^[20-22] (PSPF) ausgeglichen werden. Hier werden die Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses nach der Ionenquelle durch ein zusätzliches Beschleunigungsfeld beschleunigt. Dieses Feld wird so geschaltet, dass die später gebildeten Ionen eine längere Strecke in diesem Feld durchqueren als die früher erzeugten. Dadurch werden die später erzeugten Ionen stärker beschleunigt und treffen zeitgleich mit den früher gebildeten auf den Detektor. Das PSPF verbessert für einen eingeschränkten Massenbereich das Auflösungsvermögen, allerdings wird durch das zusätzliche Feld die Flugzeit für Ionen höherer Masse verändert. Ionen mit niedrigerer Masse erfahren keine Kräfte durch das PSPF-Feld, da sie den entsprechenden Bereich schon durchquert haben bevor das Feld angeschaltet wird.

Ortsunschärfe Werden Ionen an unterschiedlichen Orten der Ionenquelle gebildet, so erfahren sie auch unterschiedlich starke Kräfte durch das Beschleunigungsfeld. Die Ionen, die weiter vom Detektor entfernt entstehen, haben zwar eine längere Flugstrecke, sie erfahren aber auch eine stärkere Beschleunigung. Durch die hohen in der MALDI

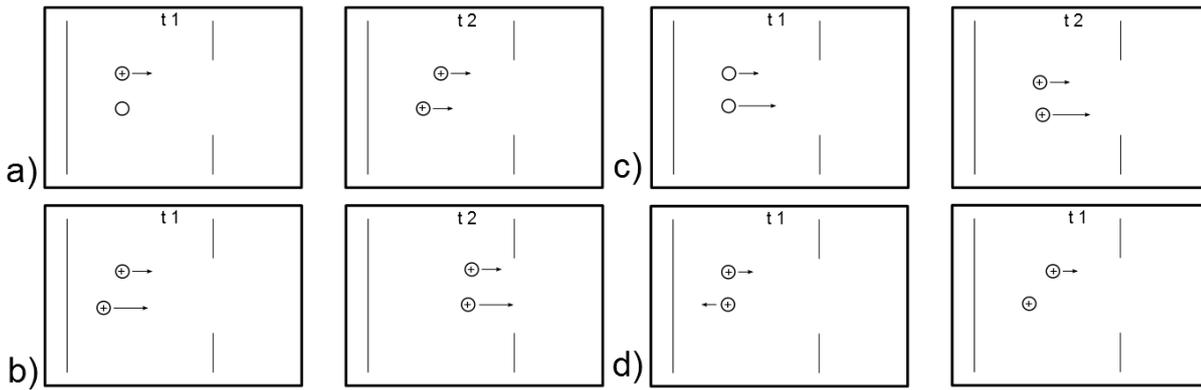


Abbildung 2.2.: Darstellung der Fehlerquellen bei der Ionenbildung.

verwendeten Beschleunigungsspannungen von einigen kV bei Beschleunigungsstrecken im cm-Bereich wirkt sich die höhere Beschleunigung stärker aus und die weiter entfernt gebildeten Ionen treffen früher auf den Detektor. (Vgl. b) in Abb. 2.2)

Um diesen Ortsfehler zu verringern wird meistens ein zweistufiges Beschleunigungsfeld verwendet (eine sog. Wiley-McLaren-Quelle^[23]). Die Ionen werden in der ersten Beschleunigungsstrecke gebildet, in der nur eine geringe Potentialdifferenz von einigen 100 V anliegt, in der zweiten Beschleunigungsstrecke erfolgt dann die Beschleunigung der Ionen mit der eigentlichen Beschleunigungsspannung. Dadurch ergibt sich für Ionen, die an verschiedenen Orten gebildet werden, nur ein geringer Unterschied in der kinetischen Energie, die sie durch das erste Beschleunigungsfeld erhalten. Durch geeignete Wahl der Beschleunigungsspannungen und der jeweiligen Beschleunigungsstrecken kann eine Ortsfokussierung in der Detektorebene erreicht werden, um das Auflösungsvermögen zu maximieren.

Geschwindigkeits- und Energieunschärfe Diese Unschärfen entstehen durch unterschiedliche Geschwindigkeiten, die die Moleküle zum Zeitpunkt der Ionisation besitzen (Geschwindigkeitsunschärfe), und unterschiedliche kinetische Energien, die die Ionen unabhängig von der Beschleunigungsspannung besitzen (Energieunschärfe). Moleküle gleicher Masse, die sich zum Zeitpunkt der Ionisation in Richtung des Detektors bewegen, aber unterschiedliche Geschwindigkeiten besitzen, werden nicht gleichzeitig auf den Detektor auftreffen, da der Unterschied der Initialgeschwindigkeit über die gesamte Driftstrecke erhalten bleibt und zu einem Auseinanderlaufen der entsprechenden Ionen führt. Außerdem können sich Moleküle mit gleicher Geschwindigkeit, aber in entgegengesetzte

Raumrichtungen bewegen. Ein Teilchen, das sich zum Zeitpunkt der Ionisation in Richtung des Detektors bewegt, wird diesen früher erreichen als ein Teilchen, das sich in die entgegengesetzte Richtung bewegt. Dieses Teilchen muss zunächst abgebremst und anschließend in die entgegengesetzte Richtung beschleunigt werden. Die Zeit, die dafür nötig ist, wird *turn-around time* genannt.

Diese beiden Effekte sind in Abb. 2.2 c) und d) dargestellt. Unter c) ist zu erkennen, dass eine unterschiedliche Geschwindigkeit in Richtung des Detektors beibehalten wird und so zu einer unterschiedlichen Flugzeit führt. Gleiche Geschwindigkeiten, aber entgegengesetzte Bewegungsrichtungen zum Zeitpunkt der Ionisation, führen zu dem in d) gezeigten Fall. Das obere Ion wird direkt in Richtung des Detektors beschleunigt, während die Bewegung des unteren Ions erst abgebremst werden muss, bevor die Beschleunigung erfolgen kann. Die Auswirkungen der Geschwindigkeitsunschärfe können durch eine hohe Beschleunigungsspannung gering gehalten werden, diese ist aber aufgrund technischer Gegebenheiten nicht unendlich zu erhöhen. Zudem führt eine erhöhte Beschleunigungsspannung auch zu einer Zunahme des oben angesprochenen Ortsfehlers.

Eine andere Variante ist die Verwendung eines Ionenreflektors. Die Ionen dringen hierbei nach einem Teil der Driftstecke in ein elektrisches Feld ein, das eine höhere Potentialdifferenz als das Beschleunigungsfeld aufweist. Wenn die Ionen in das Feld eindringen werden sie abgebremst, und danach in Richtung des Detektors beschleunigt. Die Eindringtiefe in das Reflektorfeld ist abhängig von der kinetischen Energie der Ionen und bei Teilchen gleicher Masse folglich von der Geschwindigkeit. Schnellere Ionen dringen tiefer in das Feld ein und benötigen von daher eine längere Zeit zur Durchquerung des Reflektors. Durch die geeignete Wahl der Reflektorspannung und -geometrie kann so erreicht werden, dass über den gesamten Massenbereich eine Auflösungsverbesserung erzielt wird, da schnelle und langsame Ionen eines m/z -Verhältnisses jeweils gleichzeitig auf den Detektor treffen.

Die Verwendung mehrerer Reflektoren macht es zudem möglich, sehr lange Flugstrecken von über 10 m (und somit ein sehr hohes Auflösungsvermögen) auf geringem Raum zu erreichen. Dies ist mit linearen Flugzeit-Massenspektrometern nicht zu erreichen, da es durch das mit der Länge des Flugrohres steigende Volumen nur sehr schwer möglich ist, ein ausreichendes Vakuum aufrecht zu erhalten. Ist der Druck im Flugrohr nicht niedrig genug, so unterschreitet die mittlere freie Weglänge der Ionen die Flugstrecke zum Detektor und es können nur sehr wenige Ionen nachgewiesen werden.

In einem sogenannten *multi-Re-TOF*^[24] durchlaufen die Ionen mehrere Zyklen zwischen zwei Reflektoren, bevor sie in Richtung des Detektors ausgekoppelt werden. Dadurch können theoretisch beliebig lange Flugstrecken erreicht werden. Hier gilt aber auch wieder die Beschränkung über die mittlere freie Weglänge, zudem werden die leichten Ionen nach einer bestimmten Flugzeit die schwersten Ionen überrunden, was zu Problemen in der Detektion führen kann.

Ein ähnlicher Ansatz ist das sogenannte *spiral-TOF*,^[25] in dem die Ionen durch eine Vielzahl an Reflektoren auf eine Spiralbahn gebracht werden. Dadurch entfällt auch das Ein- und Auskoppeln der Ionen in das *multi-Re-TOF*, es ist aber auch ein höheres Volumen nötig, um eine vergleichbare Flugstrecke zu erreichen. Beide Methoden machen es notwendig, die Ionenbewegung orthogonal zur Flugstrecke einzuschränken, da bei langen Flugstrecken eine geringe Initialgeschwindigkeit rechtwinklig zur Beschleunigung ausreichend ist, um das Auftreffen der Ionen auf den Detektor zu verhindern. Dies kann durch die wiederholte Fokussierung des Ionenpaketes mit Ionenoptiken erreicht werden.

Eine weitere Möglichkeit, einen Teil der obengenannten Probleme zu umgehen, ist die Verwendung von Flugzeit-Massenspektrometern mit orthogonaler Geometrie (allgemein als *o-TOF* bezeichnet). Dabei erfolgt die Beschleunigung der Ionen senkrecht zu ihrer Bewegungsrichtung. Die Ionisation der Probe kann direkt im Beschleunigungsfeld stattfinden oder aber entkoppelt vom TOF-System. Bei solchen Geräten findet die Ionisation dann in einer räumlich getrennten Ionenquelle, teilweise auch bei erhöhtem Quelledruck, statt und die erzeugten Ionen werden über Ionenferroptiken in das TOF eingebracht. Orthogonal zur Einlassrichtung werden die Ionen dann gepulst auf den Detektor beschleunigt. Der vergrößerte apparative Aufwand wird hier durch einige Vorteile aufgewogen: So kann einerseits ein höheres Auflösungsvermögen erreicht werden, da das eingelassene Ionenpaket räumlich gut begrenzt werden kann und die im Vorigen beschriebenen Unschärfen minimiert werden können. Zum anderen kann zwischen der Ionenquelle und dem TOF noch eine Massenseparation z.B. durch einen Quadrupol erfolgen (diese Kombination wird kurz als *Q-TOF* bezeichnet). Zwischen dem Quadrupol und dem TOF kann auch noch ein Fragmentierungsschritt in einer Stoßzelle erfolgen, was dem Gerät MS/MS-Kapazitäten wie bei einem FT-MS-Gerät verleiht, das niedrigere Auflösungsvermögen wird hierbei durch eine deutlich erhöhte Wiederholungsrate der Spektrenaufnahme ausgeglichen.

2.1.3. Ionisationsmethoden

Eine Unterteilung der verschiedenen Methoden zur Ionenerzeugung ist auf viele Arten möglich. Eine Möglichkeit ist die Unterscheidung anhand des Aggregatzustandes der Probe, da hierdurch große Unterschiede an die Anforderungen und den Aufbau der Ionenquelle entstehen.

Apparativ am einfachsten ist die Untersuchung von gasförmigen Proben; es können entsprechend auch Flüssigkeiten mit ausreichend großem Dampfdruck untersucht werden. Die Probe kann durch ein Ventil in das Vakuum eingeführt und dort ionisiert werden. Hier gibt es verschiedene Methoden, um dies zu erreichen: Bei der Elektronenionisation (EI) wird die Probe mit einem Elektronenstrahl (typischerweise mit 70 V beschleunigt) beschossen; die Elektronen können bei der Wechselwirkung mit der Probe dann genug Energie übertragen, dass die Analytmoleküle Elektronen abspalten und positiv geladene, sog. M^+ -Ionen gebildet werden.

Eng mit der EI verwandt ist die Chemische Ionisation (CI), bei der durch die Wechselwirkung mit den beschleunigten Elektronen ein Hilfsgas (z.B. Edelgase oder Kohlenwasserstoffe) ionisiert wird. Durch Ladungs- oder Protonenübertragungen wird die Probe dann vom Hilfsgas ionisiert. Die CI zeichnet sich gegenüber der EI dadurch aus, dass die Fragmentierung der Probe verringert wird und das es z.B. auch möglich ist, durch ein geeignetes Hilfsgas selektiv einzelne Verbindungsklassen zu ionisieren.

Bei der Feldionisation wird durch die Wechselwirkung mit einem starken, inhomogenen elektrischen Feld eine Kationisierung der gasförmigen Probe bewirkt. Die Ionisation durch Absorption von Photonen wird Photoionisation, bzw. bei Verwendung von Lasern Laserionisation genannt. Die in diesem Zusammenhang zu erwähnende REMPI-Methode ist im Abschnitt 2.1.4 näher beschrieben.

Flüssige Proben können durch Sprayverfahren ionisiert werden. Hier ist die *electrospray ionisation*^[26] zu einer Standardmethode geworden, da die Ionisation von großen Biomolekülen möglich und eine Kopplung zu HPLC-Geräten technisch einfach durchzuführen ist. Die Probenlösung wird hierbei durch eine Metallkapillare geleitet, an deren Spitze eine Spannung angelegt ist. Beim Austritt aus der Kapillare bilden sich feine, geladene Probe-Lösungsmitteltröpfchen, aus denen anschließend das Lösungsmittel verdampft, wodurch sich mehrfach geladene $[M + nH]^{n+}$ -Ionen bilden.

Feste (zum Teil auch flüssige) Proben werden im Allgemeinen auf einem Probenträger in die Ionenquelle gebracht, wo dann die Überführung in die Gasphase sowie die Ionisation stattfindet. Alternativ kann die Ionisation auch bei Atmosphärendruck durchgeführt werden, anschließend werden dort die Ionen dann wie gasförmige Proben in das Vakuumsystem eingebracht.

Bei der Felddesorption (FD) befindet sich die Probe auf einem Wolframdraht mit feinen Kohlenstoffnadeln; zwischen dem Draht und einer Gegenelektrode ist eine Spannung von einigen kV angelegt. An den Spitzen der Nadeln ist die Feldstärke so groß, dass eine Ionisation der Probe stattfindet; durch die dann unterschiedliche Ladung von Draht und erzeugtem Ion kommt es zur Desorption der Probe. Bei der *CF-Plasmadesorption* wird die (vorionisierte) Probe mit ^{252}Cf -Kernspaltstücken beschossen, wodurch Substanzen aus der Probe herausgeschlagen werden. Beim *fast atom bombardement* (FAB) wird die Probe in einer flüssigen Matrix (z.B. Glycerol) gelöst und mit einem Strahl schneller (Edelgas-)Atome beschossen. Hierbei werden entweder vorgebildete Ionen in die Gasphase gebracht, oder die Ionisation erfolgt durch Ionenpaarbildung in der Gasphase. Eng verwandt damit ist die *secondary ion mass spectrometry* (SIMS), bei der dünne Proben-schichten mit schnellen Ionen beschossen werden. In diese Kategorie gehört ebenfalls die MALDI-Technik, diese ist ausführlich in Abschnitt 2.2 beschrieben.

Große Ähnlichkeit mit der MALDI zeigen Verfahren wie die *surface-assisted laser desorption/ionization*^[27] (SALDI), bei der der Analyt mit Hilfe eines Lasers von einer Graphitoberfläche oder Kohlenstoffnanopartikeln ablatiert wird, oder *desorption/ionization on silicon*^[28] (DIOS), wo der Analyt auf poröses Silizium aufgetragen ist. Diese Methoden eignen sich gut für Analyten geringerer Masse, da hier die sonst störenden Matrixsignale im kleinen Massenbereich nicht auftreten. Größere Biomoleküle können durch eine schlechtere Kühlung des Analyten bei der Ablation nur selten intakt detektiert werden.

In den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen hat die Ionisation von Proben bei Atmosphärendruck. Es sind eine Vielzahl von Methoden entwickelt worden, die sich hauptsächlich mit der Analyse von festen Proben befassen. Die Vorteile der Ionisierung bei Umgebungsdruck liegen in der einfacheren Probenpräparation, was neben der reinen Zeitersparnis auch die Möglichkeiten zur Automatisierung erhöht.

Die genauen Mechanismen vieler Methoden sind nicht endgültig geklärt, es lässt sich aber eine Einteilung nach bestimmten Kriterien durchführen. Mehrere Methoden sind

der APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*) zuzuordnen. Die Primärionen für die Chemische Ionisation werden hierbei durch ein Plasma oder eine Koronaentladung erzeugt. Je nach Methode erfolgt die Desorption thermisch (DART^[29] [*direct analysis in real time*], ASAP^[30] [*ambient solids analysis probe*]) oder durch Impulsübertrag (DB-DI^[31] [*dielectric barrier discharge ionization*]). Erfolgt die Desorption und Ionisierung durch ein *electrospray*, so spricht man von DESI^[32] (*desorption electrospray ionization*), möglich ist auch die Ablation durch Laserbeschuss und Nachionisation durch einen ESI-Prozess (LAESI^[33] [*laser ablation electrospray ionization*], MALDESI^[34] [*matrix assisted laser desorption electrospray ionization*]). Desweiteren ist auch die Durchführung des MALDI-Prozesses bei Atmosphärendruck möglich (*atmospheric pressure-MALDI*). Verbreitung haben einige dieser Verfahren auch in der bildgebenden Massenspektrometrie (*mass spectrometry imaging* [MSI]) gefunden, da die Handhabung biologischer Proben bei Umgebungsdruck deutlich einfacher als im Vakuum ist.

2.1.4. Photonenionisation

Als Photonenionisation wird die Ionisation durch Absorption von Photonen bezeichnet. Durch die Energie des Photons wird ein Elektron aus dem Grundzustand in einen energetisch höher gelegenen Zustand angeregt. Hierbei wird zwischen mehreren Arten von Photonenionisation unterschieden (siehe Abb. 2.3). Für die PI werden meistens Laser eingesetzt, da diese viele Vorteile in diesem Bereich haben: Sie erzeugen eine sehr schmalbandige Strahlung, weisen eine hohe Kohärenz auf und haben eine hohe Leistungsdichte. Durch die Verwendung von gepulsten Lasersystemen kann die Leistungsdichte noch weiter erhöht werden.

Den einfachsten Fall stellt die Ein-Photonen-Ionisation (*single photon ionization* [SPI]) dar, die Energie des absorbierten Photons reicht in diesem Fall aus, um ein Elektron aus dem Molekül zu entfernen. Für organische Moleküle liegen die für direkte Photonenionisation nötigen Energien bei Wellenlängen von weniger als 200 nm, also im VUV-Bereich. In diesem Bereich werden die Photonen allerdings schon von der Luft absorbiert, so dass der Strahlengang in einem solchen Experiment komplett im Vakuum erfolgen muss. Dies hat einen deutlich aufwändigeren Versuchsaufbau zur Folge. Solche Wellenlängen im VUV können durch mehrmalige Frequenzvervielfachung z.B. aus Nd:YAG-Lasern erhalten werden. Die hierbei erhaltene Leistung ist allerdings gering, da bei der Frequenzvervielfachung ein großer Teil der eingesetzten Energie verloren geht. Eine andere

Möglichkeit stellen VUV-Lampen dar, z.B. Deuteriumentladungslampen oder die *electron beam excimer lightsource* (EBEL).

Die Ionisation ist auch durch die Absorption mehrerer Photonen geringerer Energie möglich, dies wird als Multiphotonenionisation (MPI) bezeichnet. Die Absorption der Photonen erfolgt nacheinander, im Fall einer Zwei-Photonen-Ionisation (siehe auch Abb. 2.3) erfolgt bei der MPI die Anregung des Valenzelektrons durch das erste Photon in einen virtuellen Zustand. Durch das zweite Photon erfolgt dann die Anregung in das Kontinuum. Der virtuelle Zustand, in den das Elektron angeregt wird, ist vom Strahlungsfeld des Lasers induziert und nicht real existent, daraus ergibt sich für den virtuellen Zustand eine sehr kurze Lebensdauer. Die beiden Photonen müssen also nahezu gleichzeitig absorbiert werden, es wird daher eine sehr hohe Leistungsdichte des Lasers benötigt. Die für die MPI benötigten Energien liegen üblicherweise im UV-Bereich, die experimentellen Anforderungen sind folglich niedriger als bei der Ein-Photonen-Ionisation.

REMPI

Im Gegensatz zur MPI wird bei der REMPI (*resonance enhanced multi photon ionization*)^[35,36] nicht in einen virtuellen Zustand, sondern einen real existenten Zwischenzustand angeregt. Dieser reale Zustand weist eine deutlich höhere Lebensdauer als der virtuelle Zustand auf, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Absorption eines weiteren Photons deutlich erhöht wird. Hieraus folgt, dass die Leistungsdichte, die zur Ionisation notwendig ist, deutlich herabgesetzt wird. Für die REMPI-Methode ergeben sich daher Anwendungen in der Analytik, so ist zum Beispiel die Bestimmung eines Stoffes in einer Mischung möglich, wenn eine nur für diese Verbindung resonante Wellenlänge verwendet wird. Der zu bestimmende Stoff kann mit deutlich niedrigerer Leistungsdichte ionisiert werden als die anderen Stoffe, die bei dieser Wellenlänge keine Resonanz aufweisen.

Wie in Abb. 2.3 gezeigt ist, gibt es mehrere Möglichkeiten, die Ionisationsenergie zu erreichen. Die einfachste Möglichkeit ist die Anregung in einen resonanten Zustand durch ein Photon und die Ionisation durch ein weiteres Photon derselben Wellenlänge. Dies wird als (1+1) oder auch 1c2p-REMPI (1 *color* 2 *photon*) abgekürzt. Es ist auch möglich, durch Verwendung von zwei Lasern unterschiedlicher Wellenlänge eine sogenannte Zwei-Farben-REMPI durchzuführen. Die Anregung in den resonanten Zustand erfolgt dann durch eine andere Wellenlänge als die Anregung aus dem resonanten Zustand ins Kontinuum; kurz als (1+1') oder 2c2p-REMPI bezeichnet. Liegt der resonante Zustand energetisch so niedrig, dass die Absorption eines zweiten Photons nicht ausreicht, um die

Ionisierungsenergie zu erreichen, so ist es auch möglich, ein drittes Photon zu absorbieren. Dies wird dann bei Verwendung einer Wellenlänge als (1+2) oder 1c3p-REMPI oder bei zwei verschiedenen Wellenlängen (1+2') oder 2c3p-REMPI bezeichnet.

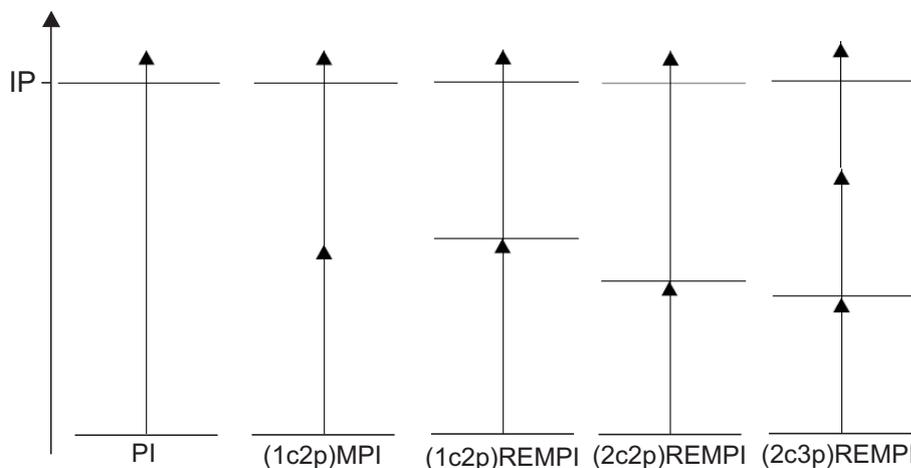


Abbildung 2.3.: Verschiedene Varianten des Photonenionisations-Prozesses.

Bei einem Wellenlängenscan der Ionisationswellenlänge bei festem Masse-zu-Ladungsverhältnis erhält man ein Frequenzspektrum des resonanten Zustandes. Man kann daraus Aussagen über den elektronischen Zustand und die Schwingungen und Rotationen des Zwischenzustandes machen. Aus dem Schwingungsspektrum ist eine Aussage über die innere Energie der Probe möglich, bei Zweifarbenexperimenten ist es auch möglich, die Ionisierungsenergie der Probe zu bestimmen. Eine Möglichkeit, um die spektrale Auflösung eines REMPI-Spektrums zu erhöhen, ist es, zwei Laser aus unterschiedlichen Richtungen einzustrahlen, dadurch findet eine Unterdrückung der Dopplerverbreiterung statt.

2.2. MALDI

Die *laser desorption/ionization* (LDI) von festen Proben wurde schon in den 1960ern eingeführt,^[37] konnte sich aber gegen die später entwickelten Verfahren FAB, FD und PD aufgrund eines geringeren möglichen Massenbereichs nicht durchsetzen. Durch die Verwendung von Lasern muss die Probe eine entscheidende Voraussetzung erfüllen: Um der LDI zugänglich zu sein, muss die Probe die Laserphotonen absorbieren, ansonsten ist eine Energieaufnahme nicht möglich. Allerdings darf die hohe Energiedichte der Laserstrahlung nicht dazu führen, dass die Probe beschädigt wird, z.B. durch Fragmentierung;

dies ist vor allem bei großen Molekülen ein häufig auftretendes Problem. Es konnte zwar gezeigt werden, dass es möglich ist, Biomoleküle mittels LDI ionisiert in die Gasphase zu überführen, die Hauptanwendungsbereiche der LDI liegen aber noch immer in der Analyse von anorganischen und kleinen organischen Verbindungen.

Anfang der 1980er wurden zwei Ansätze entwickelt, um die Energieaufnahme von nicht absorbierenden Proben durch Beimischung von absorbierenden Stoffen zu ermöglichen: Das Lösen der Probe in Glycerol unter Zugabe von ultrafeinem Cobaltpulver^[38] und die Kokristallisation der Probe mit einer absorbierenden organischen Matrix.^[1] Durch beide Verfahren konnten Massenspektren von Proteinproben mit Molekulargewichten von über 100.000 Da aufgenommen werden. Aufgrund der einfacheren Handhabung und der deutlich besseren Empfindlichkeit hat sich das Matrixverfahren durchgesetzt. Durch die Entwicklung geeigneterer Matrices für verschiedene Aufgabenstellungen und apparative Verbesserungen hat sich die MALDI (siehe auch Abb. 2.4) als ein Standardverfahren in der Massenspektrometrie von Proben hoher Molekulargewichte etabliert.

Es konnte allerdings noch kein zufriedenstellendes theoretisches Modell der Prozesse entwickelt werden, die bei der MALDI ablaufen. Es wurden für beide Teilschritte, die Desorption und die Ionisation, verschiedene Modelle vorgeschlagen, die aber jeweils nur bestimmte Aspekte des Gesamtprozesses erklären oder nur für bestimmte Probenarten gültig sind. Im Folgenden sollen diese Modelle vorgestellt werden.

2.2.1. Ionisation

Analytionen treten in der MALDI üblicherweise als protonierte Kationen auf, zudem entstehen Addukte mit Alkalimetallionen und Clusterionen. Da der Analyt die Laserphotonen in der Regel deutlich schlechter absorbiert als die Matrix, ist davon auszugehen, dass ein Protonentransfer von Matrixionen auf den Analyten stattfindet. Es muss demnach zwischen primärer und sekundärer Ionenbildung unterschieden werden. Primäre Ionenbildung ist die Erzeugung von Ionen aus Neutralen, sekundäre Ionenbildung bezeichnet die Übertragung von Ladungen (Elektronen, Protonen, Kationen oder Fragmentionen) von einem Ladungsträger auf neutrale Teilchen. Weiterhin ist es möglich, dass die Ionisierung schon in der Probenlösung stattfindet und Analytionen, die in den Matrixkristallen eingebettet sind, in ihrem ionischen Zustand ablatiert werden.

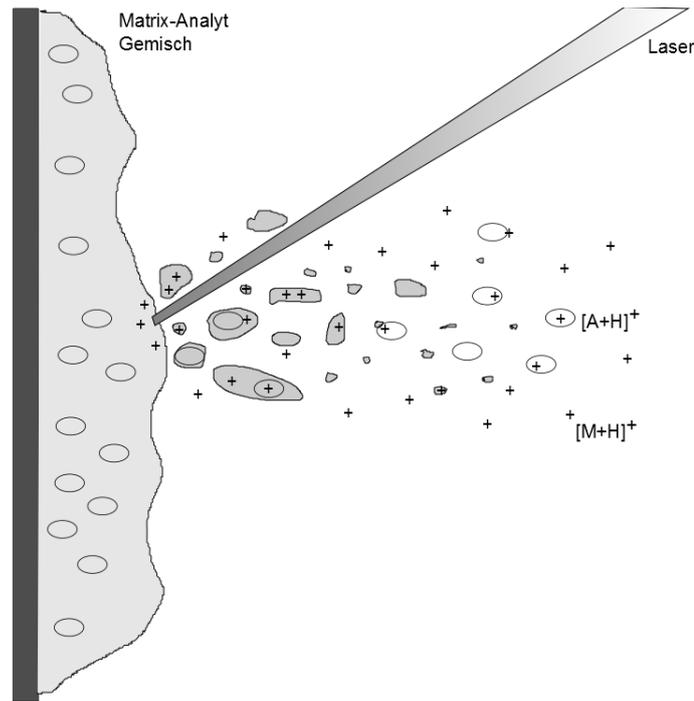


Abbildung 2.4.: Schematische Darstellung des MALDI-Prozesses.

Primäre Ionenbildung

Hierbei handelt es sich um die Bildung von Matrix- und Analytionen aus Neutralen; auslösend ist dabei die Einstrahlung von Laserlicht. Die Aufnahme von Energie durch die Laserphotonen ist durch die optische Absorption der Matrix bei der verwendeten Laserwellenlänge begrenzt. Entscheidend hierfür ist der Absorptionskoeffizient α . Dieser Koeffizient ist wellenlängenabhängig und ergibt sich aus dem molaren Absorptionskoeffizienten α_n , der eine Stoffkonstante der Matrix ist, und der Konzentration der Matrix in der Probe. Um eine ausreichend hohe Absorption bei den üblichen UV-Wellenlängen zu erreichen, ist ein aromatisches System als Chromophor in der Matrix notwendig.

Beim Eindringen in die Probe wird die Laserstrahlung von der Matrix teilweise absorbiert und dadurch abgeschwächt. Dieser Vorgang lässt sich durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreiben:

$$H = H_0 \times e^{-\alpha z}. \quad (2.6)$$

H gibt die *laser fluence* bei der Eindringtiefe z in der Probe an. H_0 ist dabei die *laser fluence* an der Probenoberfläche. Da die Matrix fast als reiner Feststoff vorliegt, erhält

man sehr hohe Werte für den Absorptionskoeffizienten α im Bereich von 5×10^4 bis $5 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$.^[39] Der Kehrwert des Absorptionskoeffizienten ist die sogenannte Eindringtiefe, diese liegt folglich bei 20 bis 200 nm. In dieser Tiefe ist die *laser fluence* auf ca. 30 % des Flusses an der Oberfläche abgesunken.

Entscheidend für den MALDI-Prozess ist auch die absorbierte Energie pro Volumen. Diese lässt sich über die Eindringtiefe und die *laser fluence* berechnen:

$$E_{abs}/V = \alpha \times H. \quad (2.7)$$

Durch die hohe Absorption sind folglich relativ geringe Werte der *laser fluence* notwendig. Typischerweise liegen diese bei Werten von einigen hundert Jm^{-2} in der Nähe der Absorptionsmaxima fester Matrices. Bei einer solchen, moderaten *laser fluence* ist eine direkte Photoionisation eines Matrixmoleküls durch die Absorption mehrerer Photonen nicht wahrscheinlich. Von daher ist anzunehmen, dass die Ionisation auch durch andere Prozesse zustande kommen wird. Zur Beschreibung des gesamten Vorganges der Ionenbildung wurden verschiedene Modelle entwickelt, die hier nun zusammenfassend dargestellt werden.

Multiphotonenionisation Ein einfaches Modell ist die Ionisation der Matrixmoleküle durch Absorption mehrerer Photonen. Die Ionisierungsenergien liegen bei den üblicherweise verwendeten Matrices allerdings oberhalb von 8 eV,^[40] diese Energie ist mit zwei Photonen der standardmäßig verwendeten Laser (Stickstofflaser bei 337 nm und verdreifachter Nd:YAG bei 355 nm) allerdings nicht erreichbar. Aufgrund der kurzen Lebensdauer der angeregten Zustände erscheinen Dreiphotonenprozesse als unwahrscheinlich. Hier muss aber erwähnt werden, dass die Bestimmung der Ionisierungsenergien in der Gasphase durchgeführt wird. In Kristallen^[41,42], und auch unter Analytbeimischung, wird die Ionisierungsenergie herabgesetzt, so dass ein Zweiphotonenprozess unter diesen Umständen nicht ausgeschlossen werden kann.

Energy-pooling Dieses Modell^[43] geht ebenfalls von mehrfacher Anregung durch Photonen aus, in diesem Fall wird allerdings nicht ein Molekül durch mehrere Photonen angeregt. Es findet stattdessen die Anregung von drei oder mehr benachbarten Molekülen mit jeweils einem Photon statt (siehe Gl. 2.8). Die Anregung eines Moleküls

kann auf ein anderes Molekül übertragen werden und wird auch als Quasiteilchen namens Exciton bezeichnet. Die Übertragung der Anregung von einem angeregten Teilchen auf ein Molekül im Grundzustand wird *exciton hopping* genannt. Treffen mehrere Excitonen zusammen, so bildet sich ein hochangeregtes Molekül, das anschließend ionisiert werden kann. Das Sammeln mehrerer Excitonen auf einem Molekül ist das sogenannte *energy pooling*.



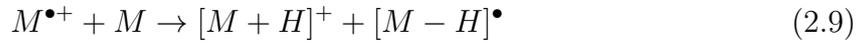
Das Auftreten von Poolingeffekten konnte durch die Zugabe von Excitonquenchern bestätigt werden^[44,45], ebenso konnte durch Experimente mit zwei zeitversetzten Laserpulsen unterhalb der *fluence threshold* gezeigt werden, dass ein Poolingprozess sehr wahrscheinlich grundlegend an der Ionisation der Matrix beteiligt ist.^[43]

Excited State Proton Transfer Die Protonenübertragung aus einem angeregten Zustand wird als *excited state proton transfer* (ESPT) bezeichnet und ist energetisch schon nach der Anregung eines Matrixmoleküls durch ein Photon möglich. Es handelt sich bei diesem Mechanismus um eine direkte Protonenübertragung, die die in der MALDI hauptsächlich detektierten protonierten Analytionen liefert. Gegen diesen Mechanismus sprechen allerdings die kurzen Lebensdauern der angeregten Zustände sowie die Tatsache, dass die gängigen Matrices keine ESPT-Aktivität in Lösung zeigen. Zudem ist die Übertragung von Protonen nur auf Analyten möglich, die eine höhere Protonenaffinität als die angeregte Matrix besitzen.^[46] Auch die Tatsache, dass die Matrix in den MALDI-Massenspektren hauptsächlich als protoniertes Kation detektiert wird, spricht gegen diesen Mechanismus als Hauptursache der Analytisation.

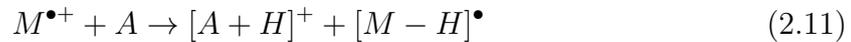
Sekundäre Ionenbildung

Die gebildeten Ionen werden neben der Beschleunigung durch die Desorption auch durch das anliegende elektrische Feld beschleunigt. Im sich entwickelnden Desorptionsplume ist die Teilchendichte trotzdem noch so hoch, dass es zu einer Vielzahl an Stößen kommt,^[47] bei denen eine Ladungsübertragung von den Matrixionen auf den Analyten möglich ist.

Gasphasenprotonierung Bei Stößen zwischen Matrixneutralen und Radikalkationen kann es zu einer Protonenübertragung wie in Gl. 2.9 gezeigt kommen. Das protonierte Matrixkation kann dann wie in Gl. 2.10 ein Proton auf ein Analytmolekül übertragen.



Es kann auch eine direkte Protonenübertragung auf den Analyten stattfinden:



Es wurden deutliche Hinweise^[48–50] dafür gefunden, dass dieser Prozess unter bestimmten Bedingungen der dominierende Prozess ist.

Ratenkonstanten-Modell Zu Erwähnen sind hier noch die Arbeiten von Knochenmuss,^[48] der ein Ratenkonstanten-Modell aufgestellt hat, das ausgehend von *energy pooling* und sekundärer Ionisation des Analyten in der Gasphase viele experimentell gefundene Effekte vorhersagt. Allerdings ist dieses Modell bislang nur für 2,5-DHB verwendet worden, da nur für diese Matrix alle relevanten Stoffeigenschaften bekannt sind.^[51] Dieses Ratenkonstanten-Modell wurde mit Molekül-Dynamik-Simulationen (siehe Abschnitt 2.2.2) kombiniert,^[52] wobei die Raten des Modells aus technischen Gründen in Wahrscheinlichkeiten überführt werden mussten. Dieses kombinierte Modell zeigt alle wichtigen Charakteristika des MALDI-Prozesses, wobei die Simulationen aus Gründen der Rechenleistung auf kurze Zeiträume und kleine Volumina beschränkt sind.

Clusterionisation Das Modell der Clusterionisation^[41] geht davon aus, dass sich bei der Ablation Cluster aus Matrix- und Analytmolekülen bilden. Die Ionisierungsenergie wird in diesen Clustern herabgesetzt, so dass die Ionisation des Clusters mit zwei Laserphotonen möglich wird. Nach dem Verdampfen der neutralen Moleküle aus dem Cluster wird das Ion erhalten. Das Auftreten und die Ionisation von Matrixclustern wurde von Meffert *et al.*^[53] genauer untersucht. Ein anderes Modell, welches von dem Auftreten von

Clustern im Ablationsvorgang ausgeht, beruht darauf, dass sich in der Probenlösung abhängig vom pH-Wert Analytionen bilden, die dann geladen in die Matrixkristalle eingebettet werden. Diese Ionen werden als Cluster mit Matrixneutralen desorbiert und dann durch die eingestrahlte Laserenergie von ihren Gegenionen getrennt.^[54]

lucky survivor-Modell Das *lucky survivor*-Modell beruht auf den oben erwähnten Annahmen der Clusterionisation. Ein oder mehrere Analytmoleküle werden in einem Cluster mit Matrixmolekülen ablatiert. In diesem Cluster sind Matrix- und Analyt-Kationen enthalten. Zusätzlich enthält der Cluster auch Gegenionen; diese Ladungstrennung kann schon im festen Zustand in der Probe vorgelegen haben, oder sie ist durch die Laserenergie hervorgerufen worden. Wenn dieser Cluster nun eine gleiche Anzahl an Kationen und den entsprechenden Gegenionen aufweist, wird die Clusterdissoziation in der Gasphase zu neutralen Molekülen oder Addukten führen. Hat der Cluster allerdings eine Ladung, so wird diese auch bei der Dissoziation des Clusters erhalten bleiben und zu (Analyt-)Ionen führen, solange keine Neutralisierung durch Photoelektronen auftritt. Die protonierten Analytkationen sind somit die *lucky survivor* des Clusterzerfalls.

Untersuchungen von Jaskolla und Karas^[50] mit deuterierten und veresterten Matrices haben gezeigt, dass das *lucky survivor*-Modell bei bestimmten Bedingungen (erniedrigter pH-Wert, damit eine Einbettung von protonierten Analyten in den Matrixkristall möglich ist und moderate Laserleistungen, um Gasphasenreaktionen zu vermeiden) der vorherrschende Ionisationsmechanismus ist. Eine basische Umgebung führt zu neutralen oder deprotonierten Analytmolekülen, die hier detektierten Kationen wurden hauptsächlich durch Gasphasenprotonierung erzeugt. Eine höhere Laserleistung führt ebenso zu einem Anstieg der Protonierung in der Gasphase.

2.2.2. Desorption

Zunächst soll hier auf den Begriff der Desorption eingegangen werden. Die Desorption bezeichnet eigentlich das Gegenteil der Adsorption, also, dass ein Teilchen (Atom, Molekül oder Ion) die Oberfläche eines Festkörpers verlässt und in die Gasphase übergeht. Dazu muss das Teilchen genug Energie besitzen, um die Bindungsenergie zur Oberfläche zu überwinden. In den Anfängen der MALDI wurde davon ausgegangen, dass tatsächlich der Übertritt einzelner Teilchen in die Gasphase stattfindet. Wie aus den im Folgenden dargestellten Modellen deutlich wird, gehen die aktuell angenommenen

Theorien davon aus, dass größere Mengen an Teilchen (z.B. Cluster aus mehreren Molekülen und auch ganze Oberflächenbruchstücke, so genannte *chunks*) gleichzeitig in die Gasphase übertreten. Dieses wird als Ablation bezeichnet; Ablation bezeichnet hier den Probenabtrag ausgelöst durch einen Temperatur- oder Druckanstieg. Da der Begriff der Desorption aber schon durch die Bezeichnung MALDI mit der Methode eng verbunden ist, wird im Allgemeinen nicht zwischen den beiden Begriffen Desorption und Ablation unterschieden, in dieser Arbeit sind sie synonym gebraucht.

Es konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass beide Prozesse, die Ablation sowie die Desorption bei der Laserbestrahlung auftreten. Bei niedrigen Laserleistungen tritt Desorption^[55] auf, der Probenabtrag ist hierbei jedoch so gering, dass keine Ionen detektiert werden können. Bei der Erhöhung der Laserleistung wird die *fluence threshold* erreicht, ab diesem Punkt ist ein MALDI-Signal messbar. An diesem Punkt setzt auch die Ablation ein. Es konnte auch in Molekül-Dynamik Simulationen^[56,57] gezeigt werden, dass eine bestimmte Schwellenleistung überschritten werden muss, damit größere Bruchstücke aus der Probe herausgelöst werden können.

Eine wichtige Größe für den Ablationsprozess ist die von der Probe aufgenommene Energie. Diese hängt von mehreren Parametern ab. Entscheidend für die Energieaufnahme ist zunächst, wie stark die Matrix bei der Wellenlänge des verwendeten Lasers absorbiert. Ein kleiner Absorptionskoeffizient ist hierfür logischerweise hinderlich, die gängigen Matrices besitzen aber alle einen aromatischen Kern, wodurch eine Absorption in den verwendeten UV-Wellenlängen gegeben ist. (In der IR-MALDI werden hauptsächlich OH- und NH-Schwingungen angeregt, dabei werden Matrices wie Glycerol oder Bernsteinsäure verwendet.) Als wichtige Parameter haben sich auch die *laser fluence* (vgl. *fluence threshold*), die Größe des Laserspots und die Pulslänge erwiesen. Wie schon erwähnt, setzt die Ablation erst bei einer bestimmten Schwellenleistung ein. Eine weitere Erhöhung der Laserleistung zeigt dann zunächst eine weitere Steigerung der Signalintensitäten. Bei zu hohen Energien treten dann verstärkt Fragmentierungen von Matrix und Analyt auf, wodurch die Signalintensität und -qualität stark abnehmen.

Für die Desorption wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen, diese lassen sich grob in drei Gruppen einteilen: Die phänomenologischen Modelle, von denen hier nur das Vulkanmodell erwähnt werden soll. Dieses geht von einem Aufheizen und Ausdehnen der Probe unterhalb der Oberfläche und einem anschließendem "Ausbruch" nach Zerschlagen der Oberfläche aus. Die bei Laserbeschuss entstehenden Krater konnten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen nachgewiesen werden, können aber auch durch diverse

andere Mechanismen erklärt werden. Die beiden anderen Gruppen sind die thermischen und die mechanischen Modelle, diese werden im Folgenden ausführlicher beschrieben.

thermische Desorptionsmodelle

Diese Modelle^[58,59] basieren auf einem Phasenübergang, der dafür sorgt, dass Teile der Probe in die Gasphase übertreten können. Dies geschieht entweder durch direkte Sublimation oder durch Schmelzen der Probe und anschließendes Verdampfen ins Vakuum. Die experimentell beobachtete Schwellenleistung lässt sich in diesen Modellen durch die Sublimations- bzw. Verdampfungsenthalpie erklären, die überschritten werden muss, um einen Teil der Probe in die Gasphase zu überführen.

Überschallstrahl (Supersonic Jet) Das Überschallstrahl-Modell^[60,61] beruht auch auf einem schnellen Phasenübergang der Matrix vom Festkörper zur Flüssigkeit durch die Laseranregung. Die Flüssigkeit expandiert adiabatisch ins Vakuum, wodurch ein Überschallstrahl ausgebildet wird, der auch Analytmoleküle enthält. Es konnte gezeigt werden, dass sich dabei eine stark asymmetrische (vorwärts gerichtete) Bewegung ausbildet. Eine Kühlung des Analyten ist hier durch die Expansion ins Vakuum gegeben.

homogeneous bottleneck-Modell In diesem Modell wird ein starker Temperaturanstieg innerhalb des bestrahlten Bereiches der Probe angenommen,^[58] wodurch ein thermisch induzierter Stress im Festkörper entsteht, der zu einem Zerreißen der Kristallstruktur der Matrix führt. Der Analyt ist in diesem Modell in das Kristallgitter der Matrix eingebettet. Die Laserenergie führt zur Sublimation der Probe, hierbei entstehen Cluster aus Matrix- und Analytmolekülen. Aus diesen Clustern verdampfen dann die Matrixmoleküle, was zu einer Kühlung des Analyten führt. Der *bottleneck* ist in diesem Fall die Energieübertragung von der absorbierenden Matrix auf den nicht absorbierenden Analyten, dadurch wurde eine Entkopplung der Temperatur von Matrix und Analyt postuliert. Diese Entkopplung führt dazu, dass die Temperatur des Analyten geringer als die der Matrix ist; dies erklärt die geringe Fragmentierung des Analyten.

mechanische Desorptionsmodelle

Hier führt die absorbierte Energie, und die daraus folgende Ausdehnung der Matrix am Laserspot, zu einer Störung des Kristallgitters. Dadurch wird ein Druck im Festkörper

aufgebaut, der zu einem explosionsartigen Probenabtrag führt. Eine Entkopplung der thermischen Energie von Matrix und Analyt ist hier nicht notwendig, da sich die Vorgänge fernab des thermischen Gleichgewichtes abspielen, die Temperaturen von Matrix und Analyt sind also als unabhängig voneinander anzusehen.

Pressure Pulse Durch die schnelle Erwärmung, und die daraus resultierenden Ausdehnung der Probe durch den Laserpuls, kommt es in der Probe zu einem Druckpuls, der sich in einen Zugspannungspuls und einen Kompressionspuls aufteilen lässt. Der Zugspannungspuls führt zu einem Ablösen von Teilen der Probenoberfläche, wenn er die Zerreißfestigkeit der Probe überschreitet. Durch beide Pulse kommt es innerhalb der Probe zu einer mechanischen Belastung, was zu Rissen in der Probe führen kann (*spallation* genannt).

MD-Simulationen Einen Einblick in die molekulare Ebene des Ablationsvorganges kann durch MD-Simulationen gewonnen werden. Da die Ablation ein kolligatives Phänomen darstellt, welches nur durch die Betrachtung einer Vielzahl von Molekülen vernünftig untersucht werden kann, müssen eine Reihe von Vereinfachungen gemacht werden, um in den Dimensionen der heutigen Berechnungsmöglichkeiten zu bleiben: Alle simulierten Moleküle werden jeweils durch ein sphärisches Teilchen mit einem angenäherten Moleküldurchmesser dargestellt. Zudem werden alle internen Freiheitsgrade eines Moleküls zusammengefasst in eine einzelne Mode, die bei Anregung den Moleküldurchmesser erhöht, die sogenannte *breathing mode*.^[62] Damit werden die Verlängerung von Bindungen im angeregten Zustand und der erhöhte durchschnittliche Platzbedarf der Moleküle durch stärkere Schwingungsanregung berücksichtigt. Diese Näherungen führen zu dem Namen *breathing sphere*-Modell und werden damit begründet, dass der entscheidende Parameter bezüglich der Ablation der Druck innerhalb der Probe ist, der durch die Ausdehnung der Moleküle entsteht. Jedes Teilchen besitzt zudem drei Translationsfreiheitsgrade.

Die Anregung der Teilchen erfolgt durch die Simulation eines Laserpulses, der entsprechend der Absorptionskoeffizienten von Matrix- und Analytmolekülen beim Eindringen in die Probe durch Absorption abgeschwächt wird.^[63] Angeregte Moleküle vergrößern sich, wie oben beschrieben, über ihre *breathing mode* und durch die Anregung mehrerer benachbarter Teilchen entstehen Regionen mit erhöhtem Druck innerhalb der Probe. In der Oberflächenregion entsteht dadurch ein Druckgradient, die daraus resultierenden Kräfte beschleunigen die oberen Materialsichten orthogonal zur Oberfläche. Die

Schwellenleistung lässt sich in diesem Modell dadurch erklären, dass genug Energie aufgebracht werden muss, um die Phasenexplosion auszulösen, ansonsten kommt es nur zur Verdampfung einzelner Oberflächenmoleküle.^[64] Es handelt es sich oberhalb der Schwellenleistung bei einem großen Teil des ablatierten Materials im *plume* um Cluster,^[57] dieses konnte auch experimentell nachgewiesen werden.^[65] Wie in Abschnitt 2.2.1 erwähnt, wurde eine veränderte Version des Ratenkonstanten-Modells in diese Simulationen integriert, um Ablation und Ionisation gleichzeitig betrachten zu können.^[52] Das *exciton hopping* und das *energy pooling* werden berücksichtigt, indem ein Stoß zwischen einem angeregten Matrix-Teilchen und einem Matrix-Teilchen im Grundzustand mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zu einer Übertragung der Anregung führt. Stöße zwischen angeregten Matrix-Teilchen können dann zur Bildung von Matrix-Ionen führen, die wiederum bei einem Stoß mit einem Analyt-Molekül ihre Ladung übertragen können.^[66] Die Simulationen beschränken sich hierbei aus Rechenleistungsgründen auf Probengrößen im unteren μm -Bereich bei Simulationszeiten von einigen ns.

Fazit Die Desorption/Ablation ist ein entscheidender Vorgang im MALDI-Prozess, für den bis heute noch keine ausreichenden Beschreibungen existieren. Durch die Vielzahl an Präparationsvorschriften und die Verträglichkeit des Desorptions/Ionisations-Prozesses gegenüber Änderungen von Parametern wie *laser fluence*, Wellenlänge oder Analytkonzentrationen erscheint es unrealistisch, dass ein Modell existiert, das alle Aspekte des Ablationsvorganges beschreibt. Vielmehr ist anzunehmen, dass verschiedene Mechanismen gibt, die zur Ablation und Ionisation führen, die auch nebeneinander stattfinden können.

Trotzdem ist es wichtig, die bei der Ablation stattfindenden Prozesse genauer zu verstehen, da die Kenntnis der auftretenden Effekte die Grundlage zur Weiterentwicklung der MALDI darstellen.

Desorptionsgeschwindigkeiten

Eine wichtige Größe um den Desorptions-/Ablationsprozess zu charakterisieren, ist die Geschwindigkeit des in die Gasphase überführten Materials. Einfach zugänglich ist hier die Geschwindigkeit der direkt gebildeten Ionen (siehe unten), diese sind aber nur ein kleiner Teil des ablatierten Materials. Das Verhältnis von Ionen zu Neutralen liegt zwischen 1:1.000 und 1:100.000.^[67,68] Um Aussagen über die Geschwindigkeiten der ablatierten Teilchen machen zu können, ist es notwendig, auch die Geschwindigkeiten der

Neutralteilchen zu kennen. Eine weitere interessante Größe, die auf der Verteilung der Geschwindigkeiten beruht, ist die Translationstemperatur der ablatierten Teilchen. Vor allem ein Vergleich der Temperaturen von Matrix und Analyt ist interessant, da die Tatsache, dass große Biomoleküle im Gegensatz zur LDI zerstörungsfrei ionisiert werden können, dafür spricht, dass die Matrix einen kühlenden Effekt auf den Analyten hat.

Ionengeschwindigkeiten Zur Bestimmung der Ionengeschwindigkeiten haben sich zwei Verfahren etabliert: Die *delayed extraction*-Methode (DE) und die *field free drift*-Methode (FFD). Bei der DE-Methode^[69] liegt in der Ionenquelle nicht wie üblich eine kontinuierliche Spannung an; die Beschleunigungsspannung wird erst zeitverzögert nach dem Ablationsspuls eingeschaltet, so dass sich der *plume* in einen feldfreien Raum entwickeln kann.

Werden Delayzeit und Beschleunigungsspannung so eingestellt, dass der Ortsfokus auf dem Detektor liegt, erreichen alle Ionen der gleichen Masse unabhängig von ihrer Initialgeschwindigkeit den Detektor gleichzeitig. Man spricht dann von einer Korrektur des Ortsfehlers. Durch die DE-Methode kann auch der Zeitfehler korrigiert werden. Das bedeutet, dass Ionen gleicher Masse, die zu unterschiedlichen Zeiten gebildet werden, durch die verzögerte Extraktion zum selben Zeitpunkt beschleunigt werden. Bei einer kontinuierlichen Extraktion ist dies nicht der Fall. Im Fall der MALDI, wo die Ionenbildung in der sich ausbildenden Ablationswolke stattfindet, sind solche Zeitfehler im Bereich einiger Nanosekunden anzunehmen. Durch den Zerfall von ablatierten Clustern kann dieser Fehler aber auch noch größer ausfallen. Aus der Flugzeit der Ionen und dem verwendeten Delay kann über mathematische Näherungen die Startgeschwindigkeit errechnet werden; aus der Peakbreite kann auch auf eine Geschwindigkeitsverteilung der Ionen geschlossen werden.

