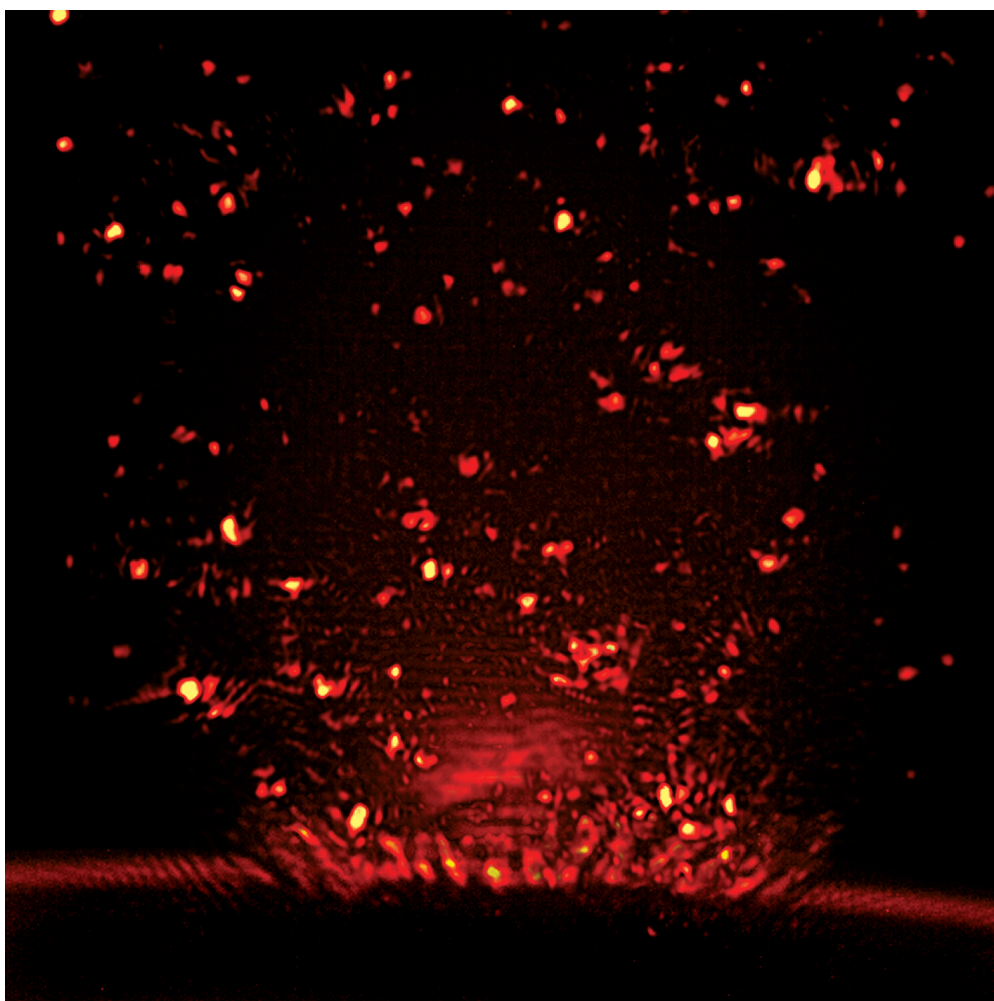


ARNE LEISNER

UNTERSUCHUNGEN ZUR PLUME-EXPANSIONSDYNAMIK
BEI DER MATRIX-UNTERSTÜTZTEN LASERDESORPTION/
IONISATION AUS GLYCEROL MIT INFRAROT-LASERN



Experimentelle Physik

**Untersuchungen zur *plume*-Expansionsdynamik
bei der Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisation
aus Glycerol mit Infrarot-Lasern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Physik
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Arne Leisner
aus Hannover
- 2003 -

Dekan: Prof. Dr. H. Zacharias
Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Fuchs
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. F. Hillenkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01., 02.02., 03.02.2004

Tag der Promotion: 03.02.2004

Umschlaggestaltung:

Photomontage (nicht maßstabsgetreu) aus Hochgeschwindigkeitsaufnahmen des Glycerol-*plumes*, der sich nach Bestrahlung durch einen optisch-parametrischen Oszillator bei einer Emissionswellenlänge von 2936nm ausbreitet

*„Nicht alles ist nämlich eine wissenschaftliche Wahrheit:
der Ozean der irrelevanten Variablen ist größer als der Ozean der Dummheit,
und das will schon etwas heißen.“*

Stanislaw Lem, Die Entdeckung der Virtualität

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Einführung	3
2.1	Biomakromoleküle	3
2.2	Massenspektrometrie	3
2.2.1	Aufbau eines Massenspektrometers	4
	Ionenquellen	4
	Massenanalysatoren	4
	Prinzip der Flugzeitmassenspektrometrie	4
	Detektoren	5
2.2.2	Schema eines Flugzeitmassenspektrometers	6
2.2.3	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation	7
	Theoretischer Ansatz	7
	Energiedeposition	7
	Schwellbestrahlung	8
	Energiedissipation	10
	Praktische Anwendung	10
2.2.4	Infrarot-Nachionisationsmassenspektrometrie	10
2.2.5	Desorptionsmodelle	11
	Photoablation	11
	Quasithermisches Modell	12
	Spallationsmodell	13
	<i>Breathing-Sphere</i> -Modell	14
2.3	Hochgeschwindigkeitsphotographie	14
2.3.1	Zeitkorrelation	14
2.3.2	Optisches Auflösungsvermögen und Abbildungsfehler	15
2.3.3	Streuung	15
2.3.4	Dunkelfeldbeleuchtung	17
2.3.5	Kamera	18
3	Experimenteller Aufbau und Meßmethodik	21
3.1	MALDI-Präparation und Meßbedingungen	21
3.2	Flugzeitmassenspektrometer	22
3.2.1	Verwendete Lasersysteme	23
	Er:YSGG	23
	Er:YAG	23
	OPO / OPA	24
3.3	Infrarot-Nachionisationsmassenspektrometrie	25
3.3.1	Zeitkorrelation	25
3.3.2	Laserstrahljustierung	27
3.4	Hochgeschwindigkeitsphotographie	28
3.4.1	Aufnahmegeometrie	30
	90°-Anordnung	30
	Dunkelfeld-Anordnung	31
3.4.2	Zeitkorrelation	32
3.4.3	Abbildungseigenschaften	35
3.4.4	Bildakquisition und -nachbearbeitung	35

4	Ergebnisse	39
4.1	Infrarot-Nachionisationsmassenspektrometrie	39
4.1.1	Desorption von Biomakromolekülen	39
4.1.2	Untersuchungen zur <i>plume</i> -Dynamik	43
4.1.3	Untersuchung zum <i>plume</i> -Öffnungswinkel	48
4.1.4	Untersuchungen zur <i>plume</i> -Ausbreitungsfront	51
4.1.5	Wasser als Matrix	52
4.2	Hochgeschwindigkeitsphotographie	53
4.2.1	Allgemeine Bildeffekte	55
	Mehrfachreflektionen im Tropfen	55
	Interferenzeffekte an Grenzflächen	55
	Zweifache Reflektion an Tröpfchen	56
	Reflektion an der Tropfenoberfläche	57
	Strahleneffekt	57
	Nicht sichtbare <i>plume</i> -Front	58
4.2.2	Serien der zeitlichen <i>plume</i> -Entwicklung	58
4.2.3	Vergleich von OPO und Er:YAG-Laser	72
	Abschnitte der <i>plume</i> -Entwicklung	72
	Beginn der Expansion	72
	Gasphasenexpansion	73
	Übergang zu Partikelemission	75
	Isolierte Tröpfchen	82
4.2.4	Festkörpermatrix Bernsteinsäure	83
5	Diskussion	85
5.1	Emissionsdauer des IR-MALDI- <i>plumes</i>	85
5.2	Abhängigkeit von der Laserimpulsdauer	86
5.3	Vergleich mit bestehenden Modellen	87
5.4	Modell zur laserimpulsabhängigen Desorption	89
5.5	Aspekte der Infrarot-Nachionisation	90
6	Zusammenfassung und Ausblick	93
Anhang A - Versuchskammer		97
Anhang B - Software zur Bildakquirierung		99
Abkürzungs- und Wortverzeichnis		101
Literaturverzeichnis		103
Danksagung		106
Lebenslauf		109

1 Einleitung

Zu Beginn des 21. Jahrhunderts sind die Biowissenschaften aus unserer Gesellschaft nicht mehr wegzudenken. Die Bioanalytik als Disziplin der Biowissenschaften hat bereits jetzt eine erhebliche Bedeutung in der medizinischen Diagnostik, aber auch in der Grundlagenforschung. Hier wiederum hat sich die Massenspektrometrie eine relativ junge und dennoch sehr erfolgreiche Position erkämpft. Ihren Ursprung hat die Massenspektrometrie in der Atomphysik. Die Möglichkeit, auch biologische Makromoleküle massenspektrometrisch analysieren zu können, eröffnete vor etwa 20 Jahren mit der Einführung der Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie (ESI-MS)^[Whi85, Fen89] und der Matrix-unterstützten Laser-desorptions-/Ionisationsmassenspektrometrie (MALDI-MS)^[Kar87, Kar88] ein ganz neues Feld der Bioanalytik, dessen Bedeutung sich auch in der Tatsache widerspiegelt, daß der Nobelpreis für Chemie 2002 unter anderem für diese Gebiete vergeben wurde.

Bei der MALDI-MS, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, werden die zu untersuchenden, thermisch instabilen Biomakromoleküle in eine sogenannte Matrix eingebettet. Bei der Matrix handelt es sich um organische Moleküle, die die verwendete Laserwellenlänge stark absorbieren.

Die Bestrahlung des Gemisches mit einem gepulsten Laser hoher Intensität führt zur Freisetzung (Desorption) und Ionisation der Matrix- und Analytmoleküle. Die Analyse der Ionen wird dann typischerweise mit einem Flugzeitmassenspektrometer durchgeführt. Dabei erfolgt die zeitliche Trennung der in einem elektrischen Feld beschleunigten Ionen nach der durch das Verhältnis von Masse zu Ladung determinierten Flugzeit in einer feldfreien Flugstrecke.

Prinzipiell sind verschiedene Kombinationen von Matrix und Laserwellenlänge denkbar. Hauptsächlich wurden und werden bisher Laser im ultravioletten Spektrum (UV) in Kombination mit Matrixmolekülen verwendet, die ein konjugiertes Elektronensystem aufweisen, und bei denen dann eine elektronische Anregung stattfindet. Jedoch wurde bereits 1990 gezeigt, daß auch gepulste Infrarot-Laser (IR) über eine rovibronische Anregung der Matrixmoleküle für die MALDI geeignet sind.^[Ove90, Ove91] Heute nimmt die Zahl der IR-MALDI-Geräte zwar zu, hat aber noch lange nicht den Stellenwert von UV-MALDI-MS erreicht. Dies liegt nur zum Teil an den hohen Anschaffungskosten und dem wartungsintensiven Betrieb gängiger IR-Laser.

Es spricht allerdings einiges dafür, die Entwicklung der IR-MALDI gleichermaßen voranzutreiben. So konnte nachgewiesen werden, daß die IR-MALDI eine deutlich geringere metastabile Fragmentierung der Analytionen verursacht; dies führte dazu, daß der zugängliche Massenbereich in der Oligonukleotidanalytik um eine Größenordnung erweitert werden konnte.^[Ber97, Ber98] Bezüglich der erreichbaren Massenauflösung ist die IR-MALDI allerdings der UV-MALDI bisher eklatant unterlegen.

Untersuchungen zum Verständnis des MALDI-Prozesses gibt es überwiegend zur UV-MALDI. Erst seit kurzem werden hierzu auch Anstrengungen für die IR-MALDI unternommen. In beiden Fällen muß allerdings festgestellt werden, daß ein umfassendes Verständnis noch nicht erreicht wurde. Parallele Bestrebungen um die Aufklärung der Mechanismen sind um so interessanter, als zwar die Prozesse aufgrund der physikalischen Unterschiede zwischen IR- und UV-Wechselwirkung vermutlich nicht identisch sind, jedoch die resultierenden Massenspektren große Ähnlichkeit aufweisen.

Zu Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurde zunächst versucht, mögliche chemische Ursachen für die reduzierte Massenauflösung, d.h. für die verbreiterten Ionenmassensignale bei der IR-MALDI-MS zu finden. Salzaddukte (Na^+ und K^+) stellen diesbezüglich in der MALDI häufig ein Problem dar. Die Untersuchungen haben ergeben, daß

für diese reduzierte Massenauflösung nicht Salzbildung durch Alkaliionen oder Analytaddukte durch Verunreinigungen der Matrix verantwortlich sind, sondern reaktive Produkte des Glycerols, also der Matrix selbst, die sich als unvermeidliche Produkte des Desorptionsprozesses in der Teilchenwolke befinden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde deshalb der Schwerpunkt auf die Untersuchung der Desorptionswolke (*plume*) in der IR-MALDI mit Glycerol verlegt. Dabei wurde insbesondere der zeitliche und räumliche Prozeß untersucht, der während und nach der Bestrahlung durch den Desorptionslaser stattfindet. Hierzu dienten zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze.

Zum einen wurde der sich entwickelnde *plume* mit einem Aufbau zur Hochgeschwindigkeitsphotographie aufgenommen. Dabei kamen unterschiedliche Beleuchtungstechniken zum Einsatz. Zum anderen wurde die Teilchenwolke, die durch Bestrahlung des (primären) Desorptionslasers entsteht, mit Hilfe eines zweiten IR-Lasers vermessen (Nachionisation). Beide Experimente wurden mit zwei IR-Lasern gleicher Wellenlänge (2,94µm), aber unterschiedlicher Impulsdauer (6ns und 100ns) durchgeführt. Sowohl die photographischen Aufnahmen als auch die Nachionisationsspektren zeigen einen deutlichen Unterschied der *plume*-Expansion abhängig von der Laserimpulsdauer.

Im Nachionisationsexperiment konnte unter anderem nachgewiesen werden, daß sich durch Desorption und Nachionisation mit zwei IR-Lasern im Gegensatz zu vergleichbaren Ansätzen mit zwei UV-Lasern Makromoleküle auch intakt aus neutralen Bestandteilen der Gasphase des *plumes* massenspektrometrisch nachweisen lassen. Dies eröffnet möglicherweise die Aussicht auf eine alternative bzw., ausgehend von der MALDI, modifizierte Analysenmethode.

2 Einführung

Das Themengebiet, in das die Untersuchungen dieser Arbeit eingebettet sind, ist bereits ausführlich in wissenschaftlichen Arbeiten beschrieben worden. Es soll an dieser Stelle daher auf die allgemeinen Zusammenhänge mit Referenz auf die entsprechende Literatur nur kurz eingegangen werden, um anschließend die speziellen Aspekte zu diskutieren, die mit der Problemstellung der vorliegenden Arbeit eng verbunden sind.

Obwohl die MALDI-MS seit Jahren eine wichtige und erfolgreiche Rolle in der Bioanalytik spielt, müssen wesentliche physikalische und chemische Prozesse bei der Desorption und Ionisation als noch immer weitgehend unverstanden angesehen werden. Untersuchungen insbesondere für die IR-MALDI-MS zur Ionenausbeute in Abhängigkeit von Laserbestrahlung¹ und Laserstrahlfläche^[Fel00], zur Laserwellenlänge und Impulsdauer^[Men00] sowie zur Geschwindigkeitsverteilung^[Ber00] basieren auf der Detektion von Ionen, sind also in das massenspektrometrische Verfahren eingebettet. Eine getrennte Untersuchung von Desorption und Ionisation ist so nicht möglich. Erst seit kurzem und derzeit noch vereinzelt werden auch für die IR-MALDI Ansätze realisiert, mit denen dies möglich ist.^[Roh02]

2.1 Biomakromoleküle

In Organismen kommen Moleküle unterschiedlichster Größe vor. Der Begriff des Makromoleküls ist nicht streng definiert. Im allgemeinen sind damit Strukturen gemeint, die wesentlich mehr als 10^2 Atome besitzen. Zwei der wichtigsten Gruppen von Makromolekülen sind die aus Aminosäuren aufgebauten Proteine² und die aus Nukleotiden aufgebauten Nukleinsäuren³ (NA). In beiden Fällen handelt es sich in der Regel um unverzweigte Polymere, die aus einem definierten Satz unterschiedlicher Monomereinheiten aufgebaut sind; so gibt es 21 Aminosäuren und vier Nukleotide⁴. Letztere liegen entweder als Ribonukleotide vor, die die Ribonukleinsäure (RNA) bilden, oder als Desoxyribonukleotide, die die Desoxyribonukleinsäure (DNA) bilden. Die Aminosäuren der Proteine sind über die Peptid-(Säureamid)-Gruppen verkettet, die Nukleinsäuren über Phosphodiesterbindungen. Eine mechanische oder thermische Belastung der Moleküle kann zur Fragmentierung der Moleküle bzw. Ionen führen. Solche Fragmentierungen sind für die Nukleinsäuren besonders ausgeprägt und limitieren hier unter anderem drastisch den zugänglichen Massenbereich. Dabei kommt es häufig neben Basenabspaltungen zu einem Bruch des Rückgrates. Die entstehenden Fragmentionen werden nach der von McLuckey^[McL92] eingeführten Nomenklatur bezeichnet. Eine eingehende Diskussion zur Problematik der Analyse von Nukleinsäuren durch die MALDI-MS findet sich in der entsprechenden Literatur.^[Gro00]

2.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie umfaßt alle Techniken, bei denen eine zeitliche oder räumliche Separation von Molekülionen nach deren Verhältnis von Masse zu Ladung durch elektrische und/oder magnetische Felder stattfindet. Differenziert werden die verschiedenen Verfahren anhand des Desorptions- und Ionenbildungsprozesses und der Technik der Massenseparation. Da es in der vorliegenden Arbeit um ein sehr spezielles Gebiet der Massenspektrometrie im Bereich der Bioanalytik geht, sollen im folgenden nur die hierfür relevanten Aspekte angesprochen werden.

¹ Bestrahlung H , auch Fluenz genannt; $[H]=\text{Jm}^{-2}$

² bei Massen unter 5000u wird auch von Peptiden gesprochen

³ englisch: *nucleic acid*

⁴ ungeachtet der Heterogenität bezüglich T und U

2.2.1 Aufbau eines Massenspektrometers

Klassisch läßt sich jedes Massenspektrometer in drei funktionelle Abschnitte unterteilen: die Ionenquelle, den Massenanalysator und den Detektor.

In der Ionenquelle werden die Analytmoleküle aus der kondensierten Phase desorbiert oder abgedampft und ionisiert. Die Ionen werden dem Analysator zugeführt, der sie nach dem Quotienten ihrer Masse und ihrer Ladung diskriminiert. Ein Detektor erlaubt den Nachweis der Ionen.

Ionenquellen

Grundvoraussetzung für die Analyse einzelner Moleküle ist deren Isolation aus dem Teilchenverband, also der Transfer aus der kondensierten in die Gasphase (Desorption) bzw. in das umgebende Vakuum. Desweiteren ist es notwendig, den Molekülen gleichzeitig oder anschließend eine elektrische Ladung aufzuprägen (Ionisation), um eine Vermessung im Gerät zu ermöglichen.

Die Methoden zur Desorption und Ionisation haben in den letzten 30 Jahren eine rasante Entwicklung erfahren. Die Herausforderung bestand darin, Techniken zu entwickeln, deren Desorptions- und Ionisationsprozesse zu einer so geringen inneren Anregung der Moleküle führen, daß sie nicht fragmentieren.

Den Durchbruch hinsichtlich einer sensitiven Analyse biologischer Makromoleküle mit Massen von mehreren hunderttausend atomaren Masseneinheiten ($>100\text{ku}$) gelang jedoch erst mit der Einführung der Elektrospraymassenspektrometrie (ESI-MS)^[Whi85, Fen89] und der Matrix-unterstützten Laserdesorptions-/Ionisationsmassenspektrometrie (MALDI-MS)^[Kar85, Kar87, Kar88]. Letztere wird in Abschnitt 2.2.3 detaillierter beschrieben, da sie für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde.

Massenanalysatoren

Eine ganze Reihe von Techniken erlaubt die Untersuchung der Masse großer Biomoleküle; allen gemein ist der Ansatz über die Wechselwirkung mit deren elektrischen Ladung. Es ist somit stets nicht die Molekülmasse direkt, sondern der Quotient aus Masse durch Ladung (m/Z) experimentell zugänglich.

Sektorfeldgeräte differenzieren die Ionen anhand der unterschiedlichen Flugbahnen, die diese in abwechselnden statischen elektrischen und magnetischen Feldern beschreiben. Diese Geräte werden heute immer seltener verwendet, da der Aufbau sperrig und die Sensitivität und der zugängliche Massenbereich im Gegensatz zu anderen Analysatoren gering ist.

In Quadrupolmassenspektrometern werden Ionen einer selektierten Masse in elektrischen Wechselfeldern auf stabilen Bahnen gehalten. Die Geräte werden ihrer Geometrie nach in Quadrupolmassenfilter und Ionenfallen (*ion traps*) unterteilt.^[Pau90, Coo91] Bei der Ionen-cyclotronresonanz-Massenspektrometrie (ICR-MS) wird ausgenutzt, daß der Kreisbahnradius eines Ions im Magnetfeld von m/Z abhängig ist. Die rotierenden Ionen erzeugen in einem Detektor ein kreisfrequenzabhängiges Induktionssignal. Nach einer Fouriertransformation ergibt sich ein Spektrum aller vorliegenden Ionen. Die Flugzeitmassenspektrometrie wurde in den für diese Arbeit ausgeführten Experimenten eingesetzt. Sie wird daher im folgenden Abschnitt ausführlicher beschrieben.

Prinzip der Flugzeitmassenspektrometrie

Die Flugzeitmassenspektrometrie (*time-of-flight mass spectrometry* - TOF-MS)^[Wol93] nutzt die Tatsache, daß sich für Ionen mit unterschiedlichen Massen, die in einem elektrischen Feld die gleiche kinetische Energie erhalten, die resultierenden Impulse bzw. die Geschwindigkeiten unterscheiden.

Das ionisierte Analytmolekül wird in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die kinetische Energie beträgt nach Verlassen des Feldes $W_{\text{kin}} = ZeU = \frac{1}{2}mv^2$ (Anzahl Z der Elementarladungen e , elektrische Spannungsdifferenz U , Masse m , Geschwindigkeit v des Moleküls). Es ergibt sich für das Verhältnis von Masse zu Ladung

$$\frac{m}{Z} = 2eUv^{-2}. \quad (1)$$

Die Ladungszahl Z läßt sich mit geeigneten Verfahren ermitteln oder abschätzen. Mit Kenntnis der Spannungsdifferenz U ist die Molekülgeschwindigkeit v , die ein Ion nach Verlassen des elektrischen Feldes hat, demzufolge in erster Näherung ein Maß für seine Masse.

Einfacher als die Geschwindigkeit läßt sich die Flugzeit in einer hinter der Beschleunigungsstrecke liegenden feldfreien Flugstrecke messen. Aus Gleichung (1) ergibt sich für eine feste feldfreie Strecke s die allgemeine Flugzeitgleichung $m = 2ZeUs^{-2}t^2$. Da die Geräteparameter U und s in der Regel nicht hinreichend genau bestimmt werden können, wird die Flugzeitgleichung in erster Näherung in der allgemeinen Form

$$\frac{m}{Z} = (A + B \cdot t)^2 \quad (2)$$

bzw. äquivalent

$$t = C + D\sqrt{\frac{m}{Z}} \quad (3)$$

angegeben. Die Gerätekonstanten A und B bzw. C und D werden in der Praxis durch eine Kalibrierung mit Ionen bestimmt, deren m/Z -Wert bekannt ist.

Detektoren

Für den Nachweis von Ionen am Abschluß der feldfreien Flugstrecke werden unterschiedliche Detektorsysteme verwendet; der für diese Arbeit eingesetzte ist ein Sekundärionenvervielfacher (SEV)⁵. Er beruht auf dem Prinzip, die durch den Einschlag der Ionen auf der Detektoroberfläche freigewordenen Elektronen in einem elektrischen Potential zu beschleunigen und in einer Kaskade bei Auftreffen auf weitere Flächen zu verstärken (Elektronenlawine). Der SEV trennt die Elektronenkaskaden räumlich durch separat aufgebaute Dynoden. Jede Dynode erzeugt eine Sekundärelektronenvervielfachung.^[Sch91]

In der MALDI-MS zeigt sich, daß mit zunehmender Masse der Analytmoleküle (kritisch ab ca. $1 \cdot 10^4 u$ und üblichen Beschleunigungsspannungen von $\leq 20 kV$) die im SEV erzeugten Sekundärelektronen und damit die resultierenden Ionensignale stark abnehmen. Die Einführung einer der ersten Dynode des SEV vorangestellten Konversionsdynode (KD)^[Spe90, Kau92] löst das Problem. Sie zeichnet sich durch einen größeren Abstand und eine besondere Isolierung gegen den SEV aus und kann somit mit einer wesentlich höheren Spannungsdifferenz zur nachfolgenden Dynode betrieben werden. Dies hat wiederum zur Folge, daß die beim Auftreffen des Analytions entstehenden, kleinen ($\leq 100 u$) Sekundärionen (Konversion von Primär- zu Sekundärionen) hinreichend beschleunigt werden, um ihrerseits eine Elektronenlawine an der ersten Dynode des SEV auszulösen. Wegen der Laufzeitdispersion der Sekundärionen (Molekülfragmente) unterschiedlicher Masse nimmt die Zeitauflösung des Detektors jedoch bei Verwendung einer KD signifikant ab.

⁵ englisch: *secondary electron multiplier* (SEM)

2.2.2 Schema eines Flugzeitmassenspektrometers

Die folgende Abbildung zeigt schematisch den typischen Aufbau eines Flugzeitmassenspektrometers, wie es auch für die MALDI-massenspektrometrischen Untersuchungen dieser Arbeit verwendet wurde.

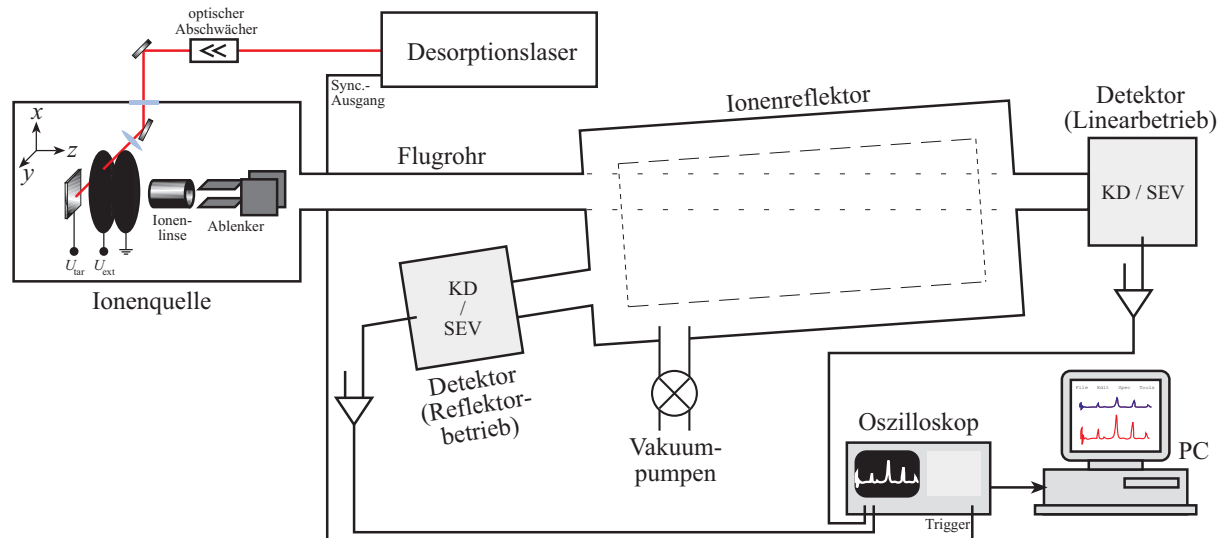


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines Flugzeitmassenspektrometers für Linear- und Reflektorbetrieb mit einer MALDI-Ionenquelle

Die Kopplung der TOF-MS mit dem MALDI-Verfahren bietet sich an, da für die Bestimmung der Flugzeit ein definierter Startzeitpunkt der Ionen erforderlich ist, der bei der MALDI durch die Desorption mit dem gepulsten Laser gegeben ist. Ein durch einen Strahlteiler ausgekoppelter Laserstrahlreflex erzeugt in einem Detektor ein Signal, das den Triggerzeitpunkt für einen Transientenrekorder darstellt.

Ionenquelle, Massenanalysator, Reflektor (falls vorhanden) und Detektor befinden sich in einem geschlossenen System, das typisch auf einen Druck von 10^{-6} hPa bis 10^{-9} hPa evakuiert wird.

Der Laserstrahl wird durch ein für die jeweilige Wellenlänge geeignetes Fenster eingekoppelt und durch eine Linse auf den Metallprobenträger (*target*) fokussiert; hierdurch wird der Desorptionsort definiert. Eine Spannungsdifferenz zwischen dem *target* und einem Extraktionsnetz führt zur Beschleunigung der Ionen. Durch Anwendung der sogenannten verzögerten Extraktion (*delayed extraction* - DE)^[Wil55, Bro95, Ves95], bei der zunächst für mehrere hundert Nanosekunden die Desorption im feldfreien Raum stattfindet und erst dann eine Hochspannung angelegt wird, kann die Startenergieverteilung der Ionen in erster Näherung kompensiert werden.

Die Ionenoptik fokussiert den divergenten Ionenstrahl auf den Detektor. Je nach Bauart der Ionenoptik nimmt die Signalausbeute unterschiedlich stark ab, wenn der Desorptionsort nicht auf der geometrischen Achse des Spektrometers liegt. Ionenquellen mit einer ausgedehnten Gitteroptik und einer langen Extraktionsstrecke verhalten sich z.B. unkritischer als solche mit einer offenen Optik (Blende mit kleinem Durchmesser) und kurzer Extraktionsstrecke, die in modernen kommerziellen Geräten häufig Verwendung finden.

Im Falle eines Reflektor-Gerätes, mit dem ebenfalls Startenergieverteilungen der Ionen kompensiert werden können, sorgt ein elektrisches Gegenfeld für eine Umkehrung der Ionenrichtung.^[Cot97] Bei den für die vorliegenden Messungen verwendeten Geräten ist der Reflektor unter einem Winkel von wenigen Grad zur einfallenden Ionenachse geneigt, so daß die reflektierten Ionen unter ca. 10° austreten; dies erlaubt eine zum Flugrohr räumlich unproblematische Anordnung des Reflektordetektors.

2.2.3 Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation

Obwohl die MALDI selbst bereits ein Spezialgebiet der Laserdesorption darstellt, würde eine vollständige Abhandlung aller Einsatzbereiche und Spezialanwendungen über den Rahmen dieser Arbeit weit hinausgehen. Es sei daher auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen.^[Leh96, Kar97, Cot97, Gro98] Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Zusammenhänge und Anwendungen der MALDI-MS vorgestellt.

Theoretischer Ansatz

Die MALDI-MS wurde Mitte der 1980er Jahre von *Karas* und *Hillenkamp* auf der Grundlage von Ergebnissen der Laserdesorptions-/Ionisationsmassenspektrometrie (LDI-MS)^[Pos78, Con80] entwickelt. Es wurde gezeigt, daß bei Bestrahlung eines Gemisches resonant absorbierender und nicht absorbierender Substanzen mit ultravioletttem Laserlicht beide Substanzgruppen als Ionen nachweisbar sind.^[Kar85] Das Prinzip der MALDI, das daraus abgeleitet wurde, besteht darin, thermisch instabile Makromoleküle in eine Matrix aus relativ kleinen, bei der eingesetzten Laserwellenlänge stark absorbierenden, organischen Molekülen einzubetten. Durch Laserbeschuß solcher Proben in der kondensierten Phase werden die Matrixmoleküle angeregt. Dies führt zu einer Desintegration der kondensierten Phase. Matrix- und Analytmoleküle werden dabei (teilweise) intakt in die Gasphase überführt (desorbiert) und ionisiert.

Die Hauptaufgabe der Matrix ist es somit, einen Großteil der Laserenergie zu absorbieren, die ansonsten zur thermischen Zerstörung des Analyten führen würde. Die Abkühlung durch adiabatische Expansion der Teilchenwolke unterstützt dies. Die Matrix soll darüber hinaus aber auch die intermolekulare Wechselwirkung zwischen den Analytmolekülen durch räumliche Separation reduzieren und die Ionisation der Analytmoleküle begünstigen.^[Kar87, Kar90]

Neben diesen Funktionen, die eine Matrix erfüllen muß, gibt es aber noch praktische Erwägungen für die Eignung eines Stoffes zur MALDI-Matrix. Da sich das Matrix-Analyt-Gemisch im Hochvakuum (10^{-7} hPa) befindet, muß die Matrix vakuumstabil sein. Außerdem soll sie gegenüber den Analytmolekülen chemisch inert sein.

Energiedeposition

Es existieren verschiedene Modelle zur Energiedeposition im MALDI-Prozeß. Die einfachste Vorstellung geht davon aus, daß die für die Desorption (und Ionisation) notwendige Energieeinkopplung in dem betroffenen Bestrahlungsbereich resonant über die lineare Matrixabsorption erfolgt. Bei sehr hohen Bestrahlungsstärken oder unvollständiger Bedeckung des Probenträgers kann eine nichtlineare Absorption oder eine Absorption durch das Substrat nicht ausgeschlossen werden; in der MALDI-MS ist bei typischen Bestrahlungsstärken von weniger als $10^7 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$ und einer sorgfältigen Präparation nicht damit zu rechnen.^[Ove92]

Für die UV-MALDI dienen die konjugierten π -Elektronensysteme aromatischer Matrices als Absorber. In der IR-MALDI erfolgt die Absorption über eine Vielzahl unterschiedlicher Molekülschwingungen. Dabei kommen als Matrixsubstanzen grundsätzlich sowohl aromatische als auch aliphatische organische Verbindungen in Frage.

Die für die IR-MALDI relevanten Valenz- und Deformationsschwingungsmoden werden im folgenden erläutert. Eine eingehende Beschreibung der Zusammenhänge kann in der Fachliteratur gefunden werden.^[Smi79, Gün96]

Ein komplexes Molekül aus N Atomen besitzt $n = 3N - 6$ Schwingungsfreiheitsgrade. Diese sogenannten Normal- oder Grundschrwingungen (Moden) setzen sich zusammen aus Valenz- oder Streckschwingungen, also Änderungen der mittleren intramolekularen Bindungslänge, und Deformations- oder Biegeschwingungen, bei denen sich der Bindungswinkel ändert.

Aufgrund der Anharmonizität (Nichtlinearität) der Schwingungspotentiale können auch Ober- und Kombinationsschwingungen auftreten. Grundvoraussetzung für die Absorption von infrarotem Licht ist das Vorhandensein eines Dipolmomentes im Molekül, welches mit dem elektrischen Feldvektor in Wechselwirkung treten kann (IR-Aktivität).

Die Schwingungsfrequenz eines Freiheitsgrades ist bestimmt durch die Masse und Bindungsstärke der beteiligten Atome. Die höchsten Schwingungsfrequenzen bei Valenzschwingungen liegen für Einfachbindungen zum Wasserstoffatom vor. Die in dieser Arbeit verwendeten IR-Lasersysteme (vorwiegend $\lambda = 2,936\mu\text{m}$) emittieren im Absorptionsbereich von OH-, NH- und CH-Valenzschwingungen.

Für eine eingehende Diskussion der Einflüsse intra- und intermolekularer Bindungen auf die spektroskopischen Eigenschaften von Matrices sei auf Untersuchungen zu diesem Thema verwiesen.^[Men00]

Vorausgesetzt, die Absorption in der Probe sei linear, so wird die Abschwächung der einfallenden Bestrahlung H_i in einem homogenen isotropen Medium der Dicke z durch das Lambert-Beer-Gesetz beschrieben:

$$H(z) = H_i \cdot e^{-\alpha z} \quad (1)$$

bzw. $H(z) = H_i \cdot 10^{-\varepsilon z}$.

α wird als natürlicher, ε als dekadischer Absorptionskoeffizient bezeichnet. Der molare dekadische Absorptionskoeffizient ergibt sich daraus mit der Stoffmengenkonzentration c_n zu $\varepsilon_n = \varepsilon \cdot c_n^{-1}$, und es gilt

$$\alpha = 2,303\varepsilon_n c_n. \quad (2)$$

Die Eindringtiefe δ der Laserstrahlung wird üblicherweise durch die Schichtdicke z definiert, bei der die einfallende Bestrahlung auf $\frac{1}{e}$ ihres Wertes ($\sim 37\%$) abgefallen ist. Aus Gleichung (1) folgt

$$\delta = \alpha^{-1}. \quad (3)$$

Die Volumenenergiedichte ξ ergibt sich mit der absorbierten Laserenergie ∂E pro Volumeneinheit ∂V in der Probe zu:

$$\xi = \frac{\partial E}{\partial V} = \alpha H_i e^{-\alpha z}. \quad (4)$$

Die molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten für IR-MALDI-typische Matrices liegen bei $5 \frac{1}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$ bis $200 \frac{1}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$. Mit Stoffmengenkonzentrationen von $10 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ bis $50 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$, typisch für reine Matrixpräparationen ohne Lösungsmittel oder Beimengungen, führt dies zu Eindringtiefen von $2\mu\text{m}$ bis $60\mu\text{m}$.^[Cra97a, Cra97b, Fel99]

Es sei an dieser Stelle angemerkt, daß die Absorptionskoeffizienten für die UV-MALDI mit Werten um $10^3 \frac{1}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$ zu einer bis zu drei Größenordnungen geringeren Eindringtiefe von 40nm bis 300nm führen.^[Kar87, All96]

Schwellbestrahlung

Da die Prozesse der MALDI-Massenspektrometrie neben anderen Parametern stark von der Bestrahlung abhängen, soll im folgenden näher auf die hiermit verbundenen Begriffe eingegangen werden.

In der Praxis der MALDI-MS findet sich gerätespezifisch typischerweise eine kritische Schwellbestrahlung H_0 (Ionennachweisschwelle), für die im resultierenden Massenspektrum

das Analytionensignal ein definiertes bzw. zu definierendes⁶ minimales Verhältnis zum Untergrundrauschen aufweist. Diese Schwelle ist geräteabhängig, d.h. viele Faktoren wie Ionenstrahldivergenz, Optimierung der Ionenachse, Empfindlichkeit der Detektoren, etc. beeinflussen die tatsächliche Schwellbestrahlung. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, daß es eine absolute physikalische Schwellbestrahlung entweder nicht gibt, oder daß sie deutlich unterhalb der gerätebedingten Schwelle liegt. Zum einen konnte mit Einzelionenzähl-experimenten⁷ in der UV-MALDI die Schwellbestrahlung um rund einen Faktor vier gegenüber konventioneller Ionendetektion (SEV und Transientenrekorder) gesenkt werden.^[Ens97] Zum anderen wird beim MALDI-Prozeß nur ein geringer (aber mit der Erkenntnis über die Zusammenhänge möglicherweise in naher Zukunft kontrolliert beeinflussbarer) Anteil der desorbierten Moleküle ionisiert.^[Dre95]

Elektronische Effekte (im Detektorsystem) steuern zum Rauschen in Massenspektren praktisch nicht bei. Der wesentliche Anteil wird durch sogenanntes chemisches Rauschen verursacht, das durch Ionensignale unspezifischer Fragmente und Molekülverbände (*cluster*) für praktisch alle Flugzeiten auftritt. Die Intensität chemischen Rauschens ist unter anderem matrixabhängig, so daß eine anzugebende Schwellbestrahlung nicht nur geräte- sondern auch probenabhängig ist.

Ungeachtet der Schwierigkeiten, die mit dem Begriff der Schwellbestrahlung verbunden sind, ist die Schwellbestrahlung ein Parameter, der für gängige MALDI-Massenspektrometer in der gleichen Größenordnung liegt. Dies ist auf die Abhängigkeit der Signalintensität I_{ion} von der Bestrahlung H zurückzuführen, die mit $I_{\text{ion}} = H^n$ empirisch etwa zu $n = 6$ bis $n = 9$ ermittelt wurde.^[Dre94, Fel99, Roh02] Obwohl unterschiedliche Massenspektrometer bezüglich der Ionen-transmission und Detektorempfindlichkeit variieren, genügt aufgrund der starken Abhängigkeit eine geringfügig andere Bestrahlungen, um diese Unterschiede zu kompensiert. Deshalb ergeben sich für die meisten MALDI-Geräte ähnliche Schwellbestrahlungen.

Zur Charakterisierung der Energiedeposition kann mit Gleichung (4) der Schwellbestrahlung ($H_i = H_0$) eine Volumenenergiedichte ξ_0 in einer oberflächennahen Schicht ($z \rightarrow 0$) zugeordnet werden:

$$\xi_0 = \left(\frac{E_{\text{abs}}}{V} \right)_0 = \alpha H_0 \quad (5)$$

Bei Schwellbestrahlung muß die deponierte Energie, genauer die Volumenenergiedichte in einer oberflächennahen Schicht ausreichen, um die Festkörperdesintegration (Desorption) einzuleiten.

Könnte für die typischerweise in der UV-MALDI genutzten Wellenlängen und Matrices noch eine in erster Näherung gute Korrelation zwischen Absorption und Schwellbestrahlung und somit eine resonante Energieeinkopplung bestätigt werden,^[Kar87, Hil90, Ali97, Che98, Hor99] so haben Studien für die IR-MALDI einen komplexeren Zusammenhang offenbart.^[Cra97a, Cra97b, Sad97, Cal97, She98, Dur98, Hes98, Pap99, Tal99, Men00]

Insbesondere im für die Messungen in der vorliegenden Arbeit relevanten Wellenlängenbereich um $3\mu\text{m}$, in dem die Absorption vieler Substanzen wie z.B. Wasser bekanntermaßen sehr temperaturabhängig ist, konnte kein einfacher Zusammenhang zwischen Schwellbestrahlung und Probenabsorption (gemessen bei niedrigen Bestrahlungsstärken) gefunden werden.

⁶ Üblicherweise wird in Anlehnung an $1/e$ ein Verhältnis von $1/3$ bzw. $3/1$ definiert.

⁷ time-to-digital-converter (TDC)

Energiedissipation

Bei der Relaxation der durch den Laserimpuls deponierten Energie auf die zur Verfügung stehenden Freiheitsgrade im Matrixkristallgitter wird für die UV-MALDI ein Exciton-Phonon-Kopplungsprozeß vermutet.^[Kar90] Dabei ist zusätzlich aufgrund des *Franck-Condon*-Prinzips die elektronische Anregung mit einer Anregung von rovibronischen Schwingungen verbunden. Eine elektronische Anregung kann bei der IR-MALDI ausgeschlossen werden; hier findet ausschließlich eine rovibronische Anregung statt.

Intramolekulare Schwingungszustände relaxieren innerhalb der Matrix über die große Anzahl niederenergetischer Vibrationsniveaus; dies geschieht normalerweise innerhalb von maximal wenigen Pikosekunden. Ob und inwieweit die deponierte Energie für die MALDI, also die Desorption und Ionisation zur Verfügung steht, wird durch die thermische und mechanische Energiedissipation aus dem bestrahlten Volumen während der Laserimpulsdauer bestimmt. In der IR-MALDI betragen thermische Relaxationszeiten wegen der hohen Eindringtiefe einigen Mikro- bis Millisekunden und sind damit mehrere Größenordnungen länger als typische Laserimpulsdauern von einigen zehn bis hundert Nanosekunden. In einer solchen Situation, die in der Literatur als *thermal confinement* bezeichnet wird, ist eine Energiedissipation durch Wärmeleitung demnach vernachlässigbar.

Praktische Anwendung

MALDI-Massenspektrometrie ist mit verschiedenen Laserwellenlängen (unter Verwendung jeweils geeigneter Matrices) möglich. Bedeutung haben Umsetzungen mit Lasern im Wellenlängenbereich von 193nm bis 400nm (UV-MALDI) und von 2µm bis 11µm (IR-MALDI) erlangt.

Für UV-MALDI sind als Matrixsubstanzen vor allem die für Peptid- und Proteinanalyse erfolgreiche 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB),^{Str91} die α-cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (α-HCCA)^[Bea92, Vor94] sowie die 3,5-Dimethoxy-4-Hydroxymethylbenzoesäure (Sinapinsäure)^[Bea89] gebräuchlich. Für die Nukleinsäureanalytik mit UV-MALDI wird sehr häufig die 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA)^[Wu93, Nor94] eingesetzt, weil sie zu einer deutlich verminderten Basenabspaltung führt.

In der IR-MALDI konnte neben den gängigen UV-Matrices und aliphatischen Carbonsäuren wie Bernsteinsäure oder Fumarsäure auch für Harnstoff eine gute Eignung in der Proteinanalytik festgestellt werden.^[Ove90, Ove91, Ove92]

Starke Fragmentierung führt in der UV-MALDI dazu, daß Nukleinsäuren von mehr als ca. 100 Basen nicht zugänglich sind. Für IR-MALDI mit der Flüssigmatrix Glycerol, die in Kombination mit verschiedenen Wellenlängen (2,79µm, 2,94µm und 10,6µm) gut eingesetzt werden kann,^[Ove92] wird eine besonders schonende Desorption/Ionisation instabiler Ionen berichtet.^[Ove92, Ber97] Diese ermöglichte es erstmals, große Nukleinsäuren intakt massenspektrometrisch nachzuweisen.^[Ber98]

Es sei noch angemerkt, daß zwar die physikalischen Randbedingungen bei den Desorptions- und Ionisationsprozessen der UV- und IR-MALDI teilweise sehr unterschiedlich sind, daß aber die resultierenden Massenspektren oftmals erstaunliche Übereinstimmungen aufweisen;^[Ove92, Cra97a, Niu98, Ber00] erst eine genauere Betrachtung offenbart die Unterschiede.

2.2.4 Infrarot-Nachionisationsmassenspektrometrie

Im Kontext der MALDI-MS sind Nachionisationsexperimente nicht neu. Jedoch wurden bisher nie zwei Infrarotlaser für die primäre Desorption (*plume*-Erzeugung) und die Nachionisation (*infrared post ionization* - IRPI) eingesetzt. In REMPI-Experimenten (*resonance enhanced multiphoton ionization*) kamen stets (durchstimmbare) UV-Laser für die Nachionisation zum Einsatz.^[Boe94] Die Ergebnisse waren, verglichen mit den Erfolgen der MALDI-

MS bei der Analyse biologischer Makromoleküle, enttäuschend. Der zugängliche Massenbereich ist auf etwa $3 \cdot 10^3$ u beschränkt.^[Sch92]

Ausgangspunkt und gleichzeitig wichtige Erkenntnis der IRPI ist, daß bei der MALDI ein *plume* auch dann bereits entsteht, wenn die Bestrahlung des Desorptionslasers unterhalb der Schwellbestrahlung liegt. Aus diesem *plume* können dann durch Bestrahlung mit einem zeitlich um den Betrag τ_{IRPI} verzögerten zweiten Laser Ionen erzeugt werden, die sich massenspektrometrisch nachweisen lassen.

Beim Einsatz von IR-Lasern ($E_{\text{photon}} = 0,44\text{eV}$ für $\lambda = 2,79\mu\text{m}$, $E_{\text{photon}} = 0,42\text{eV}$ für $\lambda = 2,94\mu\text{m}$) wäre eine Mehrphotonenabsorption notwendig, um die Ionisationsenergie eines Moleküls zu erreichen. Da eine Photoionisation aufgrund der geringen Bestrahlung bei der IRPI ausgeschlossen werden kann, liegt die Annahme nahe, daß mit dem zweiten IR-Laser eine zweite Desorption (und eine Ionisation) aus den kleinen Tröpfchen im expandierenden Glycerol-*plume* stattfindet, die der direkten Desorption aus einer Glycerol-Präparation entspricht.

Bei der *laser-induced liquid beam ion desorption* (LILBID)^[Kle96, Wat00, Wat00] werden mit einem gepulsten IR-Laser Ionen aus einem Flüssigkeitsstrahl erzeugt und dann massenspektrometrisch untersucht. Im Gegensatz zu LILBID bietet die IRPI-Methode das Potential, Proben orts aufgelöst zu untersuchen. Dies ist zum Beispiel für die Forschung an Zellen von großem Interesse. Darüber hinaus ist die benötigte Probenmenge dank des gepulsten Materialabtrages um mehrere Größenordnungen geringer als bei der LILBID, die einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom benötigt. Der Verbrauch an Probenmaterial ist in der Analytik häufig ein Kriterium für die Eignung einer Methode.

2.2.5 Desorptionsmodelle

Es existieren eine ganze Reihe von verschiedenen theoretischen Ansätzen, um den Desorptionsprozeß bei der Bestrahlung von Material durch Laser zu erklären. Die meisten stammen aus der Laser-Materialbearbeitung (Polymer- und Metalltechnik) und der chirurgischen Medizin (Gewebekoagulation und -ablation). Einige konnten auf die Bedingungen bei der MALDI übertragen werden und werden im folgenden kurz vorgestellt.

Photoablation

Bei diesem Modell^[Gar85, Sri86] wird davon ausgegangen, daß die absorbierte Laserstrahlung zu einem photochemischen Aufbrechen der Bindungen in einem Polymer führt. Die Zahl der Bindungsbrüche pro Volumeneinheit sei dabei proportional zur Anzahl der in diesem Volumen absorbierten Photonen und damit zur Volumenenergiedichte ξ .

Ablation findet statt, wenn die Zahl der Bindungsbrüche eine (materialabhängige) Schwelle überschreitet. Es werden dann sämtliche Bereiche der Probe abgetragen, in denen eine kritische Volumenenergiedichte ξ_k erreicht bzw. überschritten wird. Mithilfe des Lambert-Beer-Gesetzes ergibt sich die Abtragstiefe zu

$$z_{\text{abl}} = \frac{1}{\alpha} \ln \left(\frac{\alpha \cdot H_i}{\xi_k} \right).$$

Ist das Strahlprofil homogen, so ergibt sich das Volumen des insgesamt abgetragenen Materials durch Multiplikation mit der bestrahlten Fläche. Für Bestrahlungswerte

$$H_i < \frac{\xi_k}{\alpha}$$

wird z_{abl} negativ, liegt also außerhalb der Probe. Physikalisch bedeutet dies, daß kein Abtrag stattfindet. Das Photoablationsmodell sagt demnach die Existenz einer Schwellbestrahlung

$H_k = \xi_k \alpha^{-1}$ voraus.

Um das Modell auf die IR-MALDI anzuwenden, wird statt des photochemischen Aufbrechens der internen Molekülverbindungen ein durch die Energiedeposition bedingtes Auflösen der Bindungen zwischen den Matrixmolekülen angenommen. Dies führt zu einem explosionsartigen Auflösung der Probe.

Quasithermisches Modell

Das quasithermische Desorptionsmodell^[Dre94, Dre95] basiert auf ausschließlich thermodynamischen Überlegungen. Der Desorptionsprozeß wird als thermisch induzierte Sublimation betrachtet. Voraussetzung für diesen Ansatz ist eine definierte Temperatur. Wie bereits erwähnt findet sich bei der MALDI eine Ungleichverteilung der Energie auf die zur Verfügung stehenden Freiheitsgrade fern dem thermodynamischen Gleichgewicht. Das Modell geht jedoch davon aus, daß zumindest dem Festkörpergitter eine Quasitemperatur T_G zugeordnet werden kann.

