



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Erzeugung und Detektion von Molekularstrahlen für die Materiewelleninterferometrie

Verfasser

Anton Frederik Stöhr

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 411

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Physik

Betreuer:

Univ. Prof. Dr. Markus Arndt

Zusammenfassung

Einleitend werden bereits erfolgreich durchgeführte und in Planung stehende Experimente zur Materiewelleninterferometrie komplexer Moleküle betrachtet. Im Fokus stehen die Anforderungen an die darin zum Einsatz kommenden Molekülquelle und Moleküldetektion. Die daraus gewonnenen Parameter und Kenngrößen stellen die Rahmenbedingungen bei der Entwicklung neuer Systeme zur Erzeugung und Detektion geeigneter Molekularstrahlen dar.

Im ersten Teil dieser Diplomarbeit wird ein zusammenfassender Überblick über bereits in der Literatur zu findende Ionisationstechniken, mit einem starken Fokus auf Einphotonenionisation (PI), gegeben. Diese stellt in Materiewelleninterferometern auf der Seite der Detektion eine Alternative zu der derzeit benutzten Elektronenstoßionisation dar und kann die Detektionseffizienz erhöhen. Außerdem stellt die Realisierung von absorptiven Lichtgittern eine notwendige Bedingung für die Durchführung in Aussicht stehender Experimente dar.

Weiters werden die Mechanismen von Matrix unterstützter Laser Desorption/Ionisation (MALDI) beschrieben. MALDI erlaubt die fragmentarme Desorption von großen organischen und anorganischen Molekülen. Dieses Verfahren stellt demnach eine Alternative zu bisher eingesetzten effusiven Quellen zur Erzeugung von Molekularstrahlen dar.

Der zweite Teil beinhaltet die Darstellung der wesentlichen technischen Komponenten, die in den Experimenten zum Einsatz kamen, welche im Laufe dieser Diplomarbeit durchgeführten wurden. MALDI wurde eingesetzt um eine Reihe von Biomolekülen zu desorbieren und die Einflüsse diverser für MALDI relevanten Parameter zu untersuchen.

Weiters wurde die Laser Desorption (LD) von synthetisierten perfluoroalkyl-funktionalisierten Porphyrinen und deren Detektion mittels Photoionisation getestet und die durch die Laser hervorgerufene Fragmentation der Moleküle untersucht. Die experimentellen Resultate werden präsentiert und interpretiert.

Abschließend werden im dritten Teil die Relevanz der durchgeführten Experimente für die Materiewelleninterferometrie betrachtet und mögliche Einsatzfelder für MALDI, LD und PI dargestellt.

Abstract

To begin with, different concepts of experiments are sketched out, which aim at showing the matter-wave interference of complex molecules. The main emphasis will be put on the need for suitable techniques for the production and detection of molecular beams. The characteristics and parameters of already successfully performed and being planned experiments represent the determining factors in the development of new molecular sources and detection schemes.

In the first part of this diploma thesis a summary of already established techniques for the ionization of molecules is given, thereby putting focus on single-photon ionization (SPI). The latter represents a promising alternative to electron impact ionization, which is currently used in near-field matter-wave interferometers on the side of molecule detection and it is able to enhance the detection efficiency. Besides that, upcoming experiments rely on the feasibility of the implementation of absorptive gratings made of light via SPI.

Furthermore, the mechanisms of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) are being described. MALDI enables desorption of large organic and inorganic particles, thereby preventing fragmentation. Therefore this technique constitutes an alternative to so far applied effusive sources aiming at producing beams of more massive and fragile molecules.

The second part contains the descriptions of the major technical components applied in the experiments which have been performed throughout this diploma thesis. Using MALDI, desorption and detection via a time-of-flight mass spectrometer of a range of bio molecules was accomplished. The influences of various parameters relevant for the desorption process have been investigated.

Moreover the Laser Desorption (LD) of perfluoroalkyl-functionalized porphyrins and their detection through the process of photoionization has been tested, as well as the fragmentation behaviour of the molecules due to the applied lasers checked. The experimental results are going to be presented und interpreted.

Conclusively, the relevancies of the performed experiments for the matter-wave interferometry are properly examined and the possible fields of application for MALDI, LD and PI accordingly outlined.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1. Materiewelleninterferometrie	9
1.2. Darstellung von Materiewelleninterferometern	11
1.2.1. Fernfeld-Interferometer	11
1.2.2. Kapitza-Dirac-Talbot-Lau-Interferometer	12
1.2.3. „Optical time-domain ionizing matter-wave Interferometer“	14
1.3. Entwicklung neuer Quellen molekularer Strahlen	16
Erster Teil: Theorie und Überblick	19
2. Photoionisation	19
2.1. Überblick über Methoden	19
2.2. Einphotonenionisation	21
2.3. Mehrphotonenionisation	23
2.4. Tagging	25
2.5. Massenlimit	26
2.6. Zusammenfassung	27
3. Matrix-unterstützte Laserdesorption und Ionisation	29
3.1. Allgemeines über MALDI	29
3.2. Eine kurze Physik des MALDI Prozesses	31
3.2.1. Absorption der Laserstrahlung	31
3.2.2. Zwei Stufen Model: Desorption und Ionisation	32
3.3. Entscheidende Parameter bei MALDI	33
3.3.1. Bestrahlte Fläche, Laserenergie und Fluence	34
3.3.2. Laserstrahlprofil	35
3.4. Probenpräparation	36
3.4.1. Die Wahl der Matrix und der Lösungsmittel	37
3.4.2. Matrixzusätze	38
3.4.3. Präparationstechniken	39
3.5. Dynamik und Eigenschaften der Teilchenwolke	41
3.5.1. Mittlere axiale Geschwindigkeiten	42
3.5.2. Räumliches Verhalten	43
3.5.3. Anzahl der desorbierten Moleküle und Ladungszustände	45
Zweiter Teil: Experiment	47
4. Equipment	47
4.1. Flugzeitmassenspektrometer	47
4.1.1. Funktionsweise	47
4.1.2. Verwendetes Flugzeitmassenspektrometer und Einstellungen	48
4.1.3. Massenauflösung	50
4.1.4. Kalibration	51
4.2. Vakuumsystem	51
4.3. Laser	52
4.3.1. Desorptionslaser	52
4.3.2. Photoionisationslaser	54

5. Umsetzung und Messresultate	57
5.1. Matrix unterstützte Desorption von Biomolekülen.....	57
5.1.1. Experimenteller Aufbau und Prozedere	57
5.1.2. Analytmoleküle	62
5.1.3. Die Probenpräparation betreffende Experimente	68
5.1.4. Einfallswinkel und orthogonales vs. lineares TOF	71
5.1.5. Variation der Laserparameter	71
5.1.6. Geschwindigkeitsverteilung	72
5.1.7. Einfluss einer an die Probe angelegten Spannung.....	73
5.1.8. Zusammenfassung	74
5.2. Laser Desorption und Photoionisation von funktionalisierten Tetraphenylporphyrinen.....	75
5.2.1. Experimentelles Setup und Prozedere	75
5.2.2. Funktionalisierte Tetraphenylporphyrine.....	80
5.2.3. Massenspektren.....	81
5.2.4. Geschwindigkeitsverteilungen	85
5.2.5. Bestimmung von Photoionisationsquerschnitten	87
5.2.6. Fragmentationsverhalten	90
5.2.7. Zusammenfassung	97
Dritter Teil: Diskussion	101
6. Reflexionen, Folgerungen und Ausblick	101
6.1. Anwendbarkeit von MALDI zur Erzeugung von Molekularstrahlen.....	101
6.1.1. Die direkte Verwendung von MALDI als Teilchenquelle.....	101
6.1.2. Die indirekte Verwendung von MALDI als Teilchenquelle: Entwicklung einer Ionenfalle.....	103
6.2. Überlegungen zur Anwendung von Laserdesorption als Teilchenquelle.....	106
6.3. Überlegungen zum Einsatz von Photoionisation als Detektionsschema	107
6.4. Die Eignung von perfluoroalkyl-funktionalisierten Phenylporphyrinen für das OTIMA	108
Anhang A.....	111
Anhang B.....	113
Literaturverzeichnis	115

1. Einleitung

Die Quantenmechanik gilt heute als eine der am besten bestätigten physikalischen Theorien. Quantenmechanische Phänomene wie zum Beispiel die Unschärfe von Ort und Impuls, die Superposition mehrerer Zustände, das Tunneln durch Potentialbarrieren oder die Quantelung verschiedener Größen sind im Alltag ohne Hilfsmittel der modernen Physik nicht zu beobachten. Die Welt, die wir in unserem Alltag wahrnehmen und mit der wir umgehen verhält sich vielmehr gemäß der Newtonschen Physik: Ein klassisches Objekt hat einen definierten Ort zu einem gewissen Zeitpunkt und bewegt sich darin mit einer definierten Geschwindigkeit. Eine Glühlampe kann kontinuierlich heller und dunkler gemacht werden. Wenn ein Fußball gegen eine Wand geschossen wird, dann fliegt dieser mit Sicherheit nicht durch jene durch. Es liegen demnach zwei Theorien vor, wobei die eine unseren intuitiven Erwartungen entspricht, allerdings in kleinen Größenordnungen erwiesen falsch ist, und die andere zwar eine Reihe an Phänomenen korrekt beschreiben kann, aber unseren intuitiven Vorstellungen widerspricht.

Gemäß dem Ehrenfest-Theorem genügen die Erwartungswerte von Orts- und Impulsoperator der Quantenmechanik den Gleichungen der klassischen Mechanik – die eine Theorie geht in die andere über. Es lässt sich nun fragen, wie genau dieser Übergang stattfindet und wodurch dieser bestimmt ist.

1.1. Materiewelleninterferometrie

Eine Möglichkeit diese Frage anzugehen, ist die Fähigkeit zur Superposition von quantenmechanischen Systemen heranzuziehen, diese zu nutzen um Interferenzerscheinungen sichtbar zu machen und die Einflüsse zu untersuchen, welche zu einem Verschwinden des quantenmechanischen Charakters führen. Solch eine Art von Experimenten wurde in unserer Gruppe erfolgreich durchgeführt und sie lassen sich mittels der Theorie der Dekohärenz richtig beschreiben [1-5]. Die Wechselwirkung eines Systems mit seiner Umgebung – etwa durch elektromagnetische Strahlung oder Stöße mit anderen Teilchen – entspricht einem Prozess, bei dem es zur Lokalisierung eines Zustandes kommt, indem prinzipiell Information über den Zustand des Systems an die Umgebung abgegeben wird. Unabhängig davon, ob ein Betrachter diese Information wahrnimmt, wird eine quantenmechanische Superposition unter-

bunden und zwar in einer Zeit, die mit zunehmender Masse des Systems abnimmt. Die Zerstörung von Kohärenz kann für große Massen demnach fast instantan erfolgen, was eine Erklärung bieten kann, weshalb uns die Wirklichkeit im Alltag klassisch erscheint [6]. Auch wenn jedes System irgendwie in Wechselwirkung zu seiner Umwelt steht, so kann es dennoch durch eine weitestgehende Isolierung von jeglichen Einflüssen befreit werden. So könnten auch größere Objekte in einen Zustand der Superposition übergeführt werden, da die Quantenmechanik Einschränkungen ihrer selbst nicht beinhaltet [7]. Es gibt allerdings auch theoretische Ansätze, welche eine Modifikation der Quantenmechanik vornehmen und die ein Auftreten von Superposition makroskopischer Körper generell nicht zulassen, während für mikroskopische Objekte die Standard-Quantenmechanik ihre Gültigkeit behält [8, 9]. Die Prüfbarkeit solch einer Theorie der kontinuierlichen spontanen Lokalisierung liegt in der Reichweite von heutigen Experimenten mit Materiewelleninterferometrie (MWI) [10, 11]. Das derzeit größte einzelne Objekt bei dem Quanteninterferenz nachgewiesen werden konnte hat eine Masse von ungefähr 10^{-23} kg und eine Ausdehnung von ungefähr 10^{-8} m [12].

Neben den Bestrebungen den quantenmechanischen Charakter von Materie bei immer größeren Objekten zu testen, kann MWI auch zur Bestimmung von optischen Polarisierbarkeiten von Molekülen [13, 14], als ergänzendes Mittel in der Massenspektrometrie [15], zur Bestimmung von absoluten Absorptionsquerschnitten für Photonen [16], zur Erlangung struktureller Information von Molekülen [17, 18], oder zur Lithographie [19] verwendet werden.

Die großen Herausforderungen, welche es bei der Ausdehnung von MWI auf größere Massenbereiche und verschiedene Arten von Molekülen in Zukunft zu überwinden gilt, betreffen vor allem die Präparation und die Detektion von geeigneten Molekularstrahlen.

In bisherigen und gegenwärtigen Interferometern werden als Teilchenquellen Öfen verwendet, welche die Moleküle verdampfen und so einen thermischen Teilchenstrahl erzeugen. Dabei können allerdings nur Moleküle verwendet werden, die a) sich überhaupt verdampfen lassen, d.h. einen hohen Dampfdruck haben, und b) während des Verdampfens nicht zerstört werden, d.h. stabil sind. Deshalb wurden Bestrebungen unternommen andere Arten zur Erzeugung von Molekularstrahlen zu verwenden, welche Laserdesorption in Verbindung mit einer sich adiabatisch ausbreitenden

Gaswolke zur Kühlung und in der Massenspektroskopie gebräuchliche Methoden, wie MALDI (Matrix unterstützte Laser Desorption und Ionisation) und ESI (Elektrospray-Ionisation) umfassen [20-22]. Weil die Geschwindigkeit und die Dichte des Teilchenstrahls für das Auftreten bzw. für die Deutlichkeit von Interferenz wesentliche Eigenschaften sind, gilt es zur Manipulation von diesen geeignete Methoden zu entwickeln [23-25]. Besonders für das Vordringen in höhere Massenbereiche bedarf es der Synthese von besonders robusten und leicht flüchtigen Molekülen [26] oder dem Einsatz einer Clusterquelle [27]. Auf Seiten der Detektion müssen in Zukunft Methoden mit hoher Effizienz für verschiedene Molekülklassen zum Einsatz kommen [19, 28-32].

1.2. Darstellung von Materiewelleninterferometern

Zurzeit existieren in unserer Gruppe drei Interferometer, welche auf verschiedenen Konzepten beruhen und daher verschiedene Anforderungen an die Eigenschaften des Teilchenstrahls, den darin befindlichen Molekülen und die möglichen Detektionsschemata stellen. Allen Interferometern ist gemein, dass sie mit ladungsneutralen Molekülen arbeiten. Im Folgenden wird auf jede dieser Aufbauten eigens eingegangen.

1.2.1. Fernfeld-Interferometer

Eines der Interferometer arbeitet im Fernfeld nach dem Prinzip der Beugung an einem Gitter, wie es aus Grundpraktika bekannt ist [30] (siehe Abbildung 1.1). Als Teilchenquelle fungiert ein thermischer Ofen. Das beugende Element stellt ein Siliziumnitrid-Gitter (G_1) dar, mit einer Gitterkonstante von 100 nm, einem Öffnungsverhältnis von 0,5-0,8 und einer Dicke von 10-200 nm. Zwischen dem Ofen und dem Gitter befinden sich zwei 0,5 m voneinander entfernte Aperturen (A_1 und A_2), die eine genügende Kollimation und transversale Kohärenz des Teilchenstrahls sicherstellen. Zur Detektion werden die Teilchen auf einer Quarzscheibe aufgefangen und mittels Fluoreszenz der Moleküle das Interferenzmuster sichtbar gemacht. Zwischen dem Gitter und der Quarzscheibe liegt eine Distanz von 0,5 m.

Anders als bei der Beugung von Licht, wo als Lichtquelle ein Laser, d.h. bereits kohärentes Licht mit nur einer Wellenlänge, verwendet wird, sind bei der Materiewelleninterferometrie die longitudinale und transversale Kohärenz des aus einer Quelle

kommenden Teilchenstrahles erst herzustellen. Dies geschieht mittels des – Einsatzes eines Geschwindigkeitsselektors bzw. der Aperturen. Beides führt zu einer Reduzierung des Teilchenflusses und um dennoch ausreichend viele Teilchen detektieren zu können, werden die gewonnene Geschwindigkeitsverteilung der Moleküle und die räumliche Kohärenz des Teilchenstrahles endlich sein, wodurch die einzelnen Interferenzmaxima nicht scharf, sondern verschmiert erscheinen. Zwei weitere Effekte führen zu einem Auswischen des Interferenzmusters: Die Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen Teilchen und Gitter, welche auf Teilchen verschiedener Geschwindigkeiten einen unterschiedlich großen Einfluss hat, und eine Diffusion der deponierten Moleküle auf der Oberfläche.

Um die Interferenzmaxima auf der Quarzscheibe mittels Fluoreszenzdetektion identifizieren und auseinander halten zu können, müssen diese hinreichend weit auseinander liegen. Bei gleichbleibender Gitterkonstante und Distanz zwischen Gitter und Schirm, ist der dabei entscheidende Faktor die Geschwindigkeit der Teilchen.

Eine alternative Quelle muss demnach einen Teilchenstrahl produzieren, welcher entweder bereits eine geeignete mittlere Geschwindigkeit aufweist, eine hinreichend kleine Geschwindigkeitsverteilung besitzt und selbst eine räumliche Kohärenz des Strahls garantiert, indem sie hinreichend klein ist. Oder diese Quelle muss einen so intensiven Strahl produzieren, sodass oben besprochene Elemente verwendet werden können, um die geforderte Qualität des Teilchenstrahles sicherzustellen. Alternativ zum thermischen Ofen kann sich die in der vorliegenden Arbeit getestete gepulste Laser Desorption als eine mögliche Molekülquelle herausstellen (siehe Abschnitt 5.2 und 6.2).

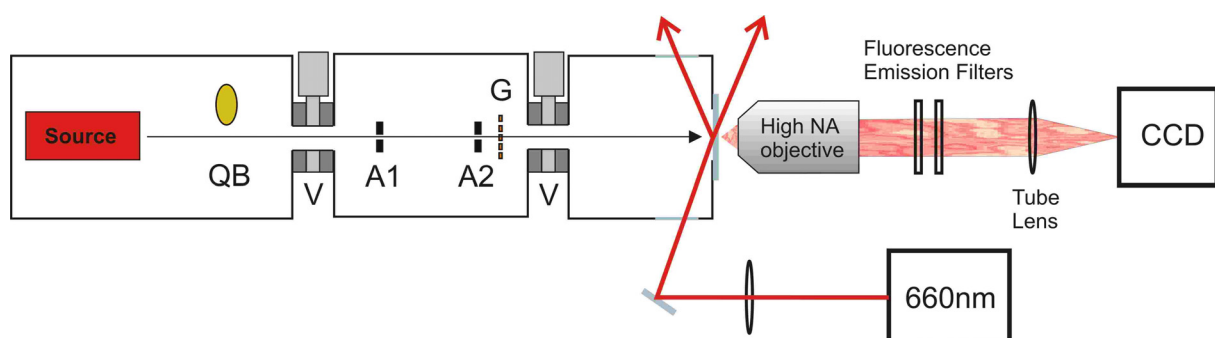


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Fernfeld-Interferometers.

1.2.2. Kapitza-Dirac-Talbot-Lau-Interferometer

Ein weiteres Interferometer arbeitet im Nahbereich und beinhaltet drei Gitter (KDTLI – Kapitza-Dirac-Talbot-Lau-Interferometer) [33] (siehe Abbildung 1.2).

Das erste dieser Gitter (G_1) dient der Herstellung der transversalen Kohärenz eines, z.B. aus einem thermischen Ofen stammenden, inkohärenten Teilchenstrahls (Lau-Effekt). Es besteht aus Siliziumnitrid, hat eine Gitterkonstante von 266 nm und ein Öffnungsverhältnis von 0,42.

Das zweite Gitter (G_2) stellt das beugende Element dar und wird durch eine stehende Lichtwelle mit einer Periodizität von ebenfalls 266 nm gebildet, welche durch Reflexion eines Laserstrahls mit einer Wellenlänge von 532 nm an einem Spiegel entsteht. Das zweite Gitter könnte ebenfalls ein materielles, absorptives Gitter sein [34]; allerdings ergibt sich bei der Verwendung eines Lichtgitters der entscheidende Vorteil eines Wegfalls von Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Teilchen und dem Gitter. Die auftretenden Kräfte wären stark positions- und geschwindigkeitsabhängig und würden, besonders bei großen und langsamen Molekülen, das Interferenzmuster verwischen. Der beugende Effekt des Lichtgitters kommt durch Dipolkräfte zwischen einem induzierten Dipolmoment im Molekül und dem elektromagnetischen Feld des Lasers zustande (Kapitza-Dirac-Effekt). Eine das Gitter passierende Materiewelle erfährt einen Phasenschub, dessen Größe von der Position des Moleküls im Laserfeld, bzw. der dort herrschenden Laserintensität, und der Polarisierbarkeit des Moleküls bei der verwendeten Wellenlänge abhängig ist. Breiten sich kohärente Materiewellen durch das Lichtgitter aus, so kommt es in regelmäßigen Abständen zu einem detektierbaren Interferenzmuster mit derselben Periodizität wie die stehende Lichtwelle, d.h. zu einer Selbstabbildung des Gitters (Talbot-Effekt).

Das dritte Gitter (G_3) – von derselben Art wie das erste – dient als Maske zur Detektion der entstandenen Interferenz. Den Detektor selbst bildet ein Quadrupolmassenspektrometer, für welches die Moleküle zuvor mittels Elektronenstoßionisation ionisiert werden. Drei horizontale Spalte – einer beim Ofen, einer vorm Detektor und einer dazwischen – dienen der Festlegung einer Flugparabel der detektierten Teilchen und so einer Geschwindigkeitsselektion.

Zurzeit sind die drei Gitter jeweils 105 mm voneinander entfernt. Das erlaubt das Operieren mit Materiewellen mit de Broglie Wellenlängen bis hinunter zu 1 pm [35]. Dieser Wellenlänge können, den Massen der Moleküle entsprechende, Geschwindigkeiten zugeordnet werden. Für ein Molekül mit einer Masse von 10.000 amu entspricht dies einer Geschwindigkeit von ca. 40 m/s. Ein Teilchenstrahl mit dieser Geschwindigkeit kann gewonnen werden, indem die Moleküle in einem Ofen bei ca. 600

K verdampft werden und der entsprechende Geschwindigkeitsbereich der Maxwell-Boltzmann-Verteilung ausselektiert wird. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Moleküle bei dieser Temperatur überhaupt verdampfen und nicht zerstört werden, was besonders für große Teilchen der hier besprochenen Größe in der Regel nicht der Fall ist. Es wird daher an der Synthese von speziellen stabilen und leicht flüchtigen Molekülen gearbeitet [26].

Auf Seiten der Detektion kann es aufgrund des Einsatzes von Elektronenstoßionisation (EI) ebenfalls zu Fragmentation kommen. Bei Photoionisation handelt es sich um eine sanftere Ionisationstechnik, welche also zu einer geringeren Fragmentation führen kann, und obendrein das Potential hat, effizienter als EI zu sein. Daher wird in der vorliegenden Arbeit diese Alternative getestet (siehe Abschnitt 5.2 und 6.3).

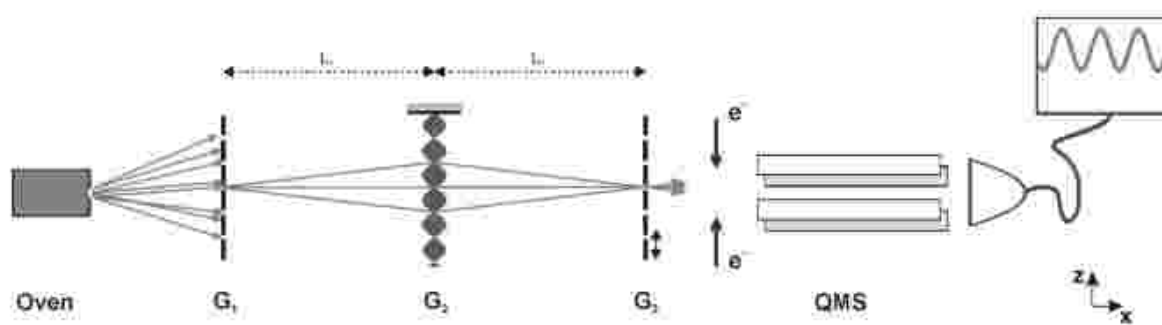


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des KDTLI. (Übernommen aus [26])

1.2.3. „Optical time-domain ionizing matter-wave Interferometer“

Ein drittes Interferometer (OTIMA) arbeitet ebenfalls im Nahbereich und ist ähnlich dem zuletzt besprochenen [11, 36] (siehe Abbildung 1.3). Der wesentliche und entscheidende Unterschied besteht darin, dass die beiden materiellen Gitter nun ebenfalls durch Lichtgitter ersetzt werden. Alle Gitter sind nun stehende Lichtwellen mit einer Gitterkonstante von 78,8 nm, welche durch Reflexion von Laserpulsen mit einer Wellenlänge von 157 nm an ein und demselben Spiegel gebildet werden. Dabei stellen das erste und das dritte wiederum absorptive Gitter dar, indem diese Moleküle ionisieren, welche sich zurzeit des Lichtpulses in deren Wellenbäuchen befinden. Die dabei entstehenden Ionen werden mittels eines elektrischen Feldes vom Teilchenstrahl entfernt und nur die sich in den Wellentälern sich befindenden neutralen Moleküle passieren die Gitter. Das erste Gitter (G₁) dient der Erzeugung der räumlichen Kohärenz des Teilchenstrahls. Das zweite ist das beugende Gitter (G₂) und wirkt zu einem Teil ebenfalls absorptiv, es bewirkt aber zum anderen Teil auch eine Phasen-

verschiebung der Materiewelle. Die Größe des absorptiven Anteils hängt von der Intensität des Laserpulses ab und die Größe des Phasenanteils in erster Linie von der optischen Polarisierbarkeit der Teilchen. Das dritte Gitter (G_3) dient als Maske zur Detektion des Interferenzmusters und den Detektor selbst bildet ein Flugzeitmassenspektrometer. Dieses Interferometer funktioniert nur bei Molekülen, die sich mit einem einzelnen Photon ionisieren lassen, d.h. eine Ionisierungsenergie unterhalb oder gleich der Energie der Photonen haben. Im jetzigen Fall beträgt die Photonenenergie 7,9 eV, entsprechend 157 nm. Als Teilchenquelle kommt zurzeit eine Magnetron-Sputterquelle zur Erzeugung von Metallclustern oder ein Even-Lavie Ventil zur Erzeugung Cluster organischer Moleküle zum Einsatz. Es entstehen so Teilchenstrahlen mit Geschwindigkeiten >100 m/s.

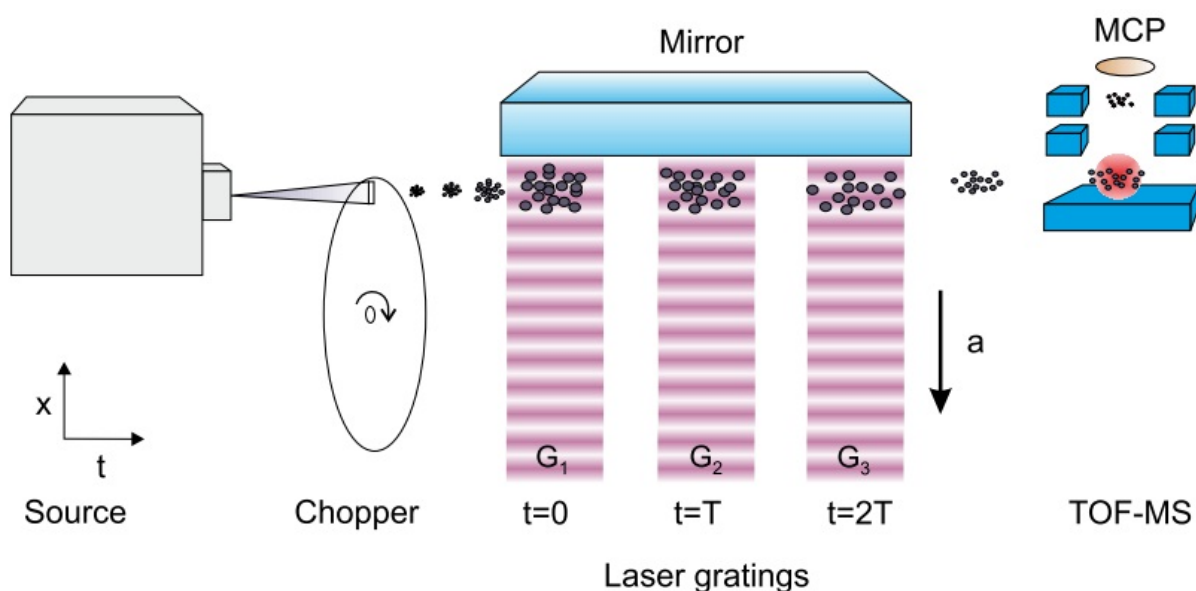


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des OTIMA. (Übernommen aus [11])

Die charakteristische Größe dieses Interferometers ist die Talbotzeit $T_T = L_T/v = m \cdot d^2/h$, wobei m die Masse eines Teilchens, v dessen Geschwindigkeit, L_T die Talbotlänge, d die Gitterkonstante und h die Planck-Konstante ist. Sie gibt die Zeit an, zu der eine Selbstabbildung eines gepulsten Beugungsgitters stattfindet, wenn dieses mit einem kohärenten Teilchenstrahl beleuchtet wird und ist unabhängig von der Geschwindigkeit der Teilchen. Alle Teilchen einer Masse erzeugen zur Talbotzeit das gleiche Interferenzmuster. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass gegenüber dem KDTLI keine Geschwindigkeitsselektion notwendig ist, welche eine Reduktion des Teilchenflusses und so des detektierten Signals zur Folge hätte. Die Signale gleicher Massen, aber unterschiedlicher Geschwindigkeiten, addieren sich auf. Die Talbotzeit kann durch

die Verzögerung zwischen den einzelnen Laserpulsen variiert werden. Der Molekularstrahl muss aus hinreichend kleinen Teilchenpaketen bestehen, also ebenfalls gepulst sein, damit verhindert wird, dass schnelle Teilchen langsame überholen und zum detektierten Signal beitragen, ohne alle Laserpulse passiert zu haben – dies wird mittels eines Choppers sichergestellt.