In der FFD-Methode befindet sich der Probenträger in einem feldfreien Raum, an den sich die Beschleunigungszone anschließt. Die gebildeten Ionen driften nach der Ablation mit ihren Initialgeschwindigkeiten durch den feldfreien Raum, bevor sie die Beschleunigungszone erreichen und von der dort anliegenden Spannung beschleunigt werden. Die Startgeschwindigkeiten können bei dieser Methode auf mehrere Arten bestimmt werden: Einerseits komplett durch die Driftzeit in der feldfreien Zone,^[70] andererseits aus dem Vergleich der Flugzeiten mit und ohne feldfreier Driftzone.^[61] Ein anderer Ansatz, der auch auf der Expansion in einen feldfreien Raum beruht, ist die orthogonale Abzugstechnik. Hierbei expandiert der *plume* wiederum in einen feldfreien Raum, nach einer

bestimmten Zeit wird dann ein Beschleunigungsfeld angelegt, das die Ionen orthogonal zur Expansionsrichtung beschleunigt. Mit einem ortsempfindlichen Detektor können die Driftstrecken der Ionen dann bestimmt werden.^[60,71]

Die mit diesen Methoden erhaltenen Werte für die Startgeschwindigkeiten liegen zwischen 200 m/s und über 1000 m/s, wobei die niedrigen Werte mit der DE-Methode erhalten wurden und nach Berkenkamp *et al.*^[72] auf nicht optimale Versuchsparameter zurückzuführen sind.

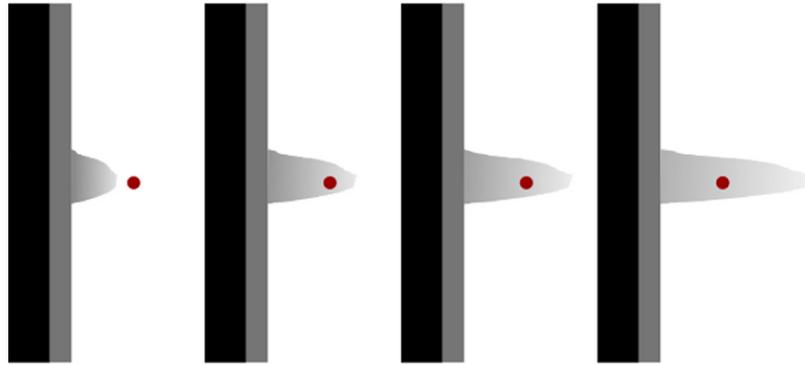


Abbildung 2.5.: Das Grundprinzip der Postionisationsmethode. Die einzelnen Bilder zeigen die Lage des Postionisationsortes innerhalb des *plume* bei ansteigendem Zeitabstand zwischen den Laserpulsen.

Geschwindigkeiten von Neutralen Die Geschwindigkeit der Neutralteilchen ist im Gegensatz zu den Ionen nicht direkt zugänglich, da in der Massenspektrometrie nur Ionen detektiert werden können. Hier wird die Postionisationsmethode verwendet, bei der die Neutralteilchen im *plume* von einem zweiten Laserpuls, der orthogonal zur Probenoberfläche durch die Ionenquelle läuft, nachionisiert werden (zum Aufbau siehe Abschnitt 3.2.1). Der Postionisationspuls wird hierbei mit variablen Zeitabständen nach dem Ablationspuls generiert. Aus diesem Delay und dem räumlichen Abstand des Postionisationsstrahls zur Probenoberfläche kann dann die Geschwindigkeit der Neutralen berechnet werden, die bei dem eingestellten Delay diese Strecke zurückgelegt haben. Mit dieser Methode können auch Geschwindigkeitsverteilungen erhalten werden, wofür sich zwei Möglichkeiten anbieten: Zum einen die Veränderung des Delays der beiden Laserpulse zueinander bei einem festen Abstand des Postionisationsortes zum Ablationsort, zum anderen das Verschieben des Postionisationslasers bei festem Delay. Es hat sich gezeigt, dass die erste Methode deutlich geeigneter ist, da die Einstellung der erforderlichen Delays im sub- μ s-Bereich technisch kein Problem darstellt. Die Veränderung

des Abstandes ist deutlich schwieriger, da die benötigten Abstände im sub-mm-Bereich liegen, wodurch eine Bestimmung des Positionsortes in der Ionenquelle nicht ohne weiteres mit der erforderlichen Genauigkeit möglich ist. Abb. 2.5 zeigt das Prinzip der Positionierung zur Messung einer Geschwindigkeitsverteilung. Bei den aufsteigenden Zeitabständen zwischen den Laserpulsen werden jeweils Neutralteilchen mit abnehmender Ablationsgeschwindigkeit ionisiert.

Geschwindigkeitsverteilungen Die Geschwindigkeitsverteilung der im MALDI-Prozess ablatierten Teilchen ist eine entscheidende Größe zur Beschreibung des Ablationsvorganges. Wichtig ist hier die Unterscheidung der verschiedenen möglichen Prozesse, einerseits das Ablösen einzelner Teilchen von der Oberfläche, andererseits der simultane Abtrag von Molekülen und Clustern im *plume*.

Die Verteilung der Geschwindigkeiten bei einem rein thermischen Desorptionsvorgang einzelner Moleküle lässt sich durch eine Maxwell-Boltzmann-Verteilung beschreiben:

$$dN(\vec{v}, T) = N \times \left(\frac{m}{2\pi k_B T} \right)^{\frac{3}{2}} \times e^{\left(-\frac{m}{2k_B T} (v_x^2 + v_y^2 + v_z^2) \right)} d^3v \quad (2.12)$$

mit v_i : Geschwindigkeit in i-Richtung; m : Masse; k_B : Boltzmann-Konstante; T : Temperatur; N : Teilchenzahl

Die Geschwindigkeiten im Ablations*plume* sind am besten mit einer verschobenen Maxwell-Boltzmann-Verteilung zu beschreiben. Durch die hohe Teilchendichte und die häufigen Stöße kommt es zu einer vorwärtsgerichteten, *jet*-ähnlichen Expansion ins Vakuum. Die Winkelabhängigkeit der Expansion wurde von Elam *et al.*^[60] für die Ablation des Dipeptides Trp-Gly zu $q = \cos^{41} \Theta$ bestimmt. Θ ist hierbei der Winkel zur Hauptflugrichtung, die orthogonal zur Probenträgeroberfläche steht. Durch die Ablation entsteht in z-Richtung eine Strömungsgeschwindigkeit v_{flow} . Um diesen weicht die Geschwindigkeit in die Strömungsrichtung von der aus Gl. 2.12 erhaltenen ab. Die mathematische Formulierung für eine verschobene Geschwindigkeitsverteilung ergibt sich also zu:

$$dN(\vec{v}, T) = N \times \left(\frac{m}{2\pi k_B T} \right)^{\frac{3}{2}} \times e^{\left(-\frac{m}{2k_B T} (v_x^2 + v_y^2 + (v_z - v_{flow})^2) \right)} d^3v. \quad (2.13)$$

Durch den gewählten Messaufbau ist nur die Messung der Geschwindigkeit in z-Richtung möglich, da die Bewegung parallel zur Probenträgeroberfläche nicht detektiert wird. Die Geschwindigkeit in z-Richtung wird durch Gl. 2.14 beschrieben.

$$dN(\vec{v}, T) = N \times \left(\frac{m}{2\pi k_B T} \right)^{\frac{3}{2}} \times e^{\left(-\frac{m}{2k_B T} (v_z - v_{flow})^2 \right)} dv \quad (2.14)$$

Aus der Breite der Geschwindigkeitsverteilung kann die Translationstemperatur der Neutralteilchen erhalten werden², welche ein Maß für die Energie der Teilchen ist. Eine absolute Messung der Teilchenenergie ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich, da diese zusätzlich zur Translationsenergie auch die Rotations- und Vibrationsenergie enthält; diese sind mit dieser Methode aber nicht zugänglich.

vorherige Arbeiten Die ersten Geschwindigkeitsverteilungen von ablatierten Neutralteilchen wurden Anfang der 90er Jahre aufgenommen, Huth-Fehre und Becker^[73] haben so z.B. Geschwindigkeitsverteilungen von Gramicidin S als Analyt und Ferulasäure als Matrix aufgenommen. Bei einer Ablationswellenlänge von 266 nm erhielten sie für beide Moleküle eine mittlere Initialgeschwindigkeit von ~ 350 m/s, bei einer Halbwertsbreite von ~ 500 m/s, wobei für die Matrix Geschwindigkeiten von bis zu 1500 m/s gemessen wurden. Karas *et al.*^[74] haben die mittlere Geschwindigkeit von 2,5-DHB bei 248 nm auf 550 m/s bestimmt.

Zechmann^[75] und Muskat^[76] haben Experimente mit verschiedenen Matrices bei einer Ablationswellenlänge von 355 nm durchgeführt und fanden für 2,5-DHB eine häufigste Geschwindigkeit von 383 m/s, für Ferulasäure 279 m/s, für Sinapinsäure 140 m/s und für Dithranol 467 m/s. Hierbei wurden reine Matrixproben verwendet. Es wurden zusätzlich auch Messungen bei 337 nm durchgeführt, diese zeigten bei FA und SA einen starken Anstieg der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit, für 2,5-DHB wurde so gut wie keine Änderung beobachtet. Messungen mit Chrysen als Modellanalyt ergaben Analytgeschwindigkeiten von 294 m/s aus 2,5-DHB und 388 m/s aus Dithranol.

Messungen bei 266 nm wurden von Walbrodt^[15] durchgeführt, dabei wurden für 2,5-DHB, FA und SA häufigste Geschwindigkeiten zwischen 400 und 500 m/s gefunden, für α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure wurde eine Geschwindigkeit von 737 m/s gefunden. Ebenfalls für Chrysen als Analyt wurden Analytgeschwindigkeiten gefunden, die unter den

²Streng genommen wird nur die Translationstemperatur in z-Richtung erhalten.

Matrixgeschwindigkeiten lagen, der Trend blieb aber gleich; 2,5-DHB zeigt die niedrigste Geschwindigkeit, α -CHCA deutlich die höchste. Außerdem wurden Geschwindigkeitsverteilungen von Chrysen aus verschiedenen Dual-Matrices (Mischungen aus zwei Matrices, siehe auch Abschnitt 2.2.3) aufgenommen, hier wurden für den Analyten Geschwindigkeiten gefunden, die unter der Analytgeschwindigkeit der schnelleren Matrix, aber über der Geschwindigkeit der langsameren Matrix liegen; die niedrigere Analytgeschwindigkeit stellt hier eine untere Grenze dar.

2.2.3. Die Matrix

Die Matrix erfüllt in der MALDI mehrere Aufgaben. Aus dem Namen der Methode wird schon ersichtlich, dass die Matrix wichtig für die Desorption/Ablation und die Ionisation des Analyten ist. Daher muss sie auch eine bestimmte Vorraussetzung erfüllen: Wichtig ist die Absorption von Licht bei der verwendeten Laserwellenlänge. In der UV-MALDI werden daher Matrices verwendet, die einen aromatischen Kern besitzen. In der IR-MALDI verwendet man Matrices wie z.B. Glycerol, Malonsäure oder Bernsteinsäure, da diese Hydroxygruppen besitzen, die die verwendeten Wellenlängen gut absorbieren können. Des weiteren sorgt die Matrix, da sie im Überschuss eingesetzt wird, für eine räumliche Trennung der Analytmoleküle.

Die heutzutage gängigen UV-Matrices, z.B. 2,5-Dihydroxybenzoesäure, α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure, Sinapinsäure oder Ferulasäure weisen alle Ähnlichkeiten untereinander auf. Sie enthalten alle einen Benzolring, sowie eine Carboxyl- und mindestens eine Hydroxygruppe. Es existieren aber auch Matrices, die nicht diesem Muster entsprechen, wie etwa Dithranol oder 2,4,6-Trihydroxyacetophenon. Es wurden zudem komplett anders aufgebaute Matrices untersucht, z.B. Fullerene oder Porphyrine; diese haben allerdings bislang keine praktische Bedeutung erlangt.

Die heutigen Standardmatrices wurden alle empirisch gefunden. Es ist bislang kein Modell bekannt, mit dem sich die Güte einer Substanz als Matrix voraussagen lässt. So ist die 2,5-DHB den anderen Dihydroxybenzoesäure-Isomeren in ihrer Qualität als Matrix oft deutlich überlegen.^[77] Hier wurden Untersuchungen zu den Kristallisations- und Absorptionseigenschaften^[54] sowie Berechnungen^[78] und Messungen^[79] thermodynamischer Eigenschaften in der Gasphase für alle Isomere durchgeführt. Dabei konnten allerdings keine allgemeingültigen Ergebnisse erhalten werden. Für bestimmte Analyten

kann auch ein anderes Isomer als 2,5-DHB gut geeignet sein.^[80] Anhand von Berechnungen der Ionisationsenergie von Clustern aus 2,5- und 3,5-DHB und einem Modellanalyten (Val-Pro-Leu) konnte die Existenz von Clustern mit niedrigerer Ionisationsenergie für 2,5-DHB vorausgesagt werden.^[81,82]

Aktuelle Arbeiten^[83] haben gezeigt, dass Derivate der Standardmatrices zum Teil bessere Matrixeigenschaften zeigen können,^[84] so wurde bei der Untersuchung einer Serie von Derivaten der CHCA herausgefunden, dass α -Cyano-4-chlor-zimtsäure^[85] bessere Nachweisgrenzen^[86] als CHCA aufweist. Erklärt wird dies durch die herabgesetzte Elektronendichte an der Carboxylgruppe, was eine verringerte Protonenaffinität zur Folge hat, wodurch die Protonierung des Analyten erleichtert wird. Durch die Verringerung der Elektronendichte verschiebt sich allerdings auch das Absorptionsspektrum zu kürzeren Wellenlängen, zudem können die Kristallisationseigenschaften der Derivate nicht vorausgesagt werden; diese sind aber für die Verwendung als Matrix nicht unerheblich. Weitere Untersuchungen mit unterschiedlich derivatisierten CHCA-Modifikationen haben gezeigt, dass Sulphonyl- und Phosphonylgruppen anstelle einer Carboxylgruppe die Kristallisationseigenschaften deutlich verschlechtern und keine Matrix-Analyt-Co-Kristallisation mehr möglich ist. Der Zusammenhang zwischen Protonenaffinität und Absorptionsspektrum konnte auch wiederholt gezeigt werden.

Dual-Matrices und Zusätze Eine Möglichkeit, um die Qualität einer Matrix zu verbessern, ist die Zugabe von anderen Stoffen zum Matrix-Analyt-Gemisch^[87,88], so ist z.B. die Zugabe von Trifluoressigsäure eine weit verbreitete Methode um die Löslichkeit und die Protonierung des Analyten durch Herabsenken des pH-Wertes zu verbessern.^[89] Eine weitere Methode, die zu besseren Spektren führen kann, ist die Verwendung der so genannten Super-DHB,^[74] eine Mischung von 2,5-DHB und 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure im Verhältnis 9:1.

Ein anderer Ansatz ist die Mischung von zwei Standardmatrices, so konnte mit einer Mischung von 2,5-DHB und α -CHCA eine deutliche Verbesserung der Spektrenqualität und der Empfindlichkeit erreicht werden.^[90] Auch die Mischung einer sauren und einer basischen Matrix kann zu Verbesserungen der Spektrenqualität führen.^[91] Dies ist jedoch nicht für alle Analyten feststellbar, die beste Matrixmischung muss scheinbar für jeden Analyten einzeln bestimmt werden und die Verwendung von Dualmatrices liefert bei manchen Analyten schlechtere Ergebnisse als eine einzelne Matrix.

Ein anderer Ansatz ist die Beimischung von Stoffen, die die Kristallisationseigenschaften der Matrix verändern sollen. Ein Problem bei der Verwendung von 2,5-DHB ist die ungleichmäßige Kristallisation, so bilden sich bei der Präparation aus Wasser in den Randbereichen große Kristalle aus. In der Mitte der Probe sind deutlich kleinere Kristalle vorhanden, dies führt zu einer inhomogenen Verteilung des Analyten und zu einer deutlich unterschiedlichen Spektrenqualität an verschiedenen Stellen des Proben-trägers. Dies kann durch Verwendung eines leichtflüchtigen Lösungsmittels verhindert werden. Die Verwendung solcher organischer Lösungsmittel hat allerdings den Nachteil, dass die meisten biologischen Proben darin nicht löslich sind. Eine vor kurzer Zeit publizierte Variante, um dieses Problem zu umgehen, ist die Verwendung einer Mischung von 2,5-DHB und Glycerol^[92], was zu einer annähernd homogenen Probenoberfläche führt. Des Weiteren wurden Präparationsprotokolle veröffentlicht, die z.B. die Zugabe von Zuckern^[93] beinhalten, diese haben sich aber höchstens in einzelnen Bereichen wie der DNA-Analytik bewährt.

Ionische Flüssigkeiten Ionische Flüssigkeiten (*ionic liquids*) sind, wie der Name schon vorgibt, Flüssigkeiten, die aus Ionen bestehen. Dieser Zustand lässt sich durch das Schmelzen von Salzen herstellen, dies geschieht allerdings bei viele Salzen erst bei sehr hohen Temperaturen. Der Begriff ionische Flüssigkeit wird im Allgemeinen aber nur für solche Stoffe benutzt, die bei Standardbedingungen im flüssigen Zustand vorliegen, daher werden sie korrekt auch als Raumtemperatur ionische Flüssigkeiten (*room temperatur ionic liquid* [RTIL]) bezeichnet. Erstmals tauchten RTIL 1912 in der Literatur auf, genauer erforscht wurden sie allerdings erst ab Anfang der 1980er Jahre, als das Potential als Lösungsmittel und Katalysator in der organischen Synthese erkannt wurde.

Um den Schmelzpunkt der RTIL möglichst gering zu halten, werden möglichst raumfüllende asymmetrische Kationen und Anionen gewählt, um die Kristallisation energetisch ungünstig zu machen. Als Kationen in RTILs dienen häufig protonierte stickstoffhaltige organische Basen, Anionen sind in der Regel organische Säuren, die oft halogeniert sind, um die Protonenaffinität herabzusetzen und eine Neutralisationsreaktion zu verhindern. Durch die Zusammensetzung aus Ionen haben RTILs die ungewöhnliche Eigenschaft, dass sie einen verschwindend geringen Dampfdruck besitzen. Daher können sie auch über lange Zeiten als Flüssigkeiten im Hochvakuum vorliegen.

In der MALDI wurden RTILs erstmalig 2001 als Matrix verwendet.^[3] Eine solche *ionic liquid matrix* (ILM) besteht aus einer konventionellen MALDI-Matrix, die als Anion für

die RTIL dient, und einer Base, die durch die Säurefunktion der Matrix protoniert wird und als Kation vorliegt. ILM stellen eine neue Klasse von Matrices dar.

Seit ihrer Einführung haben sich ILM als eine gute Alternative zu den herkömmlichen festen Matrices bewährt.^[94] Sie bieten eine Reihe von Vorteilen gegenüber konventionellen Matrices, so ist durch den flüssigen Zustand eine gleichmäßige Verteilung des Analyten in der Matrix gewährleistet.^[4] Dadurch entfällt die Notwendigkeit, die Probe komplett mit dem Laser abzurastern oder manuell nach sogenannten *sweet spots* zu suchen, an denen ein ideales Matrix/Analyt-Verhältnis vorliegt bzw. die Co-Kristallisation besonders gut verlaufen ist. ILMs besitzen zudem die Eigenschaft, ihre Oberfläche nach der Ablation zu regenerieren, was dafür sorgt, dass die Ablation immer unter vergleichbaren Bedingungen stattfindet und die Schuss-zu-Schuss-Stabilität der erhaltenen Ionensignale deutlich homogener ausfällt. In den letzten Jahren wurde in vielen Untersuchungen gezeigt, dass die Verwendung von ILMs die Analyse verschiedenster Stoffklasse verbessern kann: Proteine und Peptide,^[95–98] Kohlenhydrate,^[99,100] Glycopeptide,^[100] Oligonucleotide,^[96,101] oder auch Phospholipide.^[102] Da es möglich ist, aus den meisten konventionellen Matrices auch ILMs herzustellen, sind die Anwendungsgebiete der ILM genau so zahlreich, wie die der MALDI allgemein. Auch bei anderen Matrix-unterstützten Methoden, wie der ME-SALDI kann der Einsatz einer ILM vorteilhaft sein.^[103]

Gerade im Hinblick auf den immer weiter fortschreitenden Bedarf an automatisierten Messprotokollen, die reproduzierbare Ergebnisse liefern müssen, sind diese Eigenschaften interessant. Desweiteren besteht auch in einigen Forschungsgebieten wie dem MSI die Notwendigkeit einer quantitativen Detektion der in der Probe vorhandenen Analyten, wo die deutlich bessere Homogenität der Ablation aus ILMs Vorteile bietet.^[104] Zusätzlich macht es diese Homogenität auch möglich, den Ablationsvorgang an sich, wie in dieser Arbeit, besser zu untersuchen.

Präparationsmethoden Neben der Wahl der Matrix hat auch die Präparationsmethode einen Einfluss auf die Spektren. Die Standardmethode zur Probenpräparation ist die *dried-droplet*-Methode (dd), hier werden Matrix- und Analytlösungen gemischt und einige μl dieser Lösung auf den Probenträger gegeben. Das Abdampfen des Lösungsmittel erfolgt dann bei Raumtemperatur und Normaldruck. Bei dieser Methode bilden sich durch das langsame Eintrocknen große Matrixkristalle, in denen der Analyt eingebettet ist. Das molare Verhältnis zwischen Analyt und Matrix liegt üblicherweise bei 1:500 bis 1:5.000, es sind jedoch auch Messungen bei Verhältnissen bis zu 1:10⁸ möglich. Bei

höheren Analytkonzentrationen verschwindet der Matrix-Effekt zunehmend und es werden Spektren erhalten, die LDI-Messungen ähneln. Die *dd*-Methode hat einige Nachteile, so ist durch die Bildung von großen Kristallen keine gute Reproduzierbarkeit der Spektren an verschiedenen Orten der Probe gegeben. Es gibt Orte, an denen ein sehr viel besseres Signal erhalten wird als auf dem Rest der Probe, man spricht hier von *sweet spots*³. Die erforderliche Suche nach den *sweet spots* macht die Messung aufwändig und ist einer automatisierten Spektrenaufnahme abträglich.

Eine feinere Kristallisation ist durch das schnelle Verdampfen des Lösungsmittels erreichbar. Möglich ist dies zum einen, wie oben erwähnt, durch Verwendung eines leichtflüchtigen Lösungsmittels, zum anderen durch Erwärmen des Probenträgers oder durch Vakuumtrocknung. Die Homogenität der Probe steigt so deutlich. Auf diese Weise kann auch eine schichtweise Präparation von Matrix und Analyt durchgeführt werden, z.B. wenn die Löslichkeiten eine gemeinsame Probenlösung nicht zulassen. Diese Technik wird dann als *thin layer*-Methode^[105] bezeichnet.

Im Zuge der größeren Verwendung von MALDI-Methoden im MSI-Bereich wurden auch verschiedene automatisierte Präparationsmethoden entwickelt, zum einen durch gleichmäßiges Aufsprühen einer Matrixlösung auf die Probe oder das punktuelle Auftragen durch Sprayer oder auch Ink-Jet-Druckvorrichtungen. Hierbei wird durch das verwendete Lösungsmittel ein Teil des Analyten aus der Probe gelöst und kristallisiert zusammen mit der Matrix auf der Probenoberfläche aus.

Es ist auch möglich, eine lösungsmittelfreie Präparationsmethode, die *solvent free*-Methode,^[106] zu verwenden. Hier werden Matrix und Analyt im festen Zustand miteinander vermischt, dafür hat sich die Verwendung einer *mini-ball-mill*^[107] bewährt. Matrix und Analyt werden in einem Plastik-Cap zusammen mit kleinen Kugeln ($d \approx 1$ mm) auf einem Vortexer mehrere Minuten geschüttelt, bis eine Homogenisierung erreicht ist. Die feste Mischung wird dann mit einem Spatel auf den Probenträger gedrückt. Die Homogenisierung des Gemisches ist hierbei sehr wichtig, da sonst nicht sichergestellt ist, ob die für die MALDI geeigneten Matrix/Analyt-Verhältnisse erreicht werden. Die *solvent free*-Methode hat den Vorteil, dass die Löslichkeiten von Matrix und Analyt unerheblich sind. So sind auch Analyten zugänglich, die in keinem Lösungsmittel ausreichend löslich sind, bzw. sich nicht in den Lösungsmitteln lösen, in denen die Matrix löslich ist. Des Weiteren existiert die *pressed pellet*-Methode^[108], die hauptsächlich für Polymere verwendet wird, hier werden Matrix und Analyt zusammen zu einer Pille gepresst.

³Dieser Effekt ist sehr stark bei 2,5-DHB zu beobachten.

Die Probenpräparation bei der Verwendung einer ILM unterscheidet sich nicht essentiell von der dd-Methode, da auch hier eine gemeinsame Lösung von Matrix und Analyt auf den Probenträger aufgebracht wird. Die Verwendung einer unverdünnten ILM ist nicht möglich, da die reinen RTILs zu hohe Viskositäten aufweisen, um mit herkömmlichen Pipetten aufgetragen zu werden. Die in dieser Arbeit verwendete Präparationsmethode ist in 3.1.2 beschrieben.

2.3. Fast Flash Imaging

Um Phänomene auf sehr kurzen Zeitskalen visualisieren zu können, muss eine sehr kurze Belichtungszeit ermöglicht werden. Die Belichtungszeit liegt bei kommerziellen Kamerasystemen maximal im μs -Bereich; spezielle, sehr aufwändige Systeme können auch Zeiten im sub-ns-Bereich erreichen, sind aber oft auf eine spezielle Anwendung zugeschnitten und daher nicht universell einsetzbar. Die Zeitauflösung, die notwendig ist, um den Ablationsprozess in der MALDI darzustellen liegt im unteren ns-Bereich, und es ist daher nicht möglich, ein konventionelles Hochgeschwindigkeitskamerasystem zu verwenden.

Eine andere Möglichkeit, die Belichtungszeit möglichst kurz zu halten, ist die Verwendung von sehr kurzen Lichtblitzen. Der Detektionschip wird hierbei für eine Zeit belichtet, die länger als der Lichtblitz ist, was dazu führt, dass die Aufnahme in völliger Dunkelheit aufgenommen werden muss, da alle Photonen, die den Chip aus anderen Lichtquellen erreichen, das Bild verfälschen. Die herkömmlichen Blitzlampen erreichen Belichtungszeiten im unteren μs -Bereich, durch die Verwendung von gütegeschalteten Lasern können Belichtungszeiten im ns-Bereich ermöglicht werden. Bei dieser Methode entsteht das Problem, dass die Repetitionsrate des Blitzes nicht ausreichend ist, um ein Ereignis wie die Laserablation mit dieser Zeitauflösung in einem Durchgang zu detektieren. Um dies zu erreichen muss das Ereignis wiederholbar sein, so dass eine Serie von Aufnahmen bei veränderten Zeitabständen zwischen dem Beginn des Ereignisses und der Belichtung durch den Laserblitz aufgenommen werden können.

2.3.1. Grundprinzip des Fast Flash Imaging

Wie oben erwähnt, kann durch die Verwendung von Lasern als Belichtungsquelle eine sehr hohe Zeitauflösung erreicht werden. Im Gegensatz zur normalen Photographie wird beim FFI aber nicht das von dem aufzunehmenden Objekt reflektierte Licht detektiert, sondern eine Schattenaufnahme erstellt. Das bedeutet, dass das Objekt zwischen Lichtquelle und Kamera platziert wird und an seiner Position im Lichtstrahl einen Schatten erzeugt. Dieser Aufbau ist in Abb. 2.6 gezeigt. Auf der linken Seite befindet sich die Lichtquelle, die divergentes Licht aussendet. Dieses wird durch eine Optik kollimiert und in Richtung der Probe geleitet. Nach dem Passieren des Objektes wird das Restlicht mit weiteren Optiken auf dem Kamerachip abgebildet.

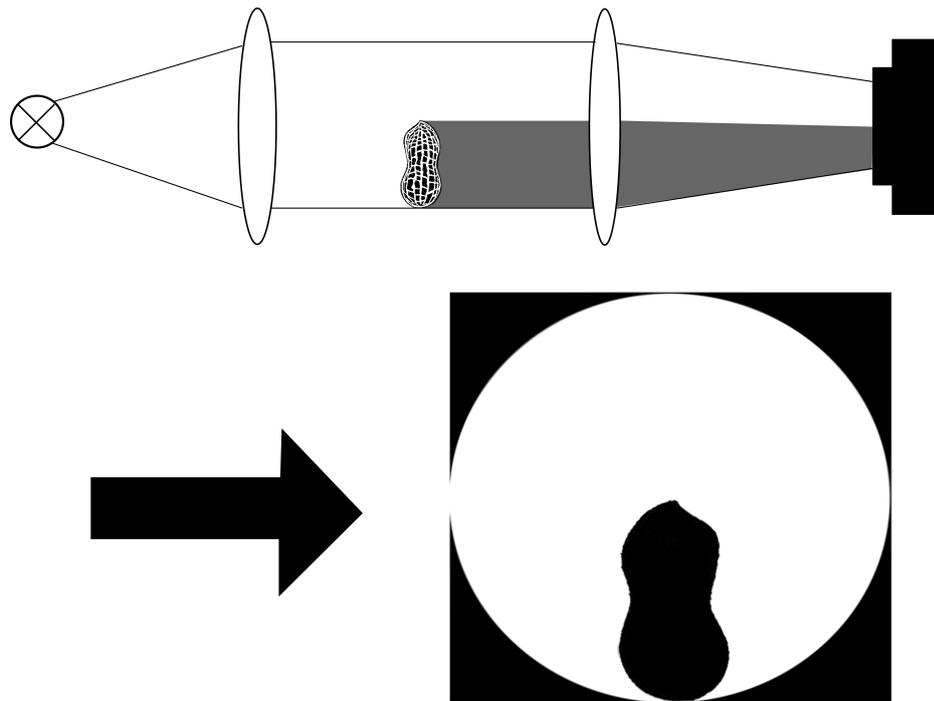


Abbildung 2.6.: Prinzipieller Aufbau eines FFI-Schattenphotographieexperiments. Das resultierende Bild ist in der unteren Zeile dargestellt.

Für eine möglichst hohe Bildqualität ist es wichtig, dass der Lichtstrahl die Probe kollimiert passiert. Bei der direkten Verwendung eines Lasers zur Beleuchtung ist es in der Regel notwendig, den Laserstrahl aufzuweiten und gegebenenfalls noch zu homogenisieren, um eine gleichmäßige Ausleuchtung des Objektes zu erreichen. Wird, wie in dieser Arbeit, die Fluoreszenz eines entsprechenden Farbstoffes zur Belichtung verwendet, so wird zunächst diffuses Licht einer endlich ausgedehnten Lichtquelle erhalten. Aus diesem Licht muss zunächst eine Quasi-Punktlichtquelle konstruiert werden, um kollimiertes Licht zu erhalten. Der Aufbau, mit dem dies in dieser Arbeit erreicht werden konnte, ist in Abschnitt 3.3.1 gezeigt.

Nachdem das Licht die Probe passiert hat und stellenweise ausgelöscht bzw. abgeschwächt wurde, kann es mit einem Objektiv auf die Kamera abgebildet und bei Bedarf dabei vergrößert werden. Die Abschwächung des Lichtstrahls kann hier durch mehrere Effekte hervorgerufen werden: Ein lichtundurchlässiger Gegenstand wird das auf ihn treffende Licht reflektieren und so ein komplett dunkles Bild in der Schattenaufnahme erzeugen. Bei sehr kleinen Partikeln, die in der Größenordnung der verwendeten Lichtwellenlänge liegen, können auch Beugungseffekte auftreten, die zu einer Veränderung der detektierten Lichtintensität führen. Ob dieser Effekt eine Auswirkung auf das er-

haltene Bild hat, ist auch von der Pixelgröße des verwendeten Photochips abhängig. Lichtdurchlässige Objekte im Strahlengang können zum Teil auch eine Reflexion des Lichtes bewirken, zusätzlich tritt eine Brechung des einfallenden Lichtstrahls auf, die die Detektion der Photonen hinter dem Objekt verringert. Diese Brechung führt dazu, dass Bereiche in der Nähe des Objektes mit erhöhter Lichtintensität abgebildet werden. Der Brechungseffekt führt auch dazu, dass Bereiche mit einer höheren Gasdichte in den Schattenbildern als dunkler detektiert werden, wie es auch in dieser Arbeit bei der Ausbreitung von Stoßwellen in der Luft bei höheren Drücken zu beobachten ist. Für die Darstellung von Dichteunterschieden ist aber die Schlieren-Photographie besser geeignet. Da für das FFI hauptsächlich monochromatisches Licht verwendet wird, ist auch das Auftreten von Interferenzmustern möglich.

Außerdem ist eine Abwandlung des Aufbaus möglich, bei der Lichtquelle und Kamera in einem Winkel von 90° zueinander aufgebaut sind. Durch diese Anordnung ist es möglich, das an der Probe gestreute Licht zu detektieren, wodurch auch die Detektion von kleineren Partikeln möglich ist. Hierbei ist aber auch wieder zu beachten, dass die räumliche Auflösung zusätzlich durch die Pixelgröße des Detektors beschränkt ist.

Neben der kurzen Pulsdauer bringt die Verwendung von Lasern als Lichtquelle auch weitere Vorteile mit sich: Durch die geringe räumliche Ausbreitung des Laserstrahls entsteht wenig Streulicht in der Versuchsanordnung. Außerdem ist es durch die monochromatischen Eigenschaften des erzeugten Lichtes einfach, mit geeigneten Bandpassfiltern störende Einflüsse von anderen Lichtquellen zu minimieren, ohne eine starke Abschwächung der eigentlichen Belichtung zu erzeugen. Moderne Lasersysteme weisen zudem einen sehr geringen *jitter* (zeitliche Schwankung des Laserpulses zum Triggersignal) auf, so dass eine Zeitauflösung in der Größenordnung der Pulsdauer des Lasers möglich ist.

2.3.2. Fast Flash Imaging zur Visualisierung der Laserablation

Eine Fragestellung, die mit der FFI-Technik sehr gut untersucht werden kann, ist die Visualisierung des *plume*, der bei der Laserablation entsteht. Der Ablations*plume* ist räumlich begrenzt und die Größe lässt sich durch die Fokussierung des Ablationslasers sehr genau bestimmen, außerdem weist das abgetragene Material eine ausreichende Dichte auf, um signifikante Abschwächungen des Belichtungspulses zu erreichen.

Voraussetzung für die Verwendung des FFI ist allerdings eine gute Schuss-zu-Schuss-Reproduzierbarkeit des Ablationsvorganges. Wichtig hierfür ist eine ausreichende Homogenität der Probenoberfläche, z. B. wenn die Ablation bei jedem Schuss an einem anderen Ort einer sehr einheitlichen Probe stattfindet (z.B. Metallsubstrate, Einkristalle oder Polymerproben^[109–111]), oder auf einer sich regenerierenden Oberfläche, wie sie bei Flüssigkeiten gegeben ist.^[112–118] Aufgrund dieser Voraussetzungen ist die Untersuchung der Ablation von konventionellen festen MALDI-Matrixproben nur sehr schlecht möglich, da die Ablation von einem Spot auf der Probe nur begrenzt oft wiederholbar ist und die inhomogene Kristallisation die Ablation von verschiedenen Spots nicht vergleichbar macht. Ein weiteres Gebiet, auf dem die FFI-Technik häufiger eingesetzt wurde, ist die Laserablation von biologischen Proben wie Gewebeschnitten,^[119] motiviert durch die vermehrte Verwendung von Lasern in der Medizintechnik.

Verwendung mit Bezug auf den MALDI-Prozess

Wie oben beschrieben wurde, ist die Untersuchung von Proben von kristallinen Matrices mittels FFI nicht ideal, daher ist die bisherige Verwendung dieser Technik im Bezug auf den Ablationsvorgang von MALDI-Prozessen überschaubar. Durch die üblicherweise vorherrschenden Vakuumbedingungen ist die Verwendung von nichtionischen Flüssigkeiten als Matrix sehr eingeschränkt, da nur wenige Flüssigkeiten die notwendige Vakuumstabilität aufweisen.

Die einzige Flüssigmatrix, die routinemäßig für massenspektrometrische Experimente verwendet wird, ist Glycerol, welches eine der Standardmatrices für die IR-MALDI ist. Mit dieser Matrix wurden FFI-Untersuchungen bei Laserwellenlängen zwischen 2,7 und 3,5 μm durchgeführt. Rohlfing *et al.*^[120] haben den Ablationsvorgang einer Glycerolprobe bei einer Ablationswellenlänge von 2,94 μm und Pulsdauern von 6 ns und 100 ns im Hochvakuum untersucht. Dazu wurden Dunkelfeld-Bilder und 90°-Streuungsbilder aufgenommen. Die unterschiedlichen Pulslängen führen hier zu einem unterschiedlichen Ablationsmechanismus, da im Falle des kurzen Pulses ein sehr viel schnelleres Aufheizen der Probe stattfindet und ein starker, schneller Druckanstieg in der Probe zur Ablösung kompletter Schichten von der Oberfläche führt (*acoustic/stress confinement*). Für den längeren Puls gilt dieses nicht, die Ablation ist thermisch ausgelöst und führt zu einem deutlich länger andauerndem Ablationsvorgang (*thermal confinement*). Fan *et al.*^[121] haben die Ablation von Glycerol unter Atmosphärendruck bei Wellenlängen von 2,94 μm

(Anregung der OH-Streckschwingung) und $3,4\ \mu\text{m}$ (Anregung der CH-Streckschwingung) untersucht. Die Dynamik der Ablation zeigt deutliche Unterschiede beim Wechsel der Wellenlänge, bei $2,94\ \mu\text{m}$ (im Bereich des Absorptionsmaximums) ist der Materialausstoß stark erhöht, zudem liegt eine erhöhte *plume*-Geschwindigkeit vor. Auch dieser Effekt ist mit einem effektiveren Aufheizen der Probe in einem kleineren Volumen und daraus resultierend mit einem schnelleren Druckanstieg zu begründen.

Die bisher einzigen Untersuchungen an einer UV-absorbierenden Matrix wurden mit 3-Nitrobenzylalkohol von Rohlfing *et al.*^[122] durchgeführt. Hier wurden Dunkelfeld- und 90° -Streuungsbilder bei einer Ablationswellenlänge von 266 nm und im Hochvakuum aufgenommen. Es wurden dabei unterschiedliche Abhängigkeiten der Intensität von ablatierter, gasförmiger Probe und kleinen Tropfen bei steigender Ablationsleistung gefunden. Das gasförmige Material zeigt einen exponentiellen Intensitätsanstieg bei Erhöhung der Leistung, wogegen die Anzahl der ausgestoßenen Tropfen einen linearen Anstieg zeigt. Anhand dieser Daten wurde ein zweistufiges Ablationsmodell postuliert, wobei sich die Zeitskalen der unterschiedlichen Ablationsvorgänge überschneiden.

Experimenteller Teil

Der Ablationsprozess, der bei den typischen MALDI-Bedingungen abläuft, lässt sich mit mehreren experimentellen Methoden untersuchen. Eine dieser Methoden ist die Postionisation. Deren theoretische Grundlagen und der bisherige Stand der Forschung sind in Abschnitt 2.2.2 dargestellt. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Ablationsvorgang von ILMs untersucht, durch die deutlich gesteigerte Homogenität der Ablation dieser Proben im Vergleich zu festen Matrices konnte auch die Qualität der Postionisationsuntersuchungen verbessert werden. Der verwendete experimentelle Aufbau hierfür und die Vorgehensweise bei den Messungen werden im folgenden Abschnitt dargestellt, gefolgt von den hierbei erhaltenen Ergebnissen. Anhand dieser Ergebnisse wurde ein Modell für den Ablationsprozess postuliert. Zur Verifizierung dieses Modelles wurde ein neues Experiment entworfen und aufgebaut, das die unter 2.3 beschriebene FFI-Methode mit einem Flugzeitmassenspektrometer kombiniert. Abschnitt 3.3 beschreibt diesen Aufbau und die damit aufgezeichneten Daten, sowie den Vergleich der Ergebnisse der beiden Messmethoden miteinander und mit aktueller Literatur. Vorangestellt ist ein Abschnitt, der die Synthese der untersuchten Matrices beschreibt und auf die verwendete Probenpräparation eingeht.

3.1. Synthese und Probenpräparation

Da ionische Flüssigkeiten als Matrices in der MALDI noch keine allzu große Verbreitung in der Standardanalytik erlangt haben, ist die kommerzielle Verfügbarkeit noch stark begrenzt. Von daher war es notwendig, alle in dieser Arbeit verwendeten Matrices zu synthetisieren. Auch ein reproduzierbares Präparationsprotokoll musste erarbeitet werden, da verschiedene Faktoren in der Probenvorbereitung beachtet werden müssen, um eine Kristallisation der ionischen Flüssigkeit zu verhindern.

3.1.1. Synthese der ionischen Flüssigkeiten

Wie oben erwähnt wurden alle in dieser Arbeit verwendeten ILMs selbst hergestellt, die Vorgehensweise entspricht vom Prinzip her der Synthesevorschrift von Armstrong *et al.*,^[3] es wurden allerdings leichte Änderungen vorgenommen. Zunächst wurden 200 mmol der organischen Säure in 5 ml Methanol gelöst. Zu dieser Lösung wurde eine äquimolare Menge der Base gegeben und diese Lösung wurde für 10 Minuten bei 30 °C gerührt. Auf die in der Literatur beschriebene Filtration wurde verzichtet, da eine klare Flüssigkeit ohne erkennbare Feststoffrückstände erhalten wurde. Eine höhere Temperatur der Lösung erwies sich aufgrund der hohen Flüchtigkeit des Methanols als nicht praktikabel. Anschließend wurde das Methanol mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt, dieses musste bei verringertem Druck geschehen, da zu hohe Temperaturen vor allem bei den DHB-Isomeren Reaktionen hervorrufen, die unter anderem an einem Farbumschlag ins Rote erkennbar waren. Ein zu starkes Erhitzen kann auch das Verdampfen eines Teils der Base zur Folge haben, was dazu führt, dass keine ionische Flüssigkeit erhalten werden kann.

Nach dem vollständigen Verdampfen des Lösungsmittels wird eine hochviskose Flüssigkeit erhalten. Im Fall der DHB-Isomere ist diese farblos, bei Verwendung von CHCA besitzt die ionische Flüssigkeit die gelbliche Farbe des CHCA-Feststoffes. Bei einigen Kombinationen von MALDI-Matrix und Base konnte mit dieser Vorschrift keine ionische Flüssigkeit erhalten werden, auch Veränderungen der Synthese führten in diesem Fall zu keinem Erfolg. Eine Systematik, welche Kombination von Säure und Base eine RTIL erzeugt ist nicht zu erkennen gewesen.

Da die Handhabung der ionischen Flüssigkeiten aufgrund der sehr hohen Viskosität mit herkömmlichen Mitteln wie Pipetten nicht möglich ist, wurde die ionische Flüssigkeit mit 3 ml Methanol aufgenommen. Dies stellte die geringste Menge an Lösungsmittel dar, bei der die gesamte RTIL wieder gelöst wurde. Die so erhaltene Flüssigkeit besitzt eine deutlich geringere Viskosität und lässt sich wie eine herkömmliche Matrixlösung präparieren.

3.1.2. Probenpräparation

Wie auch schon bei der Synthese, so gibt es auch bei der Probenpräparation einige Punkte, die beachtet werden müssen, um die Kristallisation der ILM zu verhindern. Die

Kristallisation kann durch zwei Effekte hervorgerufen werden: Zum einen durch ein zu starkes Erhitzen der Flüssigkeit. Ein Erwärmen der Matrixlösung nach dem Auftragen auf den Probenträger ist notwendig, da das Lösungsmittel (in diesem Fall Methanol) bei Raumtemperatur im Gegensatz zu den konventionellen festen Matrices nicht ausreichend verdampft. Geschieht dieses Verdampfen bei zu hohen Temperaturen, so kann auch ein Teil der organischen Base in die Gasphase übertreten, wodurch keine äquimolare Zusammensetzung der RTIL mehr gegeben ist. Dies führt dann in der Regel zur Kristallisation der gesamten Probe. Erfolgt andererseits das Entfernen des Lösungsmittels nicht in ausreichendem Maße, so verdampft der in der Probe verbliebene Teil beim Einbringen der Probe in das Vakuum des Massenspektrometers. Durch das schlagartige Verdampfen wird der Probe Wärme entzogen und dies kann dazu führen, dass die Flüssigkeit unter ihre Kristallisationstemperatur abgekühlt wird.

Derselbe Effekt ist auch schon bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck zu beobachten, wenn eine zu große Menge (mehr als 25 μl) der Matrixlösung auf den Probenträger aufgebracht wurde und eine Verdampfung des Lösungsmittels bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Durch das Verdampfen des Methanols wird an der Probenoberfläche die Temperatur verringert, was zu Bildung einer kristallinen Schicht auf der Oberfläche führt. Dadurch wird dann ein weiteres Verdampfen verhindert; unterhalb der Kristallschicht liegt dann weiter die Lösung der ILM im Lösungsmittel vor. Wurde eine größere Menge der Probenlösung direkt nach dem Auftragen erwärmt, um die Verdunstungskälte auszugleichen, so konnte es passieren, dass durch die Herabsetzung der Oberflächenspannung die Flüssigkeit vom Probenträger herunterlief. Außerdem zeigte sich, dass frisch synthetisierte RTILs deutlich weniger zur Kristallisation neigen als ältere Proben. Dies konnte teilweise dadurch verhindert werden, dass die Lösungen der ILMs gekühlt gelagert wurden; hauptsächlich bei der Verwendung von DHB-Isomeren als Säure in der ionischen Flüssigkeit.

Ein wichtiger Punkt ist auch das verwendete Lösungsmittel. Die Verwendung von Ethanol macht es möglich, dass die Probe bei der Präparation bei Raumtemperatur nicht erstarrt, da die Verdunstung langsamer erfolgt und daher der Abkühlungseffekt nicht so stark ausgeprägt ist. Um das Ethanol aber in ausreichendem Maße aus der Probe zu entfernen, um ein Erstarren im Hochvakuum zu verhindern, muss die Probe über den Siedepunkt des Ethanols erhitzt werden. Dies führt vor allem bei Verwendung leichtflüchtiger Amine dazu, dass ein Teil der Base aus der Probenlösung verdampft und die Probe daher während der Präparation kristallisiert. Bei der Verwendung von Methanol liegt die benötigte Temperatur niedriger, allerdings darf die Substanzmenge hier

nicht zu groß sein, da sonst, wie oben angesprochen, die Probe erstarrt oder verläuft. Dieses Problem kann dadurch umgangen werden, dass mehrfach kleinere Mengen der Matrixlösung aufgetragen werden, wobei das Lösungsmittel dazwischen jeweils durch Erwärmen entfernt wird. Die Zugabe einer geringen Menge Glycerol führt auch zu einer deutlich geringeren Wahrscheinlichkeit, dass die Probe kristallisiert. Das Glycerol war in den Massenspektren nicht nachzuweisen, von daher ist es möglich, dass dieses auch im Hochvakuum aus der Probe verdampft. Unter Berücksichtigung all dieser Punkte konnte ein Präparationsprotokoll erstellt werden, mit dem zuverlässig Proben mit unterschiedlicher Substanzmenge erhalten werden konnten, die auch im Hochvakuum weiterhin als Flüssigkeit vorlagen.

Die aus der Synthese erhaltene Lösung der ILM in Methanol wurde mit einer geringen Menge an Glycerol versetzt (ca. $10\ \mu\text{l}$ auf $500\ \mu\text{l}$ Matrixlösung). $10\ \mu\text{l}$ dieser Mischung wurden mit einer Pipette auf den Probenträger aufgebracht und für 30 min in einem Ofen auf $50\ ^\circ\text{C}$ erwärmt. Die Probe wurde dann wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und weitere $10\ \mu\text{l}$ der Mischung aufgetragen und entsprechend erwärmt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die gewünschte Substanzmenge aufgetragen war. Dann wurde die Probe für mindestens 6 h bei weiterhin $50\ ^\circ\text{C}$ erwärmt. Die Probe wurde dann ohne vorheriges Abkühlen direkt in das Vorvakuum des Massenspektrometers überführt und dort 10 min evakuiert. Anschließend konnte die Probe dann in das Hochvakuum überführt werden.

3.2. MALDI-Postionisationsexperimente

In der Literatur wurde im Zusammenhang mit ILMs an mehreren Stellen^[3,4,98] beschrieben, dass gleichmäßigere und reproduzierbarere Signalintensitäten mit geringer Schuss-zu-Schuss-Schwankung erhalten werden können. Da vor allem die Varianz der Menge an ablatiertem Material und die Berücksichtigung dessen in den erhaltenen Postionisationssignalen bei den Untersuchungen von festen Matrices^[15,76,123,124] ein großes Problem darstellten, bot die Verwendung von Flüssigmatrices hier ein großes Potential zur Verbesserung der Messqualität.

3.2.1. Experimenteller Aufbau

Das in dieser Arbeit verwendete lineare Flugzeitmassenspektrometer sowie die Laser und ihre Steuerung sind schon in vorherigen Arbeiten verwendet worden, genauere Einzelheiten zu den an dem Aufbau durchgeführten Änderungen im Vorfeld dieser Arbeit sind an den entsprechenden Stellen^[15,76,123,124] zu finden. Hier wird das Gerät in dem Entwicklungsstadium beschrieben, wie es für die später aufgeführten Messungen verwendet wurde.

Lin-TOF

Alle MALDI-Postionisations-Messungen wurden mit einem linearen Flugzeitmassenspektrometer durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Eigenkonstruktion; eine Skizze des Aufbaus ist in Abb. 3.1 gezeigt. Das Gehäuse der Ionenquelle ist aus Aluminium gefertigt, das Flugrohr ist aus Edelstahl, die Fenster zum Einkoppeln der Laser sind Quarzfenster (Suprasil).

Ionenquelle Das Beschleunigungsfeld in der Ionenquelle wurde mit Hilfe von Edelstahlringlektroden (100 mm Außendurchmesser) realisiert. Der Innendurchmesser der Elektroden betrug 50 mm. Durch den großen Außendurchmesser konnte in der Flugachse der Ionen ein homogenes elektrisches Feld sichergestellt werden. Zwischen der Repellerplatte und der 0 V-Elektrode liegen zwei Beschleunigungsplatten, die durch eine Drahtbrücke verbunden waren und so auf dem gleichen Potential lagen. Folglich existiert

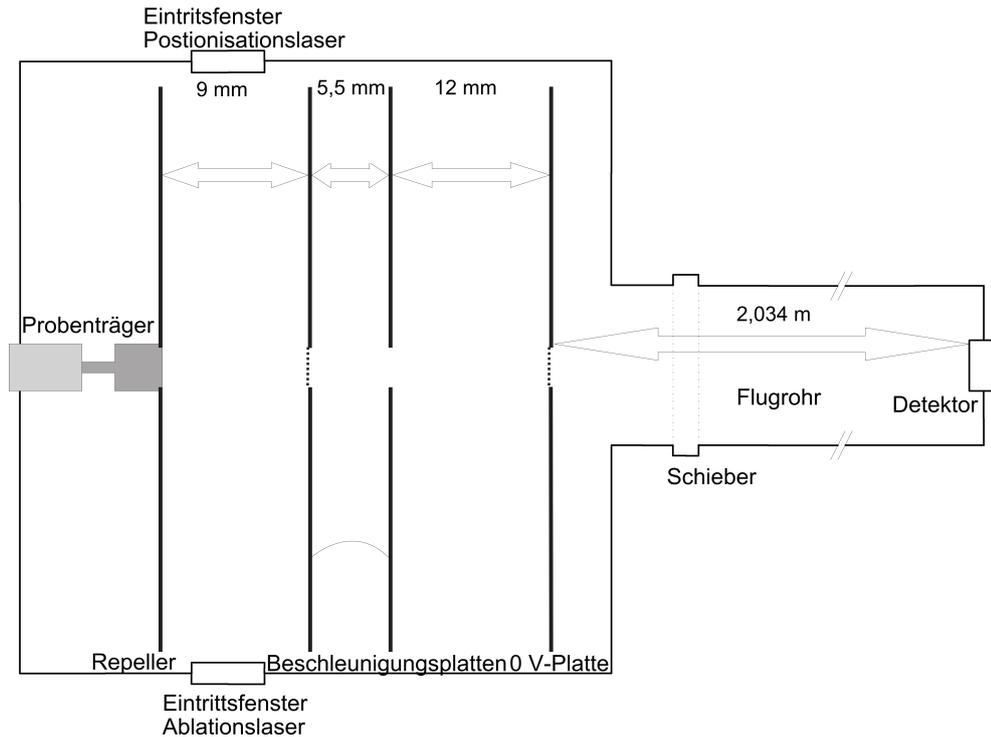


Abbildung 3.1.: Schematischer Aufbau des für die Messungen verwendeten linearen Flugzeitmassenspektrometers.

zwischen ihnen eine feldfreie Driftstrecke, mit Hilfe derer zum Beispiel Untersuchungen an Fragmentierungsreaktionen möglich wären. Um Durchgriffe der elektrischen Felder in andere Bereiche des Gerätes zu verhindern waren die erste Beschleunigungsplatte und die 0 V-Elektrode jeweils mit einem Gitter versehen.