Aus der Boltzmann-Verteilung der Energie über die verfügbaren Freiheitsgrade ergibt sich bei gegebener Temperatur T die Sublimationsrate

$$\frac{dN}{dt} = n \cdot k_0 \cdot A \cdot e^{\left(-\frac{\Delta H_S}{k_B T} \right)}.$$

mit der Oberflächenmoleküldichte n , der Ratenkonstante k_0 , der bestrahlten Fläche A , der Sublimationsenthalpie ΔH_S und der Boltzmann-Konstante k_B . Die Gleichung beschreibt einen Oberflächenprozeß im thermodynamischen Gleichgewicht. Für die Anwendung auf den MALDI-Prozeß muß die Gleichung modifiziert werden.

Für den gegebenen Fall einer gepulsten Anregung im Nanosekundenbereich kann die Gesamtzahl der freigegebenen Teilchen N als in erster Näherung proportional zur Desorptionsrate angenommen werden. Ein möglicher Einfluß der Größe der bestrahlten Fläche auf die Anzahl desorbierter Moleküle wird durch die Einführung einer empirischen Funktion $f(A)$ berücksichtigt. Die Sublimationsenthalpie wird durch eine (im thermodynamischen Ungleichgewicht nicht notwendigerweise damit identischen) Aktivierungsenergie E_{akt} ersetzt. Die Erhöhung der Gittertemperatur T_G durch die Bestrahlung wird durch einen Konversionskoeffizienten

$\eta = \frac{\Delta T_G}{H_0}$ beschrieben, in den der Absorptionskoeffizient α der Probe als linearer Faktor ein-

geht. Der Faktor P enthält die Ratenkonstante k_0 der Sublimation sowie den Entropiegewinn durch die Festkörperdesintegration.

Die Anzahl desorbierter Teilchen N ergibt sich somit bei gegebener initialer Probentemperatur T_0 zu

$$N = P \cdot f(A) \cdot e^{\left(-\frac{E_a}{k_B (T_0 + \eta \cdot H_0)} \right)}.$$

Entscheidend für das Modell ist unter anderem, daß der Desorptionsprozeß flächenunabhängig ist, d.h. sich die Funktion $f(A)$ mathematisch separieren läßt. Eine Schwellbestrahlung wird nicht vorhergesagt; vielmehr findet abhängig von Probentemperatur und Gasdruck auch ohne Bestrahlung eine Sublimation in das umgebende Vakuum statt.

Die für IR-Festkörpermatrizes ermittelten Schwellenenergiedichten (Energiedichten an der Schwellbestrahlung) liegen oft ein bis zwei Größenordnungen unterhalb der Sublimationsenthalpien der Matrizes.^[Cra97a, Cra97b] Deshalb ist ein thermisch eingeleiteter Desorptionsprozeß für die IR-MALDI eher unwahrscheinlich.

Spallationsmodell

Das ursprünglich für die Material- und Gewebeablation entwickelte Modell^[Din91] beschreibt den Desorptionsprozeß als mechanisches Aufbrechen der Probe durch laserinduzierte photoakustische Druckwellen. Um die analytische Beschreibung zu vereinfachen, wird das Modell eindimensional berechnet.

Die in der Probe durch Absorption deponierte Energie erzeugt eine Temperaturerhöhung. Diese führt zu einer thermischen Ausdehnung und somit zur Ausbildung eines Druckgradienten. Für eine instantane Energiedeposition ist der unmittelbar entstehende Druck in der Probentiefe z gegeben durch

$$\sigma(z) = \Gamma \cdot \xi(z) = \Gamma \cdot \alpha \cdot H_0 \cdot e^{-\alpha \cdot z}.$$

Der Grüneisen-Koeffizient Γ ist eine Materialkonstante, die sich aus dem Elastizitätsmodul, dem thermischen Expansionskoeffizient, der spezifischen Wärmekapazität und der Dichte zusammensetzt. Der Druckgradient ist offensichtlich an der Materialoberfläche maximal

$$\alpha(z \rightarrow 0) = \Gamma \cdot \alpha \cdot H_0$$

und fällt dann exponentiell ab. Im Anschluß läuft eine Druckwelle zum einen in das Probeninnere, zum anderen aber auch Richtung Probenoberfläche. Dort wird sie aufgrund der Randbedingungen an der Grenzfläche zwischen kondensierter Phase und Vakuum reflektiert. Dabei wird das Vorzeichen invertiert, so daß zusammen mit der ersten, von vornherein in das Probeninnere laufenden Druckwelle eine bipolare Druck- und Zugwelle die Probe durchläuft. Die Amplitude der tensalen Teilwelle wächst dabei zunächst mit der Probentiefe und fortschreitender Zeit an und erreicht in einer gewissen Tiefe z_m zu einer gewissen Zeit t_m ihr Maximum

$$\alpha_{\max}(z_m, t_m) = -\frac{1}{2} \Gamma \cdot \alpha \cdot H_0,$$

bevor sie aufgrund der Schallabsorption in der Probe langsam wieder abnimmt.

Eine realistische Betrachtung der idealisierten Annahme, daß die Energie in einem unendlich kurzen Laserimpuls in der Probe deponiert wird, führt zu einem zeitlichen Abstand zwischen kompressiver und tensaler Teilwelle, der in erster Näherung der Laserimpulsdauer τ_L entspricht. Ein effizienter Aufbau hoher Druckamplituden ist nur für Laserimpulsdauern möglich, die kurz gegen die akustische Durchlaufzeit τ_{ak} durch das Anregungsvolumen sind, da ein Teil der Druckwelle das Volumen sonst bereits vor Ende des Laserimpulses verläßt (akustische Relaxation).

Die akustische Durchlaufzeit kann mit der mittleren Eindringtiefe δ und der Schallgeschwindigkeit v zu $\tau_{ak} = \frac{\delta}{v} = \frac{1}{\alpha \cdot v}$ abgeschätzt werden.

Die Bedingung $\tau_L < \tau_{ak}$ wird allgemein als *acoustic confinement* oder *stress confinement* bezeichnet. Ist die Bedingung nicht erfüllt, so ist die Amplitude der Druckwelle entsprechend

vermindert. Der Dämpfungsfaktor $D = \frac{1 - e^{-q}}{q}$ mit $q = \frac{\tau_L}{\tau_{ak}}$ beschreibt den Einfluß der

akustischen Relaxation mathematisch und es ergibt sich die maximall erreichbare Amplitude der tensalen Teilwelle für eine endliche Laserimpulsdauer zu

$$\sigma_{\max}(z_m, t_m) = -\frac{D}{2} \Gamma \cdot \alpha \cdot H_0.$$

Übersteigt die Zugspannung der tensalen Teilwelle die Zerreißfestigkeit der Probe, so kommt es zu makroskopischen Brüchen und zum plötzlichen Abtrag ganzer Probenschichten (Spallation). Der tatsächliche Materialabtrag ist nicht analytisch zugänglich. Wegen der zur

Einleitung der Spallation notwendigen Überschreitung der Zerreißfestigkeit sagt dieses Modell allerdings qualitativ die Existenz einer Desorptionsschwelle voraus.

Das Spallationsmodell läßt sich auf die MALDI-Bedingungen übertragen.^[Cra97a, Cra97b]

Insbesondere in Bezug auf die IR-MALDI scheint dies vielversprechend, denn wegen der im Gegensatz zur UV-MALDI hohen Eindringtiefen liegt hier teilweise nicht nur *thermal confinement*, sondern auch *stress confinement* vor.

Breathing-Sphere-Modell

Dieses Modell liegt aktuellen molekulardynamischen Computersimulationen zugrunde, die Einblicke in die mikroskopischen Mechanismen des Desorptionsprozesses eröffnen.^[Zhi99, Zhi00]

Jedes einzelne Molekül in der kondensierten Phase wird durch eine Kugel repräsentiert, die sich im Potential der übrigen Moleküle befindet. Sämtliche internen Freiheitsgrade eines Moleküls werden zu einem einzigen Freiheitsgrad, dem variablen Kugeldurchmesser (*breathing sphere*) zusammengefaßt.

Obwohl es diese Vereinfachung immerhin gestattet, die Moleküldynamik von derzeit etwa 10^6 Molekülen in vernünftiger Zeit zu berechnen, sind die sich daraus ergebenden Volumina ($10 \cdot 10 \cdot 100 \text{ nm}^3$) und möglichen Zeiträume (wenige Nanosekunden) sehr eingeschränkt. Die Verallgemeinerung des engen Simulationsvolumens auf den bei der MALDI vorliegenden eindimensionalen Fall (Laserdurchmesser $\gg$ Eindringtiefe) gelingt durch Einführung periodischer Randbedingungen an den seitlichen Grenzflächen des Volumens.

Die Energiedeposition durch den Laser wird durch eine Anregung einzelner zufällig gewählter Moleküle simuliert. Die Wahrscheinlichkeit der Anregung ist dabei gemäß dem Lambert-Beer-Gesetz exponentiell von der Probentiefe abhängig.

2.3 Hochgeschwindigkeitsphotographie

Um den Desorptionsprozeß und den jeweiligen möglichen Einfluß seiner Phasen auf die Massenspektrometrie besser zu verstehen, kann eine photographische Analyse wichtige Hinweise geben. Da der Prozeß sehr schnell abläuft und eine nur geringe räumliche Ausdehnung hat, reicht eine konventionelle Kamera mit mechanischem Verschuß und herkömmlichem Objektiv nicht aus.

Der *plume*, der sich nach Bestrahlung durch den Desorptionslaser über der Probenoberfläche entwickelt, wurde mithilfe eines im Rahmen der Dissertation speziell angefertigten Aufbaues abgebildet. Hierbei wurde die Emission eines zweiten gepulsten Lasers, der als Beleuchtungsquelle fungierte, mit dem Desorptionslaser synchronisiert bzw. relativ dazu kontrolliert ausgelöst. Das Bild, das durch das vom *plume* gestreute Licht entstand, wurde über eine Optik zehnfach vergrößert mit einer ebenfalls zeitlich korrelierten digitalen Kamera aufgenommen.

2.3.1 Zeitkorrelation

Zunächst erzeugt der Impuls des Desorptionslasers einen für die IR-MALDI-MS typischen *plume*. Anschließend soll nach einer definierten Zeit der Beleuchtungslaser eine Momentaufnahme erzeugen. Dabei wird ein Zeitfenster entsprechend der Impulsdauer dieses Lasers erzeugt. Letztere ist durch das Lasersystem zu einigen Nanosekunden vorgegeben.

Die Zeitdifferenz zwischen den Lasern soll wegen der zu erwartenden Ausdehnungsgeschwindigkeit des *plumes* von $10^2 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ bis $10^3 \frac{\text{m}}{\text{s}}$ im Nano- bis Mikrosekundenbereich liegen.

Dies wird bewerkstelligt, indem die Laser zeitlich korreliert angesteuert werden.

Besonders bei der Untersuchung des *plumes* in den ersten Nanosekunden nach dem Desorptionslaserimpuls ist die zeitliche Abweichung zwischen den Lasern von Schuß zu Schuß so groß, daß die Zeitdifferenz experimentell bestimmt werden muß. Hierzu eignen sich z.B. Photodioden, die den Verlauf der Laseremissionen dokumentieren.

Die Signale der Photodioden müssen wegen der extrem kurzen involvierten Zeiten bzw. Anstiegsflanken mit einem sehr schnellen Transientenrekorder aufgenommen werden. Typischerweise wird eine solche Aufgabe heute mit digitalen Ringspeicheroszilloskopen bewältigt, die eine große analoge Bandbreite bzw. Abtastrate aufweisen. Die Bandbreite bzw. Abtastrate charakterisiert das digitale Oszilloskop bezüglich seines Verhaltens auf der Zeitachse. Die analoge Bandbreite $\Delta\omega$ eines Gerätes gibt den Bereich übertragbarer Frequenzen an und ist definiert als die Differenz von oberer und unterer Grenzfrequenz: $\Delta\omega = \omega_{\text{go}} - \omega_{\text{gu}}$. Für Transientenrekorder u.ä. ist die Bandbreite gleich der oberen Grenzfrequenz. Bei der digitalen Verarbeitung eines Signals mit der oberen Grenzfrequenz ω_{go} ergibt sich mit dem Abtasttheorem⁸, daß die Abtastrate $\omega_a > 2 \cdot \omega_{\text{go}}$ sein muß, um die zeitliche Form des Signals vollständig zu erfassen.

2.3.2 Optisches Auflösungsvermögen und Abbildungsfehler

Das optische Auflösungsvermögen wird durch verschiedene Faktoren beschränkt. Abbildungsfehler der Linsen (sphärische Aberration, Koma, Astigmatismus, Petzval-Bildfeldkrümmung und Verzerrung) spielen für den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Aufbau keine Rolle. Beschränkend ist hier die beugungsbedingte Auflösungsgrenze x_{min} , die sich durch den Radius der Aperturblende des abbildenden Systems ergibt. Mit der Brennweite f , der Wellenlänge λ und dem halben Öffnungswinkel φ ist $x_{\text{min}} = 1,22 \frac{f \cdot \lambda}{r} \approx \frac{\lambda}{\sin \varphi}$.

Die Auflösungsgrenze ist offensichtlich direkt von der Wellenlänge abhängig. Für die Wahl der Beleuchtungswellenlänge im praktischen Experiment muß zudem der Empfindlichkeitsverlauf von digitalen Kamerasensoren berücksichtigt werden. Sie sind für infrarotes und rotes Licht sehr sensitiv, während im blauen bis hin zum ultravioletten Spektralbereich die Empfindlichkeit stark abnimmt.

2.3.3 Streuung

Im folgenden werden die für die Arbeit relevanten Streumechanismen umrissen. Für eine tiefgehende Herleitung sei auf die Fachliteratur verwiesen.^[Bor32, Bor59, Ger93, Hec01]

Trifft ein Photon auf ein Atom, so werden die Elektronen des Atoms zu Schwingungen angeregt und es entsteht ein Dipolmoment mit der Schwingungsfrequenz der einfallenden Welle. Ohne Leistungsverlust (elastisch) erzeugt der Dipol ein emittierendes Photon, dessen Wellenvektor nicht identisch mit dem der einfallenden Welle sein muß. In der gesamten Ebene senkrecht zur Schwingung des Dipols ist die Intensität isotrop. Sie nimmt mit größerem Winkel zwischen Wellenvektor und Ebene ab. Entlang der Schwingungsrichtung des Dipols werden keine Photonen abgestrahlt.

Bei unpolarisiertem Licht, dargestellt durch zwei orthogonale Zustände, überlagern sich die Intensitätsverteilungen. Entlang der Vor- und Rückwärtsrichtung der ursprünglichen Welle addieren sich die Intensitäten beider Polarisationsrichtungen. Senkrecht dazu trägt jeweils nur eine Polarisationsrichtung bei. Abbildung 2.2 verdeutlicht den Zusammenhang. Abbildung 2.3 zeigt das resultierende Polardiagramm; die innere Kurve beschreibt die Intensitätsverteilung für in der Darstellungsebene polarisiertes, die äußere Kurve die für unpolarisiertes Licht. Der dargestellte Mechanismus wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet. Er gilt für Streuzentren, die kleiner als die Wellenlänge des Lichtes sind. Beim Übergang zu Partikelgrößen, die etwa der Wellenlänge entsprechen ($2r \cong \lambda$), wird die Symmetrie der Intensitätsverteilung zunehmend gestört. Dies wird als Mie-Streuung bezeichnet, deren Theorie den Durchmesser

⁸ auch Nyquist-Theorem genannt

und die Form des Streuzentrums berücksichtigt. Die Mie-Streuung verhält sich jedoch bezüglich der Experimente dieser Arbeit nicht maßgeblich anders als die Rayleigh-Streuung und soll daher nicht weiter beschrieben werden. Zu erwähnen ist jedoch, daß bei der Rayleigh-Strahlung der Streuquerschnitt wegen der Abhängigkeit von ω^4 für violettes Licht sechszehnfach größer als für rotes Licht ist. Bei der Mie-Streuung hängt der Streuquerschnitt nur schwach von der Frequenz ab.

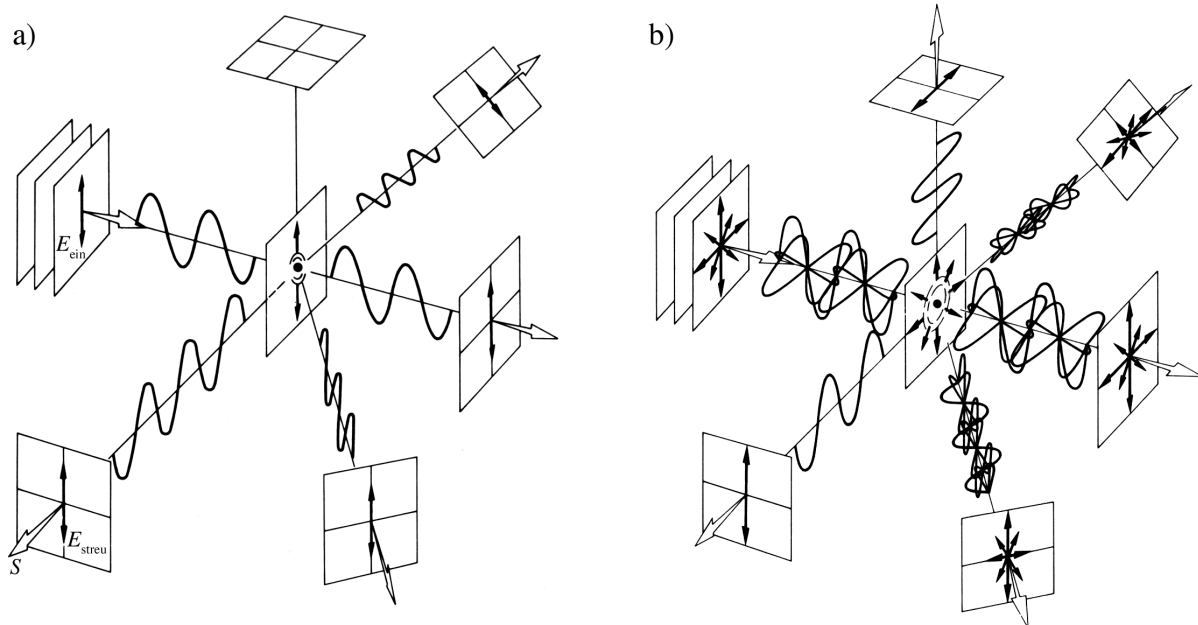


Abbildung 2.2: Rayleigh-Streuung von a) vertikal polarisiertem und b) unpolarisiertem Licht; einfallendes Licht (E_{ein}) von links, Streuzentrum (Molekül) in der Mitte; die Poynting-Vektoren S sind als weiße Pfeile eingezeichnet. [aus Hec01]

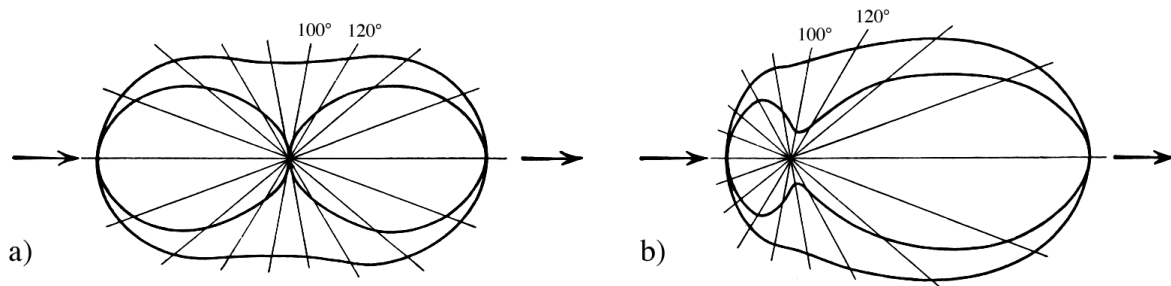


Abbildung 2.3: Winkelabhängige Intensitätsverteilung a) der Rayleigh- und b) der Mie-Streuung; einfallendes Licht von links. Die innere Kurve beschreibt die Intensitätsverteilung für in der Darstellungsebene polarisiertes, die äußere Kurve die für unpolarisiertes Licht. [aus Bor32]

Die elastische Streuung beschreibt eine Richtungsänderung des einfallenden Lichtes, ohne daß die Wellenlänge beeinflusst wird. Ist das Hindernis klein gegen die Wellenlänge, so entsteht vereinfacht gesehen eine Kugelwelle⁹. Erst für Objekte, die wesentlich größer als die Wellenlänge sind ($2r \gg 10\lambda$), führt das Zusammenwirken etlicher Huygens-Streuzentren dazu, daß ein Abbild der Objektform zu beobachten ist. Transmission, Reflektion und Brechung sind makroskopische Manifestationen von Streuvorgängen auf submikroskopischer Ebene an vielen beieinanderliegenden Atomen. Zur mittellenden Beschreibung eines Stoffes

⁹ Einstein gibt zu bedenken, daß „ausgesendete Strahlung in Form von Kugelwellen nicht existiert“.

wird die (wellenlängenabhängige) Brechzahl n eingeführt. Sie ist definiert als das Verhältnis der Geschwindigkeiten einer Welle im Vakuum und in Materie und ergibt sich aus der Dielektrizitätskonstante und der Permeabilität:

$$n \equiv \frac{c}{v} = \sqrt{\frac{\epsilon\mu}{\epsilon_0\mu_0}}.$$

Der Durchgang von Licht durch ein homogenes Medium ist eine ununterbrochene Folge von Streuvorgängen. Jeder einzelne Streuprozess bringt eine Phasenverschiebung in das Lichtfeld ein, die sich schließlich als Abweichung der Phasengeschwindigkeit des transmittierenden Strahls von der Vakuumlichtgeschwindigkeit bemerkbar macht und eine von eins verschiedene Brechzahl ergibt.

2.3.4 Dunkelfeldbeleuchtung

Mit einem optischen Aufbau können Objekte, deren Abmaße in der Größenordnung des verwendeten Beleuchtungslichtes oder darunter liegen, nicht aufgelöst werden. Das heißt aber nicht, daß sie sich überhaupt nicht nachweisen lassen. Das Streulicht (die Kugelwelle) mag nicht die eigentliche Form wiedergeben, deutet aber auf das Vorhandensein von Teilchen hin. Bei konventionellen Aufbauten wird dieses Streulicht allerdings von ungestreutem Licht (Beugung nullter Ordnung) überblendet. Die Dunkelfeldanordnung eliminiert das ungestreute Licht und ermöglicht so den Nachweis schwach streuender Teilchen. Für die theoretische Beschreibung der Dunkelfeldmethode sei auf die Fachliteratur verwiesen. ^[Men73, Stö88]

Die Abbildung 2.4 zeigt den schematischen Aufbau einer Dunkelfeldbeleuchtung mit einstufiger Abbildungsoptik, wie sie auch für die Experimente der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde.

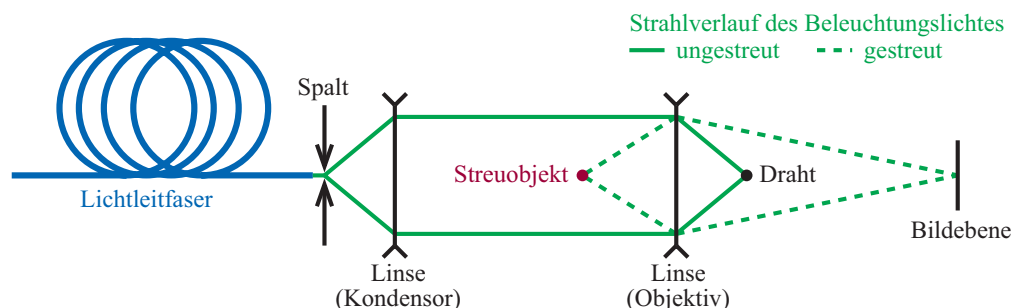


Abbildung 2.4: Schema der Dunkelfeld-Anordnung: der homogen ausgeleuchtete optische Spalt wird durch den Kondensor und das Objektiv auf den Draht abgebildet. Licht, das gestreut wird, passiert den Draht und wird vom Objektiv auf die Bildebene projiziert.

Ein vom Beleuchtungslaser homogen ausgeleuchteter optischer Spalt definierter Breite (einige Mikrometer) dient als Beleuchtungsquelle. Eine Kondensorlinse wird so angeordnet, daß sich der Spalt in ihrem Fokus befindet; somit wird das vom Spalt divergierende Licht zu einem Parallelstrahl gebündelt. Eine weitere Linse (Objektiv) bildet den optischen Spalt bzw. dessen Bild in ihre Fokusebene ab. Wird an dieser Position ein Hindernis (z.B. Feindraht) eingebracht, so wird sämtliches ungebeugtes Licht ausgeblendet.

Die Dunkelfeldbeleuchtung setzt eine homogene Ausleuchtung des Spaltes voraus; ist der Laser nicht in der Lage, diese Bedingung zu erfüllen, so läßt sich das Strahlprofil mit Hilfe einer geeigneten Lichtleiterfaser ausreichender Länge erzeugen. Ein Rechteckprofil läßt sich schon mit wenigen Metern Faser erzielen. Um jedoch die Kohärenz und somit Feinstrukturen zu eliminieren, wird eine wesentlich längere Faser erforderlich. Die benötigte Länge ergibt sich aus der Wellenlänge des Lichtes und der numerischen Apertur der Faser. ^[Pra87, Cam94]

Befindet sich ein Objekt im Parallelstrahl, das das Licht streut, so durchläuft das Licht unter einem anderen Winkel das Objektiv und wird nicht vom Draht ausgeblendet. Das Licht, das in aller Regel unter verschiedenen Winkeln vom Streuobjekt ausgeht, wird vom Objektiv gesammelt und verursacht in der Bildebene ein Bild des Streuobjektes.

Die Tatsache, daß im Gegensatz zur Hellfeldbeleuchtung das Primärlicht ausgeblendet wird, erlaubt auch den Nachweis von schwach streuenden oder sehr kleinen Objekten. Diese erscheinen als helle Flächen gegen dunklen Hintergrund. Streut ein Objekt sehr stark, d.h. wird das Licht außerhalb des Objektives bzw. dem Rand der Aperturblende vorbeigestreut, so erscheint dieses Objekt (zumindest in Bereichen großer Streuung) wiederum dunkel.

2.3.5 Kamera

Photographische Bildgewinnung ist auf die zeitliche Akkumulation des Lichtes angewiesen, um erstens ein signifikantes Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio* - S/N) zu erreichen und zweitens den dynamischen Bereich ausreichend groß anzulegen. Bei der Hochgeschwindigkeitsphotographie wird die Zeit, über die die Bildinformation integriert wird, so klein als möglich gewählt. Um dies zu erreichen, werden zum einen hochempfindliche photographische Medien verwendet, zum anderen wird mit wesentlich intensiveren Lichtquellen als in der herkömmlichen Photographie gearbeitet.

Die Experimente dieser Arbeit wurden mit einem digitalen Kamerasensor (CMOS-Chip) durchgeführt. Analoge Photographie (konventionelles Silberkornfilmmaterial) wird für solche Experimente zwar auch eingesetzt, hat aber den Nachteil, daß bestimmte Bildparameter erst nach dem Entwickeln in der Dunkelkammer zu kontrollieren sind. Besonders bei zeitlich und räumlich kritischen Objekten wie einer im Vakuum langsam verdampfenden Glycerolpräparation ist also die sekundenschnelle Kontrolle per digitaler Kamera und angeschlossenem Computer vorzuziehen. Nichtlineare Effekte, die bei der analogen Photographie mit Belichtungszeiten unter einer Mikrosekunde zu berücksichtigen sind (Schwarzschild-effekt, Kurzzeiteffekt)^[Mar88], treten bei elektronischen Bildsensoren nicht auf.

Ein wesentlicher Nachteil von digitalen Kameras liegt in der beschränkten Dynamik. Der dynamische Bereich charakterisiert ein Gerät allgemein bezüglich seines Verhaltens auf der Intensitätsachse.

Der dynamische Bereich d eines Gerätes gibt den Bereich an Meßwerten an, der verarbeitet werden kann. Er ist für ein analoges Signal definiert als Quotient aus maximalem Signalwert $I_{\max}$ und mittlerem Rauschwert I_{rausch} . Für (üblicherweise binäre) digitale Signale mit $I = 2^b$ ist zu beachten, daß nur auf Zweierpotenzen aufgerundete Werte (*bit*) angegeben werden können. Allgemein gilt

$$d = \frac{I_{\max}}{I_{\text{rausch}}} \Leftrightarrow b_d = b_{\max} - b_{\text{rausch}}.$$

Hochwertige (und teure) CCD-Chips werden aktiv gekühlt, um das elektronische Rauschen zu minimieren. Digitalkameras sind bezüglich der Ortsauflösung diskret (*pixel*¹⁰) und bezüglich der Intensität zunächst kontinuierlich; beim Auslesen des Sensorchips werden die Intensitäten jedoch ebenfalls digitalisiert. Es ist wichtig, daß bei der Digitalisierung des Intensitätssignals durch den in die Kamera eingebauten ADC (Analog-Digital-Wandler) ein angeglicher digitaler dynamischer Bereich gewählt wurde. Ist die analoge Dynamik gering, braucht auch die Speichertiefe nur gering angelegt zu werden (üblicherweise 8 *bit*).

CMOS-Kameras sind wesentlich preiswerter als vergleichbare CCD-Kameras. Dies liegt daran, daß CCDs bei der Fertigung hochspezialisierte und besonders reine Bedingungen

¹⁰ Akronym für *picture cell*

benötigen. CMOS-Chips hingegen können auf (modifizierten) herkömmlichen Halbleiterfertigungsstraßen produziert werden. Im Gegensatz zu CCDs, bei denen die *pixel* zeilenweise ausgelesen werden, ist bei CMOS-Sensoren jedes *pixel* direkt mit mehreren Transistoren kontaktiert und wird einzeln und direkt ausgelesen. Dadurch kann ein defektes *pixel* nicht (wie bei CCDs) eine ganze Zeile beeinträchtigen.

Ein Nachteil liegt jedoch in der verglichen mit CCDs geringeren Lichtempfindlichkeit von CMOS-Kameras. Da jedes *pixel* durch mindestens drei Transistoren kontaktiert ist und diese in einer Ebene mit den lichtsensitiven Flächen Platz benötigen, gibt es zwischen den Sensorfeldern ein Gitter von lichtunempfindlichen Bauteilen, auf denen ein Teil (ca. 40%) des nutzbaren Lichtes verloren geht.

Die technischen Spezifikationen der bei den Experimenten eingesetzten CMOS-Kamera werden in Abschnitt 3.4.4 besprochen.

3 Experimenteller Aufbau und Meßmethodik

3.1 MALDI-Präparation und Meßbedingungen

Die Details der Standardpräparationen für MALDI-Messungen wurden in vielen Dissertationen und Publikationen ausführlich dokumentiert. Auf eine grundlegende Beschreibung soll an dieser Stelle daher verzichtet und statt dessen auf die entsprechende Literatur verwiesen werden.^[Ber98, Fe199, Ber00, Men00]

Da die MALDI-MS unter Verwendung von infrarotemittierenden Lasern und hier speziell unter Einsatz von Glycerol als Matrix allerdings noch nicht sehr verbreitet ist, wird im folgenden kurz die Probenpräparation vorgestellt.

Glycerol, ein dreiwertiger Alkohol, ist eine farblose, klare Flüssigkeit. Wegen der Ungiftigkeit und Wasserlöslichkeit ist die Handhabung und spätere Entsorgung unproblematisch. Aufgrund der hohen Viskosität ist die volumenkorrekte Präparation allerdings mitunter etwas schwierig. Die Gängigkeit durch die Pipettenspitze kann durch leichtes Erwärmen begünstigt werden. Typischerweise werden 0,5 µl bis 1,0 µl Glycerol (wasserfrei, *p.a.*, Fluka) auf ein poliertes und gereinigtes Stahlsubstrat pipettiert. Anschließend wird ein gleiches Volumen der wässrigen Analytlösung (10^{-4} molar oder geringer konzentriert) hinzugefügt und mit der Pipettenspitze durch Rührbewegungen vorsichtig vermischt. Die Analytsubstanz *Cytochrome C (horse heart)* wurde von der Firma Sigma, der monoklonale Antikörper (*IgG, monoclonal antibody* - MAB) von Eurogentec, Serain, Belgien und das DNA-20mer von Interactiva, Ulm bezogen. Das DNA-430mer wurde im institutseigenen Genlabor hergestellt.

In der Praxis werden Analyte bzw. Analyt-Matrix-Gemische häufig mit Ionenaustauscherkügelchen (*beads*) versehen, um Kationenverunreinigungen zu eliminieren. Dieses Verfahren wurde bei den Experimenten dieser Arbeit nicht angewendet, da die im Glycerol-Analyt-Tropfen verbleibenden Kügelchen die Gesamtzeit verkürzen, während der die quasisphärische Tropfenform nicht gestört ist.

Zwar ist Glycerol als eine der wenigen Flüssigkeiten vakuumstabil, d.h. es hat bei Raumtemperatur einen geringen Dampfdruck; dennoch verdampft ein 1 µl-Tropfen im Hochvakuum (10^{-7} hPa) des Massenspektrometers innerhalb etwa einer Stunde. Dieser Prozeß kann verlangsamt werden, indem der Tropfen mitsamt dem *target* gekühlt wird. Eine dauerhafte und kontrollierte Kühlung (z.B. mit einem Peltier-Element) ist technisch problematisch, da sich das *target* in der Ionenquelle auf einem hohen elektrischen Potential (bis zu 20 kV) befindet. Zweckdienlicher ist ein einmaliges initiales Kühlen. Hierzu wird zunächst das Wasser aus der Präparation entfernt, indem sie für ca. 5 min in einem Vorvakuum (10^{-2} hPa) gelagert wird. Ein Auslassen dieses Schrittes bewirkt häufig das Zerreißen des Tropfens beim explosionsartigen Verdampfen des Wassers im Hochvakuum.

Anschließend wird das *target* für 10 s in flüssigen Stickstoff (-70°C) eingetaucht und dann unmittelbar (und bevor sich übermäßig Wasser auf der eiskalten Oberfläche niederschlagen kann) in das Vor- und anschließend in das Hauptvakuum des Massenspektrometers (10^{-7} hPa) überführt.

Für die Experimente zur Hochgeschwindigkeitsphotographie wurden Glyceroltropfen ohne Analyte auf ein schwarz eloxiertes Aluminiumsubstrat präpariert, da bei ungefärbten Metalloberflächen die Reflektion eine Bildgewinnung stören würde. Im weiteren Verlauf entsprach das Vorgehen (Abdampfen im Vorvakuum, Kühlung in flüssigem Stickstoff) jedoch demjenigen für die IR-MALDI-MS.

Für alle Experimente, sowohl der Hochgeschwindigkeitsphotographie als auch der Nachionisation wurden Bestrahlungen in der Größenordnung bzw. in unmittelbarer Nähe der für das verwendete TOF-Massenspektrometer geltenden Ionennachweisschwelle ($\sim 2700 \frac{\text{J}}{\text{m}^2}$) gewählt. Bei der Nachionisation wurde stets (und auch wiederholt während eines laufenden Experimentes) kontrolliert, daß sich die Desorptionslaserbestrahlung unterhalb der Ionennachweisgrenze befand, daß also der Desorptionslaser allein kein Ionensignal im Massenspektrum erzeugte.

3.2 Flugzeitmassenspektrometer

Das für die Experimente dieser Arbeit hauptsächlich eingesetzte Massenspektrometer (Bezeichnung: „MAUSY“ - „*Mass Analysis by an UV-Laser Desorption System*“) ^{Has92} wurden in vorangegangenen Dissertationen der Arbeitsgruppe ausführlich beschrieben. Es wird an dieser Stelle daher nur in den Punkten auf Details eingegangen, die für die Experimente besonders relevant sind.

Das MAUSY ist ein von Arbeitsgruppenmitgliedern selbst entwickeltes und gebautes Reflektor-Flugzeitmassenspektrometer, das mit einer MALDI-Ionenquelle ausgestattet ist, die durch ihre großzügige räumliche Dimensionierung den Einbau modifizierter Komponenten erlaubt. So war es möglich, sowohl Nachionisationsexperimente mit verschiedenen Lasern als auch Photoakustikexperimente (vgl. Kapitel 5.2) zu verwirklichen.

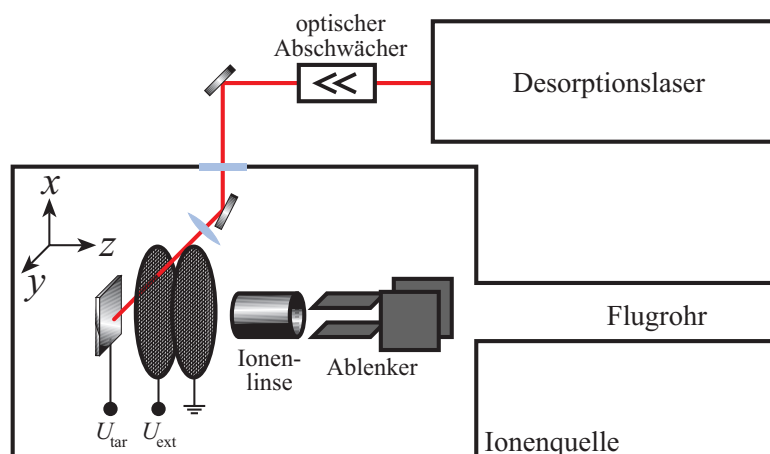


Abbildung 3.1: Schema der MALDI-Ionenquelle mit Netzionenoptik; das *target* wird mit Schrittmotoren in der x/y-Ebene verschoben; eine CCD-Kamera dient zur Beobachtung der Probe.

Die Ionenoptik besteht aus einem auf hohem elektrischen Potential ($U_{tar} = 16\text{kV}$ bis 20kV) befindlichen Stahl-*target*, einem für DE schaltbaren ($U_{DE} = U_{tar} - U_{ext}$, typisch 2kV) ersten Extraktionsnetz, das sich 6mm vom *target* entfernt befindet ($E = 250 \frac{\text{V}}{\text{mm}}$) und einem zweiten, auf Erdpotential liegenden Beschleunigungsnetz, das $12,5\text{mm}$ hinter dem ersten Extraktionsnetz liegt. Die gesamte Optik ist, verglichen mit modernen kommerziellen Geräten, groß dimensioniert. Dies hat den Vorteil, daß der Desorptionsort bezüglich der Ionenachse nicht allzu kritisch ist. So ist es möglich, die Laserstrahlen flexibel und dem Bedarf der jeweiligen Experimente angemessen zu justieren.

Falls nicht anders angegeben, wurden die Massenspektren, die in dieser Arbeit präsentiert werden, durch statische Spannungen in der Ionenquelle, also unter Verzicht auf DE gewonnen.

Als Detektor dient sowohl im Linear- als auch im Reflektorbetrieb ein SEV (EMI-Thorn 9643/A, Electron Tube Ltd., Ruislip, Middlesex, England) mit einer in einem Abstand von 10mm vorgeschalteten KD. Die Spannungsdifferenz zwischen KD und erster Dynode des SEV wurde in den Experimenten auf etwa 15kV eingestellt.

Die Flugzeitspektren werden mithilfe eines Transientenrekorders (LeCroy 9354A, 500MHz, 2GS/s, LeCroy Europe GmbH, Heidelberg) registriert und via Schnittstelle (IEEE GPIB) an einen PC übermittelt und mit einem speziellen Programm (Ulisses Version 7.31, Chips@Work, Bonn) ausgewertet.

3.2.1 Verwendete Lasersysteme

Es stehen neben einem optisch-parametrischen Oszillator verschiedene Erbium-Lasersysteme für die Desorption mit infrarotem Licht im MAUSY zur Verfügung. Dabei handelt es sich um blitzlampengepumpte, gütegeschaltete¹, infrarotemittierende Festkörperlaser. Bei ihnen werden unterschiedliche Wirtskristalle mit Er^{3+} dotiert; der Laser-Übergang findet zwischen den Energieniveaus der Erbium-Ionen statt. Das elektrische Feld des Wirtskristalls spaltet durch den Stark-Effekt die Energieniveaus auf.

Für die konventionelle MALDI-MS hat sich gezeigt, daß Laserstrahldurchmesser von deutlich weniger als etwa hundert Mikrometern keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern, sondern zur vermehrten Fragmentierung der Analytmoleküle führen. Typische Strahldurchmesser (Fokus auf *target* bzw. Probenoberfläche) liegen dementsprechend zwischen 100µm und 200µm. Der elliptische Fokus des unter 45° auf das target einfallenden

Desorptionslaserstrahls betrug in den Experimenten dieser Arbeit etwa 120·160µm².

Die Impulsenergien der Laserstrahlen wurden mit einem Energiemeter (RK3230/337, Laser Precision Corp., Yorkville, NY, USA), ggf. bei Überschreitung des Meßbereiches unter Verwendung kalibrierter Absorptionsfilter bestimmt.

Er:YSGG

Bei dem Wirtskristall handelt es sich um Yttrium-Scandium-Gallium-Granat ($\text{Y}_3(\text{ScGa})_5\text{O}_{12}$).

Die Emissionswellenlänge beträgt $\lambda = 2794\text{nm}$ und die Repetitionsrate 1Hz.

Das eingesetzte System (SEO 1-2-3, Schwartz-Electro-Optics, Orlando, FL, USA) wird durch eine im Brewsterwinkel zur optischen Achse angeordnete Lithiumniobat-Pockelszelle (Gsänger Optoelektronik, München) gütegeschaltet und weist eine Laserimpulsdauer von ~70ns und eine Impulsenergie von $9,5\text{mJ} \pm 0,2\text{mJ}$ auf. Der zeitliche Intensitätsverlauf des Impulses ist näherungsweise gaußförmig. Das räumliche Intensitätsprofil hat bei einer Fokussierung mit einer 300mm-Linse (langgestreckte Strahltaile, Spotdurchmesser 270µm) ebenfalls hinreichend ein Gaußprofil.

Er:YAG

Das Lasermedium ist ein mit Erbium hochdotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Kristall ($\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ dotiert mit ca. 40% Er^{3+}). Die Emissionswellenlänge beträgt $\lambda = 2936\text{nm}$.

Im eingesetzten System (Fin-YAG bzw. Biospec, Spektrum bzw. Bioptik, Berlin)² lassen sich Impulsdauern von minimal ~80ns erzeugen. Im praktischen Betrieb wird jedoch zugunsten einer Langlebigkeit der Komponenten und eines stabilen Betriebes typischerweise eine Impulsdauer von etwa 100ns bis 120ns eingestellt. Die Energiefluktuation von Schuß zu Schuß beträgt dann $\sigma = 8\%$ bei einer Impulsenergie von ca. 8mJ und einer Repetitionsrate von 2Hz.

Die externe Ansteuerung dieses Lasers, die sowohl für das Nachionisations- als auch Hochgeschwindigkeitsexperiment nötig wird, wird durch den Umstand vereinfacht, daß die Kondensatorbänke für die Blitzlampe keinen expliziten Ladebefehl benötigen. Die Bänke werden geladen und kontrolliert auf Ladung gehalten, sobald der vorangegangene Laserimpuls abgeschlossen ist. Hierdurch verkürzen sich die internen Laufzeiten erheblich.

¹ Güte eines Resonators = Resonanzfrequenz / Halbwertsbreite der Resonanzkurve

² Es handelt sich um mehrere Laser, die nach Firmenwechsel einen unterschiedlichen Namen tragen, jedoch eine baugleichen Resonator aufweisen.

OPO / OPA

Der optisch-parametrische Oszillator (OPO) besteht aus zwei Hauptkomponenten. Ein optisch gepumptes Medium wirkt als Verstärker für die optische Welle, und ein Resonator ermöglicht die Rückkopplung der verstärkten Welle. Der Unterschied zu einem Laser besteht vor allem darin, daß das Medium nicht in der Lage ist, Energie zu speichern. Dem Verstärkungsprozeß liegt statt dessen ein instantaner Transfer von Energie zwischen den drei beteiligten Wellen mit dem nichtlinearen Medium als Kopplung zugrunde.

Durch optisch nichtlineare Kopplung, die klassisch betrachtet zur Modulation der elektrischen Polarisation im Medium führt, wird die Frequenz ω_p der Pumpwelle in zwei Wellen niedrigerer Frequenz ω_s (*signal wave*) und ω_i (*idler wave*) umgewandelt.³ Es verändert sich bei der Kopplung also ein Parameter (Polarisation) des Mediums; aus diesem Zusammenhang ist die Bezeichnung „parametrisch“ abgeleitet. Quantenmechanisch wird die Kopplung als Spaltung eines Pump-Photons in jeweils ein Signal- und ein Idler-Photon verstanden, wobei keine Energie im Medium verbleibt: $\omega_p = \omega_s + \omega_i$.

Bei der optisch-parametrischen Verstärkung (*optical parametric amplification* - OPA) werden in einem optisch nichtlinearen Kristall zwei Wellen gekoppelt (Differenzfrequenzmischung), so daß eine dritte Wellenlänge ω_i emittiert wird: $\omega_i = \omega_p - \omega_s$.

Durch Veränderung der Winkel zwischen den Kristallen und den Laserstrahlen ist es möglich, die emittierten Wellenlängen zu variieren (Durchstimmbarkeit). Diese Möglichkeit wurde jedoch in den Experimenten dieser Arbeit nicht genutzt. Statt dessen wurde der OPO so eingestellt, daß seine Emissionswellenlänge der des Er:YAG-Lasers entsprach.

Das vorliegende System (Mirage 3000B, Continuum, Santa Clara, CA, USA) wird mit einem gütegeschalteten Nd:YAG-Laser (Surelite II-10, Continuum, Santa Clara, CA, USA, $\lambda = 1064\text{nm}$, $\tau_L = 6\text{ns}$, $E_{\text{Impuls}} = 500\text{mJ}$) gepumpt. Die Fundamentalwelle wird frequenzverdoppelt, wobei naturgemäß jenseits des frequenzverdoppelnden Kristalls auch die Pumpwellenlänge noch vorhanden ist.

Aus der frequenzverdoppelten Pumpwelle wird mit Hilfe des OPO (KTP-Kristall) eine Signal- und eine Idlerwelle erzeugt. Die Idlerwelle des OPO wird in einem OPA (KTP-Kristall) mit der Fundamentalpumpwelle zu der für die Experimente dieser Arbeit benötigten Emissionswellenlänge (OPA ω_i) von $2936\text{nm} \pm 5\text{nm}$ gemischt.

Das räumliche und zeitliche Strahlprofil des vom OPO-System emittierten Impulses wird durch den Pumplaser vorgegeben: der Gaußstrahl hat eine zeitliche Impulsbreite von $\tau_L = 6\text{ns}$. Die Standardabweichung der Energiefluktuation der Einzelimpulse liegt bei $\sigma = 5\%$. Die Repetitionsrate von 10Hz darf für einen stabilen Betrieb wegen thermischer Effekte nicht signifikant unterschritten werden.

Für eine detaillierte Charakterisierung weiterer Eigenschaften des verwendeten OPO-Systems sei auf die Dissertation von C. Menzel verwiesen.^[Men00]

³ Die Bezeichnungen Pumpwelle, Signalwelle und Idlerwelle entsprechen in dieser Reihenfolge abnehmenden Energien.

3.3 Infrarot-Nachionisationsmassenspektrometrie

Die Messungen zur Nachionisation wurden am Gerät MAUSY durchgeführt. Es kamen verschiedene IR-Lasersysteme in unterschiedlicher Kombination zur Anwendung. Im einzelnen wurden folgende Konstellationen für die Experimente mit unterschiedlicher Zielsetzung umgesetzt:

Tabelle 1: Laserkombinationen für IRPI-Experimente

primärer Laser (Desorption)	sekundärer Laser (Nachionisation)
Er:YAG	Er:YSGG
Er:YAG	OPO
OPO	Er:YAG

Im Gegensatz zum primären Desorptionslaser (vgl. Abschnitt 3.2.1) soll der Strahldurchmesser des Nachionisationslaser so klein als möglich sein, um eine hohe Ortsauflösung bei der Untersuchung der *plume*-Dichte zu erreichen. Die Position (Entfernung von der Tropfenoberfläche) des Nachionisationslaserstrahls wurde mit der Linse L3 (vgl. Abbildung 3.4, Seite 27) eingestellt. Da sich die Linse hierzu außerhalb des Vakuums befand und daher mehr als 200mm vom Desorptionssort entfernt war, war es nötig, eine Teleskopoptik (L1 und L2) vorzuschalten. So konnte der gewünschte Laserstrahldurchmesser von unter 100µm erreicht werden.

Für die Vermessung des *plumes* in unmittelbarer Nähe der Tropfenoberfläche wurden für die Desorption und Nachionisation wechselseitig der Er:YAG-Laser und der OPO ausgewählt. So war es möglich, Unterschiede in der Frühphase der *plume*-Entwicklung abhängig von der Impulsdauer bei gleicher Bestrahlungswellenlänge zu untersuchen.

Der Er:YSGG-Laser mit seiner im Vergleich zu den beiden anderen Systemen hohen Impulsenergie ermöglichte als Nachionisationslaser die Erzeugung von Spektren aus *plume*-Bereichen in einer großen Entfernung, in der die beiden anderen Systeme als Nachionisationslaser keine Ionensignale mehr erzeugten.

3.3.1 Zeitkorrelation

Die Blitzlampen beider Laser müssen kontinuierlich mit ihrer jeweiligen Repetitionsrate zeitlich korreliert betrieben werden. Nach Betätigung eines Handtastschalters sollen beide Laser mit einem definierten (frei einstellbaren) zeitlichen Abstand emittieren; Doppelimpulse gilt es dabei zu vermeiden.

Der Er:YAG-Laser, der für die Experimente zur Verfügung stand, ist für eine Repetitionsrate von 2Hz optimiert. Bei der Kombination mit dem Er:YSGG-Laser wurden beide Systeme mit 1Hz betrieben.

Bei der Kombination mit dem OPO war es unmöglich, eines der beiden Systeme auf die jeweils andere Repetitionsrate einzustellen. Der Er:YAG-Laser kann nicht mit Raten über 2Hz betrieben werden (ein interner Tiefpaßfilter verhindert dies), während der OPO wegen der thermischen Stabilität mit 10Hz arbeiten muß. Ein 1:5-Teiler synchronisiert die Ansteuersignale für die beiden Blitzlampen.

Ein externer Pulsgenerator gibt 10Hz vor. Der OPO läßt sich über einen Sub-D-Steckverbinder extern ansteuern. Die Funktionen des Er:YAG-Lasers sind über BNC-Anschlüsse zugänglich. Die folgenden beiden Abbildungen verdeutlichen die Ansteuerung der beiden Laser und den zeitlichen Ablauf. Die jeweilige Funktion (primärer Desorptionslaser oder Nachionisationslaser) ist durch die Schaltung nicht *a priori* vorgegeben.