Die Anforderung an die Geschwindigkeiten der Teilchen mit der Masse M in atomaren Masseeinheiten kann durch $v \leq (1,6 \times 10^6)/M$ m/s abgeschätzt werden, wenn der Abstand zwischen zwei Laserpulse 2,5 cm beträgt. 16.000 amu entsprechen dann 100 m/s und 160.000 amu entsprechen 10 m/s.

1.3. Entwicklung neuer Quellen molekularer Strahlen

Die beiden Nahfeld-Interferometer kommen mit den bisher benutzten Teilchenquellen bei Teilchen mit Massen größer als 10.000 amu an ihre Grenzen. Ein technisch anspruchsvolles Konzept für eine Molekülquelle soll in Zukunft realisiert werden. In einer Quadrupol-Ionenfalle sollen mittels elektrischen Wechselfeldern zunächst Molekülonen gefangen und mittels eines Buffergases, wie z.B. Helium, gekühlt werden. Anschließend kann durch nicht-resonantes Laserkühlen mit Hilfe optischer Resonatoren die Temperatur der Teilchenwolke weiters verringert werden [37]. Sobald die minimale Temperatur erreicht ist und das Buffergas entfernt wurde, wird das Fallenfeld abgeschaltet, sodass die Moleküle frei expandieren. Die Erwartung ist, dass auf diese Weise eine Temperatur von 10 K und tiefer erreicht werden kann und Teilchen mit einer Masse von 100.000 amu so eine mittlere Geschwindigkeit unter 4 m/s hätten, welche für das Zeigen ihrer Welleneigenschaften ausreichend wäre. Die Ionenfalle muss mit Ionen gefüllt werden und ein Teil der vorliegenden Arbeit ist es, MALDI für diesen Zweck zu testen (siehe Abschnitt 5.1). Auf dem Weg zur Realisierung und Implementierung einer solchen Quelle stehen eine Reihe von Herausforderungen bevor, wie z.B. das Einkoppeln der Ionen in die Falle, oder die Reduzierung der Divergenz des Ionenstrahls beim Auskoppeln oder die Neutralisation der Ionen, welche zum Schluss der vorliegenden Arbeit näher skizziert werden sollen (siehe Abschnitt 6.1).

Wie beim Fernfeld-Interferometer könnte auch im Nahfeld gepulste Laserdesorption alternativ als Teilchenquelle, insbesondere von funktionalisierten Porphyrinen, verwendet werden (siehe Abschnitt 5.2 und 6.2).

Die Abschnitte 2 und 3 geben einen weiten Überblick über bereits in der Literatur zu findende Untersuchungen bezüglich Photoionisation und MALDI, sowie einen kleinen Einblick in die ihnen zugrundeliegende Theorien.

Erster Teil: Theorie und Überblick

2. Photoionisation

Die für derzeitige Materiewelleninterferometrie benötigten Teilchenstrahlen müssen präpariert werden. Es werden Strahlen benötigt, welche neutral sind, eine hinreichende Dichte besitzen, sodass z.B. nach einer Geschwindigkeitsselektion oder Kollimation noch ausreichend viele Moleküle detektiert werden können, und eine an das Interferometer angepasste Geschwindigkeit haben, welche die de-Broglie-Wellenlänge der Moleküle bestimmt.

Die Entwicklung von Methoden neutrale Moleküle zu leiten, abzubremesen und zu fangen ist Gegenstand gegenwärtiger Forschung. Unter Ausnutzung des Starkeffekts ist es möglich, kleine Moleküle (z.B. Ammoniak) unter 100 mK zu kühlen [38, 39]. Der Gebrauch von Lasern führte unter der Ausnutzung des Strahlungsdruckes zum Fangen von einzelnen mikrometergroßen dielektrischen Objekten [40] und moderne Ansätze zielen darauf ab, diese Methode zu nutzen um große Objekte in das Quantenregime zu bringen [41].

Geladene Moleküle haben gegenüber neutralen wertvolle Vorteile: Es existieren etablierte Methoden, die das Führen, Beschleunigen, Abbremsen, Fangen und die Detektion von Ionen mit relativ geringem Aufwand ermöglichen. Die Manipulation von geladenen Teilchen mittels elektrischer Felder zeichnet sich durch ihre universelle Anwendbarkeit auf alle Moleküle verschiedener Art und Größe gegenüber den vorher genannten Methoden aus. Im Prinzip lassen sich alle Moleküle sowohl positiv als auch negativ ionisieren. Es stehen diverse Techniken zur Ionisation von Molekülen zur Verfügung, über welche im Folgenden ein kurzer Überblick gegeben wird. Wie geladene Teilchen in Interferometern auf der Seite der Strahlquelle zum Einsatz kommen können, wird ein Thema in Abschnitt 6.1.2 sein.

2.1. Überblick über Methoden

Typische Methoden um direkt beim Erzeugen von molekularen Strahlen Ionen zu erhalten, stellen *Laser Desorption Ionisation* (LDI), *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) und *ElectroSpray-Ionization* (ESI) dar. Die ersten beiden Methoden kommen im experimentellen Teil zum Einsatz, wobei auf MALDI ausführlich in

Abschnitt 3 eingegangen wird. Für eine detaillierte Beschreibung von ESI wird auf die Dissertation von Elisabeth Reiger verwiesen [42].

Die in unserer Gruppe durchgeführten Experimente zur Materiewelleninterferometrie finden mit neutralen Molekülen statt. Es bedarf eines effizienten Detektionsschemas für die Molekularstrahlen. Eine Möglichkeit stellt die Postionisation der neutralen Moleküle dar und die Detektion der dabei gebildeten Ionen mittels eines Sekundärelektronenvervielfachers (Channeltron, Multi Channel Plate).

Für thermisch sehr stabile neutrale Moleküle, wie z.B. C_{60} , kann das Heizen mit einem Laser zu deren Ionisation führen [43-45] (vgl. Abbildung 2.2).

Eine sehr häufig eingesetzte Methode zur Postionisation ist *Elektronenstoßionisation* (EI). Dabei wird ein Filament mittels elektrischen Stroms zum Glühen gebracht und die dabei entstehenden Elektronen werden beschleunigt. Alternativ dazu kann auch ein auf ein Metall auftreffender Laser Elektronen freisetzen [46, 47]. Molekülstrahl und Elektronenstrahl kreuzen sich und es werden Ionen gebildet. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass – vor allem im höheren Massenbereich – auch starke Fragmentation auftritt [48]. Typischerweise werden die Elektronen auf eine Energie von 70 eV gebracht, weil die meisten organischen Moleküle bei dieser Elektronenenergie große Stoßquerschnitte haben und daher eine effiziente Ionisation erreicht wird, welche dennoch, aufgrund einer begrenzten Raumladungsdichte, zu 10^{-4} abgeschätzt wird.

Innerhalb von Ionenfallen wird oft chemische Ionisation (CI) verwendet. Dabei kollidieren die neutralen Moleküle mit einem Gas, z.B. mittels ESI erzeugtem protonierten Methanol, und es findet ein Ladungsaustausch statt. CI wird z.B. in [49] verwendet. Es handelt sich dabei zwar um eine sanftere Art Moleküle zu ionisieren, jedoch ist CI für unsere Interessen keine gute Wahl. Würde sich das Gas in die Hauptkammer ausbreiten, in welcher sich das Interferometer befindet, würde es zu Stoßdekoherenz kommen und Interferenz verhindern [4].

In der Literatur lässt sich auch *Hyperthermal-Surface-Ionization* (HSI) als Ionisationsmethode finden [50-52]. Dabei prallen die neutralen Moleküle auf eine speziell präparierte Folie. Die kinetische Energie der Moleküle schließt die Energielücke zwischen der Austrittsarbeit der Folie und dem Ionisationspotential des Moleküls, was zur Bildung von positiven oder negativen Ionen führt. Eine positive Spannung von 5-15 V, die auch gepulst sein kann, stößt die gebildeten Ionen wieder von der Oberfläche ab. Mittels HSI war es möglich das Protein Insulin zu ionisieren [53].

In der vorliegenden Arbeit wird Photoionisation (PI) als Postionisationsmethode detaillierter betrachtet und in Abschnitt 5.2 eingesetzt. Sie stellt sich als saubere, effiziente und fragmentarme Methode heraus, die unabhängig von der kinetischen Energie der Moleküle ist und für einen weiten Massenbereich und verschiedene Molekülklassen eingesetzt werden kann. Eine gute erste Übersicht zu PI bieten [54] und [55].

2.2. Einphotonenionisation

Als Einphotonenionisation (SPI – Single Photon Ionization) kann allgemein der Vorgang bezeichnet werden, bei dem die Übertragung der Energie nur eines Photons auf ein Atom oder Molekül zur Bildung eines freien Elektrons und eines radikalischen Kations führt (vgl. Abbildung 2.2). Die Energie des Photons muss dabei größer oder gleich der Ionisierungsenergie (IE) des Atoms oder Moleküls sein.

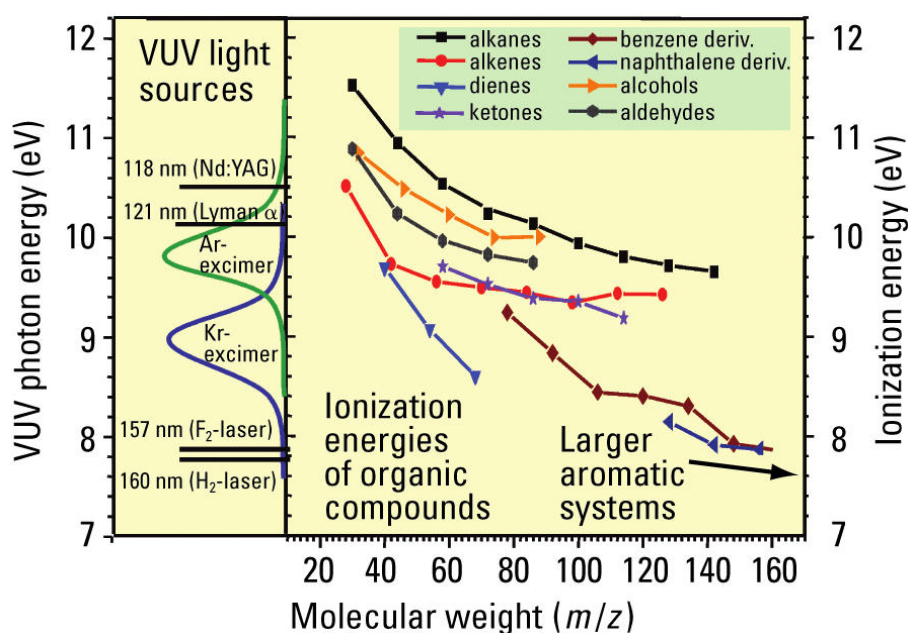


Abbildung 2.1: Ionisierungsenergien von Moleküle verschiedener Massen und Klassen, sowie Photonenenergieverteilung einiger VUV-Lichtquellen [56]

King et al. haben die Ionisierungsenergien von 3000 Atomen und Molekülen betrachtet¹ [57]. Demnach tritt eine Häufung um 8,8-9,5 eV auf bzw. für einen Großteil der Teilchen wird 130-140 nm VUV Licht für eine SPI benötigt. In Abbildung 2.1 sind die Ionisierungsenergien verschiedener Klassen und Massen dargestellt, sowie passen-

¹ Sie zogen dazu die NIST „Standard Reference Data base“ Vol. 69 heran:
<http://webbook.nist.gov/chemistry/ie-ser.html> (18.1.2012)

de Lichtquellen zur Einphotonenionisation. Es lässt sich eine Abnahme der Ionisierungsenergie mit zunehmender Masse erkennen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Molekülen fallen unter die Kategorie der aromatischen Systeme und es wird deren Ionisation mit 7,9 eV Photonen gezeigt (vgl. Abschnitt 5.2).

Auf geeignete Lichtquellen gilt es kurz einzugehen. F₂-Laser haben die kürzeste Wellenlänge von kommerziell erhältlichen Lasern. Dies beschränkt die potentiellen Analyten auf solche mit Ionisierungsenergien unter 7,9 eV. Mittels eines frequenzverdreifachten Nd:YAG Lasers kann unter nochmaliger Frequenzverdreifachung in einer Gaszelle mit einem Xenon/Argon-Gemisch Licht mit einer Wellenlänge von 118nm (10,5eV) erzeugt werden [58-63]. VUV-Excimer Lampen², die nach dem Prinzip einer Anregung eines Edelgases durch Elektronenstrahlen arbeiten, emittieren Licht mit einer Wellenlänge hinunter bis 115 nm (10,7 eV), sowohl im Puls- als auch im Dauerstrichbetrieb, allerdings mit geringen Lichtstrom in der Größenordnung von 10¹⁶ Photonen/s [64]. Freie Elektronen Laser [57], weiche Röntgen- [65], und Synchrotronstrahler werden für spezielle Anwendung ebenfalls verwendet [66, 67].

Neben den Ionisierungsenergien einzelner Teilchen sind auch die Photoionisationsquerschnitte bei den jeweiligen Wellenlängen von Bedeutung. Für den Fall, dass keine Ionisationssättigung eintritt, d.h. nicht alle sich im Ionisationsvolumen befindende Moleküle ionisieren, gilt folgende Formel für die absolute Zahl der produzierten Ionen pro Sekunde:

$$Y_{SPI} = \sigma_{PI} I_0 N \quad \text{Formel 1}$$

wo σ_{PI} der Photoionisationsquerschnitt des Analyten ist, I_0 (Photonen s⁻¹cm⁻²) der Photonenstrom der VUV-Lichtquelle, N die Anzahl der Teilchen innerhalb des Ionisationsvolumens [54].

Ein Vorteil der Einzelphotonenionisation besteht darin, dass, wenn nicht alle, so die meisten, organischen Moleküle Ionisierungsenergien unter 10,5 eV haben (vgl. Abbildung 2.1). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Moleküle wie He, CO, CO₂, H₂, H₂O oder O₂, welche als Hintergrundgase in Vakuumkammern vorkommen, Ionisierungsenergien über 10,5 eV haben und daher mit VUV-Licht nicht ionisiert wer-

² OPTIMARE Analytik GmbH & Co. KG

den. Würde das Hintergrundgas ionisieren, so könnte es zu einer Sättigung des Detektors kommen.

2.3. Mehrphotonenionisation

Bei der Mehrphotonenionisation (MPI) tragen generell mindestens zwei Photonen zur Bildung eines freien Elektrons und eines Kations bei. Die Summe der Energien der dabei beteiligten Photonen muss größer oder gleich der Ionisierungsenergie des neutralen Moleküls sein (vgl. Abbildung 2.2).

Ein wesentlicher Vorteil von MPI ist, dass Licht beliebiger Wellenlänge verwendet werden kann, vorausgesetzt, es ist in solch einer Intensität vorhanden, dass es in hinreichend kurzer Zeit zur Absorption der benötigten Anzahl von Photonen kommt. Dazu werden die zweite, dritte und vierte Harmonische von Nd:YAG Lasern verwendet (532, 355, 266 nm) [68-70], als auch mit diesen gepumpte durchstimmbare OPOs (Optisch parametrischer Oszillator) (240-360 nm) [71, 72], oder Excimer Laser gefüllt mit z.B. XeCl (308 nm) [73] oder KrF (248 nm) [74].

Die Querschnitte für die Absorption eines Photons sind für einen bestimmten Analyten für das erste, das zweite, ..., das n-te Photon verschieden. Im Prinzip handelt es sich bei der Absorption der einzelnen Photonen um Ereignisse, die nacheinander stattfinden. Die Wahrscheinlichkeit der Ionisation ergibt sich daher aus den Wahrscheinlichkeiten des Eintreffens der einzelnen Absorptionsereignisse. Beschränken wir uns auf den häufigsten Fall einer 2-Photonenionisation dann lässt sich folgende Formel für die pro Sekunde erzeugten Ionen angeben:

$$Y_{MPI} = \sigma_{1,PI} \sigma_{2,PI} I_0^2 N \quad \text{Formel 2}$$

wo $\sigma_{1,PI}$ und $\sigma_{2,PI}$ die Absorptionsquerschnitte für das erste bzw. das zweite Photon sind. Die quadratische Abhängigkeit von der Laserintensität I_0 ist charakteristisch für die 2-Photonenionisation [54].

Mehrphotonenionisation eines Moleküls kann auf mehrere Weisen erfolgen. Ein Molekül kann ionisiert werden, indem ein Elektron über virtuelle Zwischenniveaus das Molekül verlässt. Man spricht hier von einem kohärenten Prozess, bei dem sehr hohe Photonendichten benötigt werden. Ein anderer Weg führt über reale Zwischenniveaus. Das verwendete Licht kann dabei auch mit den Energieniveaus des Moleküls resonant sein, d.h. die Photonenenergie, oder ein Vielfaches davon, entspricht der Energiedifferenz von Ausgangsniveau und Zwischenniveau. Die Absorption bei solch

einer Art von Übergängen ist viel wahrscheinlicher als bei nicht-resonanten Übergängen und kann ausgenutzt werden, um selektiv vorwiegend nur solche Moleküle mit resonanten Niveaus zu ionisieren. Wird innerhalb der Zerfallszeit eines Zwischenzustandes ein weiteres Photon absorbiert, so führt dies entweder zu einem weiteren Zwischenniveau oder zur Ionisierung des Moleküls [75]. Der ganze Prozess wird REMPI (Resonance Enhanced Multi Photon Ionization) genannt und dessen Theorie wird in [76] im Detail behandelt (vgl. Abbildung 2.2). Ein eingenommener Zwischenzustand kann allerdings auch strahlungslos zerfallen (relaxieren), indem sich die elektronische Energie z.B. in Schwingungsenergie umwandelt, was auch zu einer Fragmentation des Moleküls führen kann [54]. Fragmentation eines Moleküls kann auch vorkommen, wenn ein Photon absorbiert wird, wenn sich bereits ein Kation gebildet hat [77]. Andere schnelle Relaxationsprozesse, welche mit der Absorption eines weiteren Photons in Konkurrenz stehen können, sind Isomerisation, Ladungstransfer oder Intersystem Crossing [71].

Die einfachste und am häufigsten verwendete MPI ist 1+1 MPI, bei der zwei Photonen gleicher Wellenlänge verwendet werden. Wird ein OPO verwendet, dann ist der Wellenlängenbereich durchstimmbar und die PI kann selektiv auf solche Moleküle wirken, welche Resonanz aufzeigen: 1+1 REMPI. Für das zweite Photon kann auch eine fixe andere Wellenlänge gewählt werden, wenn die Ionisierungsenergie höher liegen sollte. Dies wird 1+1' REMPI genannt.

MPI zeichnet sich durch das Einbeziehen von Zwischenzuständen gegenüber SPI aus, da diese Methode dadurch selektiv wirken kann. Zeigt ein Molekül bei einer Wellenlänge Resonanz, z.B. Tryptophan bei 290 nm [78], so führt MPI zu einem hohen fragmentarmen Ionensignal des Moleküls. Im Weiteren kann MPI auch Moleküle mit höheren Ionisierungsenergien ansprechen.

Einfluss der Pulsweite

Da es sich bei der Mehrphotonenionisation um einen Stufenprozess handelt und die Zeit auf dem dieser Prozess abläuft eine Rolle spielen wird, wurde der Einfluss der Pulsdauer des Ionisationslasers untersucht [79].

Von einigen Autoren wird berichtet, dass die Benutzung eines Piko- oder Femtosekunden Lasers zu einer effizienteren MPI führt [68, 70, 71, 80]. Einerseits kommt es zu weniger Fragmentation und andererseits wird ein höheres Signal bei weniger Ge-

samtenergie pro Puls erzielt. Bei kleinen Molekülen wirkt sich die kürzere Pulslänge nicht so stark aus wie bei Molekülen größer als 500 amu [71, 80]. Weiters ist das Ionensignal unabhängig von den in den Peptiden vorhandenen Chromophoren, d.h. deren molekulare Struktur. Dies deutet darauf hin, dass bei den kürzeren Pulsen kohärente Absorption ohne Zwischenzustände stattfindet.

Als Grund für die geringere Fragmentation wird genannt, dass aufgrund der schnellen Anregung mögliche Dissoziationspfade übersprungen werden können, d.h. bevor sich noch die innere Energie des Moleküls umverteilen kann, ist es schon ionisiert.

Dabei ist jedoch auch zu beachten, dass die verwendeten fs-Laser eine größere spektrale Bandbreite haben als ns-Laser ($>500\text{cm}^{-1}$ bzw. $<1\text{cm}^{-1}$), was bei Benutzung der fs-Laser möglicherweise zur Anregung eines weiteren Bereichs von vibronischen Moden führen kann und daher zu einer effizienteren Ionisation.

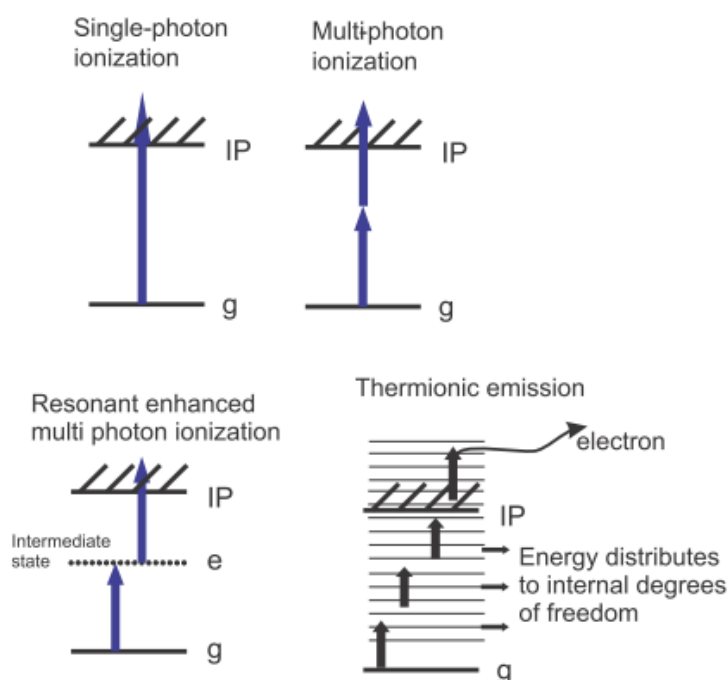


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung verschiedener Ionisationsmechanismen, welche im Text erklärt werden (aus [81]).

2.4. Tagging

Sowohl für SPI als auch für MPI können auf chemische Weise Chromophore an die Moleküle angehängt werden („tagging“). Chromophore stellen gute Absorber dar und steigern die Ionisationseffizienz, bzw. ermöglichen eine Ionisation allererst.

Bei SPI führte tagging zur Ionisation von den gesamten Molekülkomplexen [82-86]. Tagging wird auch als Möglichkeit angesehen, Fragmentation des gebildeten radika-

len Kations zu reduzieren oder zu verhindern [83]. Als Erklärung dafür wird angegeben, dass z.B. eine angeheftetes Chromophor die Ladung eines radikalen Kations auf sich delokalisiert und dadurch zur Stabilisierung des ganzen Kations beiträgt.

Die in Abschnitt 5.2 getesteten Moleküle können als „getaggt“ bezeichnet werden. In deren Zentrum befindet sich jeweils ein Porphyrin, von welchem ausgegangen wird, dass es für die Ionisierbarkeit des gesamten Molekülkomplexes verantwortlich ist.

Bei MPI können die Chromophore die benötigten Zwischenzustände bereitstellen. In [73] wurden an einzelne Aminosäuren Chromophore angehängt, was zu deren erfolgreichen Ionisation führte.

2.5. Massenlimit

Das Signal für durch EI, SPI oder MPI positionierte Moleküle nimmt mit steigender Masse kontinuierlich ab [80]. Schlag et al. sind der Frage nachgegangen, weshalb dem so ist und haben ein Modell vorgestellt, in welchem die vielen internen Freiheitsgrade eines großen Moleküls dafür verantwortlich sind [87, 88]. Anders als bei kleinen Moleküle, bei denen eine Ionisierung vorwiegend im Femtosekundenbereich stattfindet, finden die Prozesse bei größeren Molekülen auf größeren Zeitskalen statt. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung von messbaren Verzögerungen des Auftretens von freien Elektronen nach Photonenanregung. Dies deutet darauf hin, dass der gesamte Prozess der Ionisierung ein zweistufiger ist. Das Photon liefert zunächst die Energie, die benötigt wird, um den „Loslösungsprozess“ des Elektrons zu starten. Die tatsächliche Freisetzung des Elektrons ist dagegen verzögert und umso mehr verzögert, je größer das Molekül ist – und bei sehr großen Molekülen ist die Verzögerung so groß, dass andere Prozesse die Energie umwandeln – insbesondere das Brechen von Bindungen. So wird eine Ionisation verhindert.

Erklärt wird die Verzögerung dadurch, dass ein größeres Molekül eine höhere Dichte an Vibrations- und Rotationszuständen aufweist. Ein Photon, dessen Energie zur Ionisation ausreichen sollte, regt das Elektron auf ein Rydberg-Niveau knapp unter dem Vakuumniveau an. Die fehlende Restenergie geht in Vibrationsanregung verloren, welche das Elektron quasi nach einer Verzögerung wieder haben kann, um die langreichweitige Anziehung zum positiven Kern zu überwinden. Es findet eine Kopplung von elektronischen und Bewegungsfreiheitsgraden der Kerne statt. Im Allgemeinen hängt die Relokalisierung der Energie im elektronischen Freiheitsgrad von der

Vibrationsenergie, d.h. anfänglicher interner thermischer Energie des Moleküls plus vom Photon stammende, nicht an das Elektron übertragene Energie, zusammen. Je größer ein Molekül ist, desto mehr Vibrationsmoden hat es und bei gleichbleibender Gesamtenergie befindet sich daher weniger Energie in einer Mode. Zusätzliche thermische Energie führt jedoch auch zur Dissoziation des Moleküls. Beides, Ionisation und Fragmentation, benötigen die Lokalisierung von Energie, die sonst statistisch über alle Moden verteilt ist – beide Prozesse befinden sich in Konkurrenz zueinander.

Becker und Wu führen das Ionisationsverhalten größerer Moleküle auf eine zunehmende innere Energie größerer Moleküle und eine dadurch bedingte Fragmentation zurück [89]. Gestützt auf experimentelle Ergebnisse, die eine erfolgreiche Erzeugung von Ionen bis 7000 amu zeigen [90], schließen sie allerdings ein generelles Massen- und Größenlimit für Photoionisation aus und setzten vielmehr auf kalte Desorptionstechniken mit der Unterstützung von Jet Cooling.

Bei den meisten erfolgreichen Versuchen größere Molekülionen mittels Photoionisation zu erzeugen, wurde Jet Cooling verwendet [31, 78, 90, 91]. Dabei werden die Analytmolekül in einen sich mit Überschall frei ausbreitenden Gasstrom, z.B. Helium, desorbiert. Die internen Energien der Moleküle werden so, durch Stöße mit dem Trägergas, erniedrigt.

2.6. Zusammenfassung

MPI hat, speziell im Falle von REMPI, gegenüber SPI Vorteile. SPI zeichnet sich wiederum durch eine universelle Anwendbarkeit auf alle Moleküle aus, die eine Ionisierungsenergie unterhalb der verwendeten Photonenenergie besitzen. SPI stellt sich in manchen Experimenten in Bezug auf eine Fragmentation als sanftere Ionisationsmethode heraus [60, 70, 77]. Besonders aufgrund der bei MPI eingesetzten höheren Laserintensität, kommt es zur weiteren Anregung von gebildeten Kationen, was zu Fragmentation führt. Besonders wenn die Photonenenergie nur knapp über der Ionisierungsenergie liegt und keine überschüssige Energie an das Molekül übertragen wird, ist SPI die bessere Lösung. In Abschnitt 5.2 wird daher SPI eingesetzt und die Photoionisation von perfluoroalkyl-funktionalisierten Tetraphenylporphyrinen mit einer Masse bis zu 8.800 amu gezeigt.

3. Matrix-unterstützte Laserdesorption und Ionisation

“MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionisation has been a success, no doubt“ [92], schreiben Franz Hillenkamp und Michael Karas im Jahr 2000 – 12 Jahre nach dem Erscheinen ihrer wegweisenden Arbeit *Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons* und der beinahe zeitgleich erschienenen Arbeit von Koichi Tanaka *Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*. Tanaka bekam für seine Entdeckung – gemeinsam mit John B. Fenn, dem Erfinder der Elektrospray-Ionisation, und Kurt Wüthrich, für seine Arbeiten an der Strukturaufklärung von Proteinen mittels kernmagnetischer Resonanzspektroskopie – 2002 den Nobelpreis für Chemie.

In dem 1988 erschienenen Artikel [93] wird bereits über das Desorbieren von intaktem und isoliertem Bovine Albumin, einem ca. 67.000 amu schweren Protein berichtet. Die nachfolgende Darstellung der Theorie und bereits durchgeführten Experimenten zu MALDI soll dazu dienen, diese Technik den Erfordernissen für eine Molekülquelle für die Materiewelleninterferometrie anzupassen.