Es wurde ein zweistufiges Beschleunigungsfeld verwendet; die Repellerplatte, die mit dem Probenträger in elektrischem Kontakt steht und mit der Oberfläche des Probenträgers bündig abschließt, lag auf einem Potential von $U_{\text{Rep}}=12884 (\pm 3) \text{ V}$. Die erste Beschleunigungsplatte war auf $U_{1, \text{Platte}}=7700 (\pm 4) \text{ V}$ gelegt. Für das erste Feld zwischen Repeller und erster Beschleunigungsplatte ergibt sich bei dem vorliegenden Abstand von 9 mm $E_1=545 (\pm 6.5) \text{ V/mm}$, für das zweite Feld zwischen erster Beschleunigungsplatte und 0 V-Elektrode ergibt sich mit 12 mm Abstand $E_2=642 (\pm 5.7) \text{ V/mm}$. Der Potentialverlauf in der Quelle ist in Abb. 3.6 gezeigt.

Die Spannungsversorgung der Ionenquelle wurde mit zwei Hochspannungsnetzgeräten (HCN35M-35000, FUG, Rosenheim, Deutschland) realisiert, sowohl der Repeller als auch die Beschleunigungsplatten wurden hierbei über ein eigenes Netzgerät versorgt. Die 0 V-

Elektrode war mit dem Gehäuse über eine Drahtbrücke verbunden und lag folglich mit diesem auf dem gleichen Potential.

Mit diesen Potentialen konnte nur ein maximales Auflösungsvermögen von ca. 100 erreicht werden. Für die hier durchgeführten Messungen war die Auflösung aber nur von geringerem Interesse, da die Massen der eingesetzten Substanzen bekannt waren und nur die jeweiligen Signalintensitäten von Interesse waren. Die verwendeten Beschleunigungspotentiale wurden im Zusammenhang mit der Postionisationsortsbestimmung gewählt, dies wird später noch ausführlich beschrieben.

Die Evakuierung der Ionenquelle erfolgte durch eine doppelstufige Turbomolekularpumpe (TPU330, Pfeiffer Vacuum, Wetzlar, Deutschland). Mit Hilfe eines Hochpräzisionsnadelventils konnte der Druck in der Ionenquelle stufenlos zwischen 9×10^{-7} mbar und ca. 2×10^{-5} mbar eingestellt werden. In den hier durchgeführten Messungen wurde dieses Ventil nicht benutzt, der Druck lag durchgehend bei dem minimal erreichbaren Wert von ca. 9×10^{-7} mbar.

Flugrohr An die Ionenquelle schließt sich ein Flugrohr mit einer feldfreien Driftstrecke von 2,034 m an (zur Bestimmung dieses Wertes siehe Walbrodt.^[15]) Ionenquelle und Flugrohr konnten durch einen Schieber (VAT Vakuumventile, Haag, Schweiz) voneinander getrennt werden. Das Vakuum im Flugrohr wurde durch eine Turbomolekularpumpe (Turbovac 151C, Leybold, München, Deutschland) erzeugt, der minimal erreichbare Druck betrug 8×10^{-7} mbar.

Detektor Am Ende des Flugrohrs wurden die Ionen mit einer Multi-Channel-Plate (El Mul, Yavne, Israel) detektiert. Vor diesem Detektor wurden die Ionen nachbeschleunigt; die Beschleunigungsspannung betrug -2300 V, bereitgestellt wurde die Spannung von einem Hochspannungsnetzteil (FUG HCN35-12500, Rosenheim, Deutschland).

Probenträger Die verwendeten Probenträger waren aus V2A Stahl und hatten einen Oberflächendurchmesser von 9 mm. Der Probenträger wurde auf einer Schubstange in einer elektrisch isolierten, federnden Halterung befestigt. Durch eine Schleuse (evakuiert durch eine Drehschieberpumpe, minimaler Druck 1×10^{-2} mbar) wurde er in die Ionenquelle eingeschleust. Der Probenträger verfügt über eine Fräbkante, mit der er so

in den Repeller einrastet, dass er mit diesem eine plane Oberfläche bildet. So kann sichergestellt werden, dass das erste Beschleunigungsfeld möglichst homogen ist. Durch die verwendete Halterung wird erreicht, dass der Probenträger auf demselben Potential wie der Repeller liegt, und dass dieser keinen mechanischen Kräften beim Einschleusen ausgesetzt ist.

Da während der Messungen von festen Proben ein merklicher Probenabtrag auftritt, ist es nicht sinnvoll hier das Zentrum des Probenträgers als Ablationsort zu wählen, da die Signalintensitäten so nur für eine kurze Zeit für die Messungen ausreichen. Daher wurde die Ionenquelle so aufgebaut, dass der Mittelpunkt des Probenträgers 4 mm unterhalb der geometrischen Achse des TOF-MS liegt. Durch manuelles Drehen kann der Ablationsort so auf einem Ring mit einem Umfang von ca. 19 mm variiert werden. Für ILMs ist dieses nicht zwingend notwendig, da die Probenoberfläche sich selbstständig regeneriert. Der Ablationsort auf dem Probenträger hat also keinen Einfluss auf die Messung; von daher wurde auf einen Umbau verzichtet und die Ionenquelle unverändert genutzt.

Ablationslaser

Als Ablationslaser wurde ein Nd:YAG Laser (Repetitionsrate 10 Hz; GCR-150, Spectra-Physics, Darmstadt, Deutschland) verwendet, dieser konnte sowohl in der fundamentalen Wellenlänge (1064 nm) als auch frequenzverdoppelt (532 nm), -verdreifacht (355 nm) und -vervierfacht (266 nm) betrieben werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Ablationswellenlängen von 355 nm und 266 nm verwendet. Da von dem Laser, neben der benötigten Wellenlänge, auch die Fundamentale und die verdoppelte Wellenlänge emittiert wurden, wurde der Laserstrahl mit zwei dichroitischen Spiegeln (reflektierend im UV-Bereich, durchlässig im sichtbaren und IR-Bereich) umgelenkt, um die gewünschte Wellenlänge zu separieren. Der Strahl (LB2) wurde, wie in Abb. 3.2 gezeigt ist, dann durch die Iris I3 ($d=1$ mm) verkleinert, zum einen, um die Ablationsleistung zu begrenzen, zum anderen, um Intensitätsschwankungen innerhalb des Strahlprofils zu umgehen, da immer derselbe Teil der Strahls durchgelassen wurde. Mittels eines UG500-Filters (3 mm dick; Schott, Mainz, Deutschland) wurde noch vorhandenes grünes (532 nm) Streulicht abgefangen und die Leistung des UV-Strahls weiter leicht abgeschwächt. Der Strahl wurde nun mit dem Spiegel S2 umgelenkt und mit einer Linse L2 ($f=+200$ mm) auf eine Größe von ca. $50 \mu\text{m}$ fokussiert,^[15] so dass der Fokuspunkt auf der Oberfläche des

Probenträgers lag. Über die Blitzlampenspannung und das Q-Switch-Delay konnte die Leistung des Ablationslasers verändert werden; sie wurde jeweils knapp über die *fluence threshold* (die niedrigste *laser fluence*, bei der Ionen beobachtet werden) der Matrix eingestellt. Eine feste Einstellung der *laser fluence* ist bei verschiedenen Matrices nicht praktikabel, da sich die Matrices in ihrer *fluence threshold* unterscheiden und die dadurch möglicherweise vorhandene Überschussenergie zu verstärkter Fragmentierung und einem erhöhten Probenabtrag führen würde.

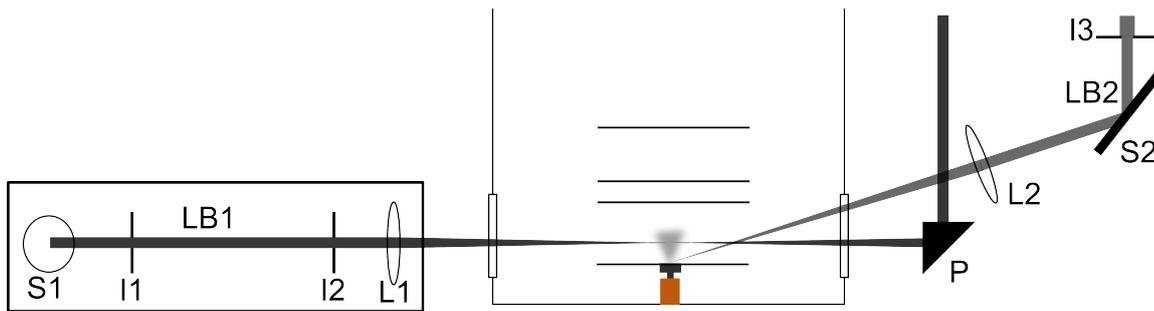


Abbildung 3.2.: Einkoppelung der beiden Laser in die Ionenquelle.

Postionisationslaser

Als Postionisationslaser wurde ein Farbstofflaser (modifizierter Jaguar C, Radiant Dyes, Wermelskirchen, Deutschland; Pumplaser: Inlite, Continuum, Santa Clara, Kalifornien, USA) eingesetzt.

Der Einkopplung des Postionisationslasers kommt eine besondere Bedeutung im Experimentaufbau zu, da der Postionisationsort eine sehr wichtige Größe zur Bestimmung der Desorptionsgeschwindigkeiten darstellt. Der vorhandene Aufbau (gezeigt in Abb. 3.2) erfüllt alle Anforderungen, die an den Postionisationslaser gestellt werden: Der Laserstrahl konnte sowohl in der Höhe als auch im Abstand zum Probenträger stufenlos verändert werden, so dass jeder Ort des Ablationsplume untersucht werden kann. Dies wurde dadurch erreicht, dass der Strahlengang auf einer Aluminiumschiene aufgebaut war, die auf zwei Verschiebetischen befestigt war. Diese waren jeweils zusätzlich auf einem höhenverstellbaren Halter montiert. Dadurch konnte die Schiene in der Höhe mit einer Genauigkeit von mindestens 0.1 mm und in der Ebene mit einer Genauigkeit von 10 μm eingestellt werden. Eine weitere Anforderung an den Strahlengang ist die Parallelität des Postionisationslaserstrahls zur Probenträgeroberfläche, damit sichergestellt

ist, dass nur Neutrale mit definiertem Abstand zum Probenträger ionisiert werden. Dies wurde durch folgenden Aufbau erreicht: Auf der optischen Schiene waren zwei Iriden montiert, die auf einen Durchmesser von weniger als 1 mm begrenzt werden können. Der Strahl wurde nun über die zur optischen Schiene führenden Spiegel so einjustiert, dass er diese beide Iriden bei minimaler Öffnung mittig passierte. Damit war eine feste Strahllage auf der Schiene erreicht, die leicht wiederherzustellen war, zum Beispiel wenn der Strahl durch Veränderung der Strahllage im Farbstofflaser verschoben wurde.

Um die Parallelität in der Ionenquelle zu verifizieren wurde eine Justagehilfe verwendet, die durch die Probenzuführung in die Quelle eingebracht wurde. Diese Justagehilfe hat zwei parallele Erhebungen, die in einem Abstand von 4 mm zur Probenträgeroberfläche eine feine Bohrung (Durchmesser kleiner als $100\ \mu\text{m}$) besitzen. Mit Hilfe der höhenverstellbaren Halter und der Verschiebetische konnte die optische Schiene nun so ausgerichtet werden, dass der Stahl die beiden Iriden auf der Schiene und die Bohrungen der Justagehilfe passiert, wodurch die Parallelität zur Probenträgeroberfläche gesichert ist. Der Strahlengang bei korrekter Justage ist in Abb. 3.3 gezeigt. Da die Bohrungen nicht auf der geometrischen Achse des TOF-MS lagen, ist es nun noch notwendig, den Postionisationslaser in der Höhe zu verschieben, da der Ablationsort auf dieser Achse liegt. Dies war dank der verstellbaren Halter in ausreichender Genauigkeit möglich.

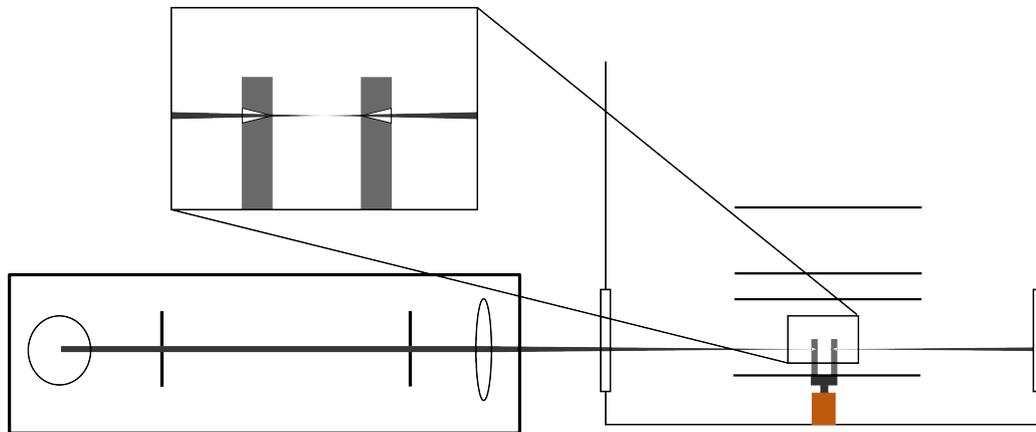


Abbildung 3.3.: Prinzip der Justagehilfe zur Einkoppelung des Postionisationslasers.

Um zu überprüfen, dass Ablationslaser und Postionisationslaser auf einer Höhe liegen, wurde eine weitere Justagehilfe verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Probenträger, auf dem ein Stück Millimeterpapier so befestigt wurde, dass es rechtwinklig vom Probenträger in die Ionenquelle ragte. Auf dem Papier konnte die Fluoreszenz der

beiden Laser beobachtet werden und so sichergestellt werden, dass beide Laser auf der selben Höhe lagen.

Der Laserstrahl wurde vom Postionisationslaser mit Spiegeln auf ein Prisma unterhalb der optischen Schiene geleitet. Mit Hilfe eines Prismas¹ wurde der Strahl durch ein Loch in der Schiene auf den oberhalb davon montierten Spiegel S1 (vgl. Abb. 3.2) gelenkt, welcher den Laserstrahl auf die Iriden I1 und I2 lenkte. Direkt vor der Ionenquelle war die Quarzglaslinse L1 ($f=+200$ mm) befestigt, die den Strahl in die Ionenquelle fokussierte. Der Fokuspunkt wurde so gewählt, dass er im Mittelpunkt des Ablationsplume lag, da das Zentrum des plume untersucht werden sollte. Der Fokuspunkt konnte über die schon beschriebene Millimeterpapierjustagehilfe bestimmt werden. Die zur Postionisation benötigte Leistung vor Eintritt in die Ionenquelle beträgt etwa $100 \mu\text{J}$. Nach dem Durchtritt durch die Ionenquelle wurde der Strahl mit dem Prisma P1 auf einen Papierschirm umgelenkt, dieser diente zur optischen Leistungskontrolle.

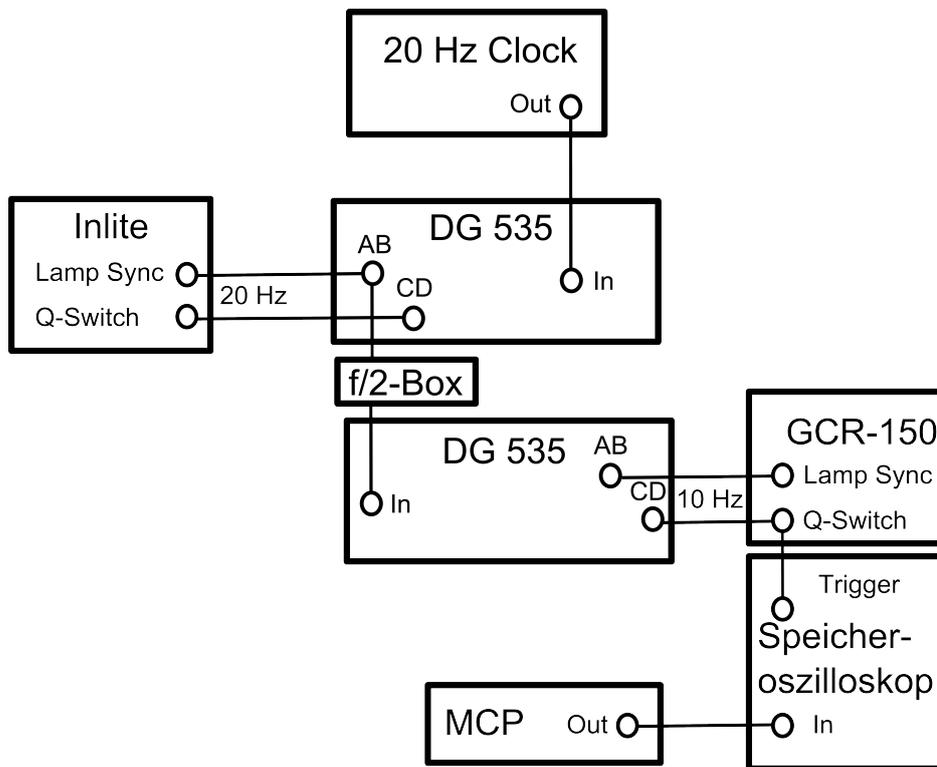


Abbildung 3.4.: Schaltplan des verwendeten Triggerschemas für die Postionisation.

¹Das Prisma war ebenfalls auf einem Verschiebetisch befestigt und konnte dadurch bei einer Verschiebung der optischen Schiene nachgeregelt werden, damit der Strahl den Spiegel auf der Schiene immer mittig trifft.

Um eine Geschwindigkeitsverteilung der ablatierten Neutralen aufnehmen zu können, ist es auch wichtig, dass das Delay (der zeitliche Abstand) zwischen Ablations- und Postionisationslaser exakt bekannt ist. Dies wurde dadurch erreicht, dass die Triggerrichtung der Laser aneinander gekoppelt wurde. Das Triggerschema ist auch in Abb. 3.4 dargestellt. Ausgangspunkt war hier, anders als zunächst zu erwarten, das Öffnen der Pockelszelle des Postionisationslasers. Mit Hilfe eines Delaygenerators (DG535, Stanford Research, Sunnyvale, Kalifornien, USA) wurde nun das Öffnen der Pockelszelle des Ablationslasers so eingestellt, dass es zu einem bestimmten Zeitpunkt (typischerweise $0,5\text{-}3\ \mu\text{s}$) vor dem nächsten Öffnen der Pockelszelle des Postionisationslasers lag. Da der Postionisationslaser mit der doppelten Frequenz (20 Hz) des Ablationslasers (10 Hz) betrieben wurde, ist nur jeder zweite Schuss des Postionisationslasers verwendet worden. Dieses auf den ersten Blick umständliche Verfahren musste gewählt werden, da hohe Anforderungen an die zeitliche Stabilität des Delays gegeben sind. Da üblicherweise das Delay in Schritten von 100 ns verändert wurde, ist ein *jitter* (zeitliche Schwankung der Laserpulse zueinander) von weniger als 10 ns erforderlich. Dies konnte mit einer Schaltung ausgehend vom Öffnen der Pockelszelle der Ablationslasers nicht erreicht werden, da der Frequenzgeber des GCR-150 zu starke zeitliche Schwankungen aufwies und zudem eine Frequenzverdopplung notwendig gewesen wäre, da der Postionisationslaser mit 20 Hz betrieben wurde. Dies ist mit einem größeren Fehler verbunden als die im verwendeten Aufbau durchgeführte Frequenzhalbierung. Die zeitliche Abfolge der einzelnen Triggerpulse ist in Abb. 3.5 dargestellt.

Die Einstellung und Überprüfung der Delays erfolgte über zwei Photodioden, die das Streulicht der beiden verwendeten Laser detektierten und deren Signale auf einem Oszilloskop (9310 A, Le Croy, Chestnut Ridge, New York, USA) angezeigt wurden. Die genaue Schaltung des Experimentes ist in den nachfolgenden Beschreibungen des verwendeten Postionisationslasers erklärt.

Als Postionisationslaser wurde ein modifizierter Jaguar C-Farbstofflaser eingesetzt, welcher von einem verdoppeltem Inlite Nd:YAG-Laser gepumpt wurde. Als Laserfarbstoff wurde Fluoreszin 27 in alkalischem Methanol eingesetzt, dieser Farbstoff lieferte Laserstrahlung im Bereich von 539-590 nm (Intensitätsmaximum bei 548 nm). Der Pumpstrahl wurde über zwei Beamsplitter geteilt und 80 % des Pumpstrahls wurden zum Pumpen des Farbstoffs verwendet, die anderen 20 % wurden über eine Delaystrecke zu einem BBO-Kristall geleitet, in welchem sie mit dem Farbstofflaserstrahl gemischt wurden. Die hierbei entstehende Summenfrequenz ergibt sich nach:

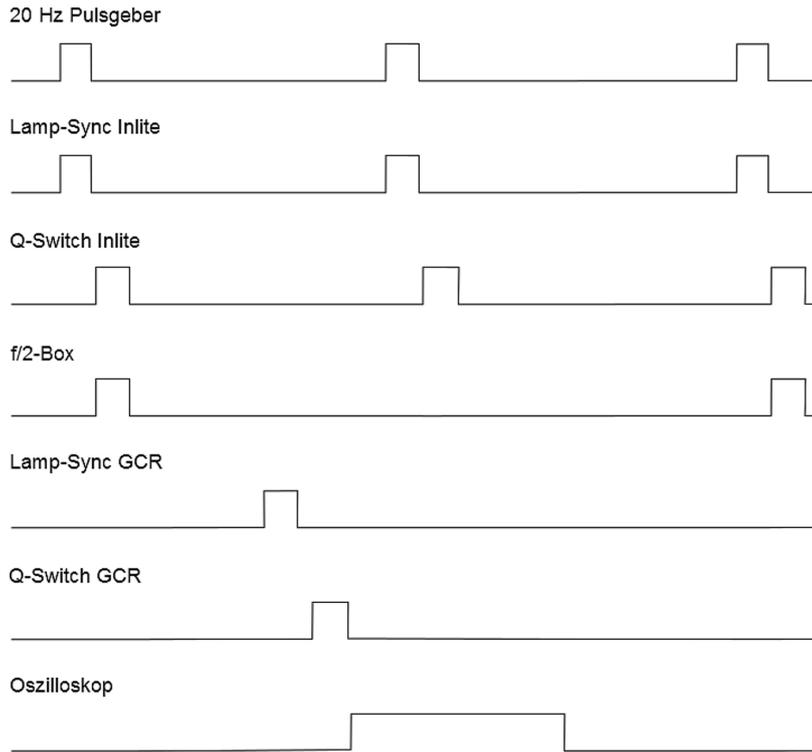


Abbildung 3.5.: Pulsdiagramm der Triggerkaskade für die Postionisationsexperimente.

$$\frac{1}{\lambda_{SUM}} = \frac{1}{\lambda_{YAG}} + \frac{1}{\lambda_{DYE}}. \quad (3.1)$$

Es konnten somit UV-Wellenlängen von 267-279 nm erzeugt werden. Die maximal erreichbare Leistung ist abhängig von der Leistung des Laserfarbstoffes bei der eingestellten Wellenlänge, im Maximum des Farbstoffes lag sie bei ca. $300 \mu\text{J}$. Die Pulslänge des Pumplasers beträgt 4-6 ns, die der erzeugten Mischwellenlänge beträgt ca. 8-10 ns. Die Linienbreite des Pumplasers ist mit 1 cm^{-1} angegeben, die Linienbreite des Farbstofflasers ist in einer vorherigen Arbeit^[124] näher untersucht worden. Für alle hier gezeigten Messungen wurde eine Postionisationswellenlänge von 272 nm verwendet.

Beim Triggering des Jaguar bzw. des Inlite als Pumplaser war eine externe Lösung erforderlich, da der interne Frequenzgeber die oben bereits erwähnten Anforderungen nicht erfüllte, hier kam es zu einem *jitter* in μs -Bereich. Auch eine Triggerung über den internen Frequenzgeber des DG 535-Delaygenerators zeigte keine verbesserten Ergebnisse. Dieser ist bei externer Ansteuerung notwendig, um das Delay zwischen dem Zünden der Blitzlampen und dem Öffnen der Pockelszelle einzustellen. Erst ein im Haus gefertigter 20 Hz-Frequenzgeber erfüllt alle Anforderungen, der *jitter* lag bei dieser Lösung unter

10 ns. Der Frequenzgeber triggerte dann den Delaygenerator, dieser erzeugte zwei Rechteckpulse (einen für die Blitzlampen, einen für den Q-Switch) mit variablem Abstand. Das Triggering des Ablationslasers erfolgte ausgehend von dem Puls für den Q-Switch des Inlite-Lasers, der vom oben erwähnten Delaygenerator erzeugt wurde. Es erfolgte zunächst eine Frequenzhalbierung, mit diesem Signal die Ansteuerung des zweiten Delaygenerators und von diesem die Ansteuerung des GCR-150.

Berechnung des Postionisationsortes aus Flugzeiten Um die Geschwindigkeit der postionisierten Neutralen zu bestimmen (die Grundlagen und vorherigen Arbeiten zu diesem Thema sind in Abschnitt 2.2.2 beschrieben) muss einerseits das Delay zwischen den beiden Lasern bekannt sein, andererseits muss die Strecke, die von den Teilchen in dieser Zeit zurückgelegt wurde, ermittelt werden. Dies kann über die Flugzeiten der postionisierten Moleküle erfolgen. Die Postionisation wird in der ersten Beschleunigungsstrecke durchgeführt, von daher erfahren die postionisierten Teilchen aufgrund ihres weiter vom Repeller entfernten Ionisationsortes eine geringere Beschleunigung als die prompten Ionen. (Siehe auch Abschnitt 2.1.2 für eine theoretische Erklärung dieses Effektes.) Der Unterschied der Flugzeit zwischen den prompten und den postionisierten Ionen setzt sich dann aus dem Delay und der der Verlängerung der Flugzeit durch die geringere Beschleunigung zusammen. Es ist dabei auch zu beachten, dass die prompten MALDI-Ionen protonierte Ionen sind, wogegen die postionisierten Teilchen als Radikalkationen auftreten; dieser Massenunterschied führt zu einem weiteren Unterschied in der Flugzeit dieser beiden Signale.

$$TOF_{ges} = TOF_{theo} + t_{Delay} + t_{ex} \quad (3.2)$$

Da die Geometrie und die Beschleunigungsspannungen des verwendeten Gerätes sehr genau bekannt sind,² kann die theoretische Flugzeit (TOF_{theo}) eines Ions, das auf der Probenträgeroberfläche gebildet wird, berechnet werden (siehe Gl. 3.2). Aus diesem Wert und der gemessenen Flugzeit kann die Verlängerung der Flugzeit (t_{ex}) durch die geringere Beschleunigung berechnet werden. Von der aus dem Spektrum erhaltenen Flugzeit (TOF_{ges}) muss noch das Delay (t_{Delay}) abgezogen werden, da der Start der Spektrenaufnahme und die Postionisation zeitlich versetzt stattfinden. Aus der Differenz von gemessener und theoretischer Flugzeit kann die Beschleunigungsspannung bestimmt werden,

²Die Bestimmung dieser Werte und Einzelheiten zur Berechnung des Postionisationsortes sind bei Walbrodt^[15] ausführlich beschrieben.

die das postionisierte Molekül erfahren hat. Da das Potential und die Länge der ersten Beschleunigungsstrecke bekannt sind, kann aus der errechneten Beschleunigungsspannung der Postionisationsort bestimmt werden.

Hierbei ist anzumerken, dass die Spannung der ersten Beschleunigungsstrecke entgegen dem üblichen Aufbau einer zweistufigen Ionenquelle bei mehreren kV lag, da die Berechnung des Postionisationsortes über den Ortsfehler der Quelle (vgl. Abschnitt 2.1.2) erfolgt, eine Verkleinerung dieses Fehlers wie bei einem Wiley-McLaren-Aufbau ist hier nicht erwünscht.

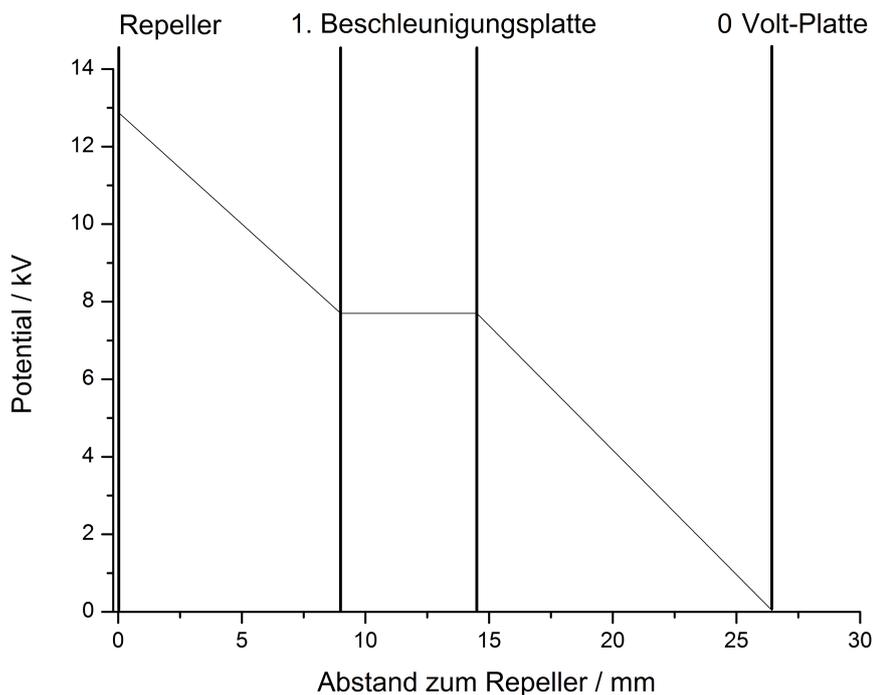


Abbildung 3.6.: Verlauf der Beschleunigungsfelder in der verwendeten Ionenquelle.

Der verwendete Feldverlauf der Ionenquelle ist in Abb. 3.6 gezeigt. Wird der feldfreie Raum zwischen den beiden Beschleunigungsstufen nicht betrachtet, so ergibt sich ein annähernd linearer Potentialgradient über den gesamten Beschleunigungsbereich. Nimmt man eine Lage des Postionisationsortes 0,5 mm von der Repellerplatte entfernt an (dies stellt einen typischen Wert für die Messungen dar), so ergibt sich eine Beschleunigungsspannung, die an diesem Punkt um 300 V gegenüber dem Repeller erniedrigt ist. Mit Gl. 2.4 kann nun berechnet werden, dass für eine Ionenmasse von 189 Da (Masse des photoionisierten CHCA-Radikalkations) eine Verlängerung der Flugzeit von 0,23 μs resultiert. Die theoretische Flugzeit bei Ionisation in der Repellerebene liegt bei 18,37 μs ;

diese Differenz ist in den Flugzeitspektren problemlos zu bestimmen. Verringert man die Potentialdifferenz in der ersten Beschleunigungsstrecke auf ca. 10 % der Gesamtdifferenz (1200 V) so beträgt bei 0,5 mm Abstand zum Probenträger die Flugzeitverlängerung nur noch $0,08 \mu\text{s}$ (resultierend aus 75 V Potentialdifferenz). In typischen Wiley-McLaren-Ionenquellen liegen die Beschleunigungsspannungen im ersten Beschleunigungsfeld noch niedriger, so dass keine sicher messbare Erhöhung der Flugzeit der postionisierten Neutralteilchen mehr möglich wäre, da die Flugzeiterhöhungen unterhalb des *jitter* der beiden Laser zueinander lägen.

Zur Bestimmung des Postionisationsortes aus den Flugzeitspektren einer Messreihe wurden aus jedem Spektrum die Flugzeiten am Signalmaximum des Radikalkations der Matrix aus der Postionisation bestimmt. Eine Berechnung des Ionisationsortes aus Flugzeiten von Fragmentionen ist auch denkbar, hierbei kann es aber zu fehlerhaften Werten kommen, da es durch die Fragmentierung zum Auftreten eines *kinetic energy release* kommen kann, der die Flugzeit der Fragmentionen beeinflusst.^[125] Von den Ionenflugzeiten wurde das jeweils in der Messung eingestellte Delay abgezogen, um die wirkliche Flugzeit zu erhalten. Anschließend wurde der Mittelwert der korrigierten Flugzeiten aus allen Spektren der Messreihe gebildet und anhand dieses Wertes mit Hilfe von Gl. 2.4 die Potentialdifferenz berechnet, mit der die Ionen beschleunigt wurden. Mit diesem Wert war es dann möglich, den Postionisationsort zu errechnen.

Eine Berechnung der Probendicke aus den Flugzeiten der prompten Ionen ist theoretisch denkbar, allerdings ist dieser Wert im Vergleich zur Beschleunigungsstrecke recht gering und die Ionenbildung kann auch in der Gasphase oberhalb der Probe stattfinden. Des Weiteren treten im MALDI-Ablationsprozess weitere Effekte auf, die die Flugzeit beeinflussen (siehe 2.1.2), so dass eine ausreichende Aussagekraft nicht gegeben ist.

3.2.2. Datenverarbeitung

Auch bei der Messung an sich und der nachfolgenden Verarbeitung der erhaltenen Daten sind einige wichtige Punkte zu beachten, um schließlich als Ergebnis der Messungen die Geschwindigkeitsverteilung der ablatierten Neutralteilchen zu erhalten. Im Folgenden wird auf diese Punkte eingegangen.

Messung

Der Probenträger wurde nach dem Trocknen der Probe in die Ionenquelle eingeschleust, wobei die Probe zuerst in den Vorvakuumbereich bei ca. 1×10^{-2} mbar eingebracht wurde. Dann wurde das Ventil zur Vorpumpe geschlossen, das Ventil zur Ionenquelle geöffnet und der Probenträger über die Schubstange auf die vorgesehene Position im Repeller gebracht, so dass der Probenträger mit seiner Fräbkante in der dafür vorgesehenen Öffnung im Repeller einrastete. Durch das Einrasten war eine reproduzierbare Position des Probenträgers gegeben. Dann wurde bei geblocktem Postionisationslaser die Leistung des Ablationslasers so eingestellt, dass sie knapp über der *fluence threshold* der Probe lag. Bei gleicher verwendeter Matrix und Präparationsmethode wurden hier bei verschiedenen Proben sehr ähnliche Leistungen benötigt. Die Ablationsleistung wurde im weiteren Verlauf der Messung nicht mehr verändert, da sich, neben einer Erhöhung der Menge an ablatiertem Material mit der Leistung auch die Fragmentierungsrate veränderte und die *chemical noise* zunahm, wodurch die Vergleichbarkeit der Messungen untereinander nicht mehr gegeben gewesen wäre. Nun wurde der Postionisationslaser freigegeben und der Probenträger gedreht, bis ein Spot gefunden wurde, auf dem sowohl ein konstantes Postionisationssignal als auch ein konstantes promptes Signal erhalten wurden. Nun wurde einige Sekunden gewartet, bis sich die Signalintensitäten nicht mehr stark änderten; zu diesem Zeitpunkt wurde die Aufnahme durch das Speicheroszilloskop (TD540A, Tektronix, Beaverton, Oregon, USA) gestoppt.

Das Auslesen des Speicheroszilloskops wurde durch ein Labview-Programm realisiert. Es wurden vom Speicheroszilloskop jeweils 30 Einzelmessungen gemittelt, um das S/N-Verhältnis zu verbessern. Da der Ablationslaser mit 10 Hz betrieben wurde, waren an dem gemittelten Spektrum folglich die Einzelspektren der letzten drei Sekunden beteiligt.

Dann wurden die ausgelesenen Daten in eine ASCII-Datei gespeichert, während dieser Zeit wurde der Ablationslaser geblockt, um einen unnötigen Probenabtrag zu verhindern. Dann wurde das Delay verändert, anschließend die Laser wieder freigegeben und es wurde gewartet, bis wieder ein konstantes Signal erhalten wurde. Die Messung wurde entsprechend fortgeführt, bis alle gewünschten Messwerte erhalten waren.

Zur Aufnahme der Intensitätswerte für eine Geschwindigkeitsverteilung wurde zunächst ein Delay eingestellt, bei dem ein intensives Postionisationssignal zu erkennen war, um den Probenträger so einzustellen, dass ein möglichst großes Signal erhalten wurde. Von

diesem Wert aus wurde das Delay dann in $0.1 \mu\text{s}$ Schritten verringert, bis ein Wert erreicht wurde, an dem keine Postionisationssignale mehr erhalten wurden. Dann wurde das Delay um $0.05 \mu\text{s}$ verringert um sicherzustellen, dass wirklich der Zeitpunkt gefunden wurde, bei dem noch keine Moleküle aus der Ablation den Postionisationsort erreichen. Anschließend wurde das Delay von diesem Wert aus wieder in $0.1 \mu\text{s}$ Schritten erhöht und jeweils ein Flugzeitspektrum aufgenommen, bis ein Delaywert erreicht wurde, bei dem keine Postionisationssignale mehr sichtbar waren. Der Messbereich lag normalerweise zwischen 0.5 und $6 \mu\text{s}$, wobei hier auch der Postionisationsort eine Rolle spielt, je kleiner der Abstand zum Probenträger ist, desto kleiner sind auch die Delayzeiten.

Auswertung

Das Oszilloskop zur Aufzeichnung der Flugzeitspektren wurde von einem Labview-Programm ausgelesen, für Einzelheiten dieses Programm betreffend sei auf Muskat^[76] verwiesen. Das Programm wurde für die Verwendung eines OPO-Systems als Postionisationslaser entwickelt, konnte aber zur Aufnahme der Massenspektren in dieser Arbeit unverändert genutzt werden. Eine Verwendung der Leistungsdaten des Postionisationslaser stellte sich im Fall der ionischen flüssigen Matrices als nicht sinnvoll heraus. Das vom Speicheroszilloskop aufgenommene und gemittelte Flugzeitspektrum wurde über das Labview-Programm in einer ASCII-Datei gespeichert.

Die ASCII-Datei wurde über ein Labtalk-Script in das Programm Origin 7.5 (Originlab, Northampton, Massachusetts, USA) eingelesen. Dabei wurden einige mathematischen Operationen automatisch durchgeführt: Zunächst wurde der Teil des Spektrums, der für die Auswertung nicht von Interesse war, gelöscht. Das aufgenommene Spektrum bestand aus 50000 Punkten bei einer aufgenommenen Flugzeit von $50 \mu\text{s}$; hiervon wurden die ersten $5 \mu\text{s}$ und die letzten $15 \mu\text{s}$ verworfen, da sich in diesen Bereichen keine für die Auswertung wichtigen Massensignale befanden, die benötigte Rechenzeit aber deutlich gesenkt werden konnte. Da letztendlich die Signalintegrale benötigt wurden, musste eine Basislinienkorrektur vorgenommen werden, um sicherzustellen, dass die Nulllinie des Spektrums bei verschiedenen Messungen immer auf den gleichen Wert lag. Hierzu wurde über das Script der Median der Messdaten ermittelt³ und von allen Werten subtrahiert.

Der verwendete Detektor gibt negative Spannungen aus, dies wurde im Weiteren auch beibehalten, so dass ein Peak im Flugzeitspektrum einen negativen Ausschlag

³Bei den verwendeten Desorptionsleistungen war eine über das Spektrum einheitliche Basislinie zu erkennen, daher ist es legitim, einen konstanten Wert für die Basislinie zu verwenden.

darstellt. Um dem Detektorrauschen entgegenzuwirken, wurde das Spektrum anschließend geglättet (*adjacent averaging*, Berechnung eines Punktes aus den 10 umliegenden Punkten). Hierbei kann die Auflösung verschlechtert werden, dies war allerdings kein großer Nachteil, da hauptsächlich die Integrale der Signale von Interesse waren. Anschließend wurde das Spektrum automatisch durch das Programm geplottet. Die Integration der Postionisationssignale erfolgte über die programmeigene Integrationsroutine. Die Integrationsgrenzen mussten hierbei für jeden Peak manuell bestimmt werden, da sich die Lage der Postionisationspeaks mit dem Delay verschiebt. Teilweise kommt es zu Überlappungen von prompten und Postionisationssignalen und die Festlegung der Grenzen konnte dadurch nicht automatisch vorgenommen werden.

Bei den Geschwindigkeitsverteilungen wurden die Intensitätswerte der jeweiligen Postionisationssignale über die Geschwindigkeit aufgetragen (zur Errechnung der Geschwindigkeit aus dem Abstand des Postionisationsortes vom Probenträger und dem Delay siehe Abschnitt 3.2.1) und es wurden (eine oder mehrere) verschobene Maxwell-Boltzmann-Verteilungen mit Hilfe des Programms Fityk^[126] an die Werte angepasst. (Näheres hierzu ist sich auch in Abschnitt 2.2.2 zu finden.) Aus der Geschwindigkeitsverteilung konnten die häufigste Geschwindigkeit, die Strömungsgeschwindigkeit und die Translations-temperatur des Ablationsplume erhalten werden. Zwischen dem Delay der Laser zueinander und der Geschwindigkeit der ionisierten Moleküle besteht ein reziproker Zusammenhang. Dies ist in Abb. 3.7 an einem gemessenen Datensatz dargestellt. Wie darin zu erkennen ist, führt die Verwendung eines konstanten Zeitabstandes zwischen den einzelnen Messpunkten zu einem zunehmenden Abstand der Messpunkte zueinander in der Geschwindigkeitsdomäne. Da der Großteil der detektierten Teilchen sich im mittleren Geschwindigkeitsbereich befindet, entsteht dadurch aber kein merklicher Fehler. Eine Messung mit konstanten Geschwindigkeitsabständen ist zudem nicht ohne Weiteres möglich, da hierfür zur Berechnung der benötigten Delays der Postionisationsort bekannt sein muss, dieser aber erst aus den Massenspektren bestimmt wird. Zudem ist die Kontrolle des Delays über das Signal der Photodiode bei kleineren Delayabständen, die sich im Bereich hoher Geschwindigkeiten ergeben würden, erschwert und der Fehler durch den *jitter* der Laser zueinander würde deutlich steigen.

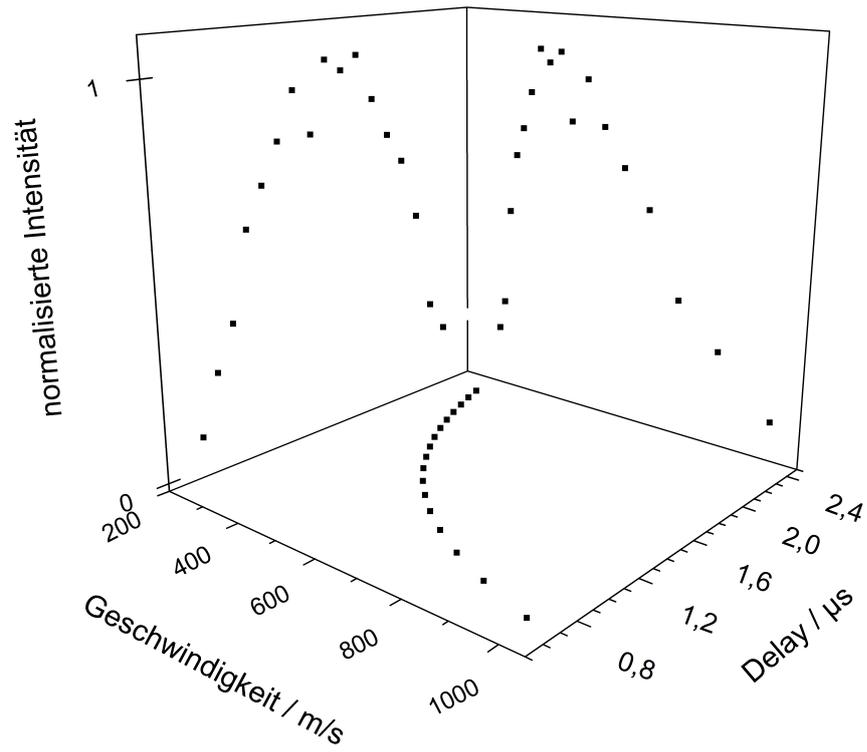


Abbildung 3.7.: Zusammenhang zwischen Delay und errechneter Geschwindigkeit in einem Messdatensatz von 3,5-DHB/Butylamin.

3.2.3. Ergebnisse

Ein Problem, das bei den Messungen von Geschwindigkeitsverteilungen der ablatierten Neutralteilchen fester Matrices auftritt, ist die starke Streuung der erhaltenen Signalintensitäten. Diese Schwankungen sind zu einem gewissen Teil dadurch bedingt, dass die Leistung der verwendeten Laser zur Ablation und zur Postionisation gewissen Schwankungen unterworfen ist. Dieser Effekt kann durch die Mittlung einer höheren Anzahl von Postionisationsspektren bei gleichen Versuchsbedingungen deutlich abgeschwächt werden, dennoch bleibt weiterhin eine große Varianz in den Intensitätswerten bestehen. Diese sind dadurch zu erklären, dass die feste Matrix nicht gleichmäßig über den Proben Träger verteilt ist und auch die Größe der Matrixkristalle unterschiedlich ist. Das kann einen starken Einfluss auf die Menge des ablatierten Materials haben; zur Korrektur ist eine Korrelation der Postionisationsintensität und der Intensität der prompten MALDI-Signale denkbar. Dies setzt voraus, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der prompten Ionen und der Menge des ablatierten Materials besteht, dieser ist aber nicht bewiesen. Weiterhin ist es durch den Probenabtrag notwendig, den Ablationsort auf dem Proben Träger kontinuierlich zu verändern. Durch die unregelmäßige Textur der Probe kann nicht sichergestellt werden, dass der Ablationsplume sich dabei immer gleichmäßig und von einer gleichbleibenden Probendicke ausgehend in das Vakuum ausbreitet. Für die Messung sinnvoller und vergleichbarer Postionisationsspektren und Geschwindigkeitsverteilungen ist es aber notwendig, dass die Photoionisation immer am gleichen Ort innerhalb des *plume* stattfindet, da dieser eine ungleichmäßige Verteilung der Teilchendichte aufweist.

Die Verwendung von flüssigen Matrices umgeht die eben erwähnten Probleme, die von der Kristallisation der Probe hervorgerufen werden. Bei diesen Matrices ist es möglich, über lange Zeiträume Spektren gleichbleibender Intensität zu erhalten, was auf eine Regeneration der Probe am Ablationsort schließen lässt. Nur bei sehr geringen Schichtdicken und extrem hohen Ablationslaserflüssen war ein kompletter Probenabtrag am Ort des Laserbeschusses zu beobachten. Bei den verwendeten Laserflüssen und der Wiederholungsrate von 10 Hz scheint sich ein Gleichgewicht zwischen Ablation und Regeneration der Probe auszubilden, so dass die Zeit zwischen den Laserschüssen ausreicht, um das abgetragene Material zu ersetzen. Jeder Ablationsvorgang findet also unter denselben Startbedingungen statt. Wie im Folgenden gezeigt wird, ist eine deutliche Verringerung der Streuung der einzelnen Messwerte bei der Verwendung flüssiger Matrices erhalten worden. Abb. 3.8 zeigt die Postionisationssignale des DHB-Radikalkations in

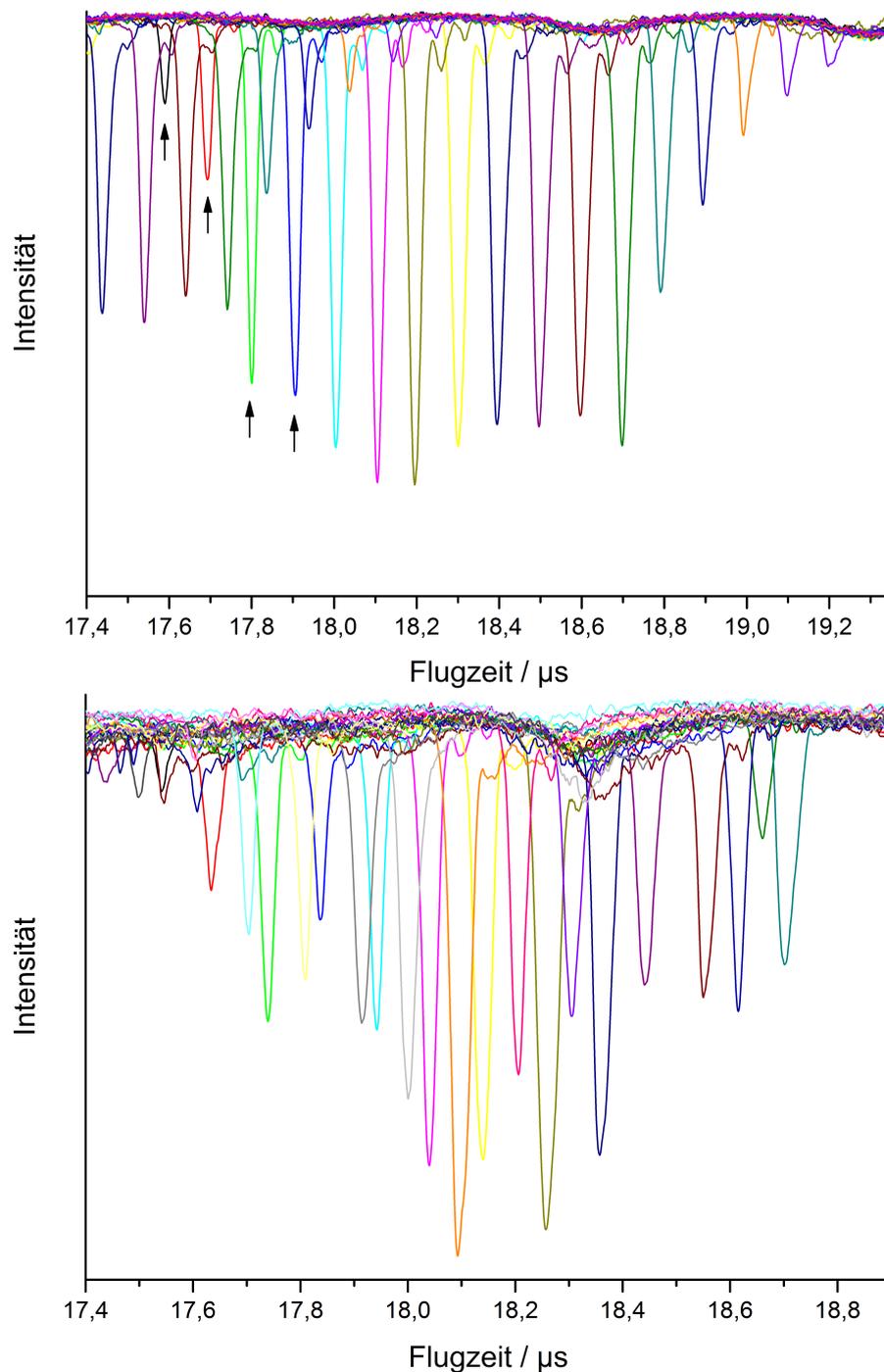


Abbildung 3.8.: Ausschnitt aus Flugzeitspektren bei unterschiedlichen Postionisationsdelays. Oben sind die Signale des Radikalkations von 3,5-DHB/Butylamin gezeigt, unten von 2,5-DHB. Die Pfeile im oberen Spektrum kennzeichnen die Signale des Radikalkations im entsprechenden Bereich, die dort zusätzlich sichtbaren Signale stammen von einer Fragmentation aus der Postionisation bei hohen Delayzeiten.

den Flugzeitspektren einer festen 2,5-DHB-Probe und einer ionischen Flüssigkeit (3,5-DHB/Butylamin). Hier ist gut zu erkennen, dass die Intensitäten der ILM eine weitaus geringere Streuung aufweisen und deutlich besser dem erkennbaren allgemeinen Trend folgen.

Ionische Flüssigkeiten weisen zudem einen verschwindend geringen Dampfdruck auf, der dem fester Matrices ähnelt. Andere Flüssigmatrices, wie z.B. das auch mittels Postionisation untersuchte 3-Nitrobenzylalkohol^[122] verdampfen im Hochvakuum noch merklich, was einerseits dazu führt, dass die Probendicke kontinuierlich abnimmt und von daher der Abstand zwischen Probenoberfläche und Postionisationsort stetig zunimmt. Zum anderen ist der Siedepunkt dieser Flüssigkeiten im Hochvakuum sehr niedrig, so dass ein thermischer Ablationsvorgang deutlich wahrscheinlicher wird und die Vergleichbarkeit mit festen Matrices deutlich weniger gegeben ist.

Dihydroxybenzoesäure

Wie schon unter 2.2.3 erwähnt, weisen die verschiedenen Dihydroxybenzoesäure-Isomere stark unterschiedliche Eigenschaften bei der Verwendung als Matrix auf. Dies ist unter anderem auf die Kristallisationseigenschaften der einzelnen Isomere zurückgeführt worden.^[54] Vor allem die Einbettung der Analytmoleküle in die Matrixkristalle scheint hier eine große Rolle zu spielen. Untersuchungen zur Gasphasenionisierung haben im Gegensatz dazu gezeigt, dass hier andere Isomere eine mindestens vergleichbare Eignung zur Bildung von protonierten Analytmolekülen zeigen.^[127] Die Verwendung von ionischen Flüssigkeiten der verschiedenen Isomere ermöglicht es, den Einfluss der Kristallisation zu eliminieren, und kann so zu weiterführenden Erkenntnissen über die zugrundeliegenden Parameter führen.

Allerdings ergibt sich bei der Verwendung von ionischen Flüssigkeiten eine zusätzliche, schwer vor herzusagende Variable: Ob eine Kombination der jeweiligen Säure mit der gewählten Base auch zur Bildung einer ILM führt, kann nur experimentell bestimmt werden. In diesem Teil der Arbeit wurden drei verschiedene, aus der Literatur^[94] bekannte, organische Amine als Gegenionen zu den DHB-Isomeren getestet: Butylamin, Tributylamin und Triethylamin. Aus den möglichen Kombinationen dieser Basen mit den Dihydroxybenzoesäure-Isomeren bildete nur ein geringer Teil eine RTIL, die eine Messung im Hochvakuum ermöglichte. Die daraus erhaltenen Erkenntnisse über den Ablationsvorgang werden im Folgenden vorgestellt.