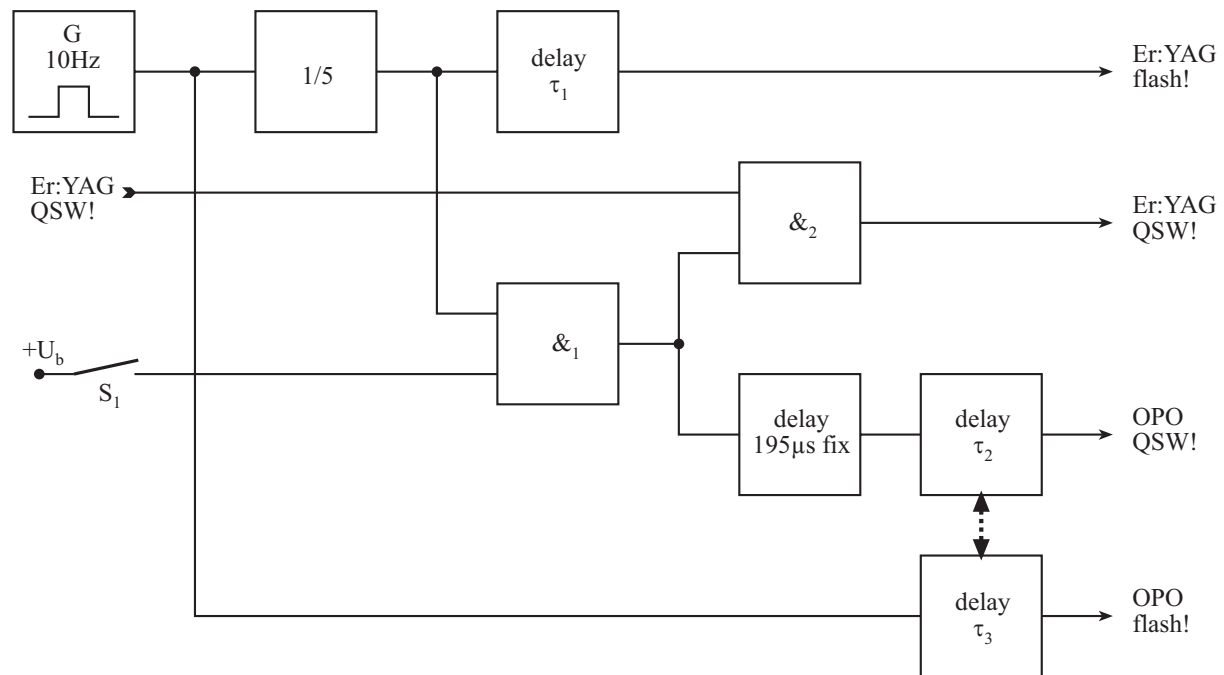


Abbildung 3.2: Schaltbild für das IRPI-Experiment (auf wesentliche Funktionseinheiten reduziert)

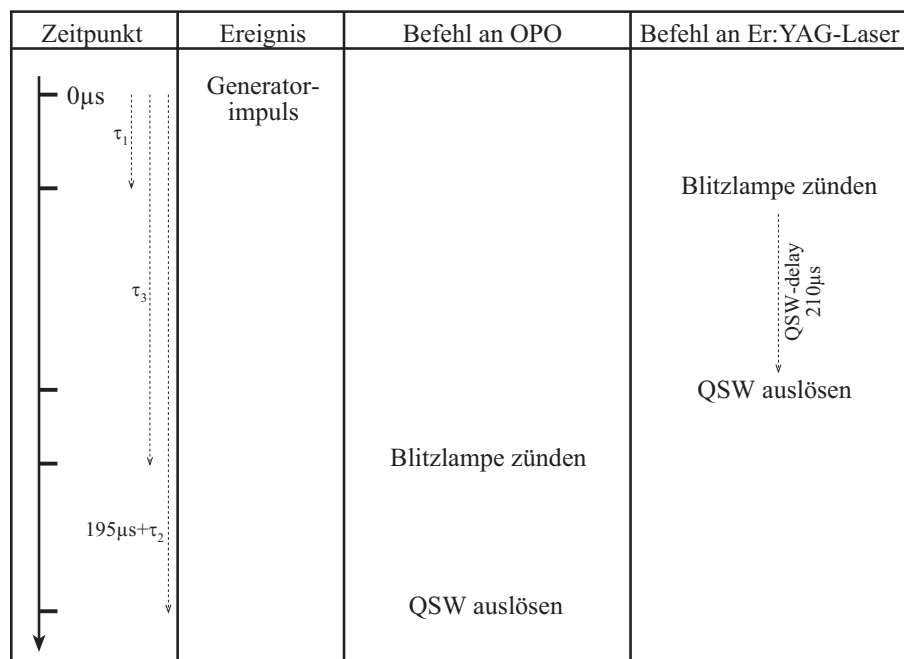


Abbildung 3.3: Zeitlaufdiagramm für das IRPI-Experiment (zeitliche Korrelation der beiden Laser). Da τ_1 unabhängig von den gekoppelten Verzögerungsgliedern τ_2 und τ_3 ist, kann die Emission des Er:YAG-Lasers („QSW auslösen“) zwanglos auch nach der des OPO stattfinden.

Das Signal des Impulsgenerators, das mit 10Hz die Blitzlampe des OPO treibt (*OPO flash!*), wird durch den Frequenzteiler auf 2Hz reduziert. Damit wird die Blitzlampe des Er:YAG-Lasers angesteuert (*Er:YAG flash!*).

Die Güteschaltungen beider Laser werden durch die Betätigung des Handtastschalter S_1 kontrolliert. Wird dieser geschlossen, so sorgt zunächst ein zwischengeschalteter Monoflop dafür, daß ein eventuelles mechanisches Prellen keine Auswirkungen auf die weitere Steuerung hat. Das vom Frequenzteiler kommende 2Hz-Signal wird mit dem des Schalters über das Und-Gatter 1 verknüpft. Der laserintern ablaufende QSW-Steuerkreis wurde

aufgetrennt, und der QSW-Befehl an die Pockels-Zelle (*Er:YAG QSW!*) wird über ein weiteres Und-Gatter 2 nur dann freigeschaltet, wenn S_1 geschlossen wurde. Das Und-Gatter 1 steuert außerdem die Güteschaltung für den OPO (*OPO QSW!*). Das Signal wird dazu um die gerätespezifische QSW-Zeit (195 μ s) verzögert.

Wenn die Verzögerung τ_1 so eingestellt wird, daß der OPO mehrere zehn Mikrosekunden vor dem Er-YAG-Laser emittiert, so kann die Verzögerung zwischen den beiden Lasern in den Versuchsreihen kontinuierlich durch die Dualverzögerungsschaltung τ_2/τ_3 gesteuert werden. Ein Zahnriemen verbindet mechanisch die Potentiometer von zwei konventionellen Schaltungen. Der mechanisch erzeugte Einstellfehler und die Hysterese sind wesentlich kleiner als die zeitlichen Abweichungen durch die Lasersysteme.

Die Zeitdifferenz τ_{IRPI} zwischen den beiden Laserimpulsen wird mit pyroelektrischen Detektoren (model 420, Eltec Instr., Daytona Beach, FL, USA; und ED200, GenTec, Kanada) kontrolliert. Als Startzeitpunkt der Laseremissionen wird jeweils der Wert des halben Maximums an der steigenden Flanke definiert. τ_{IRPI} ist durch die internen Abläufe der Lasersysteme großen Schwankungen (je nach Laserkombination bis zu $\sigma = 50 \mu$ s) unterworfen. Spektren aus Messungen mit einer Abweichung von mehr als 15% wurden bei der Erstellung von Summenspektren für die vorliegende Arbeit nicht berücksichtigt.

3.3.2 Laserstrahljustierung

Der primäre Desorptionslaser wird über die vorhandene Optik (L0) in das Massenspektrometer eingekoppelt. Mit Hilfe eines dielektrischen Abschwächers (Fa. Laseroptik, Garbsen) wird die Bestrahlung auf einen Wert unterhalb der Ionennachweisschwelle des Gerätes eingestellt.

Der Nachionisationslaser wird parallel zur *target*-Oberfläche eingekoppelt und mit einer Linse (L3) so fokussiert, daß sich die Strahltaile über der Präparation, also dem Glyceroltropfen befindet. Der Laserstrahl wird dann durch laterale Verschiebung der Linse L3 so verfahren, daß er die Ionenachse kreuzt, ohne den Tropfen zu berühren.

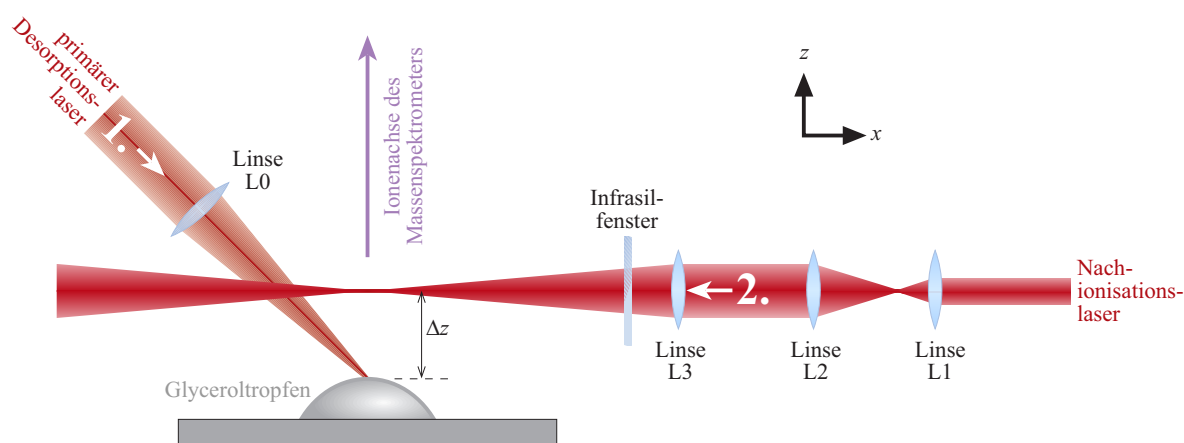


Abbildung 3.4: Skizze des Aufbaues zur Infrarot-Nachionisation: die Position des *targets* und primären Laserstrahls wurden von der konventionellen MALDI am betreffenden Gerät übernommen. Ein Nachionisationslaserstrahl wurde zusätzlich parallel zur *target*-Oberfläche eingekoppelt.

Der Abstand Δz zwischen Tropfenoberfläche und Nachionisationslaser wurde bestimmt, indem zunächst der Laserstrahl die Tropfenoberfläche gestreift hat. Dies zeigte sich einerseits durch Ionensignale im Massenspektrum, die bei abgeschaltetem Desorptionslaser vom Nachionisationslaser allein verursacht wurden. Andererseits ließ sich mit der Videokamera in der

Ionenquelle eine kurzzeitige leichte Verformung der Tropfenoberfläche beobachten, die durch die Bestrahlung und die resultierende Druckwelle verursacht wurde.

Anschließend wurde der Nachionisationslaserstrahl so weit in z -Richtung verfahren, daß er alleine (ohne primären Desorptionslaser) kein Ionensignal mehr erzeugte. Gleichzeitig war auch keine Störung der Tropfenoberfläche mehr zu beobachten. Diese Position wurde als $\Delta z = 0\mu\text{m}$ definiert. Ihre Ungenauigkeit wird maßgeblich durch den Laserstrahldurchmesser bestimmt.

Die Intensität des gaußförmigen Strahlprofils reicht sicher nicht nur in seinem Zentrum, den Nachionisationsprozeß auszulösen. Die radial abfallende Intensität stellt ein Problem bei der Definition des Strahldurchmessers dar. Ein Rechteckprofil, das mit einer Lichtleiterfaser erreicht werden kann, wäre ideal. Jedoch sind Fasern (Saphirfaser) für Wellenlängen um 2936nm teuer, schwierig zu schleifen und weisen eine niedrige Zerstörschwelle auf, so daß sie in der Praxis keine umfangreichen Versuchsreihen zulassen. Die in dieser Arbeit verwendete $\frac{1}{e^2}$ -Definition ist somit zu einem gewissen Grad willkürlich.

Der Durchmesser des Nachionisationslasers auf Höhe des Tropfens wurde mit thermoempfindlichem Papier bestimmt. Dabei wurde zunächst der Laser so abgeschwächt, daß eine Schwärzung gerade noch zu erkennen war. Die Bestrahlung wurde dann um den Faktor e^2 erhöht, und es wurde erneut das Thermopapier bestrahlt. Der Durchmesser der Schwärzung entspricht dann näherungsweise dem des Laserstrahls, an dessen Außenrand die Intensität auf $\frac{1}{e^2}$ abgefallen ist. Es ergab sich ein Durchmesser von $77\mu\text{m} \pm 6\mu\text{m}$ (Er:YAG-Laser) bzw. $85\mu\text{m} \pm 6\mu\text{m}$ (OPO) bei guter radialer Symmetrie.

Das Gerät MAUSY weist einen Abstand von 6mm zwischen *target*-Oberfläche und erstem Extraktionsgitter auf. Der Tropfen hat eine Höhe von maximal 1mm . Es ergeben sich sinnvolle Abstände zwischen Tropfenoberfläche und Nachionisationslaserstrahl von einigen zehn Mikrometern bis zu 2mm .

Da der Nachionisierungslaserstrahl auch parallel zur *target*-Oberfläche per Mikrometerschraube kontrolliert verfahren werden kann, ist eine Untersuchung der *plume*-Breite in einem vorgegebenen Abstand von der Tropfenoberfläche möglich.

3.4 Hochgeschwindigkeitsphotographie

Bei der photographischen Beobachtung des *plumes* kam als Beleuchtungsquelle ein gütegeschalteter (Pockels-Zelle) Nd:YAG-Laser (YG660S, Quantel International, Santa Clara, CA, USA) in einem ansonsten komplett abgedunkelten Labor zum Einsatz.

Der mit Neodym dotierte Wirtskristall dieses Lasersystems besteht aus Yttrium-Aluminium-Granat. Die Emissionswellenlänge beträgt $\lambda = 1064\text{nm}$, wurde aber für dieses Experiment mit einem KTP-Kristall frequenzverdoppelt (*second harmonic generation* - SHG). Ein Absorptionsfilter sorgte dafür, daß nur Licht mit einer Wellenlänge von 532nm ($E_{\text{Impuls}} = 50\text{mJ}$) emittiert wurde. Bei einer Repetitionsrate von 8Hz war die Ausgangsleistung zwar nicht maximal, jedoch für das Experiment ausreichend, da der Laserimpuls ohnehin stets erheblich abgeschwächt wurde, bevor er den *plume* beleuchtete.

Das Intensitätsprofil des Lasers ist inhomogen und zeigt lokale Maxima. Die Impulsdauer von 15ns (FWHM) stellt das Zeitfenster dar, mit dem die Momentaufnahme des *plumes* aufgenommen wurde.

Die Bilder wurden also mit monochromatischem grünen Licht erzeugt. Die gewählte Wellenlänge ist ein guter Kompromiß zwischen verschiedenen Einflüssen. Zum einen soll die Beleuchtungswellenlänge möglichst nicht im Bereich der Desorptionswellenlänge (2936nm) liegen, um eine optische Störung zu vermeiden (ein 532nm -Bandpaßfilter vor der Kamera

eliminierte Streulicht der Laserblitzlampen); zudem sind herkömmliche CCD- und CMOS-Kameras wegen ihrer unerwünschten Empfindlichkeit im Infraroten häufig mit einem Hochpaßfilter versehen, der für die Experimente hätte entfernt werden müssen. Zum anderen nimmt die Empfindlichkeit von CCD- und CMOS-Kameras im Bereich violetten und ultravioletten Lichtes rapide ab.

Das grüne Licht liegt hingegen im Bereich großer Empfindlichkeit der Kamera. Außerdem stellt diese Wellenlänge keine Probleme bei der Verwendung von Standardoptiken (Foto- und Mikroskopobjektiven) und von kostengünstigen optischen Fasern dar.

Weitere wellenlängenabhängige Aspekte (beugungsbedingte Auflösungsgrenze, Streuquerschnitt der Rayleigh-Streuung) hatten nur untergeordnete Bedeutung für das Experiment. Auch hier stellt eine Wellenlänge im mittleren sichtbaren Spektrum einen guten Kompromiß dar.



Abbildung 3.5: Experimenteller Aufbau zur Hochgeschwindigkeitsphotographie. Auf der Werkbank befindet sich links der Beleuchtungslaser und im Zentrum der Er:YAG-Desorptionslaser und die Vakuumversuchskammer. Das Kameramodul ist rechts auf der optischen Bank angeordnet. Detailaufnahmen finden sich in Abbildung 3.7, in Abbildung 3.11 und in Anhang A.

Für die Desorption, die der bei der MALDI so nahe als möglich kommen sollte, wurde eine eigene Vakuumkammer gebaut. Der Gasdruck von 10^{-6} hPa bis 10^{-7} hPa, die Präparation auf einem Metall-*target*, die vor dem Einschleusen durchgeführte Kühlung mit flüssigem Stickstoff sowie die eingestellte Bestrahlung von rund 2700 Jm^{-2} (OPO) bzw. 5000 Jm^{-2} (Er:YAG-Laser) durch den Desorptionslaser und dessen Fokusbereich auf der Probe entsprechen den Parametern, wie sie auch für die massenspektrometrischen Experimente eingesetzt wurden. Zur Desorption wurden wahlweise der Er:YAG-Laser und der OPO ($\lambda = 2936 \text{ nm}$) verwendet, die in Abschnitt 3.2.1 beschrieben sind.

Anders als im Massenspektrometer wird die Probe normal zur *target*-Oberfläche bestrahlt. Der Laserstrahldurchmesser wurde wiederum nach der $\frac{1}{e^2}$ -Definition am Desorptionsort vermessen und zu $108 \mu\text{m} \pm 10 \mu\text{m}$ (OPO) bzw. $131 \mu\text{m} \pm 10 \mu\text{m}$ (Er:YAG-Laser) bestimmt.

Auf ein elektrisches Beschleunigungsfeld wurde verzichtet, weil in der MALDI-Praxis durchgängig mit verzögerter Extraktion gearbeitet wird. Dabei sind DE-Zeiten von mehreren hundert Nanosekunden üblich, so daß Aufnahmen in feldfreier Umgebung für diese Zeiten typisch sind.

Ein weiterer Unterschied zu den meisten Massenspektrometern ist die Anordnung einer waagerechten *target*-Position. Während in Massenspektrometern die *targets* üblicherweise vertikal befestigt sind und die Ionenachse horizontal verläuft, bot sich beim Aufbau zur Hochgeschwindigkeitsphotographie aufgrund der diversen Laserstrahl- und Optikachsen ein flach auf dem Boden liegendes bzw. verschiebbar befestigtes *target* an. Die Gravitation ist bei den involvierten Geschwindigkeiten ($10^2 \frac{\text{m}}{\text{s}}$) und Zeiträumen (10^{-9} s bis 10^{-5} s) irrelevant.

Die Versuchsanordnung gestattet die Aufnahme eines Bildes pro Desorptionereignis. Diese Einschränkung ergibt sich vor allem aus der Repetitionsrate des Nd:YAG-Lasers.

3.4.1 Aufnahmegeometrie

90°-Anordnung

Der Strahl des Nd:YAG-Lasers wird zunächst mit einem Absorptionsfilter abgeschwächt und anschließend mit zwei (für 532nm unter 45° Reflektionswinkel) vergüteten Spiegeln unter 90° zur Achse der Kameraoptik in die Vakuumkammer (vergütetes BK7-Fenster) eingekoppelt. Eine Zylinderlinse (SiO_2 , $f = 208\text{mm}$) fokussiert das runde Strahlprofil zu einer vertikalen Linie (Breite $200\mu\text{m}$, Länge 7mm), die relativ zum Glycerol-Tropfen zentriert wurde. Das Objektiv und die Kamera sind für beide Aufnahmegeometrien identisch und werden in Abschnitt 3.4.3 und 3.4.4 erläutert.

Der Aufbau führt dazu, daß nur Streulicht aus einer Ebene (Schnitt) des *plumes* erzeugt wird. In Experimenten ohne die Zylinderlinse sind Partikel zu beobachten, die sich weit vor oder hinter der Gegenstandsebene der Kameraoptik befinden und somit unscharf abgebildet werden.

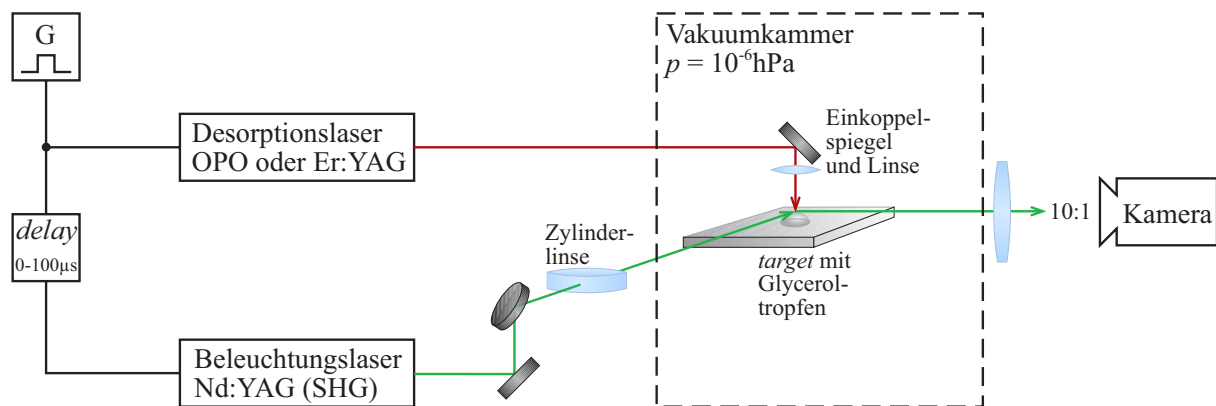


Abbildung 3.6: Skizze der 90°-Beleuchtungsanordnung für das photographische Experiment. Die Verzögerungselektronik ist stark simplifiziert dargestellt.

Das mit dieser Geometrie aufgenommene Licht stammt vornehmlich von Reflexionen an Oberflächen größerer Tröpfchen. Rayleigh-Streuung ist mit dieser Anordnung nur schwach nachweisbar, da bei der 90°-Anordnung und horizontal polarisiertem Licht senkrecht zur Einfallrichtung kein Streulicht auftritt.

Dunkelfeld-Anordnung

Der auf ca. $500\mu\text{J}$ abgeschwächte Impuls des Nd:YAG-Lasers wird mit einer 25mm-Linse in eine Quarzfaser (3M #FG-200-LAT, Kerndurchmesser $200\mu\text{m}$, NA 0,16, Länge 57m, 3M West Haven, CT, USA) eingekoppelt. Das Faserende ist unmittelbar vor einem optischen Spalt positioniert.

Der Spalt wurde aus zwei Rasierklingen (Wilkinson Standard, Schliffwinkel einphasig 12°) mit fester Spaltbreite gefertigt. Die Breite wurde in einem Beugungsexperiment zu $65\mu\text{m} \pm 5\mu\text{m}$ bestimmt. Der gesamte Spalt ist mit Mikrometerschrauben in x-, y- und z-Richtung verschieb- und um die z-Achse (Strahlrichtung) drehbar.

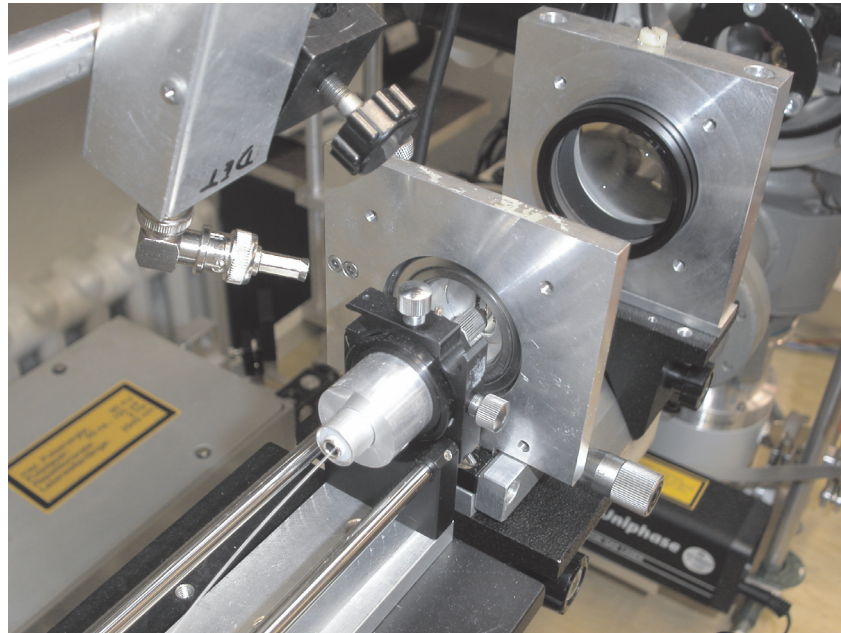


Abbildung 3.7: Optischer Spalt für die Dunkelfeld-Beleuchtung. Die optische Faser (unten links) leuchtet den aus zwei Rasierklingen aufgebauten Spalt aus. Das von dort divergierende Licht wird vom Kondensor (oben rechts) zu einem Parallelstrahl gebündelt und in die Versuchskammer eingekoppelt (oberster rechter Bildrand). Oben links ist die Photodiode zur Kontrolle der Laseremission zu sehen. Links im Hintergrund befindet sich der Er:YAG-Desorptionslaser.

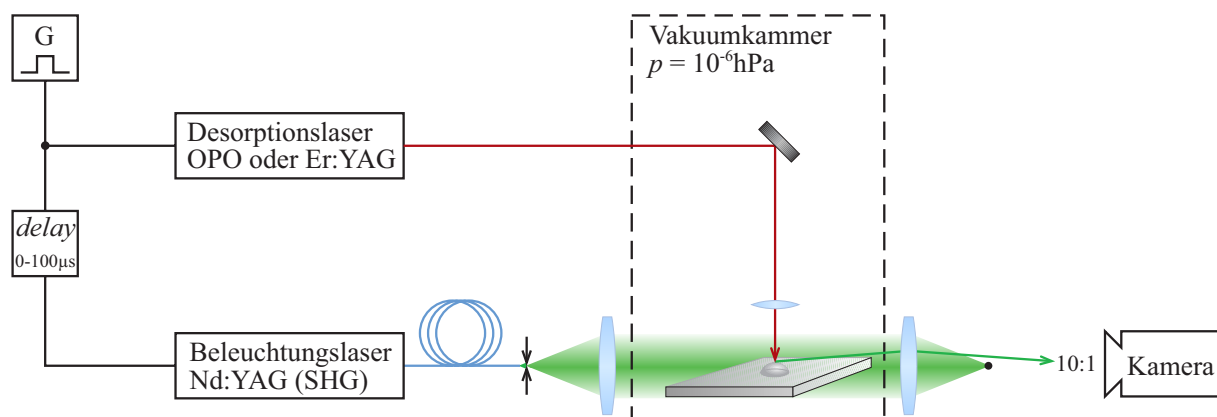


Abbildung 3.8: Skizze der Dunkelfeld-Beleuchtungsanordnung für das photographische Experiment. Die Verzögerungselektronik ist stark vereinfacht dargestellt. Eine Beschreibung des Dunkelfeldprinzips findet sich auf Seite 17.

Mit einem Kondensor (Mikroskopobjektiv Olympus DF Plan 1x, $\varnothing$ 49mm, ($f_{\text{eff}} = 111\text{mm}$), dessen Brennebene mit dem Spalt zusammenfällt, wird ein Parallelstrahl⁴ ($r = 20\text{mm}$) durch die mit BK7-Fenstern versehene Vakuum-Kammer geführt. Ein weiteres (bauähnliches) Mikroskopobjektiv (Spezifikation siehe Abschnitt 3.4.3), das auch gleichzeitig das Kameraobjektiv darstellt, ist jenseits der Kammer angeordnet (siehe Abbildung 3.8).

Ein Metalldraht (Kupferdraht $80\mu\text{m} \pm 1\mu\text{m}$ und $50\mu\text{m} \pm 1\mu\text{m}$; LS200179LC, Goodfellow, Huntington, UK), der sich in der Fokusebene des zweiten Objektivs befindet, wird so justiert, daß das Abbild des Spaltes genau auf den Draht fällt und somit ausgeblendet wird.

Bei plankonvexen Linsen erweist es sich zur Minimierung der Sphärischen Aberration als zweckdienlich, die plane Seite den größeren Strahlwinkeln zuzuwenden. Für die verwendeten Mikroskopobjektive gilt dies im übertragenen Sinne, da sie in der Konstruktion auf einer Seite für Objekte nahe der Brennebene optimiert sind (und somit auf der anderen für Parallelstrahlen). Die Objektive wurden bezüglich ihrer Vorzugsrichtung wie folgt im vorliegenden Experiment angeordnet: das erste Objektiv weist mit der Objektseite zum Spalt, das zweite zum Desorptionsort.

3.4.2 Zeitkorrelation

Es müssen mehrere Komponenten zeitlich aufeinander abgestimmt werden: nach Scharfschaltung der Kamera sollen der Desorptionslaser und anschließend der Beleuchtungslaser gezündet werden. Alle drei Geräte weisen jedoch sehr unterschiedliche interne Zeitkonstanten auf.

Es wird zunächst der Aufbau unter Verwendung des Er:YAG-Lasers als Desorptionslaser beschrieben. Bei dieser Konstellation ist wieder eine Anpassung der Repetitionsrate nötig, da er mit 2Hz arbeitet, während der Nd:YAG-Laser mit 8Hz betrieben wird. Der Aufbau gestaltet sich anders als der für die IRPI-Experimente (vgl. Abschnitt 3.3.1), da das Kameramodul 3ms Vorlaufzeit benötigt.

Die folgende Abbildung zeigt das Schema der Ansteuerung der beiden Laser sowie der CMOS-Kamera.

Die benutzergeführte Steuerung des Nd:YAG-Lasers erfolgt über ein externes Steuergerät, daß mit einem 9-poligen Sub-D-Stecker an den Laser angeschlossen ist. Der QSW kann extern über einen BNC-Stecker angesteuert werden. Da der Nd:YAG-Laser im Gegensatz zu allen anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lasern einen expliziten Ladebefehl für die Kondensatorbanken der Pumpblitzlampe benötigt, wird dieser Zyklus, der 19ms dauert, laserintern betrieben. Das 8Hz-Ausgangssignal (*end of charge* - EOC) dient dann als Puls-generator für die restliche Schaltung.

⁴ Kontrolle der Parallelität per Durchmesserbestimmung auf mehrere Meter

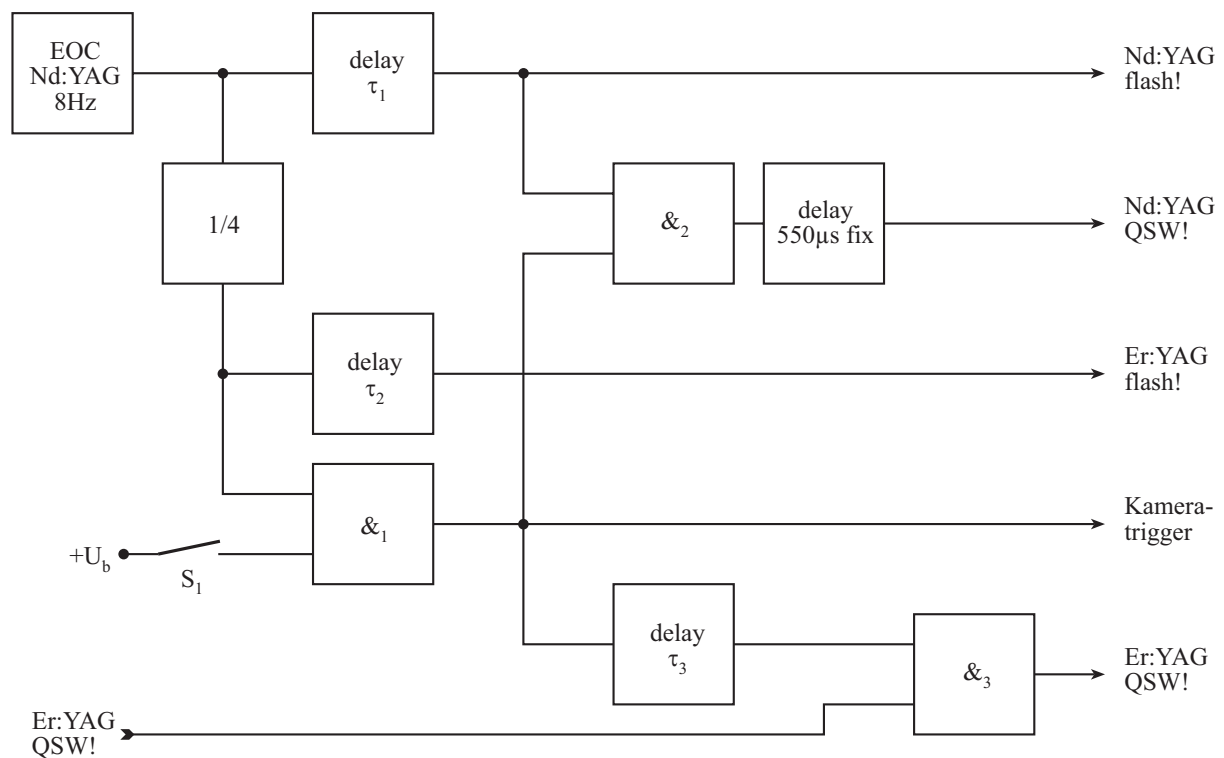


Abbildung 3.9: Schaltbild für das Experiment zur Hochgeschwindigkeitsphotographie (auf wesentliche Funktionseinheiten reduziert)

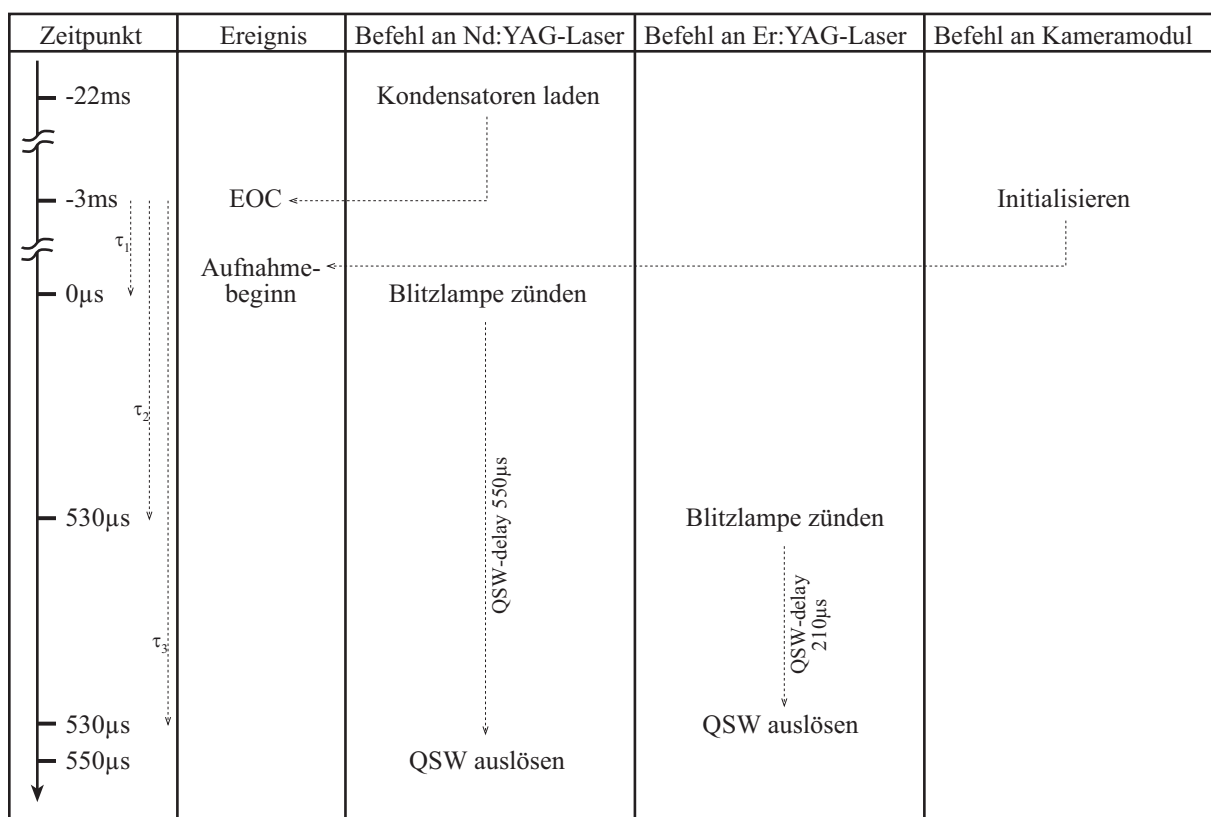


Abbildung 3.10: Zeitlaufdiagramm für das Experiment zur Hochgeschwindigkeitsphotographie

Das 8Hz-Signal wird an die Blitzlampe des Beleuchtungslasers geleitet (*Nd:YAG flash!*). Ein 1:4-Teiler erzeugt daraus das 2Hz-Signal, mit dem die Blitzlampe des Er:YAG-Lasers getrieben wird (*Er:YAG flash!*).

Wird der Tastschalter S_1 (mit nachgeschaltetem Monoflop) betätigt, so wird ein Impuls des 2Hz-Signals über das Und-Gatter 1 an das Und-Gatter 2 weitergeleitet, das wiederum den Befehl an die Güteschaltung des Beleuchtungslasers freischaltet (*Nd:YAG QSW!*). Hierzu wird das Signal um die gerätespezifische QSW-Zeit ($550\mu\text{s}$) verzögert.

Das vom Und-Gatter 1 erzeugte Signal wird außerdem an die Kamera gesendet und kontrolliert über Gatter 3 die laserinterne QSW-Steuerung des Er:YAG-Lasers (*Er:YAG QSW!*).

Da das CMOS-Kameramodul intern 3ms vom Triggerbefehl bis zur Bildakquisition benötigt, müssen die anderen Komponenten verzögert werden. Für den Beleuchtungslaser wird dies über τ_1 durchgeführt. Bei der Ansteuerung des Desorptionslasers (τ_3) addiert sich noch die QSW-Zeit des Nd:YAG-Lasers.

Mit τ_2 werden die beiden Laser synchronisiert. Die Zeitdifferenz τ_{ph} zwischen dem Desorptionslaserimpuls und dem Beleuchtungslaserimpuls, also der Augenblick der photographischen Aufnahme wird durch τ_3 eingestellt.

Bei dem Betrag von τ_3 handelt es sich um eine erhebliche Zeitspanne von mehr als 3,5ms. Andererseits ist eine ständige Feinabstimmung im Nanosekundenbereich mit möglichst geringer Zeitunschärfe nötig. Daher wurde τ_3 als eine Kombination aus zwei in Reihe geschaltete Verzögerungseinheiten aufgebaut: eine mit einem Schwingquarz getaktete Schaltung erzeugt eine lange Zeitkonstante (Millisekunden), während die Wahl der Zeitdifferenz zwischen den Impulsen mit einer konventionellen Schaltung (Monovibrator) und kontinuierlich einstellbarer Zeitspanne im Nano- bis Mikrosekundenbereich erfolgt. Der genaue Startzeitpunkt der CMOS-Kamera relativ zu den Lasern ist nicht kritisch, da die Kamera eine Mindestverschußzeit von 1ms hat und somit das Desorptionereignis auf jeden Fall in diese Zeitspanne fällt, wenn die Verzögerungszeiten richtig gewählt werden.

Wenn statt des Er:YAG-Lasers der OPO als Desorptionslaser genutzt wird, wird die Synchronisationselektronik modifiziert. Der Frequenzteiler entfällt, da die Laser mit der gleichen Repetitionsrate (10Hz) betrieben werden. Das QSW-Signal an den Nd:YAG-Laser muß verkürzt werden. Dies ist nötig, da bei 10Hz ohne eine Anpassung der Zeitkonstante Doppelimpulse bei der Emission des Nd:YAG-Lasers auftreten.

Die Pockels-Zelle des OPO (respektive dessen Pumplaser) wird direkt von τ_3 abgeleitet.

Die photographisch relevante Zeitdifferenz τ_{ph} , die zwischen Desorptionslaserimpuls und Beleuchtungslaserimpuls tatsächlich vorliegt, wird für jede Aufnahme individuell bestimmt. Hierzu dienen zwei Photodioden, die jeweils einen ausgekoppelten Teilstrahl der Laser registrieren. Herkömmliche Photodioden weisen insbesondere im infraroten Spektrum eine zu große Trägheit auf, um Zeitsignale im Nanosekundenbereich aufzulösen. Daher findet eine spezielle, sehr schnelle HgCdTe-Photodiode (Type R004-9, No. 5824, $R_v = 7\text{mVW}^{-1}$, $\tau = 1\text{ns}$, Radec, Polen) Verwendung.

Beide Dioden sind in einem etwa gleichen optischen Abstand zur Desorptionszone angebracht, so daß Laufzeitunterschiede nicht auftreten. Auch die Kabel (RG58) weisen die gleiche Länge auf.

Die Signale werden mit einem ebenfalls sehr schnellen Oszilloskop (LeCroy LC564, 1GHz, 4GS/s, LeCroy Europe GmbH, Heidelberg) aufgenommen. Als Startzeitpunkt wird der Wert des halben Maximums an der steigenden Flanke verstanden.

3.4.3 Abbildungseigenschaften

Die Optik für die Bildgewinnung besteht in beiden Beleuchtungsanordnungen aus einem Olympus DF Plapo 1X-2 ($\varnothing$ 49mm, $f_{\text{eff}} = 110\text{mm}$), einem Anastigmat, der auf einer in x- und y-Richtung feinjustierbaren Halterung befestigt ist. Das vom Objekt ausgehende Licht passiert zunächst ein für 532nm Wellenlänge vergütetes Fenster (BK7), das den evakuierten Bereich abgrenzt. Wegen des Abbildungsverhältnisses sind zur Justierung des Bildausschnittes Manipulationen am Kameraobjektiv effektiver als am Kameramodul. Es wurde bei der Einstellung darauf geachtet, daß durch laterale Verschiebung des Objektives nicht ein Teil des Strahlenganges vom Fensterrand verdeckt wird.

Theoretisch müßten bessere Ergebnisse bezüglich der Auflösung zu erreichen sein, wenn mit zwei Linsen (eine im Vakuum und eine außerhalb) dafür gesorgt wird, daß der Strahlengang beim Durchgang durch das Fenster parallel ist. Die Umsetzung scheiterte jedoch an der Verfügbarkeit zweier geeigneter (hochqualitativer) Objektive, von denen eines eine sehr kurze Bauform hätte aufweisen müssen. Außerdem zeigte ein Aufbau mit minderqualitativen Linsen, daß die Justierung in der Praxis dann sehr umständlich ist.

Objekt (*target* mit Glyceroltropfen), Objektiv und Kameramodul wurden so angeordnet, daß das Verhältnis von Bildweite und Gegenstandsweite etwa bei 10:1 lag, so daß auch die Transversalvergrößerung des Abbildungsmaßstabes dieses Verhältnis ergab.

Ein Plastikrohr (in Abbildung 3.5, Seite 29, nicht eingebaut) sorgt auf dem ca. 1,5m langen Strahlengang vom Objektiv zur Kamerahalterung dafür, daß kein Streulicht eindringen kann; obwohl der Raum abgedunkelt ist, erzeugen die Blitzlampen der Laser ggf. genug Streulicht, um ein Problem darzustellen. Ein 532nm-Bandpaßfilter eliminiert außerdem Licht, das nicht der Wellenlänge des Beleuchtungslasers entspricht. Das Filter ist wegen seines geringen Durchmessers unmittelbar (2cm) vor dem Sensorchip der CMOS-Kamera angeordnet. Das Objektiv stellt somit die Aperturblende dar.

Die beugungsbedingte Auflösungsgrenze des Systems ergibt sich theoretisch zu $x_{\text{min}} \approx 3,5\mu\text{m}$. In der Praxis konnte eine laterale Auflösung von $4\mu\text{m}$ bis $5\mu\text{m}$ erreicht werden, die mit einer Gitterplatte (Siemensscheibe) definierter Rasterweiten ermittelt wurde.

3.4.4 Bildakquisition und -nachbearbeitung

Für die Bildaufnahme wurde eine extern triggerbare, nicht aktiv gekühlte CMOS-Kamera (PixelINK PL-A633, Seriennummer 6063, Vitana Corp., Ottawa, Ontario, Kanada) eingesetzt, die über eine FireWire-Schnittstelle (IEEE 1394a) die Bilder auf einen PC überträgt. Die Sichtung und Speicherung sowie die Ansteuerung des Kamera-Moduls geschah mit einer eigens für diesen Zweck programmierten Applikation⁵. Die weitere Bildbearbeitung wurde mit Adobe Photoshop 4 bzw. 6 durchgeführt. Bei der Vermessung von Objekten und sonstigen quantitativen Auswertungen kam ImageJ (Version 1.27z, Wayne Rasband,⁶ *National Inst. of Health*, USA) zum Einsatz.

Das Kamera-Modul kann über einen eigens gefertigten Adapter an einen in drei Achsen schwenkbaren und drei Ebenen verschiebbaren Halter montiert werden, der auch das optische 532nm-Bandpaßfilter aufnimmt. Eine so umfangreiche freie Justage kann hilfreich sein, um Effekte wie die Koma zu eliminieren.

⁵ „JetShot“, siehe Anhang B

⁶ <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

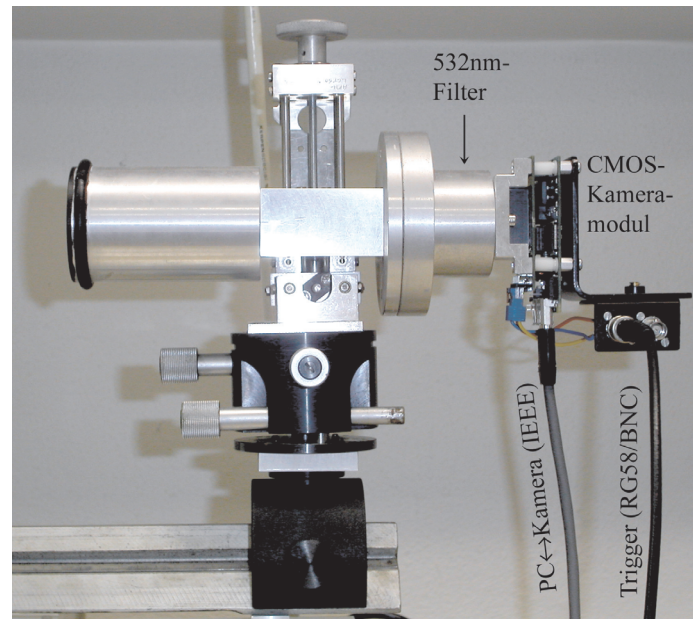


Abbildung 3.11: Seitenansicht des Kameramoduls (rechts) mit voll justierbarer Befestigung; die Versuchskammer befindet sich links außerhalb des Bildes. Auf den Flansch links wird das Rohr gesteckt, das zwischen der Kamera und dem Objektiv Streulicht abschirmt. Der optische Bandpaßfilter befindet sich im Gehäuse unmittelbar vor dem Kamerasensor.

Das Kameramodul PL-A633 verfügt über einen Sensorchip mit $1280 \cdot 1024$ *pixel* und einen 10-*bit-ADC*⁷. Jedes *pixel* wird demzufolge mit 1024 (=10 *bit*) Graustufen (*gray scale*) dargestellt. Das Rauschen in den aufgenommenen Bildern umfaßt zwei bis vier Graustufen, so daß die beiden niedrigstwertigen *bit* nicht signifikant sind.

Da vor allem im Papierdruck die Differenzierung so vieler Graustufen technisch scheitert, werden Graustufenbilder üblicherweise in Falschfarben dargestellt. Bei den Bildern dieser Arbeit wird ein Farbverlauf von schwarz über rot und gelb nach weiß verwendet („Schwarzkörperspektrum“).

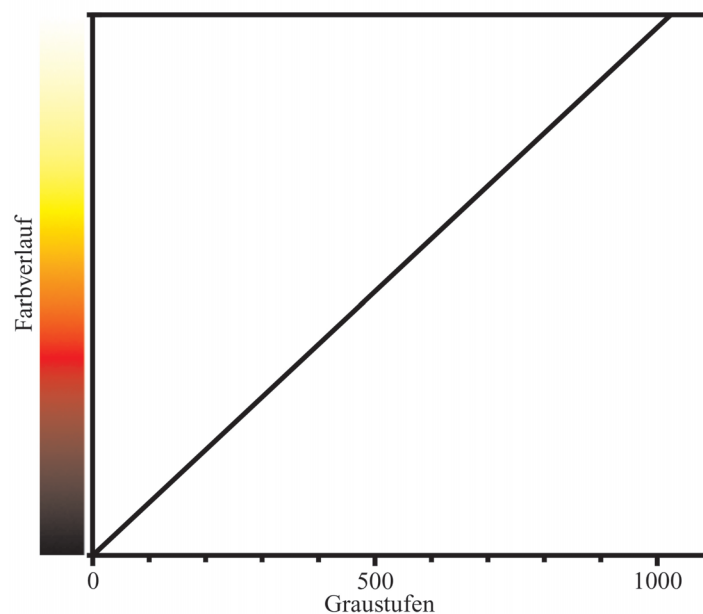


Abbildung 3.12: Falschfarbendarstellung der Hochgeschwindigkeitsaufnahmen: Spektrum des Farbdynamikverlaufs gegen 10 *bit* (1024) Graustufenwerte

⁷ Analog-Digital-Converter

Selbst bei einem solchen Vorgehen kann es besonders im obersten Intensitätsbereich passieren, daß Flächen gleichfarbig weiß und also übersteuert aussehen, die tatsächlich differenzierbar sind.

Die Synchronisation der Laser erlaubt die Aufnahme einer Abbildung pro Desorptionslaserimpuls. Es ist also nicht möglich, die Flugbahn eines individuellen Partikels im *plume* anhand mehrerer Aufnahmen zu verfolgen.

Da der Desorptionsprozeß insgesamt einer erheblichen Statistik unterliegt, mußte zu jedem Parametersatz eine Vielzahl von Aufnahmen gemacht werden, anhand derer danach entschieden werden konnte, welche repräsentativ sind. Aus diesen Aufnahmen wurden dann z.B. Serien der zeitlichen Entwicklung zusammengestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Infrarot-Nachionisationsmassenspektrometrie

4.1.1 Desorption von Biomakromolekülen

Bisher waren die Versuche zur Nachionisation großer Moleküle, die ausschließlich mit UV-Nachionisationslasern durchgeführt wurden, kaum erfolgreich bzw. im zugänglichen Massenbereich sehr eingeschränkt. Insofern ist es bemerkenswert, daß es in den Experimenten dieser Arbeit unter Verwendung von IR-Nachionisationslasern gelang, Biomakromoleküle intakt nachzuweisen. Die primäre Desorption wurde mit einem Er:YAG-Laser und die Nachionisation mit einem Er:YSGG-Laser durchgeführt.

Peptide und Proteine stellen nicht nur die ersten mit MALDI-MS nachgewiesenen Substanzklassen dar, sondern gehören nach wie vor zum wichtigsten Einsatzgebiet der MALDI-MS, auch wenn hier Nukleinsäuren und Glycokonjugate über die letzten Jahre rasant an Bedeutung gewonnen haben.

In den folgenden Abbildungen werden IRPI-Spektren einiger typischer Analyte gezeigt.