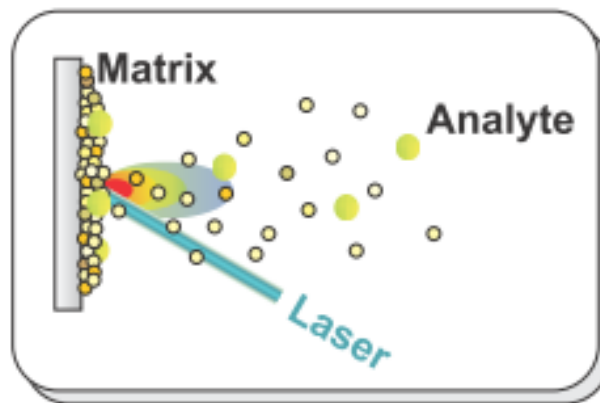


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung von Matrix unterstützter Laser Desorption (aus [21]).

3.1. Allgemeines über MALDI

Bei MALDI handelt es sich um ein Verfahren, welches ermöglicht, thermisch labile Moleküle aus der kondensierten Phase in einen Molekularstrahl zu überführen und detektierbar zu machen [94-96]. Das Entscheidende bei MALDI gegenüber dem Verdampfen durch Erhitzen oder anderen Desorptionstechniken mit Hilfe eines Lasers ist die Verwendung einer Matrix, in welche die eigentlich erwünschten Moleküle, die Analyte, eingebettet sind. Bei der Matrix handelt es sich um kristallisierte kleine Mo-

leküle, denen im MALDI-Prozess wichtige Aufgaben zukommen. Zunächst sollen die Matrixmoleküle bei der Wellenlänge des verwendeten Lasers besonders gut absorbieren, damit die vom Laser gelieferte Energie effizient übertragen werden kann. Durch diesen Energieübertrag auf die Matrixmoleküle wird auch verhindert, dass, wie bei der reinen Laserdesorption, zuviel Energie auf die Analyte selbst übertragen wird, was zu deren Fragmentation führt. Die – beim MALDI-Prozess sehr rasche – Übertragung der Laserenergie auf das Matrixmaterial führt zu dessen sehr schnellem Aufheizen, wodurch es zu einem örtlich begrenzten Verdampfen der Matrixkristalle kommt und die expandierenden Matrixmoleküle die Analytmoleküle mit sich reißen. Daneben tragen die Matrixmoleküle in der sich nach Laserbeschuss adiabatisch ausbreitenden Teilchenwolke zur Kühlung der Analyte bei. Eine Hauptaufgabe der Matrix ist es außerdem eine Ionisation der Analytmoleküle zu bewirken. Die Einbettung in eine Matrix führt weiters zu einer räumlichen Separation der Analyte und damit zu einer Reduzierung deren Wechselwirkung, wodurch die Bildung von Analyt-Clustern vermieden wird.

Die Übertragung der Laserenergie auf das Probenmaterial muss hinreichend schnell erfolgen, weshalb gepulste Laser verwendet werden. Je nach verwendetem Laser Typ variiert die Pulsdauer im Ultravioletten zwischen ungefähr 0,5 ns und 25 ns und 5-100 ns im Infraroten. Längere Laserpulse würden zur thermischen Anregung der Analytmoleküle führen, noch bevor diese sich aus der kondensierten Phase gelöst haben, und in deren Fragmentation enden.

Die Verwendung von Lasern verschiedener Wellenlängen verlangt verschiedene Arten von Matrizen. Heute werden, aufgrund der relativ niedrigen Kosten, Kompakt- und Einfachheit, vorwiegend N₂-Gaslaser eingesetzt, welche ultraviolettes Licht bei einer Wellenlänge von 337 nm emittieren. Die geläufigsten Matrizen sind jene, die dort, oder in der Nähe, ihr Absorptionsmaximum haben: 2,5-DHB, Sinapinsäure, α -CHCA, 3-HPA. Als Alternative zum N₂-Laser wird häufig auch ein frequenzverdreifender Nd:YAG Festkörperlaser verwendet, welcher bei 355 nm emittiert und für den daher die gleichen Matrizen verwendet werden können.

Der Energieübertrag der Laserstrahlung auf die Matrix geschieht beim UV-MALDI primär durch die Anregung der aromatischen π -Elektronensysteme in den Matrixmolekülen [97, 98]. Beim IR-MALDI dagegen, unter Benutzung z.B. eines Er:YAG Lasers, regt das Laserlicht mit 2,94 μ m Wellenlänge die Valenzschwingungsmoden der

passenden Matrixmoleküle an (z.B. das flüssige Glycerin). Es handelt sich um eine „weichere“ Methode zur Desorption [98, 99], weil der Energieübertrag an die Matrix-, bzw. Analytmoleküle nicht so groß ist, sodass es zu Fragmentation kommt. Als Vorteil wird auch eine große Auswahl an zur Verfügung stehenden Matrizen erachtet, die bei 3 μm stark absorbieren. IR-Matrizen stellen eine bessere physiologische Umgebung dar, als die stark säuerlichen UV-Matrizen und führen besonders bei sehr großen oder labilen Molekülen, wie bei DNA oder RNA Proben, zu günstigeren Desorptionseigenschaften [100]. Für die Anwendung bei Peptiden und Proteinen mittlerer Größe bleibt dennoch UV-MALDI bezüglich der Massenauflösung und der Sensitivität unerreicht [98].

3.2. Eine kurze Physik des MALDI Prozesses

Für ein besseres Verständnis von MALDI sollen kurz einige Mechanismen skizziert werden, welche im gesamten MALDI-Prozess involviert sind.

3.2.1. Absorption der Laserstrahlung

Die Laserenergie wird vom Probenmaterial, insbesondere von den Matrixmolekülen, gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz absorbiert: $H = H_0 \cdot \exp(-\alpha_n \cdot c_n \cdot z)$, wobei H die Laser Fluence in einer Tiefe z der Probe, H_0 die Fluence an der Probenoberfläche, α_n der molare Absorptionskoeffizient und c_n die Konzentration der absorbierenden Moleküle in der Probe sind (für eine Definition der Fluence siehe Abschnitt 3.3.1). Die Tabelle 3.1 gibt typische Werte für diese Größen an. Die Eindringtiefe δ , gibt die Tiefe in die Probe an, bei welcher die Fluence um ca. 30% abgefallen ist. Sie kann größenordnungsmäßig das Volumen abschätzen, das mit einem einzelnen Laserpuls desorbiert wird. Bei einer Dicke von ca. 5 Å pro 2,5-DHB Monolage werden bis zu 400 Monolagen pro Puls entfernt. (vgl. Abschnitt 3.5.3)

	H_0 [J m^{-2}]	α_n [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	c_n [mol l^{-1}]	$\alpha = \alpha_n \cdot c_n$ [cm^{-1}]	$\delta = 1/\alpha$ [nm]
Typische Werte	20 - 200	$5 \times 10^3 - 5 \times 10^4$	10	$5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$	20 - 200

Tabelle 3.1: Typische für UV-MALDI die Absorption der Laserstrahlung betreffende Werte (aus [96 (5)])

3.2.2. Zwei Stufen Model: Desorption und Ionisation

Bei MALDI finden zwei Prozesse statt: die Desorption von Probenmaterial und die Ionisation eines kleinen Anteils der Matrix- und Analytmoleküle. Diese beiden Prozesse sind eng miteinander verflochten und finden beide auf einer Zeitspanne von Nanosekunden und einem Raumbereich von Mikrometern statt. Aufgrund der Komplexität der involvierten physikalischen Mechanismen werden der Einfachheit halber die beiden Prozesse getrennt voneinander betrachtet.

Desorption

In der Literatur existiert eine Reihe von Modellen, welche den Desorptionsprozess bei UV-MALDI erklären. Diese Modelle reichen von einer thermischen Desorption einzelner Moleküle, über eine Schicht für Schicht Verdampfung der Oberflächen, bis zu einer Ablation ganzer Volumen infolge einer Phasen-Explosion, oder durch Laser-induzierte Druckwellen. Einen Überblick über die bestehende Literatur gibt [101 (405ff.)].

Mittels eines „Breathing Sphere“ Models in einer Moleküldynamik Computersimulation kann in Übereinstimmung mit experimentellen Ergebnissen die axiale Geschwindigkeit der sich ausbreitenden Teilchenwolke berechnet werden [102] (vgl. Abschnitt 3.5). Dabei werden die Matrixmoleküle als Sphären betrachtet, welche jeweils einen radialen internen Freiheitsgrad besitzen („breathing mode“). Die Analytmoleküle werden ebenfalls als Sphären betrachtet, jedoch ohne einen internen Freiheitsgrad. Die Eigenschaften des Festkörpers werden durch ein Wechselwirkungspotential zwischen den Molekülen beschrieben. Der innere Freiheitsgrad eines Matrixmoleküls dient der Simulation der Absorption von Photonen und der vibronischen Relaxation des angeregten Moleküls. Die Stärke der Kopplung zwischen interner Energie eines Matrixmoleküls und interner oder translationaler Energie anderer Moleküle wird über die charakteristische Frequenz der breathing mode festgelegt [103 (325f.)].

Daraus ergibt sich ein Bild von Matrixmolekülen, die anfänglich durch Laserlicht elektronisch angeregt werden. Die dadurch gewonnene Energie relaxiert in Schwingungsmoden der Moleküle, welche wiederum an Gitterschwingungen der Matrixkristalle mit den eingebetteten Analyten übergehen. Je nach der Höhe der Fluence kommt es zu einer Sublimation des Festkörpers, zu einer Verdampfung des, vorher

geschmolzenen, oberflächennahen Bereichs oder zu einem explosionsartigen Ablösen des Matrix/Analyt-Materials³ [103 (330ff.)].

Primäre und sekundäre Ionisation bei UV-MALDI

Auf Seiten der Ionisation hat es sich etabliert, wiederum zwischen zwei Mechanismen zu unterscheiden: Einem primären Ionisationsprozess, welcher während oder direkt nach dem Laserpuls stattfindet und darauffolgende sekundäre Ion-Ion und Ion-Molekül Reaktionen in der sich ausbreitenden Teilchenwolke. Kurz gesagt, findet im primären Prozess die Erzeugung von, sowohl positiv als auch negativ, geladenen Matrixmolekülen statt. Diese Ionen reagieren daraufhin im sekundären Prozess sowohl miteinander, als auch mit den Analytmolekülen, was zu den Ionen führt, welche schließlich detektiert werden. Während der sekundäre Prozess sich durch die konventionelle Thermodynamik und die kinetische Gastheorie erklären lässt [97], tritt im primären Prozess ein Mechanismus auf, der „pooling“ genannt wird. Die Energie eines einzelnen Photons des Desorptionslasers von 3,6 eV bei 337 nm reicht nicht aus um die Matrixmoleküle mit einer Ionisierungsenergie von ca. 8 eV zu ionisieren. Bei den verwendeten Laserintensitäten sind Mehrphotonenprozesse eher ausgeschlossen. Das Pooling-Model besagt, dass die Energie, welche auf die Matrixmoleküle durch Absorption übertragen wurde, sich im Festkörper als Quasiteilchen (Exzitonen) ausbreiten kann. Treffen sich zwei Exzitonen, so kann sich deren gemeinsame Energie auf ein einzelnes Matrixmolekül konzentrieren, was in weiterer Folge zur Erzeugung eines Ion-Elektron Paares führt. Das Elektron kann von einem weiteren Matrixmolekül eingefangen werden, und so zu einem komplementären Paar von Matrixionen führen [97, 102].

3.3. Entscheidende Parameter bei MALDI

Es sollen hier zusammenfassend die Zusammenhänge zwischen den Parametern bezüglich der Bestrahlungsstärke des Lasers auf die Probe dargestellt werden, wie

³ Eine Animation des Desorptionsprozesses ist auf <http://galilei.chem.psu.edu/20a.html> (18.1.2012) zu finden.

sie in [101] bereits beschrieben sind. Es werden auch Ergebnisse neuerer Untersuchungen präsentiert.

Zwei für MALDI wesentliche Parameter sind bereits genannt worden: Die Wellenlänge des Lasers λ und dessen Pulsdauer τ . Die verwendete Matrix muss mit der Wellenlänge des Lasers abgestimmt sein, sodass die Matrix bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum besitzt. Die Pulsdauer soll hinreichend kurz sein, damit es nicht zu einer thermischen Anregung der Analytmoleküle kommt, noch bevor diese sich von der Probe gelöst haben und in Gasphase übergegangen sind. Dreisewerd et al. untersuchten die Unterschiede bei Verwendung zweier N_2 -Laser mit verschiedenen Pulslängen (0,5 ns und 3 ns) und kamen zum Ergebnis, dass es keine Unterschiede gibt [104]. Menzel et al. untersuchten dasselbe für IR-Laser (6ns-185ns Pulslänge) und stellten nur eine geringe Veränderung des Ionensignals fest [105].

Da in der vorliegenden Arbeit vorwiegend ein 337 nm N_2 -Laser mit einer Pulslänge von ca. 4 ns verwendet wird, beschränken wir uns im Weiteren auf UV-MALDI.

Ebenfalls wesentliche Parameter stellen die Laserenergie E , die bestrahlte Fläche oder Spotgröße A und das Strahlprofil des Lasers dar. Die Fläche A wird hier als die Fläche definiert, wo die Intensität des Strahles größer gleich dem $1/e^2$ Wert der maximalen Intensität beträgt.

3.3.1. Bestrahlte Fläche, Laserenergie und Fluence

Ein Parameter, den es zu optimieren gilt, ist die Energieflussdichte, oder Fluence H , d.h. die vom Sample aufgenommene Energie pro Fläche: $H = \frac{E}{A} \quad [Jm^{-2}]$. Die Fluence lässt sich demnach auf zwei Arten optimieren: Durch Variieren der Laserenergie, unter der Benutzung eines Abschwächers (Attenuator), oder durch Variieren der bestrahlten Fläche, indem der Abstand zwischen fokussierender Linse und Probenoberfläche variiert wird. Dabei gilt es, unter der Annahme eines Gaußprofils, zu beachten, dass wenn die Energie bei gleichbleibender Linsenstellung erhöht wird, sich neben der Fluence, automatisch auch die bestrahlte Fläche ändert.

Die Detektion von Analyt- und Matrixmolekülen hängt stark von der Fluence ab. Die untere Schwelle der Fluence, ab welcher Ionen detektiert werden, wird definiert durch einen Signal-zu-Rausch-Abstand von 2:1 in 50% der aufgenommenen Spektren. Sie wird in der Literatur mit „Threshold Fluence“ bezeichnet und liegt in der Grö-

ßenordnung von 100 J/m^2 . Es ließ sich allerdings beobachten, dass die Threshold Fluence stark von der bestrahlten Fläche abhängt. Insbesondere nimmt sie mit kleiner werdender Fläche zu. Üblicherweise haben die Flächen einen Durchmesser von $10\text{-}300 \text{ }\mu\text{m}$. In diesem Bereich kann die Threshold Fluence um eine Größenordnung variieren.

Die Threshold Fluences von Matrix- und Analytionen liegen ungefähr in der gleichen Größenordnung. In Experimenten mit Positionisation wurde gezeigt, dass die Threshold Fluence für Matrixionen ungefähr 3-4 mal höher ist, als für neutrale Matrixmoleküle, sowie dass die freigesetzten neutralen Moleküle die Ionen bei weitem überwiegen [106].

Mit steigender Laser Fluence nimmt das Ionensignal im Allgemeinen zu, erreicht ab dem 2- bis 3-fachen der Threshold Fluence ein Maximum, gelangt in eine Sättigung, und nimmt bei noch weiter steigender Fluence, aufgrund zunehmender Fragmentation oder abnehmender Transmission in der dichteren Teilchenwolke jedoch wieder ab [107 (2785f.)]. Dreisewerd et al. berichten von einer kubischen Abhängigkeit des Ionensignals von der bestrahlten Fläche – also $f(A) \propto A^3$ –, im Bereich der Threshold Fluence bis zu dem Punkt wo die Sättigung einsetzt und bei einem verwendeten Spotdurchmesser von $10\text{-}200 \text{ }\mu\text{m}$. Im Bereich der Sättigung lässt sich eine lineare Abhängigkeit beobachten [106]. Erwartet wäre dagegen im gesamten Bereich eine lineare Abhängigkeit. Die Beobachtung wird dennoch von Qiao et. al bestätigt, welche jedoch die Anmerkung hinzufügen, dass daraus nicht eine höhere Sensitivität für größere Spots folgt: Zwar steigt die Anzahl der detektierten Ionen mit steigender Fläche, doch sind die detektierten Ionen pro Fläche dennoch bei kleineren Spots höher [107].

Eine Studie, die sehr klar die Zusammenhänge der hier diskutierten Parameter enthält, wurde 2010 von Günther et al. veröffentlicht [108].

3.3.2. Laserstrahlprofil

Als ein weiterer, für die Optimierung entscheidender Faktor, stellt sich das Strahlprofil heraus. Aus der bisherigen Darstellung von MALDI lässt sich bereits ableiten, dass ein homogenes Strahlprofil von Vorteil sein kann. Unebenheiten im Profil, d.h. starke Schwankungen der Energie innerhalb der bestrahlten Fläche, verringern die Qualität

des MALDI-Prozesses. An Stellen erhöhter Energie tritt Fragmentation auf und an Stellen erniedrigter Energie findet keine Desorption statt.

Holle et al. verglichen den Einsatz eines N₂-Lasers und eines Nd:YAG-Lasers und setzten optische Modulatoren ein, um die Performance bezüglich der Sensitivität und des Probenverbrauches des YAG-Lasers zu verbessern [109].

Bereits früh wurde erkannt, dass ein homogenes Profil zu besseren Resultaten führt. Dreisewerd et al. setzten daher in den Strahlengang zwischen ihrem N₂-Laser und der Probenplatte eine Hochleistungs-Glasfaser ein. Diese macht, aufgrund vielfacher Reflexionen innerhalb der Faser, aus dem anfänglichen Strahlprofil ein homogeneres. Die Größe des Spots wurde anschließend durch einfache Schlitzblenden unterschiedlicher Breiten variiert [106]. Das Intensitätsprofil am Ende der Faser wurde 1:1 auf die Probenoberfläche abgebildet.

Qiao et al. untersuchten den Einfluss von Glasfasern unterschiedlicher Dicke und Länge in Kombination mit einem N₂- und einem Nd:YAG-Laser [107]. Sie stellten ebenfalls fest, dass eine längere Faser die Performance steigert. Die Autoren führten dieses Verhalten klar auf eine gleichmäßigere Bestrahlung der Probenfläche zurück – sie maßen die Homogenität der Strahlprofile für verschiedene Kombinationen von Laser, Fasern und Krümmungen der Faser mit einer CCD Kamera.

Im Idealfall führt diese Technik also zu einem Flat-Top Strahlprofil, das den Desorptionsprozess verbessern kann. Es ist auf eine genügend hohe Anfangsenergie des Laserpulses zu achten, weil es durch das gesamte optische System zu zusätzlichen Verlusten in der Laserenergie kommt.

3.4. Probenpräparation

Wie oben bereits dargelegt, schränkt der verwendete Laser, bzw. dessen Wellenlänge, den Bereich möglicher Matrizen ein. Welche Matrix sich für einen vorliegenden Analyten am besten eignet, hängt davon ab, welcher Molekülklasse der Analyt angehört. Für *Peptide*, *Proteine*, *Oligonukleotide*, *Polymere*, nicht-kovalent gebundene Komplexe oder *Kohlenhydrate*, wurden verschieden gute Matrizen gefunden. Neben der geeigneten Matrix stellt sich auch die Frage nach dem optimalen Verhältnis von Analyt- zu Matrixmolekülen (A/M-Ratio), welches für verschiedene Matrix-Analyt-Kombinationen ein anderes sein wird. Und neben den geeigneten Lösungsmitteln,

möglichen Zusätzen, dem pH-Wert und dem Material des Probenhalters, wird auch die Präparationstechnik ein Thema sein.

3.4.1. Die Wahl der Matrix und der Lösungsmittel

Eine ausführliche Darstellung vieler bisher erfolgreich eingesetzter Analyt-Matrix-Kombinationen gibt [110]. Die folgende Darstellung beschränkt sich auf UV-MALDI taugliche Matrizen mit einem Fokus auf Proteine.

Eine häufig eingesetzte Matrix ist 2,5-DHB, ein Benzoessäurederivat. DHB kann sowohl bei Peptiden, großen Proteinen, als auch bei synthetischen Polymeren eingesetzt werden. Diese Matrix hat den wesentlichen Vorteil, relativ unempfindlich gegenüber Verunreinigungen, wie z.B. Salzen oder Buffer, zu sein [111]. Eine weitere Eigenschaft dieser Matrix ist, dass sich bis zu 100 µm große Kristalle bei Verdampfung des Lösungsmittels bilden. Die Probe wird dadurch inhomogen, und es kommt zum Auftreten eines „Sweet-Spot“-Effekts. Das heißt, dass manche Stellen der Probe viele und manche Stellen kaum Ionen liefern.

DHB lässt sich leicht in Wasser, aber auch zu hohen Konzentrationen in organischen Lösungsmitteln, wie Ethanol oder Acetonitril, lösen. Nachteilig für die Kristallisation wirken sich Dimethylsulfoxide und Glycerin aus.

Zu dieser Matrixklasse gehört auch HABA, von welcher Juhasz et al. gute Performance bezüglich z.B. der Sensitivität großer Proteine oder der Homogenität der Probe berichten [112]. Die Autoren betonen, dass HABA nicht in einer höheren Konzentration als 1.5 g/l gelöst werden soll (40:40:20 Acetonitril/Wasser/Methanol), da die Resultate sonst schlechter ausfallen.

Ebenfalls für die Analyse von Peptiden und Proteinen sehr häufig eingesetzte Matrizen sind α -CHCA und besonders Sinapinsäure, beides Zimtsäurederivate [113]. Sie lassen sich in Ethanol und Acetonitril lösen und sollten vor Lichteinfall geschützt werden, sobald sie einmal in Lösung sind. Diese Matrizen sind ebenfalls eher unempfindlich gegenüber Salzen und Buffer der Analytlösung, doch schon eine kleine Verunreinigung mit Natriumlaurylsulfat unterdrückt das Analytsignal komplett [111].

Für die Desorption von Nukleotiden (DNA oder RNA) eignen sich als Matrizen besonders 3-HPA [114] und Picolinsäure [115]. Sie können in einer Mischung aus 50% Wasser und 50% Acetonitril gelöst werden. Diese gelten als besonders ‚sanfte‘ Matrizen. Allgemein wird bei den Matrizen eine Klassifizierung nach ‚kalten‘ und ‚heißen‘

vorgenommen, je nachdem ob diese zu einer hohen Fragmentation beitragen oder den Analyten als Ganzen zum Ionendetektor befördern. 3-HPA und DHB gelten dabei als kältere, wogegen α -CHCA zu den heißeren Matrizen zählt. In [116] wird über die, für eine erfolgreiche Desorption von DNA, spezifische Probenpräparation berichtet.

Mittels 3-HPA haben Cai et al. 27 nm große grün fluoreszierende Polystyrol Partikel mit einer Masse von mehr als 10^6 amu erfolgreich ins Vakuum gebracht und in einer Quadrupolionenfalle gefangen [117].

Über die für die Analyse von Polymeren eingesetzten Matrizen gibt Nielsen [118] eine erste Auskunft. Hervorgehoben unter dieser Substanzklasse sei die Arbeit von Schriemer und Li, denen es gelang, Polymerstandards mit einer mittleren Masse von 1,5 MDa zu detektieren – wenn auch nur mehrfach geladene, was die Autoren auf die niedrige Detektoreffizienz im hohen m/z -Bereich zurückführen.

In Tabelle 3.2 sind die im Laufe dieser Arbeit verwendeten Matrizen dargestellt.

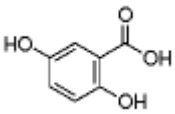
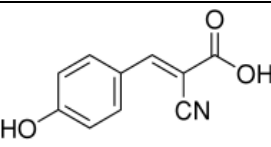
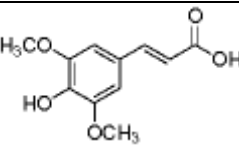
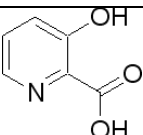
Matrix	Strukturformel	Masse
DHB 2,5-Dihydroxy- Benzolsäure		154 amu
α -CHCA α -cyano-4-hydroxy- Zimtsäure		189 amu
Sinapinsäure 3,5-Dimethoxy-4- hydroxycimtsäure		224 amu
3-HPA 3-Hydroxy-Picolinsäure		139 amu

Tabelle 3.2: In der vorliegenden Arbeit verwendete Matrizen

3.4.2. Matrixzusätze

Salze oder andere Verunreinigungen und in der Analytlösung vorhandene Buffer können den MALDI-Prozess beeinträchtigen oder gar unterdrücken. Zum Ausgleich dieser negativen Faktoren oder zur Steigerung der Performance werden der Matrix/Analytlösung Zusätze beigemischt [119]. Es sind Protonenspender, Kationisierer,

Salze und Phosphorsäure erhältlich. Nitrocellulose wird verwendet um Peptide von Salzen frei zu machen [101 (421), 120, 121, 122 (9), 123]. Im Allgemeinen sind solche Zusätze nicht notwendig.

3.4.3. Präparationstechniken

Wie Hillenkamp und Karas einmal schrieben, kann das Gebiet der Präparation von MALDI-Proben leicht als eine ‚schwarze Kunst‘ erscheinen [96 (20)]. Im Allgemeinen werden die zunächst als Pulver vorliegenden Matrix- und Analytmoleküle in den jeweils geeigneten Lösungsmitteln getrennt voneinander gelöst. Anschließend werden diese beiden Lösungen miteinander gemischt, wobei dieser Schritt bei den verschiedenen, unten näher ausgeführten, Methoden meistens den Unterschied ausmacht. In der fertigen Probe soll die Anzahl der Matrixmoleküle klar die der Analytmoleküle übersteigen – die Analyte sollen in die Matrix eingebettet sein. Die optimalen molaren Analyt-zu-Matrix Verhältnisse können von 1:1.000 bis 1:100.000 reichen. Es ist auf die Verträglichkeit der verschiedenen Lösungsmittel untereinander zu achten und wenn möglich soll dasselbe Lösungsmittel für Analyt und Matrix verwendet werden.

Bei der Verwendung von Wasser ist es ratsam, aber nicht notwendig⁴, dieses im Vorhinein zu deionisieren bis es einen elektrischen Widerstand von 18 M Ω ·cm besitzt [124] und es gleich zu verwenden, weil, ausgesetzt an Luft, der Widerstand innerhalb einer Stunde wieder auf 4 M Ω ·cm sinkt⁵. Die Matrix/Analyt Mischung verfestigt sich durch Verdampfen der Lösungsmittel auf einem Probenträger. Dieser kann aus verschiedenen Materialien sein, z.B. Edelstahl oder Teflon, und muss vor Gebrauch von diversen Verunreinigungen befreit werden.

„Dried Droplet“-Method

Es handelt sich hierbei um eine bei der Standardanalyse von Proteinen und Peptiden sehr zuverlässige Präparationsmethode⁶. Sie wurde schon in den Anfängen von MALDI von Karas und Hillenkamp eingesetzt [93]. Dabei werden Analyt- und Matrixlösung in einem Probenbehälter vermischt, anschließend davon 0,5-2 μ l auf den Probenhalter getropft und an der Luft getrocknet. Alternativ kann die Trocknung auch mit

⁴ Beim Großteil der in Abschnitt 5.1 durchgeführten Experimente wurde nicht auf die Qualität des verwendeten Wassers geachtet und einmal deionisiertes Wasser über mehrere Wochen verwendet. D.h. MALDI funktioniert auch ohne die Benutzung von reinem Wasser.

⁵ http://www.millipore.com/lab_water/clw4/tutorial (18.1.2012)

Hilfe eines leichten Luft- oder Stickstoffstroms oder auch unter einem Vakuum erfolgen (sogenannte Rapid Crystallization Methode [125]).

Es ist möglich die Oberfläche der erhaltenen trockenen Probe im Nachhinein zu waschen, wodurch nichtflüchtige Bestandteilen der ursprünglichen Lösung entfernt werden [121]. Dies muss sich allerdings nicht immer als notwendig und vorteilhaft herausstellen [126]. Dazu würden 5-10 µl kaltes 0.1%TFA, d.h. (deionisiertes!) Wasser mit 0.1%TFA, auf die fertige Probe geträufelt und nach ein paar Sekunden mit der Pipette wiederum abgesogen, oder mittels eines starken Luftstroms heruntergeblasen werden. Dieser Vorgang kann mehrmals wiederholt werden. Es ist darauf zu achten, dass dadurch die Probe selbst nicht entfernt wird.

Die Dried Droplet Methode erzeugt vor allem mit DHB eine inhomogene Verteilung der Kristalle und führt daher zu einer geringen Schuss-zu-Schuss Reproduzierbarkeit. Bei DHB bilden sich die Kristalle vor allem am Rand des aufpipettierten Tropfens. Dies ist allerdings in einer anderen Hinsicht von Vorteil: Die Kristallisation führt dazu, dass die Salze in die Mitte gedrängt werden, was einem „Selbstwaschen“ der Probe entspricht.

„Two-Layer“-Methode

Eine Variation der Dried Droplet Methode besteht darin, die Probe in zwei Schritten zu präparieren [127]. Dabei wird zunächst eine beinahe gesättigte Matrixlösung auf den Probenträger aufgetragen (Tropfen in der Größenordnung von µl). Das dabei verwendete Lösungsmittel muss stark flüchtig sein, z.B. Aceton oder Methanol, damit es zu einer schnellen und homogenen Kristallisation der Matrix kommt. Es entsteht innerhalb von 1-2 s eine dünne und dichte Schicht kleiner Matrixkristalle. Auf diese Schicht wird anschließend, wie bei der Dried-Droplet Methode eine Analyt/Matrix-Lösung aufgetragen und getrocknet. Die Analytkonzentration kann 10^{-4} - 10^{-11} mol/l betragen. Dabei ist vorausgesetzt, dass die Analytlösung die Matrixschicht nicht komplett löst.