3,5-Dihydroxybenzoesäure/Butylamin Um festzustellen, ob andere DHB-Isomere als das 2,5-Isomer für eine Postionisationsuntersuchung als ILM zugänglich sind, wurde zunächst das 3,5-Isomer ausgewählt, da dieses in den optischen und thermodynamischen^[81] Eigenschaften der 2,5-DHB am ähnlichsten ist. Zudem weißt es als einziges Isomer neben der 2,5-DHB als Feststoff eine ausreichende Absorption bei 266 und 355 nm auf.^[54] In Kombination mit den oben aufgeführten Basen wurde unter Verwendung vom Butylamin eine RTIL erhalten, die eine Untersuchung der Ablation zuließ.

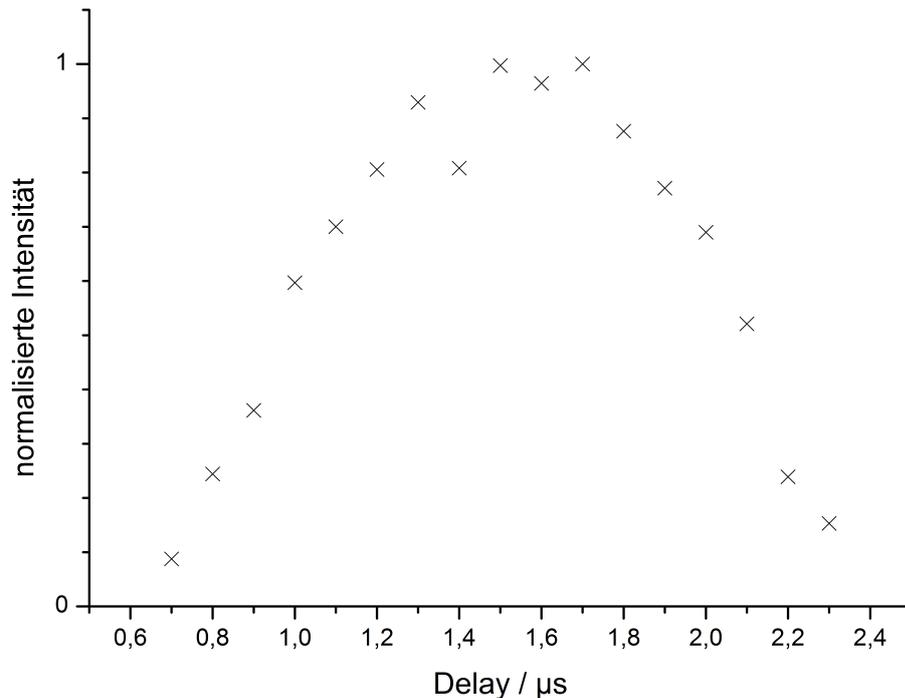


Abbildung 3.9.: Intensitätsverteilung des postionisierten Radikalkations von 3,5-DHB in Abhängigkeit des Delays.

Die hier gezeigten Ergebnisse der Postionisationsuntersuchungen wurden alle bei einer Ablationswellenlänge von 266 nm erhalten. Bei Verwendung der 3. Harmonischen des Nd:YAG-Lasers (355 nm) war schon bei Laserflüssen unterhalb der *fluence threshold* das Ausbilden einer Blase am Ort des Laserbeschusses zu erkennen. Diese Blase wuchs unter weiterem Laserbeschuss auf Größen von bis zu 1 mm an, bevor sie sich auflöste. Direkt im Anschluss an das Zusammenfallen der Blase fing eine weitere Blase an, sich zu bilden. Der Laser traf dabei auf die Oberfläche der Blase, so dass der Ablationsort ständigen Änderungen in der Position innerhalb der Ionenquelle unterlag. Dies führt einerseits zu deutlichen Schwankungen in der Flugzeit der prompt gebildeten Ionen, da diese, wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, vom Ionisationsort abhängt. Andererseits

ändert dieser Effekt auch kontinuierlich die Distanz zwischen dem Ablations- und den Postionisationsort. Da für verlässliche Intensitätswerte eine Mittelung über eine größere Zahl an Flugzeitspektren für jeden Delaywert bei konstanten Versuchsbedingungen nötig ist, ist eine Messung bei dieser Ablationswellenlänge nicht möglich gewesen. Dieser Effekt konnte bei allen DHB-Isomeren beobachtet werden, so dass diese Stoffe nur mit einer Wellenlänge von 266 nm ablatiert werden konnten. Die Ursache dieses Effektes ist unklar, es ist aber auch in anderen Systemen die Entstehung von Gasblasen an der Grenzfläche zwischen Festkörper und Flüssigkeit beobachtet worden.^[128] Möglich ist, dass eine zu geringe Absorption bei 355 nm, hervorgerufen durch eine Verschiebung der Absorption bei der Bildung der ionischen Flüssigkeit (siehe hierzu auch Abb. 3.16), dazu führt, dass der Laserpuls auf den Probenträger trifft und dort die Blasenbildung auslöst.

In Abb. 3.9 ist die Intensitätsverteilung des 3,5-DHB-Radikalkations gezeigt. Aus den Flugzeiten der Postionisationssignale wurde ein Abstand von 0,69 mm des Postionisationsortes zur Probenträgeroberfläche berechnet. Die Intensitätswerte wurden normiert, der höchste Intensitätswert wurde hierbei auf einen Wert von 1 gesetzt.

Die schnellsten Neutralteilchen erreichen den Postionisationsort nach ca. $0,7 \mu\text{s}$, die Intensität steigt bis zu einem Maximum bei ca. $1,5 \mu\text{s}$. Danach folgt eine Abnahme, bis bei Delayzeiten von mehr als $2,4 \mu\text{s}$ keine nachionisierten Teilchen mehr detektiert werden konnten. Bis auf geringe Schwankungen der Intensitätswerte in der Nähe des Maximums ist deutlich zu erkennen, dass die Intensitätswerte einem klaren Trend folgen. Anstieg und Abnahme im Bereich niedriger und hoher Delays erscheinen in dieser Darstellungsform annähernd vergleichbar, dies ist aber der Auftragung über die Delaywerte geschuldet. Der Zusammenhang zwischen Delay und Geschwindigkeit ist in Abb. 3.7 gezeigt. Wird, wie in Abb. 3.10, eine Auftragung der Intensitäten über die errechnete Geschwindigkeit der Teilchen durchgeführt, so ist zu erkennen, dass im niedrigeren Geschwindigkeitsbereich ein steiler Intensitätsanstieg auftritt, der bei ungefähr 300 m/s startet. Das Maximum wird bei Werten knapp oberhalb von 400 m/s erreicht, danach folgt eine langsamere Abnahme der Teilchenhäufigkeit, die schnellsten ablatierten Neutralen konnten bei Geschwindigkeiten um 1000 m/s detektiert werden. In der Abbildung ist zusätzlich die Geschwindigkeitsverteilung gezeigt, die durch das Anfitzen einer verschobenen Boltzmann-Verteilung an die Messwerte erhalten wurde. Hier ist deutlich sichtbar, dass die Intensitätswerte nur im Bereich des Maximums zufriedenstellend durch die Verteilungsfunktion wiedergegeben werden. Im niedrigen Geschwindigkeitsbereich ist die steile Zunahme der Intensität der Messpunkte nur sehr ungenügend zu erkennen,

die theoretische Verteilung sagt das Auftreten der Neutralen in merklicher Intensität fälschlicherweise ab ca. 100 m/s voraus. Auch das andere Ende der Geschwindigkeitsskala ist ungenügend beschrieben, ab Geschwindigkeiten über 700 m/s liegen die gemessenen Werte deutlich über den Vorhergesagten.

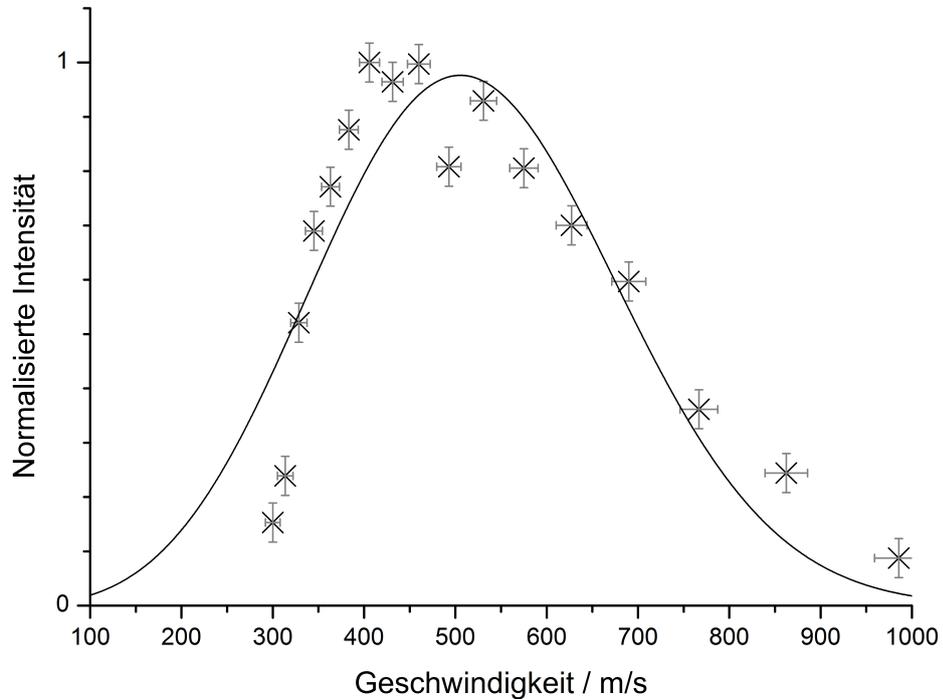


Abbildung 3.10.: Intensitätsverteilung des 3,5-DHB Radikalkations aus einer 3,5-DHB/Butylamin-Probe in Abhängigkeit der Neutralengeschwindigkeit mit angefitteter Geschwindigkeitsverteilung.

Die ungenügende Übereinstimmung der Verteilungsfunktion mit den Messwerten ist auch bei Betrachtung des R^2 -Wertes des Fits zu erkennen. Dieser Wert, auch Bestimmtheitsmaß genannt, gibt an, wie gut die Varianz einer abhängigen Variablen (hier die Abhängigkeit der Intensität von der Teilchengeschwindigkeit) durch ein statistisches Modell (in diesem Fall die verschobene Geschwindigkeitsverteilung) erklärt wird. Je näher dieser Wert an 1 liegt, desto besser ist der Zusammenhang zwischen Messwerten und Regressionsfunktion.

Für die in Abb. 3.11 gezeigte Verteilung wurde ein R^2 -Wert von 0,815 erhalten. Dies lässt angesichts der geringen Streuung der gemessenen Intensitäten darauf schließen, dass die gemessene Intensitätsverteilung nicht durch das Modell eines Ablationsvorganges, resultierend in einer verschobenen Geschwindigkeitsverteilung, beschrieben werden kann.

Dies wird auch ersichtlich, wenn der typische Verlauf einer Maxwell-Boltzmann-Geschwindigkeitsverteilung betrachtet wird. Ein so steiler Anstieg der Intensität, wie er in den Messwerten zwischen 300 und 400 m/s erkennbar ist, ist nicht mit dem langsamen Abnehmen zwischen 400 und 1000 m/s vereinbar. Um diese beiden gegensätzlichen Verläufe wiederzugeben ist die Verwendung von zwei Verteilungsfunktionen notwendig, wobei eine Funktion den Intensitätssprung bei niedrigeren Geschwindigkeiten abbildet. Die zweite Funktion beschreibt hingegen hauptsächlich die Abnahme der Intensität bei höheren Geschwindigkeitswerten, zeigt aber zudem auch über den gesamten Geschwindigkeitsbereich eine deutliche Intensität. Der resultierende Fit ist in Abb. 3.11 im Vergleich mit dem Fall einer Geschwindigkeitsverteilung gezeigt.

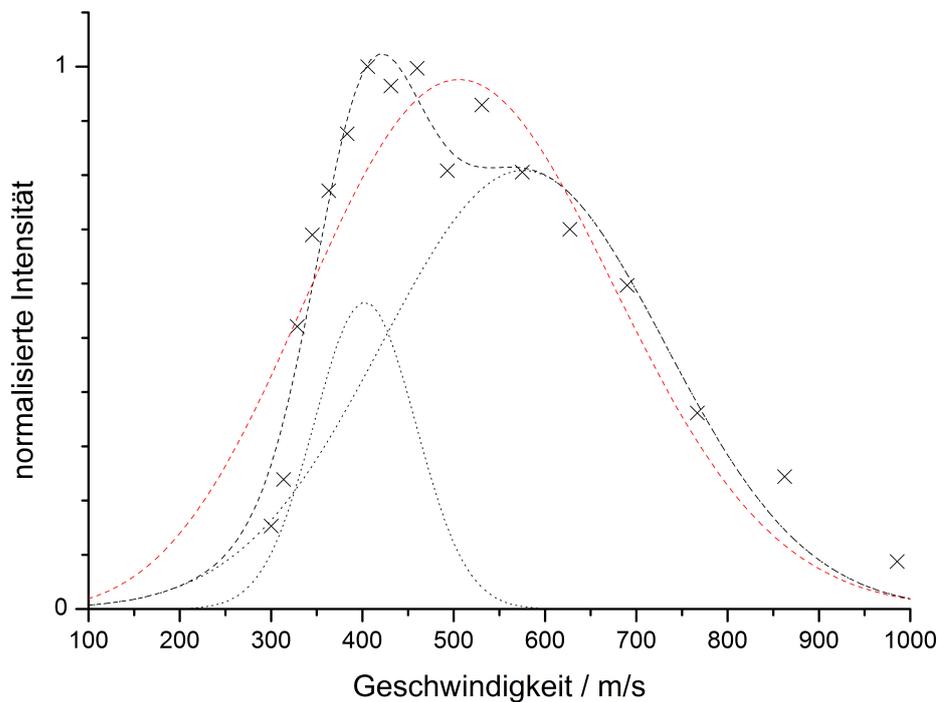


Abbildung 3.11.: Vergleich des Fits von einer (rot) und zwei Geschwindigkeitsverteilungen (schwarz). Im Fall der binären Verteilung sind die einzelnen Verteilungen gepunktet und die Summe gestrichelt dargestellt.

Wie gut zu erkennen ist, wird der Verlauf der Intensität durch die Summe der beiden Verteilungsfunktionen über den gesamten Geschwindigkeitsbereich sehr gut wiedergegeben. Dies wird auch durch einen R^2 -Wert von 0,952 für die Einhüllende bestätigt. Eine der beiden Verteilungen erstreckt sich über den kompletten Bereich zwischen 100 und 1000 m/s mit einem Intensitätsmaximum bei 580 m/s, die andere hingegen ist deutlich schmaler und zeigt nur bei Werten oberhalb von 250 m/s und unterhalb von 550 m/s In-

tensität, wobei das Maximum der Verteilung bei 400 m/s liegt. Der Verlauf der breiteren Verteilung entspricht weitestgehend dem erwarteten Verlauf einer Geschwindigkeitsverteilung mit einem langsamen Anstieg der Funktion ausgehend von sehr langsamen Geschwindigkeiten.⁴ Ab Werten von über 600 m/s wird die abnehmende Gesamtintensität ausschließlich durch diese Funktion beschrieben.

Die zweite Verteilung hingegen zeigt ein sehr ungewöhnliches Verhalten. Unterhalb von ca. 250 m/s ist keine Intensität vorhanden, was bedeutet, dass es keine Teilchen aus dem zugrundeliegenden Ablationsprozess gibt, die eine Geschwindigkeit in diesem Bereich besitzen. Dies erscheint unrealistisch, da auch bei einem Ablationsprozess, der Teilchen mit einer stark ausgeprägten Strömungsgeschwindigkeit ausstößt, bei den gegebenen Zeiträumen und Teilchendichten sich eine breitere Verteilung der Geschwindigkeiten einstellen sollte. Um hier einen Messfehler auszuschließen wurde eine zweite Geschwindigkeitsverteilung mit unveränderten Parametern aufgenommen, diese ist in Abb. 3.12 gezeigt.

Hier ist eindeutig festzustellen, dass der Intensitätsverlauf der zweiten Messung dem der Ersten sehr ähnlich ist. Die Verteilungen sind leicht (um ca. 10 - 20 m/s) zu niedrigeren Geschwindigkeiten verschoben, ein Fehler, der noch im Bereich dessen liegt, was durch die leichten Ungenauigkeiten bei der Bestimmung des Postionisationsortes zu erklären ist. Die Maxima der Verteilungen liegen bei 390 m/s für die schmale und 560 m/s für die breite Verteilung. Die schmalere Verteilung erstreckt sich über einen etwas größeren Bereich als in der ersten Messung, entspricht aber so immer noch nicht den theoretischen Erwartungen. Der R^2 -Wert für diesen Fit liegt bei 0,954. Durch die gute Übereinstimmung von Messwerten und theoretischen Verteilungen, und die Ähnlichkeit der beiden Messungen zueinander, ist somit auszuschließen, dass ein Messfehler in der ersten Messung vorlag.

Auch in der zweiten Messung ergibt sich der Eindruck, dass die breitere Verteilung einen zu erwartenden Ablationsvorgang durch die Absorption des Lasers beschreibt und die schmalere Verteilung einen zusätzlichen Ablationsvorgang, der entweder nicht den Erwartungen an die Verteilung der Geschwindigkeiten der ablatierten Teilchen entspricht oder durch die Methodik der Postionisation nicht korrekt wiedergegeben wer-

⁴Durch die experimentellen Gegebenheiten kommt es zu einer Diskriminierung der Intensitäten sehr hoher und sehr niedriger Geschwindigkeiten, da eine gewisse Teilchendichte vorhanden sein muss, um ein detektierbares Signal zu erhalten. Wird diese unterschritten, resultiert ein Intensitätswert von Null.

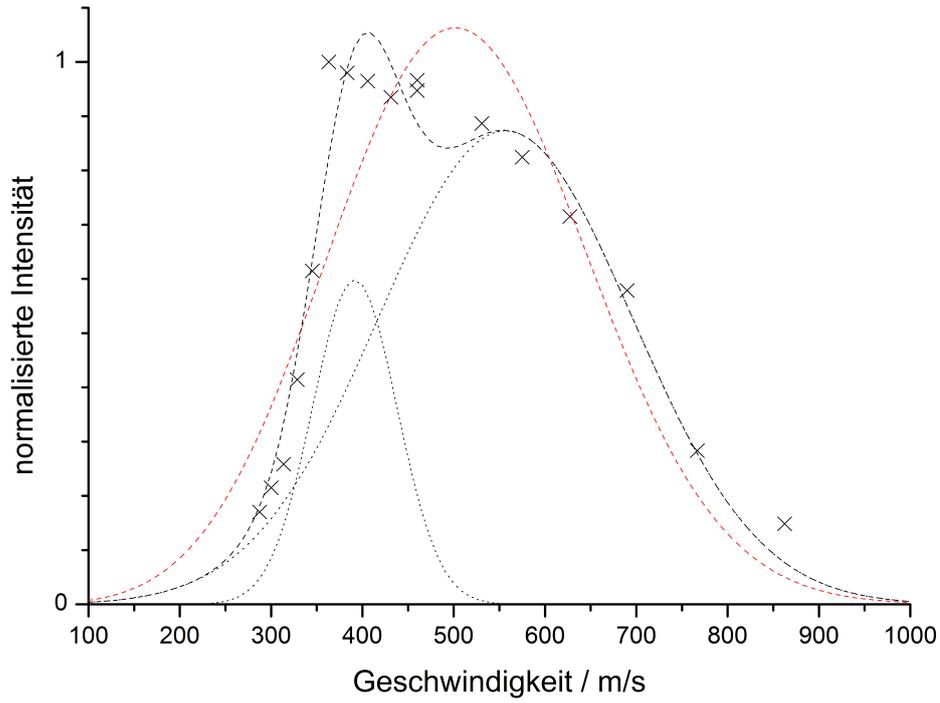


Abbildung 3.12.: Vergleich des Fits von einer (rot) und zwei Geschwindigkeitsverteilungen (schwarz) einer zweiten Probe. Im Fall der binären Verteilung sind die einzelnen Verteilungen gepunktet und die Summe gestrichelt dargestellt.

den kann. Um dieses besser zu visualisieren ist eine Auftragung der erhaltenen Intensitätsverteilungen gegen das Laserdelay gut geeignet. Diese ist in Abb. 3.13 für beide Messungen gezeigt. Auf der unteren X-Achse ist die reziproke Geschwindigkeit von hohen zu niedrigen Werten hin aufgetragen. Durch den oben schon erwähnten Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit und Delay entspricht dies einer Auftragung über das linear ansteigende Delay, das auf der oberen X-Achse gezeigt ist. In dieser Auftragung ist zu erkennen, in welcher Intensität die Teilchen aus den beiden Ablationen zu den jeweiligen Delays am Positionierungsort vorliegen bzw. an diesem ankommen. Von daher wird diese Auftragung auch als Ankunftszeitverteilung bezeichnet.

Wie schon für die Geschwindigkeitsverteilungen zu sehen war, so ist auch bei diesen Graphen eine große Ähnlichkeit der beiden Messungen zu erkennen. Wird jeweils die breitere der beiden Verteilungen betrachtet, so erreichen die schnellsten Teilchen (bei ca. 1000 m/s) den Positionierungsort nach ungefähr $0,7 \mu\text{s}$. Danach folgt ein Intensitätsanstieg, bis das Maximum bei ca. $1,2 \mu\text{s}$ erreicht wird. Die anschließende Abnahme der Teilchenzahl verläuft deutlich langsamer als der Anstieg, die langsamsten Teilchen werden bei Delays von über $2,5 \mu\text{s}$ erwartet. Der Fit mit einer Geschwindigkeitsverteilung (in der Abbildung in rot gezeigt) sagt einen ähnlichen Verlauf für den Intensitätsanstieg bei geringen Delays bis kurz vor dem Maximum voraus, danach liegen die Teilchendichten aber deutlich über der eben beschriebenen Verteilung. Diese grundsätzliche Ähnlichkeit der beiden Intensitätsverteilungen ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei dieser Verteilung um die initiale Laserablation handelt, wie sie bei festen Matrixproben auftritt.

Die schmalere Verteilung zeigt in dieser Auftragung ein prinzipiell ähnliches Verhalten, ist aber zu höheren Delayzeiten verschoben. Die Verteilungsfunktion sagt das erste Auftreten von Teilchen, die dieser Verteilung gehorchen, bei Delayzeiten von ca. $1,2 \mu\text{s}$ voraus. Die Dauer des Anstieges der Intensität bis zum Maximalwert bei ungefähr $1,7 \mu\text{s}$ ist dem der ersten Verteilung sehr ähnlich. Die darauf folgende Abnahme der Intensität findet dann im Vergleich schneller statt und ist bei ca. $2,5 \mu\text{s}$ beendet.

Der Intensitätsverlauf in den Ankunftszeitverteilungen lässt darauf schließen, dass zwei Ablationsvorgänge stattfinden, die jeweils eine eigene Teilchenwolke hervorrufen. Da sowohl das Auftreten der ersten (schnellsten) Teilchen, als auch das Maximum der Teilchendichte in den jeweiligen Verteilungen mit einem zeitlichen Abstand von $0,5 \mu\text{s}$ auftreten, liegt der Schluss nahe, dass die zwei Ablationsvorgänge mit einem zeitlichen Abstand zueinander stattfinden. Aus dieser Annahme ergibt sich das Problem, dass

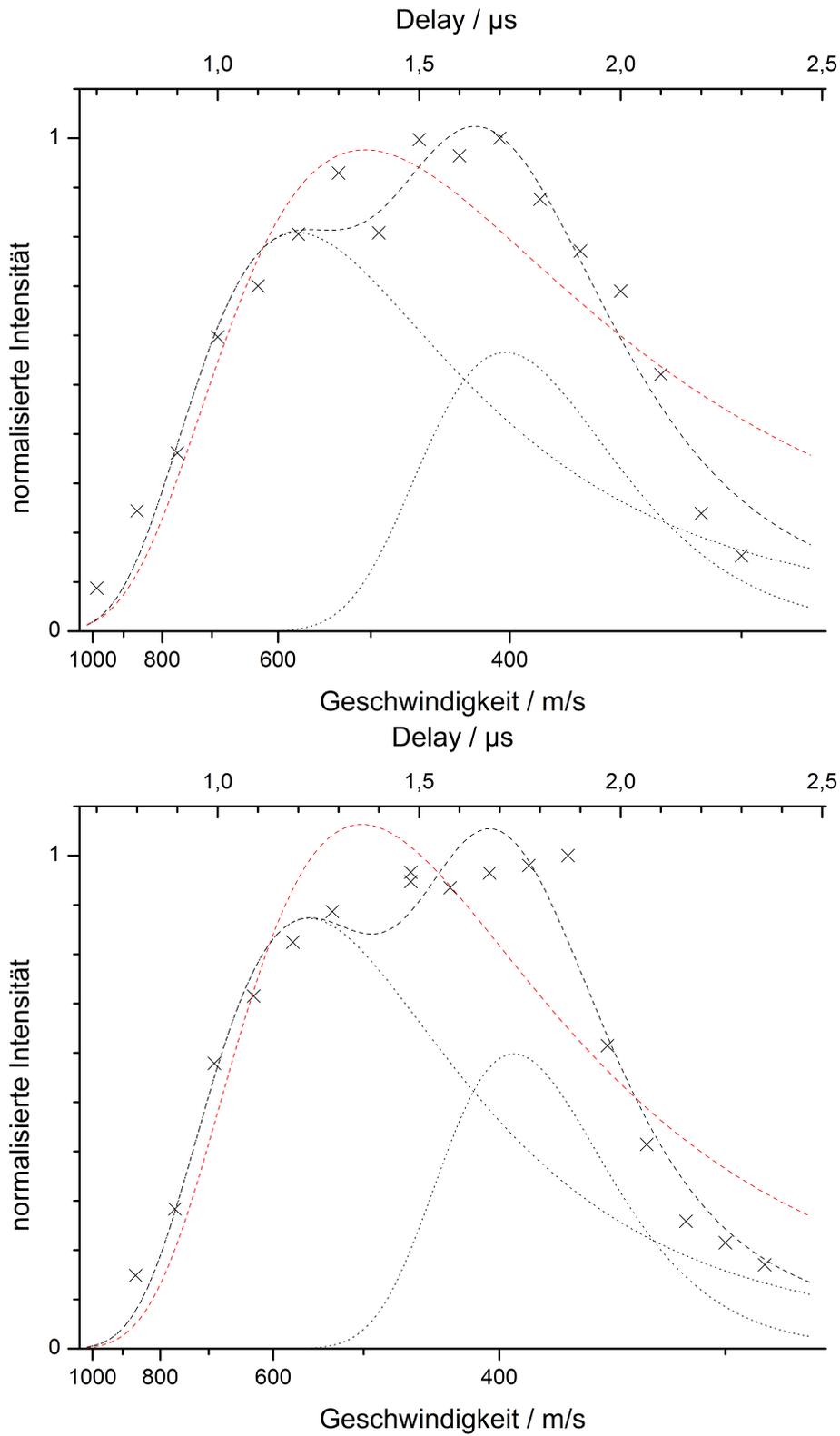


Abbildung 3.13.: Ankunftszeitverteilungen der 3,5-DHB/Butylaminproben.

die Geschwindigkeiten der zeitverzögerten Ablation falsch sind, da die Berechnung der Geschwindigkeit davon ausgeht, dass die Teilchen direkt während des Auftreffens des Laserpulses auf die Probe ablatiert werden. Ist dies nicht der Fall, sondern die Ablation findet später statt, so werden durchgehend zu niedrige Geschwindigkeiten erhalten. Dies folgt daraus, dass die in der Rechnung verwendete Zeit höher ist, als die Zeit, die die Teilchen wirklich für die Strecke zwischen Probenträger und Positionierungsstelle benötigt haben. Eine Korrektur der Geschwindigkeitswerte ist nicht ohne weiteres möglich, da die Zeit, die bei der Positionierung zwischen dem Auftreten der Teilchen liegt, nur dann der zeitliche Abstand zwischen den Ablationsvorgängen ist, wenn diese die gleiche Geschwindigkeitsverteilung besitzen. Davon ist aber nicht auszugehen, da die beiden Verteilungen im Bereich niedrigerer Geschwindigkeiten deutliche Unterschiede aufweisen. Wären die Verteilungen zudem gleich, bräuchte man die Geschwindigkeiten der zeitverzögerten Ablation nicht mehr berechnen, da die erste Verteilung ja bekannt ist.

Der erwähnte Fehler in den Delayzeiten, die zur Berechnung verwendet wurden, führt auch zu einer deutlichen Stauchung der zweiten Geschwindigkeitsverteilung, wodurch der aus dem Fit erhaltene Wert für die Translationstemperatur systematisch bei unrealistisch niedrigen Werten liegt. Von daher sind alle aus dem Fit der Verteilung gewonnenen Werte für die zeitverzögerte Ablation nicht zu verwenden. Für die initiale Ablation gilt dieses nicht, allerdings ist es durch die zusätzliche Geschwindigkeitsverteilung möglich, dass die gemessenen Intensitäten durch den Fit der falschen Verteilung zugeordnet werden, was wiederum eine neue Fehlerquelle darstellen könnte. Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in den Werten, die aus den Geschwindigkeitsverteilungen der beiden 3,5-DHB/Butylamin-Proben erhalten wurden.

Für die erste Probe wurde eine Translationstemperatur von 886 K für die initiale Ablation erhalten, die Strömungsgeschwindigkeit liegt bei 576 m/s. Die zweite Probe ergibt Werte von 726 K und 489 m/s. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Erscheinungsbild der Verteilungen: Im Fall der zweiten Messung ist das Maximum der Intensität bei einer niedrigeren Geschwindigkeit und die Verteilung weist eine geringere Breite auf, was sich durch eine geringere Translationstemperatur ergibt. Diese Unterschiede können aber auch einen anderen Ursprung haben, z.B. die oben erwähnte Unsicherheit bei der Bestimmung des Abstandes des Positionierungslaserspots oder ein leicht veränderter Positionierungsstelle innerhalb des *plume*, was durch ein leichtes Verkippen des Probenträgers z.B. beim Drehen geschehen kann. Eine veränderte Ablationslaser *fluence* ist anhand der MALDI-Signale in den Flugzeitspektren nicht zu erkennen.

Mit der Methode der Postionisation ist die Frage, ob wirklich eine zeitverzögerte zweite Ablation stattfindet, nicht eindeutig zu beantworten. Falls dies der Fall ist, so muss diese aber komplett aus neutralen Molekülen/Clustern bestehen, da in den Flugzeit-spektren keine entsprechenden Ionensignale bei höheren Flugzeiten detektiert wurden. Weiterhin ergibt sich die Frage, ob der beobachtete Effekt nur bei der verwendeten ionischen Flüssigkeit auftritt oder dies ein allgemeines Phänomen darstellt. Um dies zu untersuchen wurden weitere ILMs hergestellt und mittels Postionisation deren Ablationsverhalten untersucht.

2,5-Dihydroxybenzoesäure/Triethylamin Zum Vergleich wurde eine ILM aus 2,5-DHB und Triethylamin gewählt, die Kombination aus 2,5-DHB und Butylamin war nicht für eine Messung geeignet, da diese nach einigen Laserschüssen am Ablationsort anfang zu kristallisieren. Dieser Effekt konnte bei Verwendung von Triethylamin als Base nicht beobachtet werden.

Die Messung wurde analog zu den Messungen der 3,5-DHB/Butylamin-Proben durchgeführt. Die erhaltene Intensitätsverteilung ist in Abb. 3.14 gezeigt. Der Postionisationsort wurde auf 0,62 mm bestimmt und ist somit ähnlich zu dem der vorangegangenen Messungen. Wie in diesen ist eine gute Korrelation zwischen den Messpunkten und der theoretischen binären Verteilung sichtbar. Dies wird auch durch den R^2 -Wert von 0.969 bestätigt. Auffällig ist, dass die Geschwindigkeiten der ablatierten Teilchen deutlich niedriger liegen als in der 3,5-DHB-Probe. Dies ist für beide Geschwindigkeitsverteilungen zu erkennen. Zudem ist die schnellere Geschwindigkeitsverteilung im Vergleich zur Langsameren weniger intensiv als im vorherigen Fall. Dies ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Ionisierungseffizienz von 2,5-DHB deutlich höher ist als im Fall von 3,5-DHB. Da für die Messungen die Laserleistung an die *fluence threshold* der Probe angepasst wurde, führt dies dazu, dass für ein vergleichbares promptes Ionensignal eine niedrigere *laser fluence* für 2,5-DHB notwendig ist. Da ein höherer Anteil des ablatierten Materials als Ion vorlag führt dies folglich zu einer Abnahme der in der ersten Ablation vorhandenen Neutralteilchen. In wie weit dies auch einen Effekt auf die Intensität der zweiten Ablation hat ist nicht vorhersehbar.

Wie zu erwarten, ist liegen die aus dem Fit der ersten Geschwindigkeitsverteilung erhaltenen Werte deutlich unter denen der 3,5-DHB-Probe. Das Maximum der Intensität ist bei 290 m/s erreicht, die Strömungsgeschwindigkeit wurde auf 282 m/s und die Translationstemperatur auf 250 K bestimmt. Die schnellsten Neutralteilchen erreichen

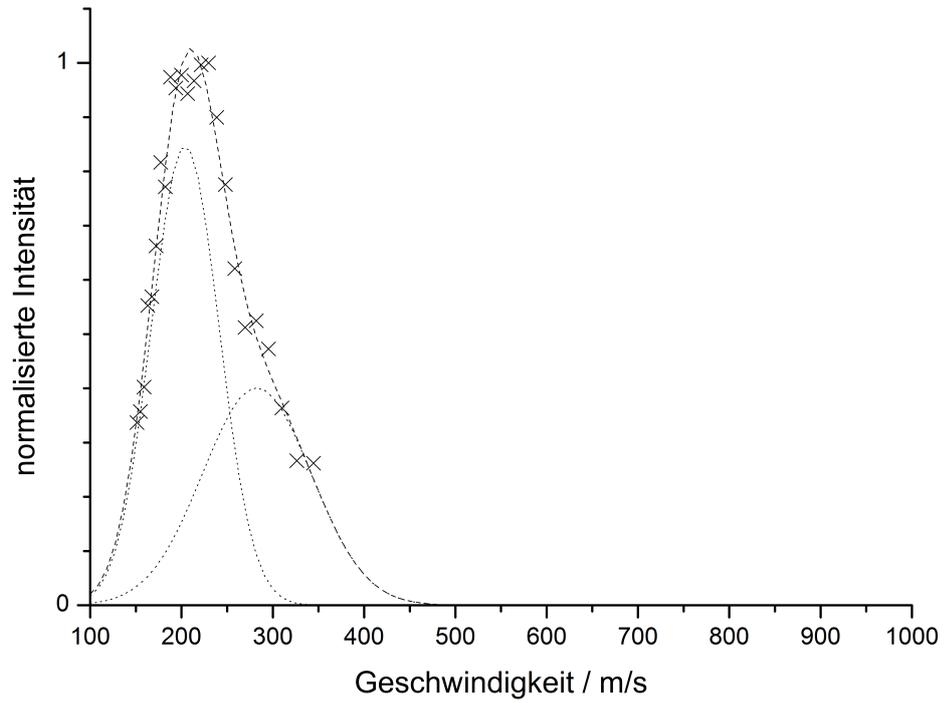


Abbildung 3.14.: Intensitätsverteilung der 2,5-DHB/Triethylamin-Probe mit angefitte-
ter binärer Geschwindigkeitsverteilung. Der Abstand des Postionisati-
onsortes zur Probenoberfläche betrug 0,62 mm.

knapp 500 m/s. Auch die Teilchen aus der verzögerten Ablation werden bei geringeren Geschwindigkeitswerten detektiert. Dies kann aus zwei unterschiedlichen Gründen geschehen: Zum einen können die Teilchen wirklich mit einer geringeren Geschwindigkeit ablatiert werden als in der 3,5-DHB-Probe, zum anderen kann ein größerer Zeitraum zwischen den beiden Ablationsereignissen liegen, was auch zu einer niedrigeren errechneten Geschwindigkeit für diese Verteilung führt.

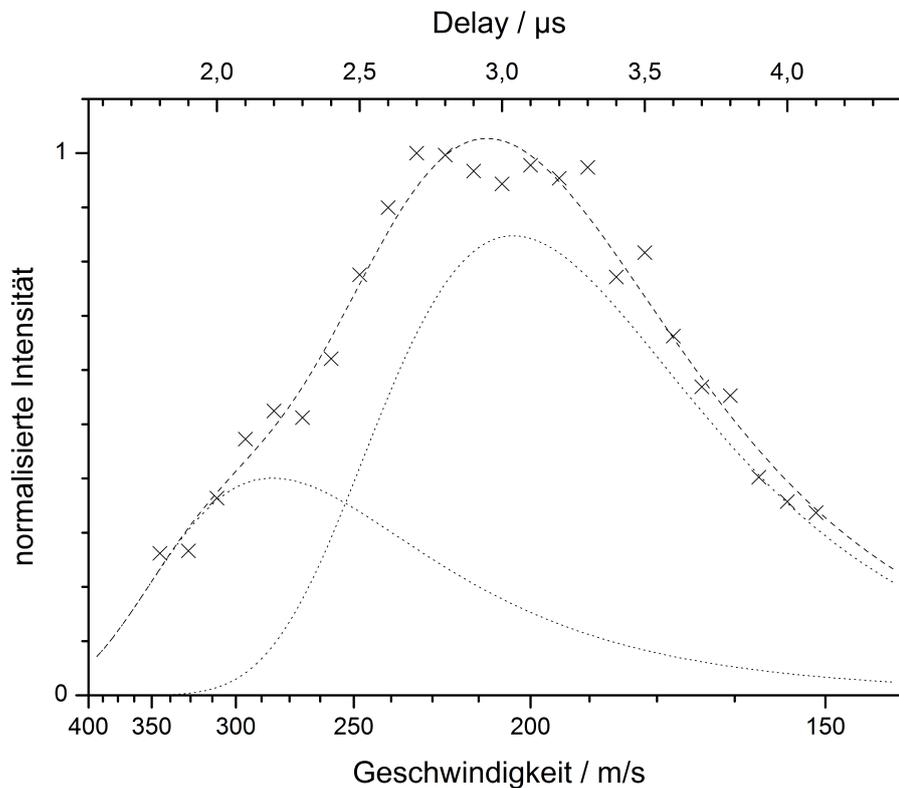


Abbildung 3.15.: Ankunftszeitverteilung der 2,5-DHB/Triethylamin-Probe.

Betrachtet man die Ankunftszeitverteilung in Abb. 3.15, so ist als erstes offensichtlich, dass im Vergleich zu 3,5-DHB/Butylamin die Flugzeiten zum Postionisationsort deutlich länger sind, in Folge der stark erniedrigten Geschwindigkeit in dieser Probe. Die ersten Teilchen der initialen Ablation erreichen diesen Punkt nach $1,5 \mu\text{s}$, das Intensitätsmaximum ist bei $2,2 \mu\text{s}$ erreicht. Die Verteilungsfunktion sagt voraus, dass noch bis zu $4,0 \mu\text{s}$ Teilchen dieser Ablation am Postionisationsort eintreffen, auch wenn die Intensität dort recht niedrig ist. Zu den späteren Zeitpunkten überwiegt die verzögerte Ablation deutlich. Teilchen aus dieser Ablation sind nach ca. $2,0 \mu\text{s}$ zum ersten Mal detektierbar. Der Anstieg auf das Intensitätsmaximum dauert in diesem Fall länger als bei der ersten Ablation, dieses ist nach $3,0 \mu\text{s}$ erreicht. Der folgende Abfall der detektierba-

ren Teilchen ist im Vergleich wesentlich flacher, auch nach $4,5 \mu\text{s}$ ist noch eine deutliche Teilchendichte zu erwarten.

Waren in der 3,5-DHB-Probe die Delaywerte des Einsetzens der jeweiligen Verteilung und ihre Maxima äquidistant, so ist dieses in der gerade beschriebenen Probe nicht der Fall. Es kann deswegen davon ausgegangen werden, dass die gleichen Abstände in der 3,5-DHB-Probe eher dadurch zu Stande gekommen sind, dass zufällig der entsprechende Abstand des Postionisationslasers zur Probe verwendet wurde, wo dieser Effekt auftritt und dies nicht durch gleiche Geschwindigkeitsverteilungen der beiden Ablationen hervorgerufen wird.

Vergleicht man die Ablationsparameter der beiden DHB-Isomere, so wird deutlich, dass sowohl die Geschwindigkeiten als auch die Translationstemperatur der 2,5-DHB-Probe entscheidend niedriger liegen als bei 3,5-DHB. Die Verwendung unterschiedlicher Basen sollte keinen großen Effekt haben, da der Energieeintrag in das System durch die Absorption des Laserlichts bei 266 nm nur durch das DHB-Isomer möglich ist. Wie oben schon erwähnt wurde, besteht die Vermutung, dass dies darauf zurückzuführen ist, dass die Erzeugung von protonierten Matrixionen bei 2,5-DHB effizienter stattfindet. Wird von *pooling*-Prozessen zur Erzeugung der Ionen ausgegangen⁵, so ist eine entscheidende Größe die Excitonendichte, die in der Probe durch den Laser hervorgerufen wird. Wie in Abschnitt 2.2.1 erwähnt, ist hier die Energie pro Volumeneinheit eine wichtige Größe. Diese setzt sich aus der Absorption der Probe und der verwendeten *laser fluence* zusammen. Um die für die Ionisation erforderliche Excitonendichte zu erreichen, ist also bei einer geringeren Absorption eine höhere *laser fluence* notwendig. Da gleichzeitig aber auch eine Umwandlung der absorbierten Energie in Wärme stattfindet, führt dies im Falle einer höheren Laserleistung auch zu einer zunehmenden Erwärmung der Probe. Dies findet aufgrund der größeren Eindringtiefe der Photonen auch in einem größeren Volumen statt. Der höhere Energieeintrag in das System bei niedrigerer Absorption führt dann zu einer heißeren und schnelleren Ablation bei vergleichbaren prompten Ionensignalen. Zusätzlich ist es auch möglich, dass die grundlegenden Prozesse des *exciton hopping* und *energy pooling* in den verschiedenen Isomeren mit unterschiedlicher Effizienz ablaufen, hierüber sind aber keine Daten verfügbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine bessere Absorption der Laserwellenlänge bei vergleichbar intensiven Ionensignalen zu einer kälteren und langsameren Ablation

⁵Siehe auch Abschnitt 2.2 für die theoretischen Grundlagen hierzu.

führen sollte. Da die in der Literatur bekannten Absorptionsspektren^[54,129] in einer neutralen Lösung, und von daher nicht bei einem der ILM entsprechenden Protonierungsgrad des DHB-Isomers gemessen wurden, musste ein Verfahren entwickelt werden, um entsprechende Spektren der reinen ionischen Flüssigkeit zu erhalten. Da die Absorption sich aus der molaren Absorption und der Konzentration des absorbierenden Stoffes zusammensetzt, liegt diese im Fall einer reinen ionischen Flüssigkeit deutlich über den Absorptionswerten der sonst üblichen stark verdünnten Lösungen. Eine Verwendung der üblichen Küvetten mit Schichtdicken im cm-Bereich ist also nicht möglich, da hier eine vollständige Extinktion des Lichtes stattfindet. Es wurde also nach einer Möglichkeit gesucht, eine Probe mit sehr dünner Schichtdicke der reinen ILM herzustellen und gleichzeitig die Messung in einem handelsüblichen UV/VIS-Spektrometer (hier wurde ein Lambda 2-Spektrometer verwendet, Hersteller: Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) zu ermöglichen. Erreicht werden konnte dies durch die Verwendung von Suprasil-Fenstern, die im Messbereich von 200 bis 400 nm eine konstante optische Transmission aufweisen, also die Messwerte nicht beeinflussen. Auf eines dieser Fenster wurde eine Lösung der ionischen Flüssigkeit aufgetragen und das Lösungsmittel durch Verdampfen entfernt. Ein zweites, identisches Fenster wurde danach auf die verbleibende Flüssigkeitsschicht gedrückt, so dass zwischen den beiden Fenstern eine gleichmäßige Verteilung der Flüssigkeit über einen ausreichend großen Bereich erzeugt wurde. Durch die Flüssigkeitsschicht werden die Fenster zusammengehalten, so dass eine Platzierung im Strahlengang des Spektrometers problemlos möglich war. Um eventuelle Reflektionsverluste auszugleichen, wurde ein weiteres, identisches Fenster in den Referenzstrahl gestellt.

Da die Schichtdicke der Flüssigkeit zwischen den Fenstern nicht messbar ist, sind Absolutmessungen der Absorptionskoeffizienten nicht möglich; bei Verwendung gleicher Flüssigkeitsmengen sind jedoch Relativmessungen verschiedener ionischer Flüssigkeiten möglich. Eine entsprechende Messung wurde für die beiden im Vorherigen besprochenen ILMs durchgeführt, die Spektren sind in Abb. 3.16 gezeigt. Hierzu wurden jeweils 3 μ l einer Lösung von 200 mmol ionischer Flüssigkeit in 3 ml Methanol auf das Suprasilfenster aufgetragen und das Lösungsmittel durch Verdampfen entfernt. Die Absorptionsskala ist so gewählt, dass die höchste Absorption innerhalb beider Spektren auf 1 normiert wurde. Dies ist der Fall bei einer Wellenlänge von 208 nm in der 2,5-DHB/Triethylamin-Probe. Alle anderen Absorptionswerte sind relativ zu diesem Wert angegeben.

Bei der zur Ablation verwendeten Wellenlänge von 266 nm erhält man dann einen Wert von 0,72 für die 2,5-DHB-ILM und 0,33 für 3,5-DHB. Dies bestätigt auch die in der Lite-

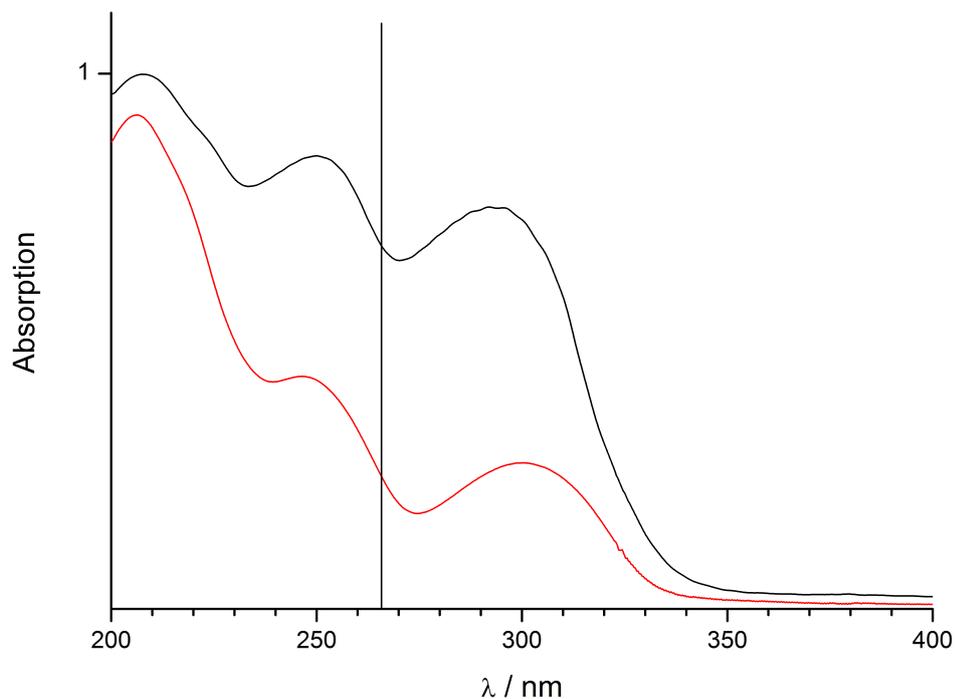


Abbildung 3.16.: UV-Absorptionsspektren der verwendeten Matrices 2,5-DHB/Triethylamin (schwarz) und 3,5-DHB/Butylamin (rot).

ratur aus verdünnten Lösungen erhaltenen Werte, die für 2,5-DHB ebenfalls eine höhere Absorption zeigen. Bezogen auf die Werte der Postionisationsexperimente bestätigt sich die Annahme, dass eine bessere Absorption (zumindest in diesem Fall) mit einer weiche- ren Ablation einhergeht. In den gezeigten UV-Spektren ist auch zu erkennen, dass beide Matrices bei 355 nm keine merkliche Absorption zeigen. Dadurch trifft der Ablationslas- erpuls in diesem Fall noch mit relativ hoher Intensität auf die Probenträgeroberfläche und kann dadurch eine Stoßwelle erzeugen, die zu der oben beschriebenen Blasenbildung führt.

α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure

Wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, war es durch die Bildung von Blasen auf der Probenoberfläche nicht möglich, Geschwindigkeitsverteilungen der DHB-Isomere bei einer Ablationswellenlänge von 355 nm zu erhalten. Da die Abhängigkeit der verwendeten Wellenlänge aber auch einen Rückschluss auf die oben angesprochenen Auswirkungen der Absorption der Probe auf die Geschwindigkeitsverteilungen zulässt, wurde eine andere Matrix gesucht, die es möglich macht, Postionisationsuntersuchungen an einer ILM sowohl bei 266 als auch bei 355 nm durchzuführen. Zu diesem Zweck wurde eine andere Klasse von MALDI-Matrices verwendet, Derivate der Zimtsäure. Mit der ionischen Flüssigkeit, die aus α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure und Tributylamin gebildet wird, wurde eine Matrix gefunden, mit der die Möglichkeit der Messung bei beiden Wellenlängen gegeben ist.

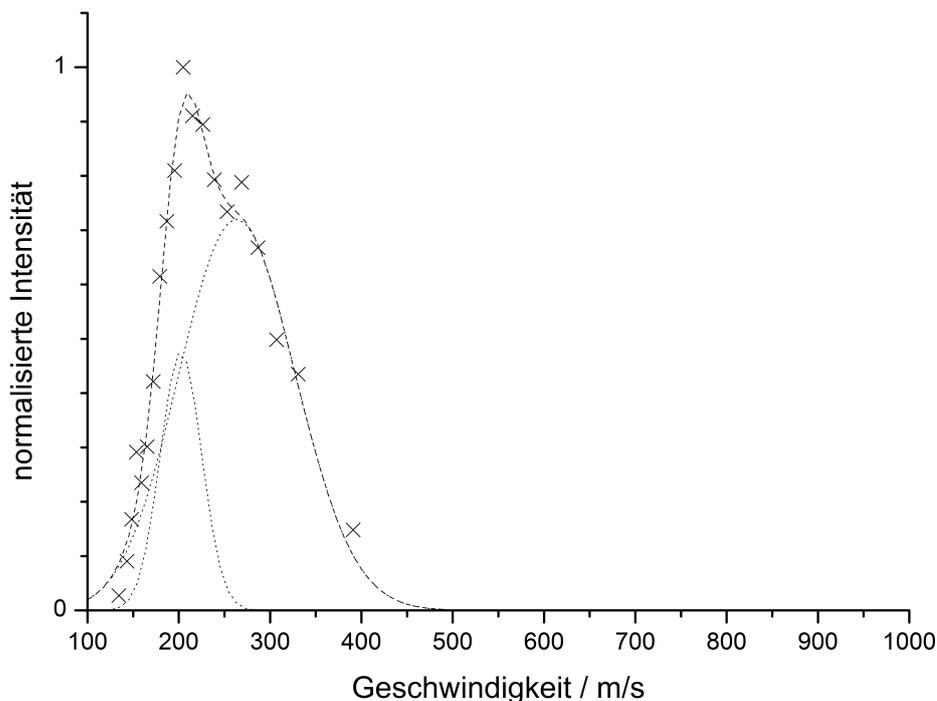


Abbildung 3.17.: Binäre Geschwindigkeitsverteilung von CHCA/Tributylamin bei 266 nm.

Einfluss der Ablationswellenlänge In Abb. 3.17 ist die Geschwindigkeitsverteilung dieser ILM unter Verwendung einer Ablationswellenlänge von 266 nm gezeigt. Der Postionisationsort wurde mit einem Abstand von 0,43 mm zur Probenoberfläche bestimmt,

er liegt also deutlich näher an der Probe als in den Messungen im vorangegangenen Abschnitt. Nach den Erkenntnissen aus jenem Abschnitt sollte der geringere Abstand dazu führen, dass eine verzögerte Ablation bei niedrigeren Geschwindigkeitswerten auf-taucht. Dies geschieht, da der in die Berechnung einfließende Fehler durch die zusätzliche Verzögerungszeit sich bei kleineren Abständen stärker auswirkt.

In der erwähnten Abbildung ist dieses im Vergleich zu den DHB-Isomeren auch zu erkennen, die Verteilung der Intensitäten aus der verzögerten Ablation hat ihr Maxi-mum bei ungefähr 200 m/s, und weist eine geringe Breite von ca. 150 m/s auf. Auch die geringere Breite ist, wie schon beschrieben, durch den geringeren räumlichen Ab-stand zwischen Ablation und Postionisation zu erklären. Die initiale Ablation besitzt ein Intensitätsmaximum bei 264 m/s, eine Translationstemperatur von 208 K und ei-ne Strömungsgeschwindigkeit von 228 m/s. Der R^2 -Wert liegt für diesen Fit bei 0,98. Diese Werte liegen auffällig nah an denen, die für die entsprechende Ablation der 2,5-DHB/Triethylamin-ILM erhalten wurden. Diese beiden Matrices erzeugen einen deutlich langsameren und kälteren *plume* als die 3,5-DHB-ILM, was darauf hinweisen könnte, dass der hohe Wärmeeintrag in die 3,5-DHB-Probe ein Grund für die unzureichende Eignung als MALDI-Matrix ist.