Angiotensin I, ein Peptid mit einer Molekülmasse von 1296,5u zeigt im Vergleich zu konventionellen MALDI-Spektren keine auffälligen Unterschiede im IRPI-Spektrum (Abbildung 4.1). Typisch für die MALDI-MS ist das fast ausschließliche Auftreten des einfach geladenen Monomeres.

Cytochrome C ist ein Protein mit einer Molekülmasse von 12360u. Auffällig ist beim IRPI-Spektrum (Abbildung 4.2) die Präsenz von vielfach geladenen Multimeren, die unter Standardbedingungen in der MALDI-MS eher die Ausnahme bilden, bei der IRPI-MS jedoch für Proteine ab etwa dieser Masse massiv und zwanglos auftritt.

Monoklonale Antikörper (*monoclonal antibody* - MAB, Abbildung 4.3) stellen mit etwa $1,5 \cdot 10^5$ u eine Gruppe von Proteinen dar, die den üblichen Massenbereich kommerzieller Geräte weit übersteigt. Auch hier zeigt sich die auffällige Häufung von Ionensignalen mehrfach geladener Multimere. Zum Vergleich ist in der oberen rechten Ecke ein MALDI-Spektrum im direkten Vergleich mit dem IRPI-Spektrum abgebildet.

Bei kurzen DNA-Sequenzen (Abbildung 4.4) ist wie schon bei Peptiden praktisch kein Unterschied zwischen den Desorptionsmethoden zu erkennen.

Hohen experimentatorischen Aufwand erfordert die Messung großer Nukleinsäuren wie dem hier vorgestellten DNA-430mer (Abbildung 4.5). Im Gegensatz zum MAB und dem DNA-20mer gelang es hier nicht, mit IRPI an die Spektrenqualität der IR-MALDI heranzureichen. Für das DNA-430mer ist das Verhalten dem großer Proteine entgegengesetzt: in MALDI-Spektren treten für diesen Analyten vielfach geladene Multimere auf, während in den IRPI-Spektren fast ausschließlich das einfach und zweifach geladene Monomer nachzuweisen sind. Auffällig bleibt in jedem Fall, daß sich die Massenspektren von Analytmolekülen großer Masse bezüglich des Auftretens mehrfach geladener Spezies zwischen MALDI-MS und IRPI-MS deutlich unterscheiden.

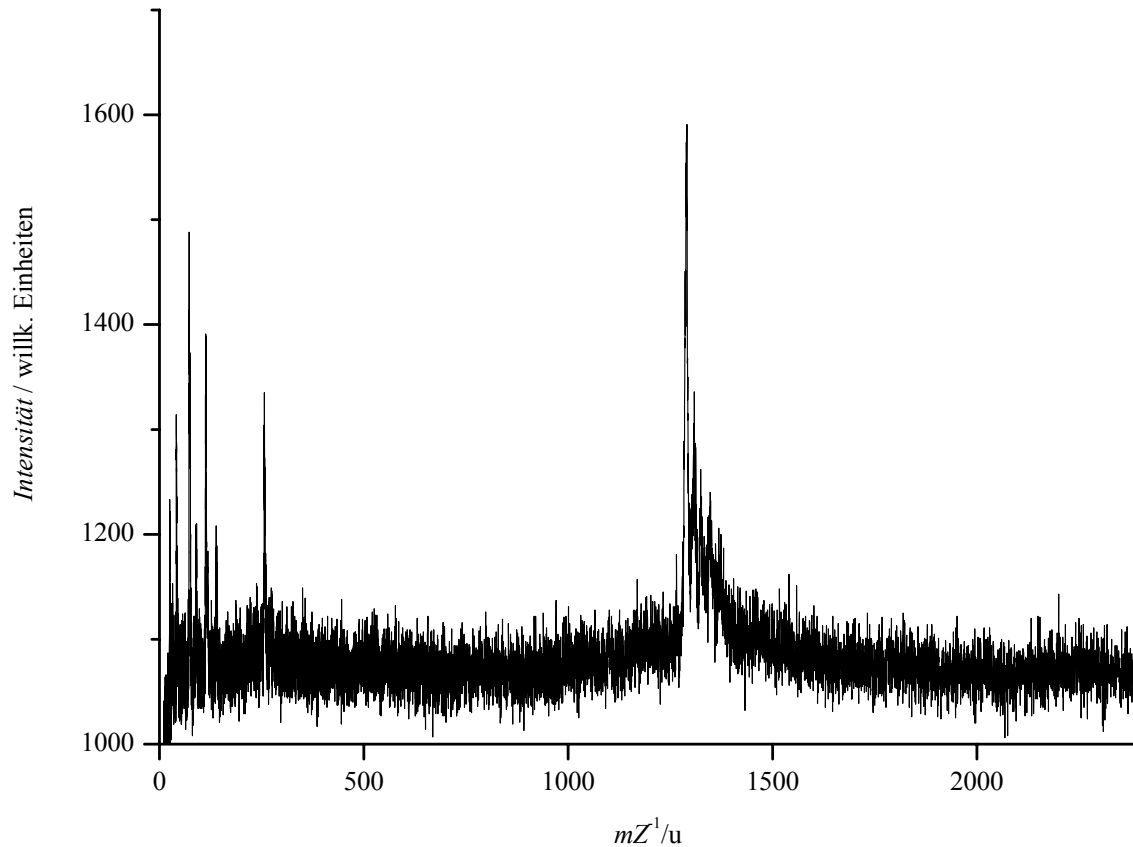


Abbildung 4.1: IRPI-MS von *Angiotensin I* ($m = 1296,5u$), Matrix Glycerol, Desorption Er:YAG-Laser ($H = 4500Jm^{-2}$), Nachionisation Er:YSGG-Laser ($H = 10 \cdot 10^3 Jm^{-2}$), Ref-TOF, $U_{tar} = 12kV$, $U_{ext} = 10,5kV$, $\tau_{IRPI} = 1,5\mu s$, $\Delta z = 0,5mm$, Summenspektrum aus 50 Spektren

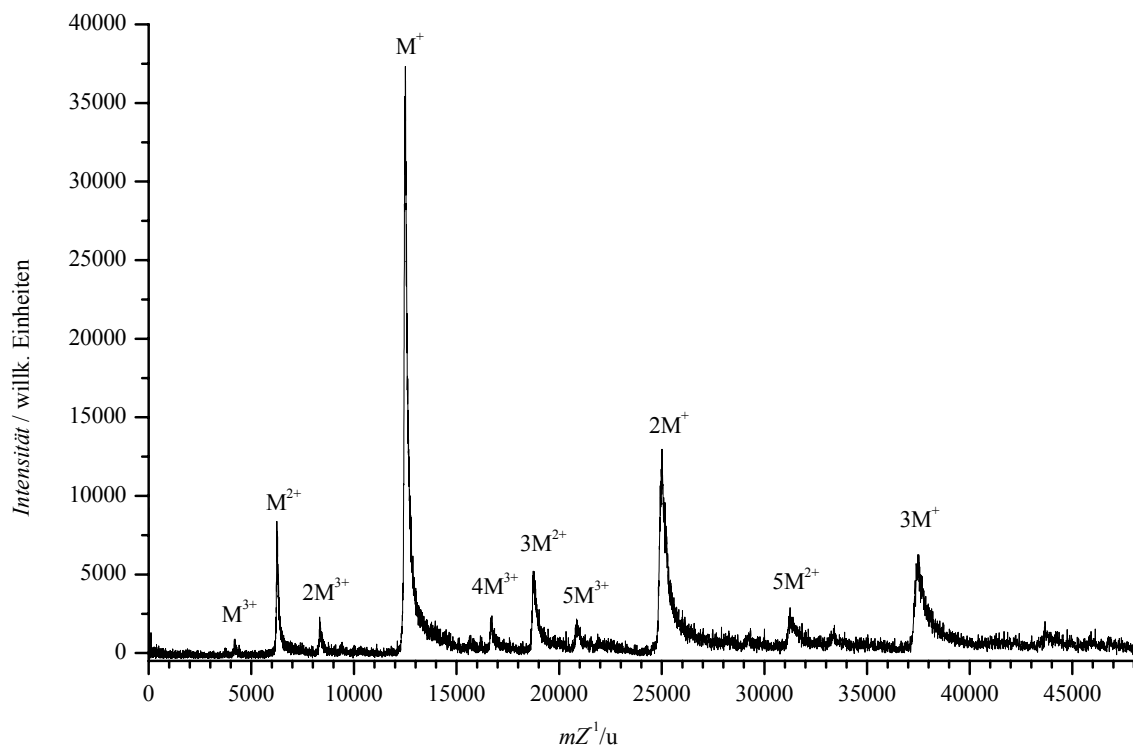


Abbildung 4.2: IRPI-MS von *Cytochrome C* ($m = 12360u$), Matrix Glycerol, Desorption Er:YAG-Laser ($H = 4500Jm^{-2}$), Nachionisation Er:YSGG-Laser ($H = 10 \cdot 10^3 Jm^{-2}$), Ref-TOF, $U_{tar} = 14kV$, $U_{ext} = 13,4kV$, $\tau_{IRPI} = 2\mu s$, $\Delta z = 2,5mm$, Summenspektrum aus 10 Spektren

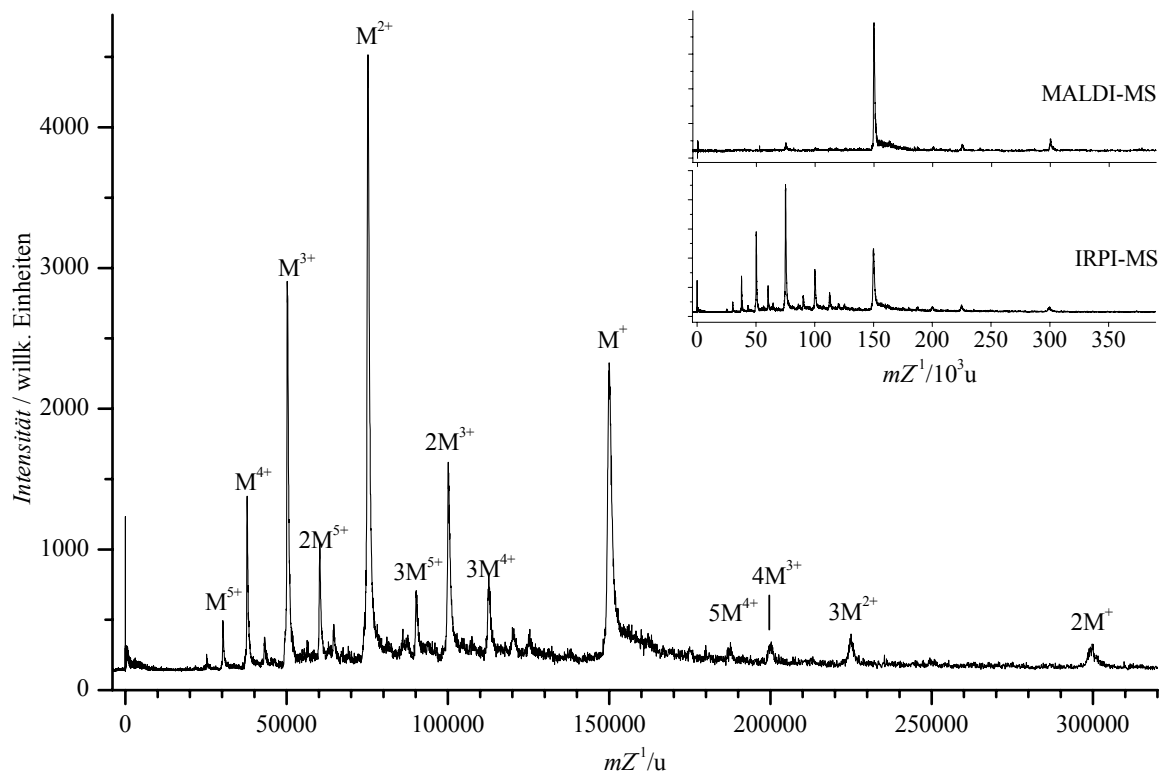


Abbildung 4.3: IRPI-MS von MAB ($m \cong 150 \cdot 10^3 \text{ u}$), Matrix Glycerol, Desorption Er:YAG-Laser ($H = 4500 \text{ Jm}^{-2}$), Nachionisation Er:YSGG-Laser ($H = 10 \cdot 10^3 \text{ Jm}^{-2}$), Ref-TOF, $U_{\text{tar}} = 14 \text{ kV}$, $U_{\text{DE}} = 4 \text{ kV}$, $\tau_{\text{IRPI}} = 2 \mu\text{s}$, $\Delta z = 1 \text{ mm}$, Summenspektrum aus 34 Spektren

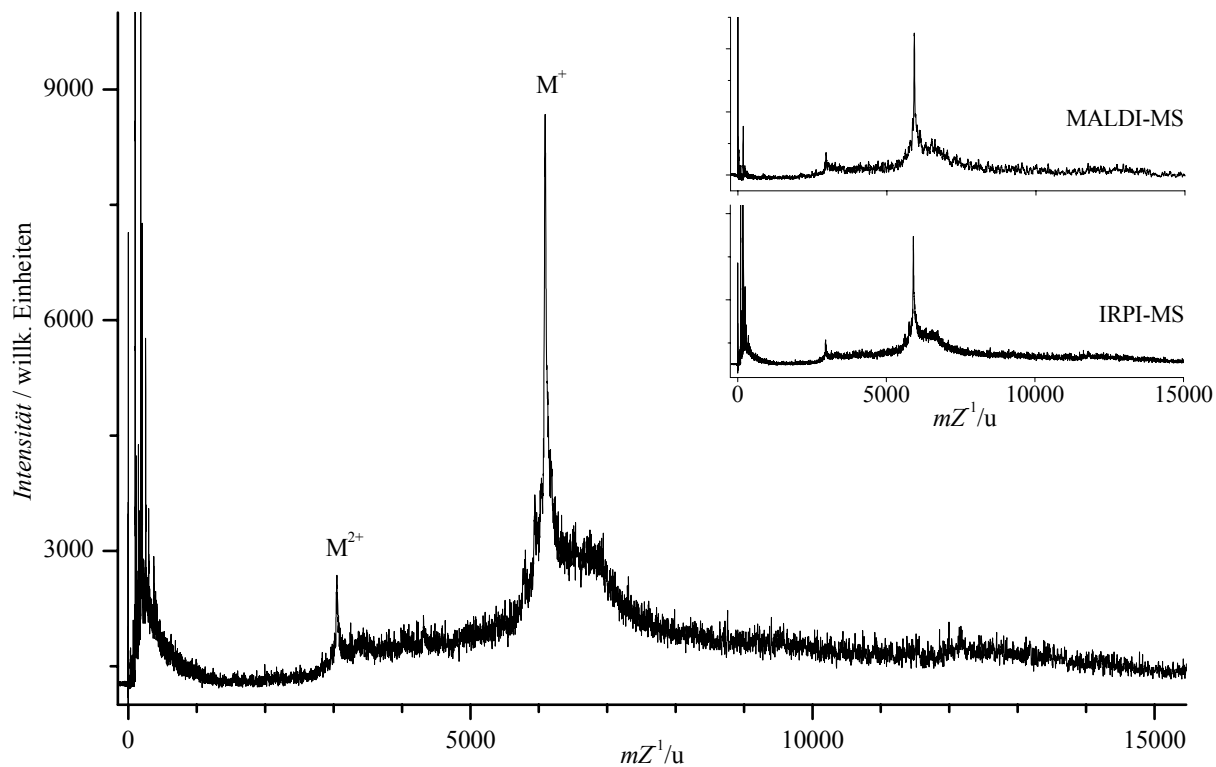


Abbildung 4.4: IRPI-MS eines DNA-20mers ($m = 6117 \text{ u}$), Matrix Glycerol, Desorption Er:YAG-Laser ($H = 4500 \text{ Jm}^{-2}$), Nachionisation Er:YSGG-Laser ($H = 15 \cdot 10^3 \text{ Jm}^{-2}$), Ref-TOF, $U_{\text{tar}} = 10 \text{ kV}$, $U_{\text{DE}} = 2 \text{ kV}$, $\tau_{\text{IRPI}} = 2 \mu\text{s}$, $\Delta z = 1 \text{ mm}$, Summenspektrum aus 86 Spektren

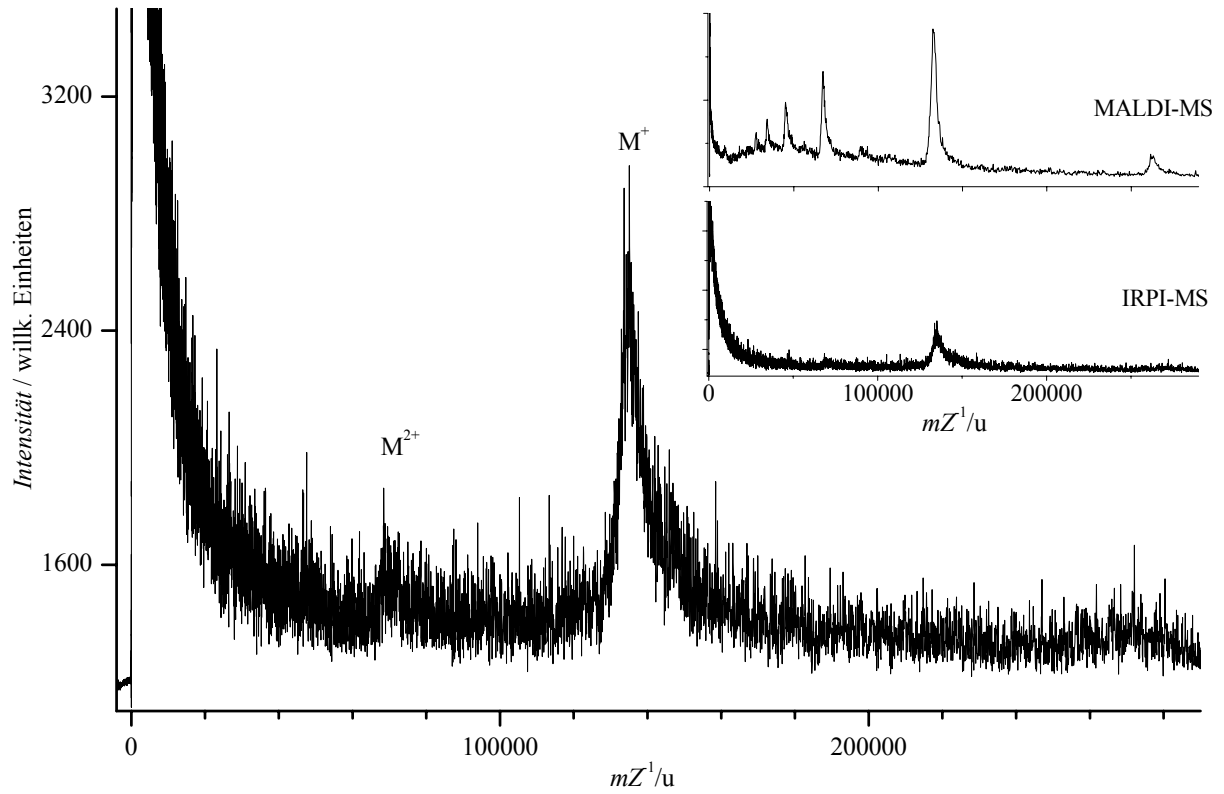


Abbildung 4.5: IRPI-MS eines DNA-430mers ($m = 133 \cdot 10^3 u$), Matrix Glycerol, Desorption Er:YAG-Laser ($H = 4500 Jm^{-2}$), Nachionisation Er:YSGG-Laser ($H = 15 \cdot 10^3 Jm^{-2}$), Ref-TOF, $U_{tar} = 16 kV$, $U_{DE} = 2 kV$, $\tau_{IRPI} = 2 \mu s$, $\Delta z = 1 mm$, Summenspektrum aus 59 Spektren. Die Signalbreite (M^+ , FWHM) beträgt für das MALDI-Spektrum 4000u und für das IRPI-Spektrum 7000u.

4.1.2 Untersuchungen zur *plume*-Dynamik

Die Ausbreitungsfront des *plumes* kann mit IRPI-MS lokalisiert werden. Da die Empfindlichkeit des Massenspektrometers begrenzt ist, handelt es sich um eine Mindestabschätzung der Art, daß sich der *plume* zu einem gegebenen Zeitpunkt mindestens bis zur Nachweisgrenze ausgedehnt haben muß.

Der gewählte Analyt *Cytochrome C* ist ein Protein mit einer Molekülmasse von 12360u. Als primärer Desorptionslaser und als Nachionisationslaser wurden wechselseitig der OPO und der Er:YAG-Laser eingesetzt. Die Impulsbreite des Nachionisationslasers hat einen vernachlässigbaren Einfluß auf die Signalintensität, so daß mit dem Experiment die *plume*-Entwicklung abhängig von der Impulsdauer des jeweiligen primären Lasers untersucht werden konnte.

In Abbildung 4.6 ist die Signalintensität gegen den Abstand Δz zur Tropfenoberfläche aufgetragen. Die unterschiedlich eingefärbten Kurven zeigen dabei das Verhalten zu verschiedenen Zeiten τ_{IRPI} der *plume*-Entwicklung. Gemessen wurden die Flächen unter den Ionsignalpeaks der einfach geladenen Monomere M^+ . Die teilweise automatisierte Auswertung der zahlreichen Spektren wurde mit einem selbst entwickelten Computerprogramm¹ durchgeführt.

Obwohl die Signalintensitäten mit Δz stark abfallen, darf die Darstellung in den Graphen nicht darüber hinwegtäuschen, daß auch für große τ_{IRPI} noch eindeutige Massensignale zu beobachten sind. In der logarithmischen Darstellung (Abbildung 4.7) ist der Verlauf im niedrigen Intensitätsbereich deutlicher zu sehen. Außerdem wird für zwei Verzögerungszeiten τ_{IRPI} exemplarisch die Serie der korrespondierenden Massenspektren (Ausschnitt des einfach geladenen Monomeres) aufgeführt (Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9).

¹ Hepheistos Version 1.5 (2001)

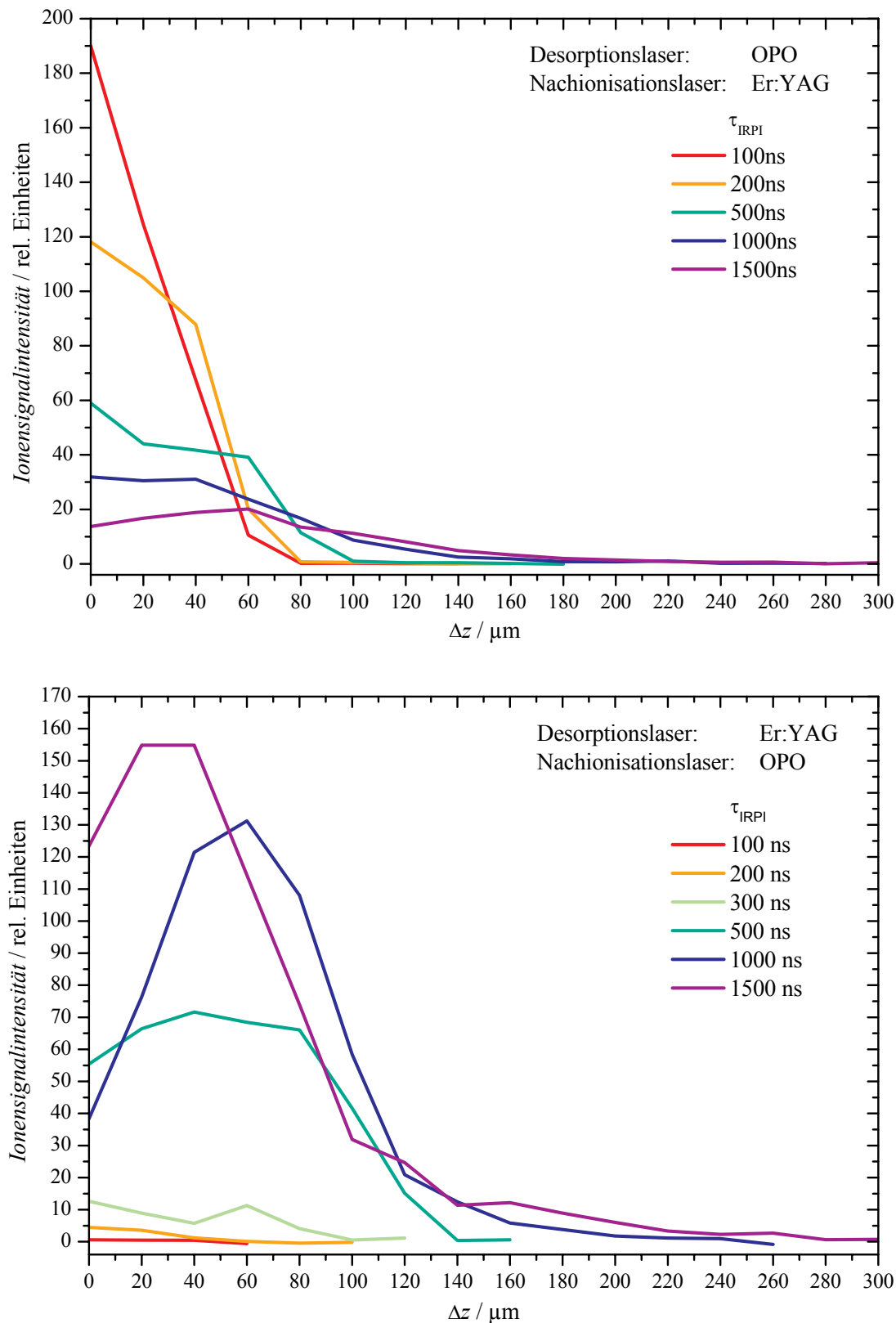


Abbildung 4.6: IRPI-MS von *Cytochrome C*/Glycerol - Ionensignalintensität (M^+ , lineare Auftragung) in Abhängigkeit von Δz und τ_{IRPI} für OPO ($H_{\text{des,OPO}} = 2500\text{Jm}^{-2}$) und Er:YAG-Laser ($H_{\text{des,Er:YAG}} = 4500\text{Jm}^{-2}$). Ref-TOF, $U_{\text{tar}} = 16\text{kV}$, $U_{\text{ext}} = 14\text{kV}$. Der Spotdurchmesser des Nachionisationslasers ($H_{\text{nachion}} \cong 7 \cdot 10^3\text{Jm}^{-2}$) im *plume*-Bereich betrug $77\mu\text{m} \pm 6\mu\text{m}$ (Er:YAG-Laser) bzw. $85\mu\text{m} \pm 6\mu\text{m}$ (OPO).

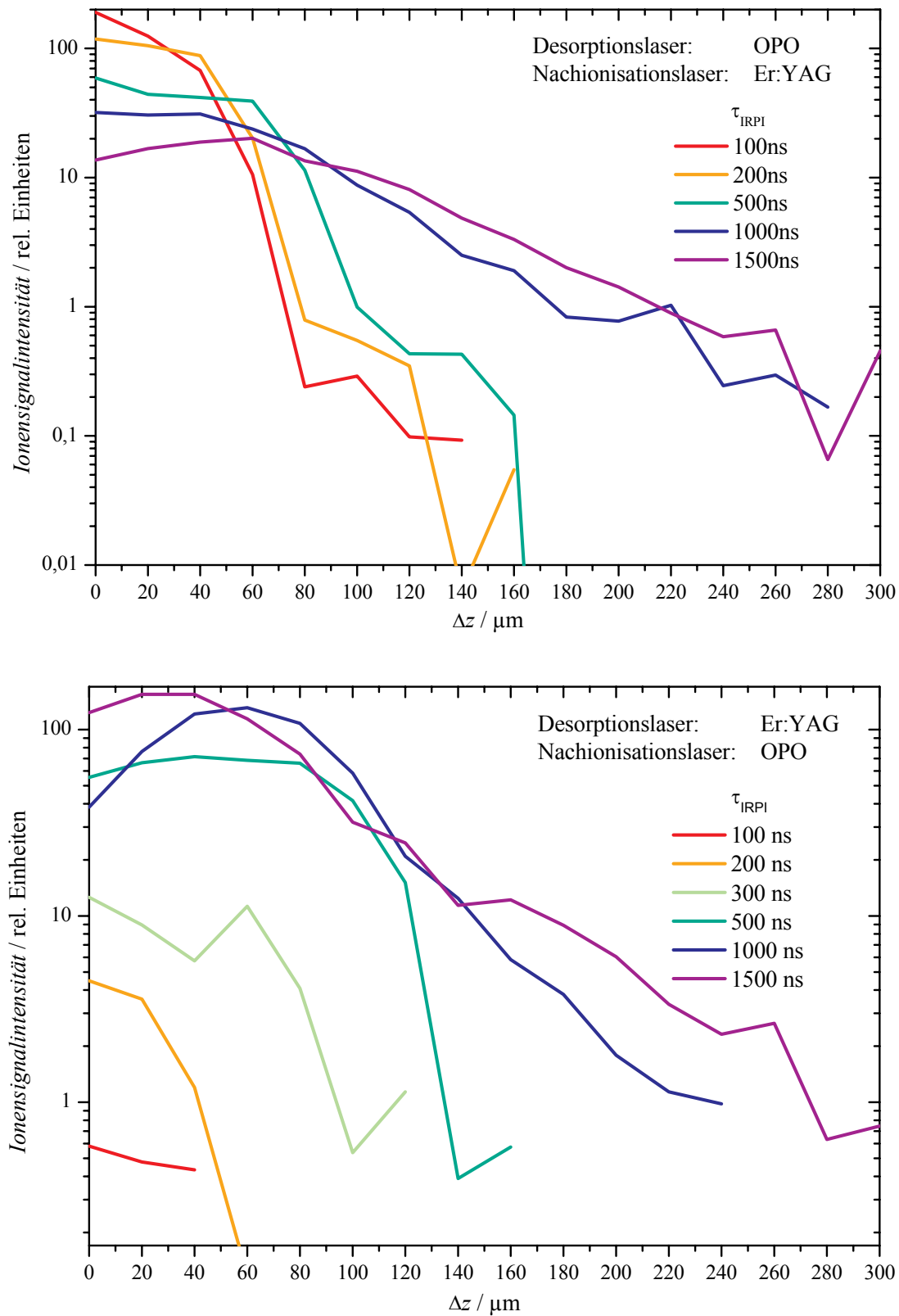


Abbildung 4.7: IRPI-MS von *Cytochrome C*/Glycerol - Ionensignalintensität (M^+ , logarithmische Auftragung) in Abhängigkeit von Δz und τ_{IRPI} für OPO ($H_{\text{des,OPO}} = 2500 \text{ Jm}^{-2}$) und Er:YAG-Laser ($H_{\text{des,Er:YAG}} = 4500 \text{ Jm}^{-2}$). Ref-TOF, $U_{\text{tar}} = 16 \text{ kV}$, $U_{\text{ext}} = 14 \text{ kV}$. Der Spotdurchmesser des Nachionisationslasers ($H_{\text{nachion}} \cong 7 \cdot 10^3 \text{ Jm}^{-2}$) im *plume*-Bereich betrug $77 \mu\text{m} \pm 6 \mu\text{m}$ (Er:YAG-Laser) bzw. $85 \mu\text{m} \pm 6 \mu\text{m}$ (OPO)

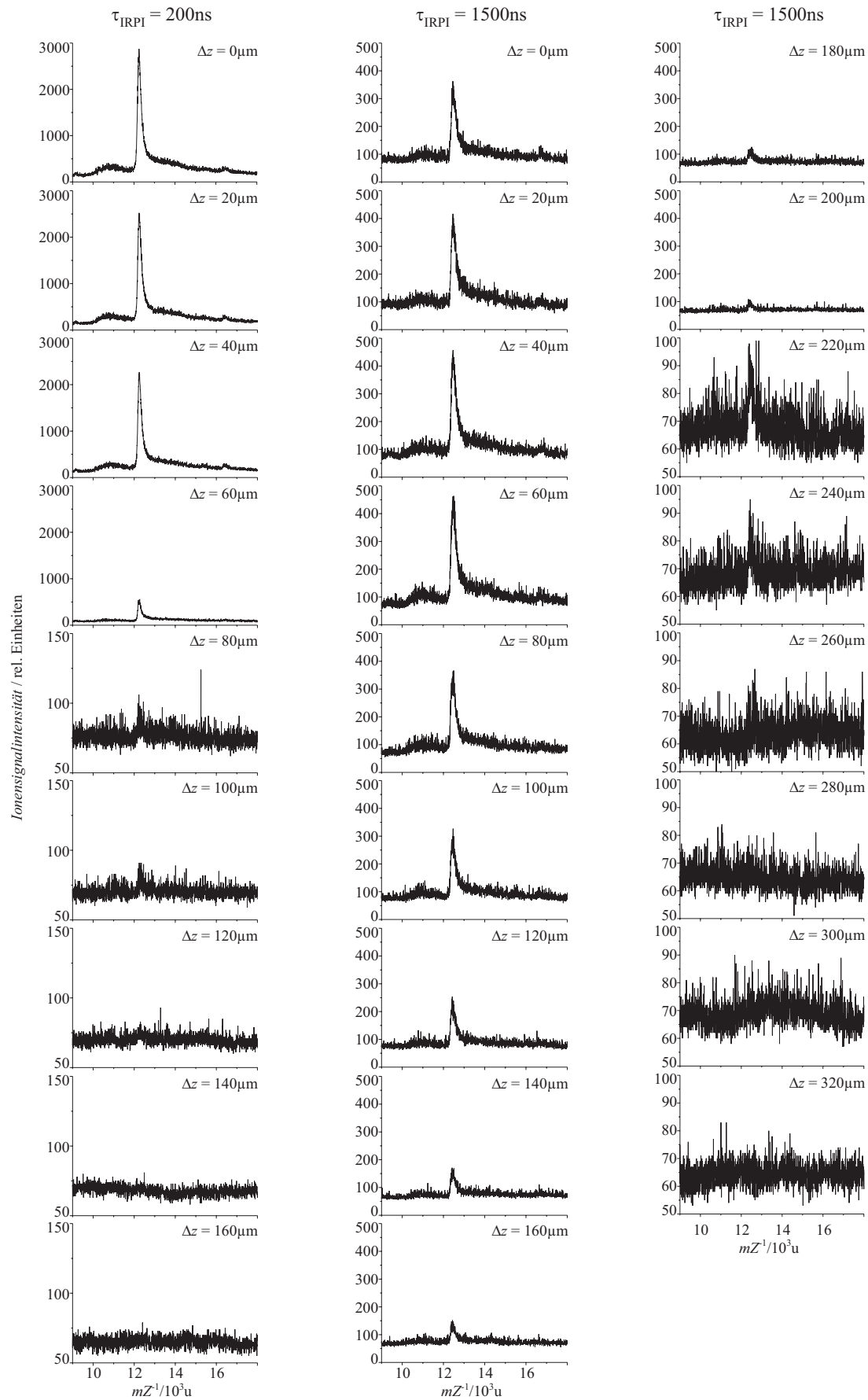


Abbildung 4.8: IRPI-MS von *Cytochrome C* - Massenspektren (Ausschnitt M^+) in Abhängigkeit von Δz für $\tau_{\text{IRPI}} = 200\text{ns}$ und 1500ns , Desorption OPO, Nachionisation Er:YAG-Laser, Parameter wie Abbildung 4.6

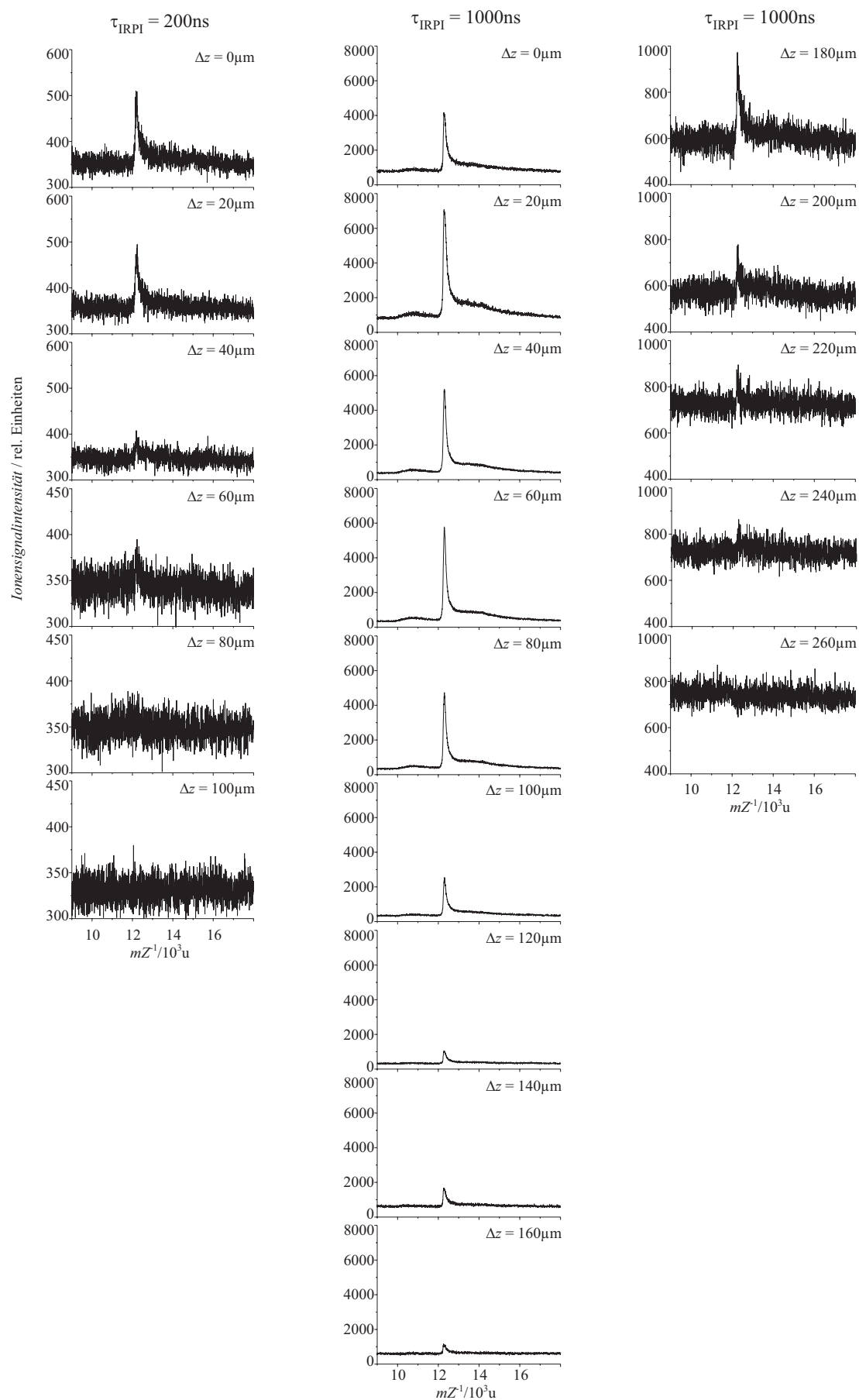


Abbildung 4.9: IRPI-MS von *Cytochrome C* - Massenspektren (Ausschnitt M^+) in Abhängigkeit von Δz für $\tau_{\text{IRPI}} = 200\text{ns}$ und 1000ns , Desorption Er:YAG-Laser, Nachionisation OPO, Parameter wie Abbildung 4.6

Die Kurvenscharen für die beiden eingesetzten primären Laser unterscheiden sich gravierend. Für die Desorption mit dem OPO zeigen sich hohe anfängliche Signalintensitäten, die sowohl räumlich als auch zeitlich rasch abnehmen; die Intensität ist zu Beginn der *plume*-Expansion maximal. Der Er:YAG-Laser verursacht hingegen eine zeitlich langsam anwachsende Emission, die erst bei etwa einer Mikrosekunde ihr Maximum erreicht. Auffällig ist auch die geringere Intensität unmittelbar über der Tropfenoberfläche. Das Maximum wird erst in etwa 20 μm bis 40 μm Abstand erreicht.

Wichtig ist in Abbildung 4.7 auch die Beobachtung, daß in beiden Fällen gleichermaßen Ionensignale für lange Zeiten $\tau_{\text{IRPI}} = 1,5\mu\text{s}$ und in signifikantem Abstand $\Delta z = 300\mu\text{m}$ nachgewiesen werden konnten. Der Widerspruch, den diese Ergebnisse zu denen photoakustischer Experimente zu bilden scheinen, wird in Kapitel 5.2 und 5.3 besprochen.

4.1.3 Untersuchung zum *plume*-Öffnungswinkel

Aufgrund der beschränkten Impulsenergien können der OPO und der Er:YAG-Laser nur Nachionisationssignale in einer Entfernung von maximal mehreren hundert Mikrometern erzeugen. In diesem Abstand sind noch kaum Unterschiede bezüglich der lateralen Ausweitung des *plumes* abhängig von der Zeit zu beobachten. In Abbildung 4.10 wird die *plume*-Breite für verschiedene Zeiten τ_{IRPI} und Abstände zur Tropfenoberfläche Δz gezeigt.

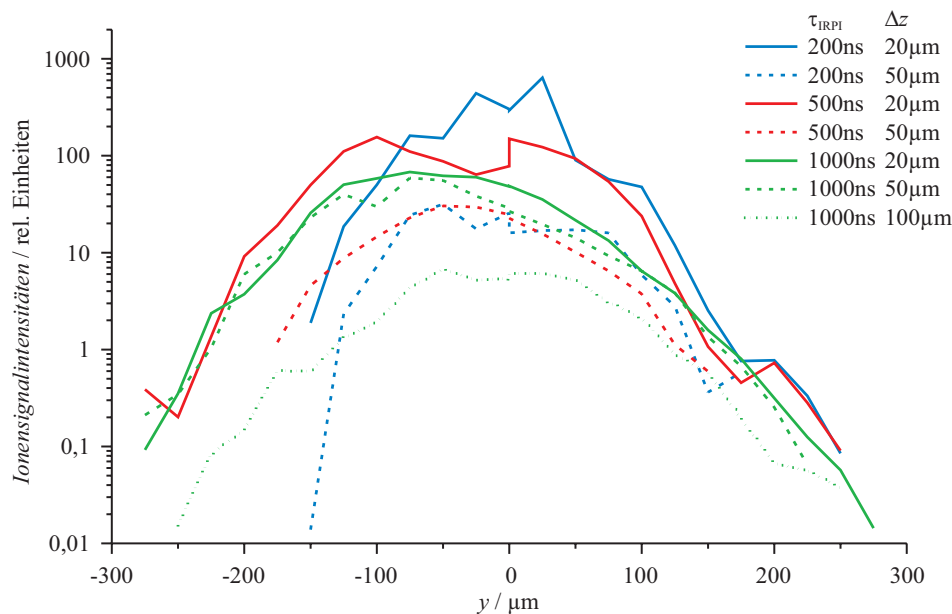


Abbildung 4.10: IRPI-MS von *Cytochrome C*/Glycerol - Ionensignalintensität M^+ in Abhängigkeit von der y -Position (laterale Verschiebung) des Nachionisationslasers für verschiedene τ_{IRPI} und Δz ; Desorption OPO ($H = 2500\text{Jm}^{-2}$), Nachionisation Er:YAG-Laser (Spotdurchmesser $77\mu\text{m} \pm 6\mu\text{m}$, $H \cong 7 \cdot 10^3\text{Jm}^{-2}$), Ref-TOF, $U_{\text{tar}} = 16\text{kV}$, $U_{\text{ext}} = 14\text{kV}$

Der Er:YSGG-Laser als Nachionisationslaser ist demgegenüber in der Lage, auch in mehreren Millimetern Abstand zur Tropfenoberfläche noch ein Nachionisationssignal zu erzeugen. Mit ihm wurde daher die *plume*-Breite in größerer Entfernung vermessen. Das IRPI-Massenspektrum aus Abbildung 4.2 wird in der folgenden Abbildung 4.11 als Flugzeitspektrum dargestellt. Abbildung 4.12 zeigt die Ionensignale (TOF-Spektren) in Abhängigkeit von der lateralen Verschiebung des Nachionisationsstrahls (y -Richtung) für $\tau_{\text{IRPI}} = 2\mu\text{s}$ und $\Delta z = 2,5\text{mm}$. Da das verwendete Datenverarbeitungsprogramm Origin² 3D-Projektionen nur für äquidistante Abszissenwerte berechnen kann, ist auf der Skala statt der Masse die Flugzeit aufgetragen.

² Origin Pro 7.0220 SR0, ©2002 OriginLab Corp., MA, USA

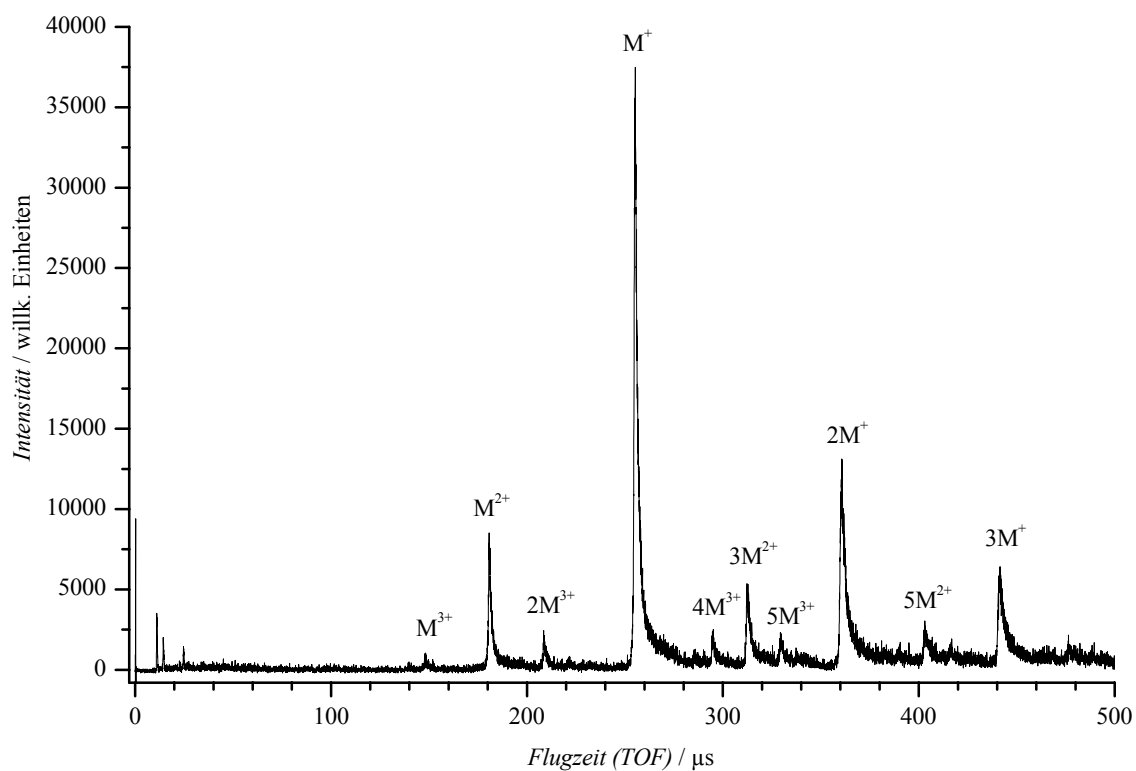


Abbildung 4.11: IRPI-Flugzeitspektrum von *Cytochrome C*, Matrix Glycerol, Desorption Er:YAG-Laser ($H = 4500 \text{ Jm}^{-2}$), Nachionisation Er:YSGG-Laser ($H = 10 \cdot 10^3 \text{ Jm}^{-2}$), Ref-TOF, $U_{\text{tar}} = 14 \text{ kV}$, $U_{\text{ext}} = 13,4 \text{ kV}$, $\tau_{\text{IRPI}} = 2 \mu\text{s}$, $\Delta z = 2,5 \text{ mm}$, Summenspektrum aus 10 Spektren

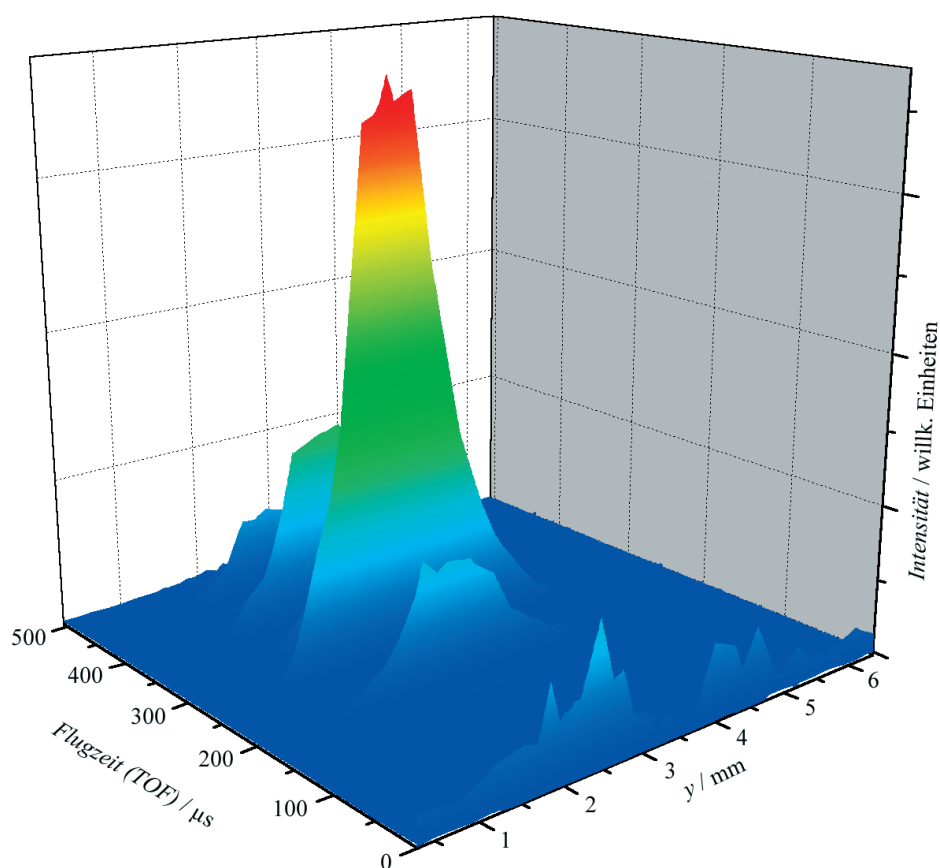


Abbildung 4.12: IRPI-Flugzeitspektrum von *Cytochrome C*/Glycerol in Abhängigkeit von der lateralen Verschiebung y des Nachionisationslasers (Parameter entsprechen denen aus vorangehender Abbildung)

Die Graphik vermittelt einen Gesamteindruck der Spektren, die von den Randzonen und dem Zentrum des *plumes* erzeugt werden konnten. Für eine quantitative Auswertung wurde das intensivste Signal (einfach geladenes Monomer M^+) vermessen. In Abbildung 4.13a ist dessen Verlauf in Abhängigkeit von der lateralen Verschiebung y des Nachionisationslasers aufgetragen.

Einerseits ist bei dieser Meßmethode zu bedenken, daß Randzonen des *plumes* möglicherweise nicht genug Material aufweisen, um ein nachweisbares Nachionisationssignal zu erzeugen; der *plume* wäre also breiter als gemessen. Andererseits ist der Durchmesser des Nachionisationslaserstrahls zu berücksichtigen. Er muß den *plume* nur streifen, um noch ein Signal zu erzeugen. Die Geometrie wird in Abbildung 4.13b verdeutlicht.