In [127] werden Sinapinsäure und α -CHCA als Matrizen benutzt. Im Vergleich zur Dried Droplet Methode wurde eine höhere Reproduzierbarkeit von Schuss zu Schuss festgestellt. In [126] wird die Überlegenheit der Two-Layer Methode mit Sinapinsäure

⁶ [http://msr.dom.wustl.edu/Research/MALDI TOF Mass Spec and Proteomics/index.htm](http://msr.dom.wustl.edu/Research/MALDI_TOF_Mass_Spec_and_Proteomics/index.htm)
(18.1.2012)

gegenüber anderen Methoden und Matrizen bei niedrigen Analytkonzentrationen gezeigt.

„Spincoaten“

Perera et al. fertigten eine Lösung wie beim Dried-Droplet Verfahren an, benutzten allerdings einen Spincoater mit einer Drehfrequenz von 300-500 rpm um 2 µl der Lösung auf einer 1 Zoll großen Edelstahlplatte zu verteilen und trocken zu lassen [124]. SEM Bilder zeigten, dass die Kristalle gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche der Probenplatte verteilt sind – in der Mitte, wie auch am Rand. Es wurde auch beobachtet, dass sich durch das Spincoaten kleinere Kristalle bilden. Als Matrix wurden Sinapin- und Ferulasäure verwendet, mit welchen jeweils ähnlich gute und, im Vergleich zur Dried Droplet Methode, bessere Resultate für die Desorption von Proteinen erzielt werden konnten. Es wurde ein höherer Ionenertrag, eine bessere Auflösung und besonders eine bessere Schuss-zu-Schuss Reproduzierbarkeit festgestellt. Das Ionsignal schwankte bis zu 18% beim Spincoaten und bis zu 40% bei den Dried-Droplet Proben. Das Signal war für 1-5 Laserpulse stabil – danach musste der Spot gewechselt werden. Im Vergleich zur Anwendung der Dried-Droplet Methode wird die Probe daher schneller verbraucht.

3.5. Dynamik und Eigenschaften der Teilchenwolke

Die Dynamik der sich nach dem MALDI Prozess ausbreitenden Teilchenwolke ist entscheidend für deren folgende Anwendungen, z.B. das Füllen einer Ionenfalle. Zur Charakterisierung der Wolke gehören vor allem deren Zusammensetzung aus Matrixmolekülen, Analytmolekülen und deren Fragmenten und Clustern, sowie Elektronen und Protonen, als auch die räumliche Geschwindigkeitsverteilungen der einzelnen Komponenten. Eine Unterscheidung zwischen Analyt- und Matrixteilchen auf der einen, sowie geladenen und neutralen Teilchen auf der anderen Seite stellt sich als sinnvoll heraus. Die Teilchenwolke, auch Plume genannt, wird hier ausschließlich in dem Stadium beschrieben, wo bereits alle intermolekularen Wechselwirkungen abgeschlossen sind, d.h. wo sich die Wolke frei im Vakuum ausbreitet.

3.5.1. Mittlere axiale Geschwindigkeiten

In der Literatur werden in Abhängigkeit der eingesetzten Messmethoden, der verwendeten Matrizen, Bestrahlungs- und Präparationsparameter unterschiedliche, manchmal stark divergierende⁷, Resultate dargestellt. Dennoch lassen sich qualitativ einige Charakteristika der Wolke angeben und die Geschwindigkeiten abschätzen.

Einheitlich wurde festgestellt, dass die Geschwindigkeit der Analytmoleküle von der verwendeten Matrix abhängt. Eine Studie vergleicht für 12 verschiedene Matrizen jeweils die mittlere axiale Geschwindigkeit von positiv geladenem Insulin, mit dem Ergebnis einer insgesamt weiten Verteilung von 270-540 m/s [123]. Zum Beispiel führen auch verschiedene Isomere von DHB zu unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Diese Ergebnisse stimmen mit denen in [129] überein, wo außerdem die Geschwindigkeiten für 6 verschiedene Matrizen zu 350-660 m/s angegeben werden – d.h. die Matrix ist etwas schneller als der Analyt. Weiters wird in beiden Arbeiten und in [130] festgestellt, dass bei gleicher Matrix, besonders bei Sinapinsäure, die Geschwindigkeiten von Analyten unterschiedlicher Massen (zumindest für Proteine) ungefähr gleich bleibt. Werden als Analyte allerdings Moleküle einer anderen Klasse, z.B. Carbohydrate, verwendet, so führt dies sehr wohl zu anderen Geschwindigkeiten [123]. Bei [129] gibt es keinen Unterschied für desorbierte Proteine oder DNA.

In [123] wird berichtet, dass sich positive wie negative Analyte gleich verhalten – in [129] dagegen, dass negative etwas langsamer sind. Wiederum einheitlich wird angegeben, dass kaum ein Unterschied besteht, ob bei gleicher Matrix ein 266 nm oder ein 337 nm Laser verwendet wird.

Die angewandte Präparationsmethode hat ebenfalls einen Einfluss auf die resultierenden Geschwindigkeiten [123]. Besonders die Wahl des Lösungsmittels hat einen starken Effekt: Bei drei verschiedenen Lösungsmitteln für die Matrix 3-HPA variiert die mittlere axiale Geschwindigkeit von Insulin zwischen 444 und 620 m/s. Zwischen Präparationsmethoden, z.B. Dried Droplet und Fast Evaporation, sind auch Unterschiede erkennbar. Zusätze zur Matrixlösung können bis zu ± 100 m/s ausmachen.

Zuletzt stellen Juhasz et al. und Glückmann et al. noch fest, dass die Geschwindigkeiten innerhalb ein und derselben Probe von Spot zu Spot variieren – dies ist bei 3-HPA stärker ausgeprägt, als bei α -CHCA oder HABA und wird auf Heterogenitäten

⁷ z.B. wird in [128] von mittleren Geschwindigkeiten bis zu 7400m/s berichtet.

der Probenoberfläche zurückgeführt – die räumliche Ausrichtung der Matrixkristalle hat einen Einfluss [131, 132].

Dass Analyte hoher wie niedriger Masse sich mit gleicher Geschwindigkeit ausbreiten, heißt, dass schwerere Analyte höhere kinetische Energien besitzen. Dies hat als Konsequenzen, dass bei der Analyse von Teilchen höherer Masse in einem Time-of-Flight Massenspektrometer sich die Auflösung verschlechtert und bei Ionenfallen die elektrischen Potentiale an die kinetische Energien der Teilchen angepasst sein müssen, mit denen Teilchen einer bestimmten Masse abgebremst oder gefangen werden sollen.

Die in Abschnitt 5.1.6 aufgenommene Geschwindigkeitsverteilung fügt sich mit einer wahrscheinlichsten Geschwindigkeit bei 510 m/s den oberen Werten, und mit ihrer Form denjenigen in [130] gezeigten.

Bisher wurde nur die axiale Richtung der Wolke betrachtet. Als nächstes wird der radiale Anteil behandelt.

3.5.2. Räumliches Verhalten

Ein Großteil der Wolke besteht aus neutralen Molekülen. Um deren Dynamik festzustellen, wird Photo-Postionisation (PI), Laser induzierte Fluoreszenz (LIF), Absorptionsspektroskopie verwendet. Aufgrund der begrenzten Anwendbarkeit von Postionisation, bleibt diese auf Matrix- und kleine Analytmoleküle (Gramicidin) beschränkt [133]. Absorptionsspektroskopie wurde bisher nur eingesetzt um die Matrixwolke zu analysieren, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass es schwierig ist Matrix- von Analytmolekülen voneinander zu unterscheiden, vor allem wegen des niedrigen A/M-Verhältnisses [134, 135]. Eine LIF-Studie von Puretzky et al., die die Ausbreitung der Teilchenwolke veranschaulicht, soll hier genauer dargestellt werden [136]:

In dieser Studie wird 3-HPA als Matrix verwendet, um ein, mit einem Farbstoff markiertes, 29 kDa schweres Protein zu desorbieren. Nach dem Desorptionsprozess werden die Moleküle innerhalb einer Ebene der Wolke, die normal auf die Probenoberfläche steht, Fluoreszenz angeregt. Dabei werden zwei verschiedene Laser verwendet, einer für die Matrix und einer für die Analytmoleküle, die auch zu einer unterschiedlichen Wellenlänge in der Lumineszenz führen. Auf diese Weise können die zeitliche Entwicklung und räumliche Ausbreitung des Plumes mit einer ICCD Kamera

aufgenommen werden. Der Anschaulichkeit halber wird das Ergebnis hier abgedruckt (Abbildung 3.2).

Jedes dieser Bilder ist das Ergebnis eines Laserschusses. Es ist zu erkennen, dass sich Matrix- und Analytteilchen unterschiedlich ausbreiten. Die Proteine weisen eine wesentlich stärker vorwärts gerichtete Dynamik auf. Aus diesem Artikel lässt sich auch der Öffnungswinkel der sich ausbreitenden Analyt-Teilchenwolke zu 16° abschätzen.

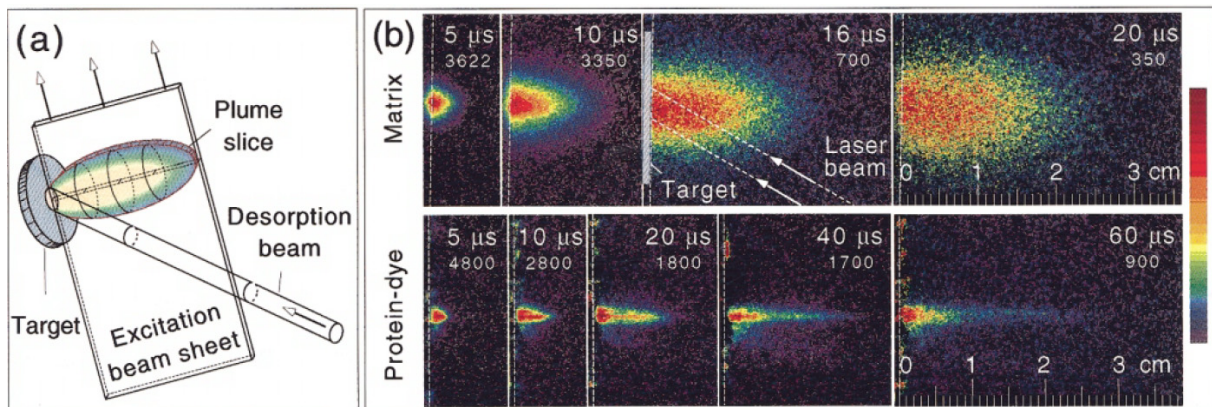


Abbildung 3.2: Ergebnisse einer LIF-Studie zur MALDI Teilchenwolke. (reproduziert aus [136])

Ayala et al. haben die radiale Geschwindigkeitsverteilung von mittels MALDI desorbierten Peptiden analysiert [132]. Sie stellten fest, dass sich die Wolke nicht normal zur Probenoberfläche ausbreitet, sondern sich zum einfallenden Desorptionslaserstrahl hinneigt, falls der Laser selber nicht normal auf die Oberfläche trifft. Dies ist in den meisten MALDI-Aufbauten der Fall und muss daher bei der Optimierung berücksichtigt werden.

Es kann allgemein gesagt werden, dass es sich bei der Geschwindigkeitsverteilung nicht um eine thermische Verteilung handelt. Dies lässt sich schon aus der vorher getroffene Feststellung schließen, dass Moleküle unterschiedlicher Massen sich mit annähernd der gleichen Geschwindigkeit bewegen. Gemeinsam mit den Beobachtungen, dass die Teilchenwolke stark nach vorne gerichtet ist, wurde daher vorgeschlagen, den, durch den Laserpuls generierten Teilchenstrahl, als einen Überschallstrahl zu betrachten, welcher aus Matrixmolekülen gebildet wird und die Analyte mitreißt [137]. Dies erklärt auch, weshalb sich Matrix- und Analytmoleküle mit annähernd gleicher Geschwindigkeit ausbreiten.

3.5.3. Anzahl der desorbierten Moleküle und Ladungszustände

Die Anzahl der desorbierten Teilchen ist von allen bisher erwähnten Parametern abhängig – sowohl von den die Präparation, als auch von denen die Bestrahlung betreffenden Parametern. Es ist ebenfalls schwierig, das Verhältnis von neutralen zu geladenen Teilchen anzugeben. Die Probleme liegen auf der theoretischen Seite in der Unkenntnis und Komplexität der exakten physikalischen Prozesse und auf der experimentellen Seite in der Unkenntnis der Transmission der Teilchen von der Probe zum Detektor, sowie auf der Unkenntnis der Effizienz des Detektors. Es lassen sich dennoch einige Abschätzungen machen.

Ausgehend von der in Abschnitt 3.2.1 festgestellten Eindringtiefe der Laserstrahlung in die Probe, kann das maximal desorbierte Volumen berechnet werden. Bei einem Spotdurchmesser von 200 μm , DHB als Matrix⁸ und einer Eindringtiefe von 100 nm, werden ungefähr 2×10^{13} Teilchen pro Laserpuls desorbiert. Bei einem Matrix-zu-Analyt-Verhältnis von 1000 sind davon 2×10^{10} Teilchen Analytmoleküle. In Experimenten wurde das Verhältnis von neutralen zu einfach geladenen Molekülen mit 10^5 abgeschätzt [98], woraus sich schließlich eine Anzahl von 2×10^5 Analytionen pro Schuss ergeben.

In einer Studie von Alexander et al. wurde ein Spiegelladungsdetektor verwendet, welcher kalibriert wurde, um aus dessen Ausgangssignal, auf die Anzahl der Ionen zurückzuschließen, die ihn passierten [138]. Es wurde Insulin als Analyt und Sinapinsäure als Matrix verwendet. Unter der Annahme, dass alle Ionen auch durch den Detektor geflogen sind, wurden pro Schuss mindestens 10^5 einfach-positiv geladene Insulin Moleküle erzeugt. Die obige Abschätzung, angewandt auf diese Studie, führt zu 4×10^6 Analytionen und kann daher eine grobe, wenn auch nicht zuverlässige, Aussage treffen, wie viele Ionen in MALDI erzeugt werden.

In MALDI werden sowohl positive als auch negative Ionen erzeugt. Das Verhältnis von beiden zueinander variiert leicht bei Anwendung verschiedener Matrizen. Im Allgemeinen wurde aber festgestellt, dass ungefähr gleich viele positiv wie negativ geladene Analytmoleküle entstehen [139].

⁸ 2,5-DHB weist eine Dichte von $1,6 \cdot 10^3 \text{ kg/m}^3$ auf. Sinapinsäure, für welche die Rechnung analog verläuft, besitzt eine Dichte von $1,3 \cdot 10^3 \text{ kg/m}^3$. (Quelle: <http://www.chemspider.com/> (18.1.2012))

Zweiter Teil: Experiment

4. Equipment

Im Laufe dieser Diplomarbeit wurden Experimente zu MALDI und Photoionisation durchgeführt, deren konkreten Aufbauten und Ergebnisse in Abschnitt 5 präsentiert werden. Bei den Versuchen zu MALDI werden biologische Moleküle desorbiert und die dabei entstehenden Ionen in einem Flugzeitmassenspektrometer analysiert. Bei den Versuchen zur Photoionisation werden funktionalisierte Porphyrine laserdesorbiert, anschließend photoionisiert und wiederum in einem Flugzeitmassenspektrometer analysiert. Im vorliegenden Abschnitt werden die wesentlichen Komponenten und deren Funktionsweisen dargestellt, die in den Experimenten zum Einsatz kommen.

4.1. Flugzeitmassenspektrometer

4.1.1. Funktionsweise

Zur Analyse der beim Desorptionsprozess freigesetzten Teilchen wird ein Flugzeitmassenspektrometer (kurz: Time of Flight - TOF) verwendet. Es beruht auf dem Prinzip, dass geladene Teilchen mittels eines statischen elektrischen Feldes beschleunigt werden. Ein geladenes Teilchen bekommt dadurch eine Geschwindigkeit, die von der Größe des elektrischen Feldes und dessen Masse abhängig ist. Im konstanten Feld erhalten Teilchen unterschiedlicher Massen unterschiedliche Geschwindigkeiten. Starten diese zunächst im identischen räumlichen Punkt, passieren anschließend die Beschleunigungsstufe, wodurch diese unterschiedliche Geschwindigkeiten erhalten und bewegen sich anschließend auf einer gewissen Strecke frei, so trennen sich die Teilchen unterschiedlicher Massen räumlich voneinander und haben nach jener Strecke unterschiedliche Ankunftszeiten am Detektor. Ist der Startzeitpunkt bekannt und wird die Ankunftszeit der Teilchen gemessen, so lassen sich aus den verschiedenen Flugzeiten t , der Beschleunigungsspannung U und der Flugstrecke D die Massen m der Teilchen bestimmen:

$$m = 2eU \cdot \left(\frac{t}{D} \right)^2$$

Formel 3

Bei e handelt es sich um die Einheitsladung. Die Masse eines Teilchens ist so proportional zum Quadrat seiner Flugzeit. Bisher wurde angenommen, dass Teilchen immer nur einfach geladen sind. Teilchen können allerdings auch mehrfach geladen sein. Die Flugzeit ist daher durch das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) bestimmt.

4.1.2. Verwendetes Flugzeitmassenspektrometer und Einstellungen

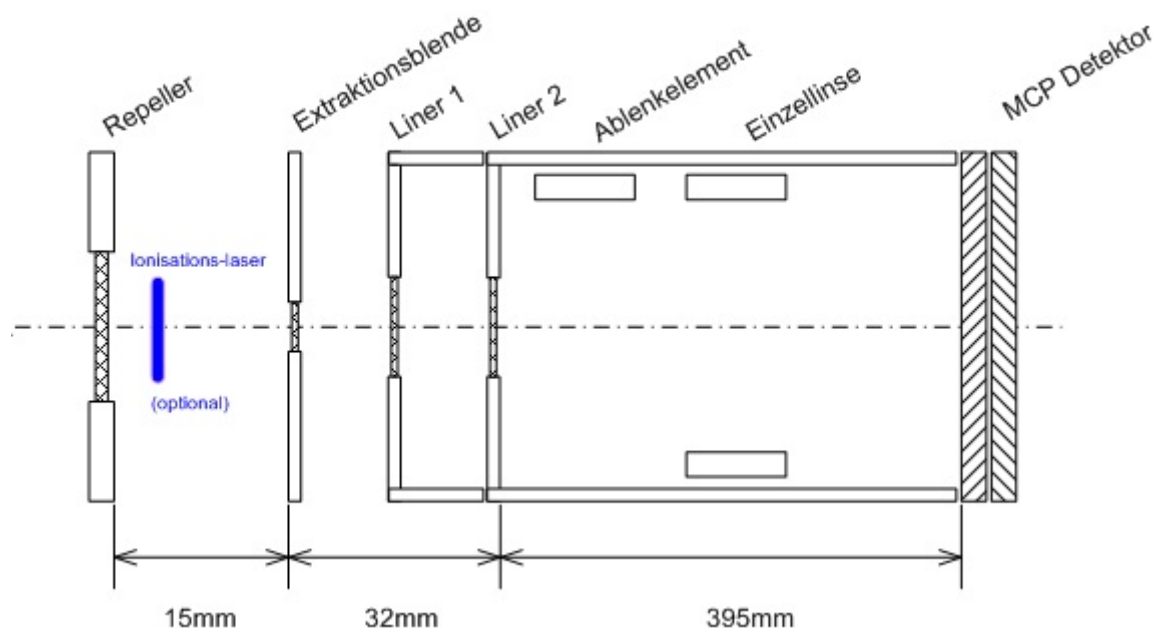


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des verwendeten Flugzeitmassenspektrometers

Bei dem von uns verwendeten Flugzeitspektrometer⁹ sind zwei Beschleunigungsstufen enthalten. Die Abbildung 4.1 lässt eine Extraktionszone zwischen Repeller und Extraktionsblende erkennen. Die zweistufige Beschleunigung geschieht zwischen Extraktionsblende und Liner 2. Zwischen Liner 2 und Detektor befindet sich die freie Driftstrecke. Ein Ablenkelement dient der Kompensation einer einheitlichen Quergeschwindigkeit aller Teilchen. Eine Einzellinse dient der Kollimierung des möglicherweise divergenten Teilchenstrahls auf den Detektor. Der Ionisationslaser (siehe Abschnitt 4.3.2) ist optional und wird nur bei Experimenten mit neutralen Molekülen (siehe Abschnitt 5.1.7) in die Vakuumkammer geführt.

Das TOF arbeitet gepulst, sodass sich immer nur ein Paket von Molekülen darin befindet. Während alle anderen Spannungen konstant bleiben wird der Repeller innerhalb von 10 ns auf ein positives Potential gelegt und befördert so die sich in der Extraktionszone befindenden positiven Ionen in die eigentliche Beschleunigungszone.

⁹ Stefan Kaesdorf Geräte für Forschung und Industrie

Der Detektor besteht aus zwei hintereinander geschalteten Mikrokanalplatten (engl. micro-channel plate MCP), welche als Sekundärelektronenvervielfacher dienen. Darauf auftreffende geladene Moleküle bewirken das Entstehen einer Elektronenlawine, welche auf einer Anode ein messbares Signal erzeugen. Bevor dieses auf einem Oszilloskop¹⁰ aufgenommen wird, wird es durch einen Vorverstärker⁹ (25-fache Verstärkung) geschickt, welcher sich bereits außerhalb der Vakuumkammer befindet. Bei den in Abschnitt 5 folgenden Messungen wird jeweils über mehrere (16 bis 128) Spektren gemittelt, um Hintergrundrauschen auszugleichen und die Spektren klarer zu machen.

Die Spannungen der einzelnen Elemente des Flugzeitspektrometers wurden auf eine Maximierung des Signal-Rausch-Verhältnisses optimiert. Die untenstehende Tabelle 4.1 enthält die Spannungen, die bei unserem Aufbau im Generellen über einen weiten Massenbereich von (600 – 150.000 amu) zu guten Ergebnissen geführt hat.

Repeller	1,68kV
Liner 1	-8,00kV
Liner 2	-16,2kV
Linse	-9,00kV
MCP	1,80 - 2,4kV
Ablenkelement	0,00kV

Tabelle 4.1: Typische Einstellungen der Spannungen des TOF-Massenspektrometers

Die Spannung des MCPs muss bei besonders intensiven Molekülstrahlen und insbesondere bei Molekülen niedrigerer Masse erniedrigt werden, weil ansonsten das Signal die Sättigungsschwelle erreicht.

Für große Massen und schwache Molekülstrahlen kann die Spannung des MCP dagegen auf bis zu 2,4 kV erhöht werden. Dabei wird allerdings auch das Rauschen verstärkt. Die Detektionseffizienz eines MCPs nimmt im Allgemeinen mit abnehmender Geschwindigkeit der Moleküle ebenfalls stark ab [96 (50), 140]. Bei gleichbleibender Beschleunigungsspannung lassen sich so Teilchen höherer Massen (>100.000 amu) nur mehr schwer nachweisen. Alternative Ladungsdetektoren wie supraleitenden Kryodetektoren [141], Induktions- [142] und Spiegelladungsdetektoren [138] könnten die Masseneinschränkung überwinden.

¹⁰ LeCroy Waverunner LT374M oder Tektronix TDS1000C-EDU

4.1.3. Massenauflösung

Die Auflösung der Massen ist definiert als das Verhältnis von der Größe der Masse eines Peaks zu der Halbwertsbreite des Peaks. Sie ist mit den Flugzeiten wie folgt verknüpft:

$$\frac{m}{\Delta m} \approx \frac{m}{dm} = \frac{c \cdot t^2}{d(c \cdot t^2)} = \frac{t}{2dt} = \frac{v}{2dv} \quad \text{Formel 4}$$

Desorbierte Moleküle haben unterschiedliche Anfangsgeschwindigkeiten, welche sich nach der Beschleunigung im Spektrometer auf deren Endgeschwindigkeiten und daher auf deren Flugzeit auswirken. Bei höheren Massen kommt dieser Effekt stärker zum Ausdruck als bei kleineren, weil die Startgeschwindigkeiten bei Molekülen unterschiedlicher Massen sich in derselben Größenordnung befinden, die Geschwindigkeiten allerdings, welche diese durch die Beschleunigung zusätzlich erhalten, mit $1/\sqrt{m}$ skalieren. Während bei einer angenommenen Beschleunigungsspannung von 20 kV und einer Anfangsgeschwindigkeit von jeweils 500 m/s, die Anfangsgeschwindigkeit bei einem Molekül mit 1.000 amu knapp 0,8% ausmacht, so macht jene bei einem Molekül mit 100.000 amu bereits 7,5% aus. Beträgt nun die Halbwertsbreite der Anfangsgeschwindigkeit 300 m/s, so bewirkt allein diese ein $m/\Delta m$ von 100 bei Molekülen mit 1.000 amu und ein $m/\Delta m$ von 10 bei Molekülen mit 100.000 amu. Die Massenauflösung verschlechtert sich bereits dadurch um fast eine Größenordnung zwischen diesen zwei Massenbereichen.

Bei den Experimenten mit MALDI kommt ein weiterer Faktor hinzu, der einen Einfluss auf die Massenauflösung hat. Während bei den Experimenten mit Nachionisation der räumliche Startpunkt durch das Volumen des Ionisationslasers innerhalb der Extraktionszone des TOFs wohldefiniert ist, befinden sich die bei MALDI generierten Ionen auf der ganzen Länge in der Extraktionszone verstreut. Beim Schalten des Repellers treten die Ionen zu unterschiedlichen Zeiten in die Beschleunigungszone ein und die räumliche Ausgedehntheit der Ionenwolke wirkt sich weiter auf unterschiedliche Ankunftszeiten beim Detektor aus.

Ein weiterer Faktor, der zu einer schlechteren Auflösung von Massenspektren führt, ist die Tatsache, dass während des Desorptionsprozesses Fragmentation des intakten Moleküls, sowie metastabile Fragmentation während des Fluges, als auch die Bildung von Addukten stattfindet [143]. Dabei entstehen Moleküle mit nahe beieinan-

der liegenden Massen. Zusammen mit der oben dargestellten Verschmierung eines Peaks durch unterschiedliche Ankunftszeiten von Molekülen derselben Masse, kommt es so zu einer Überlagerung mehrerer Peaks, welche im fertigen Massenspektrum nicht mehr auseinander gehalten werden können und als ein gemeinsamer großer Peak erscheinen.

4.1.4. Kalibration

Mit Hilfe des Oszilloskops werden die Ankunftszeiten der Ionen gemessen. Bei der Messung bereits vorhandener Ionen wird als Startzeitpunkt das Schalten des Repellers festgelegt. Bei der Messung von anfänglich neutralen Molekülen stellt der Lichtpuls des Ionisationslasers den Startzeitpunkt dar. Um aus den Ankunftszeiten auf Masse/Ladungs-Verhältnisse zu schließen, muss das Spektrum kalibriert werden. Unabhängig von der genauen Geometrie des TOFs sind die Wurzeln der Massen linear abhängig von den entsprechenden Flugzeiten. Weiß man die Flugzeiten t zumindest zweier Moleküle mit bekannten Massen m , so können die Konstanten folgender linearen Gleichung bestimmt werden:

$$\sqrt{m} = a \cdot t + b \quad \text{Formel 5}$$

Für verschiedene Einstellungen der Spannungen des TOFs gilt eine eigene Kalibration.

4.2. Vakuumsystem

Alle Experimente werden im Ultrahochvakuum mit einem Druck im Bereich zwischen 10^{-7} mbar und 10^{-8} mbar durchgeführt. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit von Stößen, zwischen den Molekülen Restgaspartikel reduziert, die Funktionstüchtigkeit des MCPs gewährleistet und Überschlüge aufgrund der Hochspannungen verhindert. Erzeugt wird das Vakuum durch Turbomolekularpumpen¹¹ (TMP) und einer davor geschalteten Drehschieberpumpe¹². Die Apparatur besteht aus dem TOF, einer Kammer¹³, in welcher die Desorption stattfindet, und einer Schleuse¹⁴ mit welcher die Probe in das Vakuum übergeführt wird. Elektrische Durchführungen sorgen für das

¹¹ Pfeiffer Vacuum, TMU 261 210 l/s und TMU52I 520 l/s

¹² Leybold, Trivac D 25 B

¹³ Vakuum Praha

¹⁴ VAT, Reihe 010

Anlegen von Spannungen innerhalb des Vakuums und das Messen des MCP-Signals. Mechanische Durchführungen sichern die Positionierung der Probe und eines elektrischen Kontakts. Ein Feinventil ermöglicht das gezielte Einlassen kleiner Mengen an Gas. Durch Fenster dringt das Laserlicht in die Kammer ein und Justagen können beobachtet werden. Die einzelnen Elemente der Kammer sind größtenteils mittels CF-Flanschen miteinander verbunden. An Druckmessgeräten, und Vorvakuumventilen werden auch KF-Flansche verwendet. Die Probenschleuse kann mit einem Absperrschieber vom Rest der Kammer abgetrennt werden. Wird eine neue Probe in die Kammer eingeführt, so wird in der Schleuse zunächst mittels der Drehschieberpumpe ein Vordruck erzeugt, wozu die TMPs kurzzeitig von der Vorpumpe getrennt werden, um einen Gasrückfluss in die Vakuumkammer zu vermeiden.

4.3. Laser

Zur Desorption geladener und neutraler Moleküle, sowie zur Nachionisation von neutralen Molekülen werden unterschiedliche Laser verwendet, deren Funktionsweise, Handhabung und Eigenschaften im Folgenden dargestellt werden.

4.3.1. Desorptionslaser

Zur Desorption wird ein Stickstofflaser verwendet. Es handelt sich dabei um einen Gaslaser bei dem durch eine elektrische Hochspannungsentladung das N_2 -Molekül vom Grundzustand in einen kurzlebigen (40 ns) elektronischen Zustand angeregt wird. Dieser geht unter der Aussendung eines Photons mit einer Wellenlänge von 337,1 nm in einen niedrigeren Zustand über.