In der Ankunftsverteilung dieser Probe (Abb. 3.18) ist auch ein ähnliches Verhalten wie in der 2,5-DHB/Triethylamin-Probe zu sehen. Der Postionisationsort wird durch den geringeren Abstand zum Probenträger bei kürzeren Delayzeiten erreicht. Die ersten Teilchen erreichen diesen nach ca. 1 μ s. Der Anstieg bis zum Maximum der Intensitäten der initialen Ablation dauert 0,6 μ s. Zu diesem Zeitpunkt treffen auch die ersten Moleküle aus der verzögerten Ablation ein. Das Maximum der Gesamtintensität wird dann bei ungefähr 2,1 μ s erreicht; dies liegt 50 ns vor der höchsten Intensität der zweiten Ablation. Die Gesamtzahl der detektierten Moleküle aus dem verzögerten Ablationsvorgang ist in dieser Probe verhältnismäßig gering, die Intensität und folglich die Anzahl der Teilchen, die hieraus nachgewiesen werden, liegt nur für einen Zeitraum von ca. 300 ns nach dem Intensitätsmaximum höher als die der Moleküle aus der Initialablation. Das ist in den anderen Messungen so nicht sichtbar gewesen und zudem auch erstaunlich, da durch den geringen Abstand der Postionisation die Verteilung der Teilchen wie beschrieben gestaucht wird und zu hohen Intensitäten über einen kurzen Zeitraum führen müsste. Das Absorptionsspektrum der verwendeten CHCA-ILM ist in Abb. 3.19 gezeigt. Hier ist zu erkennen, dass die verwendete Wellenlänge von 266 nm im Bereich eines Absorptions-minimums liegt.

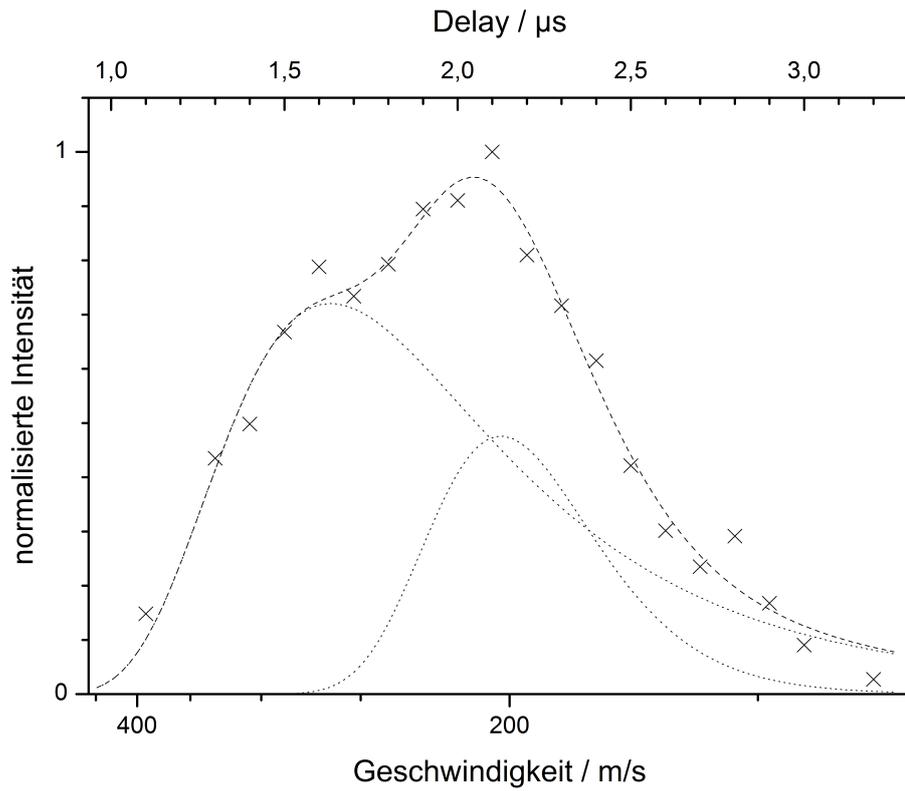


Abbildung 3.18.: Ankunftszeitverteilung von CHCA/Tributylamin bei einer Ablationswellenlänge von 266 nm.

Im Gegensatz zu 3,5-DHB/Butylamin, wo eine schlechte Absorption zu einer sehr warmen, energiereichen Ablation führt, wird dies bei CHCA/Tributylamin nicht beobachtet. Allerdings ist ein direkter Vergleich der Absorptionswerte zu den DHB-Isomeren hier nicht möglich, da im Fall der CHCA-ILM eine niedrigere Probenmenge ($1,5 \mu\text{l}$ statt $3 \mu\text{l}$) verwendet wurde, um innerhalb des Messbereiches des Gerätes zu bleiben. Eine Umwandlung der Laserenergie in Wärme scheint aber bei der CHCA-Probe nicht in einem solchen Ausmaß stattzufinden wie in der 3,5-DHB-ILM.

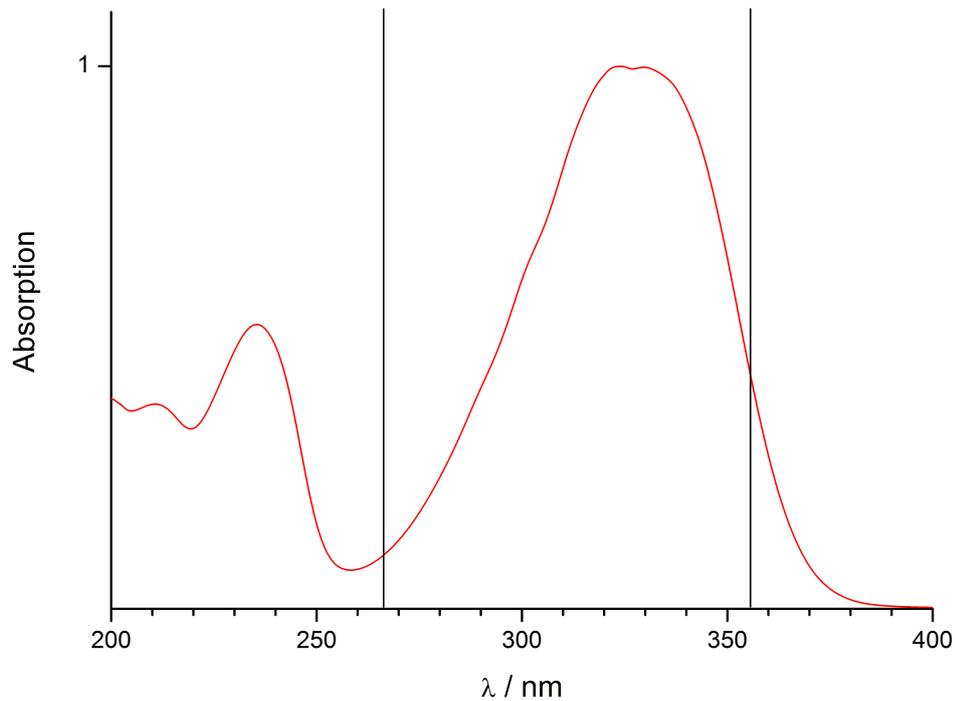


Abbildung 3.19.: UV-Absorptionsspektrum der verwendeten Matrix CHCA/Tributylamin. Die senkrechten Striche markieren die verwendeten Wellenlängen von 266 und 355 nm.

Während die Absorption bei 266 nm nur einen Wert von 0,09 bezogen auf das Maximum des Spektrums bei 322 nm ausweist, liegt diese bei 355 nm bei einem deutlich höheren Wert von 0,46. Die Auswirkungen dieses Unterschiedes auf die Geschwindigkeitsverteilung sind in der Abb. 3.20 gezeigt. Der Wechsel der Ablationswellenlänge führt zu einer deutlichen Verbreiterung der Geschwindigkeitsverteilung, was sich auch in der Translationstemperatur erkennen lässt, die um 300 K auf 509 K ansteigt. Das Maximum der Verteilung und die Strömungsgeschwindigkeit fallen in diesem Fall auf den selben Wert von 357 m/s, ungefähr 100 m/s schneller als in der Ablation bei 266 nm. Die schnellsten Teilchen erreichen bei dieser Messung ca. 700 m/s, was einen Anstieg von

über 200 m/s bedeutet. Für den Fit wurde ein R^2 -Wert von 0,87 erhalten; der Abstand des Postionisationsortes wurde auf 0,38 mm bestimmt, er liegt also etwas näher an der Probe als im Fall der geringeren Wellenlänge. Die verzögerte Ablation ist dennoch im Vergleich etwas breiter, was auch hierfür auf einen energiereicheren Vorgang schließen lässt.

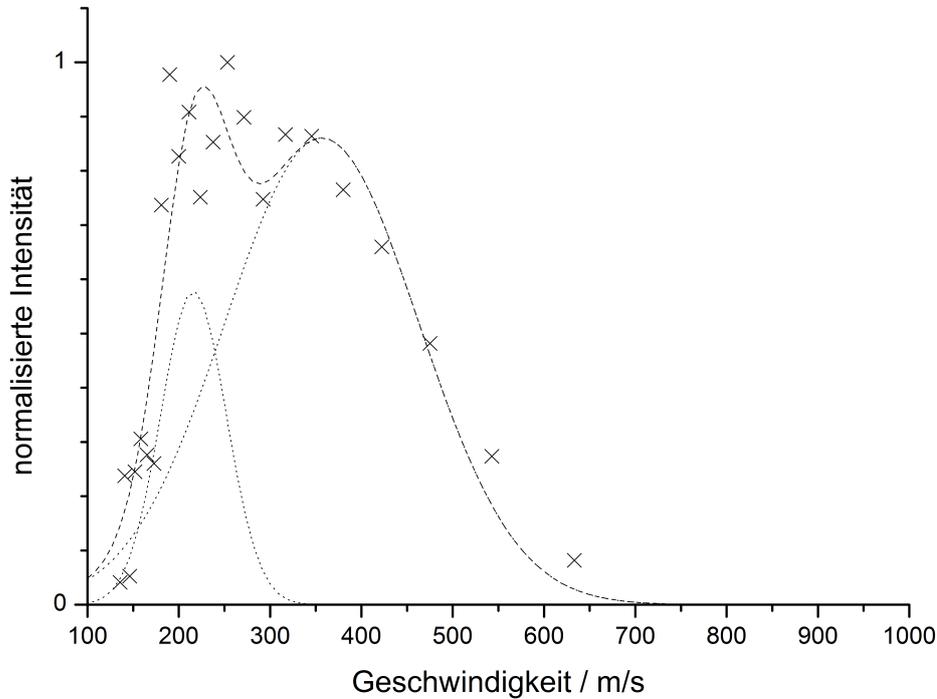


Abbildung 3.20.: Binäre Geschwindigkeitsverteilung von CHCA/Tributylamin bei 355 nm.

Die Ankunftszeitverteilung (Abb. 3.21) zeigt die zu erwartenden Veränderungen, aufgrund des etwas geringeren Abstandes und der höheren Maximalgeschwindigkeit erreichen die ersten Neutralteilchen den Postionisationsort schon nach $0,6 \mu\text{s}$, ungefähr $0,4 \mu\text{s}$ früher als bei der Ablation bei 266 nm. Das Maximum der Intensität der Initialablation wird bei leicht mehr als $0,9 \mu\text{s}$ erreicht, worauf ein langsamer Abfall der Intensität der Teilchen dieser Ablation bis zu Werten von über $3,0 \mu\text{s}$ erfolgt. Relativ zeitgleich zum Maximum der ersten Verteilung treffen auch die ersten Moleküle der verzögerten Ablation ein. Diese Verteilung weist ab $1,3 \mu\text{s}$ eine höhere Intensität auf und erreicht ihr Maximum bei $1,4 \mu\text{s}$. Die Abnahme der Intensität erfolgt schneller als in der ersten Ablation und folglich stellen ab ungefähr $1,9 \mu\text{s}$ die Moleküle der verzögerten Verteilung wieder den geringeren Anteil der Gesamtintensität.

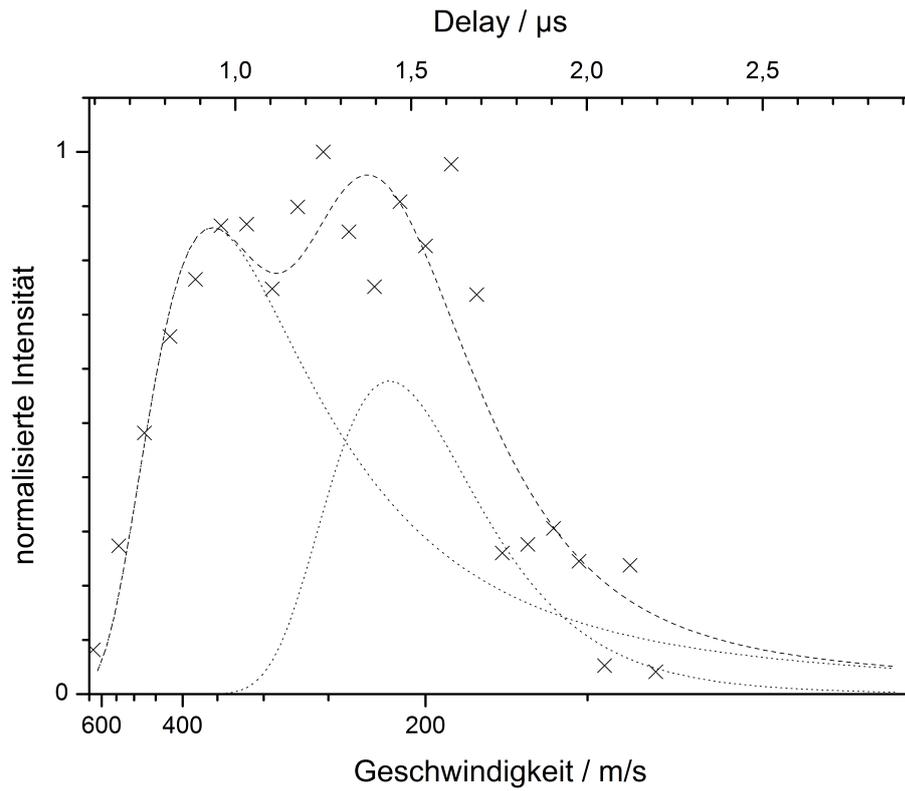


Abbildung 3.21.: Ankunftszeitverteilung von CHCA/Tributylamin bei einer Ablationswellenlänge von 355 nm.

Auf den ersten Blick scheint es überraschend zu sein, dass die Ablationsparameter bei 355 nm deutlich ansteigen. Für die beiden untersuchten DHB-Isomere tritt der gegenteilige Effekt auf: Die Erhöhung der Absorption führt zu einer kälteren Ablation. Um zu verstehen, warum dies im Fall der CHCA hier nicht so auftritt, muss man den Effekt der Wellenlänge auf die Ionisationseigenschaften berücksichtigen. Die Ionisationsenergie von CHCA liegt bei 8,3 eV.^[40] Bei Verwendung von 266 nm, wo ein Photon eine Energie von 4,66 eV besitzt, reichen also 2 Photonen aus, um ein Matrixion zu erzeugen. Wird hingegen 355 nm als Wellenlänge eingesetzt, so sind 3 Photonen notwendig, da jedes dieser Photonen nur 3,49 eV übertragen kann. Bezogen auf die in der Probe wahrscheinlich stattfindenden *energy pooling*-Prozesse bedeutet dies, dass bei 266 nm das *pooling* von zwei Excitonen ein Ion erzeugen kann. Dies ist deutlich wahrscheinlicher als das Zusammentreffen von drei Excitonen, die bei 355 nm hierfür benötigt werden.

Es ist also anzunehmen, dass eine entsprechend höhere Excitonendichte in der Matrix notwendig ist, um ein vergleichbares Ionensignal bei der längeren Wellenlänge zu erhalten. Da neben dem *pooling* aber auch andere Prozesse stattfinden, die zur Desaktivierung der Teilchen⁶ führen und Wärme in der Probe erzeugen, führt die Tatsache, dass ein geringerer Anteil der Photonen zur Ionenbildung führt, auch gleichzeitig zu einer stärkeren Erwärmung des bestrahlten Volumens und folglich zu einer energiereicheren Ablation. Für beide in dieser Arbeit verwendeten DHB-Isomere kann die Ionisationsenergie mit zwei Photonen der Wellenlänge 266 nm erreicht werden,^[78] das Verhältnis der Energie der Photonen zur Ionisierungsenergie sollte also keinen Einfluss auf die dort erhaltenen, unterschiedlichen Ablationsparameter haben.

Tabelle 3.1.: Vergleich der Ablationsparameter von ILMs und festen Matrices. Die Werte für die festen Matrices 2,5-DHB und CHCA wurden von Walbrodt^[15] übernommen.

Matrix	Abstand / mm	Häufigste Geschwindigkeit / m/s	Strömungs- geschwindigkeit / m/s	Translations- temperatur / K
2,5-DHB	0,7	421	180	926
2,5-DHB/TEA	0,62	290	282	250
CHCA	0,7	737	484	2080
CHCA/TBA	0,43	264	228	208

In Tab. 3.1 sind die Ablationsparameter der festen Matrices in Vergleich zu den Werten der Initialablation der ionischen Flüssigkeiten verglichen. Die Ablationswellenlänge be-

⁶Fluoreszenz kann zusätzlich auch beobachtet werden.

trägt dabei jeweils 266 nm. Für feste 3,5-DHB-Proben kann bei dieser Wellenlänge zwar ein Postionisationssignal erhalten werden, jedoch kein promptes Ionensignal. Von daher ist dort keine Vergleichbarkeit zu den anderen Proben gegeben. Bei einer Ablationswellenlänge von 355 nm kann aus festen CHCA-Proben ebenso keine zufriedenstellende Messung durchgeführt werden, da der Probenabtrag hier zu hoch ist.

Vergleicht man die gezeigten Werte, so fällt auf, dass die Ablationsparameter für die festen Matrices deutlich höher liegen als für die ILMs. Im Fall der CHCA werden im Feststoff Geschwindigkeitswerte erhalten, die mehr als doppelt so hoch liegen; die Translationstemperatur ist sogar um einen Faktor 10 höher. Für 2,5-DHB ist dies nicht ganz so stark ausgeprägt, der Temperaturwert ist hier aber immer noch 4 mal so hoch wie in der Flüssigmatrix. Zusätzlich ist zu erkennen, dass die Differenz zwischen der Lage des Maximums der Verteilung und der Strömungsgeschwindigkeit in den Feststoffen deutlich höher ist. Dies spricht dafür, dass die erste Ablation in den Flüssigkeiten weniger stark thermisch initiiert ist, da die Ablation umso gerichteter und *jet*-ähnlicher ist, je näher diese beiden Werte beieinander liegen.^[15]

Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass die Ablationen aus dem Feststoff und den ILMs sehr große Unterschiede aufweisen. Zudem liegen die Werte für die beiden Flüssigkeiten nah beieinander, was darauf schließen lässt, dass hier ein ähnlicher Ablationsmechanismus vorherrscht. Die deutlichen Unterschiede für die jeweiligen festen Proben können durch das stark unterschiedliche Kristallisationsverhalten der beiden Substanzen erklärt werden.

Einfluss des Postionisationsortes Aus den vorherigen Geschwindigkeitsverteilungen ist ersichtlich, dass der Abstand des Postionisationslasers zur Probenoberfläche einen starken Einfluss auf das Erscheinungsbild der Gesamtintensitätsverteilung hat. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die zeitverzögerte zweite Ablation bei verfälschten Geschwindigkeitswerten detektiert wird und dieser Fehler bei verringertem Abstand des Postionisationsortes zunimmt. Andererseits nimmt die Teilchendichte, und damit auch die Intensität der Postionisationssignale, im *plume* mit dem Abstand von der Probe ab. Um zu prüfen, ob eine genauere Untersuchung der verzögerten Ablation mittels Postionisation möglich ist, wurden mehrere Geschwindigkeitsverteilungen in verschiedenen Abständen zur Probe aufgenommen, bei ansonsten unveränderten Parametern. Hierfür wurde der Postionisationslaser in der Ablationswolke verfahren, bis der Punkt maximaler Signalintensität gefunden wurde. Ausgehend von diesem Punkt wurde der

Laserstrahl für jede neue Messung mit Hilfe der in 3.2.1 beschriebenen Verschiebetische für die Lasereinkoppelung um eine Distanz von 0,1 mm vom Probenträger entfernt. So konnten Intensitätsverteilungen für Abstände von 0,2 bis 0,6 mm aufgezeichnet werden. Wie in Abb. 3.22 zu sehen ist, sank die Signalintensität dabei stetig, bei noch größeren Abständen konnten keine Signale mehr erhalten werden.

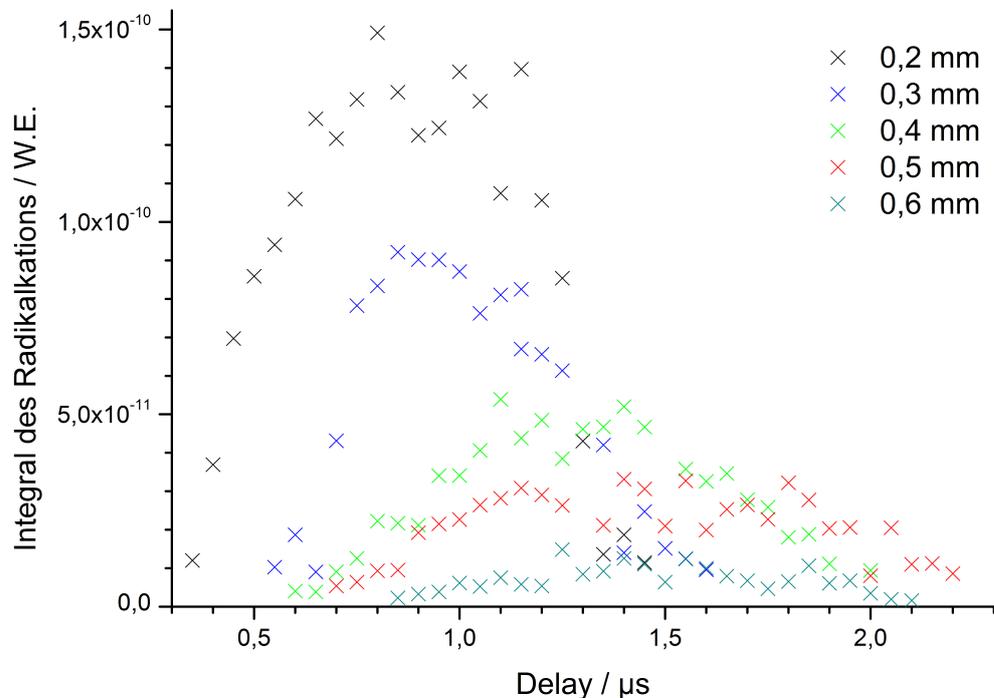


Abbildung 3.22.: Intensitätsverteilung des Radikalkations bei unterschiedlichen Abständen von Ablationsort.

Da bei den geringen Abständen der erste Zeitraum, in dem Teilchen am Positionierungsstelle vorhanden sind, sehr gering ist, wurde der Delayabstand zwischen den einzelnen Flugzeitspektren auf 50 ns verringert. Für den geringsten Abstand sind für ungefähr 1μ s Moleküle am Ionisationsort nachweisbar, dieser Zeitraum vergrößert sich sukzessive, bis in der vierten Messung Signalintensität über $1,7 \mu$ s detektierbar ist. Die Abnahme für die fünfte Messung ist dadurch zu erklären, dass die Teilchendichte schon so weit abgenommen hat, dass nur noch für die Messpunkte mit der höchsten Dichte die Detektionsschwelle überschritten wird. Die Intensitätsmaxima der einzelnen Intensitätsverteilungen verschieben sich durchgehend zu höheren Delaywerten, wobei zwischen der zweiten und dritten Messung ein relativ großer Sprung von $0,4 \mu$ s auftritt.

Die aus diesen Messungen errechneten Geschwindigkeitsverteilungen sind in Abb. 3.23 gezeigt. Die beiden Messungen bei den höchsten Abständen sind aufgrund der geringen

Intensitätswerte nicht als repräsentativ anzusehen, dies ist auch an den R^2 -Werten zu erkennen. Dieser liegt für die ersten drei Messungen oberhalb von 0,9, während für die vierte Messung nur noch ein Wert von 0,8 und für die letzte 0,6 erhalten werden.

Bei einem Abstand von 0,2 mm sind die Maxima der zwei Ablationsereignisse gut voneinander getrennt zu erkennen. In der nächsten Verteilung ist zu sehen, dass die Distanz zwischen den Maxima deutlich verringert worden ist. Wie weiter oben schon beschrieben, führt die größere Flugstrecke zum Ionisationsort dazu, dass die Verzögerungszeit der zweiten Ablation einen geringeren Fehler in der Berechnung der Geschwindigkeit verursacht, von daher nehmen die Geschwindigkeitswerte der errechneten Verteilung zu. Gleichzeitig wird hierdurch die Verteilung verbreitert, wobei die Intensität im Maximum abnimmt. Das ist in diesem Fall gut daran zu erkennen, dass der Intensitätswert in diesem Verteilungsmaximum unter dem der Initialablation (bei höheren Geschwindigkeiten zu sehen) liegt. Bei 0,4 mm Abstand sind die beiden Verteilungen der Ablationsereignisse weitgehend überlagert, so dass eine Trennung nicht mehr möglich ist, dies führt dazu, dass die hier erhaltenen Verteilungen nicht aussagekräftig sind. Aus den letzten beiden Auftragungen ist dann zu erkennen, dass sich keine klar zu erkennenden scharfen Maxima mehr ausbilden, was zu der Annahme führt, dass die Teilchen aus beiden Ablationsereignissen eine gemeinsame, nicht mehr trennbare Teilchenwolke bilden. Die Untersuchung der Ausbreitung des Ablationsplume ist also mit dieser Methode nur in einem recht beschränkten Bereich möglich.

3.2.4. Stoßwellenmodell

Aus den im Vorherigen gezeigten Positionierungsexperimenten wird deutlich, dass das Auftreten der zeitverzögerten Ablation unabhängig von der verwendeten ILM auftritt. Es ist daher davon auszugehen, dass der flüssige Zustand der Matrix ausschlaggebend für diesen Effekt ist, da etwas ähnliches in festen Matrices nicht beobachtet wurde.^[15,76] Der zeitliche Abstand zwischen den beiden Ablationen liegt im Bereich von einigen 100 ns. Eine genauere Bestimmung des zeitlichen Abstandes ist mit der hier verwendeten Methode nicht möglich, da immer eine Überlagerung der ablatierten Teilchen aus beiden Vorgängen stattfindet. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass die Positionierung in einem gewissen Abstand zur Probe durchgeführt werden muss.

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten der zweiten Ablation kann in der Stoßwelle liegen, die durch die Initialablation ausgelöst wird. Da durch die Laserenergie eine

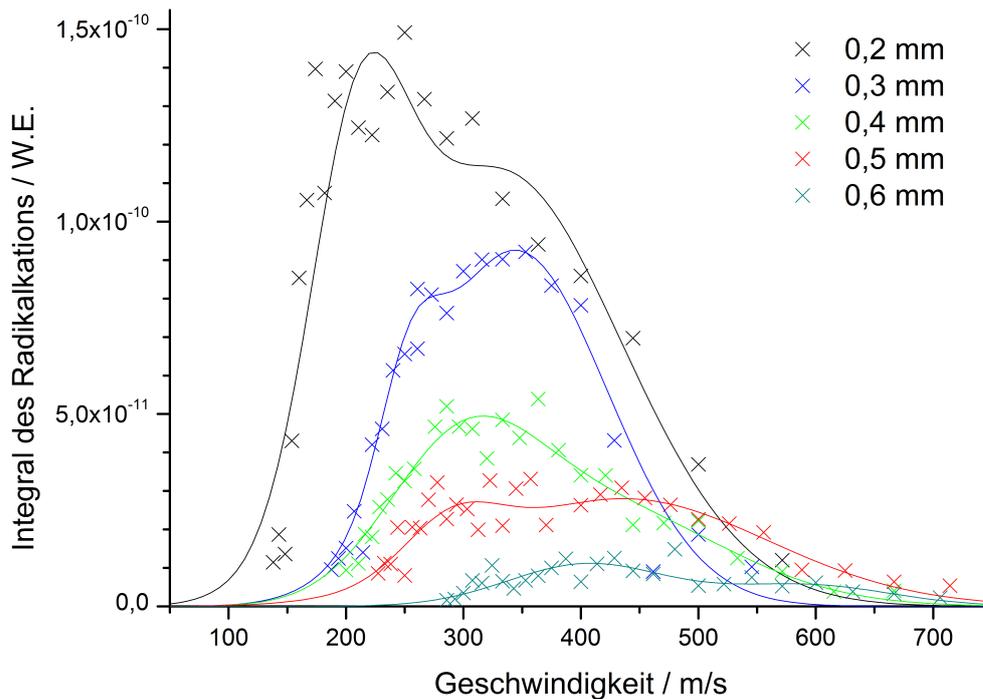


Abbildung 3.23.: Geschwindigkeitsverteilungen von CHCA/Tributylamin bei unterschiedlichen Abständen vom Ablationsort.

sehr schnelle Erwärmung der Probe am Ablationsort stattfindet, dehnt sich die Matrix an dieser Stelle auch sehr schnell aus und erzeugt einen Druckgradienten in der Flüssigkeit. Hierdurch wird eine Stoßwelle erzeugt, die sich in das Innere der Flüssigkeit ausbreitet. An der Grenzfläche zwischen Probe und Probenträger wird diese Stoßwelle reflektiert und läuft danach wieder in Richtung der Probenoberfläche. Beim Auftreffen auf die Oberfläche wird nach dem vorgeschlagenen Modell dann die zweite Ablation ausgelöst. Dieser Effekt, die Ablation von Teilchen beim Auftreffen einer Stoßwelle auf eine Flüssigkeitsoberfläche wurde auch schon in der Literatur beschrieben.^[130] Das hier beschriebene Modell ist in Abb. 3.24 graphisch veranschaulicht.

Rohlfing^[122] hat die Ausbreitung dieser Stoßwelle untersucht, wobei hier als Matrix 3-Nitrobenzylalkohol verwendet wurde. Dabei wurden Laufzeiten der Stoßwelle von der Oberfläche zum Probenträger von ca. 700 ns für eine Probendicke von ungefähr 1 mm festgestellt. Die dort verwendete Schichtdicke ist höher als in den hier untersuchten Proben, es wurde dort allerdings nur die einfache Laufzeit gemessen, nach dem oben beschriebenen Modell ist die doppelte Laufzeit der Stoßwelle entscheidend für das Auftreten der Ablation. Dadurch sollten vergleichbare Laufstrecken für die Stoßwelle bei den hier verwendeten Schichtdicken gegeben sein. Entscheidend für die Laufzeiten der

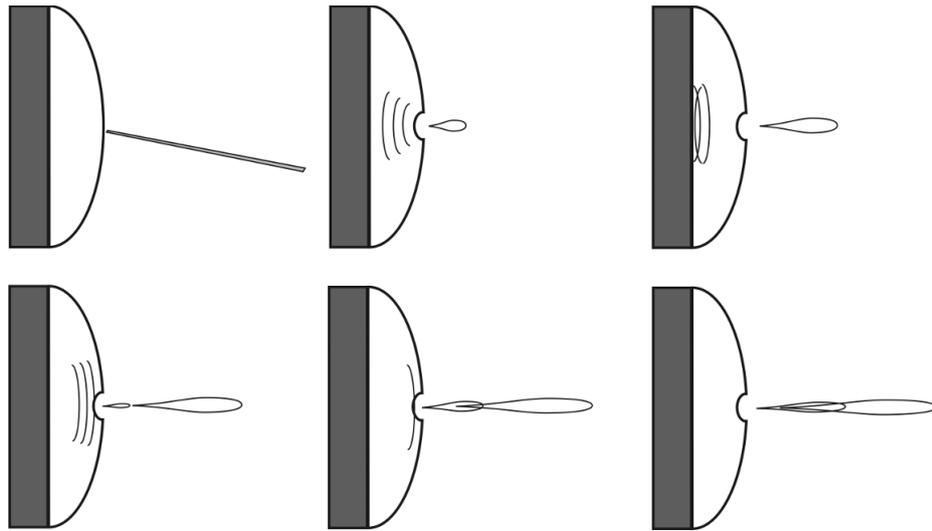


Abbildung 3.24.: Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Stoßwellenmodells.

Stoßwelle in Flüssigkeiten ist zudem die Schallgeschwindigkeit innerhalb der Flüssigkeit. Für die Schallgeschwindigkeiten in ionischen Flüssigkeiten sind allerdings keine experimentellen Werte bekannt; es ist aber anzunehmen, dass die Werte sich in den üblichen Größenordnungen für Flüssigkeiten (1000-2000 m/s) bewegen und die Laufzeiten daher vergleichbar sind.

Für eine experimentelle Bestätigung dieses Modelles ist es notwendig, die Schichtdicke der Probe zu verändern, da dies die zeitliche Lage der verzögerten Ablation verändern muss. Mit dem bisher verwendeten Aufbau ist dies allerdings nicht möglich, da eine höhere Substanzmenge dazu führt, dass die Flüssigkeit auf dem vertikal angeordneten Probenträger nach unten verläuft und die Probenschicht im Bereich des Ablationsortes unverändert bleibt. Eine Ablation im unteren Bereich ist nicht möglich, da die Ablation dann nicht mehr in der geometrischen Achse des Massenspektrometers stattfinden würde. Eine Verringerung der Schichtdicke führte auch zu keinen sinnvollen Ergebnissen, da so keine ausreichende Regeneration der Probe mehr möglich war und die Probe nach einigen Laserschüssen am Ablationsort komplett abgetragen war. Es wurde auch versucht, mittels Modifikationen am Probenträger eine Erhöhung der Probendicke zu erreichen. Zunächst würde ein Probenträger hergestellt, der eine Vertiefung von 0,5 mm in der Mitte des Probenträgers aufwies, diese wurde so groß gestaltet, dass der Ablationsort im Bereich dieser Vertiefung lag. Dies führte zu keinem Erfolg, da das schon erwähnte Verlaufen der Probe auch in dieser Vertiefung auftrat. Um dies zu umgehen wurde ein weiterer Probenträger hergestellt, bei dem eine ringförmige Vertiefung in der

Position des Ablationsortes, also 4 mm von der Mitte des Probenträgers entfernt, erzeugt wurde. Diese hatte eine Breite von 1 mm und eine Tiefe von 0,5 mm. Dadurch konnte das Verlaufen verhindert werden, aber durch die geringe Breite wurde auch hier die gesamte Probe am Ablationsort sehr schnell abgetragen. Durch Drehen des Probenträgers kann zwar die ursprüngliche Probenschicht wiederhergestellt werden, es herrscht dadurch aber keine konstante Probendicke von Messung zu Messung.

Denkbar wäre es auch, die Ionenquelle so umzubauen, dass der Probenträger horizontal im Beschleunigungsfeld platziert wird und die Ionen orthogonal zur Ablationsrichtung beschleunigt werden. Dabei würde allerdings die Möglichkeit wegfallen, den Postionisationsort aus den Flugzeiten der nachionisierten Teilchen zu bestimmen, da ein anderer Abstand zwischen Probenträgeroberfläche und Postionisationsort nicht zu einer veränderten Lage innerhalb des Beschleunigungspotentials führt.

Eine genauere Untersuchung bzw. eine Verifizierung des postulierten Modells ist also mit den gegebenen Voraussetzungen mit Hilfe der Postionisation nicht möglich. Von daher ist es notwendig eine andere Methode zu verwenden um den Einfluss der Probendicke auf die verzögerte Ablation aufzuklären. Der gewählte Versuchsaufbau ist im Abschnitt 3.3 beschrieben.

3.2.5. Zusammenfassung und Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ionische Flüssigkeiten als Matrix sehr gut geeignet sind, um Untersuchungen zum Laserablationsvorgang durchzuführen. Mit der hier verwendeten Postionisationsmethode ist eine deutliche Steigerung der Reproduzierbarkeit der erhaltenen Signalintensitäten erreicht worden. Auch in den hieraus bestimmten Geschwindigkeitsverteilungen ist zu erkennen, dass eine erheblich bessere Korrelation zwischen den Messwerten und den hieraus berechneten Geschwindigkeitsverteilungen gegeben ist, was die R^2 -Werte der Fits gut wiedergeben.

Aus den Intensitätsverteilungen ist erkennbar, dass es zwei zeitlich voneinander getrennte Ablationsereignisse gibt, wobei die Initialablation der in den festen Matrices auftretenden Laserablation entspricht. Im Vergleich der Ablationsparameter dieser Ablation mit Werten für die entsprechenden festen Matrices ist für 2,5-DHB und CHCA erkennbar, dass für die Flüssigmatrices bei einer Ablationswellenlänge von 266 nm niedrigere Geschwindigkeiten und Temperaturen vorherrschen. Zudem liegen die Werte für diese ionischen Flüssigkeiten nah beieinander, was darauf schließen lässt, dass die Unterschiede der Ablationsparameter im Feststoff zu einem großen Teil vom Kristallisationsverhalten hervorgerufen werden. Ein zusätzlicher Einfluss kann durch die Verschiebung des Absorptionsspektrums hervorgerufen werden. Bei Messungen der UV-Absorption der reinen ILM konnte eine Verschiebung der Absorption zu niedrigeren Wellenlängen festgestellt werden. Aus diesem Grund war es auch nicht möglich, die Ablation von 2,5-DHB in ionischen Flüssigkeiten mit 355 nm zu untersuchen, da hier die Absorption im Gegensatz zum Reinstoff nicht ausreichend war.

Der Effekt der Absorption des Laserlichtes auf die Ablationsparameter ist auch beim Vergleich der beiden DHB-Isomere 2,5-DHB und 3,5-DHB zu erkennen. Während das Erstgenannte bei 266 nm eine ausreichende Absorption besitzt und eine kalte Ablation aufweist, absorbiert das 3,5-Isomer nur schlecht und es sind deutlich höhere Laserflüsse notwendig, um eine Ablation/Ionisation in der Probe zu verursachen. Hierbei ist durch die höhere Eindringtiefe des Lasers und die daraus folgende niedrigere Energiedichte der *energy pooling*-Prozess ineffektiver und ein großer Teil des absorbierten Lichtes führt nur zur Erwärmung der Probe vor der Ablation. Dieser Effekt ist gut in den stark erhöhten Ablationsparametern zu erkennen.

Der Einfluss der Ablationswellenlänge konnte zusätzlich anhand der CHCA-Proben untersucht werden, hier zeigt sich, dass die Ablation bei 355 nm als heiß und schnell

einzustufen ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei dieser Wellenlänge die Energie von drei Photonen notwendig ist, um die Ionisierungsenergie zu erreichen, wogegen bei 266 nm zwei Photonen ausreichen. Das bedeutet gleichzeitig, dass eine höhere Photondichte notwendig ist, um die Ionisation zu erreichen, da ein *pooling*-Prozess, der drei Excitonen benötigt, deutlich unwahrscheinlicher ist als ein Prozess, der mit zwei Excitonen auskommt. Die absorbierte Energie, die nicht zur Ionisation führt, wird dann zu einem großen Teil in Wärme umgewandelt, so dass, trotz besserer Absorption bei dieser Wellenlänge, eine Erhöhung der Ablationsparameter folgt.

Zudem wurde festgestellt, dass in den ILMs ein zusätzlicher Ablationsvorgang zeitverzögert zum Laserpuls stattfindet, der in Messungen fester Matrices nicht erkennbar ist. Da in den Massenspektren keine Ionen detektiert werden können, die dieser Ablation entstammen, ist davon auszugehen, dass diese ausschließlich aus Neutralteilchen besteht. Mit den verwendeten Methoden ist dieser Ablationsvorgang nicht ausreichend zu charakterisieren, da die errechneten Geschwindigkeiten durch die Zeitverzögerung systematisch zu niedrig liegen. Dies könnte nur dadurch ausgeglichen werden, dass die Zeitverzögerung genau bekannt ist. Da die Teilchenwolken der beiden Ablationen sich aber bei den experimentell zugänglichen Parametern deutlich überschneiden, ist diese Bestimmung mit Hilfe der Postionisation nicht möglich.

Um die Entstehung der zweiten Ablation zu erklären wurde ein Modell postuliert, das von der Stoßwelle ausgeht, die durch die plötzliche Erwärmung und, daraus folgend, schlagartige Volumenzunahme in der Probe entsteht. Diese Stoßwelle wird nach dem Durchlaufen der Probe am Probenträger reflektiert und trifft danach wieder am Ablationsort auf, wo dadurch ein weiterer Ablationsvorgang ausgelöst wird. Die dazu benötigten Laufzeiten der Stoßwelle in der Probe stimmen dabei gut mit Literaturwerten überein. Zur Verifizierung dieser Modellvorstellung wurde versucht, die Schichtdicke der Probe zu verändern, was aufgrund von experimentellen Einschränkungen nicht möglich war. Um den zugrundeliegenden Mechanismus weiter aufzuklären, war es daher notwendig, ein anderes Messprinzip zu verwenden. Der Aufbau des dazu konstruierten Experimentes und die daraus erhaltenen Erkenntnisse sind im folgenden Abschnitt 3.3 dargestellt.

3.3. Fast Flash Imaging/Massenspektrometrie

Wie im vorherigen Kapitel schon dargestellt, war die weitere Untersuchung des Ablationsmechanismus der ionischen flüssigen Matrices mit Hilfe der Positionierung nicht möglich. Dies ist zum größten Teil darin begründet, dass die beiden Ablationsvorgänge eine so geringe Zeitverzögerung zueinander besitzen, dass bei den experimentell zugänglichen Abständen der Positionierung zum Ablationsort die beiden Ablationsplumes schon miteinander überlappen. Dadurch ist eine exakte Zuordnung der erhaltenen Intensitätswerte und der damit dargestellten Teilchendichte auf den jeweiligen Ablationsvorgang nicht mehr möglich. Zudem werden für die zeitverzögerte Ablation systematisch zu niedrige Geschwindigkeitswerte erhalten. Außerdem war es durch den vorhandenen experimentellen Aufbau nicht möglich, die Schichtdicke der Probe zu verändern, was allerdings eine Notwendigkeit darstellt, um die Gültigkeit des oben postulierten Stoßwellenmodells zu überprüfen.

Damit die Untersuchung mit einem anderen Experiment erfolgen kann, muss dieses einige Anforderungen erfüllen: Die zeitliche Auflösung muss es erlauben, den Ablationsvorgang zu mehreren Zeitpunkten darstellen zu können, damit zwischen den beiden einzelnen Ablationen unterschieden werden kann. Die räumliche Auflösung sollte besser als in Fall der Positionierungsuntersuchungen sein, wobei die gleichzeitige Darstellung eines größeren Volumens des *plume* wünschenswert ist. Zudem muss der Aufbau es ermöglichen, Änderungen der Probendicke zu ermöglichen. Weiterhin sollte eine Vergleichbarkeit der verwendeten *laser fluence* mit den Positionierungsmessungen möglich sein; dasselbe gilt für den Druck, bei dem die Experimente durchgeführt werden, da der Einfluss des selbigen auf die Ablation nicht ohne weiteres abgeschätzt werden kann.

Um die nötige Zeitauflösung zu ermöglichen, bietet sich die Verwendung eines laserbasierten Detektionsverfahrens an, da durch die vorherigen Experimente schon sichergestellt wurde, dass die zeitlichen Schwankungen hier gering genug sind. Hier bietet sich das Fast Flash Imaging an, das in der Vergangenheit schon öfter zur Visualisierung von Laserablationsvorgängen verwendet wurde. Hier sei auf den Abschnitt 2.3 für weitere Einzelheiten verwiesen. Diese Experimente wurden größtenteils aber bei Atmosphärendruck und unter Verwendung von deutlich höheren Laserflüssen und Spotdurchmessern durchgeführt. Unter den typischen MALDI-Bedingungen wurden nur Untersuchungen durchgeführt, die entweder die Veränderung der Dichte im Vakuum über der Probe detektieren können (Dunkelfeld-Photographie) oder die Streuung des Lichtes an

Partikeln, die eine gewisse Größe aufweisen müssen (Streuungsphotographie). Da aber aus den Positionismessungen nicht erkennbar ist, um was für eine Art von ablatiertem Material es sich bei den beiden Ablationsereignissen der hier verwendeten Proben handelt, ist die Verwendung einer Methode notwendig, die die gleichzeitige Detektion dieser beiden Möglichkeiten erlaubt. Dies ist mit der Schattenphotographie möglich, ob diese sich allerdings zur Detektion der geringen ablatierten Teilchenzahlen in Vergleich zu den literaturbekannten Experimenten (siehe Abschnitt 2.3) eignet, musste zunächst sichergestellt werden. Wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird, konnte die Methode soweit verbessert werden, dass dies möglich ist.

Die Variation der Probenschicht kann dadurch erreicht werden, dass der Probenträger horizontal angeordnet wird, so dass ein Verlaufen der Probe ausgeschlossen ist. Für die Vergleichbarkeit der verwendeten Laserflüsse bietet es sich an, eine gleichzeitige Detektion der erzeugten Ionen durchzuführen. Dies konnte, wie im vorherigen Aufbau auch, durch Flugzeitmassenspektrometrie erreicht werden. Dies hat den Vorteil, dass sichergestellt werden kann, dass die Untersuchungen unter weitestgehend gleichen Bedingungen durchgeführt werden, da gerade die Bestimmung der Größe des Laserspots nicht beliebig genau durchgeführt werden kann und somit die verwendete *laser fluence* einer gewissen Unsicherheit unterliegt; da dies im Hochvakuum erfolgen muss, ist die Vergleichbarkeit des bei der Messung herrschenden Druckes automatisch gegeben.

3.3.1. Experimenteller Aufbau

Wie oben schon erwähnt, wurden bisherige Experimente bezüglich der Laserablation mit Hilfe der Schattenphotographie bei deutlich größeren Laserdurchmessern (mehrere Millimeter im Vergleich zu einigen hundert Mikrometern) und Laserflüssen im J/cm^2 -Bereich durchgeführt. Diese Parameter führen zu einem deutlich höheren Materialausstoß als die in der MALDI verwendeten Bedingungen. Es ist also anzunehmen, dass die Ablation bei den hier benötigten Lasercharakteristika einen kleineren und weniger dichten *plume* erzeugt. Dies führt dazu, dass eine bessere Sensitivität des Detektionssystems benötigt wird, da das zur Belichtung des Detektorschips der CCD-Kamera (*charge coupled device*) verwendete Licht von den ablatierten Teilchen weniger abgeschwächt wird.

Fast Flash Imaging

Eine Voraussetzung für die Detektion dieser geringen Helligkeitsunterschiede ist die Parallelität des zur Belichtung verwendeten Lichtes. Trifft zu viel Streulicht auf den CCD-Chip, so kann die Gesamtintensität des detektierten Lichtes so stark erhöht werden, dass die von der Ablation verursachten Intensitätsänderungen nicht mehr wahrgenommen werden können. Aufgrund der Eigenschaften von Laserlicht bietet sich dieses hier als Belichtungsmittel an. Von daher wurde der in Abschnitt 3.2.1 erwähnte Inlite-Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm als Lichtquelle getestet. Da der Laserstrahl einen zu kleinen Durchmesser besitzt, um die gesamte Probe zu beleuchten, wurde dieser noch mit einem Teleskopaufbau auf einen Strahldurchmesser von 4 cm aufgeweitet. Dadurch wurde gleichzeitig auch die *laser fluence* verringert, um die Gesamtintensität zu verringern; eine zu hohe Laserintensität erschwert die Detektion von Intensitätsunterschieden auf der Skala der verwendeten CCD-Kamera. Mit diesem Aufbau zeigte sich, dass die Intensitätsverteilung innerhalb des Laserspots durch das *spackle*-Muster^[131] nicht homogen genug für eine annähernd gleichmäßige Ausleuchtung der Probe ist. Durch die Aufweitung des Laserstrahls und die Vergrößerung bei der Abbildung auf den CCD-Chip wird dieser Effekt noch weiter verstärkt. Eine Homogenisierung der Intensitätsverteilung war durch die Einkopplung in einen Lichtwellenleiter zwar möglich, das daraus erhaltene Licht war aber divergent und hatte eine ringförmige Struktur und war von daher nicht zur Ausleuchtung der gesamten Probe geeignet. Die Streuung des Laserlichtes an einem dünnen, faserreichen Papier konnte den *spackle*-Effekt zwar abschwächen, dies geschah aber nicht in einem ausreichenden Maße.

Eine weitere Möglichkeit, kurze Lichtpulse zu erhalten, ist die Fluoreszenz von Laserfarbstofflösungen, die mit einem entsprechenden Pumplaser angeregt werden. Diese Methode hat den Nachteil, dass die Fluoreszenz sich divergent in alle Raumrichtungen ausbreitet. Zudem ist eine Erhöhung der Fluoreszenz-Intensität auch mit einer Vergrößerung des fluoreszierenden Volumens verbunden, entweder durch das Vergrößern des Pumplaserspots oder die Erhöhung der Pumpleistung, was die Eindringtiefe in die Lösung erhöht.

Bei dem einfachsten denkbaren Aufbau wird das in Richtung der Kamera erzeugte Licht aus der Farbstofffluoreszenz mit Hilfe von zwei Linsen im entsprechenden Abstand zueinander kollimiert. Dieser Aufbau erzeugte zwar einen gleichmäßig ausgeleuchteten Bereich mit ausreichender Intensität; durch die räumliche Ausdehnung der Lichtquelle

war die Parallelität des Lichtes jedoch nicht ausreichend. Dies führt dazu, dass die Bereiche im Bild, die eine geringere Intensität zeigen sollten, durch Streustrahlung eine zu hohe Intensität erhalten. Außerdem ist es nicht möglich, die Ablation mit dem Objektiv scharf abzubilden.⁷ Um eine zufriedenstellende Abbildung der Ablation zu erreichen ist es notwendig, diese Streustrahlung zu eliminieren. Dies konnte dadurch erreicht werden, dass das vom Laserfarbstoff ausgesendete Licht mit Hilfe einer Sammellinse mit kurzer Brennweite ($f = 30\text{ mm}$) gesammelt und auf die Öffnung einer Iris fokussiert wurde. Diese Öffnung wurde auf 1 mm Durchmesser verkleinert, so dass jegliches Licht, das nicht direkt im Fokus der Linse liegt von der Iris ausgelöscht wird. Der nach dem Fokuspunkt divergent verlaufende Lichtstrahl wird dann mittels einer zweiten Sammellinse ($f = 50\text{ mm}$) kollimiert. Durch diesen Aufbau erhält man einen kollimierten Lichtstrahl, der sich so verhält, als wäre er aus einer Lichtquelle mit der Größe der Irisöffnung erzeugt worden. Die erhaltene Parallelität und Intensität des Lichtes ist dann für die im Folgenden dargestellten Messungen ausreichend.

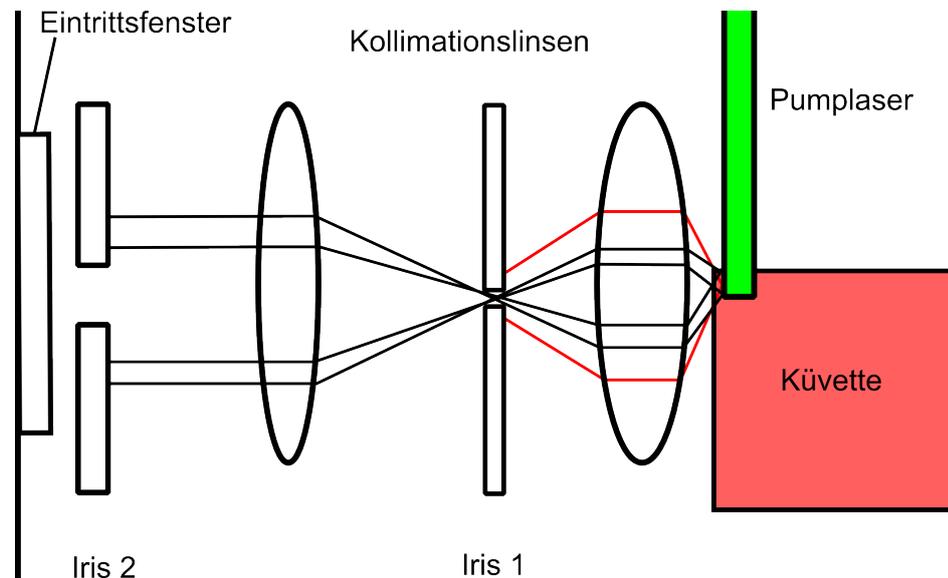


Abbildung 3.25.: Einkoppelung der Farbstofffluoreszenz zur Beleuchtung des Ablationsvorganges. Die schwarz dargestellten Lichtstrahlen laufen durch den Fokuspunkt der Sammellinse und können kollimiertes Licht erzeugen. Die roten Lichtstrahlen werden durch die Iris 1 ausgelöscht.

Um die Streuung dieses Lichtes an Objekten innerhalb der Ionenquelle zu verhindern, und den Eintritt von Streulicht aus anderen Lichtquellen wie z.B. dem Pumplaser zu vermeiden, wurde eine weitere Iris von dem Eintrittsfenster der Ionenquelle platziert.

⁷Hierauf wird später noch genauer eingegangen.