Wenn die y -Positionen des Nachionisationslasers zugrundegelegt werden, an denen noch Analyt ionensignale mit $S/N \geq 3/1$, also nahe der Nachweisgrenze im Massenspektrum aufgenommen werden konnten, ergibt sich rechnerisch mit einem Abstand der äußeren Positionen von 4mm ein halber Öffnungswinkel des Glycerol-Analyt-*plumes* von ungefähr 34° . Für die laterale Ausdehnung des *plumes* kann jedoch auch die Breite der Kurve in Abbildung 4.13a als Maß genommen werden, an der die Intensität auf 1/3 des maximalen Signals abgefallen ist ($\sim 2\text{mm}$). Daraus ergibt sich ein halber Öffnungswinkel von etwa 20° .

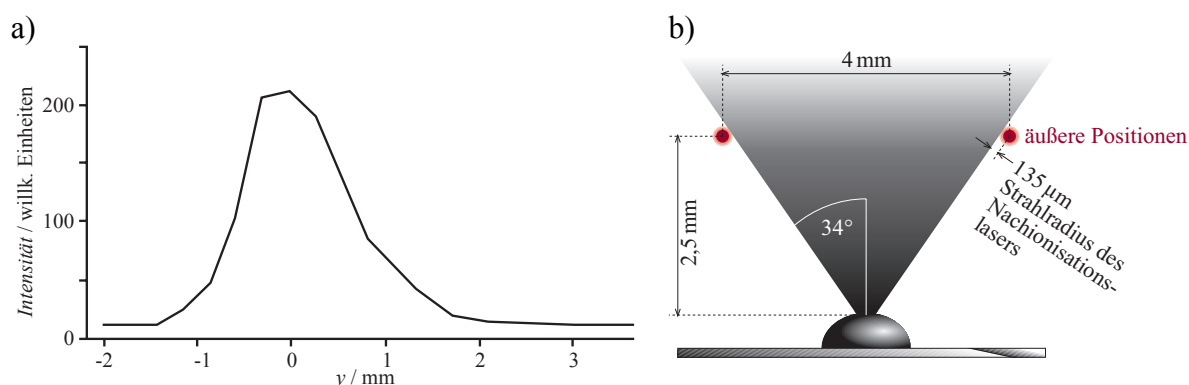


Abbildung 4.13: a) Ionensignalintensität (Cytochrome C, M^+) gegen laterale Verschiebung y des Nachionisationslasers (Er:YSGG, $H = 10 \cdot 10^3 \text{ Jm}^{-2}$), Desorptionslaser Er:YAG ($H = 4500 \text{ Jm}^{-2}$), $\Delta z = 2,5\text{mm}$, $\tau_{\text{IRPI}} = 2\text{ }\mu\text{s}$, b) Bestimmung des *plume*-Öffnungswinkels anhand der äußersten Laserpositionen, die noch ein signifikantes Ionensignal erzeugten, und unter Berücksichtigung des Laserstrahldurchmessers

Ein möglicherweise wichtiger Einfluß auf die Signalintensität bei der Nachionisation aus dem Randbereich ist die Verteilung der Partikelgrößen im *plume*. Dieser Aspekt konnte bei der Berechnung der *plume*-Breite nicht berücksichtigt werden; zwar ließe sich mit den Ergebnissen der Hochgeschwindigkeitsphotographie eine grobe Abschätzung der Verteilung machen, aber der Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Nachionisation ist derzeit noch völlig ungeklärt.

4.1.4 Untersuchungen zur *plume*-Ausbreitungsfront

Um einen Eindruck von den involvierten Geschwindigkeiten bei der Ausbreitung der Teilchenwolke zu erhalten, wurden IRPI-Spektren bei einem definierten Abstand Δz für verschiedene Zeiten τ_{IRPI} aufgenommen. Hierzu wurde *Angiotensin I* und Glycerol als Matrix mit dem Er:YAG-Laser desorbiert und dem Er:YSGG-Laser nachionisiert. Die Ionen-signalintensitäten des einfach geladenen Analytmonomeres sind in Abbildung 4.14 gegen τ_{IRPI} aufgetragen. Zur deutlicheren Darstellung des steilen Anstieges der Kurve in den ersten $7\mu\text{s}$ ist der betreffende Ausschnitt in der oberen rechten Ecke vergrößert dargestellt.

Bei etwa $2,5\mu\text{s}$ ist der halbe Maximalwert erreicht. Wenn dies als Maß für die Position der *plume*-Front genommen wird, ergibt sich mit $\Delta z = 0,5\text{mm}$ eine Geschwindigkeit von ca. $200 \frac{\text{m}}{\text{s}}$.

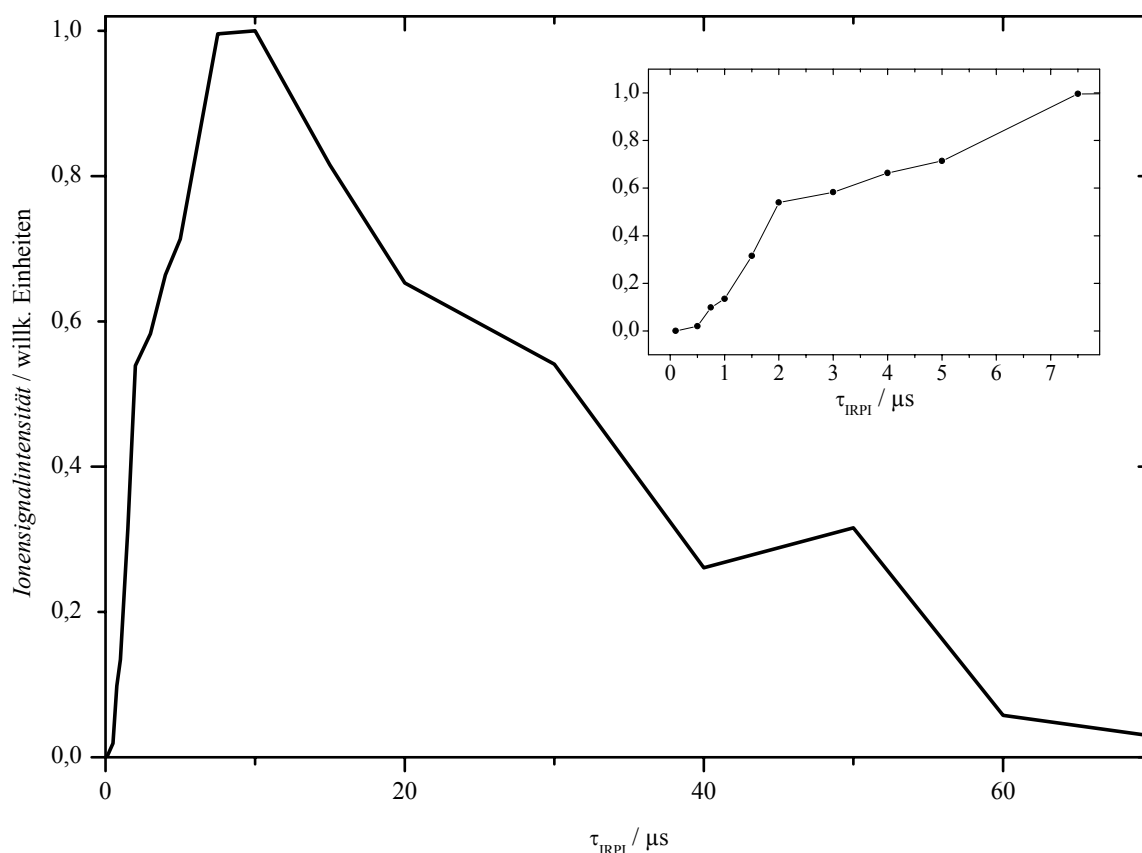


Abbildung 4.14: Ionensignalintensität gegen Nachionisationsverzögerung τ_{IRPI} , IRPI-MS von *Angiotensin I*, Matrix Glycerol, Desorption Er:YAG-Laser ($H = 4500\text{Jm}^{-2}$), Nachionisation Er:YSGG-Laser ($H = 10 \cdot 10^3\text{Jm}^{-2}$), Ref-TOF, $U_{\text{tar}} = 12\text{kV}$, $U_{\text{ext}} = 10,5\text{kV}$, $\Delta z = 0,5\text{mm}$, Summenspektrum aus 50 Spektren.

4.1.5 Wasser als Matrix

In Anlehnung an vorangegangene Experimente^[Ber94] in der Arbeitsgruppe wurden die Nachionisationsexperimente auch mit gefrorenem Wasser als quasiflüssiger Matrix getestet. Wasser ist nativ in praktisch allen biologischen Proben vorhanden (Hydratwassergehalt) und könnte ggf. unter Verzicht auf weitere Substanzen in der IR-MALDI-MS bzw. in der IRPI-MS als Matrix genutzt werden.

Die Präparation entspricht der in der oben angegebenen Arbeit als WP1 bezeichneten und soll hier nur kurz umrissen werden. Der Analyt, der in wässriger Lösung vorliegt (10^{-3}M), wird auf das Stahlsubstrat präpariert (ca. $6\mu\text{l}$). Anschließend wird die Präparation für drei Minuten in flüssigen Stickstoff eingetaucht und zügig in das Massenspektrometer eingeführt.

Bei der Durchführung der Experimente der vorliegenden Arbeit wurde besonderer Wert auf eine gründliche Reinigung der *targets* gelegt, um Reste anderer Matrixsubstanzen (Glycerol, Bernsteinsäure) aus vorhergehenden Meßreihen auszuschließen.

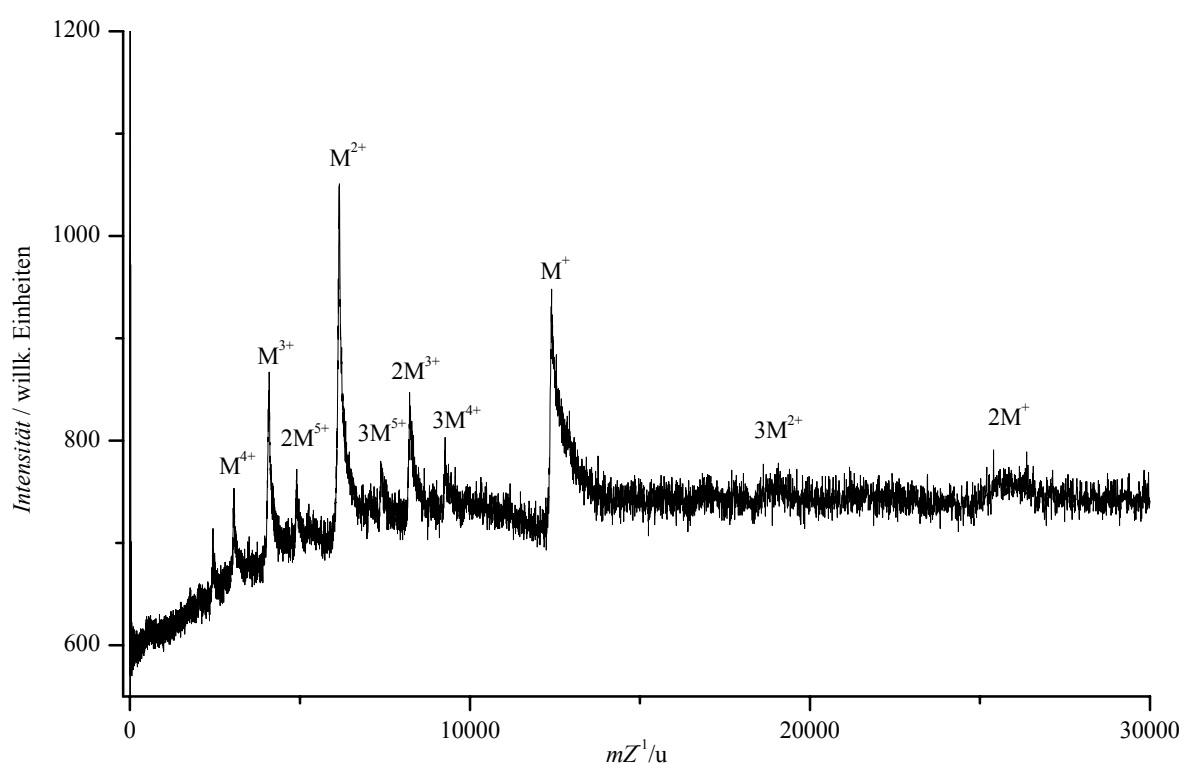


Abbildung 4.15: IRPI-MS von *Cytochrome C*/Wasser als Matrix, $\tau_{\text{IRPI}} = 3\mu\text{s}$, $\Delta z = 0,5\text{mm}$, Desorption Er:YAG-Laser ($H = 4500\text{Jm}^{-2}$), Nachionisation Er:YSGG-Laser ($H = 20 \cdot 10^3\text{Jm}^{-2}$), Ref-TOF, $U_{\text{tar}} = 16\text{kV}$, $U_{\text{ext}} = 14\text{kV}$, Summenspektrum aus 38 Spektren

Es zeigt sich, daß sowohl die Probleme (u.a. schlechte Reproduzierbarkeit) als auch die resultierenden Massenspektren vergleichbar mit denen der angeführten Arbeit sind. Die Abhängigkeit der Ergebnisse von der Temperatur der Präparation, die sich ohne aktive Kühlung während der Meßreihe über etwa 30 Minuten langsam erhöht, wurde ebenfalls analog zu den vorangegangenen Arbeiten beobachtet. So ist bei Temperaturen bis 170K ein starkes Rauschen über das gesamte Spektrum zu beobachten, das mit weiter ansteigender Temperatur etwas unterdrückt wird. Ab etwa 220K nehmen bei gleichbleibender Bestrahlung die Massensignale im unteren Spektrumbereich stark zu.

Die Qualität der Spektren ist der von Spektren mit Glycerol oder Bernsteinsäure als Matrix weit unterlegen. Es ist festzustellen, daß Eis als Matrix in IR-Nachionisationsexperimenten zwar funktioniert, aber der konventionellen IR-MALDI weder signifikant über- noch unterlegen ist. Die Bedeutung dieser Beobachtung wird in Kapitel 5.5 diskutiert.

4.2 Hochgeschwindigkeitsphotographie

Die Begriffe Tropfen und Tröpfchen sollen zur Unterscheidung im weiteren so verwendet werden, daß mit Tropfen die ursprüngliche Probenpräparation von ca. 1 μl auf dem Metallsubstrat gemeint ist, und mit Tröpfchen die mikroskopischen Objekte, die aus abladiertem Material bestehen und sich im *plume* befinden.

Die Zeitdifferenz τ_{ph} zwischen Desorptionslaser und Beleuchtungslaser wurde mit Photodioden für jede einzelne Aufnahme bestimmt. Abbildung 4.16 zeigt die Signalverläufe. Die Kurven für die Desorptionslasersignale lassen das Störsignal erkennen, das durch die Pumpblitzlampe des Nd:YAG-Lasers verursacht wird und etwa 250ns vor dessen Emission hochfrequent einsetzt und dann in eine langanhaltende Modulation der Grundlinie übergeht. Die Zeitmessungen von τ_{ph} für den Er:YAG-Laser werden hiervon so stark beeinflusst, daß die Standardabweichung bei etwa 20ns liegt. Da das Signal des OPO eine deutlich steilere Flanke aufweist, treten hier nur Probleme auf, wenn es mit dem hochfrequenten Störbereich zusammenfällt ($\tau_{\text{ph}} \approx 220\text{ns}$).

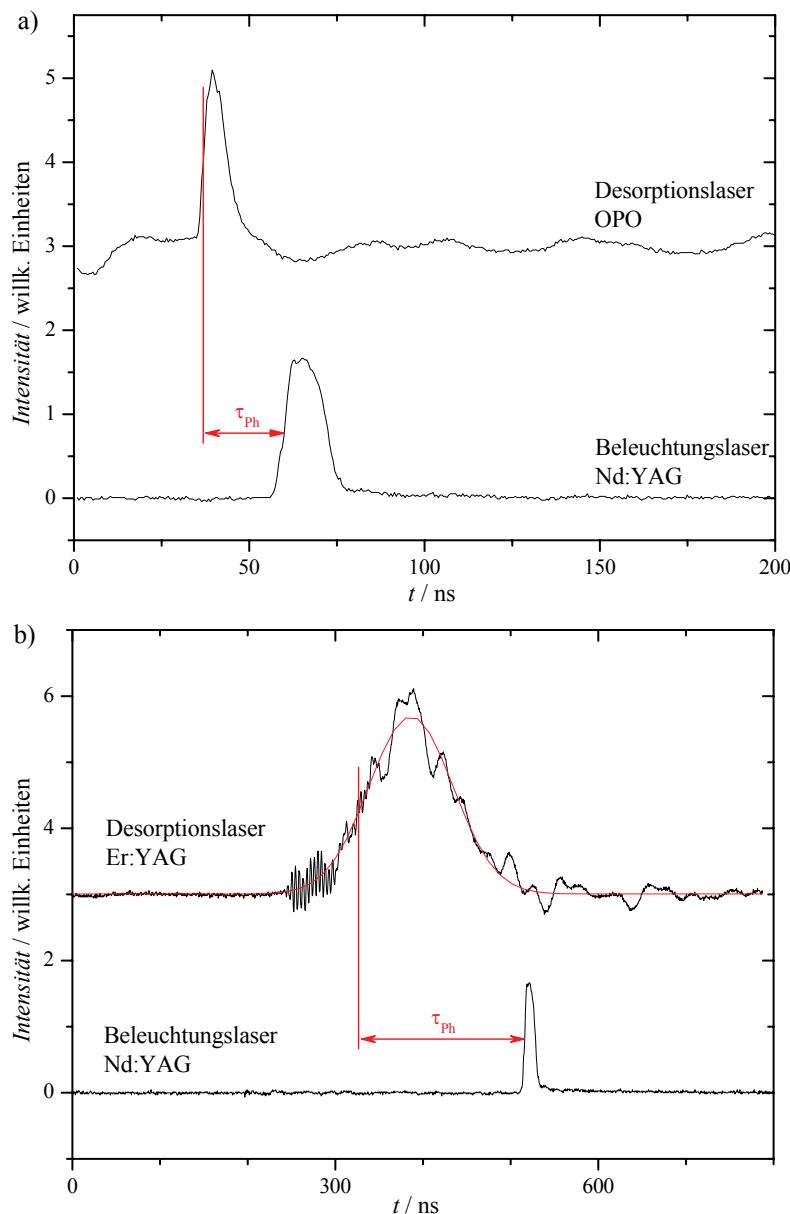


Abbildung 4.16: Signalverläufe der Photodetektoren zur Kontrolle der Laseremissionen bzw. der relativen Verzögerung τ_{ph} , Beleuchtungslaser (Nd:YAG-Laser) gegen a) OPO und b) Er:YAG-Laser

Laser sind wegen der hohen emittierten Intensitäten in der Lage, statt eines Desorptionsprozesses ein Plasma zu zünden. Dieses leuchtet wiederum sehr hell. Die Bildinformation, die vom *plume* durch den grünemittierenden Beleuchtungslaser gewonnen werden soll, würde durch ein Plasma verfälscht.

Um das Auftreten eines Plasmas auszuschließen, wurde der 532nm-Bandpaßfilter (grün) wahlweise durch einen Blaufilter (Transmissionscharakteristik in Abbildung 4.17) vor dem Kameramodul ersetzt. Da ein Plasma eine hohe Emission im blauen und violetten Spektrum aufweist, müßte mit dem Blaufilter eine stärkere Lichtintensität als (oder zumindest ähnlich hohe wie)³ bei Verwendung des Grünfilters nachweisbar sein. Unter MALDI-typischen Bedingungen ist mit dem Blaufilter jedoch praktisch kein Signal zu beobachten (Abbildung 4.18b). Als Gegenversuch wurde mit jedem der beiden Filter ein durch extrem hohe Bestrahlung provoziertes Plasma aufgenommen. Dieses war mit dem Grünfilter als mäßig leuchtender und mit dem Blaufilter als hellleuchtender Fleck zu sehen (ohne Abbildung).

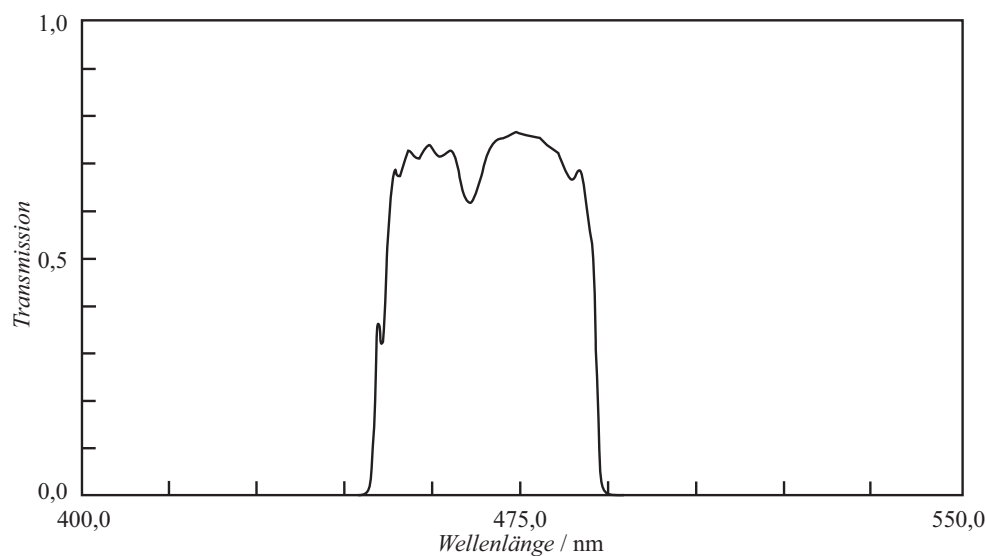


Abbildung 4.17: Transmissionsspektrum des Blaufilters

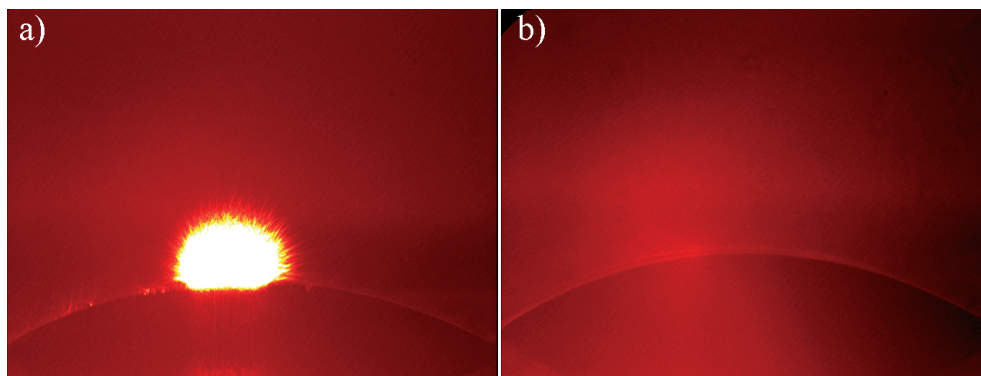


Abbildung 4.18: Aufnahme (90°-Anordnung) des *plumes* unter IR-MALDI-typischen Bedingungen ($2 \cdot H_0$) mit a) 532nm-Bandpaßfilter (grün) und b) Blaufilter vor der Kamera. Zur Kenntlichmachung der Tropfenoberfläche wurde außerdem eine diffuse weiße Hintergrundbeleuchtung eingeschaltet.

³ Der stärkeren Emission eines Plasmas im kurzen Wellenlängenbereich steht die zum Violett abnehmende Sensitivität des Kamerasensors entgegen.

4.2.1 Allgemeine Bildeffekte

Bei der Auswertung der Bilder müssen eine Reihe von Artefakten berücksichtigt werden, die im folgenden diskutiert werden. Es könnte der Eindruck entstehen, daß das Auftreten und Verschwinden dieser Artefakte von Aufnahme zu Aufnahme völlig erratisch ist; dies liegt jedoch im allgemeinen daran, daß je Laserexposition nur je ein Bild aufgenommen werden konnte und das Desorptionseignis selbst einer erheblichen Statistik unterliegt. Die Einzelbilder der im folgenden dargestellten Serien stammen zudem teilweise aus verschiedenen Versuchsreihen (gleicher Bedingungen).

Mehrfachreflektionen im Tropfen

Der Tropfen Glycerol, der auf das Metall-*target* präpariert wird, zeigt abhängig von Größe und Form (Radius der Oberfläche) sowie Einfallswinkel der Beleuchtung mitunter auffällige Lichtmuster, die sich mit mehrfachen Reflektionen innerhalb des Tropfens erklären lassen. Das Phänomen tritt bei beiden Beleuchtungsanordnungen auf.

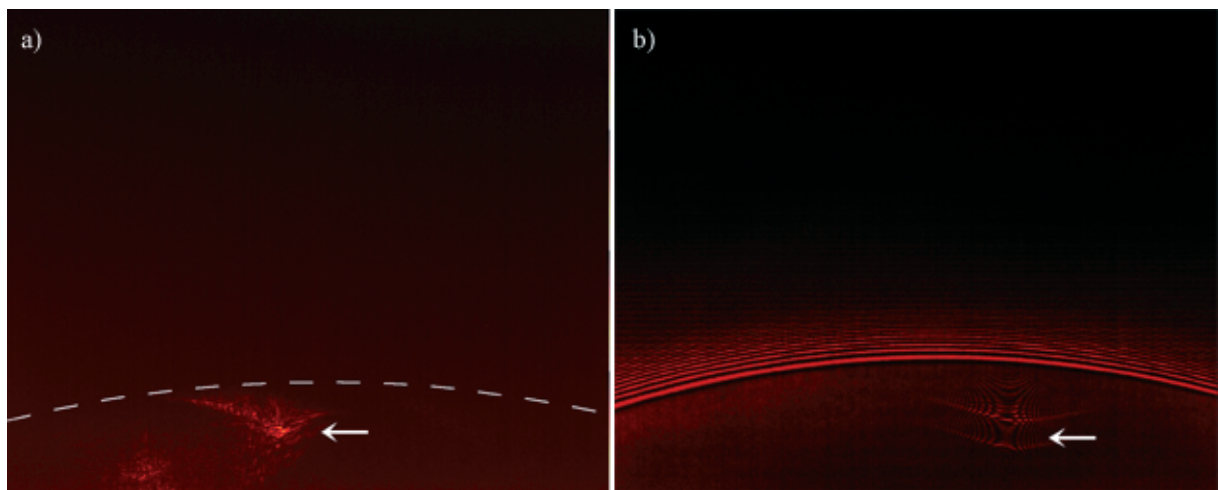


Abbildung 4.19: Reflektionsmuster im Tropfen bei a) 90°-Anordnung (mit angedeuteter Tropfenoberfläche) und b) Dunkelfeld-Anordnung. Der Desorptionslaser wurde bei diesen Aufnahmen deaktiviert. Die weißen Pfeile weisen auf die typischen Strukturen dieses Effektes.

Interferenzeffekte an Grenzflächen

Bei der Dunkelfeldbeleuchtung treten an Grenzflächen Streifenmuster auf.^[Stö88] Die Muster sind besonders intensiv, wenn eine Tropfenoberfläche (oder Phasengrenze) parallel zur Ausrichtung des optischen Spaltes liegt. In diesem Fall ist die tatsächliche Lage der Oberfläche im Bild nicht mehr zu identifizieren. Daher eignet sich eine vertikale Ausrichtung des Spaltes besser zur Beurteilung horizontaler Tropfengrenzen und *vice versa*.

Da die Ausrichtung des optischen Spaltes relativ zur Tropfenoberfläche der Glycerolpräparation einen Einfluß auf die photographischen Ergebnisse hat, wird dieser Parameter bei der Darstellung der Bilder stets mit angegeben. Die folgenden Bezeichnungen „orthogonal“ und „parallel“ sind im Sinne der geometrischen Anordnung von Spalt zu Tropfenoberfläche im Bildzentrum zu verstehen.

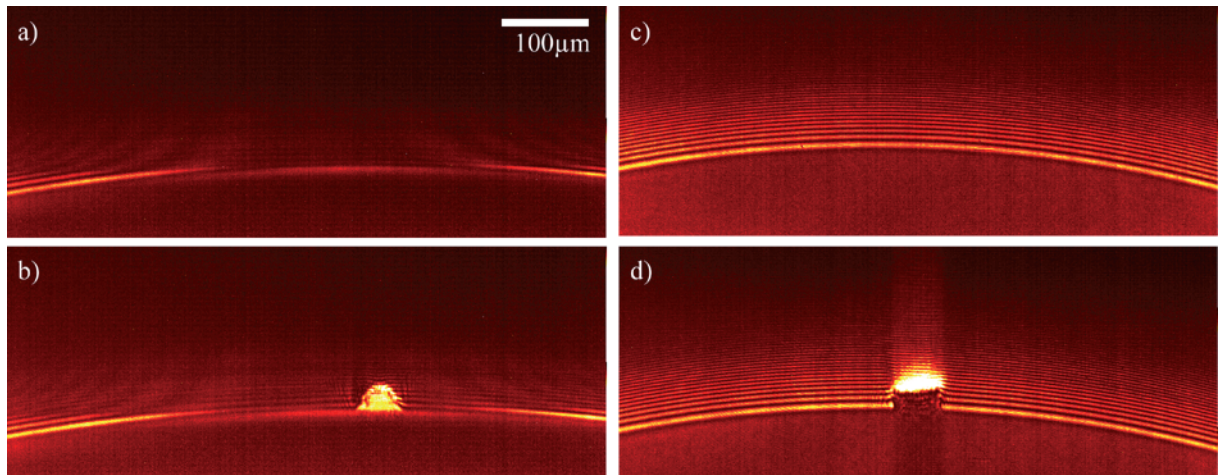


Abbildung 4.20: Dunkelfeld-Aufnahme mit a) und b) orthogonaler und c) und d) paralleler Spaltanordnung. In den Aufnahmen a) und c) wurde der Desorptionslaser deaktiviert.

Ein weiterer Effekt ist besonders deutlich in Abbildung 4.20d zu sehen. Eine Lichtsäule scheint sich senkrecht über dem *plume* zu erheben. Diese Erscheinung entsteht sekundär als optischer Effekt der Dunkelfeld-Beleuchtung. Sie verläuft stets parallel zur Spaltanordnung und hat keine Divergenz. Im Bereich des Tropfens (unten) tritt sie kontrastärmer und invertiert auf.

Zweifache Reflektion an Tröpfchen

Ungeachtet der Tatsache, daß selbstverständlich gelegentlich eng beieinanderliegende Tröpfchen im *plume* auftreten, gibt es eine auffällige Paarung, bei der die beiden Tröpfchen auf einer nahezu waagerechten Achse liegen.

Bei der Beleuchtung unter 90° treten Reflektionen sowohl an der vorderen Tröpfchenaußenseite als auch der hinteren Innenseite auf. Die folgende Abbildung zeigt den Effekt.

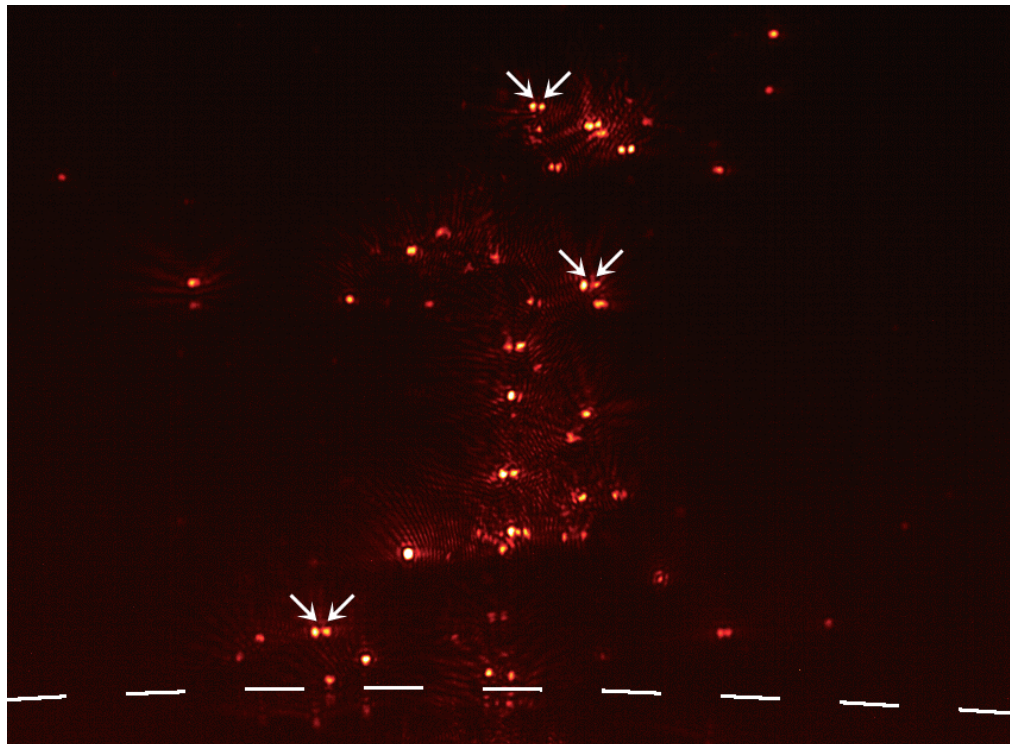


Abbildung 4.21: Doppelreflektion an einzelnen Tröpfchen im *plume* (90° -Anordnung, einfallender Beleuchtungsstrahl von links). Einige Paare sind repräsentativ hervorgehoben.

Reflektion an der Tropfenoberfläche

Wie der vorangegangene Effekt bewirken auch Reflektionen des Bildes eines Tröpfchens an der Oberfläche des Präparationstropfens Eindrücke eines Paares, dessen Achse nun senkrecht auf der Oberfläche steht.

Vor allem bei der 90°-Anordnung ist die Tropfenoberfläche selbst nicht zu sehen. Jedoch wurden in den Versuchsreihen zwischenzeitlich unter diffuser Beleuchtung Bilder aufgenommen, auf denen die Tropfenoberfläche gut zu sehen ist. Wird sie dann in die *plume*-Aufnahmen projiziert, ist schnell ersichtlich, daß ein Tröpfchen des Paares im Tropfeninneren liegen müßte.

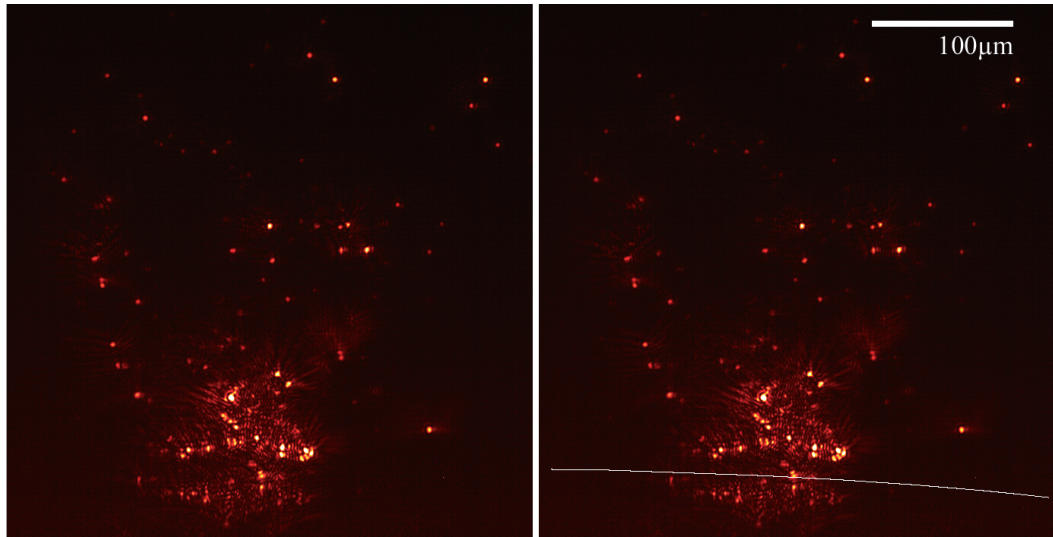


Abbildung 4.22: Reflektion des Bildes von Tröpfchen an der Tropfenoberfläche, a) ohne und b) mit projizierter Tropfenoberfläche (90°-Anordnung, einfallender Beleuchtungsstrahl von links)

Strahleneffekt

Bei der 90°-Anordnung fallen strahlenartige Strukturen auf, die vom Desorptionszentrum auszugehen scheinen und für Partikelströme gehalten werden können. Bei genauerer Analyse der Aufnahmen fällt allerdings auf, daß diese Strahlen auch von Tröpfchen im *plume* ausgehen. Abbildung 4.23b zeigt desweiteren, daß auch Strahlen von hellen Zentren des Reflektionsbildes ausgehen. Als Reflektionen der oberen Strahlen müßten sie nach unten weisen; sie entsprechen jedoch in ihrer Ausrichtung eher der Punktsymmetrie der oberen Strahlen und weisen damit darauf hin, daß ein sekundäres Phänomen vorliegt, das nicht mit der Kinetik des *plumes* korreliert ist.

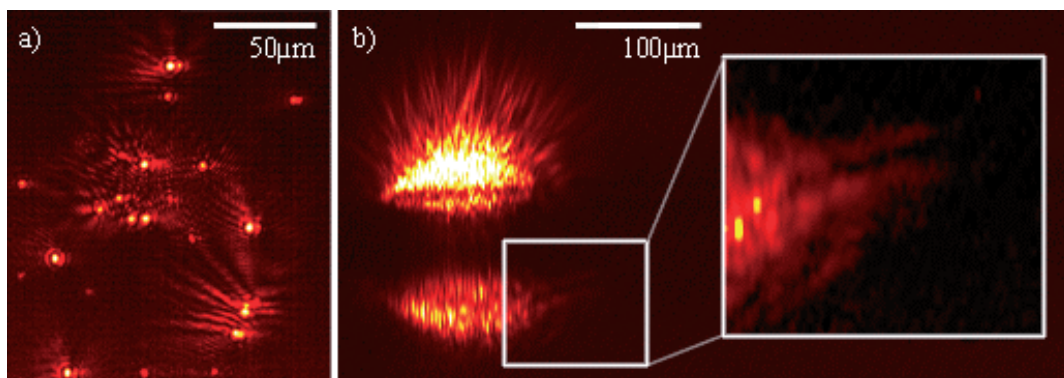


Abbildung 4.23: Strahlenmuster bei der 90°-Anordnung a) an isolierten Tröpfchen (ca. 150µm über der Tropfenoberfläche, $\tau_{ph} = 10\mu s$), b) am *plume*-Zentrum und dessen Reflektionsbild an der Tropfenoberfläche ($\tau_{ph} = 400ns$)

Es handelt sich vermutlich um einen optischen Effekt, der durch Streuung oder Beugung auf der Strecke zwischen Streuort und Kamerasensor verursacht wird. Daß dieser Effekt nicht bei der Dunkelfeld-Anordnung zu beobachten ist, läßt sich auf die bis zu zwei Größenordnungen höheren Bestrahlungswerte des Beleuchtungslasers bei der 90°-Beleuchtung zurückführen.

Nicht sichtbare *plume*-Front

Bei den Dunkelfeldaufnahmen fällt auf, daß die vorderste Front des sich ausbreitenden *plumes* nicht sichtbar ist. Die meisten Hochgeschwindigkeitsphotographien, die zur Laserablation bei der Materialbearbeitung in Publikationen zu finden sind, wurden bei Atmosphärendruck aufgenommen. Für die Vergleichbarkeit mit der MALDI mußten die Experimente dieser Arbeit jedoch so ausgeführt werden, daß der *plume* im Hochvakuum expandiert. Der Brechzahlunterschied zwischen Luft und Vakuum ist für die Dunkelfeldanordnung kritisch. Abbildung 4.24 zeigt, daß unter Atmosphärendruck auch mit dem vorliegenden Aufbau mehr Bildinformationen gewonnen werden können.

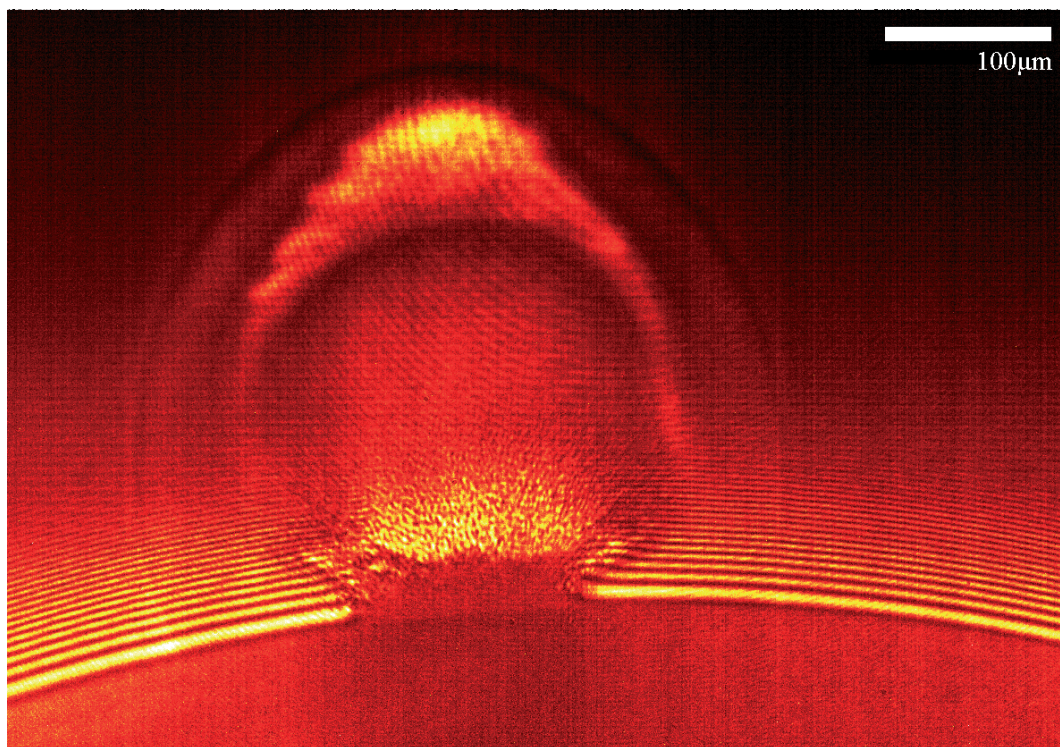
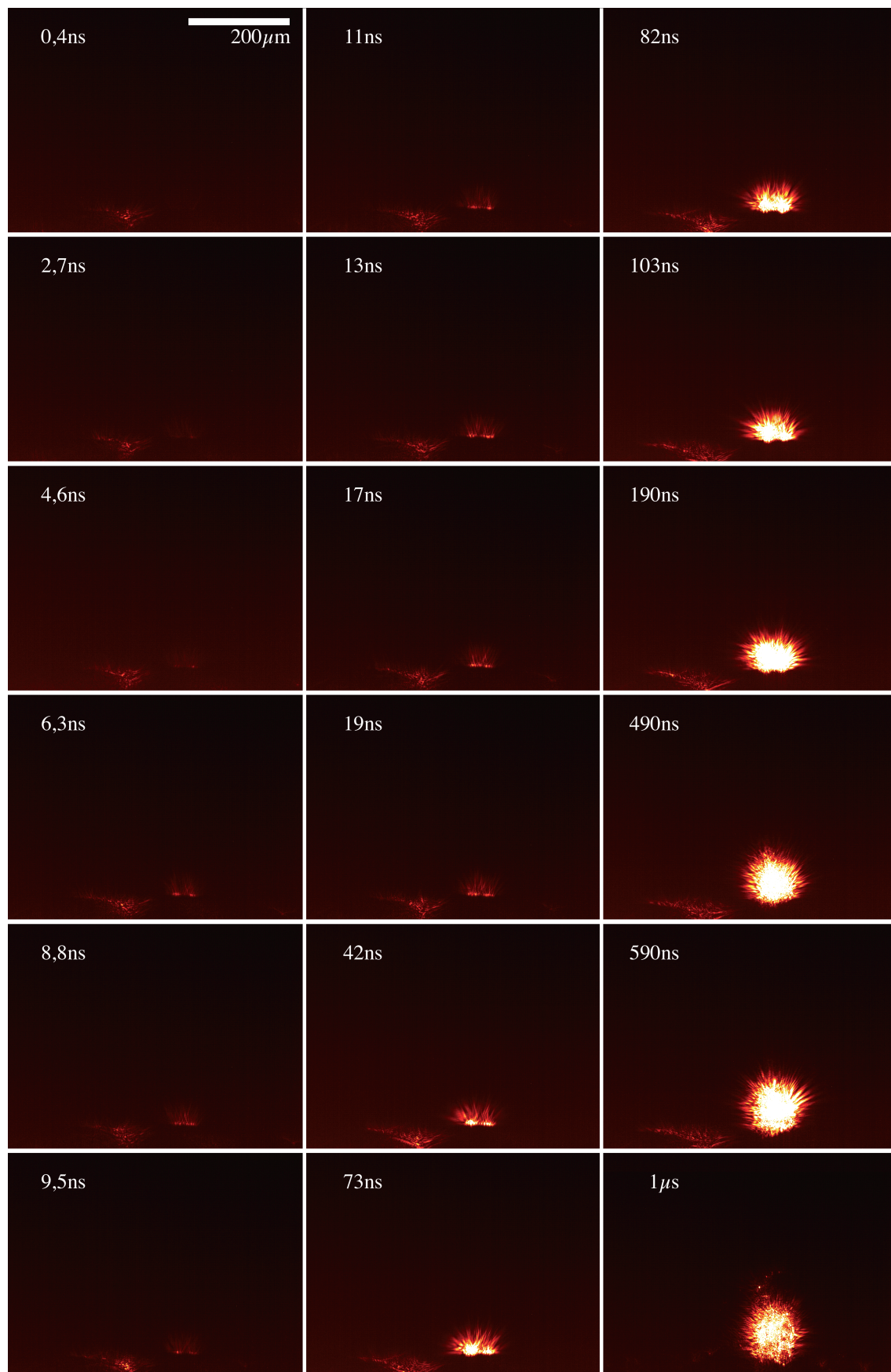


Abbildung 4.24: *plume* unter Atmosphärendruck, Dunkelfeld-Aufnahme (parallele Spaltorientierung), Desorptionslaser OPO, $\tau_{ph} = 230\text{ns}$

4.2.2 Serien der zeitlichen *plume*-Entwicklung

Zunächst werden die Bildserien (eine Serie pro Doppelseite) dargestellt, die den *plume* in seiner zeitlichen Entwicklung unter den jeweiligen Versuchsbedingungen (Desorptionslaser, Beleuchtungsmethode) zeigen.

Die Zeitdifferenz τ_{ph} zwischen Desorptionslaser und Beleuchtungslaser steht bei jedem Bild als Index in der oberen linken Ecke. Wegen eines technischen Defektes stehen die Bilder einer Teilserie (Dunkelfeld-Anordnung für den OPO mit orthogonaler Spaltausrichtung) nur bis zu einigen hundert Nanosekunden zur Verfügung.