Der von uns verwendete Laser¹⁵ liefert eine maximale Pulsenergie von 300 μ J bei einer Repetitionsrate von 20 Hz. Die Pulslänge beträgt 4 ns, der Strahl misst 8x8 mm und die Strahldivergenz 0,5 mrad. Um eine Fluence von ungefähr 100 J/m² auf der Probenoberfläche zu erhalten (vgl. Abschnitt 3.3.1), wird eine Linse zur Fokussierung benötigt. Damit die Spotgröße bei den Desorptionsexperimenten über einen weiten Bereich kontinuierlich variiert werden kann, wird eine verfahrbare plankonvexe Linse mit einer Brennweite von 1040 mm bei 337 nm verwendet.

¹⁵ Thermolaser Science VSL-337ND-S

Es ist notwendig, dass der Laserstrahl möglichst parallel zum Verfahrweg der Linse durch diese trifft. Dazu wird der in Abbildung 4.2 gezeigte Aufbau verwendet. Anschließend tritt der Strahl nach zwei weiteren Spiegeln durch ein Fenster in die Vakuumkammer ein und trifft die Probe an der Stelle, die mit der Achse des TOFs kreuzt. Die gesamte Optik bewirkt einen Verlust von 60% der ursprünglichen Laserenergie – die Probe erreichen noch $120 \pm 3 \mu\text{J}$.

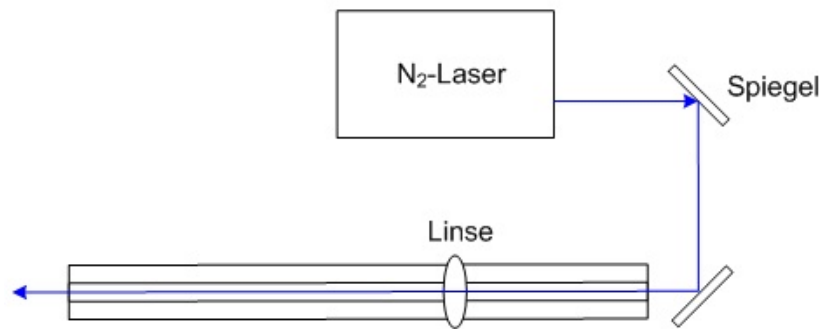


Abbildung 4.2: Strahlengang des Desorptionslasers. Dabei wird sichergestellt, dass die Linse, unabhängig von ihrer Position, vom Strahl mittig getroffen wird.

Das Strahlprofil kann mittels einer Fluoreszenzscheibe sichtbar gemacht und mittels einer CCD aufgenommen werden. Die Abbildung 4.3 enthält die Darstellung des Strahlprofils in einer Entfernung vom Fokus der Linse, die innerhalb des Bereiches liegt, wo die Experimente durchgeführt wurden. Es lässt sich ein weiterer Bereich mit konstanter Energie erkennen, was einem Flat-Top Profil entspricht, welches für die Laserdesorption gut geeignet ist (vgl. Abschnitt 3.3.2).

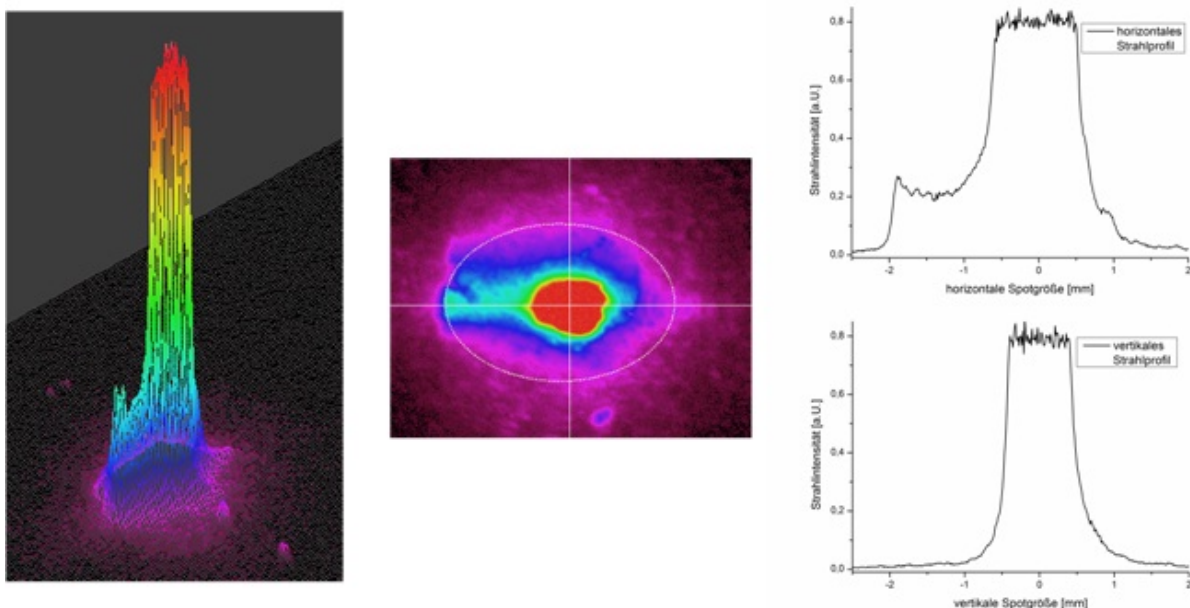


Abbildung 4.3: Strahlprofil des Desorptionslasers in einem Abstand von 10 cm außerhalb des Fokus der Linse. Links: 3D-Ansicht des Intensitätsprofils. Mitte: 2D-Ansicht. Rechts: Horizontaler und vertikaler Schnitt durch das Profil entlang der in der 2D-Ansicht dargestellten Achsen.

In der Abbildung 4.4 ist die Spotgröße und die sich bei einer Pulsenergie von 120 μJ daraus ergebende Fluence über einen weiten Bereich in Abhängigkeit der Linsenposition dargestellt. Zur Bestimmung der Spotgröße wurde jeweils für die horizontale und vertikale Richtung der Durchmesser des Spots bestimmt ($1/e^2$ -Wert). Unter der Annahme, dass die Spotform am ehesten einer Ellipse gleichkommt wurde dann die Fläche bestimmt.

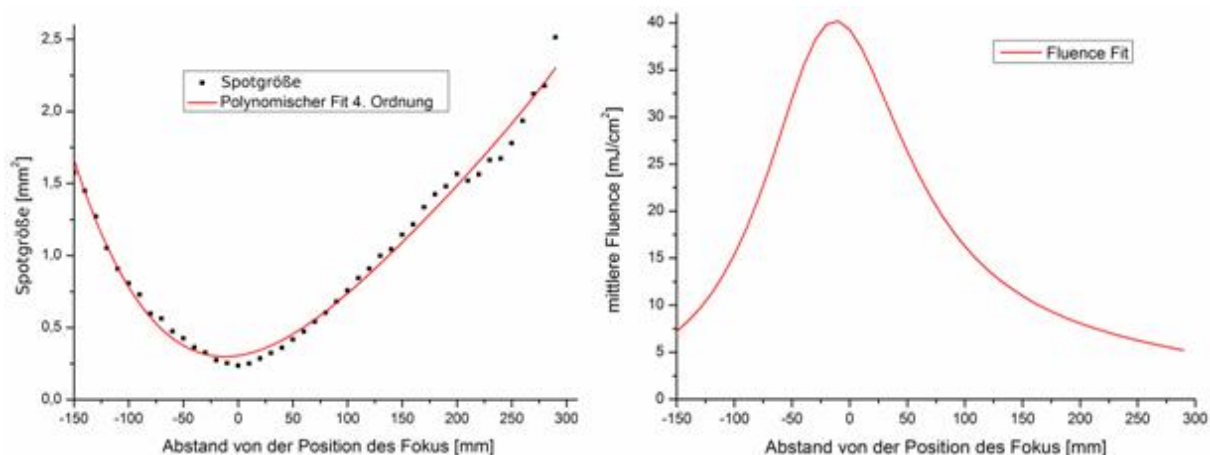


Abbildung 4.4: Spotgröße und Fluence in Abhängigkeit der Linsenposition. Für die Bestimmung der Fluence wurde die gefittete Kurve von der Messung der Spotgröße herangezogen

4.3.2. Photoionisationslaser

Zur Photoionisation wird ein Excimer Laser verwendet. Das laseraktive Medium ist in unserem Fall ein Helium-Fluor-Gasgemisch, wobei den oberen bzw. unteren Laserzustand zwei angeregte Zustände des F_2 -Moleküls darstellen. Die Besetzung des oberen Laserzustandes wird durch eine elektrische Entladung in Gang gesetzt. Der Laser emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 157,6 nm. Licht dieser Wellenlänge kann sich in Luft nicht ausbreiten, weil es besonders von Sauerstoff stark absorbiert wird. Der Strahlengang muss daher entweder in Vakuum verlaufen oder mit Stickstoff kontinuierlich gespült werden. Der von uns verwendete Laser¹⁶ liefert eine maximale Pulsenergie von 1,70 mJ bei einer Repetitionsfrequenz von 20 Hz und hat eine Puls-zu-Puls-Stabilität von 3%. Die Pulsenergie kann durch Einstellen der Hochspannung des Thyratrons über die Steuerungssoftware variiert werden. Die Pulslänge beträgt 8 ns und die Strahlgröße misst 6x3 mm. Der Laserstrahl wird mit einer plankonvexen Kalziumfluorid-Zylinderlinse ($f \approx 200$ mm) fokussiert und tritt durch ein CaF_2 -Fenster in

¹⁶ GAM Laser, INC EX5

die Vakuumkammer ein. Durch die N₂-Spühlung, die Linse und das Fenster ist insgesamt mit einer Transmission von ~85% der ursprünglichen Laserenergie zu rechnen. Das Strahlprofil lässt sich innerhalb der Vakuumkammer mittels einer Fluoreszenz-scheibe sichtbar machen und mittels eines Beamprofilers¹⁷ von außerhalb aufnehmen. Das in Abbildung 4.5 gemessene Strahlprofil entspricht dem innerhalb der Extraktionszone des TOFs (vgl. Abbildung 4.1). Die Ausdehnung des Laserstrahls beträgt in vertikaler Richtung $7,8 \pm 0,2$ mm und in horizontaler Richtung $0,55 \pm 0,05$ mm (FWHM). Dies ergibt eine Spotgröße von $4,3 \pm 0,5$ mm².

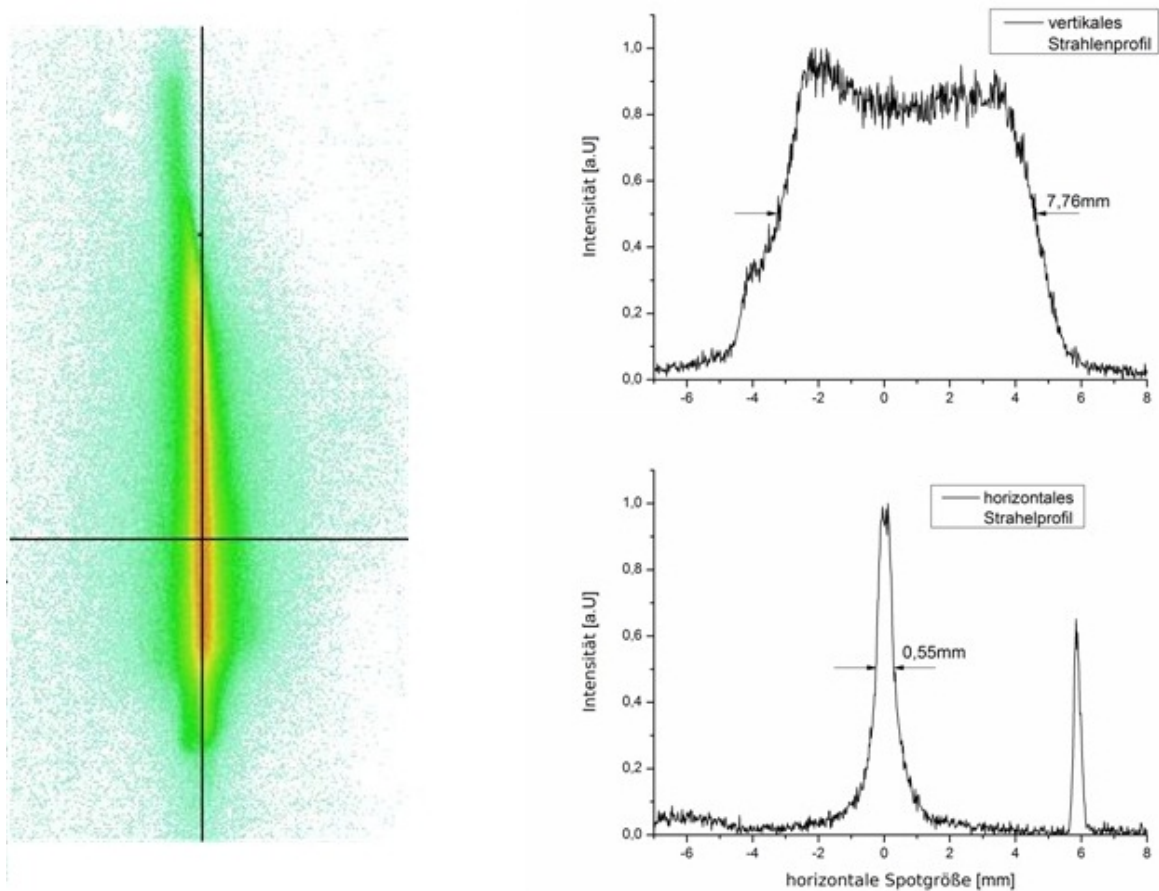


Abbildung 4.5: Strahlprofil des Photoionisationslasers. Rechts: 2D-Ansicht. Rechts: Vertikaler und horizontaler Schnitt durch das Profil entlang der in der 2D-Ansicht dargestellten Achsen. Das Signal bei 6 mm im vertikalen Profil stammt von einer Reflexion von Tageslicht innerhalb der Kammer und ist unabhängig vom Laser.

¹⁷ Ophir Spiricon SP503U

5. Umsetzung und Messresultate

In diesem Abschnitt werden die experimentellen Aufbauten zu MALDI und der Desorption von funktionalisierten Porphyrinen mit anschließender Photoionisation dargestellt. Obwohl sich die jeweiligen Aufbauten sehr ähneln, werden sie jeweils einzeln vorgestellt, um eine voneinander unabhängige Betrachtung beider möglich zu machen. Die darin enthaltenen wesentlichen Komponenten wurden Abschnitt 4 ausführlich beschrieben. Es werden Ergebnisse präsentiert, welche in Abschnitt 6 darauf befragt werden, inwiefern MALDI als Molekülquelle bzw. Photoionisation in einem neuen Detektionsschema bei Materiewelleninterferometern zum Einsatz kommen kann.

5.1. Matrix unterstützte Desorption von Biomolekülen

Das Ziel bei den Experimenten zu MALDI war das erfolgreiche Desorbieren von Biomolekülen, sowie das Kennenlernen der diversen relevanten Parameter, wie sie in der Literatur berichtet werden und in Abschnitt 3 dargestellt sind. Das weitere Ziel war, den Desorptionsprozess hinsichtlich des Teilchenflusses und dessen Konstanz zu optimieren. In diesem Abschnitt werden das experimentelle Setup, die verwendeten Moleküle und die Resultate dargestellt.

5.1.1. Experimenteller Aufbau und Prozedere

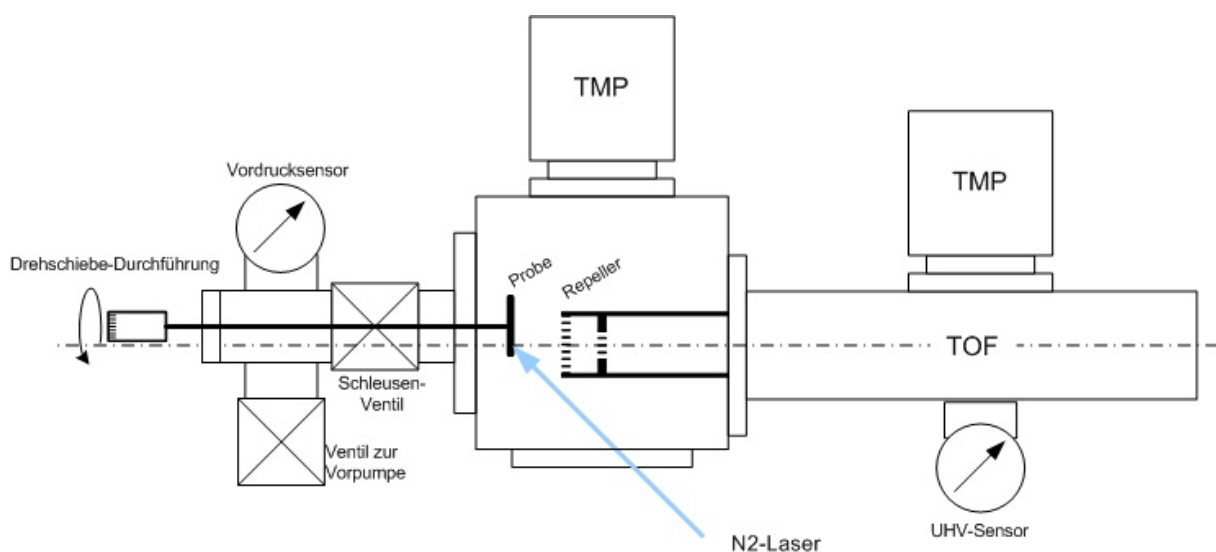


Abbildung 5.1: Experimenteller Aufbau für die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation.

Die Abbildung 5.1 zeigt die Vakuumkammer bestehend aus Schleusenteil, der Kammer wo die Desorption stattfindet und dem TOF. Zwei Turbomolekularpumpen sorgen für einen Druck zwischen 10^{-7} mbar und 10^{-8} mbar und das schnelle Wiederherstellen des Vakuums nach dem Tauschen einer Probe. Die Probenplatte hat einen Durchmesser von 35 mm, sodass sie gerade noch durch alle Rohre und das Schleusenventil hindurch passt und besteht aus Aluminium oder rostfreiem Edelstahl. Sie kann vorne an die drehbare Lineardurchführung montiert und dadurch etwa 5 cm hinter dem Repeller positioniert werden. Der Strahl des N_2 -Lasers trifft die Probe unter einem Winkel von ungefähr 45° an der Stelle, die mit der Achse des TOFs ungefähr schneidet, wodurch ein maximaler Teilchenfluss gewährleistet wird (vgl. Abschnitt 3.5.2 bezüglich der Dynamik der Teilchenwolke). Die Lineardurchführung befindet sich selbst nicht auf der Achse des TOFs, wodurch durch Drehen der Probe der maximale Umfang der Probenplatte abgefahren werden kann. Bei der Präparation der Probe ist darauf zu achten, dass sich die Analyt/Matrix-Mischung auf dieser Spur befindet.

Indem mittels einer Keramik- oder Kunststoffschraube die Probe von der Lineardurchführung isoliert wird, kann an die Probe mittels eines von unten kommenden, auf einer separaten Lineardurchführung befestigten, Schleifkontaktes eine zusätzliche Spannung angelegt werden.

Die Präparation der Probe erfolgt über eine der in Abschnitt 3.4.3 erläuterten Methoden.



Abbildung 5.2: Probenplatte aus Aluminium mit am Rand getrockneten Tropfen (Dried-Droplet-Methode) einer Matrix/Analyt-Mischung bestehend aus 2,5-DHB und Hemoglobin.

Timing

Die Messungen laufen nach einer fixen Sequenz ab. Die Wiederholrate ist durch die des N₂-Lasers auf 30 Hz beschränkt. In der Regel wird mit 1-2 Hz gearbeitet, um jede einzelne Messung mitverfolgen zu können und einem schnellen Verbrauch der Probe vorzubeugen. Eine Pulsgeneratorkarte¹⁸ gibt TTL-Pulse gewünschter Frequenz aus, welche den Haupttakt darstellen und mittels einer Delay-Box¹⁹ an den Laser, das TOF und das Oszilloskop weitergegeben wird. Die Verzögerungszeiten, Höhe und Länge der Pulse sind somit variabel einstellbar. Zur Triggerung des N₂-Lasers werden TTL-Pulse mit einer Länge von $\geq 1 \mu\text{s}$ verwendet. Mit einer Verzögerung von $40 \mu\text{s} - 1000 \mu\text{s}$ werden das Schalten des Repellers, sowie das Oszilloskop ebenfalls durch TTL-Pulse mit einer Länge von $\geq 1 \mu\text{s}$ getriggert. In der Abbildung 5.3 ist die Pulsfolge schematisch dargestellt.

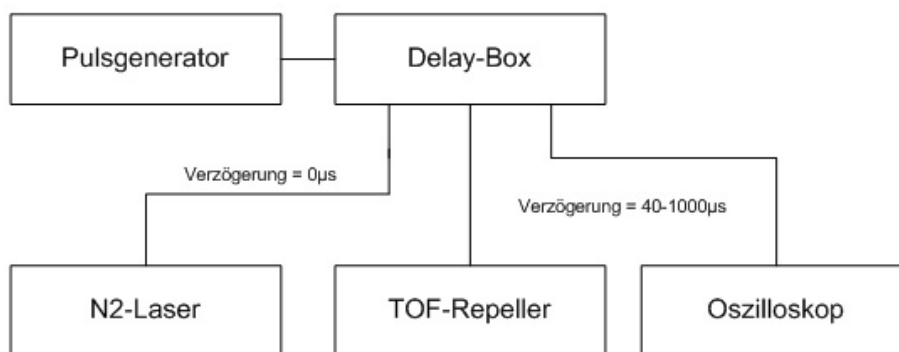


Abbildung 5.3: Schema zur Triggerung der einzelnen im Experiment benötigten Elemente.

Messung

Befindet sich die Probe auf ihrer Position, trifft der Laser die Probe an der richtigen Stelle, befindet sich die optische Linse an einer geeigneten Position, sodass die Fluence stimmt (vgl. Abschnitt 4.3.1), herrscht ein Druck von besser als 10^{-6} mbar in der Kammer, sind die TOF- und MCP-Spannungen hochgedreht und ist ein geeignetes Delay zwischen Laser und Schalten des Repeller eingestellt, so kann gemessen werden.

Aufgrund des Sweetspot-Effekts (vgl. Abschnitt 3.4.1) führt nicht jeder Laserschuss zu einem detektierbaren Signal. Deshalb wird durch Drehen der Probe die bestrahlte Stelle gewechselt, und nach einer Stelle gesucht, bei der ein Ionensignal sichtbar wird. Ist so eine Stelle gefunden, liefert diese, je nachdem wie dick die Probe aufge-

¹⁸ National Instruments PCI-6221/CB-68LP

¹⁹ Berkeley Nucleonics 575-8C Digital Delay Generator

tragen ist, für 10-100 Schüsse Ionen. Besonders bei Verwendung von DHB als Matrix wurde beobachtet, dass sich vorwiegend an den Rändern der getrockneten Analyt-Matrix-Tropfen Sweetspots befinden, während in deren Mitte kaum ein Ionensignal gemessen wurde. Bei Sinapinsäure wurde dieser Effekt nicht beobachtet – über den ganzen Bereich des Tropfens waren Sweetspots zu finden. Um vor allem bei Testzwecken eine Probe länger verwenden zu können und ein zu häufiges Wechseln der Probe zu vermeiden, kann die Stelle des Laserspots in Bezug auf die Achse des TOFs geringfügig verändert und so mehrere Spuren auf der Probe „abgegrast“ werden.

Einzelne Spektren erscheinen sehr verrauscht. Deshalb wird über 16 - 128 Spektren gemittelt. Im höheren Massenbereich (>5000 amu) und besonders bei Ionen mit einer Masse >100.000 amu ist das allgemeine Signal sehr schwach (10 - 100 mV). Das Signal-Rausch-Verhältnis beträgt dort $SNR = 5$ und es kann besonders bei niedrigen Verzögerungen zwischen Desorption und Schalten des Repellers zu einer Überlagerung des Spektrums mit als hochenergetisch neutral identifizierten Teilchen kommen. Es konnte nicht eruiert werden, welche Teilchen dies sind. Es gibt auch einen ionischen Anteil solcher Teilchen, welche allerdings durch Anlegen einer negativen Spannung von 15 V an die Probe unterdrückt werden kann. Dieses Störsignal fällt bei größeren Verzögerungen und höherer Amplitude des Analytionensignals im Massenspektrum nicht auf.

Kalibration

Zur Kalibration des Flugzeitmassenspektrometers (vgl. Abschnitt 4.1.4) wurde eine Mischung aus vier Proteinen²⁰ mit Sinapinsäure als Matrix verwendet. In der Tabelle 5.3 sind die verwendeten Proteine und deren Molekülmassen aufgelistet.

Protein	(M+H) ⁺ Durchschnitt	Protein	(M+H) ⁺ Durchschnitt
Insulin (Rind)	5.735 amu	Aldolase (Hasen Muskel)	16.952 amu
Cytochrom C (Pferd)	12.362 amu	Albumin (Rinder Serum)	39.212 amu

Tabelle 5.3: Zur Kalibration verwendete Proteine und deren Molekulargewichte.

²⁰ Sigma Aldrich. ProteoMass™ Protein MALDI-MS Calibration Kit. MSCAL3.

Die Proteine wurden jeweils in einer Konzentration von 10 nmol/ml in 0,1% TFA²¹ und 10 mg der Matrix in 1 ml 50% ACN in 0,05% TFA²² gelöst. Eine Volumeneinheit pro Proteinlösung wird mit vier Volumeneinheiten der Matrixlösung vermischt, sodass eine Matrix/Analyt-Mischung entsteht mit A/M=4500 und von jedem Protein gleich viele Teilchen enthalten sind. Es wurde die Dried-Droplet Methode verwendet und die TOF-Spannungen gemäß Tabelle 4.1 eingestellt (MCP = 2,1 kV). Die Abbildung 5.4 zeigt die lineare Abhängigkeit der Flugzeiten im TOF von den Wurzeln der Massen.

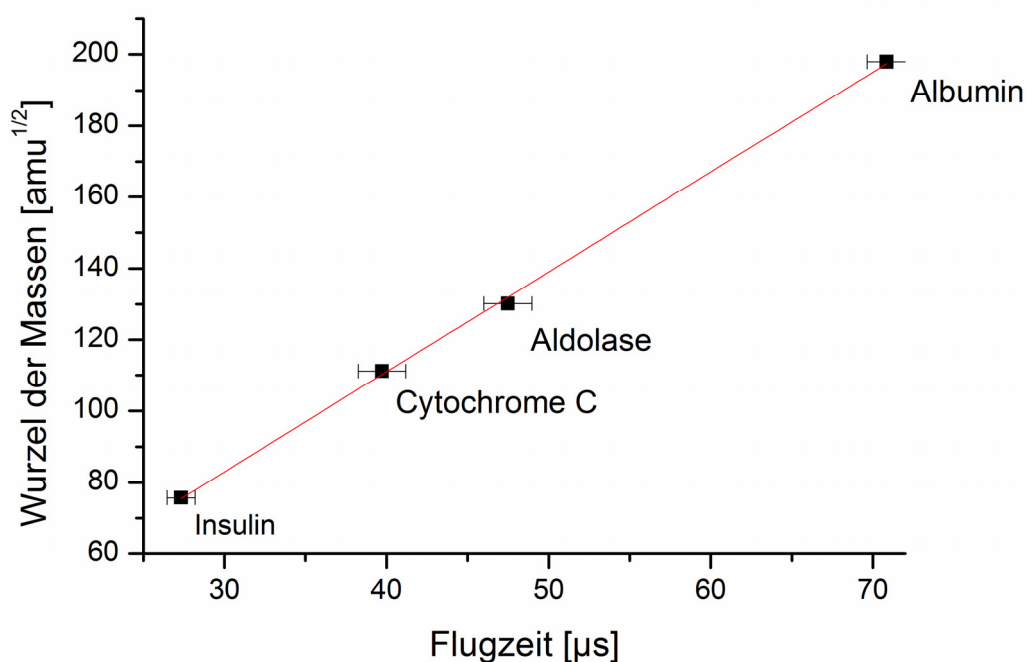


Abbildung 5.4: Abhängigkeit der Flugzeiten von den Massen der Proteine und ein linearer Fit zur Kalibration des Flugzeitmassenspektrometers.

Es ergeben sich als Konstanten $a = 2,81 \pm 0,06 \times 10^{-5}$ und $b = -1 \pm 2,5$. Mittels der Gleichung $m(t) = (a \cdot t + b)^2$ können nun alle gewonnen Spektren umskaliert werden. Die Abbildung 5.5 zeigt das bereits umskalierte Massenspektrum der Proteine. Aus den großen Fehlern der Konstanten, die aus der geringen Massenauflösung stammen (vgl. Abschnitt 4.1.3), ergibt sich bereits dadurch bei der Bestimmung einer Masse von 150.000 amu ein Fehler von ± 8.400 amu, was etwa $\pm 6\%$ entspricht. Die TOF-Spannungen werden über Drehpotentiometer, die eine Genauigkeit von 1% zuließen eingestellt. Obige Kalibrationskonstanten wurden für alle folgenden Mes-

²¹ Diese Angabe bedeutet, dass sich in H₂O 0,1% Trifluoressigsäure befinden.

²² Diese Angabe bedeutet eine Mischung von Acetonitril mit 0,1% TFA im Volumenverhältnis (v/v) 1:1.

sungen verwendet, welche über einen Zeitraum von einem Monat stattgefunden haben.