Diese Iris wurde so eingestellt, dass die Probe für die Messungen ausreichend beleuchtet wurde. Dieser Aufbau ist in Abb. 3.25 dargestellt. Entscheidend für eine ideale Ausleuchtung des Ablationsvorganges ist auch die korrekte Platzierung der Quasilichtquelle und des Fluoreszenzortes. Beides muss exakt auf derselben Höhe wie die Probenoberfläche liegen. Ist dies nicht der Fall, so passiert das Licht die Ionenquelle nicht parallel zum Repeller und der darauf platzierten Probe. Ist die Quasilichtquelle zu niedrig platziert führt dies dazu, dass der Ablationsort nicht beleuchtet wird, da das Licht schon am Repeller reflektiert wird und die Probe in dessen Schatten liegt. Ist die Lichtquelle andererseits zu hoch platziert kommt es zur Reflektion des Belichtungspulses auf der Repelleroberfläche. Auch dadurch ist es nicht mehr möglich, den *plume* sichtbar zu machen, da das reflektierte Licht das Bild der Ablation zu stark überlagert. Da die Farbstofflösung in einer oben geöffneten Küvette verwendet wurde, war es notwendig, die Küvette in einem höhenverstellbaren Halter zu montieren, um die Verdunstung des Lösungsmittels und folglich die Verschiebung der Flüssigkeitsoberfläche auszugleichen. Um eine möglichst große Fluoreszenzintensität zur Belichtung zu erhalten, wurde der Pumplaser spot möglichst nah an der Sammellinse platziert.

Nach dem Durchtreten der Ionenquelle und der Abschwächung des Lichtes durch die ablatierten Teilchen muss dieses detektiert werden. Das geschah durch eine CCD-Kamera (TE/CCD) der Firma Princeton Instruments (Trenton, New Jersey, USA). Der in dieser Kamera verwendete CCD-Chip stammt von EEV (Chelmsford, UK) und besteht aus 1152×298 Pixeln der Größe $22,5 \times 22,5 \mu\text{m}^2$, dies ergibt eine aktive Oberfläche von $25,9 \times 6,7 \text{mm}^2$. Zur Verringerung des Dunkelrauschens des Detektors wurde der CCD-Chip thermo-elektrisch auf ca. -35°C gekühlt.

Aus den Positionierungsexperimenten kann abgeschätzt werden, dass der *plume* eine signifikante Teilchendichte nur in einem Bereich von ungefähr 0,5 mm oberhalb der Probe aufweist. Bei der Betrachtung der Pixelgröße des CCD-Chips ergibt sich ohne Vergrößerung nur ein Bereich von 20 Pixeln, auf die das Ablationsereignis abgebildet wird. Bei ersten Experimenten mit einem vorhandenen Tachonar 1:1 Objektiv (Astro, Berlin, Deutschland) wurde auch genau dies festgestellt. Da durch die geringe Anzahl an Pixeln die Aussagekraft der erhaltenen Schattenbilder nicht ausreichend ist, um den Ablationsprozess zu untersuchen, musste eine Vergrößerung nach der Abschwächung des Lichtes erreicht werden, um einen ausreichend großen Bereich des CCD-Chips zur Abbildung der Ablation zu verwenden. Dies konnte mit einem Standardphotoobjektiv durchgeführt werden. Das hierbei verwendete Objektiv DX AF-S NIKKOR 18-55 mm 1:3.5-5.6G der

Firma Nikon (Tokio, Japan) musste in Retrostellung in den Strahlengang eingebracht werden, um eine ausreichende Vergrößerung zu erzielen.

Unter Retrostellung versteht man die Verwendung des Objektivs um 180° zur eigentlichen Stellung gedreht. Dadurch ist eine deutlich höhere Vergrößerung als in normaler Positionierung möglich, allerdings ergeben sich veränderte Anforderungen bezüglich der Abstände des Objektivs zu Objekt und Kamera. Das Objektiv ist so konstruiert, dass es das Objekt scharf auf den Kamerachip in einem vorgegebenen Abstand abbildet. Bildseitig liegt der Chip also in der Brennebene des Objektivs; die Lage dieser Ebene ist durch die Brennweite des Objektivs gegeben. Diese lässt sich bei dem verwendeten Objektiv stufenlos zwischen 18 und 55 mm einstellen. Bei der Verwendung in Retrostellung werden nun Bildseite und Objektseite vertauscht, wodurch eine scharfe Abbildung des Objektes nur möglich ist, wenn sein Abstand zur Bildseite der Brennweite entspricht. Von daher ist der Abstand des Objektivs zum Ablationsort recht genau vorgegeben, experimentell ergab sich ein Abstand von 35 mm als Idealwert. Die erhaltene Vergrößerung kann durch den Abstand zwischen Objektiv und Kamera verändert werden, hier wurde ein Abstand von 20 cm gewählt, um den Ablationsvorgang auf einem möglichst großen Bereich des CCD-Chips abzubilden.

Wie oben erwähnt besitzt der Chip eine längliche Form. Es gibt also zwei denkbare Positionierungen der Kamera, die vertikale oder horizontale Anordnung der längeren Seite, hier stellte sich die vertikale Variante als sinnvoller heraus, da so die Vergrößerung auf die Breite der Ablation eingestellt werden konnte und ein ausreichender Bereich oberhalb der Probe abgebildet wurde. Die horizontale Anordnung verringerte die maximal mögliche Vergrößerung. Der Raum zwischen Objektiv und Kamera musste so gut wie möglich gegen Lichteinfall von äußeren Lichtquellen abgedunkelt werden, da sonst eine zu hohe Intensität auf dem Kamerachip gemessen wurde. Dadurch wird der Kontrast des eigentlichen Bildes deutlich verschlechtert. Dieser Effekt wird vor allem dadurch hervorgerufen, dass die Belichtungszeit der Kamera minimal im ms-Bereich liegt, die Dauer des Beleuchtungspulses aber nur einige Nanosekunden beträgt. Solange der Shutter der Kamera geöffnet ist, wird das einfallende Streulicht auch detektiert, von daher reicht hier schon eine recht geringe Intensität zur Störung der Aufnahme aus, da der Zeitraum der Detektion um einen Faktor von ungefähr 10^6 höher ist als das eigentlich zu detektierende Phänomen. Auf das genaue Timing des Experimentes wird unten noch weiter eingegangen.

Auch bei der Verwendung des oben vorgestellten Strahlenganges der Belichtung durch die Fluoreszenz kam es noch zur Detektion von Streulicht bzw. Licht, das sich nicht exakt parallel zum Repeller durch die Ionenquelle ausbreitet. Da hierdurch auch eine Verschlechterung des Kontrastes hervorgerufen wird, musste die Blendeneinstellung des Objektivs möglichst gering gewählt werden, um zu verhindern, dass dieses unerwünschte Licht vom CCD-Chip detektiert wird. Gleichzeitig wird durch die verkleinerte Blende aber auch die Intensität des Lichtes und der beleuchtete Bereich des Kamerachips verringert, so dass hier eine Einstellung notwendig war, die das Streulicht auslöscht, aber die Detektion des durch die Ablation abgeschwächten Lichtes noch zulässt. Dies konnte mit einer mittleren Öffnung der Blende erreicht werden.⁸

Durch den niedrigen, vorgegebenen Abstand zwischen Ablationsort und Objektiv ergeben sich für die weitere Konstruktion des Experimentaufbaus Schwierigkeiten, da dieser Abstand im Bereich der Größe der normalerweise verwendeten Beschleunigungsplatten und des Repellers liegt. Zusätzlich muss das Objektiv außerhalb des Vakuumbereiches platziert sein, da die Scharfstellung und die Blendeneinstellung noch zugänglich sein mussten, um das erhaltene Bild zu optimieren. Der verwendete Aluminiumwürfel für die Ionenquelle hat eine Kantenlänge von 15 cm. Da eine Platzierung des Ablationsortes in der Mitte des Würfels durch die gleichzeitige Verwendung als Flugzeitmassenspektrometer vorgegeben ist, damit die erzeugten Ionen auch den Detektor erreichen können, muss das Objektiv also von außen in den Würfel eingelassen werden. Dies konnte mit Hilfe eines Aluminiumzylinders erreicht werden, in dem auf der Innenseite ein Fenster angebracht wurde, damit das Licht ungehindert das Objektiv erreichen kann. Dieser Aufbau ist in Abb. 3.26 skizziert.

Massenspektrometrie

Um den benötigten Abstand zwischen Ablationsort und Objektiv erreichen zu können, war es notwendig, für Repeller und Beschleunigungsplatten einen geringeren Durchmesser von 44 mm zu verwenden. Dadurch ergab sich noch ein Abstand von 13 mm zwischen dem äußeren Rand des Repellers und dem Fenster vor dem Objektiv. Durch diesen geringen Abstand konnten in diesem Aufbau nicht die MALDI-üblichen Beschleunigungsspannungen verwendet werden; maximal wurde eine Spannung von 6 kV benutzt. Dies

⁸Da das Objektiv in diesem Aufbau nicht mit einem Kameragehäuse verbunden war musste die Einstellung der Blende manuell erfolgen, daher ist es nicht möglich, einen Zahlenwert anzugeben.

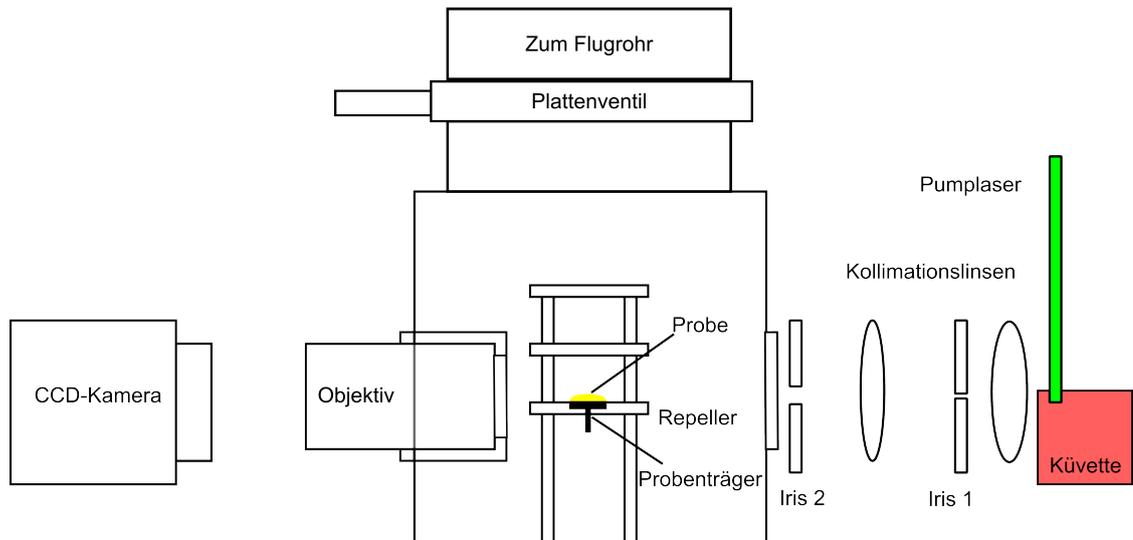


Abbildung 3.26.: Schematische Darstellung des verwendeten Aufbaus, Vorderansicht.

stellt aber kein größeres Problem dar, da sich durch die Fragestellung keine hohen Anforderungen an das Auflösungsvermögen des Gerätes ergeben. Die Flugzeitspektren sollen hauptsächlich eine Aussage zur *fluence threshold* der Probe zulassen, hierfür reichen die verwendeten Beschleunigungsspannungen aus. Durch die notwendige Einbringung des Objektivs in den Würfel der Ionenquelle bedingt, musste die Ionenquelle so gebaut werden, dass Fluoreszenzort, Probenoberfläche, die Mitte des Objektivs und der CCD-Chip auf einer Höhe liegen. Dafür war es nötig, die Repellerplatte mit einem deutlichen Abstand zum Boden des Quellenwürfels zu befestigen. Dies wurde mit Abstandshaltern aus Keramik erreicht, welche eine Länge von 65 mm besaßen und in die Bodenplatte des Würfels eingeschraubt wurden. Auf diesen Haltern wurde die 3 mm starke Repellerplatte befestigt und jeweils im Abstand von 20 mm eine Beschleunigungs- und die 0 V-Platte mit einer Stärke von 2 mm. Die Potentialdifferenzen der zwei Beschleunigungsstufen wurden so gewählt, dass der Ortsfokus der zweistufigen Ionenquelle in der Detektorebene liegt, der Repeller lag auf einem Potential von 6000 V, die Beschleunigungsplatte bei 5430 V.

Die Probe wurde auf einem Probenträger mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Stärke von 2,5 mm in eine entsprechende Aussparung in der Mitte des Repellers platziert. An der Unterseite des Probenträgers ist eine runde Verlängerung mit einem Durchmesser von 2 mm und einer Länge von 5 mm angebracht, die das korrekte Positionieren der Probe und das Entfernen des Probenträgers aus den Repeller erlaubt. Eine Einbringung des Probenträgers in die Ionenquelle war durch diese Aufbauten immer mit dem Belüften

dieser verbunden. Von daher konnte das Flugrohr mit Hilfe eines Plattenventils von der Ionenquelle abgetrennt werden, um ein zusätzliches Belüften von diesem zu vermeiden. In den beiden darüber liegenden Beschleunigungsplatten waren mittig 10 mm breite runde Öffnungen, um die Ionen in Richtung des Detektors zu beschleunigen. Der verwendete Aufbau ist in Abb. 3.26 gezeigt.

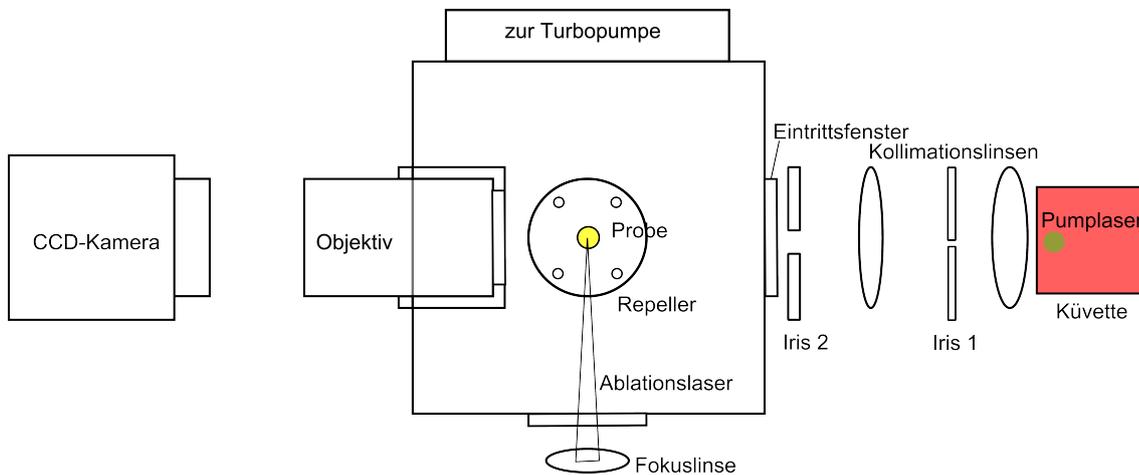


Abbildung 3.27.: Schematische Darstellung des verwendeten Aufbaus, Aufsicht.

An der Rückseite der Ionenquelle ist eine Turbomolekularpumpe (THP 170, Pfeiffer Vacuum, Asslar, Deutschland) platziert, mit dieser war es möglich, einen minimalen Druck von 1×10^{-6} mbar zu erreichen. Für Messungen bei höheren Drücken wurde die Ionenquelle mit Hilfe der Vorpumpe auf den gewünschten Wert evakuiert, dieser Druck blieb ausreichend lange konstant, um die Messungen durchzuführen. Auf der Vorderseite war das Fenster für die Einkoppelung des Ablationslasers angebracht. (Siehe auch Abb. 3.27.) Dieses wurde so angeordnet, dass der einfallende Laserstrahl in einem möglichst großen Winkel auf die Probe traf. Aufgrund des restlichen Aufbaus war hier maximal ein Einfallswinkel von 30° zu erreichen.

Für die Ablation wurde derselbe Laser verwendet wie bei den Positionierungsexperimenten. Auch die Fokussierung dieses Lasers wurde analog zu dem vorherigen Aufbau mit einer Sammellinse mit 200 mm Brennweite durchgeführt. Diese Linse war in alle Raumrichtungen präzise verstellbar montiert, um eine genaue Kontrolle über den Ablationsort und den Laserspotdurchmesser zu ermöglichen. Der Ablationslaser wurde wieder mit Wellenlängen von 266 und 355 nm verwendet, eventuell auftretendes Streulicht dieses Lasers stellt kein Hindernis für die Aufnahme der Schattenbilder dar, da die Linsen des Objektivs bei diesen Wellenlängen nicht durchlässig sind.

Die feldfreie Driftstrecke im Flugrohr wurde experimentell ermittelt, hierzu wurde eine sehr dünne Schicht von Alkalisalzen auf den Probenträger aufgebracht und diese mit einer Wellenlänge von 266 nm ablatiert. Das erhaltene Flugzeitspektrum ist in Abb. 3.28 gezeigt. Mit Hilfe der gemessenen Flugzeiten und den bekannten Beschleunigungsfeldern konnte über die in Abschnitt 2.1.2 gezeigten Gleichungen die feldfreie Flugstrecke auf 1,49 m bestimmt werden.

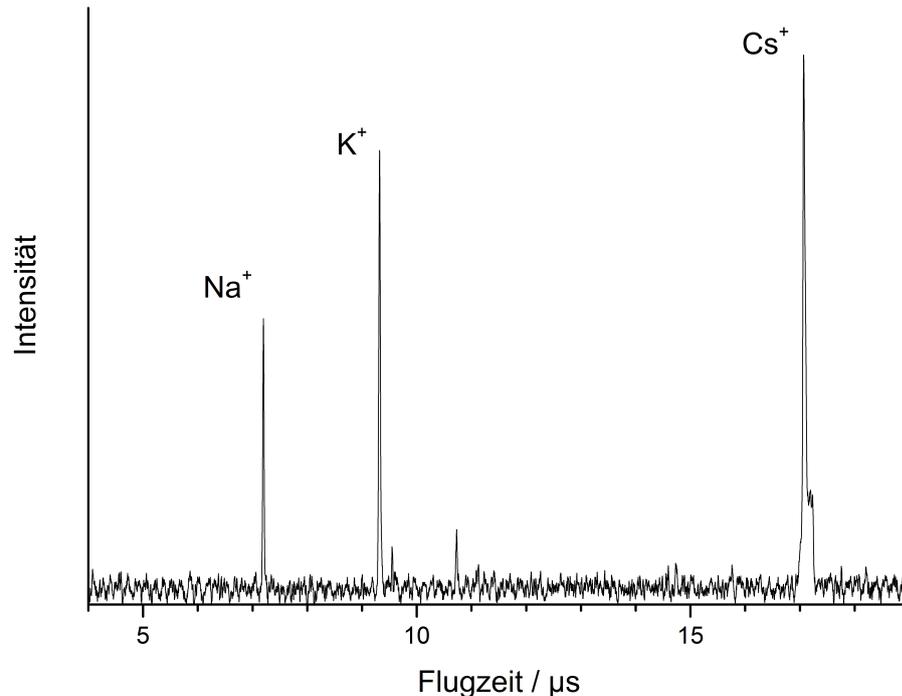


Abbildung 3.28.: Flugzeitspektrum verschiedener Alkalkationen zur Bestimmung der Driftstrecke des Flugzeitmassenspektrometers.

Zeitliche Steuerung des Experimentes

Da im Gegensatz zu den Positionierungsexperimenten bei den Schattenbildaufnahmen keine Mittelung über mehrere Ablationsereignisse möglich ist, bekommt die exakte zeitliche Steuerung des Experimentes eine noch höhere Bedeutung. Vor allem im Anfangsstadium der Ablation ist eine möglichst fehlerfreie Einstellung des Delays zwischen dem Ablations- und dem Beleuchtungspuls notwendig. Zusätzlich zur Ansteuerung der Laser kommt hier auch noch das Auslösen der Kamera als weitere Variable hinzu. Die Beleuchtungszeit der Kamera wird über einen eingebauten mechanischen Shutter gesteuert. Dies ist ein sogenannter Zentralshutter, der sich kreisförmig von der Mitte her

öffnet. Bei den hier verwendeten minimalen Belichtungszeiten kommt es durch die Zeit, die der Shutter zum Öffnen braucht dazu, dass die Mitte des CCD-Chips länger dem Umgebungslicht ausgesetzt ist, als die Randbereiche. Damit der Fehler der Intensitätswerte hierdurch möglichst gering gehalten werden kann, wurde die Abbildung der Ablation in der Shuttermitte platziert, da der entstehende Fehler in den Aufnahmen an diesem Ort am geringsten ist.

Durch den Öffnungsvorgang der Kamera und die für den Datentransfer von dieser zum Messrechner benötigte Zeit war die maximale Repetitionsrate der Kameraaufnahmen eingeschränkt; bei der geringsten möglichen Öffnungszeit⁹ konnte ca. alle 5 Sekunden eine Aufnahme ausgeführt werden.

Das Auslösen der Kamera wurde an den Q-Switch-Trigger des Ablationslasers gekoppelt; das erforderliche Delay musste experimentell gefunden werden, da die Kamera eine deutliche Verzögerung zwischen Eingang des Pulses und Öffnung des Shutters aufweist. Zusätzlich musste das Delay noch so weit erhöht werden, bis der beleuchtete Bereich vor dem Laserpuls komplett freigelegt wurde. Bei zu geringen Werten konnten noch dunkle Bereiche durch die Lamellen der Shutters beobachtet werden.

Die Steuerung der beiden Laser wurde prinzipiell wie bei der Positionierung betrieben, der Beleuchtungslaser mit 20 Hz wurde als Ausgangspunkt verwendet und der Ablationslaser (10 Hz) so angepasst, dass er zum gewünschten Zeitpunkt vor dem nächsten Beleuchtungspuls ausgelöst wurde. Da durch die Verwendung der Kamera zusätzliche Triggerpulse notwendig waren, wurde die Steuerung umgestellt und mit einem 8-Kanal-Delaygenerator (9520 Pulse Generator, Quantum Composers, Bozeman, Montana, USA) realisiert. Dieser bietet im Vergleich zu dem vorher verwendeten DG-535 den Vorteil, dass das Auslassen von Triggerpulsen möglich ist, also die nötige Frequenzhalbierung für den Ablationslaser ohne die externe f/2-Schaltung möglich war. Dadurch war es zusätzlich auch möglich, die Ansteuerung der Kamera mit einer Frequenz von 0,2 Hz direkt aus dem Q-Switch-Puls des Ablationslasers zu erzeugen. Da der Beleuchtungslaser mit der doppelten Frequenz des Ablationslasers betrieben wird, ist es zwingend erforderlich, dass die Zeit, die der CCD-Chip belichtet wird, geringer als die Zeit zwischen zwei Belichtungspulsen (50 ms) ist. Dies konnte mit dem verwendeten Shutter bei den minimalen Öffnungszeiten problemlos erreicht werden.

⁹Im Steuerungsprogramm der Kamera ist die Öffnungszeit des Shutters stufenlos bis in den Pikosekundenbereich einstellbar, es wurde aber festgestellt, dass ein Wert unter 3 ms keine Veränderung mehr hervorrief.

Wie schon erwähnt war der Ausgangspunkt der Triggerkaskade der zur Belichtung eingesetzte Inlite-Laser, dieser wurde mit jeweils einem Puls für die Blitzlampen und den Q-Switch durch den Delaygenerator ausgelöst. Zur Erzeugung des Ausgangspulses für die Kaskade wurde der unter 3.2.1 schon beschriebene externe 20 Hz-Pulsgeber verwendet. Auch das Speicheroszilloskop zur Aufzeichnung der Flugzeitspektren wurde durch den Delaygenerator getriggert, dieses war an den Q-Switch des Ablationslasers gekoppelt. Der beschriebene Aufbau ist auch in Abb. 3.29 dargestellt.

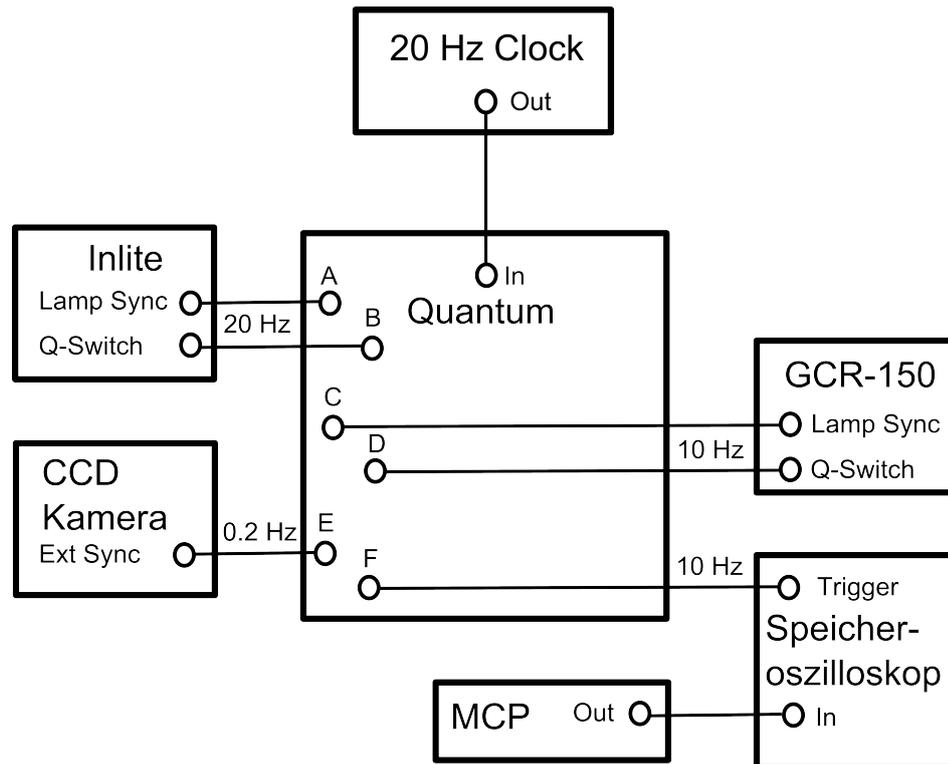


Abbildung 3.29.: Schaltplan des verwendeten Aufbaus für die FFI/TOF-Kopplung.

Die verwendete Triggerkaskade (dargestellt in Abb. 3.30) war so konzipiert, dass die beiden Detektionssysteme (CCD-Kamera und TOF-MS) zeitlich starr an den Ablationslaser gebunden sind, obwohl dieser nicht den Ausgangspunkt der Kaskade darstellt. Wie schon bei den Positionierungsexperimenten war diese Lösung notwendig, da die Repetitionsrate des Belichtungslasers höher als die der Ablation ist.

Da die maximale Wiederholungsrate der Kamera bei 0,2 Hz liegt, kann nur jeder fünfzigste Ablationslaserpuls zur Aufnahme eines Schattenbildes verwendet werden. Gerade bei dünneren Proben war es möglich, dass es dadurch zu einem Problem mit zu

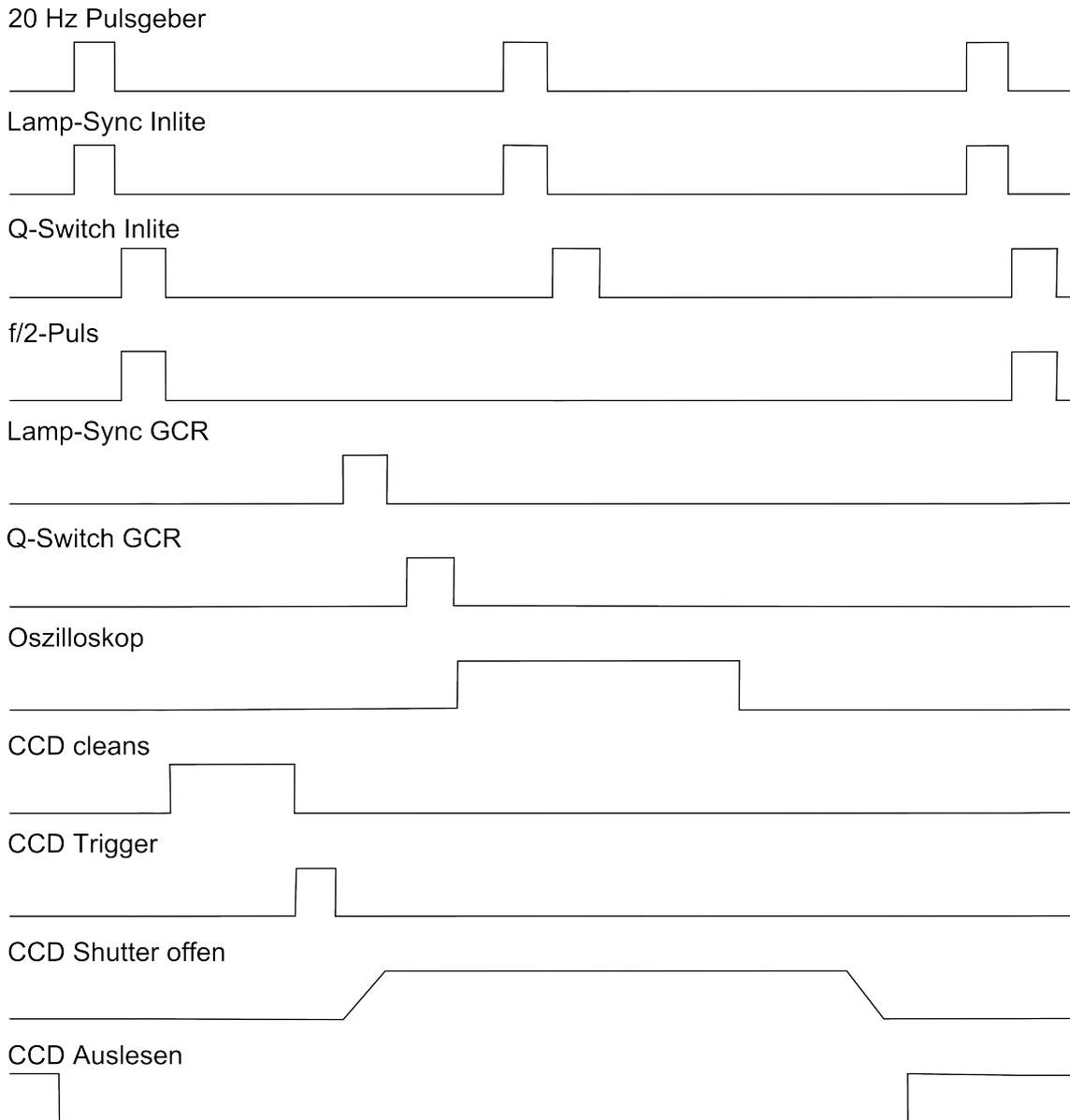


Abbildung 3.30.: Pulsdiagramm der Triggerkaskade für die FFI-Experimente.

starkem Probenabtrag kam. Von daher wurde versucht eine geringere Frequenz des Ablationslasers zu erreichen, in dem die Blitzlampen zwar weiterhin mit 10 Hz getriggert wurden, die Pockelszelle aber nur bei jedem zehnten Blitzpuls geöffnet wurde. Dieses Verfahren erzielte zwar den gewünschten Effekt einer geringeren Ablationsfrequenz, bewirkte aber auch starke Veränderungen des Strahlprofils des Ablationslasers. Zusätzlich wird durch dieses Prinzip die Aufnahme der Massenspektren erschwert, da hier weiterhin eine Mittelung über mehrere Spektren vorgenommen wurde und die hierfür benötigte Zeit folglich auch um den Faktor 10 vergrößert wurde. Es wurde von daher bei dünneren Proben dazu übergegangen, den Ablationslaser weiterhin mit 10 Hz zu betreiben und in dem Zeitraum zwischen den Kameraaufnahmen manuell zu blockieren. Dasselbe Verfahren wurde auch bei Messungen mit erhöhter *laser fluence* verwendet, da es hier sonst auch zu einem Problem mit dem stärkeren Probenabtrag kommen würde.

Theoretisch ist es mit der verwendeten CCD-Kamera möglich, höhere Repetitionsraten zur Aufnahme der Bilder zu erhalten. Im sogenannten *frame transfer*-Modus wird nur ein Teil des Kamerachips für das aufgenommene Bild verwendet und die erzeugten Ladungen werden danach auf einen anderen Bereich des Chips transferiert und ausgelesen. Nachdem die Ladungen auf dem bildgebenden Bereich gelöscht wurden ist eine weitere Beleuchtung möglich. Hierbei treten aber im verwendeten Aufbau mehrere Probleme auf: Da der Shutter während dieses Vorgangs durchgehend geöffnet ist, werden in dem Bereich, auf den die Aufnahmen transferiert werden, auch durch auftreffende Photonen zusätzliche Ladungen erzeugt, die das eigentliche Bild verfälschen. Zwar werden die hier auftretenden Ladungen vor dem Transfer durchgehend gelöscht, der Transfer und das Auslesen finden aber nur innerhalb von Millisekunden statt, so dass der nächste Beleuchtungspuls während dem Auslesen dieses Bereiches eintrifft und das Bild unbrauchbar macht. Ein weiteres Problem stellt die Größe der benötigten Fläche des Bildes auf dem Chip dar: Um die notwendige Vergrößerung zu erreichen ist es hier nur möglich, das Bild auf ein Drittel der Chipfläche zu beschränken, so dass nur noch zwei gleichgroße Bereiche für den Transfer zur Verfügung stehen. Da zudem die Veränderung des Delays zwischen den Lasern manuell erfolgen musste, ist die geringe Zeit, die zwischen den Aufnahmen stattfindet nicht ausreichend, damit dies durchgeführt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit ist es, durchgehend die erzeugten Ladungen auf dem gesamten Chip zu löschen, bis das Triggersignal eintrifft. Um hier keine Verfälschung der Bilder durch unterschiedliche Expositionszeiten zu erzeugen, wäre es notwendig, das Triggersignal für die Kamera an den Belichtungslaser zu koppeln, da sonst das unterschiedliche

Delay zu verschiedenen Zeiträumen zwischen Trigger- und Beleuchtungspuls führt. Die Erzeugung von zwei frequenzhalbierten Pulsen mit unterschiedlichen Abständen aus dem selben Ursprungspuls führte im verwendeten Delaygenerator aber zu einer Erhöhung des *jitter* zwischen den Lasern. Zusätzlich führt die benötigte Zeit zum Auslesen der einzelnen Pixel zu einem systematischen Fehler der Intensitäten zwischen den Pixeln. Bei der Verwendung des Shutters tritt dieses Problem nicht auf, da das Auslesen erst nach dem Schließen des Shutters durchgeführt wird. Von daher stellte die verwendete Lösung unter Zuhilfenahme des Shutters trotz der geringen Wiederholungsrate die praktikabelste Lösung dar, um den Fehler, der durch die Detektion von Streulicht entsteht, möglichst gering zu halten.

Datenverarbeitung

Die Lichtintensitäten, die auf dem CCD-Chip in Form von Ladungen auf den einzelnen Pixeln erhalten werden, wurden durch eine Controllereinheit (ST-138, Princeton Instruments, Trenton, New Jersey, USA) ausgelesen und auf einen PC transferiert. Dort wurden sie mit dem zugehörigen Programm Winspec (Version 2.52) angezeigt. Dieses Programm wurde gleichzeitig auch zur Steuerung der Aufnahme-Parameter verwendet. Vor der Aufzeichnung eines Bildes wurden die auf dem Chip durch Dunkelrauschen vorhandenen Ladungen in 4 Durchgängen gelöscht, wobei pro Durchgang jeder Pixel 10 mal entladen wurde. Dadurch, und durch die Kühlung des Chips, wurde sichergestellt, dass dieses Rauschen einen möglichst geringen Einfluss auf die erhaltenen Intensitäten hat. Bei jeder Aufnahme wurde der gesamte Detektor ausgelesen und das erhaltene Bild angezeigt. Eine Mittelung über mehrere Aufnahmen ist durch die Software möglich; wie in Abb. 3.32 dargestellt ist, war die Reproduzierbarkeit der Aufnahmen aber gut genug, so dass dies nicht notwendig ist. Die erhaltenen Bilder wurden von der Software im programmeigenen SPE-Format gespeichert. Für die weitere Verarbeitung der Daten war die Konvertierung in ein anderes Dateiformat notwendig, dies konnte mit dem Programm ImageJ^[132] durchgeführt werden.

Die Kamera erzeugt die Bilder in Graustufen mit einer Farbtiefe von 16 Bit, die Intensität kann also Werte zwischen 0 und 65.536 annehmen, wobei ein Wert von 0 die komplette Abwesenheit von Ladungen auf dem Pixel darstellt und aufgrund des Dunkelrauschen auch bei völliger Dunkelheit nicht zu erreichen ist. Bei dem Maximalwert ist die höchstmögliche Ladungsdichte des Pixels erreicht, eine noch stärkere Beleuchtung

kann den Wert dann nicht mehr erhöhen, kann aber dazu führen, dass Ladungen auf die benachbarten Pixel übertragen werden; dieser Effekt ist auch als *smearing* bekannt. Da dies auch schon bei Werten unterhalb des Maximalwertes auftreten kann, ist es auch aus diesem Grund notwendig, das auf den Detektor treffende Streulicht zu minimieren. Bei den später dargestellten Aufnahmen wurde in den Bereichen, auf die kein direktes Licht aus der Farbstofffluoreszenz trifft, also z.B. im Schatten des Probenträgers, ein Intensitätswert von ungefähr 500 erhalten. Nicht durch Teilchen aus der Ablation abgeschwächtes Licht erzeugte leicht schwankende Werte zwischen 900 und 1200. Diese Schwankungen stammen aus der Fluoreszenz und der zur Anregung verwendeten Pumplaserstrahlung. Zur Darstellung der Ablation ist dann also der Bereich zwischen den eben genannten Werten für komplett ausgelöschtes und nicht abgeschwächtes Licht verfügbar, um die Intensitätsänderung des Lichtes zu veranschaulichen. Der so erhaltene Dynamikbereich von ca. 550 *counts* ist groß genug, um eine zuverlässige Aussage über die ablatierten Teilchen treffen zu können. Für die Darstellung der Bilder wurden die Helligkeitswerte auf diesen Dynamikbereich beschränkt, so dass der Probenträger, ebenso wie die Probe, als schwarze Fläche zu erkennen ist; dies ist in Abb. 3.31 dargestellt.

Da die Fluoreszenz wie schon erwähnt leichte Schwankungen in der Intensität zeigte, ist der Maximalwert bei ungeschwächtem Lichteinfall leicht variabel, was auch in den unterschiedlichen Hintergrundhelligkeiten der einzelnen Aufnahmen zu erkennen ist. Eine Abschwächung des Lichtes ist nicht nur durch die Ablationswolke möglich, sondern auch durch andere Objekte im Strahlengang der Belichtung. So kann z.B. Staub auf den Optiken eine Schwächung des Lichtes verursachen. Dies ist in den Bildern aber von der Abschwächung durch die ablatierten Teilchen unterscheidbar, da dieser Staub sich nicht in der Schärfeebene des Objektivs befindet und von daher unscharf abgebildet wird. Eine Störung, die in den Aufnahmen erkennbar ist, wird durch Verunreinigungen auf den CCD-Chip verursacht. Diese führen an den jeweiligen Stellen auf dem Chip zu einer zusätzlichen Abschwächung des einfallenden Lichtes, sind aber gut von den Effekten der Ablation zu unterscheiden, da die Verringerungen der Intensität immer an den selben Stellen im Bild auftreten, wie auch in Abb. 3.31 zu erkennen ist. Eine Korrektur hiervon über eine Hintergrundintensitätsverteilung, die von den aufgenommenen Bildern subtrahiert wird, erwies sich nicht als praktikabel, da die Absolutwerte der Intensität wie erwähnt Schwankungen aufweisen; dadurch blieben diese Stellen weiterhin sichtbar. Bei höheren Lichtintensitäten ist die Abschwächung des Lichtes nicht so stark ausgeprägt, mit dem verwendeten Aufbau konnte aber keine höhere Intensität erreicht werden; eine weitere Erhöhung der Pumplaserleistung führte zu dem, dass die Größe des

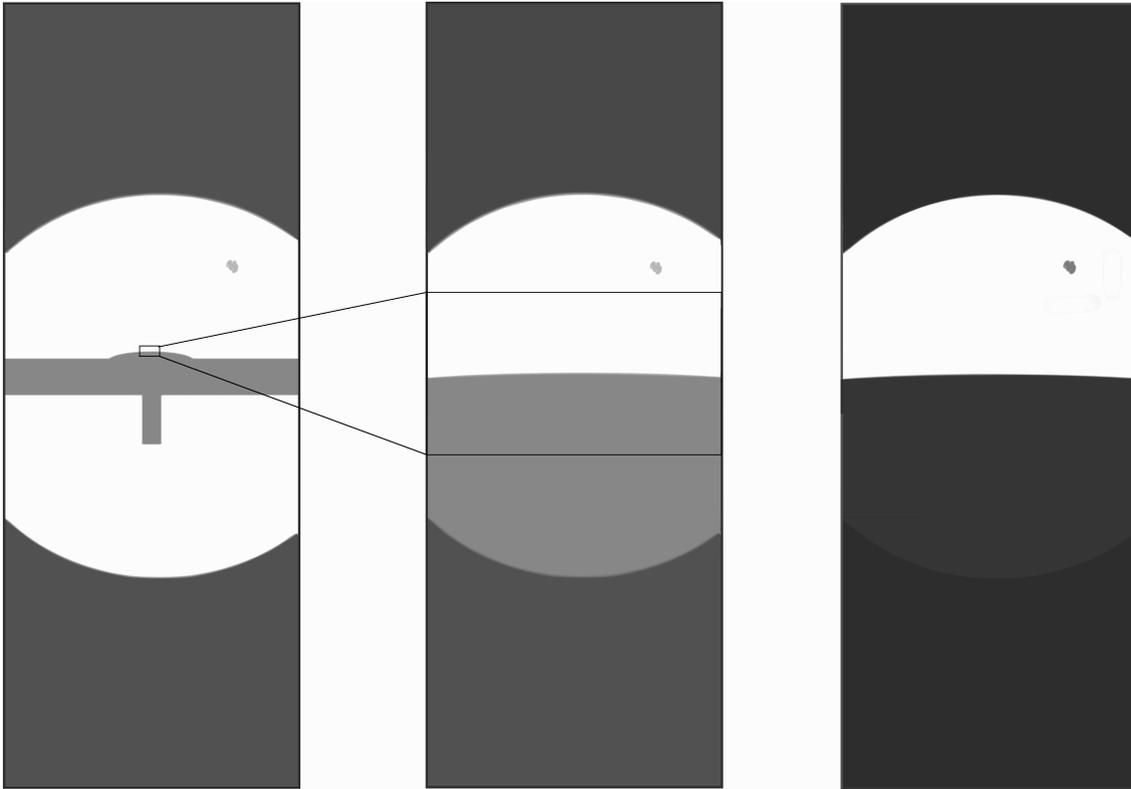


Abbildung 3.31.: Schematische Darstellung der erhaltenen Aufnahmen. Das linke Bild zeigt die Aufnahme ohne, das Mittlere mit Vergrößerung durch das Objektiv. Im rechten Bild ist der Effekt der Anpassung des Dynamikbereiches des vergrößerten Bildes dargestellt. Der Fleck in den Bildern zeigt die Abschwächung der Intensität durch Verunreinigungen auf dem CCD-Chip.

fluoreszierenden Bereiches erhöht wurde, was bei dem verwendeten Strahlengang nur zu einer geringen Erhöhung der verwendbaren Lichtintensität führte. Zum anderen wird der Energieeintrag in die Farbstofflösung dadurch erhöht, was entweder zu Ablationseffekten in dieser oder sogar zur Entzündung des Lösungsmittels führt.

Wie in Abb. 3.31 gut zu sehen ist, wird aufgrund der Form des CCD-Chips nur ein Ausschnitt benötigt, um den Ablationsvorgang darzustellen. Das automatische Zuschneiden der Bilder auf den entsprechenden interessanten Bereich wurde über ein Script mit Hilfe des Programmes IrfanView realisiert.

Messung

Wie schon im Bezug auf den Aufbau des Experimentes erwähnt, ist für die Qualität der Aufnahmen sehr wichtig, dass die Ablation in der Schärfeebene des Objektivs stattfindet. Damit dies durch die Justage erreicht werden kann, wurde die Fokuszuglinse des Ablationslasers wie beschrieben so montiert, dass sie in alle Raumrichtungen exakt positioniert werden kann, um die notwendige Präzision beim Einstellen des Ablationsortes zu erreichen. Die Schärfeebene des Objektivs wurde so eingestellt, dass sie sich in der Mitte des Probensträgers befindet. Dies ist notwendig, da die Probe, besonders bei Messungen höherer Schichtdicke, durch die hohe Oberflächenspannung der ionischen Flüssigkeiten eine stark ausgeprägte Halbkugelform annimmt. Durch diese Form bedingt muss die Ablation an einer Position auf der Probe stattfinden, an der sichergestellt ist, dass das Licht, das durch die Ablation abgeschwächt wurde, auch den Detektorchip erreicht. Wird die Ablation an Orten durchgeführt, die, vom Objektiv aus gesehen, hinter der Probensträgermitte liegen, so wird ein Teil des Lichtes, das den Ablationsort passiert hat, durch die dahinter befindliche, höhere Probenschicht komplett ausgelöscht. Findet die Ablation dagegen vor der Mitte statt, liegt der untere Teil des *plume* im Schatten der höchsten Probenbereiche und kann auch nicht detektiert werden. Theoretisch kann die Ablation von daher auf der gesamten Ebene parallel zu Objektiv stattfinden, da auf dieser Ebene jeder Punkt den jeweils höchsten Punkt der Probe vom Objektiv aus gesehen darstellt.

Durch die gleichzeitige Aufnahme der Flugzeitmassenspektren ist dies aber nicht ideal, da die geometrische Achse des Massenspektrometers in der Mitte des Probensträgers liegt. Von daher ist es notwendig, die Ablation dort durchzuführen, um hier Fehler durch Inhomogenitäten im Beschleunigungsfeld zu vermeiden. Da die Beschleunigungsplatten,

wie oben erwähnt, mit einem geringeren Durchmesser als üblich gefertigt werden mussten, gilt dies für den verwendeten Aufbau besonders stark.

Der Ablationsort wurde zunächst optisch in der Mitte der Probe platziert, bei gleichzeitiger Beleuchtung durch die Farbstofffluoreszenz konnte die Positionierung auf dem höchsten Punkt der Probe schon mit einer hohen Genauigkeit durchgeführt werden, da dieser genau dort liegt, wo die Beleuchtung der Probe aufhört. Nun konnte durch die Fokussierungsmöglichkeit des Objektivs das erhaltene Bild auf maximale Schärfe eingestellt werden. Da dieses keine ausreichende Genauigkeit bot, musste anschließend über die Einkoppellinse der Ablationsstrahl noch leicht angepasst werden, um eine optimale Bildqualität zu erhalten.

Weiterhin ist auch die Lage der Lichtquelle eine wichtige Größe für die Qualität der Bilder. Um diese einzustellen wurde zunächst die Fluoreszenz vor der Kamera auf einem Schirm abgebildet, da der Bildbereich, der von der Kamera detektiert wird nicht ausreichend ist, um sicherzustellen, dass das Licht parallel zum Probenträger liegt. Eine gute Möglichkeit, um dieses zu erkennen, ist die Abbildung der Repellerplatte. Diese muss bei parallelem Lichteinfall die geringst mögliche Breite im Schattenbild aufweisen, was durch die Veränderung der Höhe der Küvette entsprechend eingestellt werden konnte. Da im Laufe der Messungen das Lösungsmittel in der Fluoreszenzküvette verdampfte war es notwendig die Höhe des Ortes, an dem die Fluoreszenz erzeugt wurde, nachzujustieren. Hier zeigte sich, dass unter den üblichen Versuchsbedingungen dieses nach 30 Minuten erforderlich war, um eine gleichbleibende Qualität der Aufnahmen zu erhalten.

Die *laser fluence*, die für die Justage des Ablationsortes verwendet wurde, lag über dem in den Positionierungsexperimenten verwendeten Wert. Dies war notwendig, da nur so eine ausreichende Abschwächung des einfallenden Lichtes möglich war, um den idealen Ablationsort zu finden. Die Abhängigkeit der erhaltenen Aufnahmen von der *laser fluence* ist genauer untersucht worden und im folgenden Abschnitt dargestellt. Nach erfolgter Justage des Ablationsortes wurde die *laser fluence* so verändert, dass die dadurch erhaltenen Signalintensitäten im Flugzeitspektrum dem gewünschten Werten entsprachen. Um ein Massenspektrum zu erhalten, das dem der Positionierungsmessungen entspricht, war eine Ablations*laser fluence* von ungefähr $1,8 \text{ J/cm}^2$ notwendig. Dies ist im Vergleich zur Ablation kristalliner Matrices ein recht hoher Wert, der sich dadurch erklären lässt, dass die Absorption der ionischen Flüssigkeiten unterhalb der Werte für Feststoffe liegt. Die Verringerung der Absorption ist zum einen darin begründet, dass

die Konzentration des absorbierenden Stoffes, in diesem Fall das deprotonierte CHCA-Anion, verringert ist, da das nicht absorbierende Gegenion equimolar in der Flüssigkeit vorliegt. Andererseits weist das Säureanion auch eine Verschiebung des Absorptionsspektrums zu niedrigeren Wellenlängen gegenüber der neutralen Säure auf. (Siehe auch Abschnitt 3.2.3.)

Die beschriebene Justage war nach jedem Probenwechsel notwendig, da hierfür die Halterung des Objektivs an der Ionenquelle entfernt werden musste. Zudem musste der Ablationsort bei einem Wechsel der Ablationsleistung teilweise leicht nachjustiert werden, da die Strahlage sich dabei geringfügig ändern konnte. Nachdem alle Einstellungen optimiert wurden, musste zunächst der Startpunkt des Ablationsvorganges ermittelt werden. Hierfür wurde mittels zweier Photodioden die zeitliche Lage der beiden verwendeten Laserpulse zueinander über ein Oszilloskop sichtbar gemacht. Das Delay zwischen den beiden Lasern wurde über den Delaygenerator so eingestellt, dass die Signale der Photodioden exakt übereinander lagen. Bei dieser Einstellung konnte in den Schattenaufnahmen noch keine Veränderung des erhaltenen Bildes durch den Ablationslaser nachgewiesen werden. Dies trat erst auf, wenn der Beleuchtungspuls 10 ns nach dem Ablationsablationspuls ausgelöst wurde.

In den Positionierungsuntersuchungen wurden feste Delayabstände zwischen den einzelnen Messungen verwendet. Dies bot sich für die Aufnahmen der Schattenbilder nicht an, da auch der Bereich sehr nah an der Probe durch diese Methode zugänglich ist, und die Änderungen durch den Ablationspuls hier in sehr geringen Zeiträumen stattfinden. Von daher wurden hier geringere Zeitdifferenzen von minimal 10 ns Unterschied zwischen den Aufnahmen verwendet. Bei höheren Zeitabständen zwischen Ablation und Belichtung treten innerhalb dieses kurzen Zeitraumes keine sichtbaren Änderungen in den detektierten Lichtintensitäten auf; von daher wurde mit ansteigendem Delay auch der Abstand zwischen den einzelnen Messungen erhöht.

Um einen unnötigen Probenabtrag zu vermeiden, wurde, wie oben erwähnt, zwischen den einzelnen Aufnahmen, also in der Zeit, die für Datentransfer, Speicherung und Änderung des Laserdelays notwendig war, der Ablationslaser geblockt. Dadurch war es möglich, auch bei geringeren Probenmengen, mehrere Serien von Aufnahmen, zum Beispiel bei unterschiedlichen Laserflüssen, von einer Probe zu erhalten.

In allen hier gezeigten Messungen wurde die schon im Positionierungsteil verwendete Matrix CHCA/Tributylamin untersucht. Diese Matrix wurde gewählt, da sie im Gegensatz zu den DHB-ILMs die Untersuchung bei 266 und 355 nm zulässt.