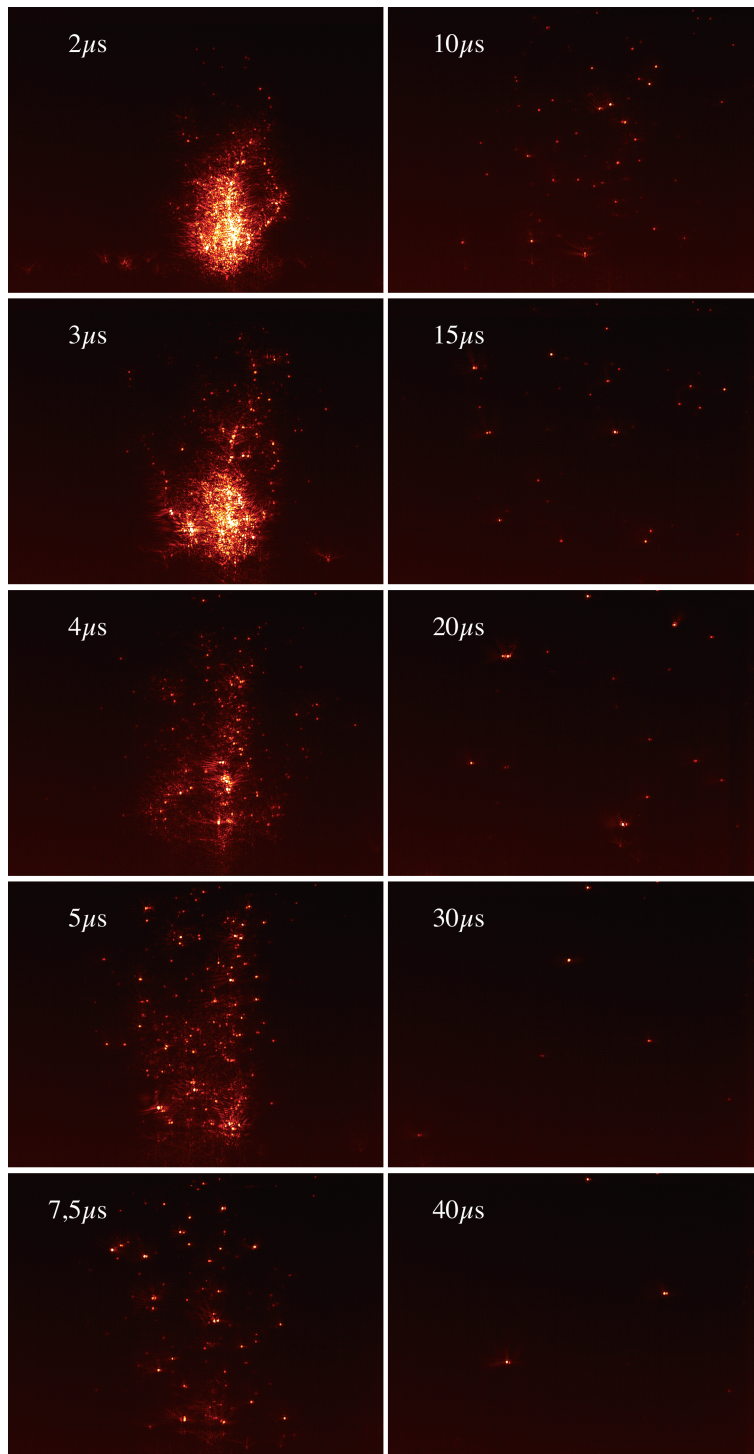
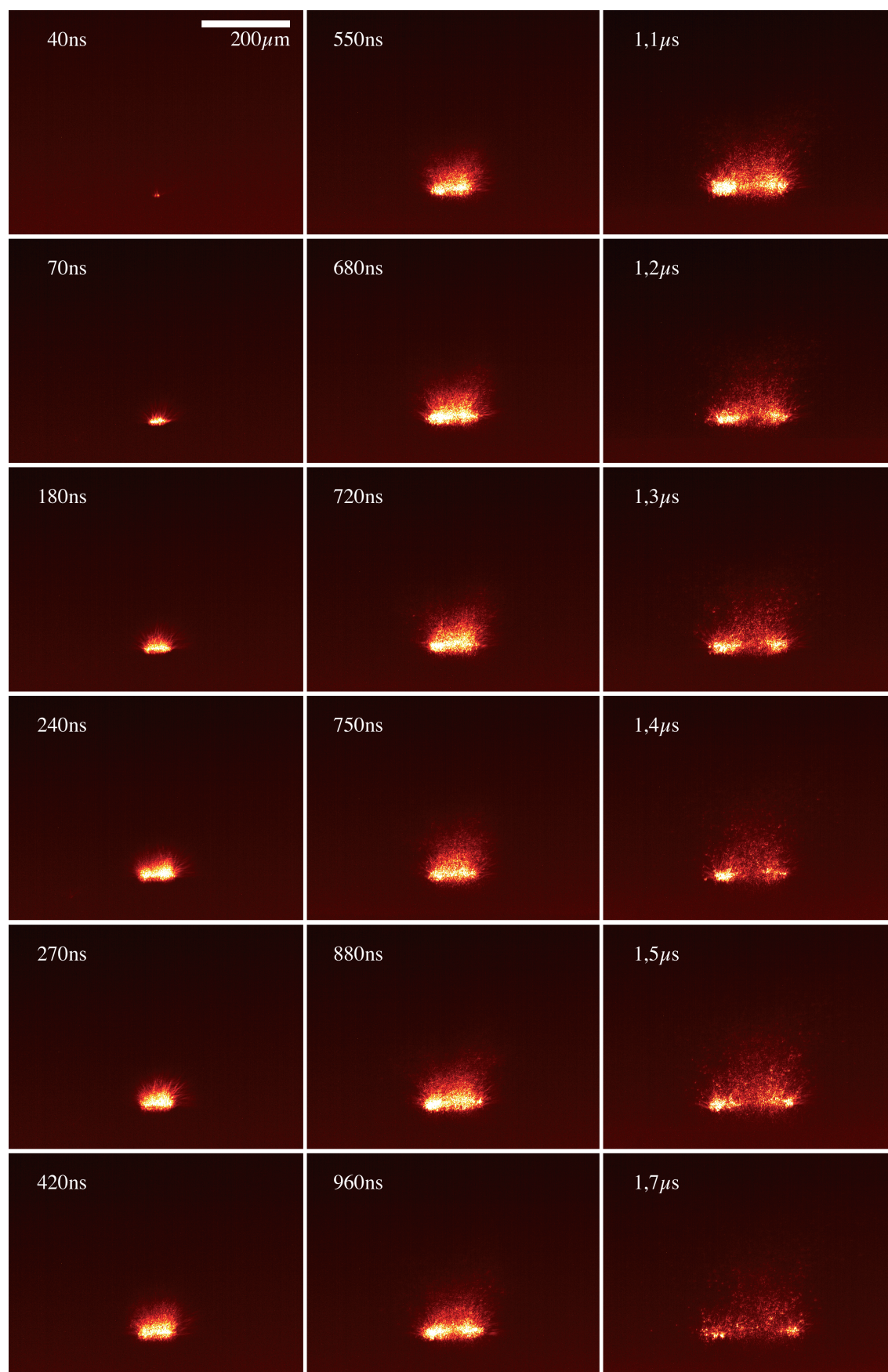


Abbildung 4.25: 90°-Beleuchtung, Desorptionslaser OPO, $H_{\text{des}} = 2800 \text{ Jm}^{-2}$, Laserfokusbereich 108 μm , τ_{ph} als Index angegeben



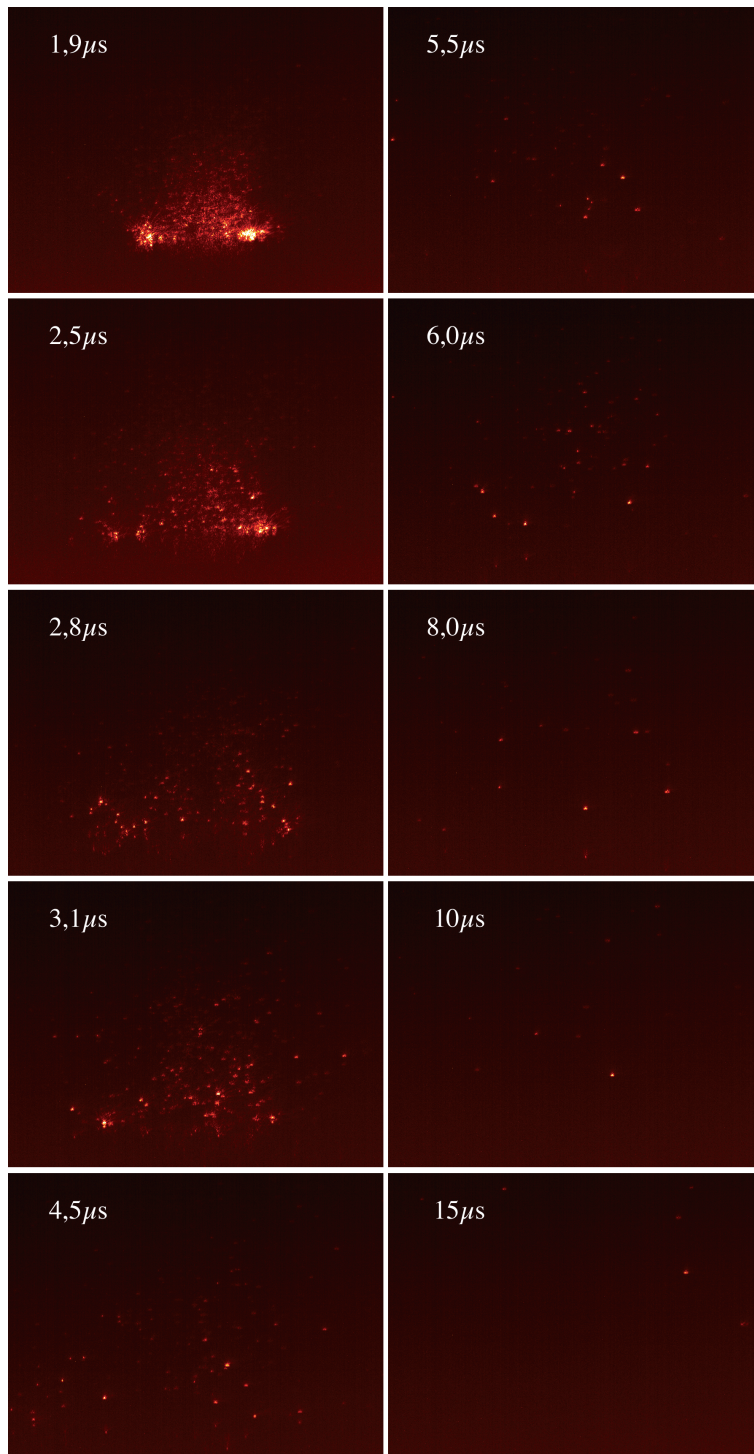


Abbildung 4.26: 90°-Beleuchtung, Desorptionslaser Er:YAG, $H_{\text{des}} = 5200 \text{ Jm}^{-2}$, Laserfokusdurchmesser $131 \mu\text{m}$, τ_{ph} als Index angegeben



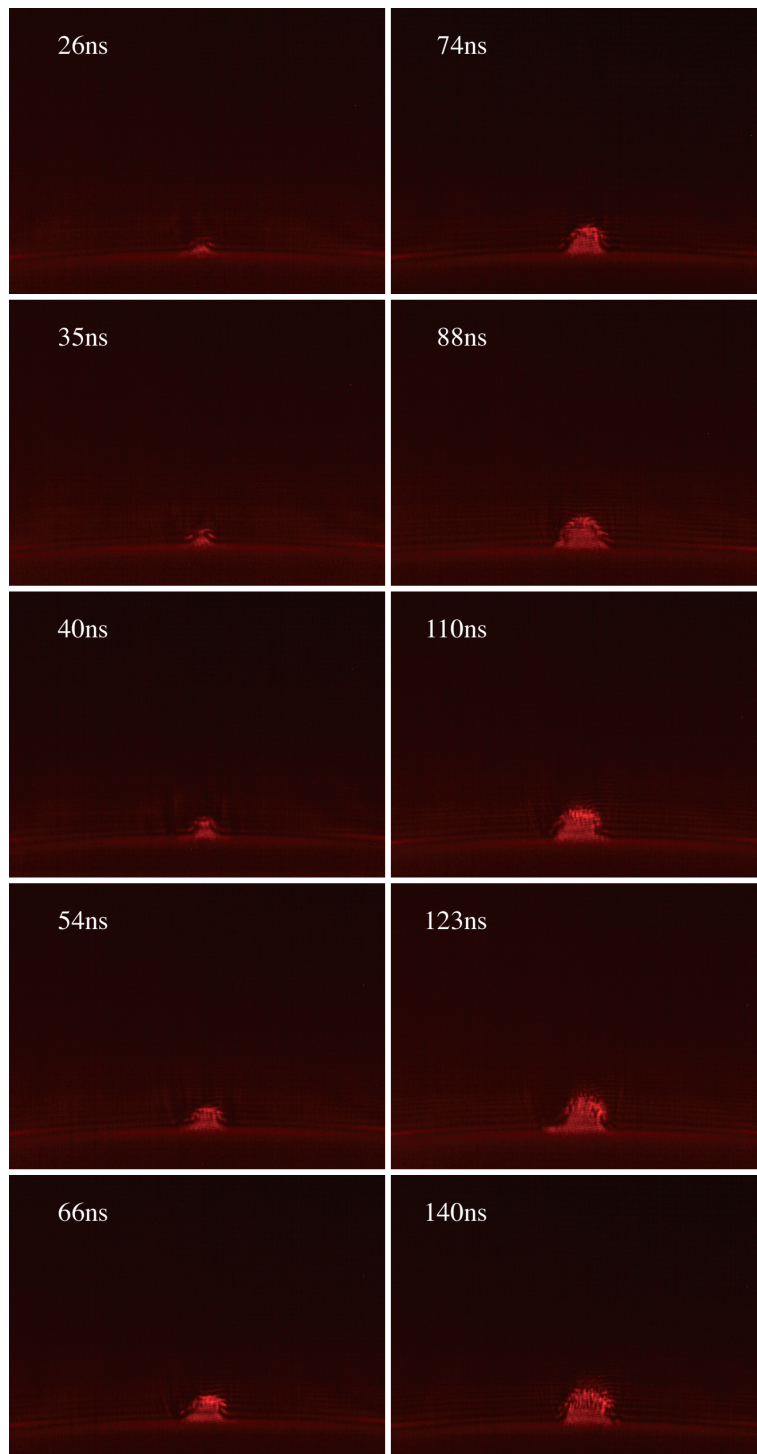
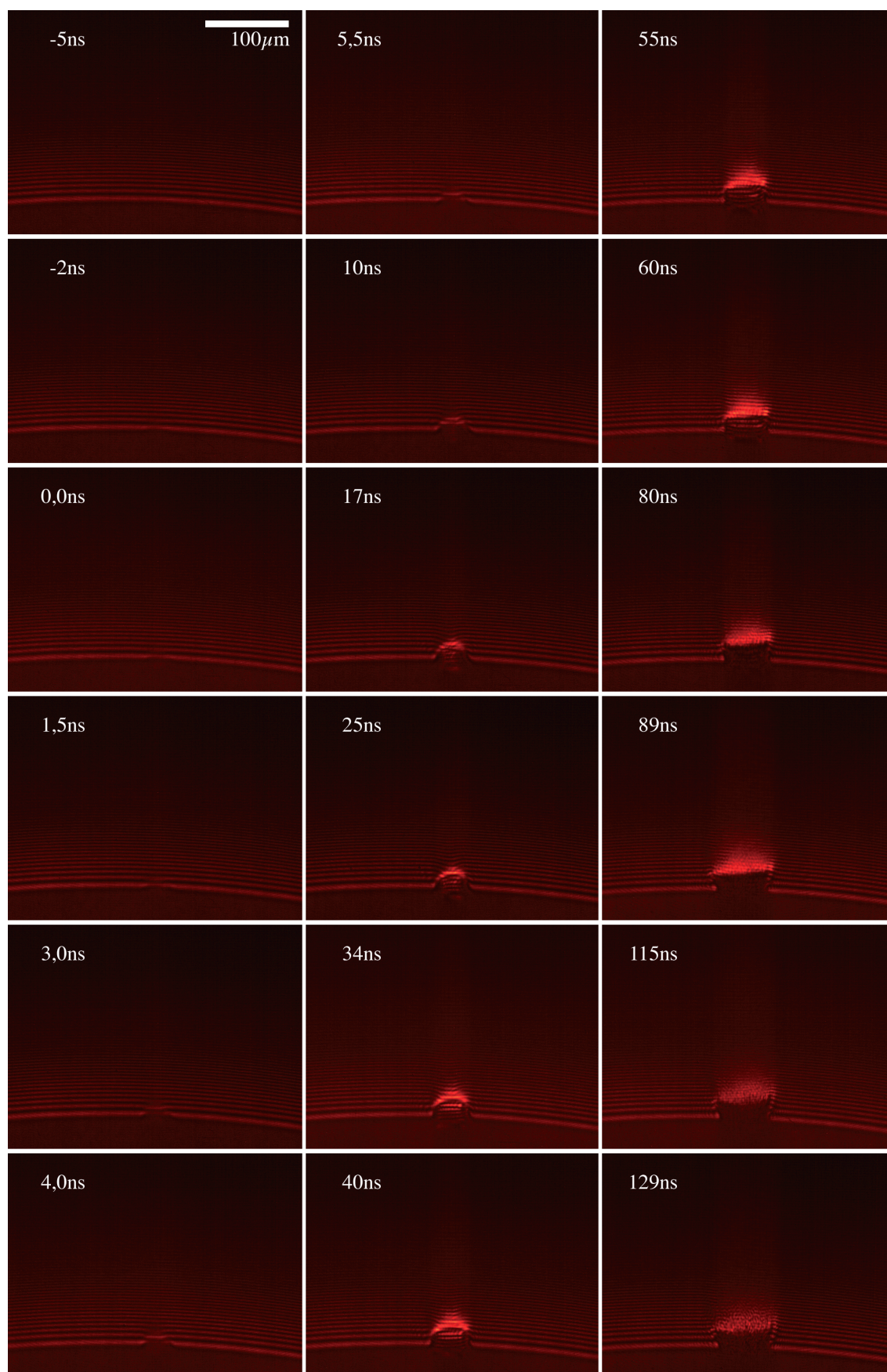


Abbildung 4.27: Dunkelfeld-Beleuchtung, Spalt orthogonal, Desorptionslaser OPO, $H_{\text{des}} = 2800 \text{ Jm}^{-2}$, Laserfokusdurchmesser $108 \mu\text{m}$, τ_{ph} als Index angegeben



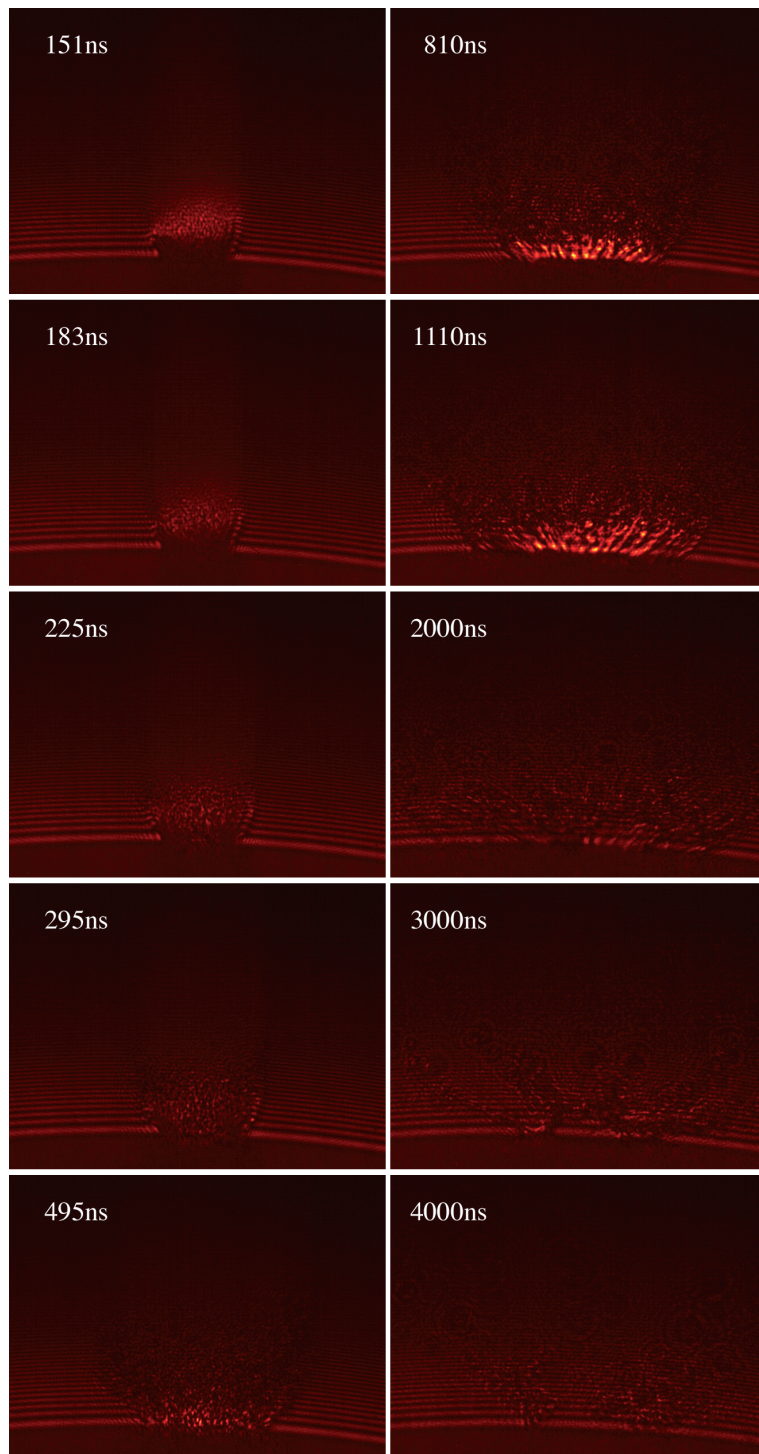
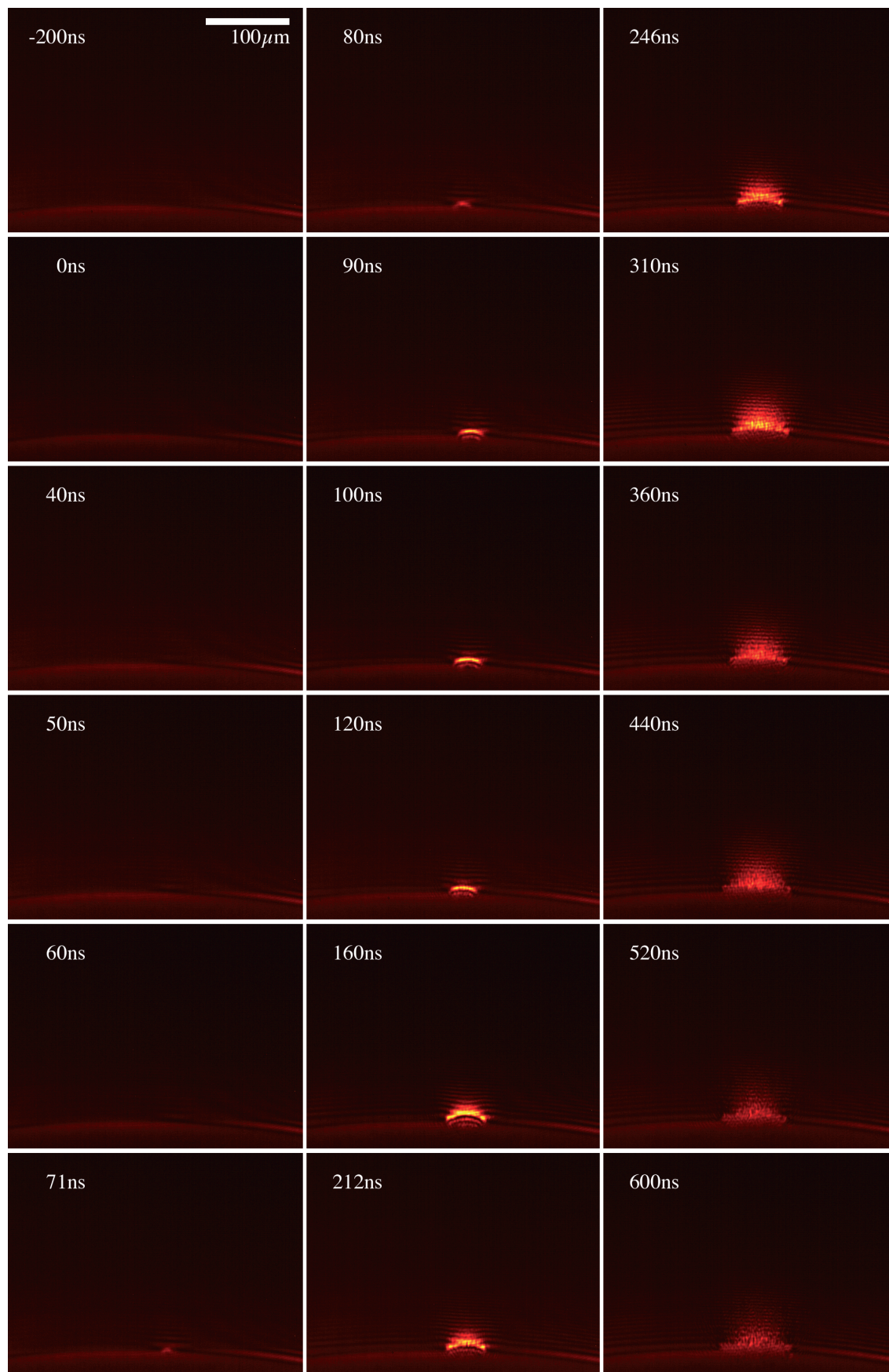


Abbildung 4.28: Dunkelfeld-Beleuchtung, Spalt parallel, Desorptionslaser OPO, $H_{\text{des}} = 2800 \text{Jm}^{-2}$, Laserfokusdurchmesser $108 \mu\text{m}$, τ_{ph} als Index angegeben



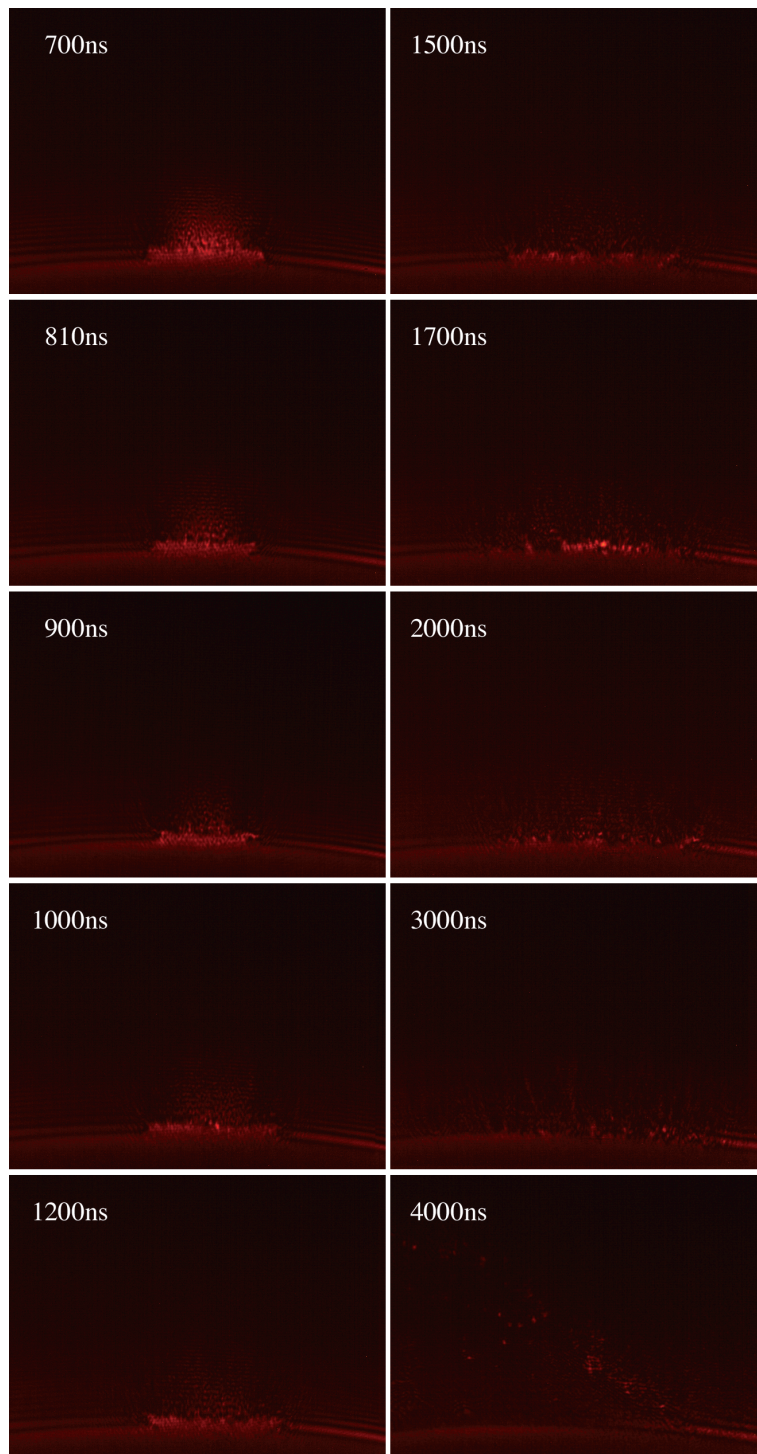
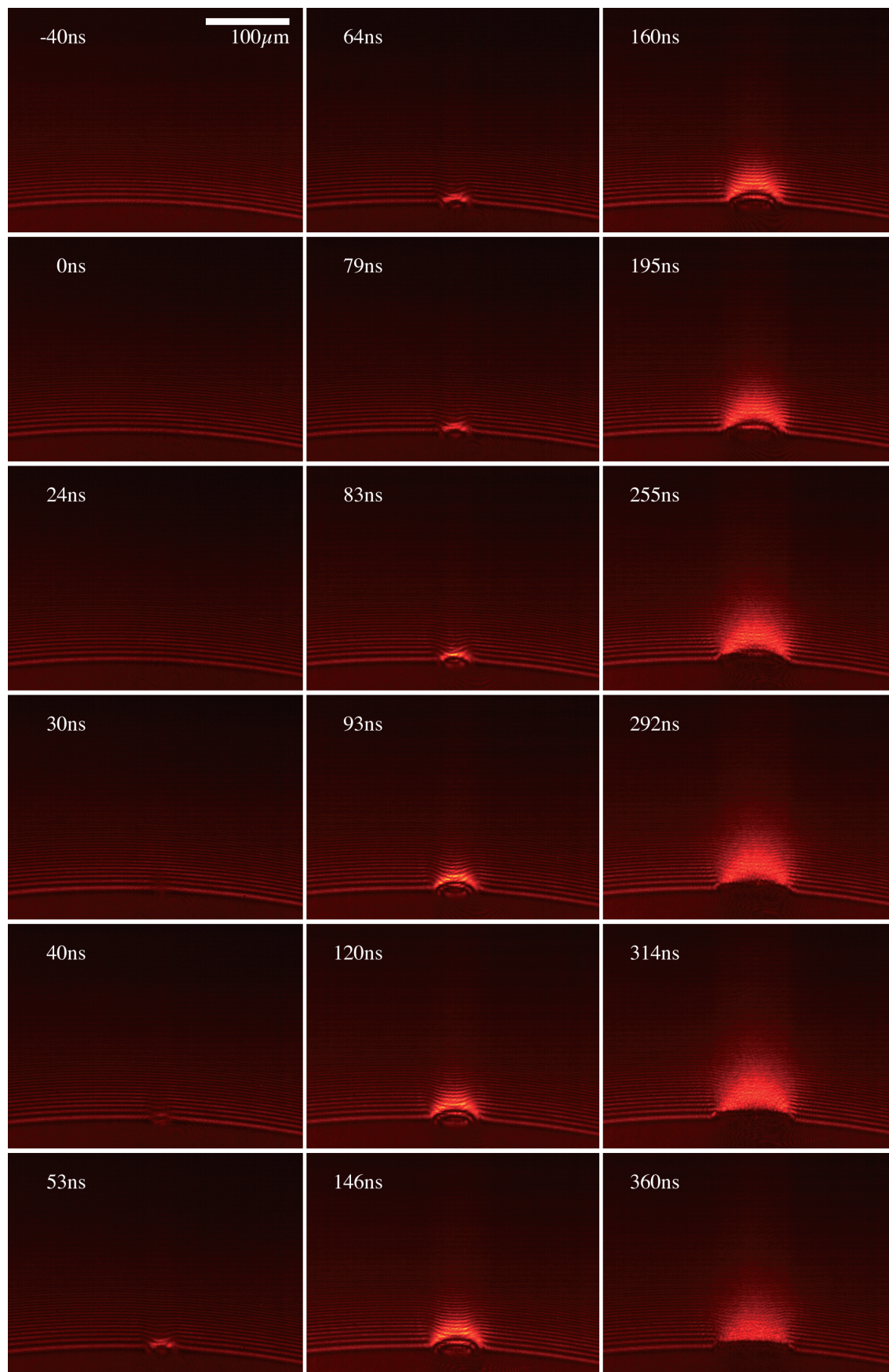


Abbildung 4.29: Dunkelfeld-Beleuchtung, Spalt orthogonal, Desorptionslaser Er:YAG, $H_{\text{des}} = 5200\text{Jm}^{-2}$, Laserfokusdurchmesser $131\mu\text{m}$, τ_{ph} als Index angegeben



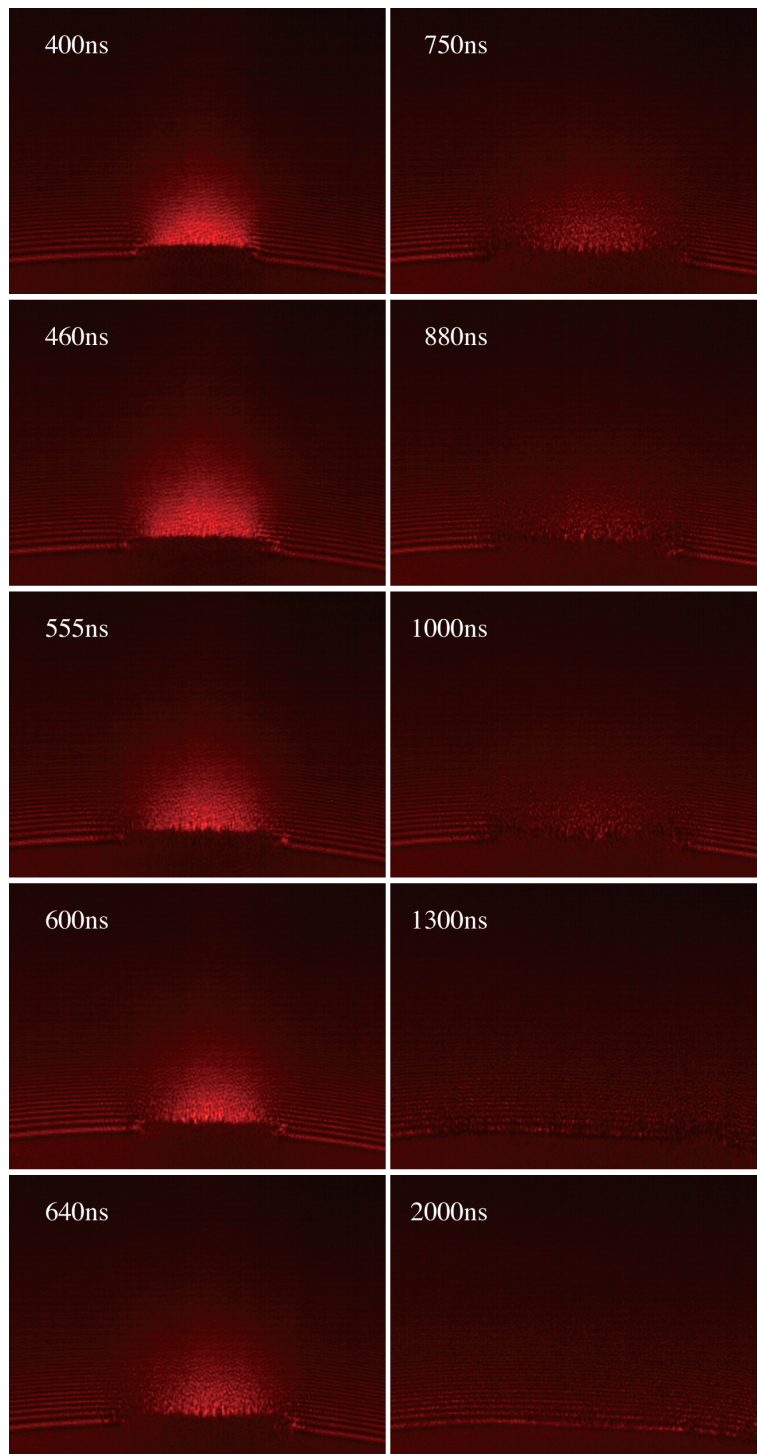


Abbildung 4.30: Dunkelfeld-Beleuchtung, Spalt parallel, Desorptionslaser Er:YAG, $H_{\text{des}} = 5200\text{Jm}^{-2}$, Laserfokusdurchmesser $131\mu\text{m}$, τ_{ph} als Index angegeben

4.2.3 Vergleich von OPO und Er:YAG-Laser

Abschnitte der *plume*-Entwicklung

Die Expansion des *plumes* kann in vier Bereiche unterteilt werden. Über den ersten Abschnitt, in dem zwar schon Laserstrahlung absorbiert wird, jedoch noch keine makroskopische Veränderung der kondensierten Phase auftritt, gibt dieses Experiment offensichtlich keine Auskunft. In einem zweiten Schritt findet eine Expansion kleiner Partikel und einzelner Moleküle (Gasphase) statt. Während des dritten Abschnittes treten vermehrt größere Strukturen im *plume* auf, die vom Kamerasystem aufgelöst werden. In einer abschließenden und langanhaltenden Phase verschwindet der Gasphasenanteil im *plume* fast vollständig, und es bleiben vereinzelte Tröpfchen, deren Position relativ zur ursprünglichen Desorptionsfläche scheinbar keiner Systematik unterliegt.

Die verschiedenen eingesetzten Beleuchtungsmethoden eignen sich unterschiedlich gut zur Beurteilung der *plume*-Phasen. Während die Dunkelfeld-Anordnung zur Beobachtung der Gasphasen besonders gut geeignet ist, bereiten bei der 90°-Anordnung für kurze τ_{ph} die auf Seite 57 beschriebenen Strahleneffekte häufig ein Problem. Sie überdecken die Bildinformationen, die vom *plume* selbst erlangt werden sollen. Obwohl diese Aufnahmen somit keine oder nur wenig Aussage über die Gestalt des anfänglichen *plumes* geben, erlauben sie eine qualitative Beurteilung darüber, zu welchem Zeitpunkt die *plume*-Expansion einsetzt und bestätigen somit die Ergebnisse der Dunkelfeld-Experimente.

Die Spätphase der *plume*-Entwicklung wird vor allem durch größere Tröpfchen über dem Desorptionsgebiet bestimmt. Deren Detektion gelingt besonders gut mit der 90°-Anordnung. Die zweifache Reflektion an Tröpfchen (vgl. Seite 56) unterstützt dabei die Vermessung der Tröpfchendurchmesser.

Beginn der Expansion

Die folgende Abbildung 4.31 zeigt die Zeiträume, in denen erste Veränderungen der bestrahlten Oberfläche auftreten. Dabei sind jeweils Dunkelfeld-Aufnahmen mit orthogonaler und paralleler Spaltgeometrie für die Desorption mit dem OPO bzw. dem Er:YAG-Laser nebeneinandergestellt.

Erste Anzeichen einer *plume*-Expansion sind bei Bestrahlung mit dem OPO für $\tau_{ph} = 0\text{ns} \pm 2\text{ns}$ und mit dem Er:YAG-Laser für $\tau_{ph} = 35\text{ns} \pm 10\text{ns}$ zu beobachten. Es kann also festgestellt werden, daß die Expansion jeweils etwa kurz vor dem Erreichen des Intensitätsmaximums des Lasers einsetzt.

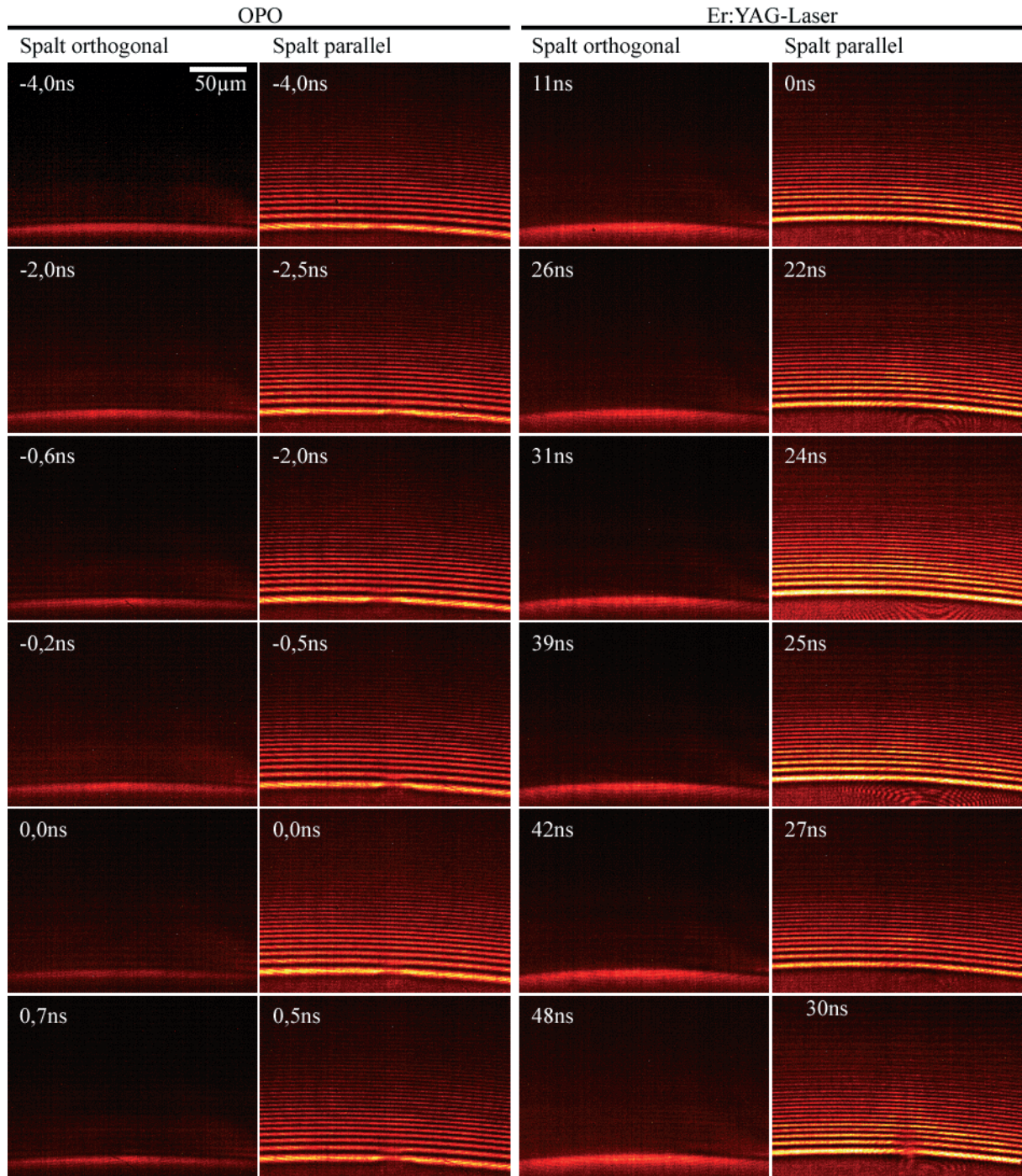


Abbildung 4.31: Beginn der *plume*-Expansion beim OPO ($H_{\text{des}} = 2800 \text{ Jm}^{-2}$, Laserfokusbereich $108 \mu\text{m}$) und beim Er:YAG-Laser ($H_{\text{des}} = 5200 \text{ Jm}^{-2}$, Laserfokusbereich $131 \mu\text{m}$) als Desorptionslaser, Dunkelfeld-Aufnahmen mit orthogonaler und paralleler Spaltorientierung

Gasphasenexpansion

Um die weitere zeitabhängige Expansion des *plumes* für die beiden unterschiedlichen Desorptionslaser OPO und Er:YAG-Laser vergleichen zu können, sind in der folgenden Abbildung 4.32 jeweils zwei Dunkelfeld-Aufnahmen nebeneinandergestellt, die eine etwa vergleichbare Ausdehnung der Gasphase zeigen. Die erste Zeile zeigt zunächst Aufnahmen, auf denen noch keine Anzeichen einer Veränderung auftreten. Eine erste deutliche Auswölbung ist für den OPO bei $\tau_{\text{ph}} = 10 \text{ ns}$ und für den Er:YAG-Laser bei $\tau_{\text{ph}} = 50 \text{ ns}$ zu sehen.

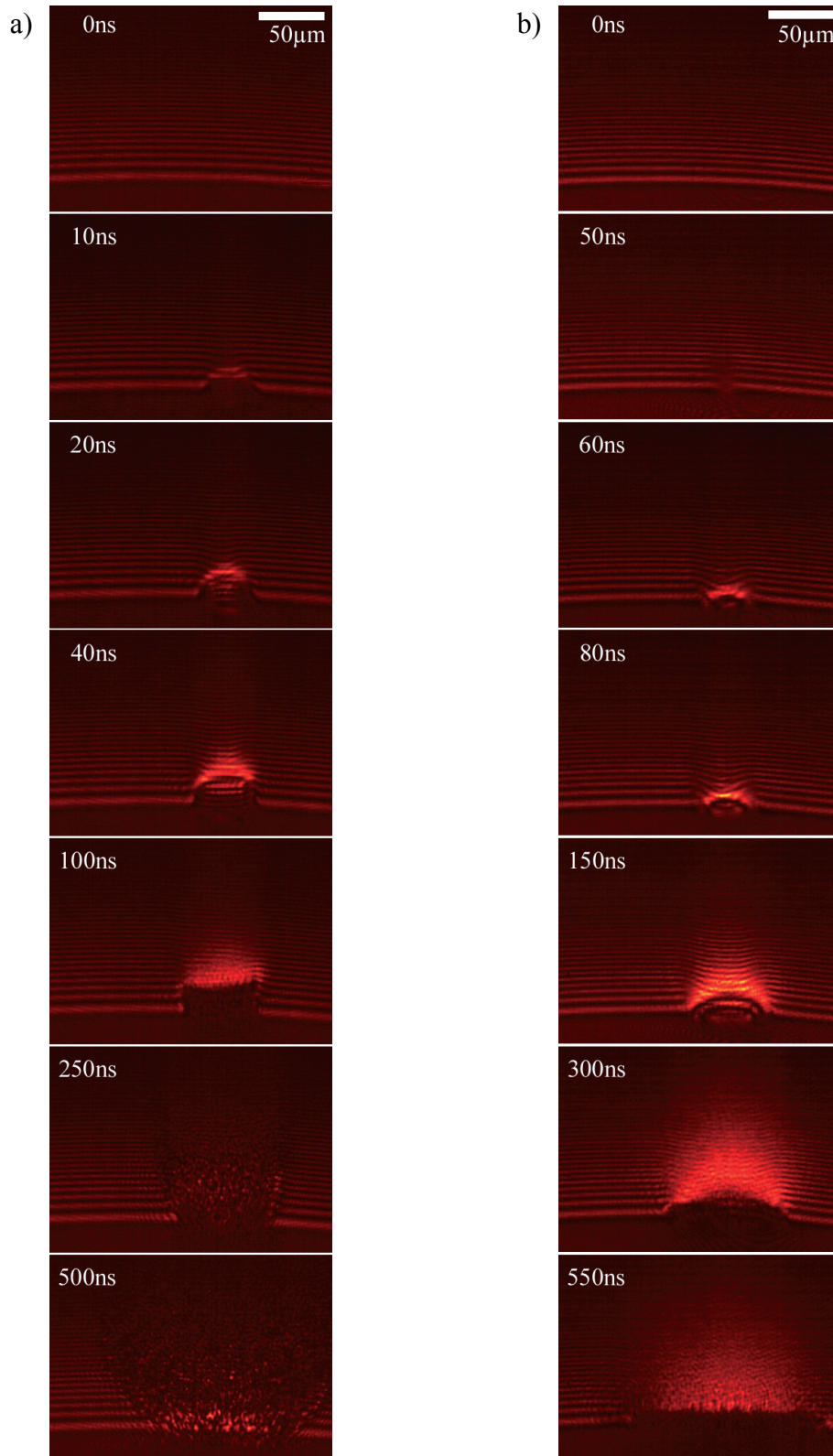


Abbildung 4.32: Dunkelfeld-Aufnahmen (parallele Spaltorientierung), zeitliche Entwicklung des *plumes* für a) OPO ($H_{\text{des}} = 2800 \text{ Jm}^{-2}$, Laserfokusbereich 108 µm) und b) Er:YAG-Laser ($H_{\text{des}} = 5200 \text{ Jm}^{-2}$, Laserfokusbereich 131 µm) als Desorptionslaser

Die Dunkelfeld-Aufnahmen mit parallel ausgerichtetem optischen Spalt, die die seitliche, also vertikale *plume*-Grenze gut wiedergeben, zeigen einen drastischen Unterschied zwischen den *plume*-Formen nach Bestrahlung mit dem OPO und dem Er:YAG-Laser. Während für den OPO der *plume* eine divergente, mit zunehmendem Abstand von der Tropfenoberfläche

ausbreitende Form mit verhältnismäßig scharfer seitlicher Begrenzung hat, ist für den Er:YAG-Laser der *plume* an der Basis stets am breitesten und dehnt sich annähernd gleichmäßig in alle Richtungen aus.

Auffällig ist auch der Unterschied in der Zusammensetzung des *plumes* zu fortgeschrittenen τ_{ph} : während für den Er:YAG-Laser ein weitgehend strukturloser Dichtegradient zu beobachten ist, setzt für den OPO bereits bei ca. 200ns die massive Ausbildung einer granulären Struktur ein.

Übergang zu Partikelemission

Die zunehmende Präsenz von Strukturen oberhalb der Auflösungsgrenze des Kamerasystems wird mit *line scans* quantitativ bewertet. Dabei handelt es sich um Messungen der Graustufen entlang eines durch das Bild gelegten Pfades, der in den folgenden Abbildungen durch eine rote Linie gekennzeichnet ist.

Zunächst wird der vertikale Verlauf des *plumes* ausgewertet (siehe Abbildung 4.33). Hierzu werden vier Aufnahmen aus der Serie von Abbildung 4.32 vermessen. Die Kante (roter Pfeil) zwischen der dunklen und hellen Domäne im Zentrum des *plumes*, die besonders deutlich in den Aufnahmen für $\tau_{\text{ph}} = 100\text{ns}$ und 550ns zu sehen ist, spiegelt vermutlich keine Eigenschaft des *plumes* wider, sondern entsteht durch Interferenz von Lichtstrahlen, die an der vor und hinter dem Desorptionort liegenden Tropfenoberfläche unter flachem Winkel reflektiert werden.