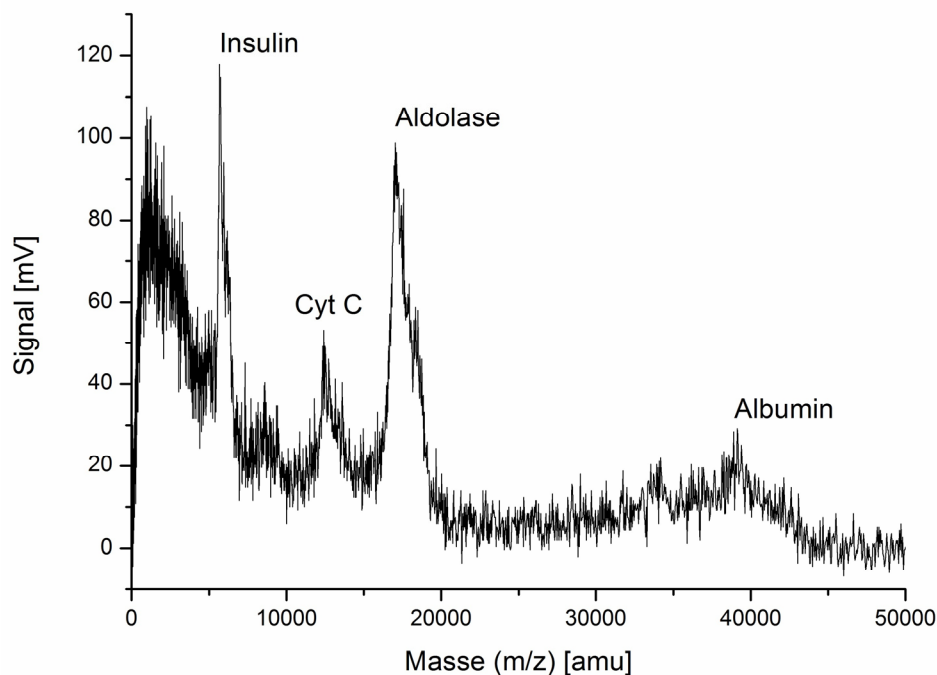


Abbildung 5.5: Massenspektrum des Proteinkits zur Kalibration des TOFs. (vgl. Tabelle 5.3)

Auswertung

Die durch das digitale Speicheroszilloskop gewonnenen Flugzeitspektren werden in Origin oder Matlab ausgewertet (siehe Anhang A).

5.1.2. Analytmoleküle

Um MALDI zu testen wurden mehrere Proteine verwendet – sowohl kleine (Insulin und Ubiquitin), als auch große Proteine (Albumin und Immunoglobulin G). Biologische Moleküle sind für die Materiewelleninterferometrie insofern von Interesse, als sie hohe Massen haben können, kommerziell in hoher Reinheit erhältlich sind und die Charakterisierung von physikalischen Eigenschaften dieser Moleküle für die Biologie von Interesse sein kann. Eine intrinsische oder durch Tags hervorgerufene Fluoreszenz der Moleküle ist zwecks einer Detektion in Interferenzexperimenten ebenfalls von Interesse. Drei exemplarische Proteine, welche in Abbildung 5.6 dargestellt sind, werden im Folgenden genauer besprochen und die gewonnenen Massenspektren gezeigt.

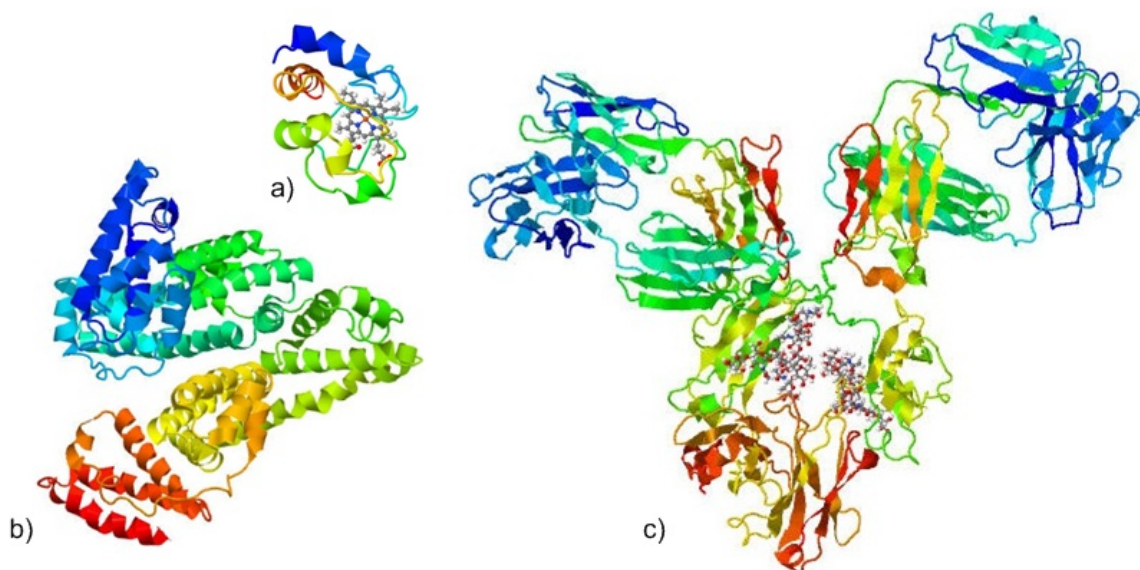


Abbildung 5.6: Sekundärstruktur von a) Pferdeherz Cytochrom C, b) Human Serum Albumin und c) Human Immunoglobulin G. Die Größenverhältnisse entsprechen ungefähr den realen. (Quelle: Protein Data Bank²³. a) 1AKK, b) 1AO6, c) 1IGY)

Cytochrom C

Bei Cytochrom C handelt es sich um ein aus mehr als 100 Aminosäuren bestehendes Protein. Es beinhaltet ein Häm-Molekül, das kovalent an das Protein gebunden ist und diesem seine rote Farbe gibt. Neben der vorhandenen Aminosäure Tryptophan trägt das Chromophor stark zur Fluoreszenz des Proteins bei [144]. Es besitzt ein Fluoreszenzmaximum bei 370 nm unter Anregung mit Licht von 280 nm. Die Fluoreszenz dieses Moleküls kann für die Detektion eines Interferenzmusters von Bedeutung sein (vgl. Abschnitt 1.2.1). Das von uns verwendete Cytochrom C vom Pferdeherzen²⁴ hat eine Masse von 12.384 amu.

Die Abbildung 5.7 zeigt ein Massenspektrum des Proteins. Dabei wurde Sinapinsäure als Matrix (vgl. Abschnitt 3.4.1) verwendet und zur Probenpräparation die Two-Layer Methode angewandt (vgl. Abschnitt 3.4.3). Dazu wurden zuerst 2,2 mg des pulverförmigen Proteins in 10 ml 0,1% TFA und davon getrennt 20 mg pulverförmige Sinapinsäure in 1,5 ml Methanol gelöst. Anschließend wurden ungefähr 0,5 ml der Matrixlösung auf der Probenplatte gleichmäßig verteilt und an Luft trocknen gelassen. Nachdem sich eine gleichmäßige Schicht kristallisierter Matrixmoleküle gebildet hat, wurden 1 ml der Matrixlösung mit 1 ml der Analytlösung vermischt, diese in einzelnen ungefähr 10 µl großen Tropfen auf den Rand der bereits mit Matrix beschichteten Probenplatte aufgetragen und ebenfalls trocknen gelassen. Die fertige Probe

²³ <http://www.pdb.org/> (18.1.2012)

wurde auf die Lineardurchführung montiert und in die Vakuumkammer eingeschleust, sodass sie sich ungefähr 5 cm hinter dem Repeller des TOFs befindet. Die Linse und der Abschwächer des Laserstrahls wurden so eingestellt, dass ein im Durchmesser ungefähr 226 μm kleiner Spot auf der Probe mit einer Energie von 20 μJ entsteht, was einer Fluence von ungefähr 51 mJ/cm^2 bzw. 13 MW/cm^2 entspricht. Die TOF Spannungen wurden gemäß denen in Tabelle 4.1 eingestellt. Die Spannung am MCP betrug 2 kV. Es wurde mit einer Repetitionsrate von 2 Hz gemessen und über 16 Spektren gemittelt.

Es lässt sich im unteren Massenbereich (<9000 amu) ein großer Beitrag von nicht masseaufgelösten Ionen erkennen, welcher aus Matrixclustern, Analytfragmenten und deren Mischung bestehen kann. Deutlich davon abgegrenzt befindet sich der Peak welcher dem Intakten protonierten Cytochrom C zuzuordnen ist. Ebenfalls lassen sich deutlich ein aus zwei, und weniger deutlich ein aus drei, Cytochromen bestehender Cluster, sowie ein zweifach protoniertes Analytmolekül erkennen. Die Massenauflösung beträgt $m/\Delta m = 9$.

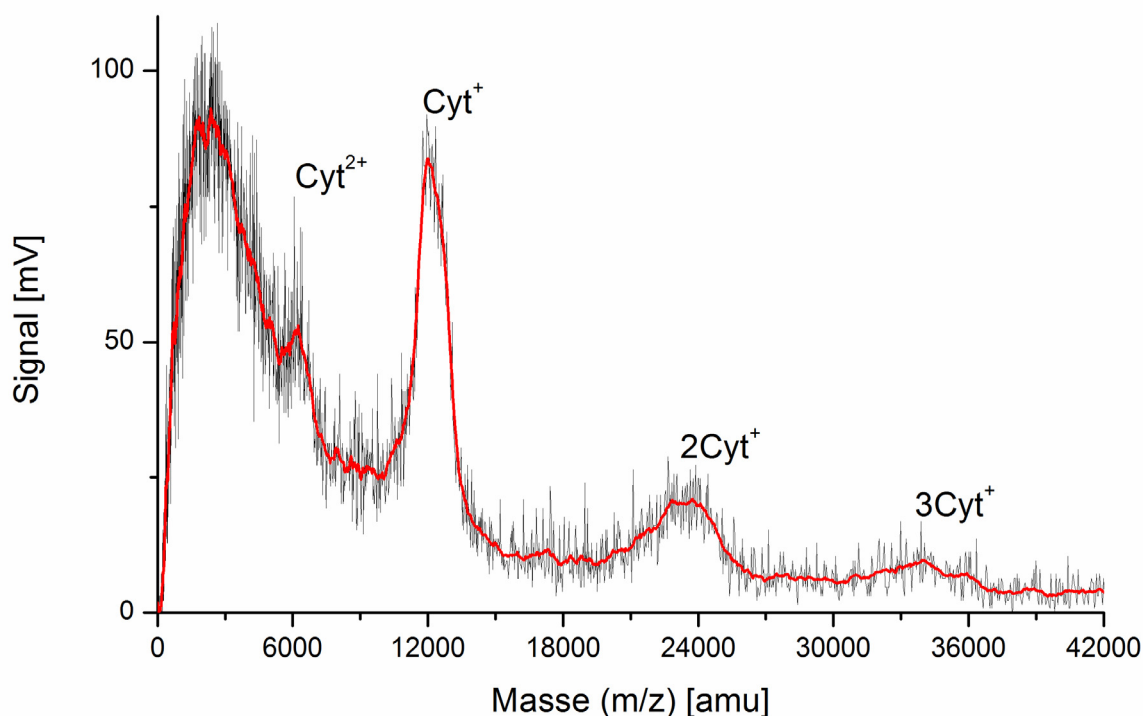


Abbildung 5.7: Positive Ionen Massenspektrum von Pferdeherz Cytochrom C mit Sinapinsäure als Matrix und Two-Layer Methode ($A/M=1:3000$). Es wurde über 16 Spektren gemittelt. Die rote Linie entspricht dem geglätteten Signal. Die Fluence bei der Desorption beträgt ca. $51\text{mJ}/\text{cm}^2$ und der Spotdurchmesser ca. $226\text{ }\mu\text{m}$.

²⁴ Sigma-Aldrich. Cytochrome C from equine heart. C7752, Reinheit $\geq 95\%$. Lyophilized powder.

Serum Albumin

Das im Blut von Säugetieren vorkommende Protein Albumin besteht aus einer Kette von 584-590 Aminosäuren. Das von uns verwendete Makromolekül²⁵ (BSA, von Bovine Serum Albumine) hat eine Masse von 66.430 amu. Darin sind zwei Tryptophan, 20 Tyrosin und 27 Phenylalanin enthalten [145], welche alle zu einer schwachen intrinsischen Fluoreszenz des Proteins beitragen²⁶.

Es wurde eine Matrix-Analyt-Mischung zubereitet. Dazu wurden 10 nmol BSA in 1 ml 0,1 % TFA und 0,5 mg Sinapinsäure in 0,5 ml Methanol gelöst. Beide Lösungen wurden in einem Volumenverhältnis (v/v) von 1:1 vermischt (A/M = 1:6250) und auf die Probenplatte in je ungefähr 10 µl Tropfen aufgetragen (Dried-Droplet Methode). Die Probe wurde in die Vakuumkammer geschleust. Der Laserspot hatte einen Durchmesser von 211 µm und die Laserenergie war 20 µJ. Daraus ergibt sich eine Fluence von 59 mJ/cm² bzw. 15 MW/cm².

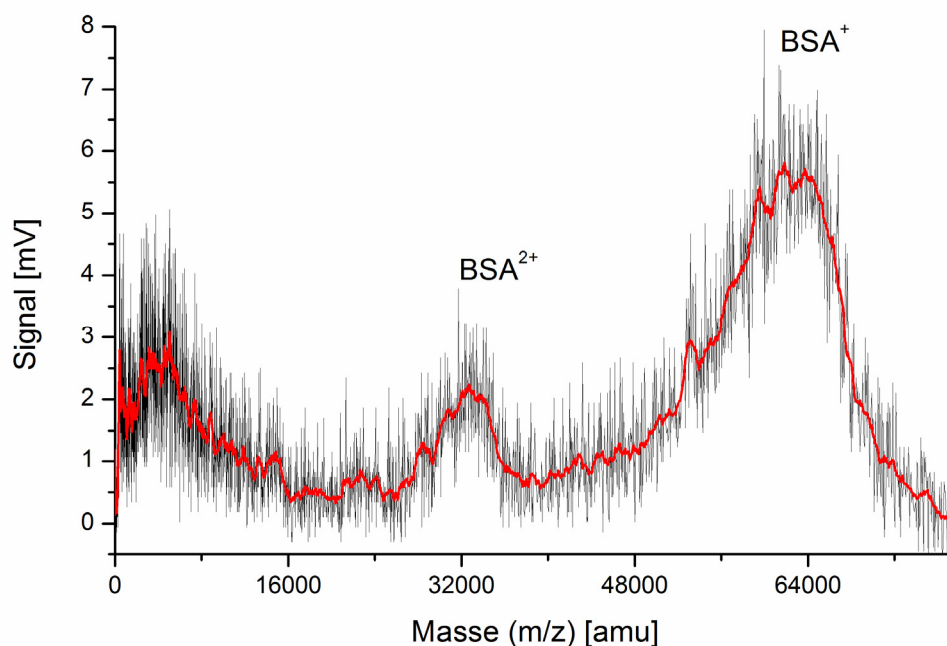


Abbildung 5.8: Positive Ionen Massenspektrum von Bovine Serum Albumin (BSA) mit Sinapinsäure als Matrix und Dried Droplet Methode (A/M=1:6000). Es wurde über 16 Spektren gemittelt. Die rote Linie entspricht dem geglätteten Signal. Die Fluence bei der Desorption beträgt ca. 60mJ/cm² und der Spotdurchmesser ca. 211 µm.

²⁵ Sigma-Aldrich. Albumin from bovine serum. A7906. Reinheit ≥ 98%. Lyophilized powder.

²⁶ Fluoreszenzfarbstoffe wie 5-Aminofluorescein (AFL) können an Albumin in einer kovalenten Bindung angehängt werden und so zu einer besseren Sichtbarkeit des gesamten Moleküls nach einer Anregung mit Laserlicht führen [146 (63ff.)]. Es ist auch möglich, Tags zu verwenden welche nicht-kovalent gebunden sind, allerdings führen diese zu einer geringeren Stabilität des fluoreszierenden Komplexes.

Die Abbildung 5.8 zeigt ein Massenspektrum von BSA. Im Gegensatz zur Desorption von Cytochrom C lässt sich im Verhältnis zum Analytpeak ein weniger ausgeprägtes Signal im unteren Massenbereich erkennen. Möglicherweise hängt dies mit der anderen Präparationsmethode oder auch mit der insgesamt niedrigeren Analytkonzentration zusammen. Es lässt sich ein sehr breiter Peak erkennen, welchem das einfach protonierte BSA zuzuordnen ist. Aufgrund der niedrigen Massenauflösung von $m/\Delta m = 6$ lässt sich allerdings nicht ausschließen, dass sich innerhalb des Peaks Fragmentationen von BSA befinden. Das zweifach protonierte BSA erscheint bei der halben Masse des einfach protonierten. Obwohl die Spannung des MCPs auf 2,1 kV erhöht wurde, ist das Signal, bei sonst ähnlichen Parameterwerten, um eine Größenordnung kleiner, als bei Cytochrom C. Der Grund hierfür kann wiederum an der Präparation, bzw. an der generell zunehmenden Schwierigkeit liegen, Moleküle höherer Masse zu desorbieren, oder auch an der sinkenden Detektionseffizienz des MCPs bei höheren Massen (vgl. Abschnitt 4.1).

Immunglobulin G

Immunglobulin G (IgG), ein im Blut von Säugetieren vorkommender Antikörper, besteht aus vier Aminosäureketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Von diesen Ketten sind je zwei identisch, wobei das Molekulargewicht der schweren (γ -) Ketten je ungefähr 50.000 amu und der leichten (κ - oder λ -) Ketten je ungefähr 25.000 amu ist²⁷. Das von uns verwendete IgG²⁸ hat ein Molekulargewicht von 143.700 amu.

Die Abbildung 5.9 zeigt das Massenspektrum. Die Dried-Droplet Methode und ein relativ hohes Matrix/Analyt-Verhältnis von $A/M = 1:200$ wurden verwendet. IgG wurde in 0,1% TFA und Sinapinsäure wurde in 50 % ACN 0,05 % TFA gelöst. Um ein insgesamt höheres Ionensignal zu erzielen, wurde der Laserspot auf einen Durchmesser von 1 mm vergrößert, was einer Flächenzunahme von 2000 % gegenüber obigen Messungen entspricht. Dementsprechend wird auch die Energie auf 120 μ J, also um 600 % erhöht, was zu einer Fluence von 15 mJ/cm^2 bzw. 3 MW/cm^2 führt. Die Fluence beträgt also 25 % der Fluences vorheriger Messungen mit kleineren Spotgrößen

²⁷ Gemeinsam mit seinem nicht-kovalent bindenden Antigen, das auch mit einem Farbstoff, wie Fluoresceinisothiocyanat, versehen sein kann, würde der gesamte, nun sichtbare, Molekülkomplex auf eine Masse von 200.000 amu kommen [147]. Fraglich ist jedoch, ob sich dieser Molekülkomplex auch als Ganzes desorbieren ließe.

²⁸ Sigma-Aldrich. IgG from bovine serum. I5506. Reinheit $\geq 95\%$. Lyophilized powder.

(vgl. Abschnitt 3.3.1). Der größere Spot führt, bei sonst ähnlichen Werten der Parameter (MCP = 2,1 kV), zu einer Erhöhung des Ionensignals um mehr als eine Größenordnung. Eine weitere Vergrößerung des Spots erscheint daher als interessant, war allerdings durch die begrenzte Energie des N_2 -Lasers nicht möglich.

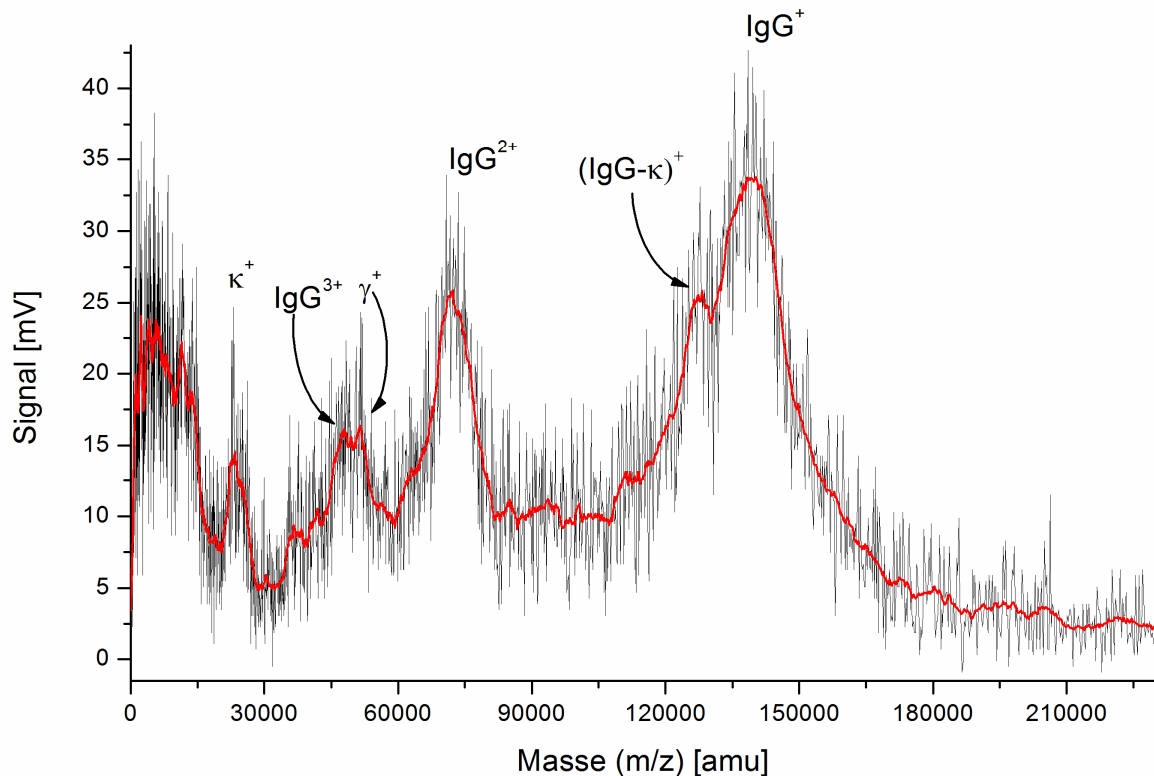


Abbildung 5.9: Positive Ionen Massenspektrum von Immunoglobulin G mit Sinapinsäure als Matrix und Dried Droplet Methode ($A/M=1:200$). Es wurde über 16 Spektren gemittelt. Die rote Linie entspricht dem geglätteten Signal. Die Fluence bei der Desorption beträgt ca. 15 mJ/cm^2 und der Spotdurchmesser ca. 1 mm.

Im Spektrum fallen wiederum ein starkes Rauschen und breite Peaks auf ($m/\Delta m = 7$), welchen dennoch protonierte Analytionen zugeordnet werden können. In den einzelnen Peaks sich befindende Fragmente können nicht ausgeschlossen werden. Es lässt sich ein ausgeprägtes Signal des intakten IgGs erkennen, sowie ein damit überlagertes Signal des um eine kleine Aminosäurekette (κ oder λ) reduzierten Proteins. Ebenfalls lassen sich das doppelt und dreifach geladene Protein erkennen, wie auch Signale, die den einzelnen leichten und schweren Aminosäureketten zuzuordnen sind.

5.1.3. Die Probenpräparation betreffende Experimente

Verschiedene Matrizen und andere Moleküle

Bei unseren Messungen standen uns als Matrix 2,5-DHB, α -CHCA und 3-HPA zur Verfügung (vgl. Abschnitt 3.4.1). Beim Experimentieren mit kleineren Molekülen wie Rhodamin B, Vitamin B12, Gramacidin, Insulin und Ubiquitin konnte DHB erfolgreich als Matrix eingesetzt werden. Weiters konnte mit DHB auch Cytochrom C erfolgreich desorbiert werden.

Es wurde auch versucht Hemoglobin, ein aus vier nicht-kovalent gebundenen Aminosäureketten bestehendes und insgesamt 64.458 amu schweres Protein, mit DHB als Matrix zu desorbieren. Dabei konnten allerdings nur die einzelnen Ketten, sowie deren Cluster, aber nicht das intakte ganze Protein detektiert werden. Von so einem Verhalten bei der versuchten Desorption eines nicht-kovalenten Komplexes wird auch in [148] berichtet. Zehl und Allmaier berichten von der erfolgreichen Desorption von Hemoglobin unter der Verwendung von 2,6-DHAP als Matrix und einer sorgfältigen Probenpräparation [149]. In [150] wird Glutaraldehyd als Crosslinker zur Verstärkung der Bindungen zwischen den Aminosäureketten verwendet und Hemoglobin erfolgreich desorbiert.

Die Matrix 3-HPA wurde verwendet um Ubiquitin, ein ungefähr 8.500 amu schweres Protein zu desorbieren – allerdings ohne Erfolg, auch bei Probieren verschiedener Matrix/Analyt-Verhältnissen ($A/M = 1:8.000$ bis $1:50.000$). Möglicherweise ist 3-HPA allgemein für die Desorption von Proteinen nicht geeignet.

Die Matrix α -CHCA wurde verwendet um Insulin, ein ungefähr 5.808 amu schweres aus zwei unterschiedlich großen Aminosäureketten bestehendes Peptid, zu desorbieren – es konnte allerdings nur ein ungefähr 3.300 amu schweres Fragment detektiert werden, welchem die größere der zwei Ketten zuzuordnen ist. Möglicherweise scheiterte die Desorption des intakten Peptides an der Laserfluence oder auch an der Präparation der Probe. Das Problem wurde nicht weiter verfolgt.

Verschiedene Lösungsmittel

Für Matrix- und Analytmoleküle lässt sich nicht immer dasselbe Lösungsmittel verwenden. Deshalb ist auf die Mischbarkeit der Lösungsmittel untereinander zu achten. In Anhang B befindet sich eine Tabelle aller in dieser Arbeit verwendeten Moleküle, inklusive den für diese Moleküle geeigneten Lösungsmittel. Proteine lassen sich in

der Regel in H₂O oder 0,1% TFA H₂O gut lösen (bis zu 10 mg/ml). Sinapinsäure, die hier am häufigsten eingesetzte Matrix, lässt sich kaum in H₂O lösen. Obwohl Methanol mit Wasser vollständig mischbar ist²⁹, kommt es bei der Mischung einer Protein/Wasser- mit einer Sinapinsäure/Methanol-Lösung entweder sofort, oder nach einiger Zeit (30min) zu einer deutlich sichtbaren Aggregation von Teilchen. Zur Lösung dieses Problems hat es sich als sinnvoll herausgestellt die wässrige zur Methanol-Lösung zu pipettieren und nicht umgekehrt, sowie den Anteil der Methanollösung größer gleich dem Anteil der wässrigen Proteinlösung sein zu lassen. Ebenfalls sollte eine solche Mischung sofort verwendet und nach 30 min verworfen werden. Mit ACN 0,05% TFA als Lösungsmittel für Sinapinsäure wurde das Problem nicht festgestellt. Dennoch sollten Mischungen immer frisch sein. Analytlösungen können dagegen über längere Zeiträume verwendet werden.

Es wurde festgestellt, dass neben der Mischbarkeit auch die Oberflächenspannung und die Flüchtigkeit der Lösungsmittel von Interesse sind. Die Oberflächenspannung bestimmt, wie stark ein auf die Probenplatte pipettierter Tropfen zerläuft. Dass ein Tropfen nicht zerläuft, begünstigt die Bildung von Matrixkristallen mit inkorporierten Analytmolekülen und schafft eine dickere Matrix/Analyt-Schicht, was der Lebensdauer in Bezug auf das Verbrauchen einer Probe zu Gute kommt. Die Flüchtigkeit eines Lösungsmittels schlägt sich auf die Zeit nieder, die es benötigt eine Probe zu präparieren. Durch einen kontinuierlichen Luftstrom kann das Trocknen einer Probe beschleunigt werden.

Verschiedene Präparationstechniken und Materialien für die Probenplatte

Alle in Abschnitt 3.4.3. dargestellten Methoden zur Probenpräparation wurden ausprobiert. Dabei stellte sich die Dried-Droplet Methode als die zuverlässigste Art heraus um ein hohes und reproduzierbares Analytionensignal zu erhalten. Der Nachteil dieser Methode, der allerdings auch für die anderen gilt, ist die notwendige Suche nach Sweetspots, die ein paralleles Mitverfolgen des Spektrums am Oszilloskop verlangt.

Der Einsatz eines Spincoaters für das Auftragen einer gleichmäßigen Matrix/Analyt-Schicht hat zu keinem Ionensignal des Analyten geführt. Möglicherweise ist dies auf die Drehgeschwindigkeit des Spincoaters zurückzuführen, die minimal 30 Umdre-

²⁹ <http://gestis.itrust.de/> (18.1.2012)

hungen pro Sekunde betrug. Perera et al. verwendeten dagegen ungefähr 5 Us^{-1} [124].

Als Materialien für die Probenplatte wurden Aluminium und rostfreier Edelstahl ausprobiert, wobei kein nennenswerter Unterschied in der Performance zwischen diesen festgestellt wurde.

Verschiedene Matrix-zu-Analyt-Verhältnisse

Die Analytkonzentrationen wurden in einem weiten Bereich ($A/M = 10^{-2} - 10^{-6}$) variiert. Es wurden keine systematischen Messungen durchgeführt, allerdings einige qualitative Beobachtungen gemacht.