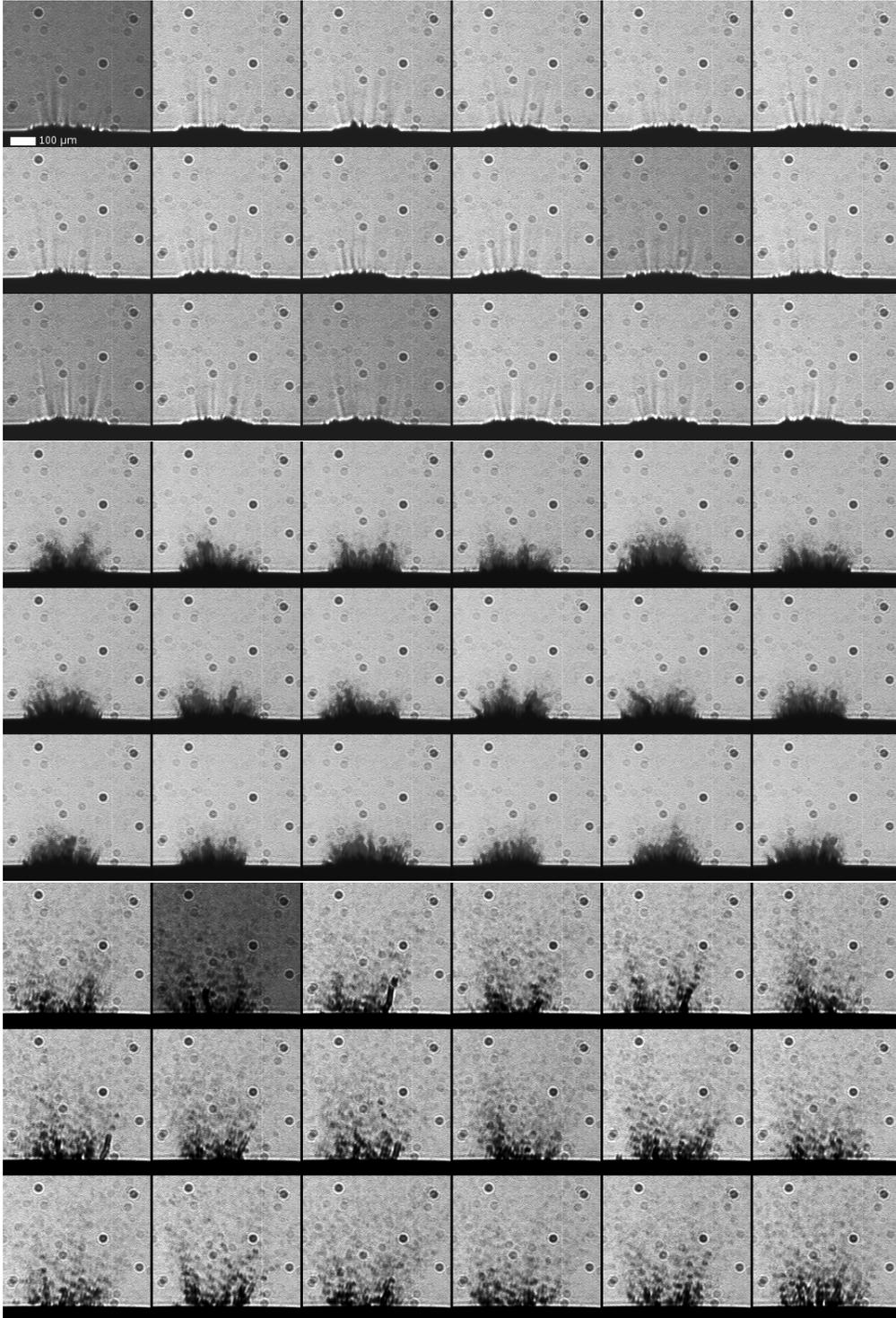


Abbildung 3.32.: Aufnahmen von jeweils 18 Schattenbildern bei festem Delay zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit. Die verwendeten Delayzeiten betragen: Obere drei Reihen 200 ns, Mitte 1 μ s, Unten 5 μ s.

Da jedes Bild nur den Ablationsvorgang eines einzelnen Laserschusses darstellt, ist es zunächst notwendig, sicherzustellen, dass hierbei eine ausreichende Reproduzierbarkeit des Ablationsvorganges vorliegt. Hierfür wurden bei gleichbleibenden experimentellen Parametern mehrere Bilder aufgenommen. Dies wurde bei drei verschiedenen Delayzeiten durchgeführt, um die *plume*-Entwicklung in verschiedenen Stadien auf ihre Gleichmäßigkeit zwischen den einzelnen Laserschüssen hin zu überprüfen. Diese Bilder sind in Abb. 3.32 gezeigt. Es handelt sich hierbei um Aufnahmen, die im Hochvakuum bei 1×10^{-6} mbar erhalten wurden. Die Ablationswellenlänge beträgt 355 nm, diese Wellenlänge wurde gewählt, da die Leistungsschwankungen hier geringer sind als bei 266 nm, was einen zusätzlichen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der einzelnen Messungen haben könnte.

Hier soll zunächst einmal nicht auf das genaue Aussehen der Ablationswolke eingegangen werden, dies folgt im anschließenden Teil. In den jeweiligen Serien an Aufnahmen ist zu erkennen, dass es gewisse Schwankungen im Ablationsvorgang gibt, wie es auch zu erwarten ist, wenn nur das Resultat eines einzelnen Laserschusses abgebildet wird. Das grundlegende Aussehen des *plume* ist aber in den einzelnen Bildern jeweils sehr ähnlich. So kann sichergestellt werden, dass das Aussehen der Bilder bei verschiedenen Delays hauptsächlich durch die zeitliche Entwicklung des *plume* gegeben ist und nicht durch andere, äußere Effekte.

In den gezeigten Aufnahmen sind auch die schon angesprochenen dunklen Stellen durch die Verunreinigung des CCD-Chips klar zu erkennen. In einer Serie von Aufnahmen lassen sich diese problemlos von den Ablationseffekten unterscheiden, da sie immer auf dem selben Ort im Bild zu sehen sind und jeweils eine sehr ähnliche Intensität zeigen. In einzelnen Aufnahmen ist der Hintergrund etwas dunkler als im Rest der Bilder. Dies ist auf die Intensitätsschwankungen der Fluoreszenz zurückzuführen und wird durch die nachträgliche Anpassung des Dynamikbereiches der Helligkeitswerte noch leicht verstärkt. In den unteren Aufnahmen bei $5 \mu\text{s}$ sind die oberen Bereiche der Ablationswolke relativ unscharf zu erkennen, was auf die Bewegung der ablatierten Teilchen orthogonal zur Hauptablationsrichtung zurückzuführen ist. Durch diese Bewegung entfernen sich die Teilchen mit zunehmender Zeit nach der Ablation mit der jeweiligen orthogonalen Initialgeschwindigkeit vom Ablationsort. Dadurch entfernt sich ein Teil der ablatierten Matrix von der Schärfenebene des Objektivs und wird unscharf abgebildet. In den Bildern ist von daher ein Schnitt durch die Ablationswolke auf Höhe dieser Schärfenebene zu erkennen.

3.3.2. Ergebnisse

Bevor eine Aussage über die Abhängigkeit des Ablationsvorganges von der Probendicke getroffen werden kann, muss zunächst der allgemeine Ablationsmechanismus und die mit der verwendeten Methode daraus erhaltene Darstellung näher untersucht werden. Hierzu wurde zunächst eine Serie von Aufnahmen über den gesamten Zeitraum aufgenommen, in dem mit der FFI-Technik das Auftreten von ablatierten Teilchen detektiert werden kann. Diese Aufnahmen sind in Abb. 3.33 gezeigt. In den einzelnen Bildern ist jeweils das eingestellte Delay zwischen den Lasern angegeben. Wie schon im vorherigen Teil erwähnt, wurde hierbei das Delay nicht durchgehend um gleiche Werte verändert, da sich zu späteren Zeiträumen nur sehr kleine Änderungen der Aufnahmen über größere Zeitspannen zeigten. Die ersten Änderungen, die durch den Ablationslaserpuls hervorgerufen werden, sind bei einem Delay von 10 ns zu erkennen. Im Bereich des Laserspots ist ein leichtes Anschwellen der Probe zu erkennen, welches sich über die nächsten ca. 50 ns fortsetzt. Oberhalb hiervon ist ein Bereich zu erkennen, der heller als die Umgebung ist. Hier liegt zunächst die Vermutung nahe, dass dies durch das Aussenden von Photonen aus der Probe hervorgerufen wird, z.B. aufgrund von Fluoreszenz, die durch den Ablationslaser verursacht wird. Dies ist aber durch die zeitliche Steuerung des Experimentes nicht als Ursache möglich, da der Ablationslaser und die CCD-Kamera zeitlich fest zueinander stehen und zwischen den Messungen nur der Abstand des BelichtungsLasers zu den beiden anderen Triggerpulsen verändert wird. Von daher müsste eine Detektion der Probenfluoreszenz in jeder Aufnahme zu erkennen sein. Unter Zuhilfenahme eines Bandpassfilters, der schmalbandig nur für die verwendete BelichtungsWellenlänge durchlässig ist, konnte zusätzlich sichergestellt werden, dass dieser Effekt aus keiner anderen Lichtquelle stammt. Zu Erklären ist dieses Auftreten des helleren Bereiches durch die Veränderung der Dichte direkt über der Probe. Dies führt dazu, dass das Licht in diesem Bereich von den ablatierten Teilchen gebrochen wird und so zusätzlich zur regulär einfallenden Strahlung in einem Bereich oberhalb der anschwellenden Probe detektiert wird.

Nach ungefähr 60 ns sind in diesem helleren Bereich und leicht darüber an mehreren Stellen dunklere Streifen zu erkennen, die sich in den darauffolgenden 300 ns in das Vakuum oberhalb der Probe ausbreiten. Da hiervon nur eine geringe Abschwächung des Lichtes hervorgerufen wird, ist davon auszugehen, dass dies durch die Ablation gasförmiger Moleküle entsteht, die eine leichte Erhöhung der Teilchendichte oberhalb der Probe

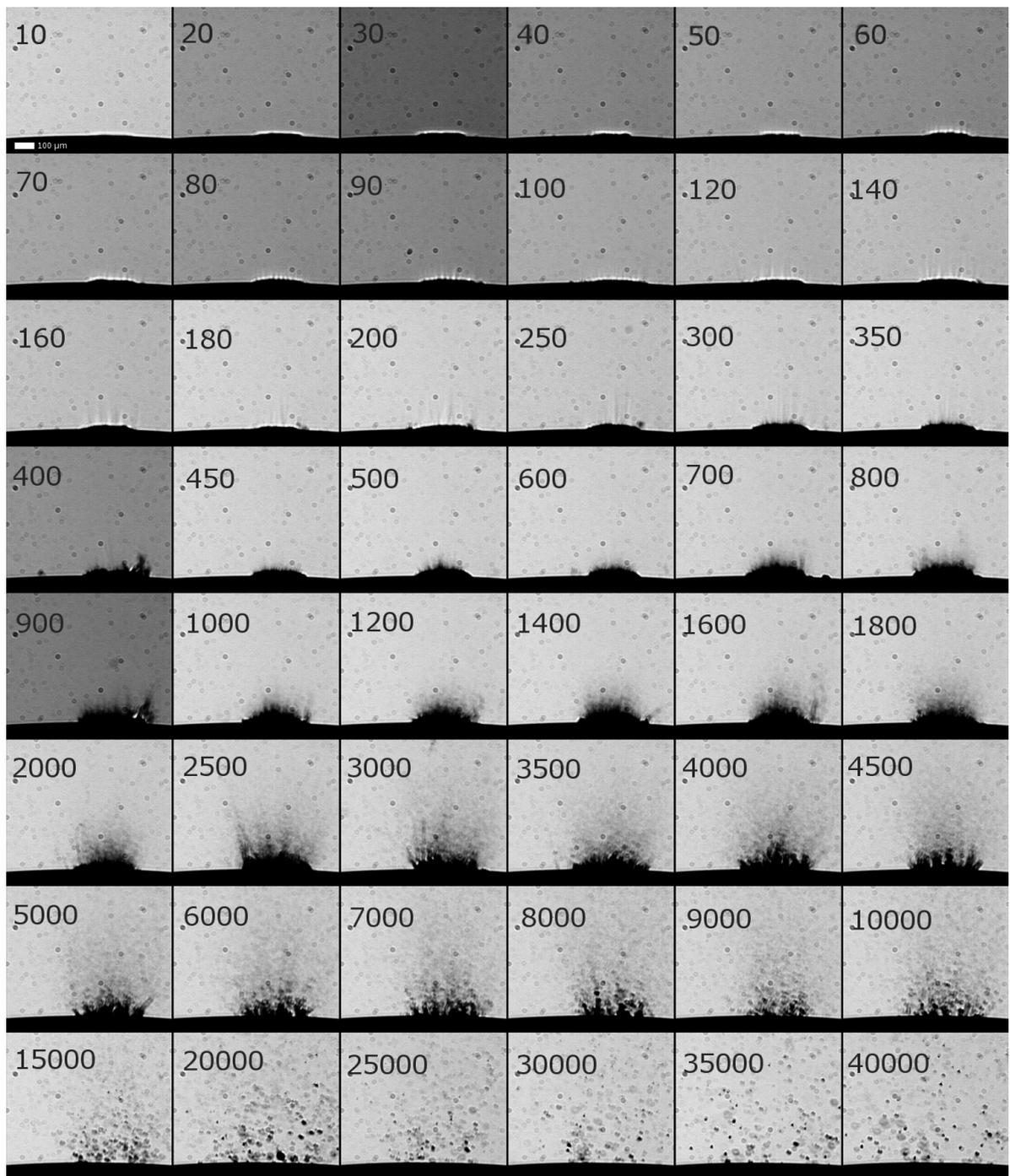


Abbildung 3.33.: Schattenbildaufnahmen des gesamten Ablationszeitraumes mit ansteigendem Delay zum Ablationslaserpuls. Das aufgetragene Volumen der Matrixlösung betrug $25 \mu\text{l}$, die *laser fluence* lag bei ca. $1,8 \text{ J}/\text{cm}^2$. Die Zahlenwerte geben das Laserdelay in Nanosekunden an.

bewirken und von daher auch eine Brechung des Lichtes verursachen. Der hiervon betroffene Bereich erstreckt sich über die gesamte Breite des Laserspots und nimmt über die ersten 100 ns einen ansteigenden Raum oberhalb der Probe ein. Anschließend nimmt die hervorgerufene Abschwächung des Lichtes wieder ab. Das Anschwellen der Probe bleibt über diesen gesamten Zeitraum weiterhin sichtbar und nach ca. 500 ns beginnt aus diesem Bereich die verzögerte Ablation sichtbar zu werden. Ausgehend von einem weiteren Anschwellen der Probe findet dann ein Materialausstoß statt, der wieder vom gesamten Laserspot ausgeht, in der Mitte des Spots aber stärker ausgeprägt ist. Diese Ablation erstreckt sich über einen deutlich längeren Zeitraum als die Initialablation, so ist auch noch nach bis zu 10 μs das Austreten von Material aus der Probe zu erkennen. Während in den ersten 2 μs dieses Vorganges oberhalb des angeschwollenen Bereiches nur eine vergleichsweise niedrige Verdunkelung sichtbar ist, die wieder auf die Ablation von Gas bzw. Clustern zurückzuführen ist, sind in den späteren Bereichen einzelne Tröpfchen zu erkennen, die im gesamten Bereich über der Probe verteilt sind. Diese sind noch bis mindestens 40 μs nach dem Eintreffen des Ablationslaserpulses zu erkennen.

Ein ähnliches Bild für den Ablationsvorgang wurde auch von Rohlfig *et al.*^[122] gefunden, wobei, wie in Abschnitt 2.3 schon beschrieben, dort der Ausstoß von gasförmiger Matrix und kleinen Tropfen auf der selben Zeitskala stattfinden; während im Fall der ionischen Flüssigkeit, die hier verwendet wurde, die beiden Ablationen konsekutiv stattfinden. Die Tatsache, dass die Tröpfchen in der hier verwendeten Matrix deutlich länger nachweisbar sind, lässt sich mit dem verschwindend geringen Dampfdruck der ionischen Flüssigkeit erklären. Dieser spielt von allem bei der großen Oberfläche, die die kleinen Tropfen im Vergleich zu ihrem Volumen besitzen, eine große Rolle für die Lebensdauer im Vakuum. Der Unterschied der zeitlichen Relation der beiden Ablationsvorgänge zwischen dieser Arbeit und den Ergebnissen von Rohlfig *et al.* könnte auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein: Zum einen aufgrund von unterschiedlichen Probendicken, was auf das im vorangegangenen Teil vorgestellte Stoßwellenmodell schließen lassen würde. Weiterhin könnte auch ein unterschiedlicher Energieeintrag in das System durch eine veränderte *laser fluence* zu einem Wechsel im Mechanismus führen und schließlich kann der Unterschied auch durch Stoffeigenschaften der jeweils verwendeten Matrices verursacht sein.

Die beiden erstgenannten Möglichkeiten sind mit dem hier verwendeten Aufbau gut messbar, wobei zunächst auf die Veränderung der *laser fluence* eingegangen werden soll.

Laser fluence-Abhängigkeit

Das Einsetzen der Ionendetektion bei Erhöhung der *laser fluence*, also die *fluence threshold*, stimmt sehr gut mit dem Anfang der Detektion von ablatierten Teilchen aus der Matrixprobe überein. Die Ablation bei einer *laser fluence* knapp oberhalb der *threshold* ist im oberen Teil der Abb. 3.35 gezeigt. Der Zeitbereich der Initialablation wurde hierbei nicht in der Genauigkeit wie in Abb. 3.33 aufgezeichnet, da grundlegende Änderungen in diesem Mechanismus auch in den vorhandenen Aufnahmen erkennbar wären und sich der Hintergrund für die hier durchgeführten Untersuchungen auf das Auftreten der verzögerten Ablation bezieht. Für die gezeigten Messungen wurde eine Flüssigkeitsmenge von $25\ \mu\text{l}$ Matrixlösung auf den Probenträger aufgetragen. Dies stellt eine geringe Probenmenge im Vergleich zu späteren Messungen dar und ist auch der Grund für das Auftreten des hellen Streifens oberhalb der Probe in allen hier gezeigten Aufnahmen, da bei der resultierenden Probendicke dieser Effekt nicht zu vermeiden war.

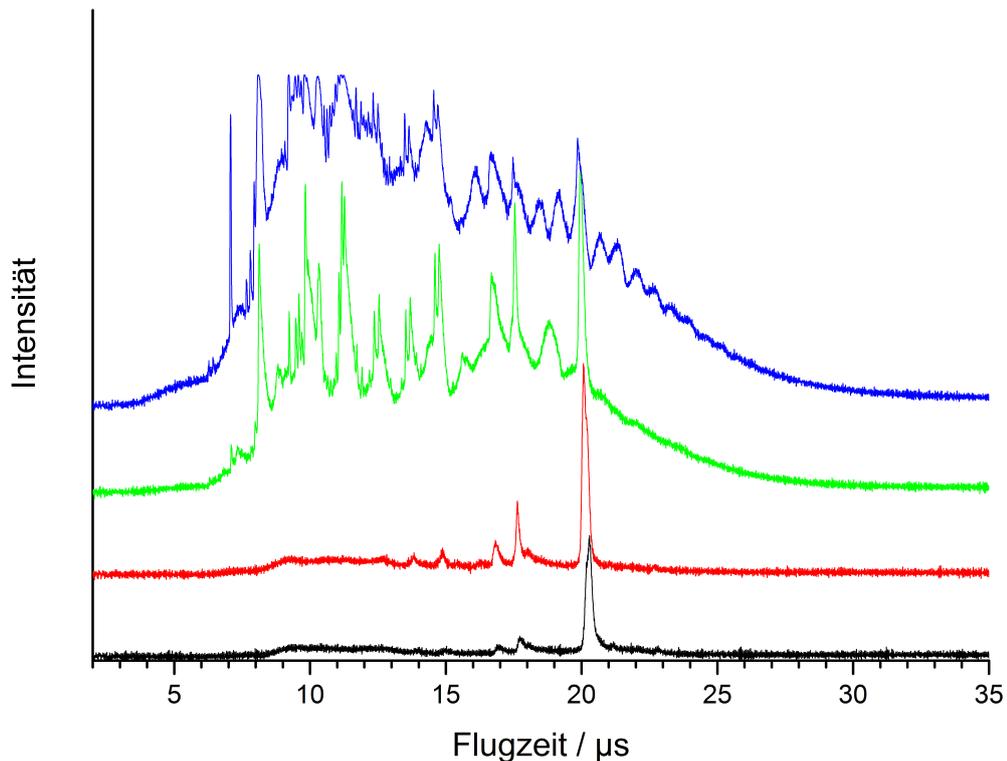


Abbildung 3.34.: Flugzeitmassenspektren bei den verwendeten *laser fluence*-Werten. Verwendet wurde eine *laser fluence* von 0.8 (schwarz), 1.8 (rot), 4.6 (grün) und $7.5\ \text{J}/\text{cm}^2$ (blau).

Die initiale Ablation ist im Bereich zwischen 100 und 300 ns anhand der dunklen Streifen oberhalb der Probe zu erkennen. Ein Anschwellen der Probe in diesem Zeitraum ist bei der verwendeten *laser fluence* kaum zu erkennen. Bei 400 ns Delay ist in der Schattenaufnahme kein Einfluss der Laserablation erkennbar, hier muss der erste Ablationsvorgang folglich abgeschlossen sein. Der verzögerte Vorgang startet dann bei 500 ns und entspricht weitgehend dem oben beschriebenen Mechanismus, wobei die geringe *laser fluence* zu einer geringeren Lichtschwächung und folglich zu einem geringeren Teilchenausstoß führt. Damit ist auch der geringere Zeitraum zu erklären, in dem noch ablatierte Matrix detektiert werden kann, dies ist in diesem Fall nur bis 15 μs nach dem Laserpuls zu beobachten. Die Flugzeitmassenspektren, die bei den jeweils verwendeten Laserflüssen erhalten wurden, sind in Abb. 3.34 gezeigt. Dort ist zu sehen, dass bei dem Wert für diese Messreihe nur ein sehr kleines Ionensignal bei einer Flugzeit von 20,5 μs für die Matrix erhalten wird. Dies entspricht dem protonierten CHCA-Kation.

Die untere Serie von Schattenbildern ist bei einer etwas höheren *laser fluence* aufgenommen worden, was auch in dem entsprechenden Flugzeitspektrum anhand der Ionensignale zu erkennen ist. Im Gegensatz zu vorherigen Messung ist zu erkennen, dass auch mit einem Delay von 500 ns eine Detektion von gasförmiger Matrix aus der ersten Ablation möglich ist, während zu diesem Zeitpunkt schon der zweite Ablationsvorgang startet. Es ist auch eine deutlich höhere Menge an ablatiertem Material anhand der verstärkten Lichtauslöschung zu erkennen.

In den beidem Messreihen in Abb. 3.36 setzt sich der aus den vorherigen Messungen erkennbare Trend fort, bei noch höheren Laserflüssen ist eine Detektion der Initialablation auch bei noch höheren Delays möglich. Da eine Mindestteilchendichte notwendig ist, um ein sichtbares Signal in den Aufnahmen zu erzeugen, kann dieser Effekt durch den erhöhten Materialausstoß erklärt werden, so dass die über der Probe vorherrschende Teilchendichte länger zu einer Detektion führen kann. Da die Intensität dieser Ablation in den Bildern ab 100 ns durchgehend abnimmt, ist nicht davon auszugehen, dass der Teilchenausstoß über einen verlängerten Zeitraum auftritt.

Zusätzlich ist auch zu erkennen, dass die Zeiträume, in denen die Teilchenwolken der beiden Ablationen sichtbar sind, sich immer weiter überschneiden und die zweite Ablation bei geringeren Delays startet. Betrachtet man die zugehörigen Flugzeitspektren in Abb. 3.34, so ist deutlich zu erkennen, dass die Laserflüsse sich hier weit oberhalb der üblicherweise in der MALDI verwendeten Werte befinden. Für die dritte Messung ist schon ein deutliches Ansteigen der Basislinie und zunehmende Fragmentierung der

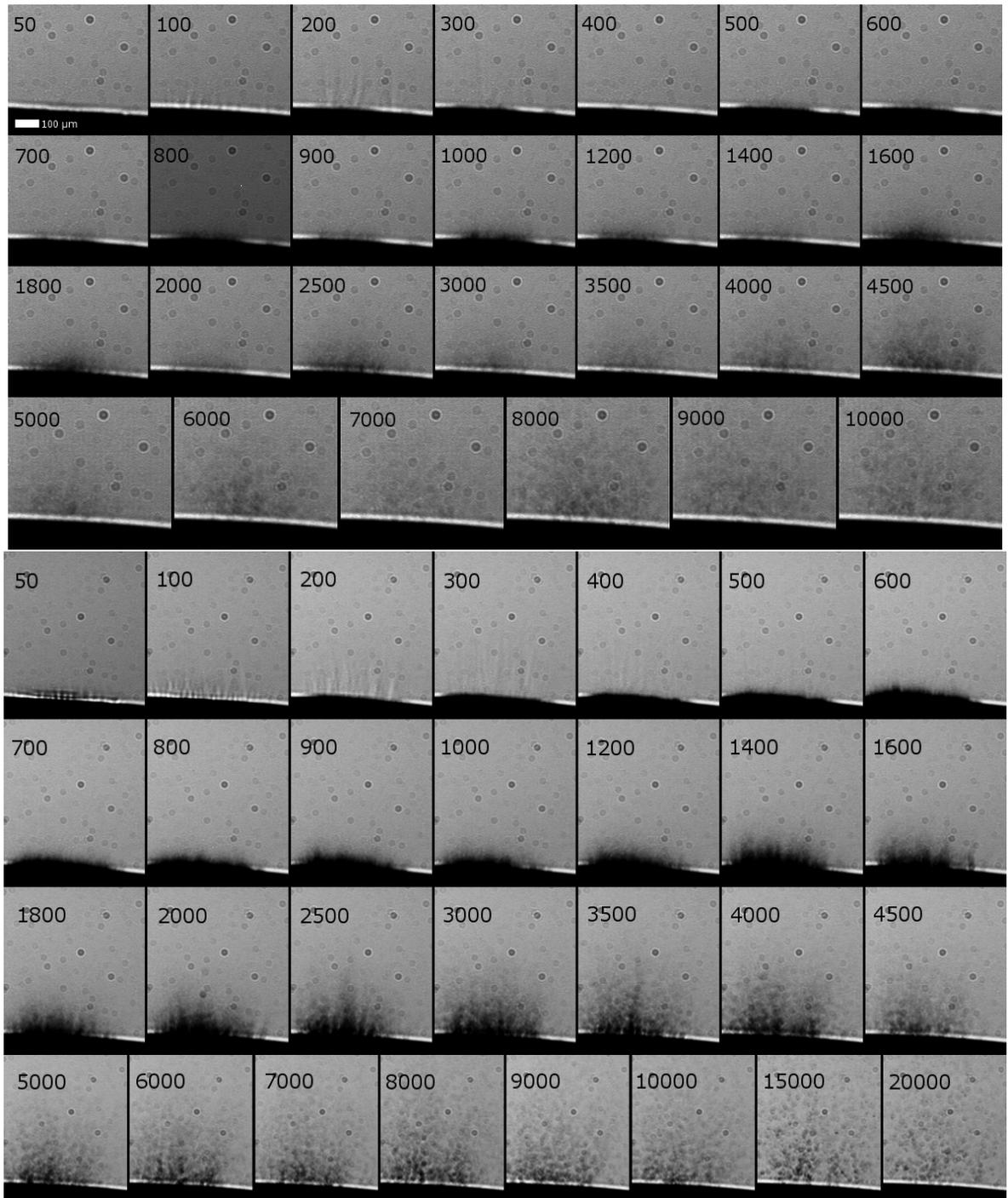


Abbildung 3.35.: Schattenbildaufnahmen bei einer *laser fluence* von 0,8 (oben) und 1,8 J/cm² (unten).

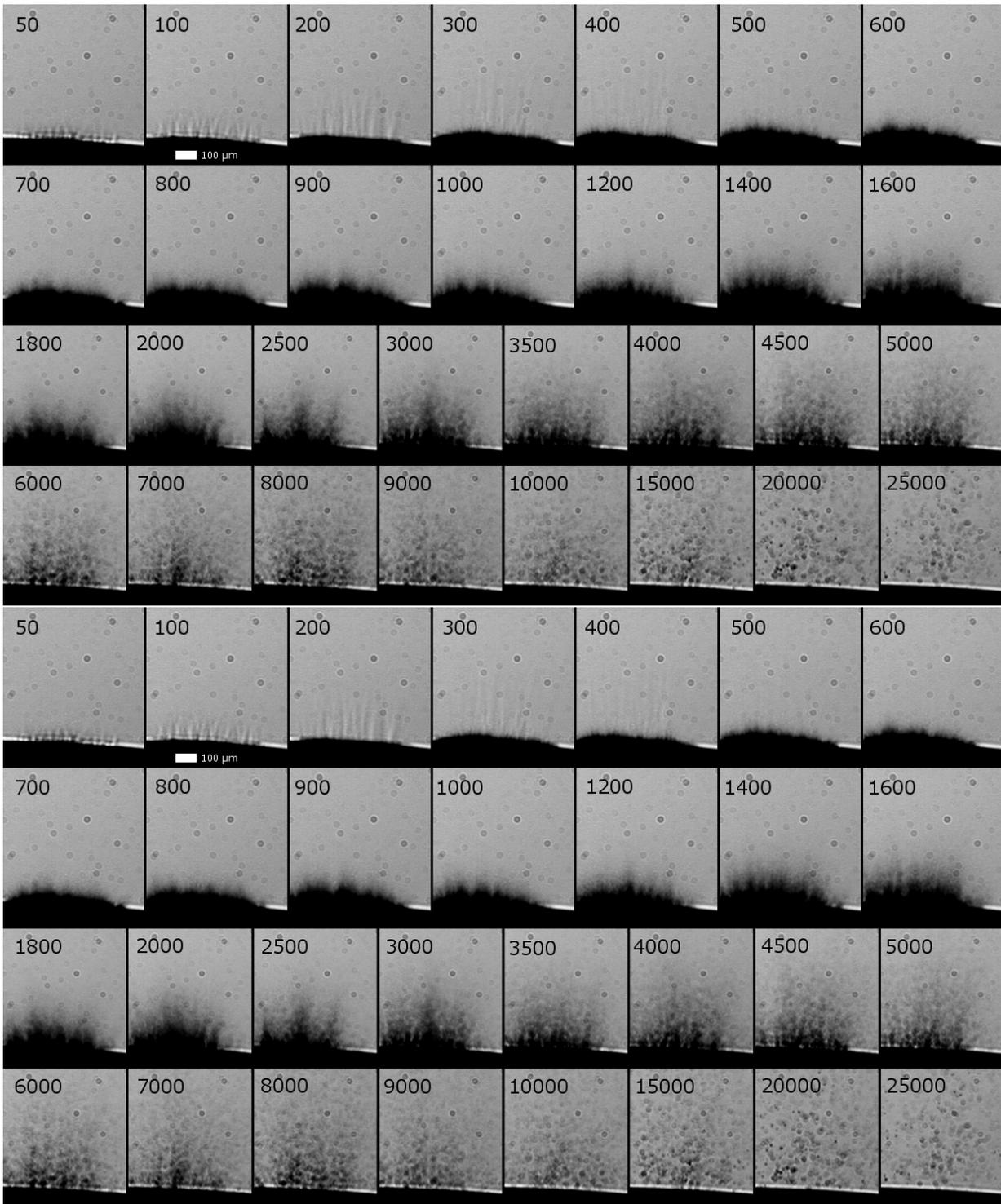


Abbildung 3.36.: Schattenbildaufnahmen bei einer *laser fluence* von 4,6 (oben) und 7,5 J/cm² (unten).

Matrix zu erkennen, während bei der höchsten *laser fluence* sogar die Sättigung des MCP-Detektors sichtbar ist.

Insgesamt ist aus diesen Messungen zu erkennen, dass die *laser fluence* einen deutlichen Einfluss auf die Menge der ablatierten Teilchen hat, was so auch zu erwarten ist. Der Mechanismus der Ablation ändert sich auch in Bereichen oberhalb der MALDI-Bedingungen nicht grundlegend, es kommt nur zu einem etwas früheren Startpunkt der verzögerten Ablation. Die zweite Messreihe (unten in Abb. 3.35) entspricht von den Ionenintensitäten sehr gut den Werten der Positionierungsuntersuchungen aus Abschnitt 3.2.3. Aus der Ankunftszeitverteilung der CHCA/Tributylamin-Probe (vgl. Abb. 3.21) ist ein Abstand von ungefähr 500 ns zwischen den beiden Ablationen vorhergesagt worden, dies stimmt sehr gut mit den hier mittels FFI erhaltenen Werten überein. Da die Probendicke in den Positionierungsexperimenten nicht bestimmbar war, ist ein möglicher Einfluss unterschiedlicher Werte auf den Zeitraum zwischen den Ablationen hiervon aber nicht auszuschließen. Von daher wurden FFI-Untersuchungen von Proben unterschiedlicher Schichtdicke durchgeführt, die im nächsten Abschnitt dargestellt werden.

Veränderung der Probendicke

Die Veränderung der Probenschichtdicke kann aufgrund der horizontalen Anordnung des Probenträgers durch eine Variation der aufgetragenen Flüssigkeitsmenge erreicht werden. Die Angabe eines Absolutwertes ist allerdings nicht möglich, da, wie schon erwähnt, eine verdünnte Lösung der Matrix auf den Probenträger aufgetragen wird. Diese besteht ungefähr aus gleichen Volumenteilen von ILM und Lösungsmittel, so dass eine Halbierung des im Folgenden angegebenen Gesamtvolumens ungefähr das Volumen der auf dem Probenträger verbliebenen Matrix ergibt. Ein Rückschluss hieraus auf die Probendicke am Ablationsort ist aber nicht ohne weiteres möglich, da bei den dünneren Proben (10 und 15 μl Matrixlösung) eine relativ einheitliche Flüssigkeitsschicht auf dem Probenträger erhalten wurde, bei höheren Werten bildete sich durch die Oberflächenspannung ein Tropfen, der in der Mitte, wo die Ablation durchgeführt wurde, deutlich höher ist als in den Randbereichen. So ist die Flüssigkeitsschicht bei der Verwendung von 30 μl mehr als doppelt so hoch wie bei einer Probe, für die 15 μl aufgetragen wurden.

Zur Überprüfung des postulierten Stoßwellenmodells ist die Kenntnis der genauen Probenschicht aber nicht notwendig, da die zeitliche Verschiebung der verzögerten Ab-

tion hier als Ergebnis ausreichend wäre. Erst zur Bestimmung der Geschwindigkeit der Stoßwelle in der Probe würde dieser Wert benötigt werden.

Die Aufnahmen in diesem Teil wurden analog zu den vorher gezeigten Messungen durchgeführt, wobei die *laser fluence* auch bei den verschiedenen Probendicken verändert wurde, um sicherzustellen, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen *laser fluence* und Probendicke nicht übersehen wird. Dies ist nicht beobachtet worden; der Übersichtlichkeit halber sind an dieser Stelle nur die Aufnahmen dargestellt, die bei der *laser fluence* erhalten wurden, der dem der Positionierungsexperimente entspricht. Die übrigen Aufnahmen sind im Anhang gezeigt.

Als Ausgangspunkt für diese Untersuchung wurde die schon im vorherigen Abschnitt gezeigte Messung mit einem Matrixlösungsvolumen von $25\ \mu\text{l}$ verwendet, die entsprechende Schattenbildserie ist in Abb. 3.35 im unteren Teil zu finden. Wie bei der Untersuchung der Abhängigkeit der verzögerten Ablation von der *laser fluence* wurde hier auf eine detaillierte Visualisierung der Initialablation verzichtet, da dies unerheblich ist, um den Startpunkt der verzögerten Ablation zu erkennen. Zunächst wurde ein geringeres Volumen der Matrixlösung verwendet. Die daraus erhaltenen Schattenbilder sind in Abb. 3.37 gezeigt. Wird für diese Probe und die Probe mit $25\ \mu\text{l}$ Matrixlösung eine gleichmäßige Verteilung der Probe angenommen, müsste die Stoßwelle in dieser Probe nur 40% der Laufzeit in der dickeren Probe aufweisen. In den Aufnahmen ist aber zu erkennen, dass die verzögerte Ablation erneut bei ca. 500 ns startet.

Dies spricht dafür, dass die Ablation einen anderen Ursprung hat und nicht von der Stoßwelle der Initialablation ausgelöst wird. Um diese Annahme zu bestätigen wurde die Schichtdicke der Probe auch erhöht, Schattenbilder einer Probe mit $50\ \mu\text{l}$ Matrixlösung sind in Abb. 3.38 gezeigt. Auch hier ist zu erkennen, dass das Ablationsverhalten dem der beiden vorherigen Proben entspricht. Von daher ist das Stoßwellenmodell, das anhand der Positionierungsexperimente aufgestellt wurde, durch diese Untersuchungen widerlegt worden.

Betrachtet man die Veränderungen, die bei der Variation der *laser fluence* im Ablationsverhalten detektierbar waren, so zeigte sich dort eine Abnahme der Verzögerung des zweiten Ablationsvorganges bei höherem Energieeintrag in die Matrix. Nimmt man an, dass die verzögerte Ablation thermisch bedingt ist, und eine gewisse Schwellentemperatur notwendig ist, um den Ablationsvorgang auszulösen, so ist es möglich, dieses Verhalten zu erklären. Wie schon in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, führt nur ein Teil der

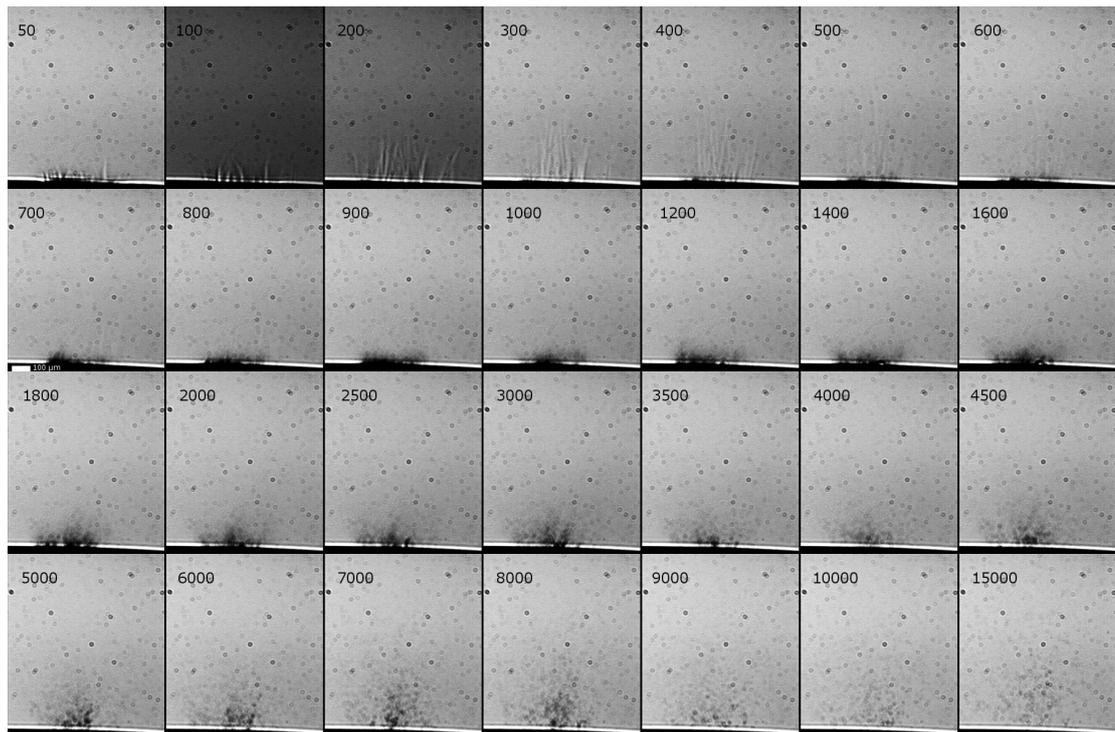


Abbildung 3.37.: Schattenbildaufnahmen einer Probe mit $10 \mu\text{l}$ Matrixlösung und einer *laser fluence* von $1,8 \text{ J/cm}^2$.

absorbierten Photonen zur Erzeugung von Ionen durch *pooling*. Da in der verwendeten Matrix CHCA bei 355 nm Ablationswellenlänge die Energie von drei Photonen notwendig ist, um die Ionisationsenergie der Matrix zu erreichen, ist eine hohe Photonendichte Voraussetzung für die Bildung von Ionen. Dies führt auch dazu, dass ein großer Teil der eingebrachten Energie durch Relaxationsprozesse Wärme innerhalb des absorbierenden Volumens erzeugt. Schnelle Relaxationsprozesse im Pikosekundenbereich führen zur schnellen Erwärmung der Matrix und schließlich zur Initialablation des oberen Bereiches der bestrahlten Probe. Im unteren Bereich der Probe sollte ein weiteres Aufheizen durch langsamere Prozesse stattfinden.

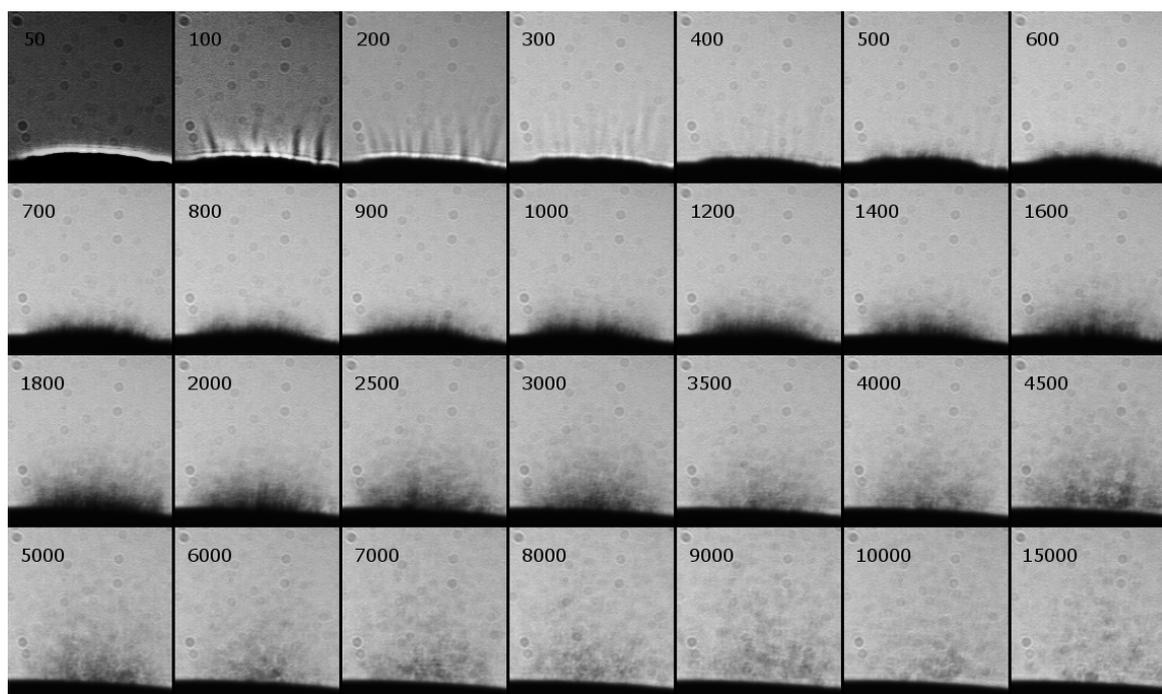


Abbildung 3.38.: Schattenbildaufnahmen einer Probe mit $50 \mu\text{l}$ Matrixlösung und einer *laser fluence* von $1,8 \text{ J/cm}^2$.

Hierbei ist auch zu beachten, dass durch den Laser Protonentransferreaktionen in der ionischen Flüssigkeit ausgelöst werden, die auch in den Massen- und Postionisationsspektren zu erkennen sind. Die Säure in einer ionischen Flüssigkeit liegt zum Großteil als Anion vor, dies ist auch durch die Verschiebung der Absorption zu kleineren Wellenlängen in den UV-Spektren der verwendeten Matrices zu erkennen. Da in den Postionisationsexperimenten neutrale Säuremoleküle ionisiert und in den Massenspektren protonierte Kationen der Säure detektiert werden, muss durch die Laserenergie die Übertragung von Protonen der protonierten Base auf das Säureanion ausgelöst werden. In den unteren

Probenbereichen, die Energie absorbieren, aber nicht initial ablatiert werden, findet nach dem Laserpuls dann verstärkt die Rückreaktion, also die erneute Protonierung der Base statt, wobei die durch den Laserpuls aufgenommene Energie verzögert als Wärme abgegeben wird und ein weiteres Aufheizen der Probe verursacht. Das Vorliegen von neutralen Säure- und Basemolekülen sollte auch dazu führen, dass das Übertreten der Probe in die Gasphase erleichtert wird. Eine höhere Ablationslaser *fluence* bewirkt einen höheren Energieeintrag, so dass die Schwellenenergie schneller erreicht werden kann.

Mit diesem Modell kann auch erklärt werden, warum die verzögerte Ablation bei der Verwendung von 266 nm vergleichsweise geringe Intensitäten in den Positionierungsexperimenten aufweist. Wie dort schon erwähnt ist der zusätzliche Energieeintrag in die Matrix geringer, da bei dieser Wellenlänge nur ein *pooling*-Prozess von zwei Excitonen zur Erzeugung von Matrixionen notwendig ist. Von daher sollte nur ein geringerer Teil der absorbierten Photonen zur Erwärmung des nicht-ablatierten Bereiches der Probe führen und die verzögerte Ablation dieses Bereiches weniger intensiv ausfallen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden auch Schattenbildaufnahmen bei dieser Ablationswellenlänge durchgeführt.

Wellenlängenabhängigkeit der Ablation

Auch bei einer Wellenlänge von 266 nm wurde eine *laser fluence* für die Ablation verwendet, die zur Detektion einer Signalintensität führt, die der der Positionierungsexperimente entspricht. Diese Aufnahmen sind in Abb. 3.39 gezeigt. Es wurden auch Messungen bei anderen Laserflüssen durchgeführt, diese sind im Anhang dargestellt.

Im Vergleich zu den Bildern bei 355 nm ist hier in der Initialablation ein ähnliches Bild zu erkennen, wobei diese Ablation in einem etwas kürzeren Zeitraum erfolgt. So ist schon nach 30 ns ein Materialausstoß oberhalb der angeschwollenen Probenoberfläche zu erkennen, was bei der längeren Ablationswellenlänge erst bei ca. 60 ns sichtbar ist. Nach 350 ns ist aus diesem Ablationsereignis keine detektierbare Teilchendichte mehr vorhanden, was bei 355 nm erst nach ca. 500 ns der Fall ist. Die verzögerte Ablation startet hier ebenfalls nach dem Ende der Initialablation und ist in der Intensität im Vergleich deutlich geringer. Zudem ist der Zeitraum, in dem eine Detektion der hier ausgestoßenen Teilchen möglich ist, deutlich verringert. Nach 7 μ s ist hier der Ablationsvorgang komplett abgeschlossen. Dies ist ein deutlich geringerer Wert als die über 40 μ s, die in

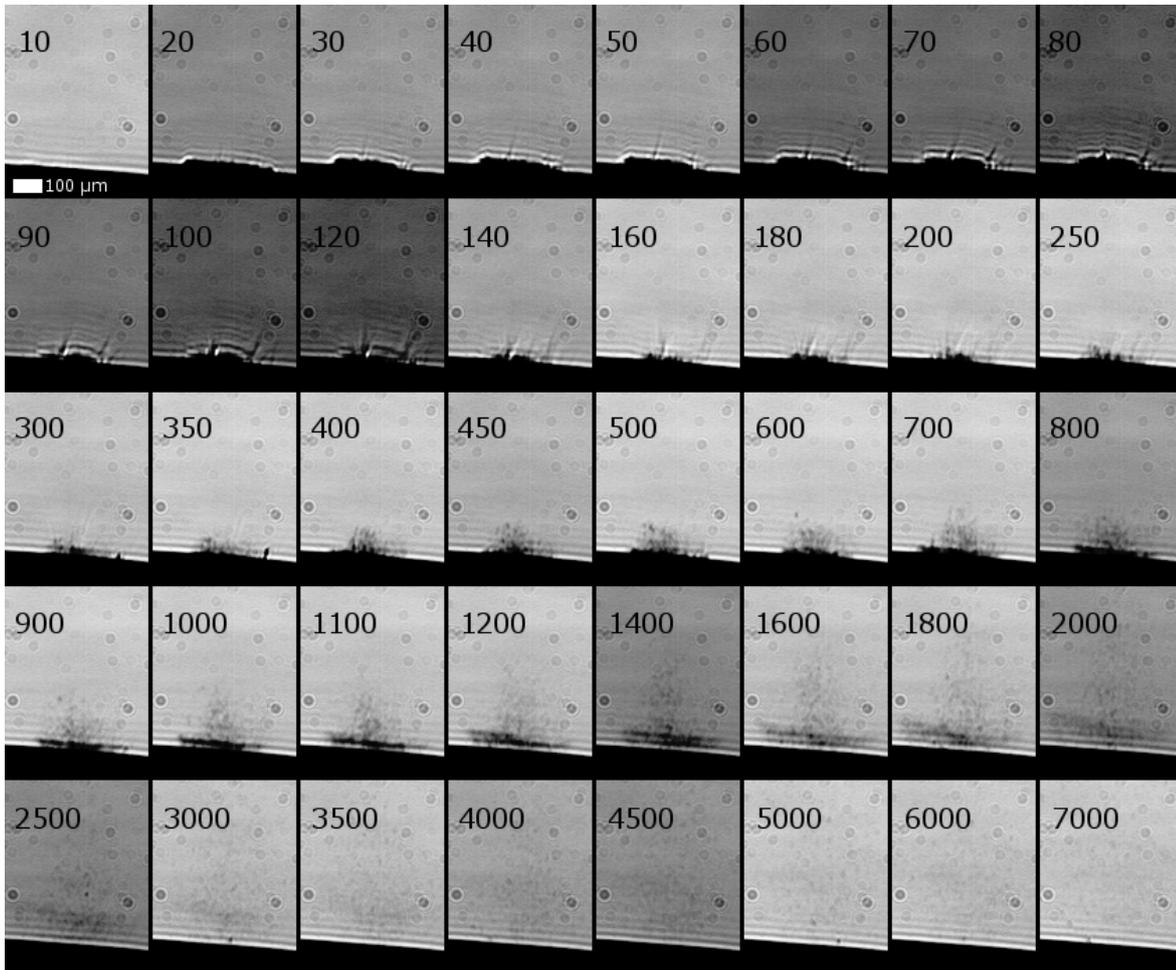


Abbildung 3.39.: Schattenbildaufnahmen der Ablation bei einer Wellenlänge von 266 nm.

Abb. 3.33 erkennbar sind. Dies lässt auf einen geringeren Teilchenausstoß als Folge einer erniedrigten Energieaufnahme der Probe schließen.

In den im Anhang gezeigten Messungen bei höheren Laserflüssen ist derselbe Effekt wie bei der Verwendung von 355 nm erkennbar, eine Erhöhung des Flusses bewirkt einen früheren Startpunkt der verzögerten Ablation. Die Verstärkung des Teilchenausstoßes ist hier bei einer Erhöhung der *laser fluence* nicht so stark ausgeprägt wie bei der anderen verwendeten Wellenlänge, während dieser Effekt in der Initialablation deutlich erkennbar ist. Dies könnte dadurch zu Stande kommen, dass die Absorption der Photonen durch die Matrix bei dieser Wellenlänge schlechter ist und dadurch ein höheres Probenvolumen durch den Laser erwärmt wird. Der Bereich, in dem die Schwellenenergie zur Ablation überschritten wird, vergrößert sich dabei aber nicht in dem selben Maße wie bei einer Wellenlänge von 355 nm, die vergleichsweise stärker absorbiert wird.

3.3.3. Fazit und Vergleich der Messmethoden

In den hier gezeigten Messungen des Ablationsvorganges der ionischen flüssigen Matrices ist erkennbar, dass diese Methode gut geeignet ist, um das Verhalten der Ablation darzustellen und Erkenntnisse über den Einfluss unterschiedlicher Parameter auf die Dynamik der Ablation zu gewinnen. Besonders die Tatsache, dass, im Gegensatz zur Postionisation, die gesamte Ablationswolke zu einem bestimmten Zeitpunkt dargestellt werden kann, macht diese Methode zu einem geeigneten komplementären Ansatz zur Untersuchung der Ablation. Obwohl bei dieser Messmethode in Gegensatz zur Postionisation der ablatierten Neutralen nur die Abbildung der Ablationswolke eines einzelnen Laserpulses möglich ist, zeigt sich, dass der Ablationsvorgang der ionischen Flüssigkeiten reproduzierbar genug ist, um mit einer Serie von Einzelaufnahmen den gesamten Prozess darzustellen.

Die Kopplung des Fast Flash Imaging mit Flugzeitmassenspektrometrie erwies sich trotz der damit verbundenen Anforderungen an den experimentellen Aufbau zusätzlich als sehr hilfreich, um einen direkten Rückschluss auf die Vergleichbarkeit der experimentellen Bedingungen zu den üblichen MALDI-Messungen zu erhalten.

Die aus den Postionisationsexperimenten aufgestellte Theorie zweier, zeitlich zueinander verzögerter Ablationsereignisse konnte mit Hilfe dieser Methode bestätigt werden. Die Ursache hierfür ist aber nicht, wie zunächst vermutet wurde, eine Stoßwelle, die

von der Initialablation erzeugt wird. Dank der zusätzlichen Informationen, die durch den neuen experimentellen Aufbau erhalten werden konnten, kann dieses Modell ausgeschlossen werden, da der Startpunkt der verzögerten Ablation unabhängig von der Probendicke ist. Würde die Ablation davon ausgelöst werden, müsste hier eine größere Verzögerung bei dickeren Proben auftreten, da die Laufzeit der Stoßwelle in der Probe hierdurch erhöht wird. Dies ist, wie gezeigt wurde, nicht der Fall.

Bei der Variation der *laser fluence* konnte festgestellt werden, dass dieser einen Einfluss auf den Startpunkt der verzögerten Ablation hat, wobei der sonstige Ablationsmechanismus weitgehend unverändert bleibt. Die Erhöhung der ablatierten Probenmenge bei Erhöhung der *laser fluence* entspricht den Erwartungen an das Experiment. Die Beobachtung, dass eine höhere *laser fluence* einen früheren Start der verzögerten Ablation bedingt, führt zu der Annahme, dass die vom Laser absorbierte Energie zu einem Teil von der Probe erst mit einer zeitlichen Verzögerung in Wärme umgewandelt wird und zu einem bestimmten Zeitpunkt einige hundert Nanosekunden nach dem Laserpuls eine Schwellentemperatur erreicht wird, worauf der zweite Ablationsvorgang aufgelöst wird. Eine höhere *laser fluence* führt dabei dazu, dass diese Schwellentemperatur früher erreicht wird. Die ausgestoßenen Teilchen dieser Ablation lassen sich bei der in den ersten Experimenten verwendeten Wellenlänge von 355 nm bis zu 40 μ s nach dem Ablationslaserpuls detektieren. Diese unerwartet hohe Zeit ist dadurch zu erklären, dass sich Tröpfchen der ionischen Flüssigkeit bilden, die insgesamt neutral geladen sind und durch den extrem geringen Dampfdruck der ILM eine sehr hohe Lebenszeit im Vakuum aufweisen.