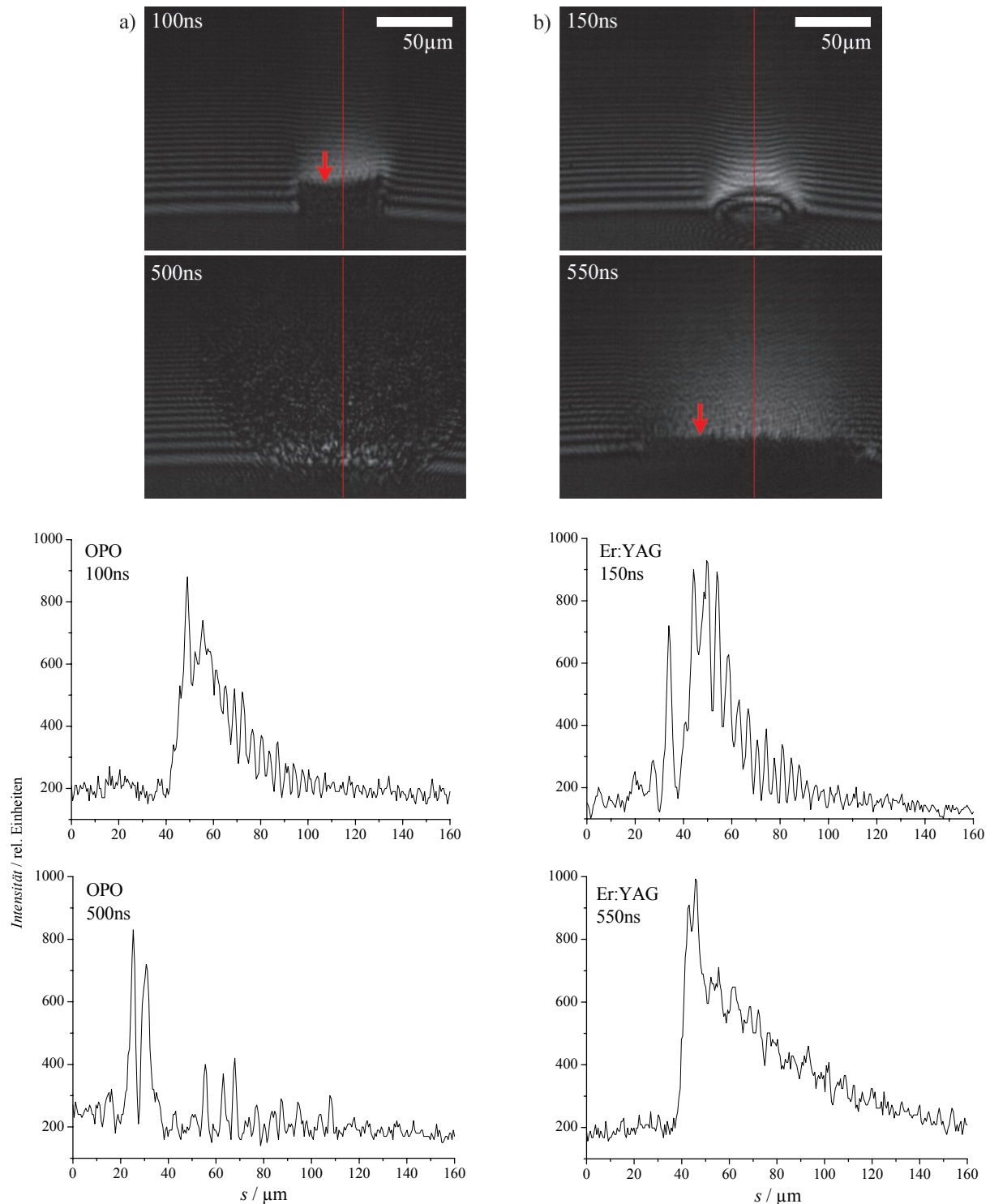
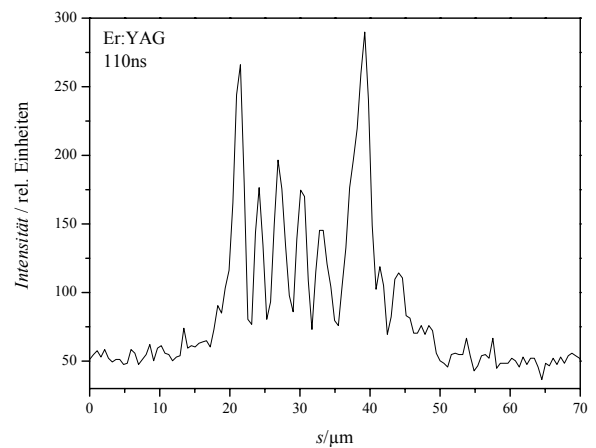
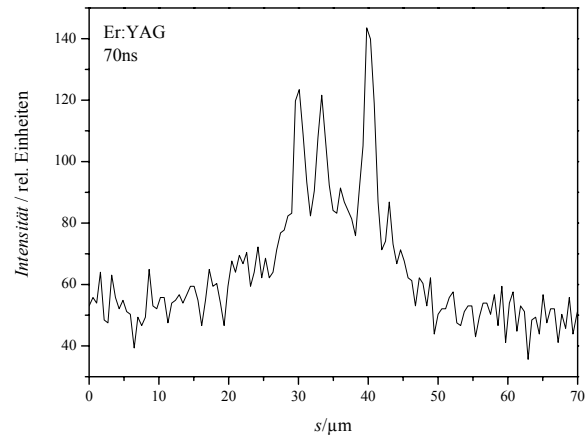
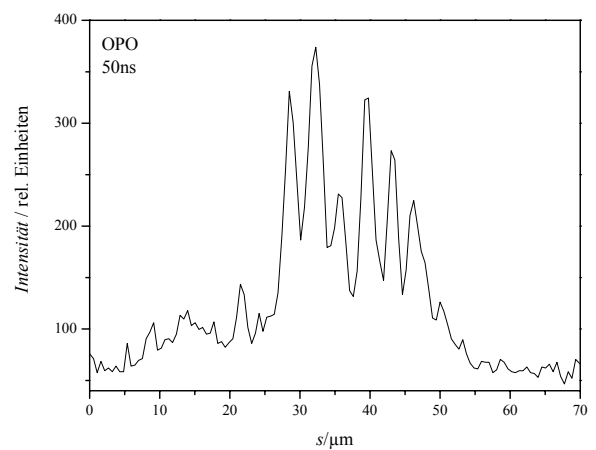
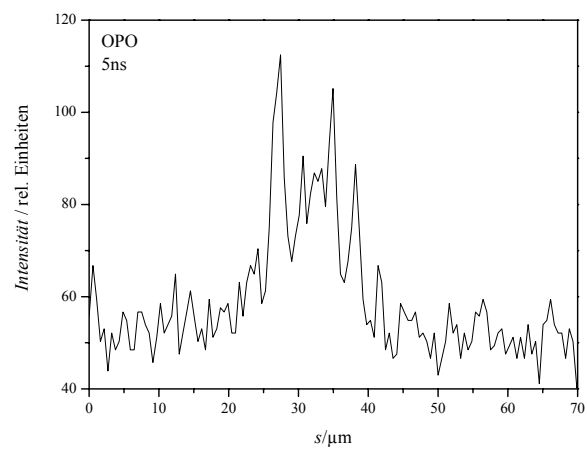
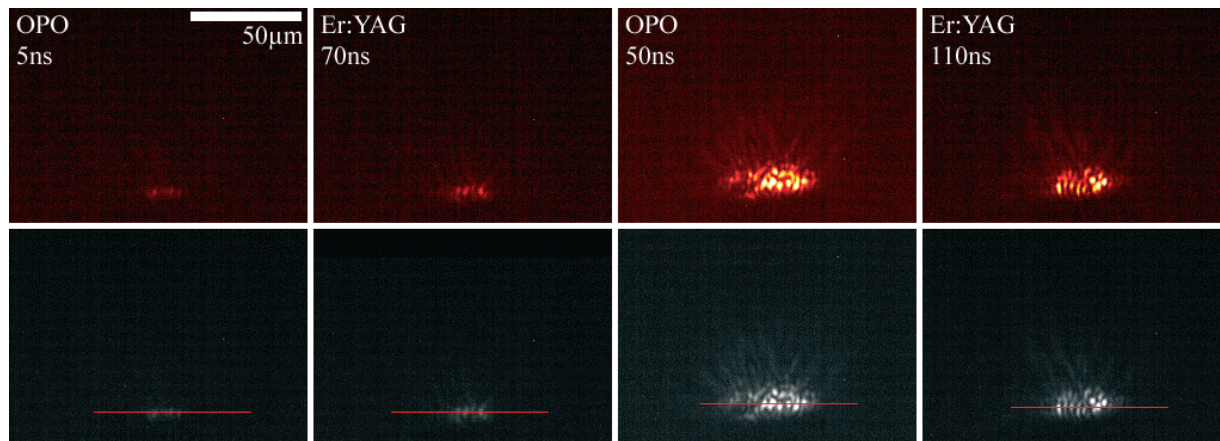


Abbildung 4.33: Dunkelfeld-Anordnung (parallele Spaltorientierung), Analyse der *plume*-Struktur anhand von *line scans* für a) OPO und b) Er:YAG-Laser als Desorptionslaser

Da bei der vertikalen Analyse die Bewertung der Feinstruktur (Partikel) durch die horizontal verlaufenden Interferenzmuster (Modulation) erheblich erschwert wird, werden im folgenden ergänzend horizontale *line scans* durchgeführt. Soweit dies möglich ist, wird dabei ein Pfad gewählt, der innerhalb eines Interferenzstreifens liegt.

Um eine bessere Übersicht der zusammengehörenden Aufnahmen und Graphen zu ermöglichen, wurden die folgenden Abbildungen paarweise auf Doppelseiten angeordnet. Es werden mit zunehmender zeitlicher Verzögerung jeweils der OPO mit dem Er:YAG-Laser als

Desorptionslaser verglichen. Die erste Doppelseite zeigt Aufnahmen der 90°-Anordnung, die darauffolgende zeigt die entsprechenden Serien der Dunkelfeld-Anordnung. Die photographischen Aufnahmen sind jeweils in Falschfarbdarstellungen und darunter in Graustufen abgebildet. Dies soll Gelegenheit geben, die Bildinformation kontrastreich und ohne überdeckende Elemente zu begutachten und andererseits den Verlauf des Pfades nachzuvollziehen.



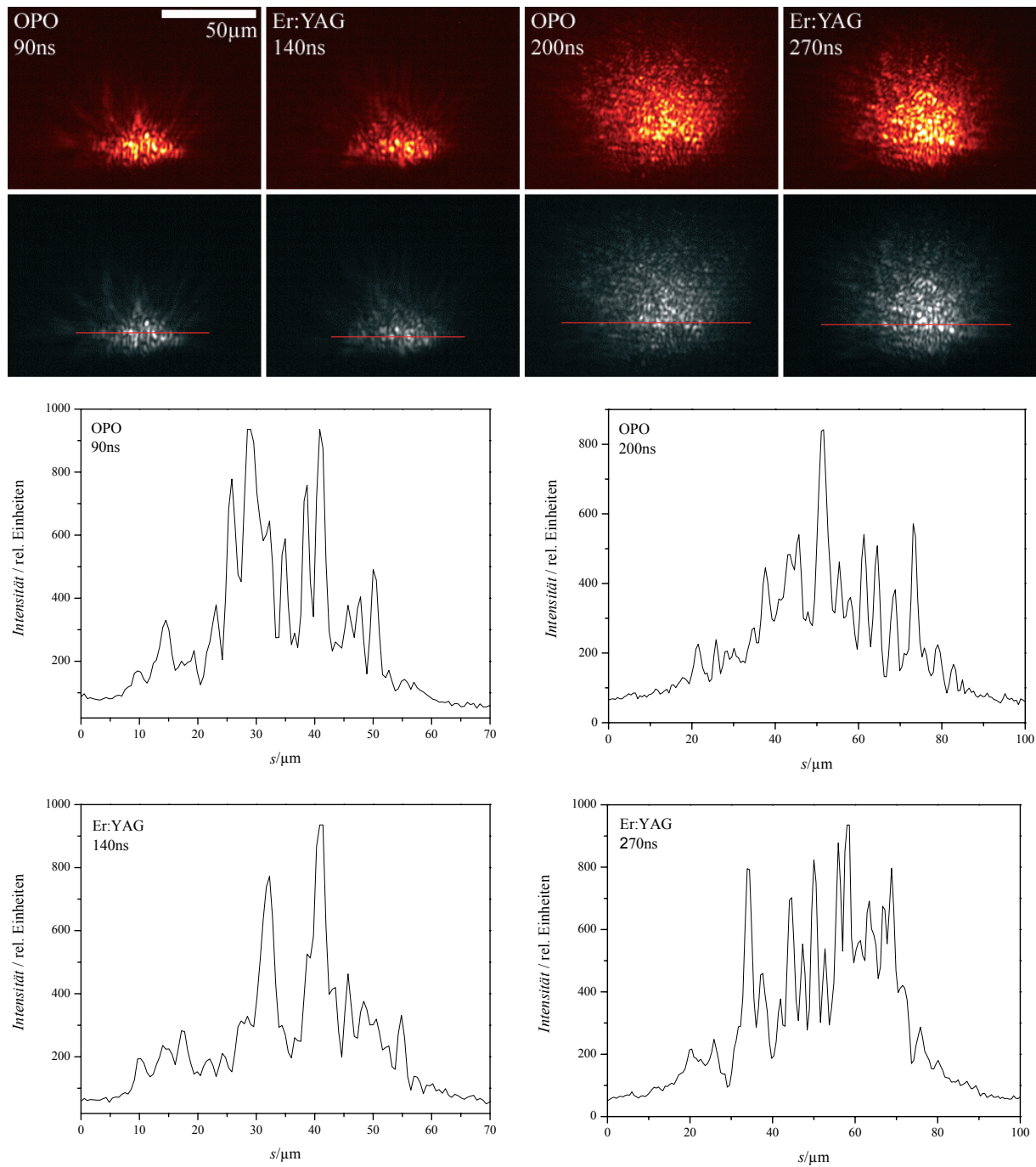
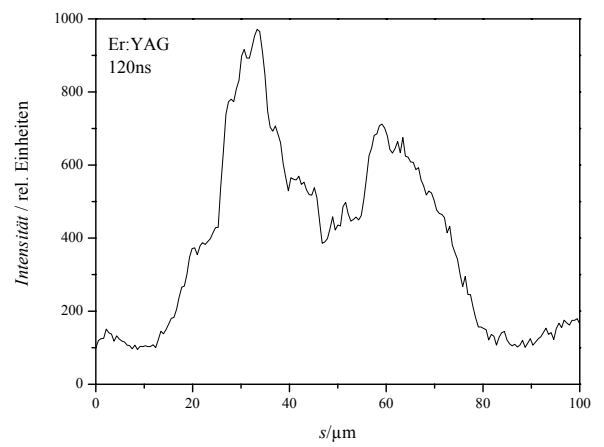
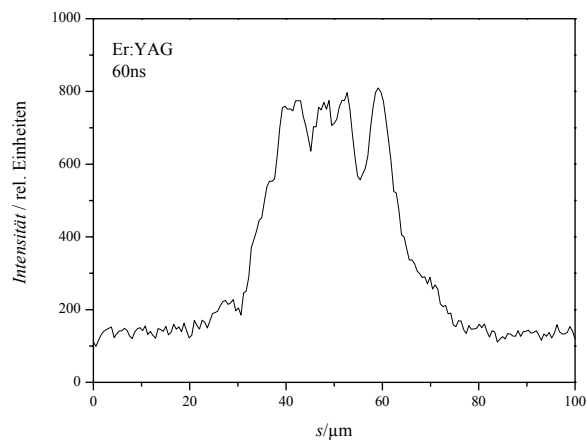
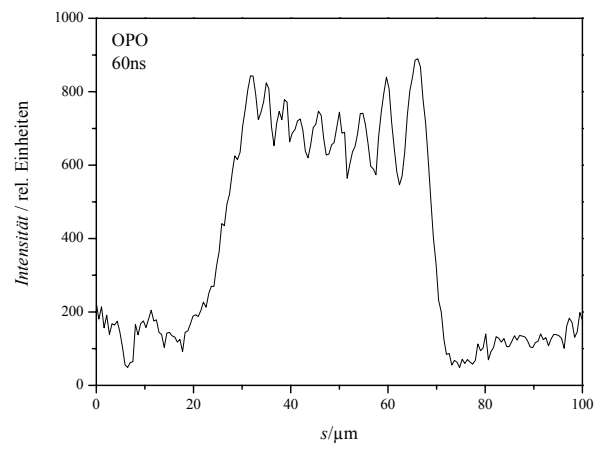
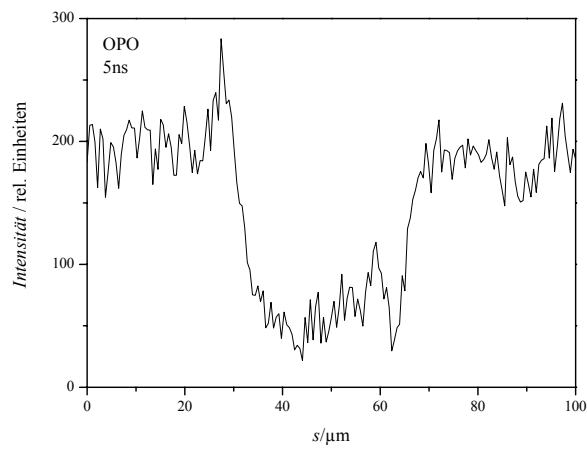
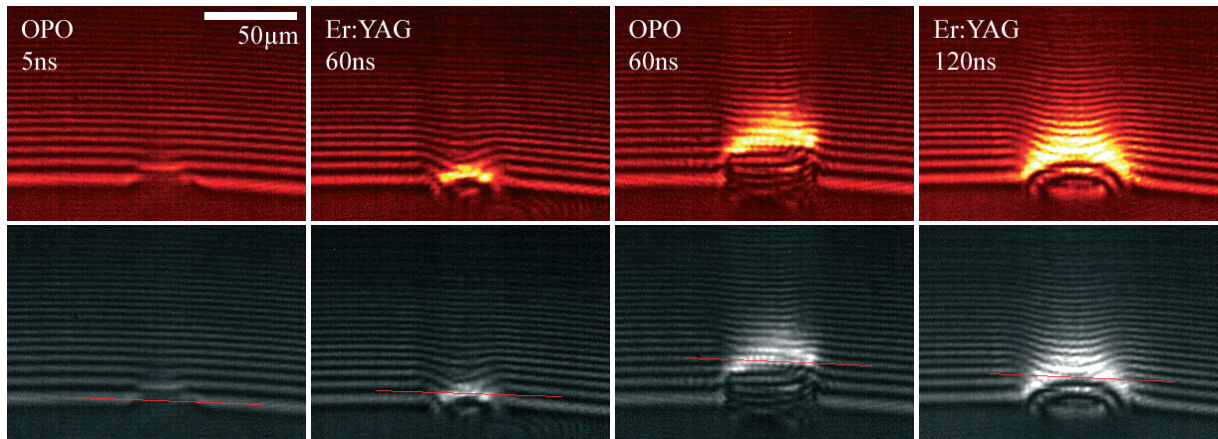


Abbildung 4.34: 90°-Anordnung, Analyse der *plume*-Struktur anhand von *line scans*. Zu jeder Kombination von Desorptionslaser (OPO oder Er:YAG-Laser) und τ_{ph} wird die Aufnahme in Falschfarben und darunter in Graustufen mit eingezeichnetem Pfad dargestellt. Der Intensitätsverlauf entlang des Pfades ist im korrespondierenden Graphen dargestellt.



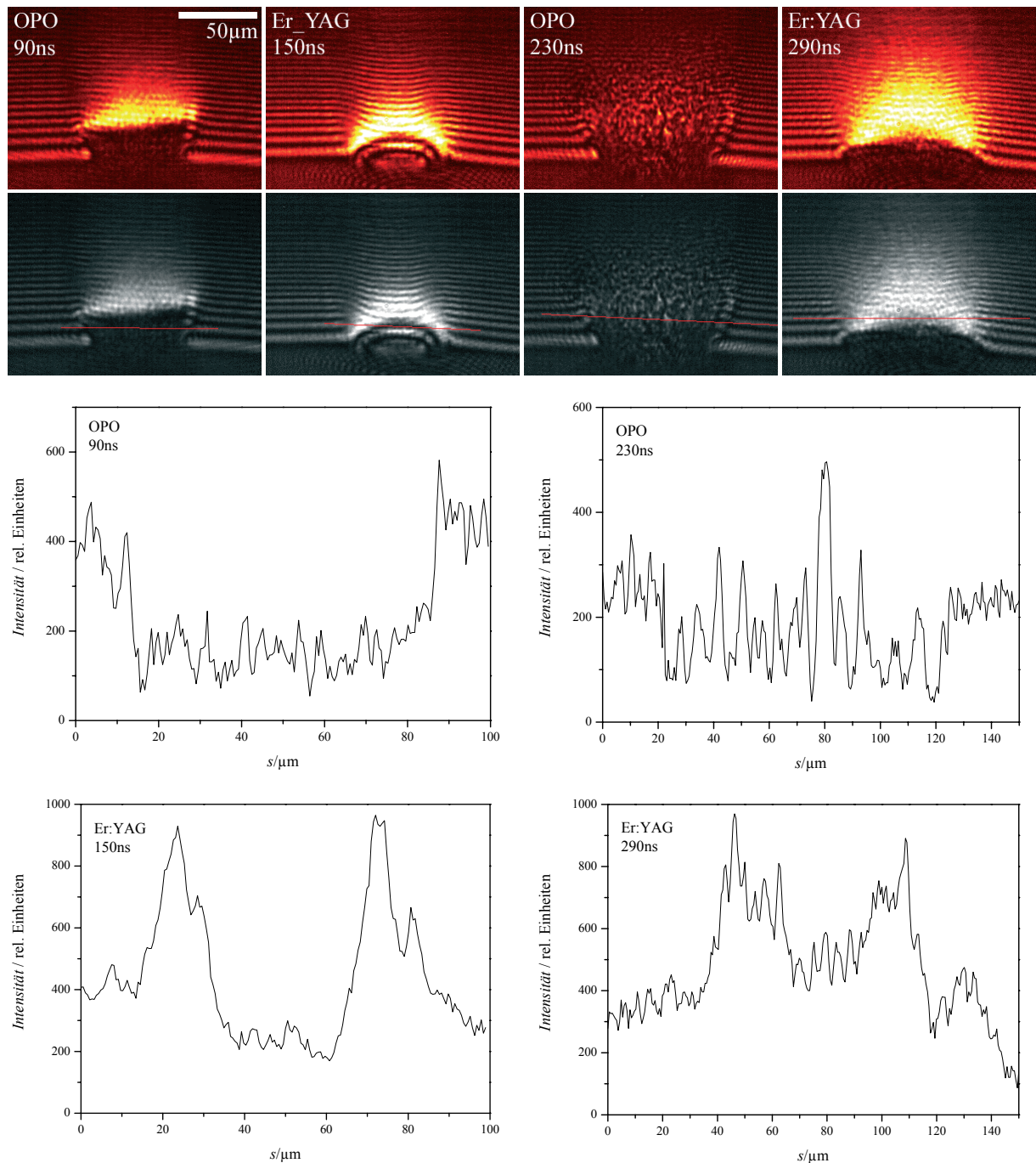


Abbildung 4.35: Dunkelfeld-Anordnung (parallele Spaltorientierung), Analyse der *plume*-Struktur anhand von *line scans*. Zu jeder Kombination von Desorptionslaser (OPO oder Er:YAG-Laser) und τ_{ph} wird die Aufnahme in Falschfarben und darunter in Graustufen mit eingezeichnetem Pfad dargestellt. Der Intensitätsverlauf entlang des Pfades ist im korrespondierenden Graphen dargestellt.

Die Analyse ergibt, daß größere Muster oberhalb der Auflösungsgrenze des Kamerasystems ab etwa 200ns (OPO) bzw. 250ns (Er:YAG-Laser) auftreten. In der unmittelbaren Gasphasendomäne ist nicht zu unterscheiden, ob die Intensitätsmodulationen durch Tröpfchen oder durch Gas hoher Dichte entstehen. Denkbar ist auch, daß mehrere Tröpfchen, deren Größen unterhalb der optischen Auflösungsgrenze liegen, innerhalb der Schärfentiefe dicht beieinander liegen.

Isolierte Tröpfchen

Nach einigen Mikrosekunden gehen die *plumes* unabhängig vom verwendeten Desorptionslaser in eine Phase über, in der nur noch einzelne Tröpfchen über dem Bestrahlungsgebiet zu beobachten sind. Diese Phase hält mehrere zehn Mikrosekunden an. Vereinzelte Tröpfchen sind noch bis zu 100 μs nach dem Desorptionslaserimpuls nachweisbar. Während der ersten 2 μs sind die Durchmesser der Tröpfchen auf ungefähr 8 μm (OPO) bzw. 5 μm (Er:YAG-Laser) beschränkt und nehmen danach tendenziell zu. Im gesamten beobachteten Zeitraum überschreiten die Tröpfchen jedoch selten 12 μm .

Für die quantitative Auswertung der Tröpfchengrößen wurde einerseits der Durchmesser der Tröpfchen (FWHM) und andererseits bei Doppelreflektionen (vgl. Seite 56) der Abstand der Reflektionen (Maxima) vermessen. Abbildung 4.36 demonstriert exemplarisch, daß die beiden resultierenden Werte hinreichend übereinstimmen.

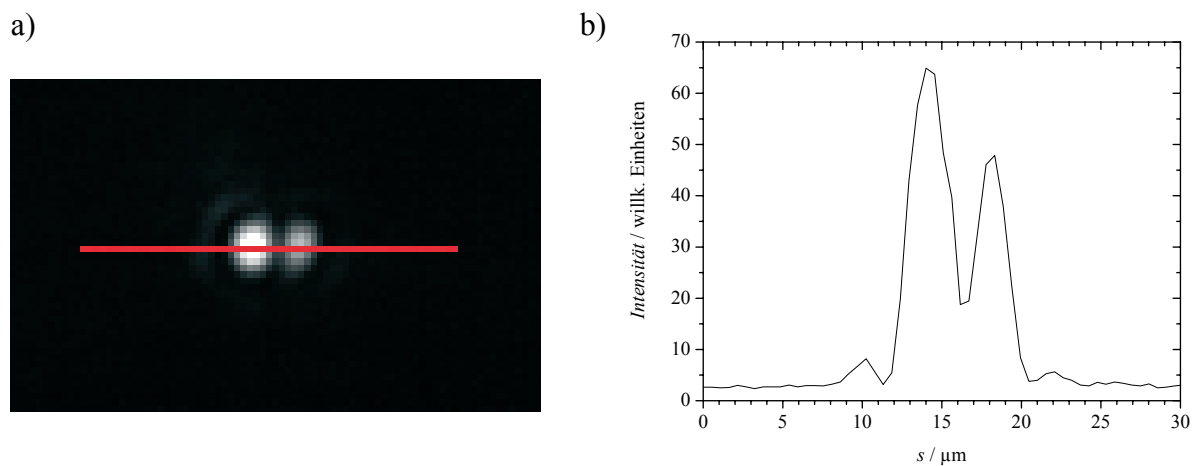


Abbildung 4.36: Bestimmung der Tröpfchengröße: der Durchmesser entspricht dem Abstand der zwei Reflektionen an einem Tröpfchen, a) Graustufenaufnahme, 90°-Anordnung, Beleuchtungslaser von links, Desorptionslaser Er:YAG-Laser, b) line scan. Der Durchmesser der intensiveren Reflektion entspricht etwa dem Abstand der beiden Reflektionen

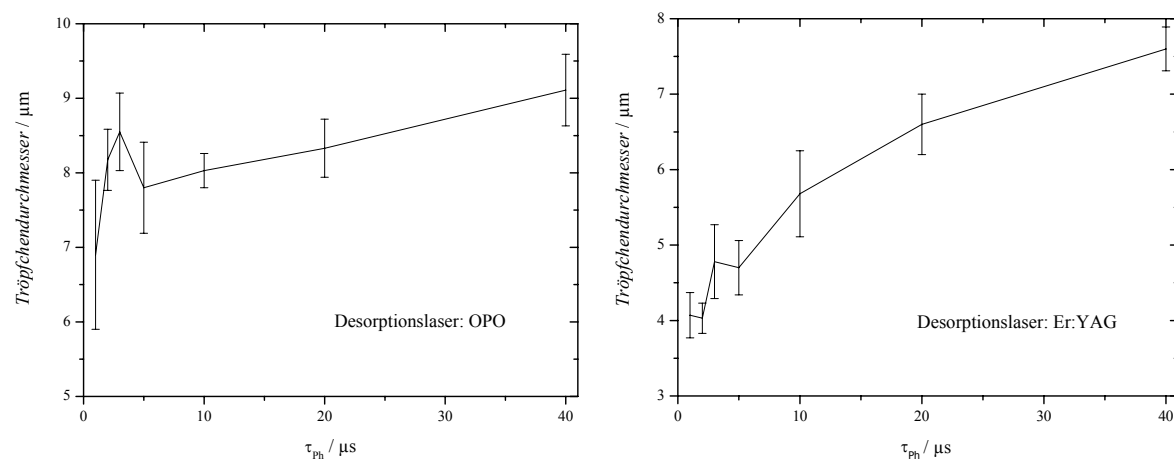


Abbildung 4.37: Tröpfchengröße im *plume* in Abhängigkeit von τ_{ph} für a) den OPO und b) den Er:YAG-Laser als Desorptionslaser. Die Fehlerbalken repräsentieren die statistische Abweichung.

Da das verwendete photographische Verfahren grundsätzlich nur ein Bild pro Desorptionsereignis aufnehmen kann, liefert es keine Aussage darüber, ob die Tröpfchen nach einer so langen Zeit immer noch aus der Tropfenoberfläche abladiert werden. Die Störung der

Oberfläche, die schwach auch nach $15\mu\text{s}$ noch zu erkennen ist, läßt dies vermuten. Unwahrscheinlich ist, daß es sich um extrem langsame Tröpfchen handelt, die in den ersten Mikrosekunden emittiert wurden.

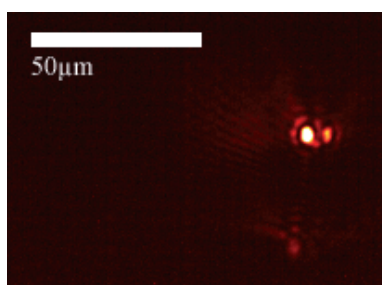


Abbildung 4.38: Tröpfchen nahe der Probenoberfläche, 90°-Anordnung, $\tau_{ph} = 40\mu\text{s}$, Desorptionslaser OPO. Im unteren rechten Bildsegment ist die Reflektion des Tröpfchens an der Tropfenoberfläche (nicht sichtbar) zu beobachten.

Die vorangehende Abbildung zeigt exemplarisch die Aufnahme eines *plume*-Tröpfchens in unmittelbarer Nähe der Probenoberfläche für $\tau_{ph} = 40\mu\text{s}$. Falls das Tröpfchen während der ersten Mikrosekunden der *plume*-Entwicklung emittiert wurde, ergäbe sich eine für den hochdynamischen Desorptionsprozeß extrem niedrige Geschwindigkeit von ca. 1ms^{-1} . Außerdem müßten Teilchen mit einer so niedrigen Geschwindigkeit auch nach der doppelten Zeit $\tau_{ph} = 80\mu\text{s}$ noch an ähnlicher Position zu sehen sein. Tatsächlich sind aber zu jenen Zeitpunkten nur noch extrem vereinzelt und in aller Regel von der Tropfenoberfläche weit entfernte Tröpfchen nachweisbar.

Ein Zurückkehren bereits entfernter Tröpfchen ist auch ausgeschlossen. Das nächstliegende Hindernis in der evakuierten Reaktionskammer ist der Einkoppelspiegel für den Desorptionslaser, der sich 3cm entfernt befindet. Ein Tröpfchen, das gleich zu Beginn der Desorptionsphase startet, müßte am Spiegel abprallen, ohne daran haften zu bleiben und offensichtlich eine Geschwindigkeit von mehr als $2000\frac{\text{m}}{\text{s}}$ aufweisen, um $30\mu\text{s}$ später wieder im Bildausschnitt zu erscheinen.

4.2.4 Festkörpermatrix Bernsteinsäure

Obwohl das Hauptmotiv für die Experimente in der Untersuchung des *plumes* für Glycerol als Matrix bestand, lag es nahe, auch Bernsteinsäure als gängige IR-Festkörpermatrix zu testen. Es stand ein gezüchteter Einkristall zur Verfügung, der mit Vakuumfett auf dem *target* so fixiert wurde, daß eine ca. 1mm^2 große Fläche annähernd parallel im Beleuchtungsstrahl lag und nicht durch davor oder dahinter liegende Kristallgrate verdeckt wurde. Dennoch war es nicht möglich, auch nur annähernd Aufnahmen einer Qualität zu erzielen, die mit der definierten Oberfläche der Flüssigmatrix erreicht werden konnte.

Mit der Dunkelfeldmethode war keine Bildinformation über den *plume* zu gewinnen. Die Hellfeldbeleuchtung ermöglichte immerhin den Nachweis größerer Partikel in der fortgeschrittenen Phase der *plume*-Entwicklung mehrere hundert bis tausend Mikrosekunden nach dem Desorptionslaserimpuls. Es waren hierfür verhältnismäßig hohe Bestrahlungswerte von $H_{suc} = 8000\frac{\text{J}}{\text{m}^2}$ nötig. Dies korreliert jedoch mit den MALDI-massenspektrometrischen Erfahrungen; auch dort ist eine um Faktor drei bis vier höhere Schwellbestrahlung zum Nachweis von Analytionensignalen notwendig, wenn statt der *dried droplet*-Präparation¹ Bernstein-Einkristalle als Matrix verwendet werden.^[Men00]

¹ Trocknung des wässrigen Matrix-Analyt-Gemisches im Luftstrom unter Bildung einer feinkristallinen Oberfläche

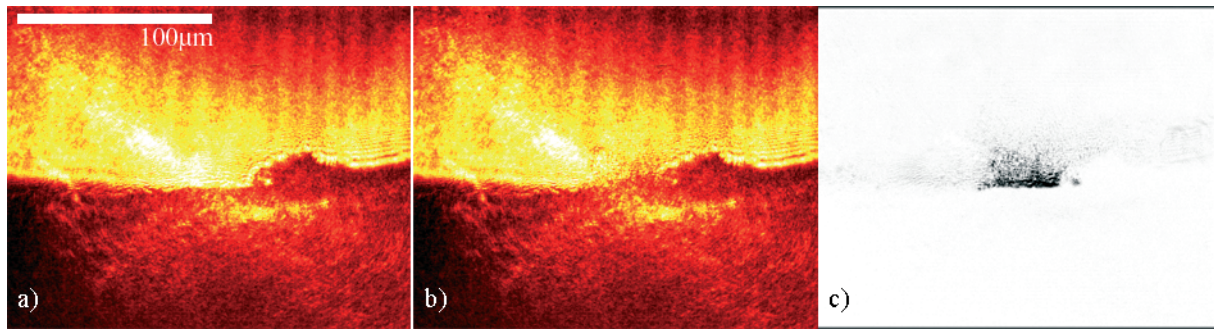


Abbildung 4.39: Dunkelfeld-Aufnahme eines Bernsteinsäureeinkristalls ($\tau_{ph} = 750\text{ns}$) a) ohne und b) mit Er:YAG-Desorptionslaser. c) repräsentiert das Differenzbild aus a) und b).

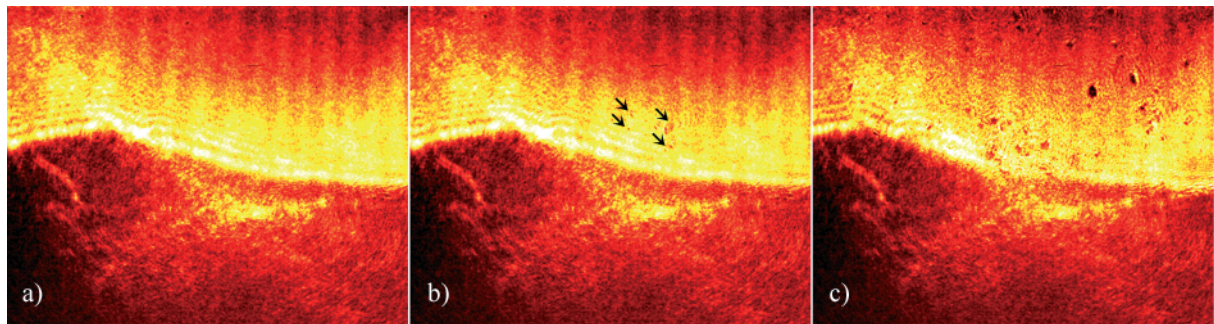


Abbildung 4.40: Dunkelfeld-Aufnahme eines Bernsteinsäureeinkristalls ($\tau_{ph} = 3,6\mu\text{s}$) a) ohne Desorptionslaser, b) bei niedriger Bestrahlung H_{suc} und c) bei hoher Bestrahlung $8 \cdot H_{suc}$. In b) markieren die schwarzen Pfeile die schwach sichtbaren Partikel im *plume*.

Auffällig ist eine analoge Entwicklung des *plumes* bei Festkörper- und Flüssigmatrizes. In beiden Fällen wird eine massive Emission in den ersten paar hundert Nanosekunden erreicht und von einer lang anhaltenden Präsenz von Einzelpartikeln gefolgt.

Abbildung 4.40c verdeutlicht dabei, daß die Anzahl und Größe der Bernsteinpartikel von der Laserbestrahlung abhängt.

5 Diskussion

Der Begriff der Desorption bezeichnet eigentlich die Auslösung einzelner Moleküle aus kondensierter Phase, ist demnach also ein Oberflächenprozeß. Offensichtlich findet bei der Bestrahlung unter den gegebenen Bedingungen der MALDI-MS jedoch nicht nur eine Desorption, sondern auch ein massiver Abtrag größerer *cluster* statt; dies wird in der Literatur allgemein als Ablation (Volumenprozeß) bezeichnet. Da jedoch im Zusammenhang mit der MALDI der Begriff der Desorption im wissenschaftlichen Sprachgebrauch fest verankert ist, wird er in dieser Arbeit synonym zu dem der Ablation verwendet.

5.1 Emissionsdauer des IR-MALDI-*plumes*

Die Experimente ergaben einige wichtige Erkenntnisse über den *plume* bei der IR-MALDI. Überraschenderweise dauert der Materialabtrag sehr viel länger an als angenommen. Dies wird zum einen durch die IRPI-Experimente dokumentiert. Für beide getesteten Laserimpulsdauern ($\tau_{L, OPO} = 6\text{ns}$ und $\tau_{L, Er:YAG} = 120\text{ns}$) sind Nachionisationssignale im Mikrosekundenbereich nachweisbar, selbst wenn die Bestrahlung deutlich unterhalb der Schwellbestrahlung des Massenspektrometers liegt.

Die Hochgeschwindigkeitsaufnahmen klären zum anderen die zeitlich sich verändernde Zusammensetzung des *plumes*. Zunächst herrscht eine Gasphasendomäne in sehr definiertem Bereich über der bestrahlten Fläche vor. Ihre seitliche Ausdehnung entspricht in den ersten paar hundert Nanosekunden in etwa dem Durchmesser des Desorptionslasers. Im weiteren Verlauf weitet sie sich langsam aus, und es treten zunehmend größere Tröpfchen auf. Einige Mikrosekunden nach dem Laserimpuls ist die Tropfenoberfläche in einem Durchmesser gestört, der etwa vier mal größer als der Laserstrahldurchmesser ist. Es kann davon ausgegangen werden, daß hier akustische Effekte dominieren. Damit erklärt sich auch, warum für die fortgeschrittenen Zeiten die Laserimpulsdauer kaum noch Einfluß auf die *plume*-Form hat. Da bei mehreren zehn Mikrosekunden praktisch nur noch vereinzelte erratisch verteilte Tröpfchen über dem Desorptionsgebiet vorhanden sind, ist auch zu verstehen, warum für diese Zeiten die Nachionisation von Schuß zu Schuß zwischen intensivem und gar keinem Ionensignal schwankt. Hellfeldaufnahmen zeigen darüber hinaus, daß auch bei der Bestrahlung von Festkörpermatriices (Bernsteinsäure-Einkristall) eine sehr lange Ablationsphase vorliegt.

MALDI-massenspektrometrische Untersuchungen zeigen unter Bestrahlungsbedingungen, die mit denen der Experimente dieser Arbeit vergleichbar sind, daß der für die MALDI-MS relevante Desorptions- und Ionisationsprozeß innerhalb weniger zehn bzw. hundert Nanosekunden stattfindet. So wurde für Glycerol als Matrix und *Angiotensin I* als Analyt bei Verwendung einer Desorptionswellenlänge von 2936nm eine von der Laserimpulslänge weitgehend unabhängige obere Grenze von etwa 320ns für den Desorptions- und Ionisationsprozeß gefunden.^[Men00] Vieles deutet darauf hin, daß der tatsächliche Wert deutlich darunter liegt. Für Bernsteinsäure als Matrix ergaben sich obere Abschätzungen von 35ns für $\tau_L = 6\text{ns}$ und $\tau_L = 100\text{ns}$ und 80ns für $\tau_L = 185\text{ns}$.

Dies bedeutet, daß die Ionen in einem sehr kurzen Zeitraum während oder unmittelbar nach dem Laserimpuls und zu einem Zeitpunkt entstehen, bei dem in den Hochgeschwindigkeitsaufnahmen noch kaum ein Effekt zu sehen ist. Insbesondere für die IR-MALDI kann qualitativ abgeschätzt werden, daß die Teilchenzahl des abladierten Materials um Größenordnungen über der des ionisierten Anteils liegt.

5.2 Abhängigkeit von der Laserimpulsdauer

Für die Versuchsreihen zur Untersuchung der *plume*-Geometrie mit Hochgeschwindigkeitsaufnahmen und durch Nachionisation wurden zur Desorption wechselweise zwei IR-Laser eingesetzt, die sich maßgeblich nur in der Laserimpulsdauer unterscheiden. Dabei zeigt sich, daß es eindeutige Unterschiede in der Entwicklung des *plumes* vor allem in den ersten paar hundert Nanosekunden gibt (vgl. Seite 44).

Wird in den IRPI-Experimenten ein Desorptionslaser mit kurzer Impulsdauer (OPO) eingesetzt, so ist zu beobachten, daß für τ_{IRPI} von 100ns bis 1000ns die Ionensignalintensität zunächst maximal ist und dann kontinuierlich auf etwa ein Zehntel ihres Anfangswertes abfällt. Die Signalintensität ist für alle τ_{IRPI} auch mit der Entfernung zur Tropfenoberfläche monoton fallend. Die Emissionsrate für Tröpfchen, aus denen IRPI-MS stattfinden kann, setzt demzufolge unmittelbar ein und reduziert sich dann langsam.

Bei langen Desorptionslaserimpulsdauern (Er:YAG-Laser) zeigt der *plume* ein ganz anderes Verhalten. Er weist unmittelbar nach dem primären Desorptionslaserimpuls ein schwaches Signal auf und steigt mit wachsendem τ_{IRPI} auf das etwa zehnfache an, um dann weit in den Mikrosekundenbereich zu dauern. Auffällig ist auch der Verlauf der Intensität mit der Entfernung von der Oberfläche. Für $\tau_{\text{IRPI}} \geq 500\text{ns}$ zeigt die Kurve ihr Maximum bei etwa $50\mu\text{m}$ von der Tropfenoberfläche entfernt. Da für kürzere τ_{IRPI} keine Überhöhung für geringere Entfernungen zu beobachten ist, ist es unwahrscheinlich, daß das Signal von sehr langsamem Tröpfchen herrührt. Vielmehr ist zu vermuten, daß mit der Zeit die Emissionsrate von Tröpfchen steigt, deren Größe die IRPI begünstigt.

Das Ergebnis der sich zeitlich entgegengesetzt entwickelnden Signalintensitäten bei der IRPI-MS in Abhängigkeit von der Laserimpulsdauer korreliert sehr gut mit denen einer Versuchsreihe, die parallel von A. Rohlfing in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde.^[Roh02, Roh03] Der Glycerol-Tropfen wird in dem Fall statt auf ein Metallsubstrat auf einen Piezo-Kristall präpariert. Bei der Bestrahlung der Probe mit dem Desorptionslaser wird eine photoakustische Welle erzeugt (vgl. Kapitel 2.2.5, Seite 13), die wiederum vom Piezo-Kristall detektiert werden kann.

Aus dem Signal kann auf die Ablation von der Oberfläche des Glycerol-Tropfens geschlossen werden. Bei diesen Experimenten offenbarte sich, daß das Ablationssignal für kurze Laserimpulse nur einige Nanosekunden anhält, während es für lange Impulse bis zu $1\mu\text{s}$ nachweisbar war (Abbildung 5.1).

Die Hochgeschwindigkeitsaufnahmen der vorliegenden Arbeit scheinen diesen Erkenntnissen zu widersprechen. Sie zeigen unabhängig von der Impulsdauer eindeutig einen *plume* mehrere Mikrosekunden nach dem Desorptionslaserimpuls. Auch die Tatsache, daß für beide Lasertypen mit der IRPI-MS mehrere Mikrosekunden nach dem primären Desorptionsereignis Ionensignale erzeugt werden konnten, steht zunächst im Widerspruch dazu. In den folgenden beiden Abschnitten soll versucht werden, diese Diskrepanz zu erklären.

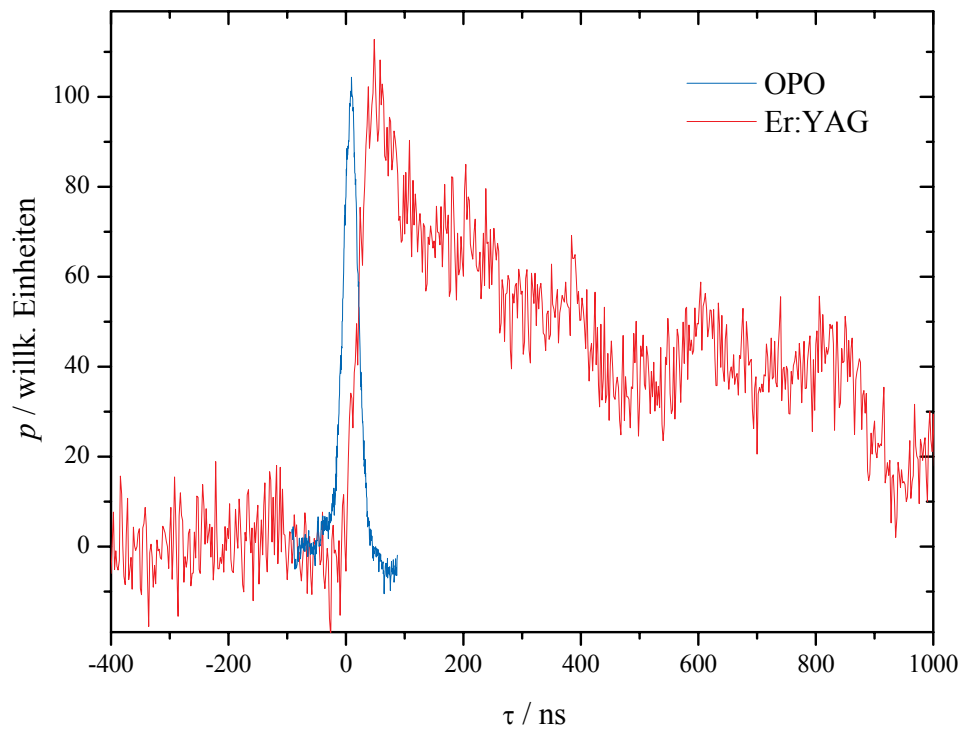


Abbildung 5.1: Ablationssignal (kompressive Druckwelle p) gegen reduzierte Zeit τ . Die aus der photoakustischen Druckwelle ermittelten Kurven für die beiden verschiedenen Desorptionslaser OPO und Er:YAG-Laser (in beiden Fällen $\lambda = 2936\text{nm}$) zeigen ein sehr unterschiedlich langes Emissionsverhalten. Aus [Roh03]

5.3 Vergleich mit bestehenden Modellen

Es soll zunächst von den Ergebnissen der molekulardynamischen Computersimulation ausgegangen werden. Dabei ist zu beachten, daß die Laserimpulsdauer und die Eindringtiefe herunterskaliert wurden. Dies ist nötig, da in sinnvoller Zeit nur ein Volumen von mehreren zehn Nanometern Kantenlänge berechnet werden kann. Es wurde eine mittlere Eindringtiefe von 50nm gewählt. Kurze Laserimpulsdauern von 15ps und 150ps simulieren die Bedingungen für das *stress confinement* und das *thermal confinement*. Letzteres liegt bei der IR-MALDI in jedem Fall für die Bestrahlung mit dem Er:YAG-Laser vor. Für den OPO ist zumindest die Möglichkeit gegeben, daß es sich um *stress confinement* handelt; es sei ins Gedächtnis gerufen, daß die Grenze nicht genau definiert ist, da auch die Bedingung $\tau_L < (\alpha \cdot \nu)^{-1}$ für das *stress confinement* (vgl. Seite 13) nur eine Abschätzung ist.

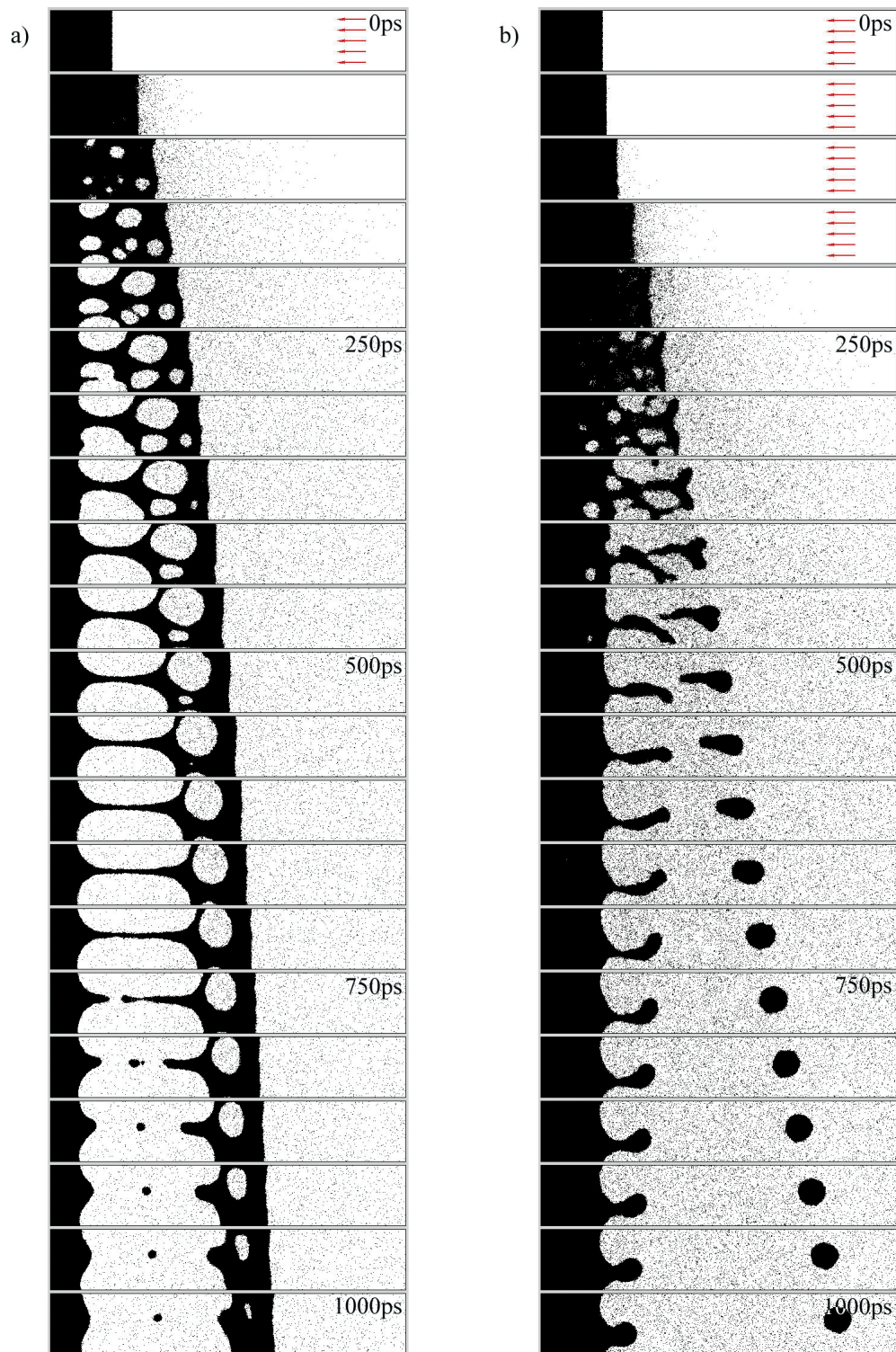


Abbildung 5.2: Molekulardynamische Simulation (*breathing sphere*) für Laserimpulsdauern a) 15ps (*stress confinement*) und b) 150ps (*thermal confinement*). Der Laserstrahl wird durch die roten Pfeile symbolisiert. Die Serien zeigen die ersten 1000ps nach Laserimpulsbeginn (Zeitindex oben rechts in den Bildern in Abständen von 250ps). Das Volumen beträgt $10 \cdot 10 \cdot 100 \text{ nm}^3$. Aus [Zhi00] und <http://www.people.virginia.edu/~lz2n/ablation/>

Es fällt auf, daß die Modellrechnung unterschiedliche Vorhersagen für die Form der Materialablation macht. Während im *stress confinement* ein Bruch im Inneren des Materials stattfindet, der zum Abheben einer ganzen Schicht führt, ist beim *thermal confinement* ein ausgeprägterer kontinuierlicher Materialabtrag mit nahezu gleichmäßigem Dichtegradienten und nur vereinzelt Partikeln zu beobachten.

Die Autoren führen den Unterschied auf zwei Prozesse der Festkörperdesintegration zurück. Im Fall des *thermal confinement* ist die Ablationsschwelle durch einen explosiven Phasenübergang nach Überhitzung des bestrahlten Volumens geprägt. Im *stress confinement* hingegen entsprechen die Beobachtungen eher einer photomechanischen Festkörperauflösung infolge der erzeugten Druckimpulse analog zu dem in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Spallationsmodell.

Für beide in dieser Arbeit verwendeten Laserimpulsdauern muß ein reiner Spallationsprozeß ausgeschlossen werden. Jedoch ist es wahrscheinlich, daß die Form des *plumes* für kurze Laserimpulsdauern von wenigen Nanosekunden durch die sehr hohen Amplituden der laserinduzierten thermoelastischen Druckwelle beeinflußt wird.