- Die Konzentration von IgG in einer Sinapinsäure/Methanollösung wurde variiert. Das Matrix/Analytverhältnis betrug $A/M = 500$, $A/M = 1.500$ und $A/M = 3.500$. Das bei diesen Proben gewonnene maximale Analytsignal unterschied sich nicht um mehr als 50% und es war eine kontinuierliche Zunahme des Analytsignals mit zunehmender Konzentration der Proteine zu registrieren. Es war kein Maximum erkennbar, allerdings muss mit einem solchen gerechnet werden. In der oben dargestellte Messung von Immunglobulin G wurde ein $A/M = 200$ verwendet, und das für dieses Molekül höchste Signal erzielt.
- Die Konzentration von BSA in einer Sinapinsäure/Methanollösung wurde variiert. Das Matrix/Analytverhältnis betrug $A/M = 6.000$, $A/M = 30.000$ und $A/M = 60.000$. Es ließ sich eine kontinuierliche Zunahme des Ionensignals mit zunehmender Konzentration von BSA feststellen. Das maximal gemessene Signal der höchsten Konzentration war das 15-fache der niedrigsten Konzentration.
- Bei einer Ubiquitin/DHB-Mischung lies sich im Bereich $A/M = 10^{-5} - 10^{-6}$ kein Ionensignal vernehmen, während in einem Bereich von $A/M = 10^{-3} - 10^{-4}$ schon.
- Aufgrund eines höheren Ionensignals kommt es auch zu einem stabileren Ionensignal von Schuss zu Schuss und von Spot zu Spot.

Allgemein kann so eine Konzentration von 1 Analytmolekül auf 3000 Matrixmoleküle als ein guter Ausgangspunkt für eine weitere Optimierung des Matrix/Analyt-Verhältnisses gelten.

5.1.4. Einfallswinkel und orthogonales vs. lineares TOF

Eine lineare Anordnung von MALDI-TOF, d.h. wenn sich die Matrix/Analyt-Wolke in Richtung des Detektors ausbreitet, garantiert einen maximalen Teilchenfluss.

Im Falle einer orthogonalen Anordnung war es möglich, den Laserstrahl normal auf die Oberfläche einfallen zu lassen. Das erhaltene Ionensignal ist dabei stark reduziert, da nur solche Ionen ins TOF gelangen, welche durch die gepulste Repellerspannung in dieses abgelenkt werden. Ein positiver Effekt des orthogonalen Aufbaus stellt eine verbesserte Massenauflösung dar, weil die radiale Geschwindigkeit der Teilchenwolke kleiner ist als die longitudinale (vgl. Abschnitt 3.5.2) und durch das Schalten des Repellers nur eine bestimmte Geschwindigkeitsklasse ausselektiert wird (vgl. Abschnitt 4.1.3.). Weiters können nun keine neutralen Teilchen mehr in das TOF gelangen und schnelle Ionen, Elektronen oder Protonen ausselektiert werden. Bei MADLI kommt es, neben der Desorption einzelner Moleküle, zur Ablation und Aggregation von Nanoteilchen [151, 152]. Solche könnten z.B. in einem KDTLI die materiellen Gitter beschädigen (vgl. Abschnitt 1.2.2). Ein effizientes optimiertes System zur Selektion gewünschter Teilchen, wäre daher wünschenswert.

Es wurden keine bemerkenswerten Unterschiede bezüglich der Desorption zwischen einem normalen Einfall und eines solchen mit einem Winkel von 45° beobachtet (vgl. Abschnitt 3.5.2). Bei einem schrägen Einfall unter einem Winkel Θ zur Flächennormale muss beachtet werden, dass sich die Größe des Laserspots um $\cos^{-1}\Theta$ ändert.

5.1.5. Variation der Laserparameter

Um die maximale Energie des Lasers ausnutzen zu können, wurde auf einen Abschwächer zum Variieren der Energie verzichtet und die Fluence durch Verfahren der optischen Linse und somit durch die Größe des Laserspots bestimmt (vgl. Abschnitt 4.3.1). Um quantitative Aussagen machen zu können, dürfte jeweils immer nur ein Parameter variiert werden: Um den Einfluss der Spotgröße zu testen, müsste die Energie mit verändert werden, um dieselbe Fluence beizubehalten; um den Einfluss der Energie zu untersuchen, müsste die Linse mit verändert werden, weil eine höhere Energie einen größeren Spot zur Folge hat.

Es konnte qualitativ die Feststellung getroffen werden, dass es eine optimale Fluence gibt. Für eine vorgegebene Energie gibt es eine optimale Spotgröße und für eine

vorgegebene Spotgröße gibt es eine optimale Energie (vgl. Abschnitt 3.3.1). Wurde eine Spotgröße von 180 μm verwendet so war die Erzeugung von Ionen nur bei einer Fluence von ca. 50 - 100 mJ/cm^2 zu beobachten. Bei einer Spotgröße von 700 μm entspricht der benötigte Bereich der Fluence 10 – 20 mJ/cm^2 . Beide Parameter müssen daher aufeinander abgestimmt werden.

Die Erzeugung von Analytionen ist gegenüber der Fluence sehr sensibel. Eine Abweichung von 30% von der „optimalen Fluence“ führt entweder zu einem Ausbleiben von Analytionen oder zu einer Fragmentation der Moleküle.

5.1.6. Geschwindigkeitsverteilung

Es konnte eine Geschwindigkeitsverteilung des mittels MALDI desorbierten Proteins Immunoglobulin G aufgenommen werden (Abbildung 5.10).

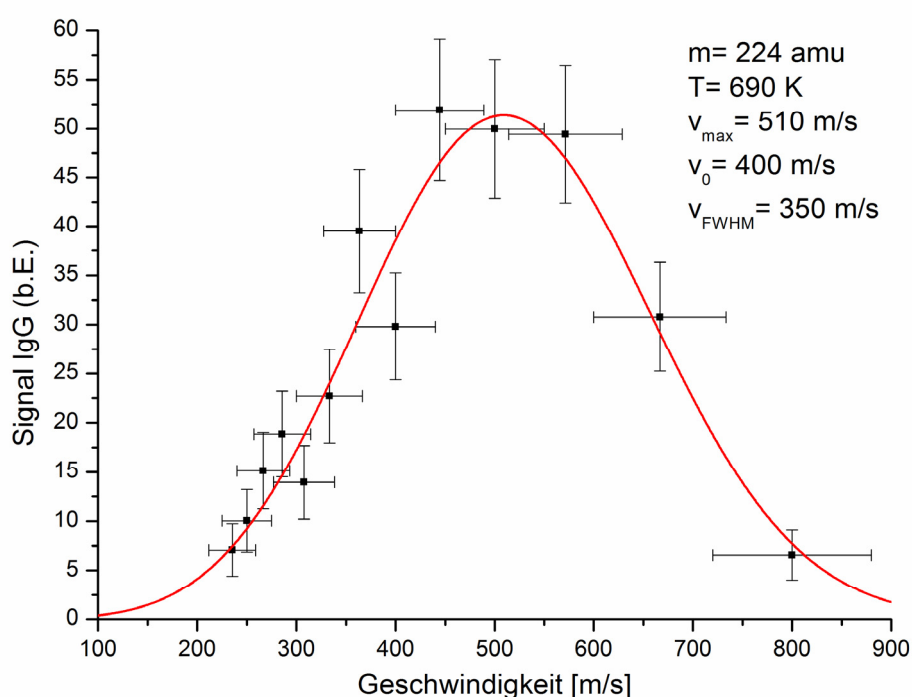


Abbildung 5.10: Geschwindigkeitsverteilung von Immunoglobulin G mit Sinapinsäure als Matrix. Der rote Fit entspricht einer Maxwell-Boltzmann-Verteilung mit einem Geschwindigkeitsoffset v_0 . Die dargestellten Messfehler stammen von der Ungenauigkeit der Messung des Abstandes zwischen Probenoberfläche und Repeller. Jeder Datenpunkt entspricht einer Mittelung von 16 Spektren.

Als Matrix wurde Sinapinsäure verwendet ($A/M = 1:2192$) und die Fluence betrug ungefähr 60 mJ/cm^2 bei einer Spotgröße von ungefähr 210 μm . Die aufgenommenen Daten lassen sich mittels einer modifizierten Maxwell-Boltzmann-Verteilung mit einem Geschwindigkeitsoffset gemäß Formel 6 fiten [153, 154].

$$I(v) = A \cdot 4\pi \cdot \left(\frac{m}{2\pi \cdot k_B \cdot T} \right)^{3/2} \cdot v^2 \cdot \exp \left(-\frac{m \cdot (v - v_0)^2}{2k_B \cdot T} \right) \quad \text{Formel 6}$$

Als Masse für den Fit wurde die Masse der Matrixmoleküle verwendet, weil diese die Analytmoleküle „transportieren“. Der Offset v_0 beträgt 400 m/s und die Breite der Verteilung (FWHM) 350 m/s. Die Temperatur als Fitparameter T kommt auf 700 Kelvin. Der genaue Wert der relevanten Flugdistanz ($d = 40 \pm 5$ mm) konnte nicht ermittelt werden, wodurch sich ein großer systematischer Fehler bei der Bestimmung der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit ergibt: $v_{\max} = 510 \pm 50$ m/s. Dieser Wert liegt innerhalb den Geschwindigkeitsbereichen, die in der Literatur berichtet werden (vgl. Abschnitt 3.5.1), ist aber etwas höher als der in [123] für Sinapinsäure mit Insulin als Analyt. Möglicherweise hängt die mittlere Geschwindigkeit von der Masse ab oder auch von der genauen Probenpräparation, wie es in [123] berichtet wird. Die wahrscheinlichste kinetische Energie des desorbierten Proteins beträgt 200 ± 40 eV.

5.1.7. Einfluss einer an die Probe angelegten Spannung

Mit dem Ziel das Analytionensignal zu erhöhen, wurde eine Spannung an die Probe angelegt. Für Testzwecke wurde Insulin als Analyt mit DHB als Matrix verwendet. Es wurde festgestellt, dass eine negative Spannung zu einer kontinuierlichen Abnahme des Ionensignals führt und das Signal von Fragmentationen deutlich zunimmt. Durch das Anlegen einer positiven Spannung nimmt zwar das Signal des intakten Moleküls ebenfalls ab, aber das Signal von Fragmentationen wird stark verringert (vgl. Abbildung 5.11).

Für andere Moleküle, z.B. IgG, wurde dieser Effekt auf das Ionensignal nicht genauer untersucht und auch nicht ausgenutzt, da keine sonderliche Steigerung des Analytsignals zu beobachten war.

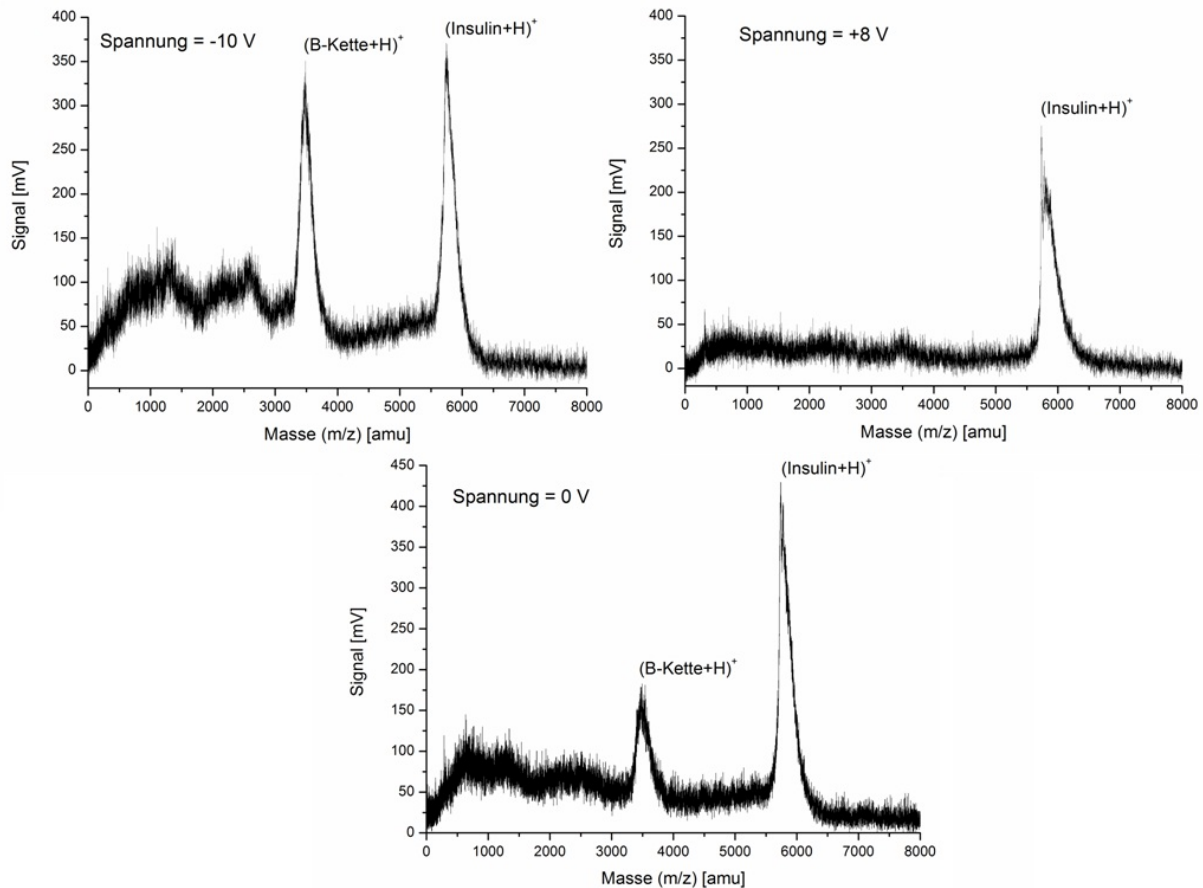


Abbildung 5.11: Vergleich der Massenspektren von Insulin unter Verwendung von DHB als Matrix ($M/A \approx 1:1000$). Ein Effekt von einer an die Probe angelegten Spannung ist eindeutig zu erkennen. Es wurde jeweils über 20 Spektren gemittelt.

5.1.8. Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass sich mit Hilfe von MALDI Biomoleküle desorbieren lassen. Die betrachteten Teilchen erstreckten sich über einen Massenbereich von 500 bis 150.000 amu. Mittels eines Flugzeitmassenspektrometers wurden jeweils die Massenspektren der bei der Desorption entstandenen positiv geladenen Ionen betrachtet. Der Einfluss von für den Desorptionsprozess kritischen Faktoren, z.B. der Fluence, des Matrix-zu-Analyt-Verhältnisses, oder der Präparationstechnik, wurden untersucht. Neben den einfach geladenen intakten Molekülen wurden ebenfalls deren Fragmente und mehrfach geladene Ionen beobachtet. Eine mittlere Geschwindigkeit der Molekülionen konnte zu 510 m/s bestimmt werden – für das Füllen einer Ionenfalle ist die sich daraus resultierende kinetische Energie der Teilchen zu berücksichtigen (vgl. Abschnitt 6.1.2). Inwiefern sich MALDI als Quelle fragiler, thermisch instabiler Moleküle in Materiewelleninterferometern eignet, wird in Abschnitt 6.1.1 diskutiert.

5.2. Laser Desorption und Photoionisation von funktionalisierten Tetraphenylporphyrinen

Das Ziel des in diesem Abschnitt dargestellten Experiments war die Klärung der Frage, ob sich die eigens für die Materiewelleninterferometrie hergestellten perfluoroalkyl-funktionalisierten Porphyrine photoionisieren lassen [26]. Diese Frage wird positiv beantwortet. Daran anschließend stellten sich die Frage nach deren Photoionisationsquerschnitten, sowie der Einfluss der Photoionisation auf eine mögliche Fragmentation der Moleküle. Um diese Fragmentation von derjenigen zu unterscheiden, die aus dem Desorptionsprozess stammt, mussten systematische Messungen durchgeführt werden. Für eine mögliche Anwendung von Laserdesorption als Quelle wurde der produzierte Teilchenstrahl hinsichtlich dessen longitudinaler Geschwindigkeit bestimmt. Es werden der experimentelle Aufbau, die verwendeten Moleküle und die Ergebnisse dargestellt.

5.2.1. Experimentelles Setup und Prozedere

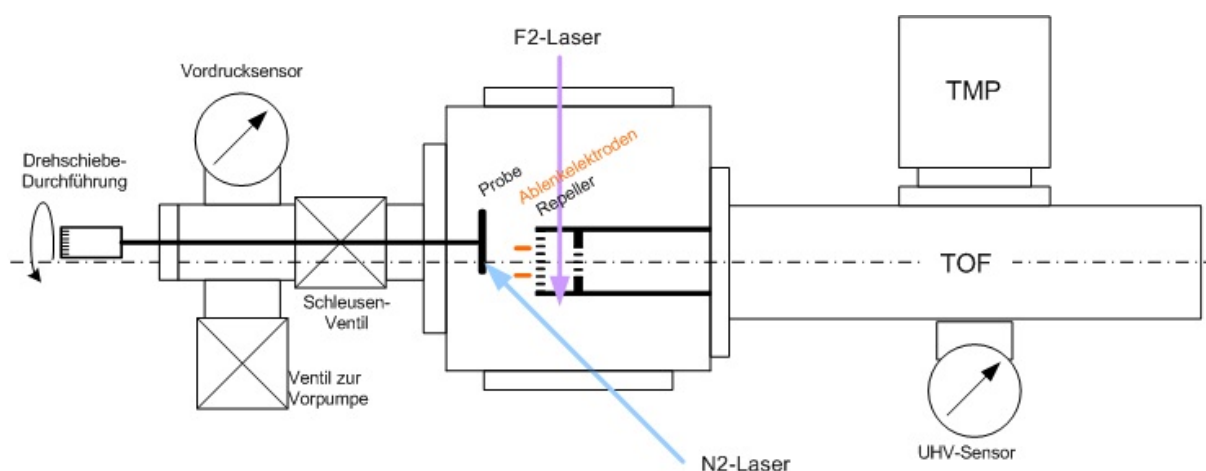


Abbildung 5.12: Experimenteller Aufbau für die Laserdesorption mit anschließender Photoionisation.

Der in Abbildung 5.12 gezeigte experimentelle Aufbau unterscheidet sich nicht wesentlich von dem Aufbau zu MALDI (vgl. Abschnitt 5.1.1). Die Vakuumkammer besteht aus einem Schleusenteil, der Kammer, in der die Desorption mit anschließender Photoionisation stattfindet, und dem TOF. Eine Turbomolekelpumpe sorgt für einen Druck zwischen 10^{-7} mbar und 10^{-8} mbar und das schnelle Wiederherstellen des Vakuums nach dem Tauschen einer Probe. Anstelle der vorderen TMP ist nun ein CaF₂ Fenster für das Eintreten des F₂-Laserstrahles eingebaut, welcher die sich

ausbreitende Teilchenwolke in der Extraktionszone des TOFs, ungefähr 3 mm vom Repeller entfernt, trifft (vgl. Abschnitt 4.3.2).

Zwischen der Probe und dem Repeller wurde 5 mm ober- und unterhalb der Symmetrieachse vom TOF je ein 30 x 10 mm großes Stück Blech aus Edelstahl montiert. Diese fungieren als Ablenkelektroden für die, bei der Desorption erzeugten Ionen und sind vom Rest der Kammer und des TOFs elektrisch isoliert. An sie können Spannungen von bis zu ± 2.500 V angelegt werden³⁰ und somit auch hochenergetisch geladene Teilchen vor einem Eintritt ins TOF abgehalten werden.

Die Probenplatte hat einen Durchmesser von 34 mm, sodass sie gerade noch durch alle Rohre und das Schleusenventil hindurch passt und besteht aus Aluminium oder rostfreiem Edelstahl. Sie kann vorne an die drehbare Lineardurchführung montiert und dadurch etwa 5 cm hinter dem Repeller positioniert werden. Der Strahl des N₂-Lasers trifft die Probe unter einem Winkel von ungefähr 45° an der Stelle, die mit der Achse des TOFs schneidet, wodurch ein maximaler Teilchenfluss gewährleistet wird (vgl. Abschnitt 4.3.1.) Die Lineardurchführung befindet sich selbst nicht auf der Achse des TOFs, wodurch durch Drehen der Probe der maximale Umfang der Probenplatte abgefahren werden kann. Bei der Präparation der Probe ist darauf zu achten, dass sich die Moleküle mehrheitlich auf dieser Spur befinden.

Für die Präparation der Probe wird die Probenplatte gleichmäßig, auch mehrfach, mit einer Moleküllösung benetzt, sodass eine deutlich sichtbare Schicht Moleküle aufgetrocknet wird. Je dicker die Schicht ist, desto länger kann von der Probe Material desorbiert werden.

Timing

Die Messungen laufen nach einer fixen Sequenz ab. Die Wiederholrate ist durch die des N₂-Lasers auf 30 Hz beschränkt. Es wird mit 5 Hz gearbeitet, um ein schnelles Verbrauchen der Probe zu vermeiden. Eine Pulsgeneratorkarte³¹ gibt TTL-Pulse gewünschter Frequenz aus, welche mittels einer Delay-Box³² an den N₂-Laser, den F₂-Laser, das TOF und das Oszilloskop weitergegeben werden. Die Verzögerungszeiten, Höhe und Länge der Pulse sind somit variabel einstellbar. Zur Triggerung des N₂-Lasers werden TTL-Pulse mit einer Länge von ≥ 1 μ s verwendet. Zur Triggerung

³⁰ Stanford Research Systems, Inc. Model PS350

³¹ National Instruments PCI-6221/CB-68LP

³² Berkeley Nucleonics 575-8C Digital Delay Generator

des F₂-Lasers werden ebenfalls TTL-Pulse mit einer Länge von $\geq 2 \mu\text{s}$ verwendet. Eine Verzögerung zwischen der Triggerung des F₂-Lasers und dem tatsächlichen Laserpuls von $3 \mu\text{s}$, welche mit einer Photodiode gemessene wurde, wird berücksichtigt. Mit einer Verzögerung von $40 \mu\text{s} - 3.500 \mu\text{s}$ werden das Schalten des Repellers, sowie das Oszilloskop ebenfalls durch TTL-Pulse mit einer Länge von $\geq 1 \mu\text{s}$ getriggert. In der Abbildung 5.13 ist die Pulsfolge schematisch dargestellt.

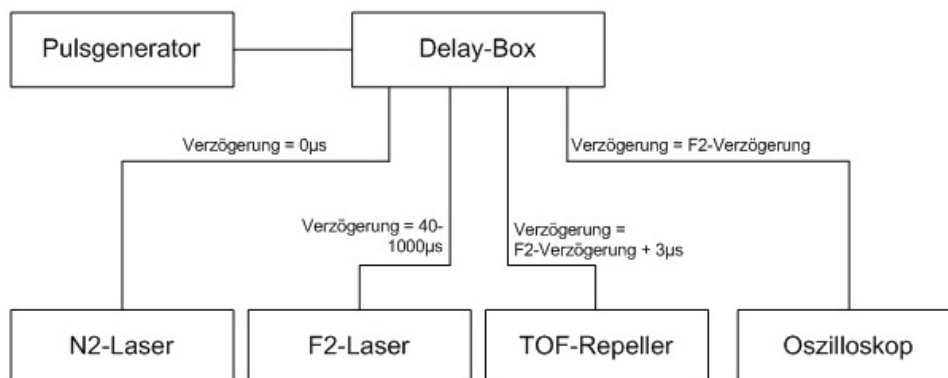


Abbildung 5.13: Schema zur Triggerung der einzelnen im Experiment benötigten Elemente.

Messung

In der Literatur ist erwähnt, dass sich Tetraphenylporphyrine (TPP) ohne Verwendung einer Matrix mit einem gepulsten infraroten CO₂-Laser desorbieren lassen. Dabei entstehen positive und negative Ionen [155], sowie neutrale Moleküle, welche mittels eines ArF- oder Nd:YAG-Lasers (193 bzw. 266 nm) ionisiert werden können [156]. Photoabsorptionsspektren von Porphyrinen lassen darauf schließen, dass eine Desorption durch den von uns eingesetzten N₂-Laser (337 nm) ebenfalls möglich ist [157, 158]. Der von uns eingesetzte F₂-Laser zur Photoionisation (157 nm) liefert Photonen mit Energien (7,9 eV) oberhalb den in [159] bestimmten Ionisationsenergien der Porphyrine (6,3 - 6,5 eV) und lässt eine Einphotonenionisation erwarten (vgl. Abschnitt 2.2).

Die uns von der Forschungsgruppe von Marcel Mayor der Universität Basel zur Verfügung gestellten perfluoroalkyl-funktionalisierten Teilchen besitzen in ihrem Kern ein TPP-Molekül, welches von Fluor-Kohlenstoff-Ketten umgeben ist. Aufgrund der Bindung zwischen Kohlenstoff und Fluor, welche als die stärkste in der organischen Chemie gilt, ist das Molekül als gesamtes sehr stabil. Die Moleküle haben einen zu ihrer Masse relativ hohen Dampfdruck, was deren Laserdesorption begünstigt [26].

Ist die Probenplatte gleichmäßig mit den Molekülen benetzt, so kann durch kontinuierliches Drehen der Probe gleichmäßig Material desorbiert werden. Anders als bei MALDI gibt es hier keine Sweetspots – vielmehr kommt es zu einem gleichmäßigen Abtragen der Probe innerhalb einer Spur. Ist die Abnahme der Signalintensität zu groß, kann durch geringfügiges Wechseln der Spur, weiteres Material desorbiert werden.

Durch ein gleichmäßiges Drehen der Probe und Mitteln über 16 - 128 Spektren können Schwankungen in der Zahl der desorbierten Moleküle von Schuss zu Schuss ausgeglichen werden.

Die verwendeten Moleküle haben eine Masse von 700 - 15.000 amu und lassen sich mit dem MCP gut detektieren. Die gemessenen Signale sind relativ zu den bei MALDI gemessenen hoch (50 - 500 mV) und können auch in die Sättigung gehen, wozu die Spannung des MCPs heruntergedreht werden muss. Aufgrund des Einsatzes von Postphotoionisation, wodurch die Ionen in einem beschränktem Volumen erzeugt werden und daher einen gemeinsamen Startpunkt im Spektrometer haben, lässt sich eine bessere Massenauflösung als bei MALDI mit $m/\Delta m > 70$ erzielen.

Kalibration

Zur Kalibration des Flugzeitmassenspektrometers (vgl. Abschnitt 4.1.4) wurden Toluol und Zink-TPP verwendet (s. Abbildung 5.14 und Abbildung 5.15). Die Struktur des 678 amu schweren Metallotetraphenylporphyrins samt dessen Fragmenten ist bekannt [158]. Das leichtflüchtige Toluol (92,14 amu, IE = 8,3 eV) wird über ein Feinventil in die Vakuumkammer gelassen und ermöglicht, in jedem Spektrum einen Peak zu haben, der als Kontrolle für die Kalibration dient. Die Kalibration ist stark von den verwendeten TOF- und MCP- Spannungen abhängig. Deshalb wird entweder bei jeder Probe eine eigene Kalibration durchgeführt, oder das TOF beim Wechseln der Probe angelassen, sodass sich die Beschleunigungsspannungen nicht ändern. Im zweiten Fall wird nur die Spannung des MCPs heruntergedreht, um bei diesem elektrische Überschlüge zu vermeiden, welche es zerstören würden.

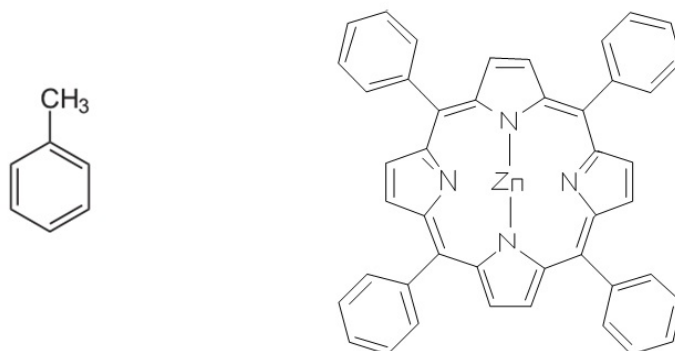


Abbildung 5.14: Strukturformeln von Toluol (links) und Zink-Tetraphenylporphyrin (rechts).

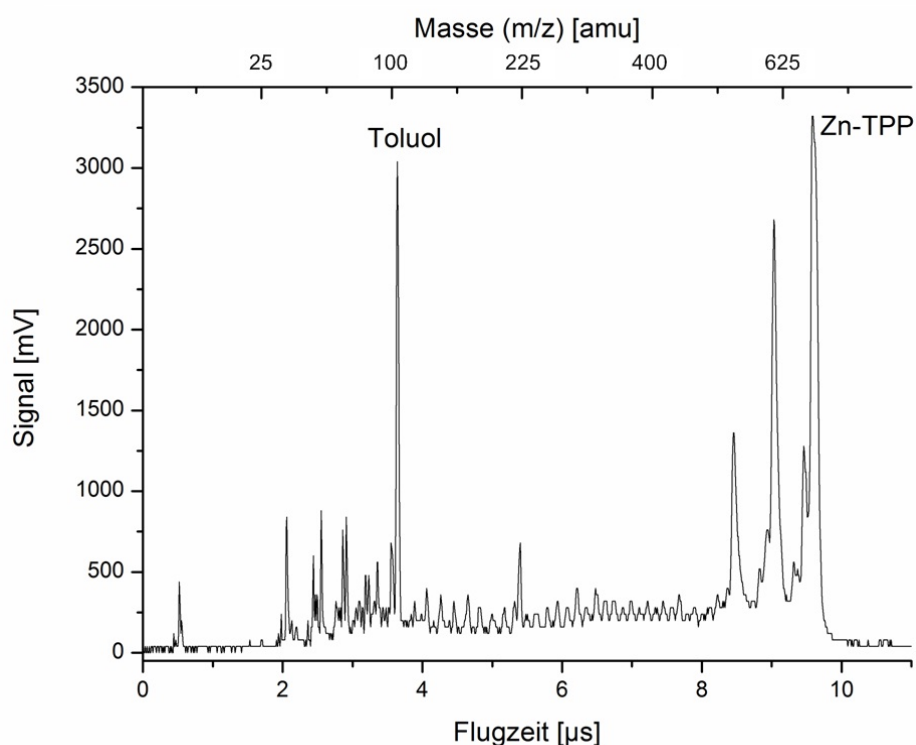


Abbildung 5.15: Flugzeit- und Massenspektrum von laserdesorbierten und postphotoionisierten Toluol und Zn-TPP zur Kalibration der Spektren. Die zwei Fragmentpeaks von Zn-TPP stammen vom Verlust von ein bzw. zwei Phenylresten.