Bei einem Wechsel der Ablationswellenlänge auf 266 nm ist bei vergleichbaren Signalintensitäten der erzeugten Ionen eine Abnahme der ausgestoßenen Teilchendichte zu erkennen, was auch in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Postionisation ist. Zusätzlich erscheint die Größe der hier auftretenden Tröpfchen geringer, und die Detektion dieser ist nur bis ungefähr 7 μ s nach dem Ablationspuls möglich. Da bei dieser Wellenlänge nur ein *pooling*-Prozess von zwei Excitonen mit der Energie der absorbierten Photonen notwendig ist, um die Ionisierung der Matrix zu erreichen, ist der hier auftretende Energieeintrag geringer, was in guter Übereinstimmung mit den postulierten thermischen Ursprung der verzögerten Ablation ist.

Zusammenfassung und Ausblick

4.1. Zusammenfassung

Die Kombination der in dieser Arbeit verwendeten Messmethoden hat sich als gut geeignet erwiesen, um den Ablationsvorgang der verwendeten ionischen flüssigen Matrices zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit stellt die ersten Untersuchungen an Matrices dieser Art dar. Die aus der Literatur bekannten Vorteile dieser Matrices, die verbesserte Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten von Schuss zu Schuss, und zusätzlich auch über den gesamten Bereich der Probe, lassen sich durch die deutlich erhöhte Gleichmäßigkeit der einzelnen Ablationsereignisse erklären. Dadurch ist auch die Qualität der in dieser Arbeit gezeigten Geschwindigkeitsverteilungen deutlich verbessert, die erhaltenen Intensitäten der Positionierungssignale weisen eine deutlich geringere Streuung auf, als dies in vorherigen Untersuchungen fester Matrices zu beobachten war. Ursache hierfür ist die Tatsache, dass die Ablation bei jedem Laserschuss aus einer näherungsweise identischen Umgebung in der Matrix ausgeht, da die flüssige Probe ihre Oberfläche zwischen den einzelnen Ablationsereignissen regeneriert und zusätzlich keine Effekte unterschiedlicher Kristallisationseigenschaften auftreten können. Diese Regeneration der Probe führte zusätzlich dazu, dass die gesamten Messungen vom selben Ablationsort auf der Probe durchgeführt werden konnten. Dies steht im Gegensatz zu den festen Matrices, wo der Probenabtrag dazu führt, dass der Ablationsort durchgehend verändert werden muss. So können Probleme zum Beispiel durch unterschiedliche Schichtdicken oder Kristallisationseigenschaften an verschiedenen Orten auf der Probe entstehen.

Durch die geringe Streuung der Messwerte war auch zu erkennen, dass die Gesamtintensität der ablatierten Neutralteilchen durch eine verschobene Maxwell-Boltzmann-Geschwindigkeitsverteilung nicht zufriedenstellend wiedergegeben werden kann. Bei ge-

nauerer Betrachtung ist zu erkennen, dass zwei zeitlich zueinander verzögerte Ablationsereignisse auftreten, die jeweils eine eigene Teilchenwolke ausstoßen. Aufgrund der experimentellen Gegebenheiten war mit Hilfe der Postionisation nur die Charakterisierung der Initialablation möglich.

Die hierfür erhaltenen Ergebnisse zeigen auch deutlich, dass die Kristallisation der Matrix einen großen Einfluss auf die Ablationsparameter hat. So ähneln sich die zur Charakterisierung verwendeten Parameter der Neutralengeschwindigkeit und der Translationstemperatur für die ILMs der Matrices 2,5-DHB und CHCA stark, während diese Parameter für die festen Matrices erhebliche Unterschiede aufweisen. Weiterhin ist die Absorption des verwendeten Laserlichtes durch die Matrix eine entscheidende Größe; hier muss eine gewisse Dichte an angeregten Molekülen in einem bestimmten Volumen erreicht werden, um die Ionisierung der Matrix zu erreichen. Bei einer geringen Absorption, wie sie für 3,5-DHB bei 266 nm gegeben ist, erfolgt die Absorption, bedingt durch die hohe Eindringtiefe der Photonen, in einem sehr großen Volumen innerhalb der Probe, weshalb eine höhere *laser fluence* zu Ionenerzeugung notwendig ist. Dadurch wird aber auch eine starke Erwärmung der Probe erreicht, die sich in den entsprechend hohen Ablationsparametern widerspiegelt. Zusätzlich hat sich auch gezeigt, dass die Energie der absorbierten Photonen im Vergleich zur Ionisierungsenergie der Matrix eine wichtige Größe darstellt. Für die ILM bestehend aus CHCA und Tributylamin war so zu erkennen, dass die Ablation bei 266 nm trotz einer geringeren Absorption weniger energiereich ist als bei 355 nm. Da bei Verwendung von 266 nm als Ablationswellenlänge die Energie von zwei Photonen zur Ionisation ausreicht, wird hier weniger zusätzliche Energie absorbiert als bei 355 nm, wo drei Photonen notwendig sind, da bei der kürzeren Wellenlänge effektivere *pooling*-Prozesse ablaufen.

Anhand der Postionisationsexperimente wurde ein Modell für die Entstehung der verzögerten Ablation ausgehend von der Stoßwelle, die in der Probe durch die schnelle Erwärmung erzeugt wird, aufgestellt, welches aber mit dieser Methode nicht ausreichend verifiziert werden konnte. Von daher war der Aufbau eines neuen Experimentes notwendig, mit dem dieses ermöglicht werden konnte. Hier bot sich die Fast Flash Imaging-Methode an, da hiermit der gesamte *plume* mit einer sehr guten zeitlichen Auflösung abgebildet werden kann. Zusätzlich wurde diese Methode mit einem Flugzeitmassenspektrometer gekoppelt, um eine Vergleichbarkeit der Ablationsbedingungen zu den vorherigen Messungen zu garantieren.

Mit Hilfe der mit diesem Aufbau durchgeführten Messungen konnte das Auftreten der verzögerten Ablation bestätigt werden. Das postulierte Stoßwellen-Modell erwies sich bei diesen Untersuchungen aber als fehlerhaft; die Ergebnisse der Fast Flash Imaging-Aufnahmen zeigten keinen Einfluss der Schichtdicke der Probe auf den Zeitpunkt der verzögerten Ablation. Die Veränderung der *laser fluence* des Ablationslasers zeigte hier aber einen Einfluss auf den Startpunkt dieser Ablation, was auf einen thermischen Effekt schließen lässt, der dieser Ablation zu Grunde liegt. Diese Annahme konnte auch durch die Messungen bei einer veränderten Ablationswellenlänge bekräftigt werden.

Der gesamte Ablationsvorgang ließe sich nach dieser Vorstellung durch ein Zwei-Stufen-Modell erklären. Dabei wird die initiale Ablation durch die schnelle Erwärmung der oberen Probenschicht durch den Ablationslaser ausgelöst, aus diesem Prozess stammen auch die detektierbaren Ionen. Ein Teil der absorbierten Energie führt erst mit einer Verzögerung zu einer Erwärmung des nicht ablatierten Probenvolumens. Durch diese Erwärmung wird zu einem Zeitpunkt, der von der *laser fluence* abhängig ist, ein zweites Ablationsereignis ausgelöst. Hier muss eine gewisse Schwellentemperatur erreicht werden, was bei einer höheren *laser fluence* früher der Fall ist.

Ein ähnliches Verhalten im Ablationsvorgang ist auch in der Literatur bei Rohlfig *et al.*^[122] zu erkennen, hier ist aber keine zeitliche Trennung dieser beiden Ereignisse in einem vergleichbaren Ausmaß ersichtlich. Die dort verwendete Matrix 3-Nitrobenzylalkohol verfügt aber über einen deutlich höheren Dampfdruck im Hochvakuum als die hier verwendeten ionischen Flüssigkeiten, so dass die angesprochenen Schwellentemperatur dort sehr viel schneller erreicht werden kann. Zusätzlich ist der schon erwähnte Effekt, dass durch die Laserenergie Protonenübertragungen in der Probe initiiert werden, in der dort verwendeten Matrix nicht zu erwarten, was auch eine schnellere Umwandlung der gesamten Überschussenergie in Wärme zur Folge haben sollte.

4.2. Ausblick

Bei Messungen mit 3-Nitrobenzylalkohol zeigte sich, dass diese Matrix im Hochvakuum der Ionenquelle unter Laserbeschuss sehr schnell verdampfte und daher Vergleichsmessungen mit diesem Stoff nicht möglich waren. Hier wäre es denkbar, die Messungen bei leicht erhöhtem Druck durchzuführen, um das Verdampfen dieser Matrix einzuschränken. Weiterhin wäre die weitere Bestätigung des Zwei-Stufen-Modells durch die Verwendung

anderer ionischer Flüssigkeiten hilfreich, ebenso wie die Verwendung weiterer Ablationswellenlängen. Hier bietet sich besonders der in der MALDI hauptsächlich verwendete Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm an.

Um eine bessere Absorption des Laserlichtes und folglich eine geringere Eindringtiefe der Photonen zu erreichen, ist die Verwendung organischer Basen mit einem Chromophor denkbar, wobei hier der Einfluss der Base auf die *pooling*-Prozesse schwer abzuschätzen ist. Diese Prozesse und ihr Einfluss auf den Ablations/Ionisationsvorgang könnten auch durch die Verwendung von zwei zeitverzögerten Laserpulsen unterhalb der *fluence threshold* der Matrix untersucht werden. Ähnliche Experimente wurden von Setz und Knochenmuss zur Verifizierung des Auftretens der *pooling*-Prozesse in der Matrix durchgeführt.^[44] Im Fall der ILMs könnte auch eine Aussage über die Umwandlung der Laserenergie in Wärme, und folglich auch über die Entstehung der verzögerten Ablation aus einem solchen Experiment erhalten werden.

Ein experimenteller Parameter, der in den hier dargestellten Messungen nicht verändert wurde, ist die Größe des Ablationslaserspots. Dieser wurde in den FFI-Untersuchungen zur besseren Vergleichbarkeit mit den Postionisationsmessungen konstant auf dem dort verwendeten Wert gehalten. Ein möglicher Einfluss des Ablationsvorganges von dieser Größe ist vor allem im Bezug auf das schnell wachsende Feld des *mass spectrometry imaging* interessant, da hier ein möglichst kleiner Laserdurchmesser wünschenswert ist, um eine verbesserte räumliche Auflösung zu erhalten. Mit dem hier verwendeten Aufbau ist dieser Wert allerdings auch nicht beliebig zu verringern, da einerseits bei der hier verwendeten Vergrößerung ein kleiner Ablationsort dazu führt, dass der *plume* nur von einer sehr geringen Zahl an Pixeln abgebildet wird. Andererseits nimmt bei einer höheren Vergrößerung die Lichtstärke stark ab und die Detektion der ablatierten Teilchen wird dadurch erschwert.

Auch im Zusammenhang mit dem MSI ist hier eine Erhöhung des Druckes am Ablationsort zu erwähnen, aufgrund der gleichzeitigen Verwendung des linearen Flugzeitmassenspektrometers ist in diesem Aufbau so keine gleichzeitige Detektion der erzeugten Ionen möglich, da dieses nur im Hochvakuum durchgeführt werden kann. Um eine Detektion der unter Atmosphärendruck erzeugten Ionen zu ermöglichen, wäre ein Transfer dieser Ionen in ein Massenspektrometer mit einem geeigneten Einlass notwendig, was einen stark veränderten Aufbau des Experimentes erfordern würde. Wie schon erwähnt, würde durch einen solchen Aufbau aber auch die Möglichkeit der Untersuchung nicht-ionischer Flüssigkeiten gegeben sein. Erste Übersichtsmessungen ohne Ionendetektion

haben hier gezeigt, dass das bei Drücken unterhalb von 50 hPa der Ablationsmechanismus dem im Hochvakuum entspricht. Bei höheren Drücken ist das Erscheinungsbild der Ablation stark verändert. Dies ist auch in Abb. 4.1 zu sehen.

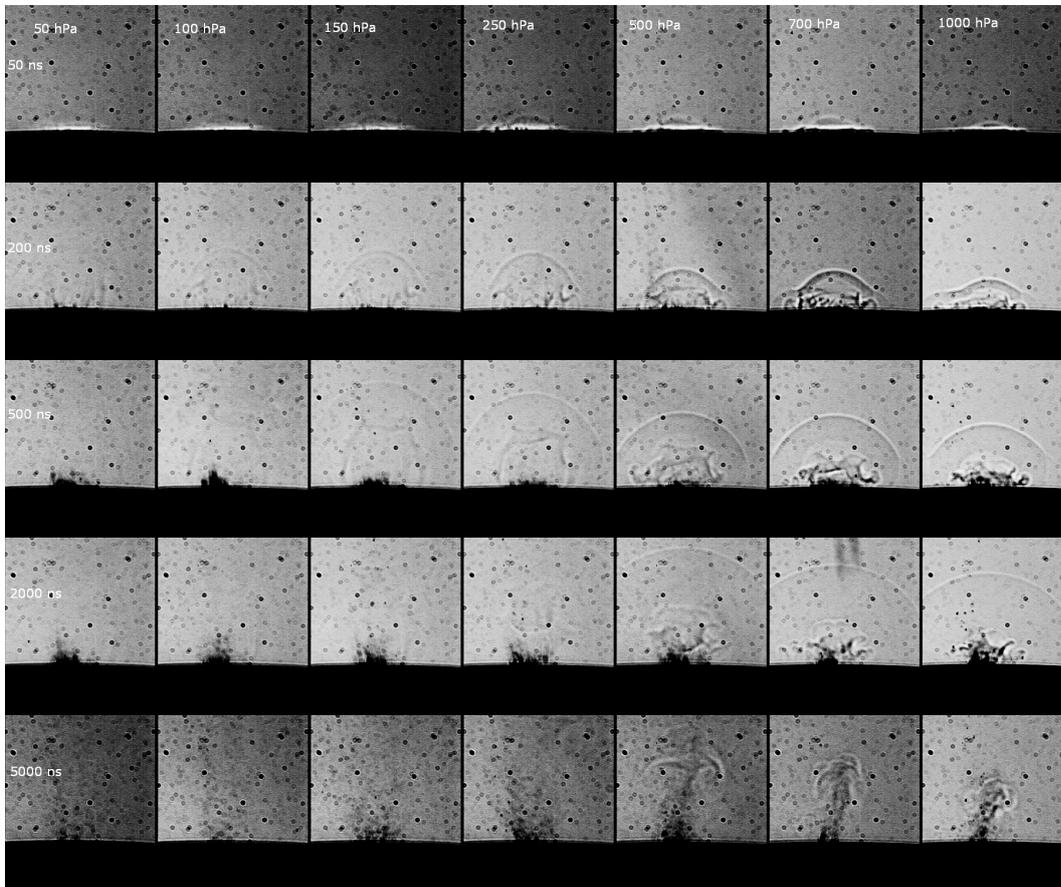


Abbildung 4.1.: Schattenbildaufnahmen bei unterschiedlichen Drücken in der Ionenquelle.

Aus dem Vergleich der Positionierungsdaten für die Initialablation lässt sich ein merklicher Unterschied zwischen den Parametern von ILMs und festen Matrices erkennen, von daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass die hier angestellten Überlegungen zum Ablationsvorgang auf die konventionellen Matrices übertragen werden können. Es hat sich aber gezeigt, dass die Kristallisation einen starken Einfluss auf die Ablation zu besitzen scheint. Folglich wäre es interessant, den Einfluss der Kristallstruktur auf den Ablationsvorgang weiter zu untersuchen; auch vor dem Hintergrund, dass es eine Vielzahl von Präparationsmethoden zur Erzeugung der MALDI-Proben gibt, die zu teilweise stark unterschiedlichen Morphologien der Proben führen. Da die Reproduzierbarkeit der einzelnen Ablationen hier nicht in dem Ausmaße wie bei den ionischen Flüssigkeiten

gegeben ist, müsste hier eine Methode zur Mittelung mehrerer Laserschüsse gefunden werden um zuverlässige Aussagen treffen zu können.

Auch die Verwendung von kürzeren Ablationslaserpulsen im Pikosekundenbereich könnte weitere Erkenntnisse über den Ablationsvorgang ermöglichen. Hier haben Rechnungen von Knochenmuss und Zhigilei^[66] mit Hilfe des *breathing sphere*-Modelles gezeigt, dass diese kurzen Laserpulse initial zu einem höheren Druckgradienten in der Probe führen, durch die Beschränkung der Simulationen auf kleine Volumina und kurze Zeiträume kann aber aus diesen Rechnungen der Einfluss auf die Entwicklung der Ablationswolke nicht komplett vorausgesagt werden. Die Simulationen mit diesem Modell und die Messungen der Ablationswolke mit den hier verwendeten Methoden ergänzen sich gut, um den gesamten Ablationsvorgang zu verstehen, da die Vorgänge in der Probe in der Zeit kurz nach dem Laserpuls mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht aufzuklären sind. Andererseits sind die Zeiträume der gezeigten Messungen mit Simulationen nicht zu erreichen, da die dafür benötigte Rechenleistung deutlich zu hoch liegt.

Schließlich ist auch noch zu erwähnen, dass eine genauere spektroskopische Untersuchung der in der MALDI verwendeten Substanzen hilfreich wäre, um die Prozesse zur Ionenerzeugung innerhalb der Matrix zu verstehen, da viele wichtige Parameter wie z.B. die Lage von angeregten Zuständen der Moleküle oder auch Ionisierungsenergien größtenteils unbekannt sind.

Literaturverzeichnis

- [1] F. Hillenkamp, M. Karas, D. Bachmann, *Anal. Chem.* **1985**, 57(14), 2935.
- [2] C. Whitehouse, R. Dreyer, M. Yamashite, J. Fenn, *Analyt. Chem.* **1985**, 57(3), 675.
- [3] D. Armstrong, L. Zhang, L. He, M. Gross, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 3679.
- [4] M. Mank, B. Stahl, G. Boehm, *Analytical Chemistry* **2004**, 76(10), 2938.
- [5] W. Bartky, A. Dempster, *Phys. Rev.* **1929**, 33, 1019.
- [6] J. Mattauch, R. Herzog, *Phys. Rev.* **1936**, 50, 617.
- [7] E. Johnson, A. Nier, *Phys. Rev.* **1953**, 9, 10.
- [8] W. Paul, M. Raether, *Z. Physik* **1955**, 140, 262.
- [9] W. Paul, H. Steinwedel, *Z. Naturforsch. A* **1953**, 8, 448.
- [10] P. Dawson, *Quadrupole Mass Spectrometry and Its Applications*, Elsevier, New York, **1976**.
- [11] D. Douglas, A. Frank, D. Mao, *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, 24, 1.
- [12] A. Marshall, G. Hendrickson, C. LeCnad Jackson, *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, 17, 1.
- [13] A. Makarov, *Anal Chem* **2000**, 72(6), 1156.
- [14] A. Cameron, D. Eggers, *Rev. Sci. Instr.* **1948**, 19, 605.
- [15] D. Walbrodt, *Das Ablationsverhalten von Matrix- und Analytneutralen im UV-MALDI-Prozess*, Dissertation, Christian-Albrechts-Universitaet zu Kiel, **2007**.

-
- [16] J. Todd, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1995**, *142*, 211.
- [17] J. Gross, *Mass Spectrometry*, Springer, **2004**.
- [18] S. Colby, T. King, J. Reilly, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 865.
- [19] J. T. Watson, O. D. Sparkman, *Introduction to Mass Spectrometry*, Wiley, **2007**.
- [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. Grundwuermer, J. Grotemeyer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 2.
- [23] W. Wiley, J. McLaren, *Rev. Sci. Instr.* **1955**, *26*, 1150.
- [24] A. N. Verentchikov, M. Yavor, Y. Hasin, M. Gavrik, *Mass Spectrometry* **2005**, *2*, 11.
- [25] T. Satoh, H. Tsuno, M. Iwanaga, Y. Kammei, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1969.
- [26] P. Kebarle, T. Liang, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 972.
- [27] J. Sunner, Y.-C. Dratz, E. Chen, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4335.
- [28] J. Wei, J. M. Buriak, G. Siuzdak, *Nature* **1999**, *399*, 243.
- [29] R. Cody, J. Laramee, H. D. Durst, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2297.
- [30] C. McEwen, R. McKay, B. Larsen, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7826.
- [31] N. Na, M. Zhao, S. Zhang, C. Yang, X. Zhang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1859.
- [32] Z. Takats, J. Wiseman, B. Gologan, G. Cooks, *Science* **2004**, *15*, 471.
- [33] P. Nemes, A. Vertes, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8098.
- [34] J. Sampson, A. Hawkrige, D. Muddiman, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 1712.
- [35] U. Boesl, H. J. Neusser, E. W. Schlag, *Z. Naturforsch. A* **1978**, *33*, 1546.

-
- [36] L. Zandee, R. B. Bernstein, D. Lichtin, *J. Chem. Phys.* **1978**, *69*, 3274.
- [37] F. J. Vastola, A. Pirone, *Adv. Mass Spectrom.* **1968**, *4*, 107.
- [38] K. Tanaka, K. Waki, Y. Ido, S. Akita, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1988**, *2*(8), 151.
- [39] F. Hillenkamp, M. Karas, *MALDI MS*, Wiley-VCH, **2007**.
- [40] V. Frankevich, J. Zhang, M. Dashtiev, R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 2343.
- [41] M. Karas, R. Krueger, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 427.
- [42] R. Knochenmuss, Q. Lin, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 1422.
- [43] R. Knochenmuss, A. Vertes, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 5406.
- [44] P. D. Setz, R. Knochenmuss, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 4030.
- [45] T. Jaskolla, M. Karas, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 1054.
- [46] R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 337.
- [47] A. A. Puretzky, D. B. Geohegan, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *286*, 426.
- [48] R. Knochenmuss, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2199.
- [49] I. P. Smirnov, X. Zhu, T. Taylor, Y. Huang, P. Ross, I. Papayanopoulos, S. Martin, D. Pappin, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2958.
- [50] T. Jaskolla, M. Karas, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22*, 976.
- [51] R. Knochenmuss, *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, *285*, 2028.
- [52] R. Knochenmuss, L. Zhigilei, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 22947.
- [53] A. Meffert, J. Grotemeyer, *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *210/211*, 521.
- [54] V. Horneffer, K. Dreisewerd, H.-C. Ludemann, F. Hillenkamp, M. Lage, K. Strupat, *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *185/186/187*, 859.
- [55] R. Levis, *Annual Review of Physical Chemistry* **1994**, *45*, 483.

-
- [56] L. Zhigilei, E. Leveugle, B. Garrison, Y. Yingling, M. Zeifman, *Chem. Rev.* **2003**, *102*, 321.
- [57] L. Zhigilei, B. Garrison, *J. App. Phys.* **2000**, *88*, 1281.
- [58] A. Vertes, R. Gijbels, R. D. Levine, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1990**, *4*, 228.
- [59] K. Dreisewerd, M. Schuerenberg, M. Karas, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectr.* **1995**, *141*, 127.
- [60] J. Elam, D. Levy, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8113.
- [61] W. Zhang, B. Chait, *Int. J. Mass Spectrom.* **1997**, *160*, 259.
- [62] L. Zhigilei, P. Kodali, B. Garrison, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 2028.
- [63] L. Zhigilei, *Appl. Phys. A* **2003**, *76*, 339.
- [64] L. Zhigilei, P. Kodali, B. Garrison, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2845.
- [65] R. Zenobi, S. Nettesheim, M. Handschuh, *Appl. Surf. Sci.* **1999**, *137*, 125.
- [66] R. Knochenmuss, L. Zhigilei, *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 333.
- [67] C. Mowry, M. Johnston, *Rapid. Comm. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 569.
- [68] A. A. Puretzky, D. B. Geohegan, *Phys. Rev. Let.* **1999**, *83*, 444.
- [69] M. Glueckmann, M. Karas, *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 467.
- [70] D. Ermer, M. Baltz-Knorr, R. J. Haglund, *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 538.
- [71] V. Boekelmann, B. Spengler, R. Kaufmann, *Europ. J. Mass Spectr.* **1995**, *1*, 81.
- [72] S. Berkenkamp, C. Menzel, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 209.
- [73] T. Huth-Fehre, C. Becker, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 378.
- [74] M. Karas, *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1476.
- [75] C. Zechmann, *Spektroskopische Untersuchung der Lumineszenzerscheinungen beim UV-MALDI-Desorptionsprozess*, Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universitaet zu Kiel, **2001**.

-
- [76] T. Muskat, *Matrixabhaengiges Ablationsverhalten von Neutralen und Oberflaechencharakteristika bei der Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation*, Dissertation, Christian-Albrechts-Universitaet zu Kiel, **2004**.
- [77] L. Jessome, N. Hsu, Y. Wang, C. Chen, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 130.
- [78] F. Yassin, D. Marynick, *Molecular Physics* **2005**, *103*, 183.
- [79] M. Mormann, S. Bashir, D. P.J., D. Kuck, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *33*, 544.
- [80] J. Schiller, R. Suess, B. Fuchs, M. Mueller, M. Petkovic, O. Zschoernig, H. Waschpky, *Eur. Biophys. J.* **2007**, *36*, 517.
- [81] F. Yassin, D. Marynick, *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110*, 3820.
- [82] G. Kinsel, Q. Zhang, J. Narayanasamy, F. Yassin, H. V. Rasika Dias, B. Niesner, K. Prater, C. St. Marie, L. Ly, D. Marynick, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 3153.
- [83] T. Jaskolla, W.-D. Lehmann, M. Karas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 12200.
- [84] T. Porta, C. Grivet, R. Knochenmuss, E. Varesio, G. Hopfgartner, *J. Mass Spectrom.* **2011**, *46*, 144.
- [85] T. Jaskolla, B. Fuchs, M. Karas, J. Schiller, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 867.
- [86] M. Openshaw, J. Leszyk, *J. Biomol. Tech.* **2010**, *21*, 37.
- [87] S. L. Cohen, B. Chait, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 31.
- [88] A. Gusev, W. Wilkinson, A. Proctor, D. Hercules, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1034.
- [89] S. Bashir, R. Mutter, A. E. Giannakopoulos, M. Wills, P. Derrick, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *519*, 181.
- [90] S. Laugesen, P. Roepstorff, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 752.
- [91] Z. Guo, L. He, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 1939.

-
- [92] J. Soltwisch, S. Berkenkamp, K. Dreisewerd, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 59.
- [93] M. Shahgholi, B. A. Garcia, N. H. L. Chiu, P. J. Heaney, K. Tang, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e91.
- [94] A. Tholey, E. Heinzle, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 24.
- [95] J. Crank, D. Armstrong, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *30*, 1790.
- [96] J. J. Jones, S. Batoy, A. B. Maricco, C. L. Wilkins, R. Liyanage, J. O. Lay, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*(12), 2000.
- [97] A. Tholey, M. Zabet-Moghaddam, E. Heinzle, *Anal. Chemistry* **2005**, *78*(1), 291.
- [98] A. Tholey, M. Zabet-Moghaddam, E. Heinzle, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2006**, *19*, 1928.
- [99] T. Laremore, S. Murugesan, T.-J. Park, F. Avci, D. Zagorevski, R. Linhardt, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*(6), 1774.
- [100] Y. Fukuyama, S. Nakaya, Y. Yamazaki, K. Tanaka, *Analytical Chemistry* **2008**, *80*(6), 2171.
- [101] S. Carda-Broch, A. Berthod, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 553.
- [102] A. Tholey, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 1761.
- [103] Q. Liu, L. He, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 2229.
- [104] Y. L. Li, M. Gross, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*(12), 1833.
- [105] B. Garcia, P. J. Heaney, K. Tang, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2083.
- [106] S. Trimpin, A. Rouhanipour, R. Az, H. Raeder, K. Muellen, *Rapid. Comm. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 1364.
- [107] S. Trimpin, M. Deinzer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 542.
- [108] V. Horneffer, M. Glueckmann, R. Krueger, M. Karas, K. Strupat, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *249-250*, 426.
- [109] B. Hopp, M. Csete, G. Szabo, Z. Bor, *Appl. Phys. A* **1995**, *61*, 339.

-
- [110] M. Hauer, D. Funk, T. Lippert, A. Wokaun, *Optics and Lasers in Engineering* **2005**, *43*, 545.
- [111] H. Furutani, H. Fukumura, H. Masuhara, T. Lippert, A. Yabe, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 5742.
- [112] Y. Kawaguchi, X. Ding, A. Narazaki, T. Sato, H. Niino, *Appl. Phys. A* **2005**, *8*, 275.
- [113] D. Kim, M. Ye, C. P. Grigoropoulos, *Appl. Phys. A* **1998**, *67*, 169.
- [114] K. Hatanaka, M. Kawao, Y. Tsuboi, H. Fukumura, H. Masuhara, *J. Appl. Phys.* **1997**, *82*, 5799.
- [115] K. Hatanaka, Y. Tsuboi, H. Fukumura, H. Masuhara, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 3049.
- [116] Y. Tsuboi, H. Fukumura, H. Masuhara, *Appl. Phys. Lett.* **1994**, *64*, 2745.
- [117] Y. Tsuboi, K. Hatanaka, H. Fukumura, H. Masuhara, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11237.
- [118] Y. Tsuboi, K. Irie, H. Miyasaka, A. Itaya, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 3017.
- [119] A. Vogel, V. Venugoplalan, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 577.
- [120] A. Rohlfing, K. Dreisewerd, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 12275.
- [121] X. Fan, K. K. Murray, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 1492.
- [122] A. Rohlfing, A. Leisner, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 5367.
- [123] D. Walbrodt, *Untersuchungen zur Laserdesorption grosser Biomolekuele*, Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universitaet zu Kiel, **2003**.
- [124] N. Hellwig, *Multiphotonenionisation von Dipeptiden und Matrices in der MALDI-Ablationswolke*, Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universitaet zu Kiel, **2008**.
- [125] A. Kulle, *Untersuchung zur Freisetzung kinetischer Energie bei Dissoziationsreaktionen multifunktionaler Systeme*, Dissertation, Christian-Albrechts-Universitaet zu Kiel, **2006**.

-
- [126] M. Wojdyr, *J. Appl. Cryst.* **2010**, *43*, 1126.
- [127] A. Meffert, *Untersuchungen zu Ionisation und Reaktionen bioorganischer Cluster in der Gasphase*, Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **1998**.
- [128] H. Niino, Y. Kawaguchi, T. Sato, A. Narazaki, T. Gumpenberger, R. Kurosaki, *Applied Surface Science* **2006**, *252*, 4387.
- [129] D. Allwood, P. Dyer, *Chemical Physics* **2000**, *261*(3), 457.
- [130] A. Zijlstra, C.-D. Ohl, in *19th International Congress on Acoustics*, **2007**.
- [131] C. Dainty, *Laser Speckle and Related Phenomena*, Springer, **1984**.
- [132] M. Abramoff, P. Magelhaes, S. Ram, *Biophotonics International* **2004**, *11*, 36.

A. FFI-Aufnahmen

Zusätzliche Messungen zur Untersuchung der Probendicke

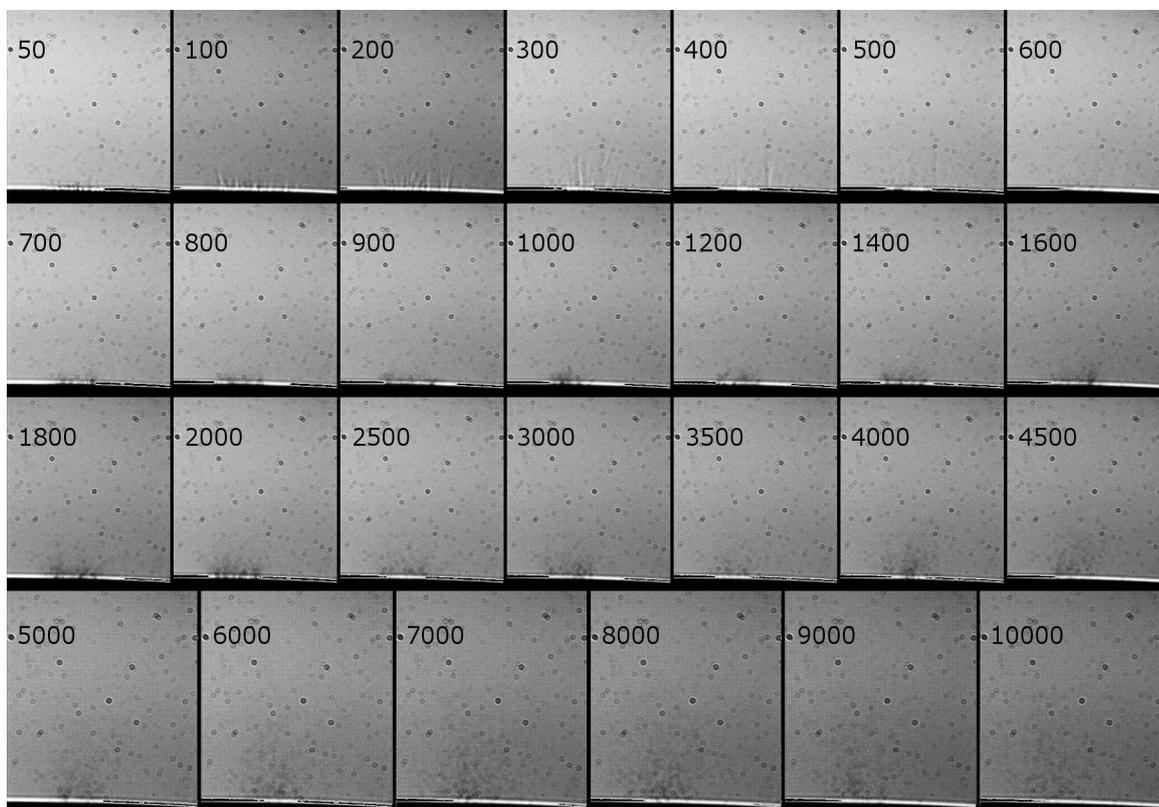


Abbildung A.1.: Schattenbildaufnahmen einer Probe mit $10 \mu\text{l}$ Matrixlösung und $0,8 \text{ J/cm}^2$ laser fluence.

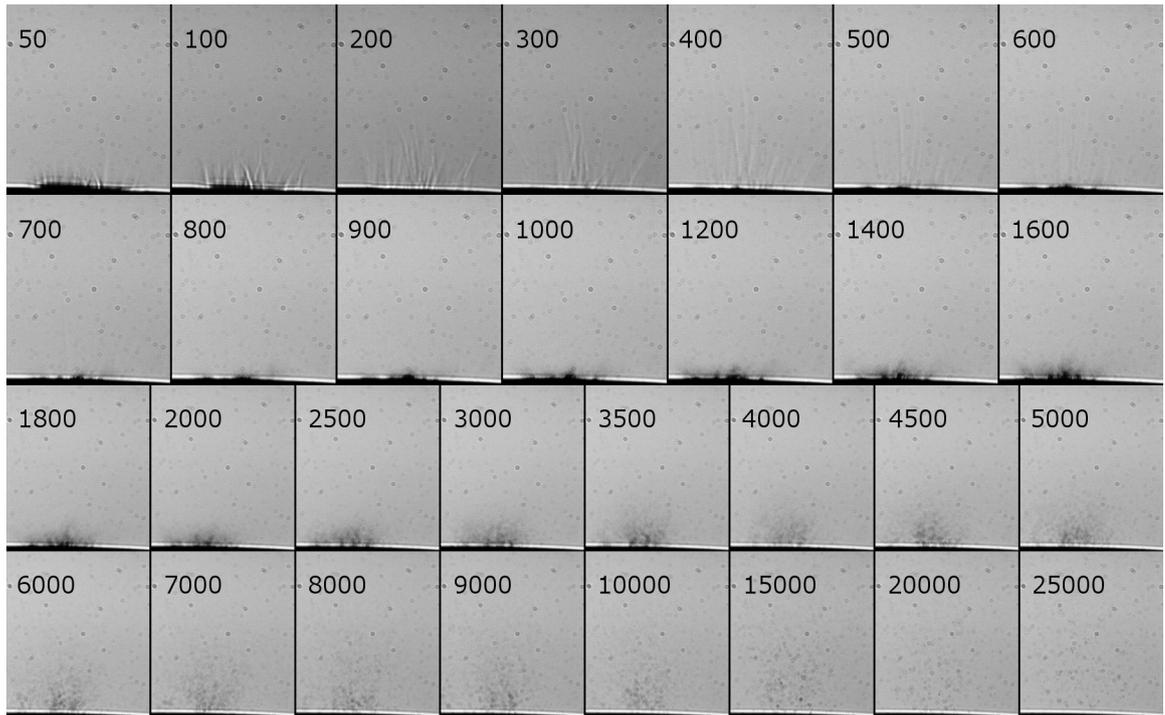


Abbildung A.2.: Schattenbildaufnahmen einer Probe mit $10\ \mu\text{l}$ Matrixlösung und $4,6\ \text{J}/\text{cm}^2$ laser fluence.

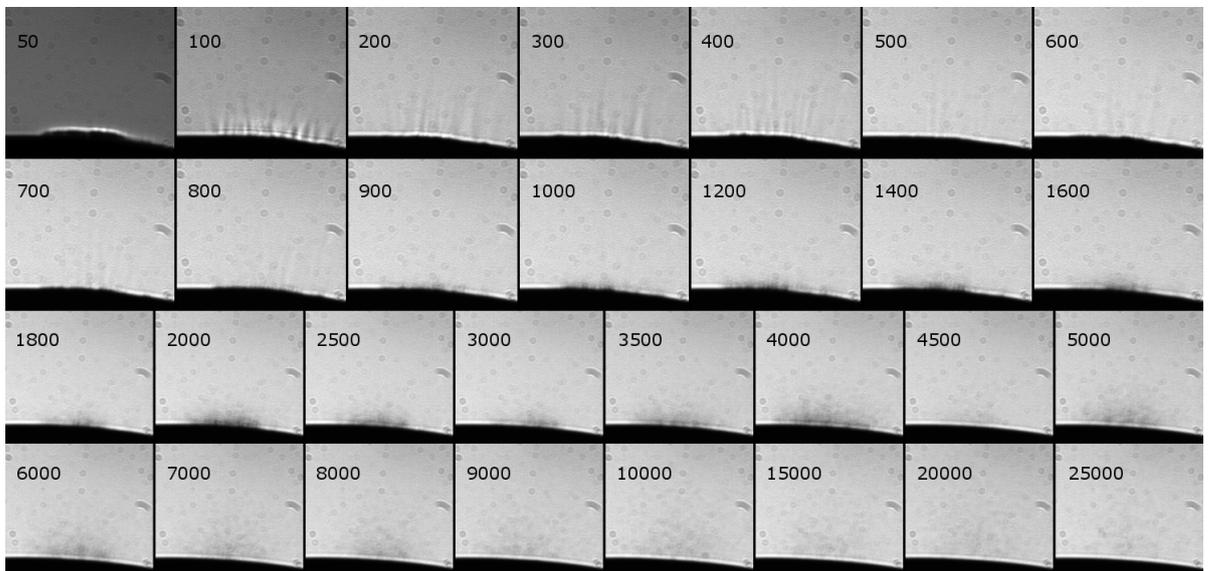


Abbildung A.3.: Schattenbildaufnahmen einer Probe mit $50\ \mu\text{l}$ Matrixlösung und $0,8\ \text{J}/\text{cm}^2$ laser fluence.

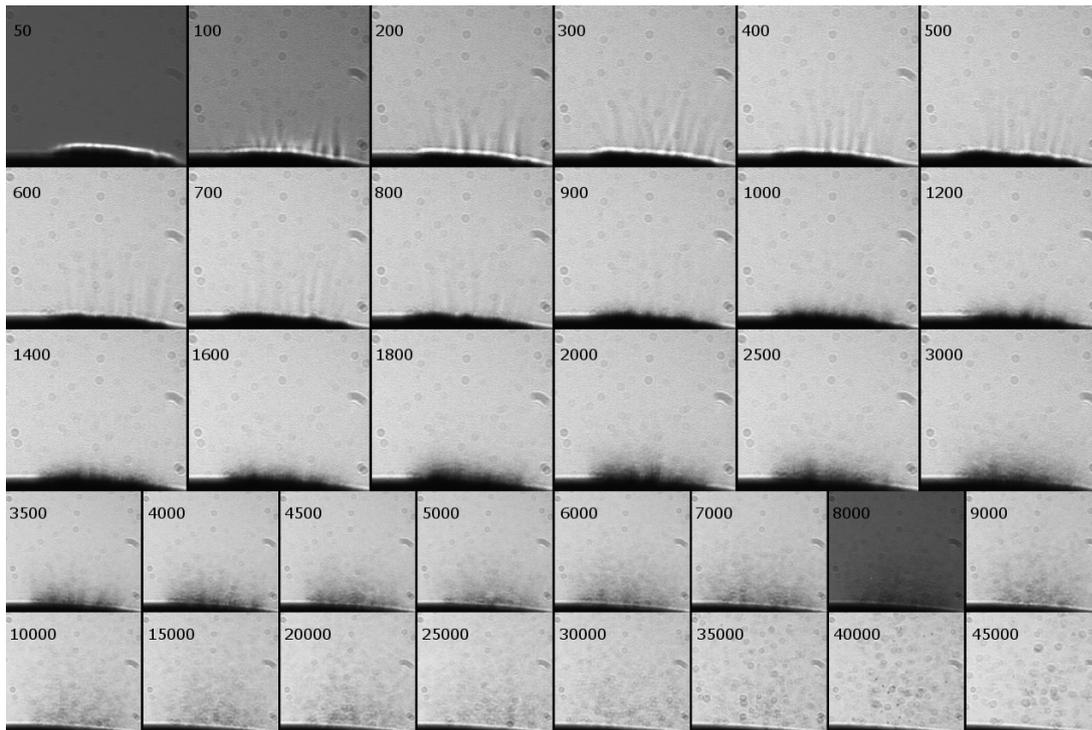


Abbildung A.4.: Schattenbildaufnahmen einer Probe mit $50 \mu\text{l}$ Matrixlösung und $4,6 \text{ J/cm}^2$ laser fluence.

Abhängigkeit der Ablation von der laser fluence bei 266 nm

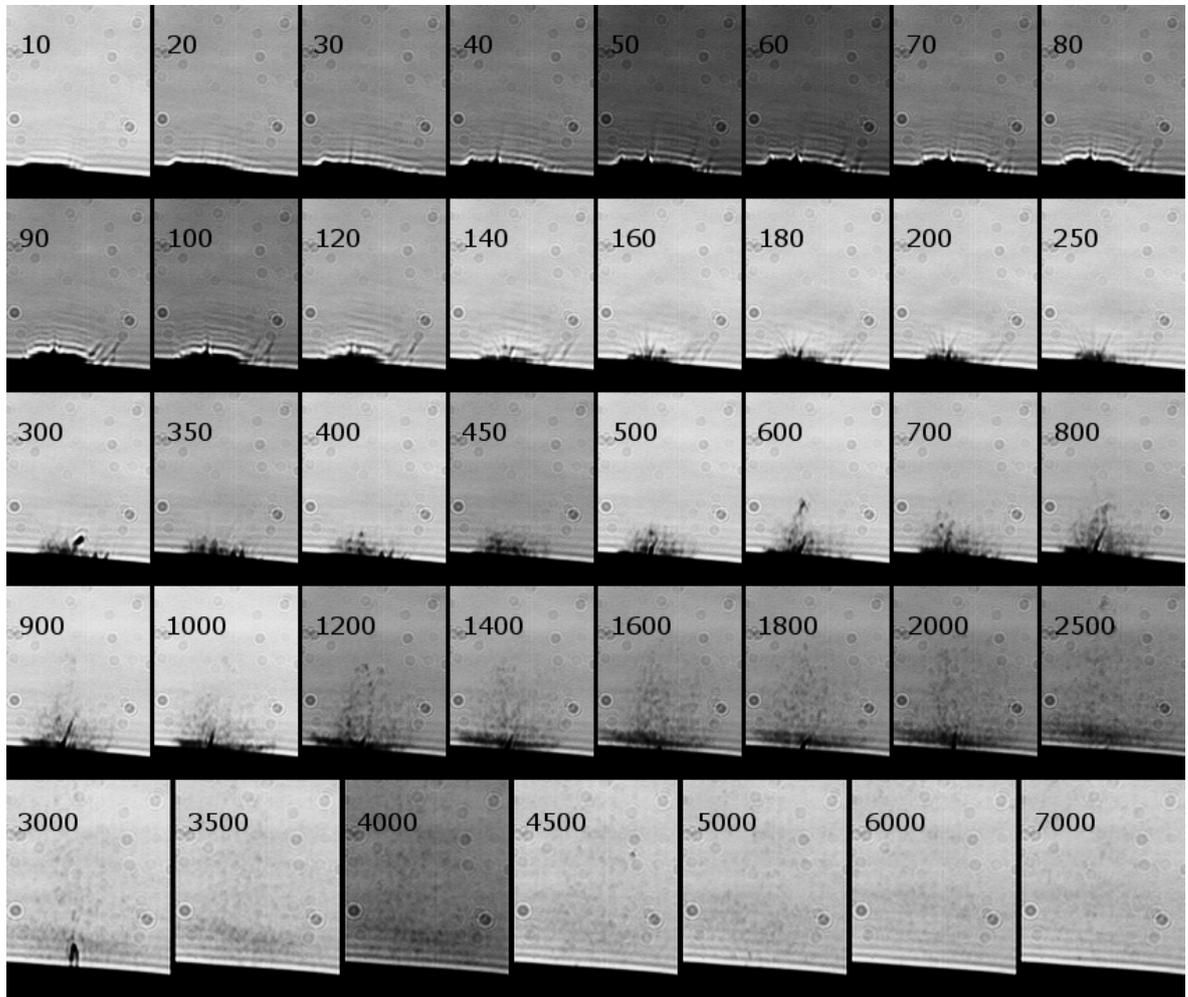


Abbildung A.5.: Schattenbildaufnahmen bei einer Ablationswellenlänge von 266 nm und einer Signalintensität der Flugzeitspektren entsprechend Abb. 3.36 oben.

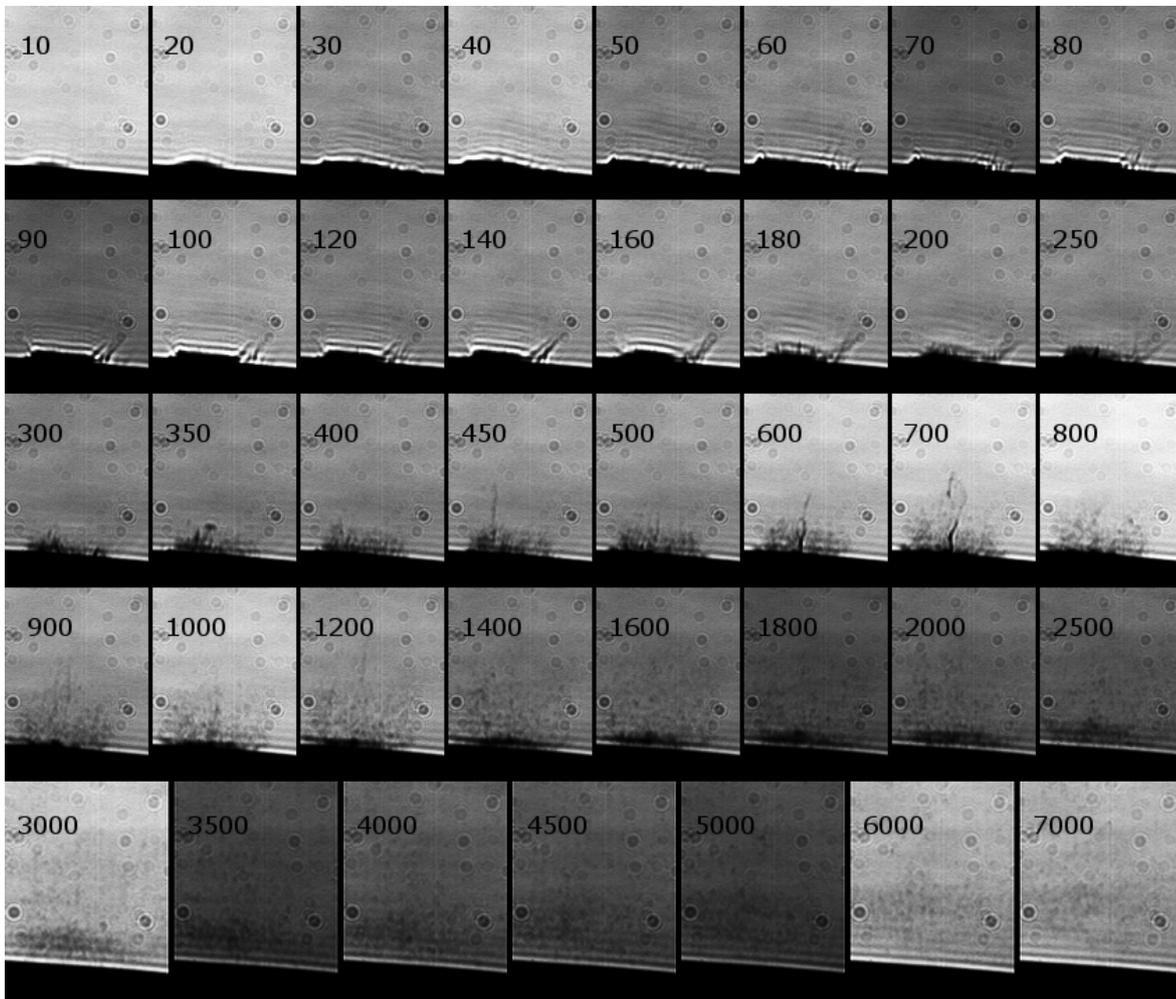


Abbildung A.6.: Schattenbildaufnahmen bei einer Ablationswellenlänge von 266 nm und einer Signalintensität der Flugzeitspektren entsprechend Abb. 3.36 unten.

Publikationen und Poster

2012

N. Hellwig, T. Muskat, J. Grotemeyer: Pressure- and Laser Fluence-Dependence of the Ablation Dynamics of Ionic Liquid Matrices investigated by Fast-Flash Imaging *60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Vancouver.

N. Hellwig, J. Grotemeyer: Pressure- and Laser Fluence-Dependence of the Ablation Dynamics of Ionic Liquid Matrices investigated by Fast-Flash Imaging *Gemeinschaftliche Tagung der Polnischen Gesellschaft für Massenspektrometrie mit der 45. DGMS-Jahrestagung*, Poznan.

2011

N. Hellwig, T. Muskat, J. Grotemeyer: Investigation of the Ablation Process of Ionic Liquid Matrices by simultaneous Time-of-Flight Mass Spectrometry and Fast-Flash Imaging *44. DGMS-Jahrestagung*, Dortmund.

2010

N. Hellwig, C. Gernert, J. Grotemeyer: Investigation of Ionic Liquid Matrices of the six Dihydroxybenzoic acid isomers *43. DGMS-Jahrestagung*, Halle.

2009

N. Hellwig, T. Muskat, J. Grotemeyer: Laser Ablation of Ionic Liquids in UV-Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation *18th IMSC*, Bremen.

N. Hellwig, A. Thrun, T. Muskat, J. Grotemeyer: UV-Laser Ablation of Ionic Liquid Matrices *Anal. Bioanal. Chem.* **2009** 395, 2457.

N. Hellwig, A. Thrun, T. Muskat, J. Grotemeyer: Ablationsverhalten von Ionischen Flüssigkeiten als UV-MALDI-Matrix *42. DGMS-Jahrestagung*, Konstanz.

Danksagung

Zum Schluss muss auch noch vielen Menschen gedankt werden, ohne die die Anfertigung dieser Dissertation nur sehr schwer möglich gewesen wäre.

An erste Stelle natürlich Prof. Grottemeyer, zunächst für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Betreuung anfertigen zu können und auch für die Freiheiten, die dabei in der Schwerpunktlegung und Durchführung der Laborarbeit gestattet wurden.

Tassilo Muskat gebührt Dank für zu viele Einzelheiten, um sie hier ausführlich darzustellen, angefangen von schnellen Antworten zu allen Facetten der experimentellen Arbeit, bis hin zur Kostenübernahme für so manchen Kasten Bier. Und natürlich auch für das Korrekturlesen und kritische Hinterfragen dieser Arbeit und diverser Poster.

Weiterhin muss auch das technische Personal, namentlich Uwe Eggers, Carsten Grun, Michael Karstens und Klaus Warns (in wertfreier alphabetischer Reihenfolge), erwähnt werden, die für jedes Problem, das die Kenntnisse eines Chemikers übersteigt, eine Lösung gefunden haben. Gleiches gilt auch für die Institutswerkstatt.

Gedankt werden muss auch allen weiteren Mitarbeitern des Arbeitskreises für die Arbeitsatmosphäre und die Diskussionen. Hier müssen auch meine Praktikanten Alexander und Claus erwähnt werden, die an Teilen dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom 01. Mai 2008 bis zum 12. Juni 2012 am Institut für Physikalische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer bearbeitet.

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Abhandlung - abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist und ich dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Sie ist dabei unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Diese Arbeit hat weder in Auszügen noch in ganzer Form einer anderen Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegen. Sie wurde in ihrer Gesamtheit nicht veröffentlicht und auch nicht zur Veröffentlichung eingereicht.

Kiel, den 12. Juni 2012

(Nils Hellwig)