Für die thermischen Abläufe schlägt *Rohlfing* folgenden Zusammenhang vor.^[Roh03] Liegen hohe Aufheizraten (Laserbestrahlung) vor, so kann es durch das Fehlen von Nukleationskeimen zu einer Überhitzung jenseits der Siedetemperatur kommen. In einer derartig überhitzten Flüssigkeit setzt nun trotz fehlender Nukleationskeime eine spontane Bildung von Gasblasen (homogene Nukleation) ein. Der Dampfdruck der Flüssigkeit treibt das Wachstum dieser Gasblasen, während die Oberflächenspannung es hemmt. Da also Arbeit gegen die Oberflächenspannung verrichtet und Energie aus der umgebenden Flüssigkeit aufgenommen werden muß, kann das Anfangswachstum der Gasblasen nur mit einer begrenzten und temperaturabhängigen Rate erfolgen. Erst wenn ein gewisser kritischer Durchmesser überschritten ist, vergrößern sich die Gasblasen spontan und ohne weitere externe Energiezufuhr. Es kommt dann zu einer explosiven Verdampfung der überhitzten Flüssigkeit. Übertragen auf die IR-MALDI bedeutet dies, daß für Laserimpulsdauern von 100ns das Glycerol durch die Bestrahlung überhitzt und anschließend durch homogene Nukleation verdampft. Die Rate der Verdampfung ist temperaturabhängig. Wegen des Lambert-Beer-Gesetzes fällt diese mit der Probentiefe exponentiell ab. Die Wärmeleitung, die bei Zeitspannen des Materialabtrages im Mikrosekundenbereich in jedem Fall zu berücksichtigen ist, bewirkt, daß die maximal durch die Desorption der Laserenergie erreichbare Temperatur in tieferen Probenschichten erst deutlich später erreicht wird als an der Probenoberfläche. Somit verdampfen für lange Laserimpulsdauern die oberen Schichten eher als tieferliegende.

Für kurze Laserimpulse ($\tau_L = 6\text{ns}$) findet zwar ebenfalls eine Überhitzung des Glycerols statt, die Amplitude der induzierten thermoelastischen Druckwelle ist bei gleicher Laserbestrahlung jedoch um den Faktor 200 größer.^[Roh02] Es kommt zunächst zu einer Erhöhung der Temperatur oberhalb des Siedepunktes, ohne daß jedoch eine homogene Nukleation einsetzt. Gleichzeitig verursacht die tensale Druckwelle eine dramatische Absenkung der spinodalen Temperatur (oberste Temperatur, bis zu der eine Flüssigkeit überhitzt werden kann). Unterschreitet diese die Temperatur des Glycerols, so kommt es spontan und ohne Gasblasenbildung zu einer Verdampfung (*spinodal decomposition*).^[Vog03] Für kurze Laserimpulsdauern kann der Desorptionsprozeß also als durch Druckwellen unterstützte Photoablation beschrieben werden.

5.4 Modell zur laserimpulsabhängigen Desorption

Um die Ergebnisse dieser Arbeit mit den denen des Photoakustikexperimentes und den Modellvorstellungen des vorangegangenen Kapitels zu vereinen, soll folgender Mechanismus vorgeschlagen werden: die Aufnahmen vom *plume* bei langen Laserimpulsdauern spiegeln einen kontinuierlichen Abtrag von Material wieder, dessen Dichte aufgrund der Geschwindigkeitsverteilung mit der Entfernung zur Tropfenoberfläche abnimmt. Er setzt wegen der zeitlichen Verzögerung bei der homogenen Nukleation erst vergleichsweise spät ein.

Für kurze Impulsdauern zerreißt die tensale Teilwelle, die durch die Bestrahlung verursacht wird und das Volumen durchläuft, an einer durch die Temperatur und Druckamplitude bestimmten Stelle innerhalb des Glycerol-Tropfens den Materialverbund und sorgt dafür, daß eine ganze Probenschicht abgehoben wird. Diese verdampft dann ihrerseits kontinuierlich. Einen Hinweis auf diese Hypothese geben die Abbildungen des *plumes* für Zeiten um $\tau_{ph} = 150\text{ns}$. Für kurze Desorptionslaserimpulse ist eine deutliche Einschnürung des *plumes* nahe der Tropfenoberfläche zu beobachten.

Eine komplette optische Trennung der (angenommenen) abgehobenen Schicht und des verbleibenden Tropfens war nicht möglich und ist auch nicht zu erwarten. Zu Beginn des Prozesses wird der Abstand weit unterhalb der optischen Auflösungsgrenze liegen. Zu fortgeschrittenen Zeiten setzt eine Emission von den Oberflächen analog der beim Er:YAG-Laser ein. So wird verdampfendes Material von der Unterseite des abgetragenen Schicht zur Streuung des Lichtes führen.

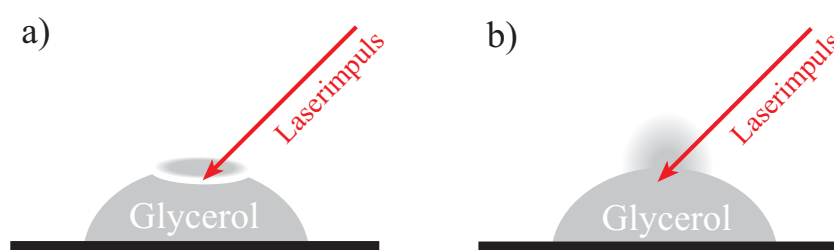


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Desorptionsmechanismen für a) kurze Laserimpulse (*stress confinement*) und b) lange Laserimpulse (*thermal confinement*)

Da die Ionensignalintensität bei der IRPI-MS mit dem OPO (kurze Impulsdauer) unmittelbar mit Beginn der *plume*-Bildung maximal ist, ist zu vermuten, daß initial die Materialschicht abgehoben wird und dann Tröpfchen von deren Oberfläche emittiert werden. Die Nachionisation geschieht dann nicht direkt aus der Schicht; sondern vielmehr aus den emittierten Tröpfchen.

Das Modell erklärt einerseits, warum im Photoakustikexperiment für kurze Laserimpulse eine Ablation von nur wenigen Nanosekunden gemessen wurde, obwohl die Experimente der vorliegenden Arbeit lange Emissionen zeigen: nach dem instantanen Abtrag der Schicht und damit der mechanischen Trennung findet der weitere Prozeß vor allem von der Oberfläche der abgelösten Schicht statt. Dies erklärt auch andererseits, warum für Zeiten im Mikrosekundenbereich die *plume*-Formen sehr ähnlich werden.

Erstaunlich bleibt allerdings auch bei diesem Modell, daß eine meßbare Ionenbildung im MALDI-Experiment in beiden Fällen auf die ersten ca. 10ns bis 100ns beschränkt ist, zu denen noch kaum morphologische Veränderungen der Tropfenoberfläche gesehen werden.

5.5 Aspekte der Infrarot-Nachionisation

Obzwar die Experimente helfen sollten, die Vorgänge der MALDI zu verstehen, werfen sie auch neue Fragen auf. Der Prozeß der Nachionisation ist wegen der zur konventionellen MALDI zusätzlich hinzukommenden Parameter schwer systematisch zu untersuchen. Grundsätzlich ist zu klären, ob es sich bei der IRPI-MS um eine Nachionisation einzelner Moleküle oder um die Desorption aus einer kondensierten Phase mit anschließender Ionisation handelt.

Eine Nachionisation mit einem UV-Laser hätte bei Erfolg darauf hingewiesen, daß im primären *plume* viele neutrale Einzelanalytmoleküle vorliegen, die in der Folge leicht zu ionisieren gewesen wären. Im Experiment konnte hier kein Ionensignal nachgewiesen

werden. Als Ausschlußexperiment ist der Ansatz aber nicht anzusehen; die Tatsache, daß bei der Nachionisation mit UV-Lasern keine Ionen nachgewiesen wurden, kann zum einen auf eine möglicherweise mangelnde Empfindlichkeit des Massenspektrometers zurückgeführt werden. Zukünftige Experimente an wesentlich empfindlicheren Geräten werden diesbezüglich Aufschluß geben. Zum anderen weist der mangelnde Erfolg der REMPI-Methode (siehe Abschnitt 2.2.4) darauf hin, daß die direkte Nachionisation einzelner Analytmoleküle größerer Masse durch UV-Laser grundsätzlich nicht gelingt.

Vermutlich findet bei Verwendung zweier IR-Laser eine Desorption aus makroskopischen *clustern* (Tröpfchen) im *plume* statt, ohne daß sich der Prozeß grundlegend von dem der Desorption aus dem Präparationstropfen unterscheidet; die *cluster* sind so groß, daß sie die Eigenschaften einer kondensierten Phase aufweisen. Ausgehend vom im vorigen Abschnitt vorgestellten Modell setzt dann für kurze Laserimpulse (*stress confinement*) nach der Phasenexplosion unmittelbar die Emission von Tröpfchen ein, deren Größe für die IRPI-MS optimal ist. Mit der fortschreitenden Desintegration der abladierten Schicht sinkt auch die Ausbeute an nachionisierbaren Tröpfchen. Für lange Laserimpulse (*thermal confinement*) wird zunächst Material abladiert, dessen Partikel unter den Bedingungen der IRPI-MS nur in geringem Umfang nachionisiert werden können. Die Emissionsrate geeigneter Tröpfchen nimmt dann zu und hält Mikrosekunden lang an.

Die Tatsache, daß die Nachionisation aus gefrorenem Wasser als Matrix nicht besser funktioniert als die direkte Desorption, weist ebenfalls darauf hin, daß bei der IRPI eine Desorption aus einzelnen Tröpfchen stattfindet und also für die direkte wie die nachträgliche Desorption ein zumindest ähnlicher Mechanismus stattfindet.

Andererseits unterscheiden sich die Massenspektren von IR-MALDI-MS und IRPI-MS offensichtlich. MALDI zeichnet sich generell z.B. im Gegensatz zu ESI dadurch aus, daß fast ausschließlich einfach geladene Spezies auftreten. Durch geeignete Wahl der Parameter können zwar auch höher geladene Moleküle leicht nachgewiesen werden, jedoch liegt der Schwerpunkt unter Standardbedingungen auf einfach geladenen Spezies. Bei der IRPI verhält es sich anders. Wenn hier die Parameter von der MALDI nur insofern verändert werden, als der Desorptionslaser unterhalb der Schwellbestrahlung eingestellt wird und ein Nachionisationslaserstrahl den *plume* kreuzt, so ergeben sich ohne besondere Anstrengung auffallend viele höhergeladene Analytionen.

Es ist zu vermuten, daß der *plume* zum Zeitpunkt und Ort der Nachionisation sehr ausgedünnt ist. Dann ist die Wahrscheinlichkeit von Kollisionen der Ionen in der Gasphase unter IRPI-Bedingungen geringer als bei der konventionellen MALDI. Vorausgesetzt, der Desorptionsprozeß aus einem makroskopischen Tropfen unterscheidet sich im Grundsatz nicht von dem aus Tröpfchen im *plume*, könnte dies so interpretiert werden, daß bei der MALDI-MS zunächst ebenfalls hochgeladene Spezies entstehen, die durch Stöße in der Gasphase überwiegend auf einfache Ladung reduziert werden (vgl. *lucky survivor*-Modell für die UV-MALDI)^[Kar00].

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit war das Schwerpunktthema die zeit- und orts aufgelöste Untersuchung des bei der IR-MALDI aus der Matrix Glycerol entstehenden *plumes* mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen. Dabei wurden zwei Lasersysteme (OPO, Er:YAG) gleicher Wellenlänge ($\lambda = 2,94\mu\text{m}$) aber unterschiedlicher Impulsdauer ($\tau_{\text{L,OPO}} = 6\text{ns}$, $\tau_{\text{L,Er:YAG}} = 120\text{ns} \pm 20\text{ns}$) bei Schwellbestrahlung ($H_{0,\text{OPO}} \approx 2700\text{Jm}^{-2}$, $H_{0,\text{Er:YAG}} \approx 5000\text{Jm}^{-2}$) und annähernd gleichem Strahldurchmesser ($d \approx 120\mu\text{m}$) am Desorptionort verwendet.

Es konnte eine Abhängigkeit der *plume*-Form von der Laserimpulsdauer festgestellt werden. In den ersten rund tausend Nanosekunden ist nicht nur das Bild des *plumes* in den Hochgeschwindigkeitsaufnahmen sehr unterschiedlich, sondern auch die Ionenausbeute im Nachionisationsexperiment. Ein photomechanischer Einfluß ist sehr wahrscheinlich. Für fortgeschrittene Zeiten ähneln sich die Ergebnisse und zeigen einen Materialabtrag, dessen zeitliche Dauer Größenordnungen über die der der MALDI-MS zugrundeliegenden Ionenbildung hinausgeht.

Hieraus und in Einklang mit den Ergebnissen des photoakustischen Experimentes und theoretischen Überlegungen zu bestehenden Desorptionsmodellen wurde eine Hypothese vorgestellt, die von einer kontinuierlichen Verdampfung für lange Laserimpulse und für einen abrupten Materialabtrag mit anschließender kontinuierlicher Verdampfung für kurze Laserimpulse ausgeht.

Während die Hochgeschwindigkeitsphotographie ausschließlich dem Informationsgewinn über die MALDI-*plume*-Dynamik dient, stellt die Nachionisation mit infraroten Lasern daneben auch eine interessante technische Variante zur konventionellen MALDI-MS dar. Die Massenspektren von „schwierigen“ Analyten, die im Rahmen dieser Arbeit mit dem IRPI-Verfahren erzeugt werden konnten, sind vielversprechend.

Derzeit gibt es mehrere Ansätze, die Desorption mit geringeren Bestrahlungswerten und somit mit geringeren inneren Energien zu ermöglichen, indem bereits vorzerstäubte Partikel erzeugt werden. Zum Nutzen solcher Techniken gibt es eine ganze Reihe von Überlegungen. Zum einen soll offensichtlich die Fragmentierung der Analytmoleküle reduziert werden. Aber zum anderen gibt es auch Aspekte bezüglich indirekter Einflüsse wie zum Beispiel der Probenausbeute. Für die FAB-MS¹, die ebenfalls aus Glycerol als Matrix desorbiert, gehen *Benninghoven et al.* davon aus, daß sich die Analytmoleküle vor allem an der Tropfenoberfläche sammeln und somit aufkonzentriert im bestrahlten Volumen vorliegen.

Ungeachtet der Frage, ob dies für alle Analyten und Flüssigmatrizes zutrifft und auf MALDI-Bedingungen übertragbar ist, sollte diesem Punkt bei zukünftigen Untersuchungen durchaus Gewicht beigemessen werden. Falls es zutrifft, daß sich eine hohe Konzentration an Analytmolekülen in den obersten Schichten eines Tropfens befindet, wegen der Eindringtiefe bei der Desorption aber ein sehr viel größeres Volumen abgetragen wird, so ist die Ausgangssituation für die IRPI deutlich unterschiedlich. Es werden dann Tröpfchen mit sehr hoher Konzentration bestrahlt, die von konzentrationsarmer Flüssigkeit räumlich weit getrennt sind.

Es wurde bereits erwähnt, daß es sich negativ auf die Spektrenqualität auswirkt, wenn bei der konventionellen MALDI-MS der Strahldurchmesser des Desorptionslasers wesentlich kleiner als etwa $100\mu\text{m}$ eingestellt wird. Diese Forderung muß für die IRPI keineswegs zutreffen. Sollte es für die IRPI gelingen, die Fokusse ohne Beeinträchtigung der Spektrenqualität stark zu reduzieren, ermöglicht dies die orts aufgelöste Analyse einer Probe.

¹ *fast atom bombardment mass spectrometry*

Eine zunächst für die bisherige konventionelle MALDI-MS wenig relevante Erkenntnis der Experimente ist die langanhaltende Materialablation. Diese kann bei zukünftigen Geräten durchaus eine Rolle spielen. Einerseits verhindert sie hohe Repetitionsraten der TOF-Massenspektrometer, da für einen definierten Zustand der Ionenquelle ein neuer Laserimpuls erst nach vollständigem Abschluß des vorangehenden Prozesses eingeleitet werden sollte. Andererseits gibt es inzwischen Geräte, die zwar immer noch auf dem Flugzeitprinzip basieren, jedoch einen kontinuierlichen Partikelstrom benötigen (Orthogonal-TOF). Hier kann gerade durch eine hohe Repetitionsrate des Desorptionslasers ein quasikontinuierlicher Materialabtrag erzeugt werden.

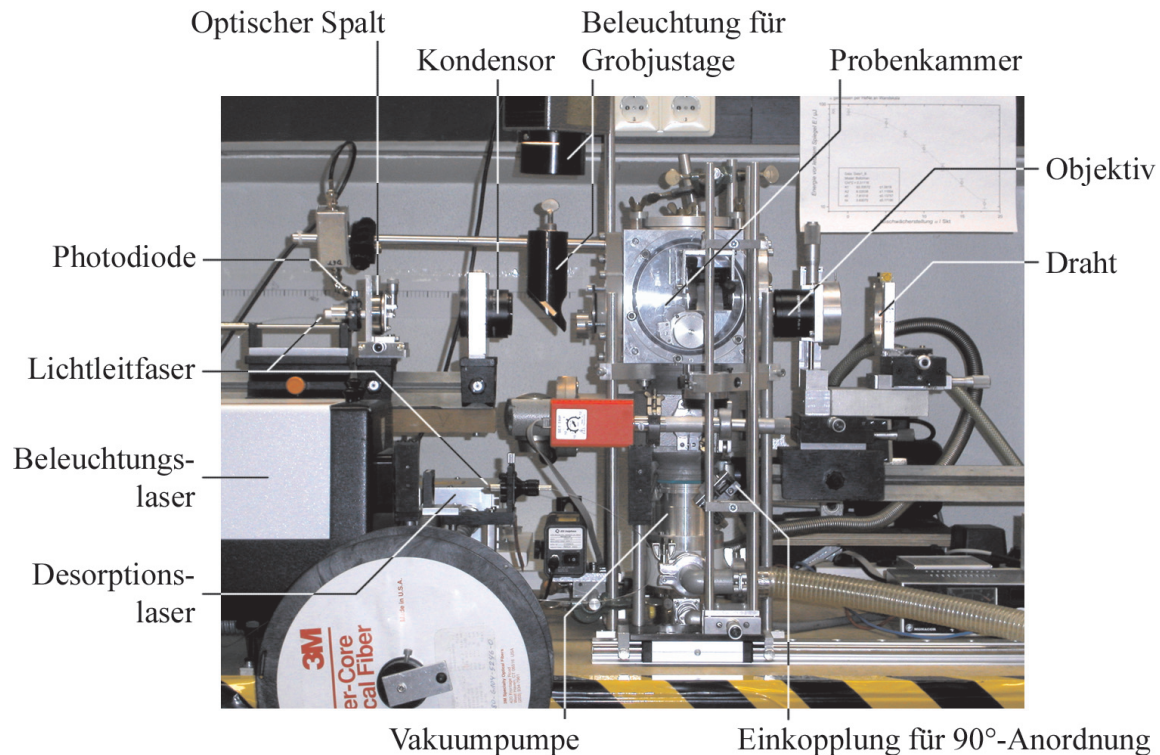
Der Aufbau zur Hochgeschwindigkeitsphotographie ermöglichte eine einzelne Aufnahme pro Desorptionslaserimpuls. Trajektorien der Tröpfchen können somit nicht dargestellt werden. Da für die massenspektrometrisch relevante MALDI, die in den ersten Nanosekunden stattfindet, diese Tröpfchen keine Rolle spielen, wurden diesbezüglich auch keine weiteren Anstrengungen unternommen. Sollte sich jedoch in Zukunft wegen erhöhter Repetitionsraten oder gewünschter quasikontinuierlicher Partikelströme die Notwendigkeit ergeben, auch das kinetische Verhalten der Tröpfchen in der fortgeschrittenen *plume*-Entwicklung zu erfahren, kann dies z.B. durch Mehrfachbelichtungen geschehen. So ist es denkbar, den Beleuchtungslaser in der Art zu betreiben, daß Mehrfachimpulse (*spiking*) emittiert werden. Wegen der langen Belichtungszeit der Kamera ist dann ein Tröpfchen zu verschiedenen kurz aufeinanderfolgenden Zeitpunkten auf der Aufnahme zu sehen (Stroboskopie).

Empfindlichere Massenspektrometer, flexiblere Laser hoher Ausgangsleistung, leistungsfähigere Computer zur Berechnung molekulardynamischer Simulationen sowie weitere experimentelle Ansätze werden die Prozesse um die Desorption in der MALDI allmählich aufklären. Der Ionisationsprozeß wird dabei schwieriger experimentell zugänglich sein, da er die zweite Stufe in einem gekoppelten Vorgang darstellt. Ein fundamentales Verständnis der Prozesse ist in jedem Fall nötig, um in Zukunft die ohnehin bereits erfolgreiche MALDI-Methode gezielt weiter verbessern zu können.

ANHANG

Anhang A - Versuchskammer

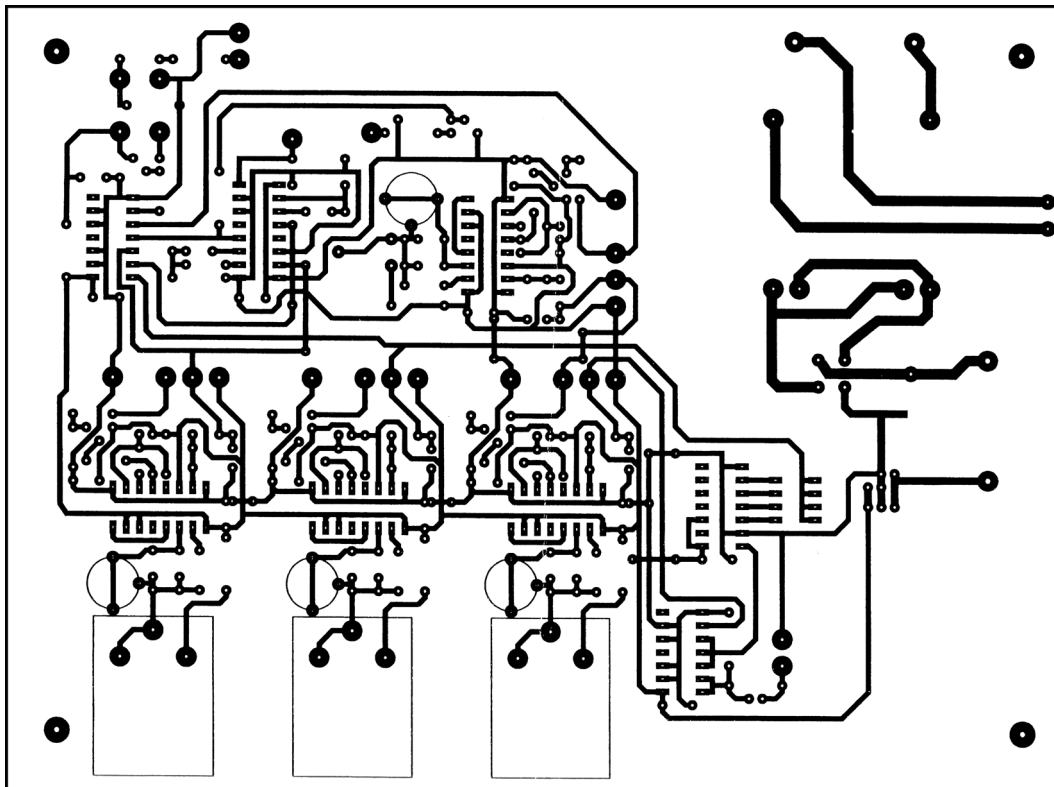
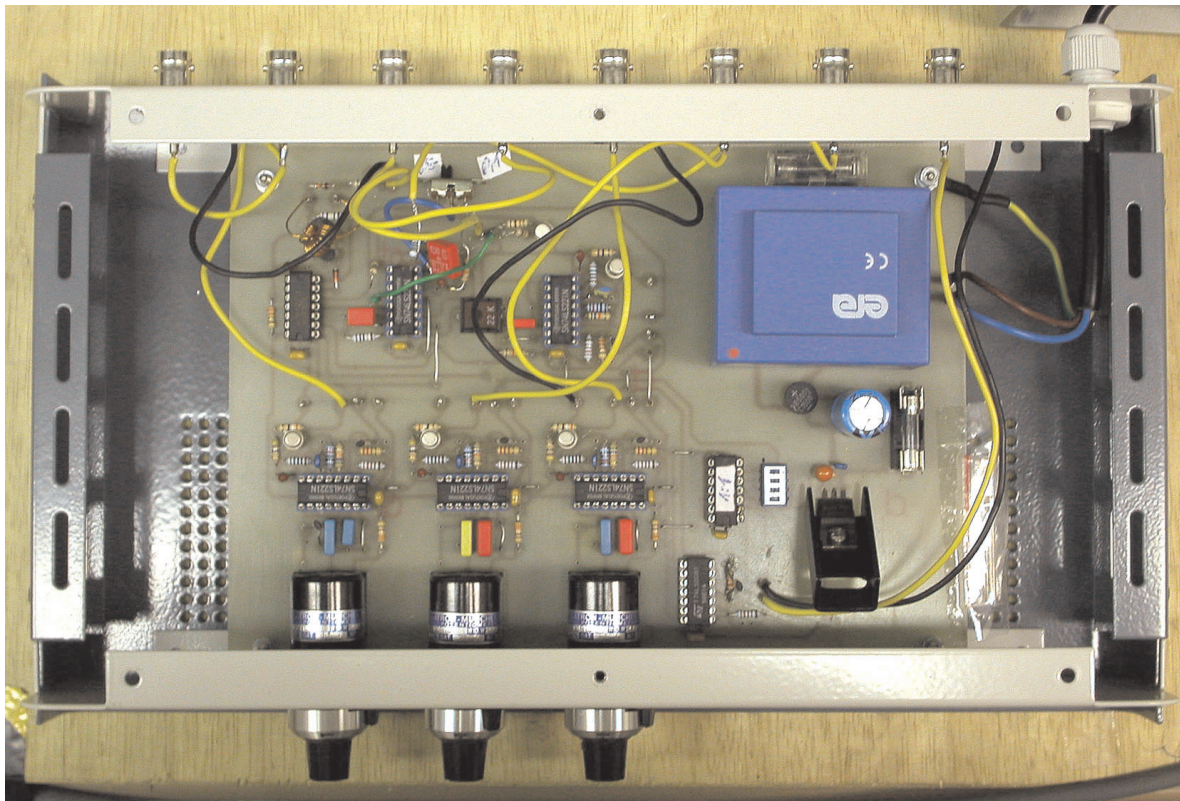
Die Versuchskammer für die Hochgeschwindigkeitsphotographie des MALDI-Prozesses und die Synchronisationselektronik wurde in Rahmen der Arbeit konzipiert und umgesetzt. Eine Gesamtansicht des Aufbaus ist auf Seite 29 abgebildet. Eine Detailaufnahme des optischen Spaltes ist auf Seite 31, eine Abbildung des Kameramoduls auf Seite 36 zu finden.



Der Beleuchtungslaser befindet sich links am Bildrand. Im Falle der 90°-Anordnung wird der Laserstrahl abgeschwächt und über zwei Spiegel senkrecht zur Betrachtungsebene in die Probenkammer eingekoppelt. Für die Dunkelfeld-Anordnung wird der Laserstrahl ebenfalls abgeschwächt und mit einer Linse in die Lichtleitfaser eingekoppelt. Die 57m lange Faser befindet sich auf der Rolle, die im unteren linken Bildbereich zu sehen ist. Das Ende befindet sich unmittelbar vor dem optischen Spalt, so daß dieser durch den Laserimpuls ausgeleuchtet wird. Ein Teil des Lichtes wird reflektiert und gelangt in die Photodiode. Kondensor und Objektiv bilden den Abschnitt, in dem der Lichtstrahl parallel verläuft. Dazwischen ist die Probenkammer angeordnet. Rechts von der Probenkammer bildet das Objektiv in allen Beleuchtungsanordnungen den *plume* auf den Kamerasensor ab, der in dieser Abbildung nicht zu sehen ist.

Um die Position des *targets* und der Kamera grob zu justieren, kann eine kontinuierliche Beleuchtungsquelle eingeschoben werden, die sich dann auf der optischen Achse der Dunkelfeld-Anordnung befindet.

Die Synchronisation der Laser und der Kamera wurden mit der im folgenden abgebildeten Elektronik durchgeführt. Externe verstellbare Verzögerungseinheiten wurden nach Bedarf (unterschiedliche interne Laufzeiten der verschiedenen Lasertypen) ergänzt.

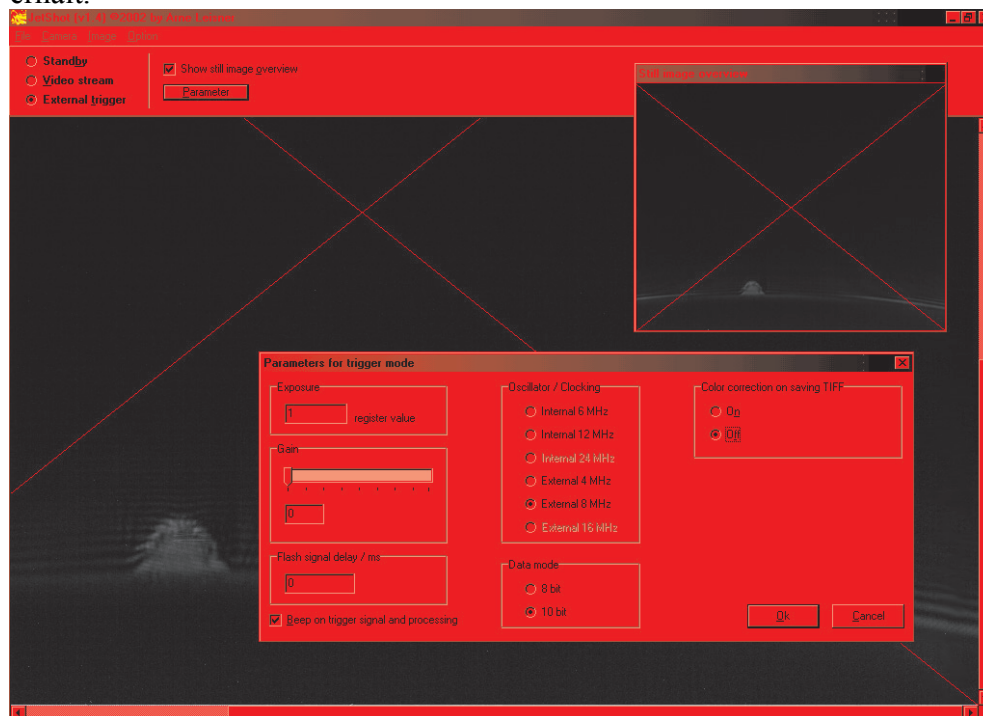


Anhang B - Software zur Bildakquirierung

Die bei der Hochgeschwindigkeitsphotographie eingesetzte Digitalkamera PixelINK PL-A633 verfügt neben einem externen Triggereingang über eine Kommunikationsschnittstelle (IEEE 1394a). Mit dieser wird das Kameramodul von einem Einzelplatzrechner (PC) aus konfiguriert. Die erzeugten Bilddaten werden ebenfalls über diese Schnittstelle vom Modul an den Rechner übertragen. Hierfür ist ein PC mit einer entsprechenden Schnittstelle und einem Prozessor notwendig, der mindestens einem Intel Pentium2 entspricht.

Die Programmierschnittstelle (*application programming interface* - API), die vom Kamerahersteller als Bibliothek mitgeliefert wird, ermöglicht es, eigene Anwendungen zur Steuerung und Bildübertragung der Kamera zu schreiben.

Das für die Experimente dieser Arbeit programmierte *JetShot* ermöglicht die Einstellung aller notwendigen Parameter (Belichtungszeit, Bildgröße, Speichertiefe) und das Abspeichern der erhaltenen Daten im TIFF-Format (*tagged image file format*). Daten mit einer Speichertiefe von 10 *bit* werden dabei als 16-*bit*-TIFFs abgespeichert. Nachdem die Daten von der Kamera übermittelt wurden, können sie zunächst gesichtet werden. Beim Abspeichern können optional Kommentare in eine Textdatei geschrieben werden, die den gleichen Dateinamen erhält.



Durch elektronische Störungen der blitzlampengepumpten Festkörperlaser kommt es gelegentlich dazu, daß ein Triggersignal von der Kamera ignoriert wird. Viele Aufnahmen besonders in der Frühphase der *plume*-Entwicklung unterscheiden sich praktisch nicht. Um zu gewährleisten, daß nicht versehentlich zweimal die gleiche Aufnahme gespeichert wird, wird nach dem Abspeichern die alte Aufnahme durch ein rotes X markiert.

Um unnötiges Restlicht im Labor zu vermeiden, wurden die Monitorfarben vornehmlich auf Rottöne eingestellt, die vom 532nm-Bandpaßfilter der Kameraoptik eliminiert werden.

Um Probleme bei möglichen zukünftigen Programmierarbeiten zu vermeiden, sei darauf hingewiesen, daß der *ident string*, mit dem sich das Kameramodul auf Anfrage des Programms identifiziert, in Release 2.1 fehlerhaft¹ dokumentiert ist.

¹ „PL-A630 Imaging Module“ (falsch) - „PL-A630 Series Imaging Module“ (korrekt)

Abkürzungs- und Wortverzeichnis

Eigennamen und fremdsprachliche Fachbegriffe sind in der Arbeit kursiv geschrieben.

Abkürzungen werden in dem Kapitel erklärt, in dem sie verwendet werden. Falls sie mehrfach vorkommen, sind sie außerdem im folgenden aufgelistet.

ADC	<i>analog digital converter</i> (Analog-Digital-Wandler)
bit	<i>binary digit</i> (Einheit für die Anzahl von Zweierschritten)
DE	<i>delayed extraction</i> (verzögerte Extraktion)
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EOC	<i>end of charge</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
FT	Fourier-Transformation
FWHM	<i>full width at half maximum</i> (Halbwertsbreite)
H	Elementsymbol für Wasserstoff
IR	infrarot
IRPI	<i>infrared post ionization</i>
KD	Konversionsdynode
KTP	Kalium-Titanyl-Phosphat
M	Symbol für Makromolekül
MAB	<i>monoclonal antibody</i>
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MS	Massenspektrometrie
MAUSY	Gerätebezeichnung: <i>Mass Analysis by an UV-Laser Desorption System</i>
m/Z	Quotient aus Masse und Ladung
NA	<i>nucleic acid</i>
OPA	<i>optical parametric amplification</i> (optisch-parametrische Verstärkung)
OPO	<i>optical parametric oscillator</i> (optisch-parametrischer Oszillator)
p.a.	<i>pro analysi</i>
PC	<i>personal computer</i> (Einzelpplatzrechner)
pixel	<i>picture cell</i> (diskrete Bildeinheit)
plume	Teilchenwolke
PSD	<i>post-source decay</i>
QSW	<i>quality switch</i> (Güteschaltung)
Ref	Reflektor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rovibronisch	rotational und vibrational
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SHG	<i>second harmonic generation</i> (Frequenzverdopplung)
Skt	Skalenteile
S/N	<i>signal-to-noise ratio</i> (Signal-Rausch-Verhältnis)
TOF	<i>time of flight</i> (Flugzeit)
UV	ultraviolett
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat
YSGG	Yttrium-Scandium-Gallium-Granat

Literaturverzeichnis

- [All96] Allwood D.A., Dreyfus R.W., Perera I.K., Dyer P.E.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996 **10** 1575
- [All97] Allwood D.A., Dreyfus R.W., Perera I.K., Dyer P.E.; *Appl. Surf. Sci.* 1997 **109/110** 154
- [Bea89] Beavis R.C., Chait B.T.; *Rap. Comm. Mass Spec.* 1989 **3** 432
- [Bea92] Beavis R.C.; *Org. Mass Spec.* 1992 **27** 156
- [Ber94] Berkenkamp S.: Wasser als Matrix in der Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie; *Diplomarbeit in Physik, Westfälische Wilhelmsuniversität Münster* 1994
- [Ber97] Berkenkamp S., Menzel C., Karas M., Hillenkamp F.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997 **11** 1399
- [Ber98] Berkenkamp S., Kirpekar F., Hillenkamp F.; *Science* 1998 **281** 260
- [Ber00] Berkenkamp S.: Untersuchungen zur MALDI-MS mit IR-Lasern und zum IR-MALDI-Prozeß; *Dissertation Westfälische Wilhelmsuniversität Münster* 2000
- [Boe94] Boesl U., Weinkauff R., Weickhardt C., Schlag E.W.; *Int. J. Mass Spec. Ion Proc.* 1994 **131** 87
- [Bor32] Born M.: Optik; *Springer Verlag* 1932
- [Bor59] Born M., Wolf E.: Principles of Optics; *Cambridge Univ. Press* 1959
- [Bro95] Brown R.S., Lennon J.J.; *Anal. Chem.* 1995 **67** 1998
- [Cal97] Caldwell K.L., McGarity D.R., Murray K.K. *J. Mass Spectrom.* 1997 **32** 1374
- [Cam94] Campbell M., Zheng R., Ledingham K.W.D.; *Meas. Sci. Tech.* 1994 **5** 726
- [Che98] Chen X., Carroll J.A., Beavis R.C.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998 **9** 885
- [Con80] Conzemius R.J., Capellen J.M.; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1980 **34** 197
- [Coo91] Cooks R.G., Glish G.L., McLuckey S.A., Kaiser R.E.; *Chemical and Engineering News* 1991 **69** 26
- [Cot97] Cotter R.: Time-of-flight mass spectrometry: instrumentation and application in biological research; *ACS professional reference book* 1997
- [Cra97a] Cramer R.: Untersuchungen zur IR-MALDI-MS mit Hilfe eines Free-Electron-Lasers; *Dissertation Westfälische Wilhelmsuniversität Münster* 1997
- [Cra97b] Cramer R., Haglund R.F., Hillenkamp F.; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1997 **169/170** 51
- [Din91] Dingus R.S., Scammon R.J.; *SPIE Proc. of Laser-Tissue Interaction II* 1991 **45** 1427
- [Dre94] Dreisewerd K.: Untersuchungen zu den physikalischen Prozessen bei der UV-MALDI thermisch labiler organischer Moleküle; *Dissertation Westfälische Wilhelmsuniversität Münster* 1994
- [Dre95] Dreisewerd K., Schürenberg M., Karas M., Hillenkamp F.; *Int. J. Mass Spec.* 1995 **141** 127
- [Dur98] Durant E.E., Brown R.S.; *Proc. 46th ASMS Conf. Mass Spectrom. and All. Topics, Orlando, FL, USA* 1998
- [Ens97] Ens W., Schürenberg M., Hillenkamp F.; *Proc. 45th ASMS Conf. Mass Spectrom. and All. Topics, Palm Springs, CA, USA* 1997
- [Fel99] Feldhaus D.: MALDI-MS mit Infrarot-Lasern: Untersuchungen zur Abhängigkeit der Ionensignalintensität von der Bestrahlung; *Diplomarbeit in Physik, Westfälische Wilhelmsuniversität Münster* 1999
- [Fel00] Feldhaus D., Menzel C., Berkenkamp S., Hillenkamp F., Dreisewerd K.; *J. Mass. Spec.* 2000 **35** 1320
- [Fen89] Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M.; *Science* 1989 **246** 64
- [Gar85] Garrison B.J., Srinivasan R.; *J. Appl. Phys.* 1985 **57** 2909
- [Ger93] Gerthsen C., Vogel H.: Physik; *Springer Verlag* 1993
- [Gro98] Gross J., Strupat K.; *Trends in Analytical Chemistry* 1998 **17** 470
- [Gro00] Groß J.: Analysis of Nucleic Acids by MALDI: Fragmentation Mechanisms and Development of Ribonucleic Acid Sequencing; *Dissertation Westfälische Wilhelmsuniversität Münster* 2000
- [Gün96] Günzler H., Heise H.M.: IR-Spektroskopie: eine Einführung; *VCH, Weinheim* 1996
- [Has92] Hassenbücker A.: Verbesserung der Massenauflösung in der MALDI-MS mit einem Flugzeitmassenspektrometer; *Dissertation Westfälische Wilhelmsuniversität Münster* 1992
- [Hec01] Hecht E.: Optik; *Oldenbourg Wissenschaftsverlag* 2001
- [Hes98] Hess W.P., Park H.K., Yavas O., Haglund R.F.; *Appl. Surf. Sci.* 1998 **127/128/129** 235
- [Hil90] Hillenkamp F., Karas M., Bahr U., Ingendoh A.: Ion Formation from Organic Solids V - A. Hedin, B.U.R. Sundquist, A. Benninghoven (Editoren), *John Wiley & Sons, Chichester* 1990 111
- [Hor99] Horneffer V., Dreisewerd K., Lüdemann H.-C., Hillenkamp F., Läge M., Strupat K. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1999 **185/186/187** 859
- [Kar85] Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F.; *Anal. Chem.* 1985 **57** 2935
- [Kar87] Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F.; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987 **78** 53

- [Kar88] Karas M., Hillenkamp F.; *Anal. Chem.* 1988 **60** 2299
- [Kar90] Karas M.; *Phys. Bl.* 1990 **46** 149
- [Kar97] Karas M., Bahr U.; *NATO ASI Ser.* 1997 **504** 33
- [Kar00] Karas M., Glückmann M., Schäfer J.; *J. Mass Spec.* 2000 **35** 1
- [Kau92] Kaufmann R., Kirsch D., Rood H.A., Spengler B.; *Rap. Comm. Mass Spec.* 1992 **6** 98
- [Kle96] Kleinekofort W., Avdiev J., Brutschy B.; *Int. J. Mass Spec Ion Proc.* 1996 **152** 135
- [Leh96] Lehmann W.D.: Massenspektrometrie in der Biochemie; *Spektrum Akad. Verlag Heidelberg* 1996
- [Mar88] Marchesi J.J.: Photokollegium; *Verlag Photographie* 1988
- [McL92] McLuckey S.A., Van Berkel G.J., Glisch G.L.; *J. Am. Soc. Mass Spec.* 1992 **3** 60
- [Men73] Menzel E., Mirandé W., Weingärtner I.: Fourier-Optik und Holographie; *Springer Verlag* 1997
- [Men00] Menzel, C.: Untersuchungen zum Einfluß von Laserwellenlänge und Laserimpulsdauer in der MALDI-MS mit Infrarot-Lasern; *Dissertation Westfälische Wilhelmsuniversität Münster* 2000
- [Niu98] Niu S., Zhang W., Chait B.T.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998 **9** 1
- [Nor94] Nordhoff E., Kirpekar F., Karas M., Cramer R., Hahner S., Hillenkamp F., Kristiansen K., Roepstorff P., Lezius A.; *Nucl. Acid Res.* 1994 **22** 2460
- [Ove90] Overberg A., Karas M., Bahr U., Kaufmann R., Hillenkamp F.; *Rap. Commun. Mass Spectrom.* 1990 **4** 293
- [Ove91] Overberg A., Karas M., Hillenkamp F.; *Rap. Commun. Mass Spectrom.* 1991 **5** 128
- [Ove92] Overberg A.: MALDI-MS mit Infrarot-Lasern: Untersuchungen zu Prinzip und Methode; *Dissertation Westfälische Wilhelmsuniversität Münster* 1992
- [Pap99] Papantonakis M., Baltz-Knorr M., Ermer D., Haglund R.F.; *Proc. 47th ASMS Conf. Mass. Spectrom. and All. Topics, Dallas, TX, USA* 1999
- [Pau90] Paul W.; Vortrag, Nobel Foundation *Angew. Chem.* 1990 **102** 780
- [Pos78] Posthumus M.A., Kistemaker P.G., Meuzelaar H.L.C., Ten Noever de Brauw M.C.; *Anal. Chem.* 1978 **50** 985
- [Pra87] Prause L., Hering P.; *Laser und Optoelektronik* 1987 **1** 25
- [Roh02] Rohlfing A.: Photoakustische Analyse des Desorptionsprozesses; *Diplomarbeit in Physik, Westfälische Wilhelmsuniversität Münster* 2002
- [Roh03] Rohlfing A., Menzel C., Kukreja L.M., Hillenkamp F., Dreisewerd K.; *J. Phys. Chem. B* 2003 **107** 12275
- [Sad97] Sadeghi M., Olumee Z., Tang X., Vertes A., Jiang Z.X., Henderson A.J., Lee H.S., Prasad C.R. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 1997 **11** 393
- [Sch91] Schröder E.: Massenspektrometrie: Begriffe und Definitionen; *Springer Verlag* 1991
- [Sch92] Schlag E.W., Grotemeyer J., Levine R.D.; *Chem. Phys. Lett.* 1992 **190** 521
- [She98] Sheffer J.D., Murray K.K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998 **12** 1685
- [Smi79] Smith A.L.: Applied Infrared Spectroscopy; *John Wiley & Sons, Inc. New York* 1979
- [Spe90] Spengler B., Kirsch D., Kaufmann R., Karas M., Hillenkamp F., Giessmann U.; *Rap. Comm. Mass Spec.* 1990 **4** 301
- [Sri86] Srinivasan R., Braren B., Seeger D.E., Dreyfus R.W.; *Macromolecules* 1986 **19** 916
- [Stö88] Stöbel W.: Fourier-Optik; *Springer Verlag* 1988
- [Str91] Strupat K., Karas M., Hillenkamp F.; *Int. J. Mass Spec. Ion Proc.* 1991 **111** 89
- [Tal99] Talrose V.L., Person M.D., Whittall R.M., Walls F.C., Burlingame A.L., Baldwin M.D.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999 **13** 2191
- [Ves95] Vestal M.L., Juhasz P., Martin S.A.; *Rap. Comm. Mass Spec.* 1995 **9** 1044
- [Vog03] Vogel A., Venugopalan V.; *Chem. Rev.* 2003 **103** 577
- [Vor94] Vorm O., Roepstorff P., Mann M.; *Anal. Chem.* 1994 **66** 3281
- [Wat00a] Wattenberg A., Sobott F., Brutschy B.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000 **14** 859
- [Wat00b] Wattenberg A., Sobott F., Barth H.D., Brutschy B.; *Int. J. Mass Spec.* 2000 **203** 49
- [Whi85] Whitehouse C.M., Dreyer R.N., Yamashita M., Fenn J.B.; *Anal. Chem.* 1985 **57** 675
- [Wil55] Wiley W.C., McLaren I.H.; *Rev. Sci. Instrum.* 1955 **26** 1150
- [Wol93] Wollnik H; *Mass. Spec. Rev.* 1993 **12** 89
- [Wu93] Wu K.J., Steding A., Becker C.H.; *Rap. Comm. Mass Spec.* 1993 **7** 142
- [Zhi99] Zhigilei L.V., Garrison B.J.; *Appl. Phys. A* 1999 **69** S75
- [Zhi00] Zhigilei L.V., Garrison B.J.; *J. Appl. Phys.* 2000 **88** 1281

Danksagung

Meiner Freundin Susanne Meyer habe ich mehr Glück zu verdanken, als ich je auszudrücken vermag. Aber da es hier um die Dissertation geht, soll von Susannes diesbezüglichen Verdiensten die Rede sein. Ohne ihre Fachkenntnisse in der digitalen Druckvorstufe und Seitengestaltung wäre diese Arbeit nicht in der vorliegenden Form gelungen. Und ihre Geduld und Unterstützung bei meinen Stimmungsschwankungen während des Zusammenschreibens weiß ich zu schätzen.

Herrn Prof. Franz Hillenkamp danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und eines spannenden Forschungsthemas. Zahlreiche konstruktive Diskussionen und die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf verschiedenen Tagungen - unter anderem in den USA - vorstellen zu können, machten diese Promotion für mich besonders wertvoll.

Herrn Prof. Harald Fuchs gilt mein Dank für die freundliche Betreuung meiner Arbeit im Physikalischen Institut. Die stets angenehme Atmosphäre ließ mich nie das Gefühl haben, mit meinen Anliegen zur Last zu fallen.

Die analytischen Untersuchungen mit der DNPH-Methode im Anorganisch-Chemischen Institut wurden von Martin Vogel und Gabriela Zurek durchgeführt. Peter Quint aus unserer Arbeitsgruppe bestimmte die Salzkonzentration in Glycerol. Obwohl all diese Experimente letztlich nicht in die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eingeflossen sind, möchte ich den Beteiligten dennoch für ihre Mühe danken.

Herr PD Jürgen Vogel ermöglichte mir einen Besuch im Medizinischen Laserforschungszentrum Lübeck. Dort lernte ich von Ingo Aplitz wertvolle Informationen zur Theorie und Praxis der Dunkelfeldbeleuchtung mit Lasern.

Leonid Zhigilei danke ich nicht nur für die Erlaubnis, die Bilder seiner Computersimulationen abbilden zu dürfen, sondern auch für die angeregte und angenehme Diskussion über die *plume*-Dynamik.

Allen Mitgliedern - auch den inzwischen ehemaligen - aus den Arbeitsgruppen von Prof. Hillenkamp und Prof. Peters gebührt ein großer Dank für zahlreiche kleine Hilfen, ohne die eine solche Arbeit nicht möglich ist. Sie alle aufzuführen sprengt den Rahmen der Danksagung. Repräsentativ erwähnen möchte ich hier Herbert Gryga, Jörg Althoff und Frau Schneider.

Klaus Dreisewerd und Martin Schürenberg danke ich vor allem für das gemeinsame *brain storming*, bei dem die Idee zu den Nachionisationsexperimenten entstanden ist. Stefan Berkenkamp danke ich für die Hilfe bei der Messung der Nukleinsäure und des Antikörpers.

Rainer Berenbrock setzte nicht nur viele meiner Konstruktionszeichnungen um, sondern gab mir nützliche Hinweise zur Materialbearbeitung und brachte mir die Arbeit an der Drehbank und der CNC-Fräse bei.

Andreas Hoekstra ist eine Seele von Mensch, allzeit hilfsbereit und nie eine Bitte ausschlagend.

Bernhard Kamping ist der gute Geist des Hauses. Durch seine Hilfe beim Auf- und Umbau meiner Versuchsanordnungen und in zahllosen anderen Fällen ist er weit über seine Pflichten als Hausmeister hinausgegangen.

Ulrich Röhling danke ich für die Geduld bei der Beantwortung meiner unendlichen (skeptischen) Fragen zur Elektronik. Abgesehen von vielen Diskussionen habe ich von ihm sehr viele praktische Dinge gelernt.

Mit Andreas Rohlfing verbrachte ich einige der lustigsten und konstruktivsten Stunden im Labor. Selten gab es bei langweiligen Meßreihen oder schwierigen Umbauten so viel zu lachen.

Beatrice Spottke, mit der ich ein Büro teilte, danke ich für die witzigen Aufmunterungen während der drögen Tage, auch auf Konferenzreisen. Sie gab mir oft Rückhalt, wenn es im Labor oder bei Besprechungen nicht so recht klappte. Ich bin sehr froh, daß wir unsere Arbeiten gemeinsam abschlossen.

Tina Crone danke ich für die diversen Nachfragen, ob ich schon mit dem Zusammenschreiben angefangen habe. Darüber hinaus danke ich ihr aber dafür, eine umwerfende Freundin zu sein, die wirklich großzügig und immer verlässlich ist.

Zu guter Letzt gebührt ein unendlich großer Dank meinen Eltern Annemarie und Uwe Leisner. Sie haben mich nicht nur großzügig finanziell, sondern auch zu jedem Zeitpunkt moralisch unterstützt. Diese Dissertation als Wegpunkt meiner Entwicklung ist auch ihr Verdienst als Eltern.