Auswertung

Die durch das digitale Speicheroszilloskop gewonnenen Flugzeitspektren werden in Origin oder Matlab ausgewertet. (siehe Anhang A).

In den Massenspektren sind im unteren Massenbereich Peaks vorhanden, welche keinen Summenformeln zugeordnet wurden. Diese Ionen können durch Photodissoziation und photochemische Prozesse entstanden sein. Ebenfalls werden Restgasmoleküle, z.B. vom Pumpenöl, ionisiert, welche als scharfe Linien in den Spektren erscheinen.

5.2.2. Funktionalisierte Tetraphenylporphyrine

Die Arbeitsgruppe von Marcel Mayor der Universität Basel synthetisiert fluorierte Moleküle, welche sich aufgrund ihrer hohen Stabilität und niedrigen Dampfdrücken besonders für die Materiewelleninterferometrie eignen [26]. Die Abbildung 5.16 zeigt die Strukturformeln der uns zur Verfügung gestellten perfluoroalkyl-funktionalisierten Porphyrine TPPF₈₄, TPPF₁₂₀ und TPPF_{20-x+17*x}. Es handelt sich dabei um meso-Tetraphenylporphyrine, wobei die Wasserstoffatome an den Enden der Phenyl-Ringe (gekennzeichnet durch R) entweder durch je ein Fluoratom oder einen Fluor-Kohlenstoff-Komplex ausgetauscht sind. Ein Schwefelatom dient jeweils zur Bindung eines FC-Komplexes an das m-TPP.

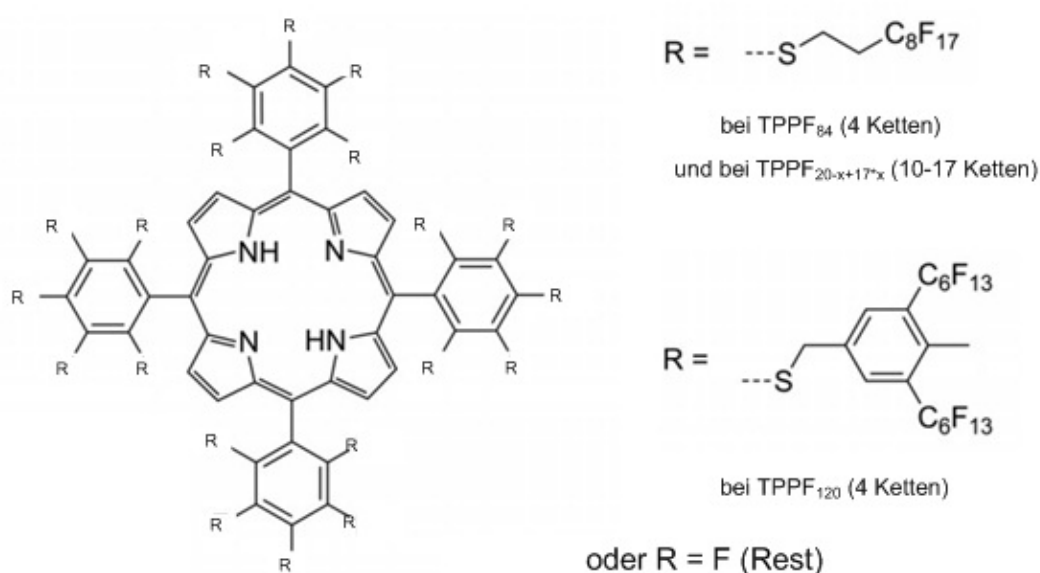


Abbildung 5.16: Strukturformeln von TPPF₈₄, TPPF₁₂₀ und TPPF_{20-x+17*x}. Adaptiert aus [26].

Summenformeln und Molekulargewichte³³

Die Namen der Moleküle ergeben sich aus der Anzahl der in ihnen enthaltenen Fluoratome:

TPPF₈₄: C₈₄H₂₆F₈₄N₄S₄ m = 2.815 amu

TPPF₁₂₀: C₁₂₄H₃₈F₁₂₀N₄S₄ m = 3.991 amu

TPPF_{20-x+17*x}: C₄₄H₁₀F_(20-x)N₄(C₁₀H₄F₁₇S)_x m_{x=14} = 7.417 amu

³³ Berechnet nach <http://www.chemie.fu-berlin.de/cgi-bin/molform> (18.1.2012)

5.2.3. Massenspektren

TPPF₈₄

Es wurden drei Schichten mit jeweils 1 ml einer Aceton/TPPF₈₄-Lösung (3×10^{-4} mol/l) auf die Probenplatte aufgetrocknet und ins Vakuum eingeschleust. Die TOF-Spannungen wurden gemäß Tabelle 4.1 eingestellt (MCP = 1,75 kV). Die Spannungen der Ablenkelektroden betrug ± 65 V und es konnte ohne Nachionisation kein Ionsignal gemessen werden. Die Repetitionsrate betrug 20 Hz, der Durchmesser des Desorptionslaserspots 1 mm und die Fluence 15 mJ/cm². Die Intensität des Postionisationslasers betrug 17 MW/cm² und es wurde eine Verzögerung zwischen Desorption und Ionisation von 300 μ s gewählt, was einer Teilchengeschwindigkeit von 140 m/s entspricht. Es wurde über 16 Schuss gemittelt, die Abbildung 5.17 zeigt das dadurch gewonnene Massenspektrum und die Tabelle 5.4 beinhaltet die Massen der einzelnen Peaks.

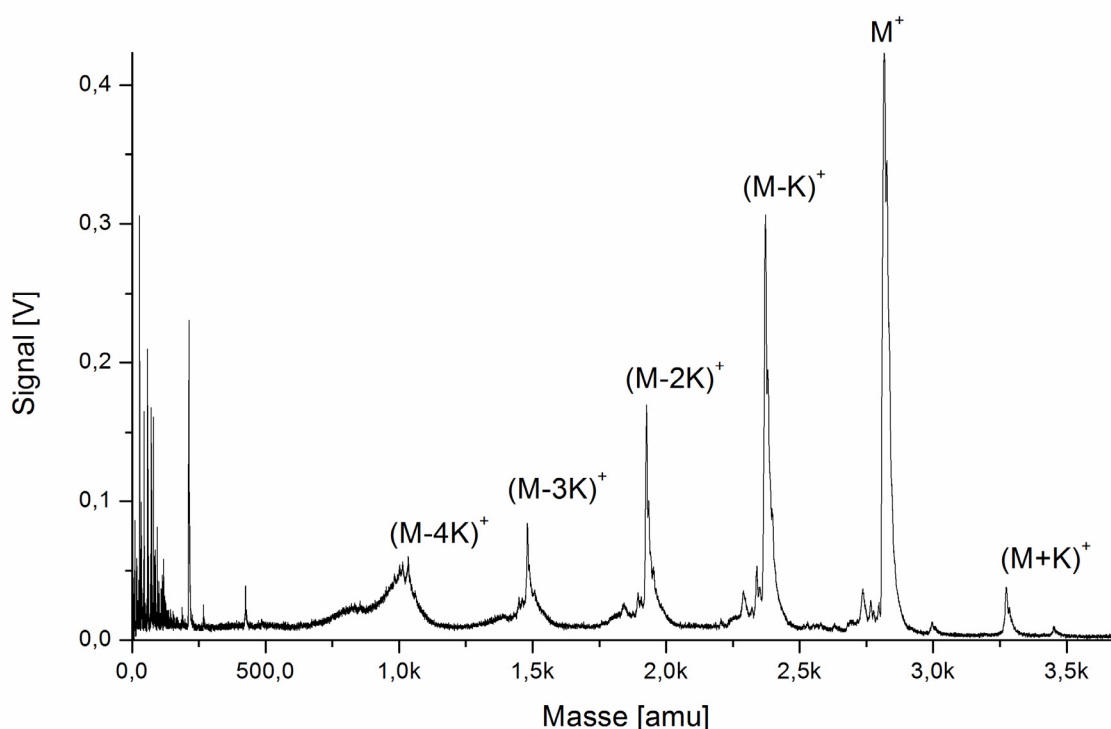


Abbildung 5.17: Massenspektrum von TPPF₈₄

Peak	(M+K) ⁺	M ⁺	(M-K) ⁺	(M-2K) ⁺	(M-3K) ⁺	(M-4K) ⁺
Masse [amu]	3274	2817	2372	1927	1481	1035
Differenz zum vorherigen Peak		-457	-445	-445	-446	-446

Tabelle 5.4: Peakzuordnung des Massenspektrums von TPPF₈₄

Es lässt sich nicht nur das intakte Molekül $[M^+]$ erkennen, sondern auch Fragmente, $(M-xK)^+$ $x=1-4$, und ein Aggregat $(M+K)^+$. Die Fragmente stellen das um jeweils 1,2,3 oder 4 Fluorkomplexe reduzierte $TPPF_{84}$ dar. Ein Fluorkomplex K ($C_{10}H_4F_{17}$) hat eine Masse von 447 amu; d.h. das Schwefelatom bleibt jeweils am fluorierten Phenylring, der Rest bricht ab und wird durch ein Wasserstoffatom ersetzt. Beim Aggregat kommt es zum Anhängen eines zusätzlichen Fluorkomplexes an ein $TPPF_{84}$.

$TPPF_{120}$

Mit denselben Einstellungen wie bei der Messung von $TPPF_{84}$, einer ähnlichen $TPPF_{120}$ /Aceton-Lösung, aber einer Intensität von 3 MW/cm² des F_2 -Lasers, wurde das in Abbildung 5.18 gezeigte Massenspektrum aufgenommen. Die Tabelle 5.5 beinhaltet die Massen der einzelnen Peaks.

Neben dem intakten Molekül lassen sich wiederum Fragmente, $(M-xK)^+$ $x= 1-4$, erkennen, die sich jeweils um die Masse eines Fluorkohlenstoffkomplexes unterscheiden. Ein Fluorkomplex K ($C_{20}H_7F_{26}$) hat eine Masse von 741 amu, d.h. das Schwefelatom bleibt jeweils am fluorierten Phenylring, der Rest bricht ab und wird durch ein Wasserstoffatom ersetzt. Neben diesen Hauptfragmenten treten kleinere Peaks auf, die sich zu ihren jeweils größeren Peaks um ca. 150 amu unterscheiden. Dies entspricht der Masse eines fluorierten Phenylringes R (C_6F_4 , 148 amu). Das würde heißen, dass ein Fluorkohlenstoffkomplex samt des fluorierten Phenylringes abbricht, sich daraufhin der Phenylring löst und sich der nun lose Fluorkomplex wiederum an den Rest des gesamten Moleküls bindet.

Es ist ebenfalls ein Peak mit der Masse 761 amu vorhanden, der dem ganzen Fluorkomplex K' ($C_{20}H_7F_{26}S$, 773 amu) zuzuordnen ist.

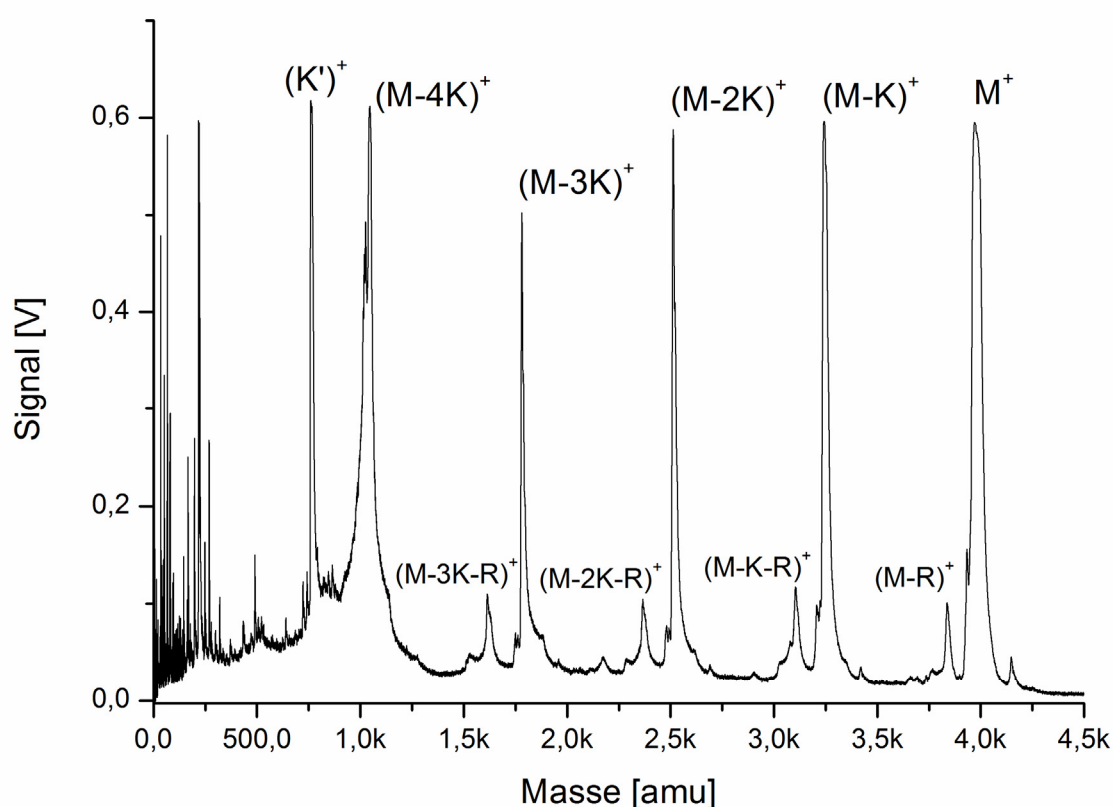


Abbildung 5.18: Massenspektrum von TPPF₁₂₀

Peak	M ⁺	(M-K) ⁺	(M-2K) ⁺	(M-3K) ⁺	(M-4K) ⁺
Masse [amu]	3969	3244	2513	1781	1046
Differenz zum vorherigen Peak		-725	-731	-732	-735
Peak	(M-R) ⁺	(M-K-R) ⁺	(M-2K-R) ⁺	(M-3K-R) ⁺	(K') ⁺
Masse [amu]	3837	3104	2366	1614	761
Differenz zum Peak oberhalb	-132	-140	-147	-167	-285

Tabelle 5.5: Peakzuordnung des Massenspektrums von TPPF₁₂₀

TPPF_{20-x+17*x}

Die Abbildung 5.19 zeigt das Massenspektrum von TPPF_{20-x+17*x}. Die Einstellungen entsprechen denselben wie bei den Messungen von TPPF₁₂₀. Die Moleküle wurden zu einer Konzentration von ca. 7×10^{-4} mol/l in Ether gelöst. Die Tabelle 5.6 beinhaltet die Massen der einzelnen Peaks. Die mit 10 - 17 gekennzeichneten Peaks entsprechen den TPP-Derivaten mit jeweils 10 - 17 Fluorkohlenstoffkomplexen. Sie unterscheiden sich um eine Masse von 458 ± 15 amu, was einem Fluorkomplex weniger

einem Fluoratom entspricht ($C_{10}H_4F_{17}S$ minus F, 460 amu). Die Fragmente, welche durch F1 - F10 gekennzeichnet sind, unterscheiden sich jeweils um 472 ± 40 amu, was einem Fluorkomplex entspricht ($C_{10}H_4F_{17}S$, 479 amu). Das heißt, dass sich Fluorkomplexe von den intakten Molekülen lösen und clustern. Das Fragment F13 entspricht einem Fluorkomplex ($C_{10}H_4F_{17}S$, 479 amu). Die Fragmente F11, F12 und F14 konnten keiner Summenformel zugeordnet werden.

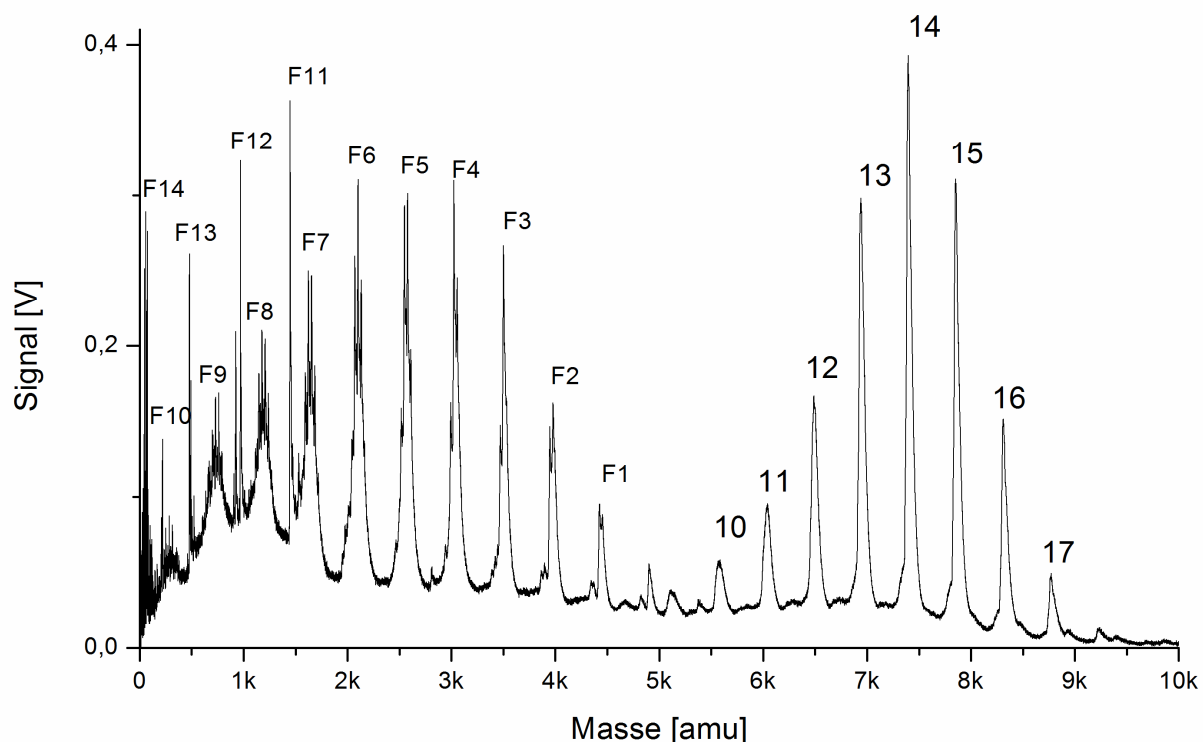


Abbildung 5.19: Massenspektrum von $TPPF_{20-x+17*x}$ $x=10-17$

Peak	17	16	15	14	13	12	11	10
Masse [amu]	8774	8310	7853	7398	6942	6488	6044	5572
Differenz zum vorherigen Peak		-464	-457	-455	-456	-454	-444	-472
Peak	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Masse [amu]	4425	3977	3502	3024	2578	2101	1624	1178
Differenz zum vorherigen Peak		-448	-475	-478	-446	-477	-477	-446
Peak	F9	F10		F11	F12	F13	F14	
Masse [amu]	731	219		1448	971	480	57	
Differenz zum vorherigen Peak	-447	-512						

Tabelle 5.6: Peakzuordnung des Massenspektrums von $TPPF_{20-x+17*x}$

5.2.4. Geschwindigkeitsverteilungen

Von denselben Molekülen, TPPF₈₄, TPPF₁₂₀ und TPPF_{20-x+17*x}, und mit denselben Einstellungen wie oben (vgl. 5.2.3), wurden die Geschwindigkeitsverteilungen aufgenommen, welche aus den Laserdesorptionsprozessen resultieren. Die Variable im Experiment stellt nun die Verzögerung zwischen der Desorption und der Photoionisation der Moleküle dar. Die Abbildung 5.20, Abbildung 5.21 und Abbildung 5.22 zeigen die gewonnenen Verteilungen. Die Datenpunkte wurden mit einer Maxwell-Boltzmann-Verteilung gemäß Formel 7 gefittet [153, 154]. Die Tabelle 5.7 stellt zusammenfassend die Charakteristika der Geschwindigkeitsverteilungen dar. Die freien Fitparameter waren A und T.

$$I(v) = A \cdot 4\pi \cdot \left(\frac{m}{2\pi \cdot k_B \cdot T} \right)^{3/2} \cdot v^2 \cdot \exp\left(-\frac{m \cdot v^2}{2k_B \cdot T} \right) \quad \text{Formel 7}$$

Molekül	Masse [amu]	T [K]	A	v _{max} [m/s]	v _{FWHM} [m/s]
TPPF ₈₄	2815	6300	0,5	190 ± 25	230
TPPF ₁₂₀	3991	5900	0,7	160 ± 20	180
TPPF ₂₄₄	7415	11700	0,8	160 ± 20	180

Tabelle 5.7: Fitparameter, maximale Geschwindigkeit und Halbwertsbreite der Geschwindigkeitsverteilung von TPPF₈₄, TPPF₁₂₀ und TPPF_{20-x+17*x} (x=14)

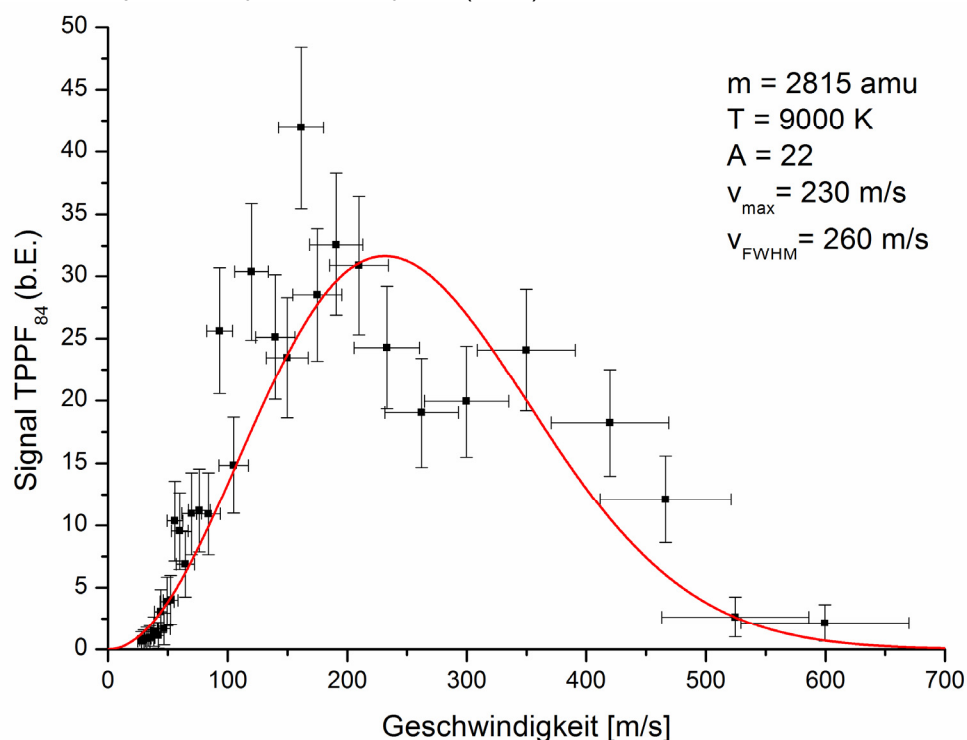


Abbildung 5.20: Geschwindigkeitsverteilung von TPPF₈₄. Fit gemäß Formel 7. Die maximale Geschwindigkeit ist grün eingezeichnet.

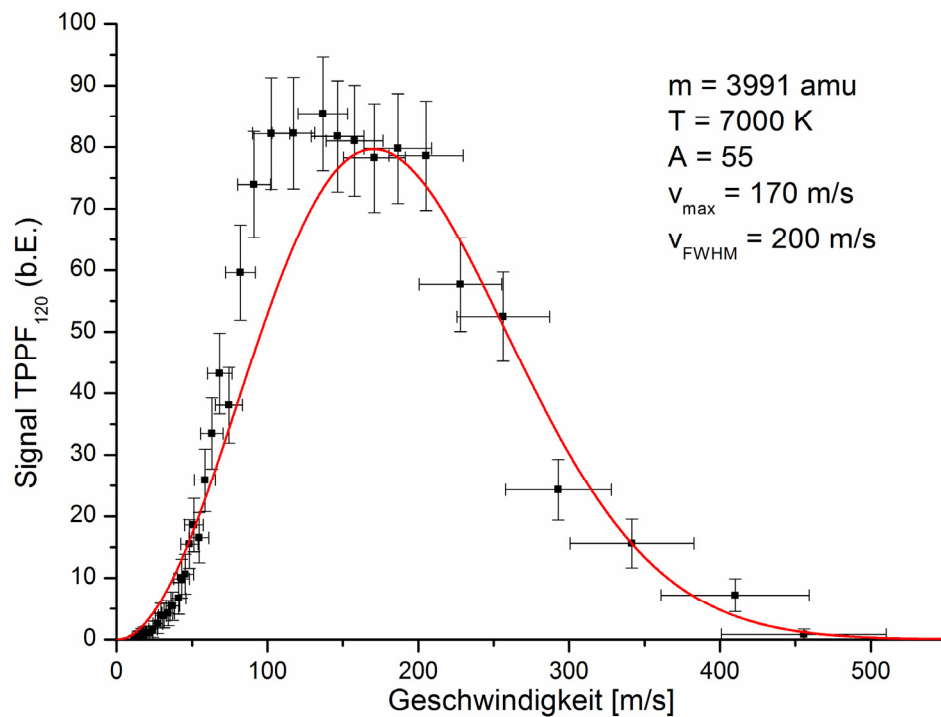


Abbildung 5.21: Geschwindigkeitsverteilung von TPPF_{120} . Fit gemäß Formel 7. Die maximale Geschwindigkeit ist grün eingezeichnet.

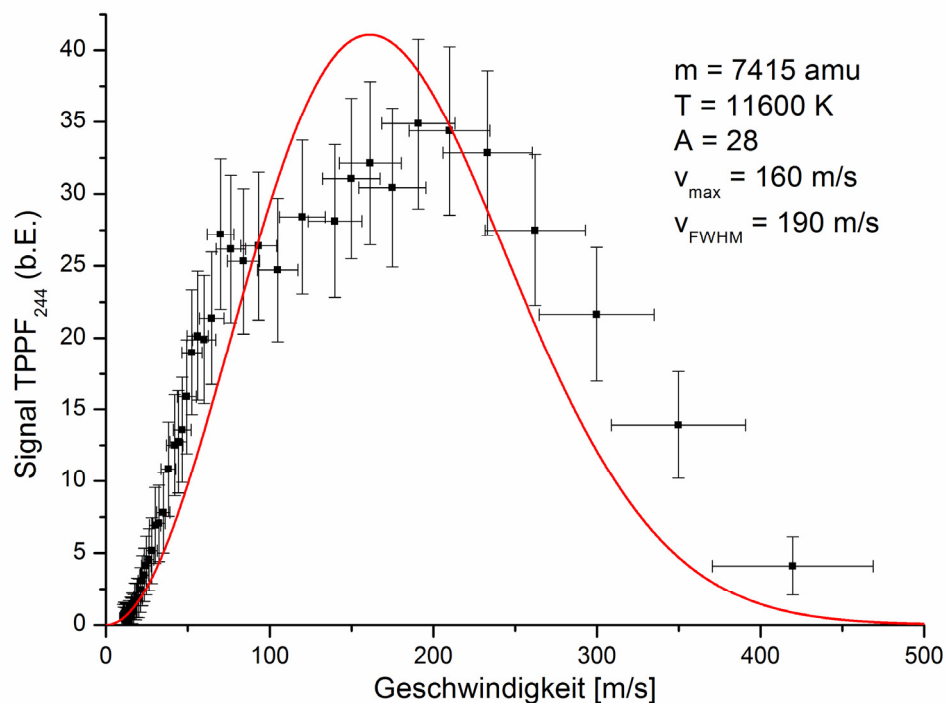


Abbildung 5.22: Geschwindigkeitsverteilung von $\text{TPPF}_{20-x+17 \cdot x}$ $x=14$. Fit gemäß Formel 7. Die maximale Geschwindigkeit ist grün eingezeichnet.

5.2.5. Bestimmung von Photoionisationsquerschnitten

Eine Möglichkeit Photoionisationsquerschnitte von Molekülen zu bestimmen, ist, das Ionensignal in Abhängigkeit der Intensität des Ionisationslasers zu messen und die Datenpunkte gemäß der Formel 8 für Einphotonenionisation zu fitten (vgl. [160]). Der Querschnitt kann als Fitparameter extrahiert werden.

$$S(E_L) = A \cdot \left(1 - \exp \left(-\sigma_1 \cdot \frac{E_L}{h\nu \cdot F} \right) \right) \quad \text{Formel 8}$$

Die Abbildung 5.23 zeigt das Ionensignal von TPPF₁₂₀ und dessen Fragmenten (vgl. Seite 82) in Abhängigkeit der Energie des F₂-Lasers. Der große Sprung von 700 µJ auf 1200 µJ ist durch die Ansteuerungssoftware des Lasers bedingt. Es ist zu erkennen, dass sich alle Signale im Wesentlichen gleich verhalten. Die Ionensignale M⁺ und (M-1K)⁺ erreichen ein Maximum und nehmen bei höherer Laserintensität wieder ab, was als Anzeichen für eine photoinduzierte Fragmentation gilt. Bei den Signalen (M-2K)⁺ und (M-3K)⁺ ist bei noch höherer Laserintensität ebenfalls ein Maximum und ein wieder Abnehmen zu erwarten. Ionisation und Fragmentation sind demnach zwei konkurrierende Prozesse.

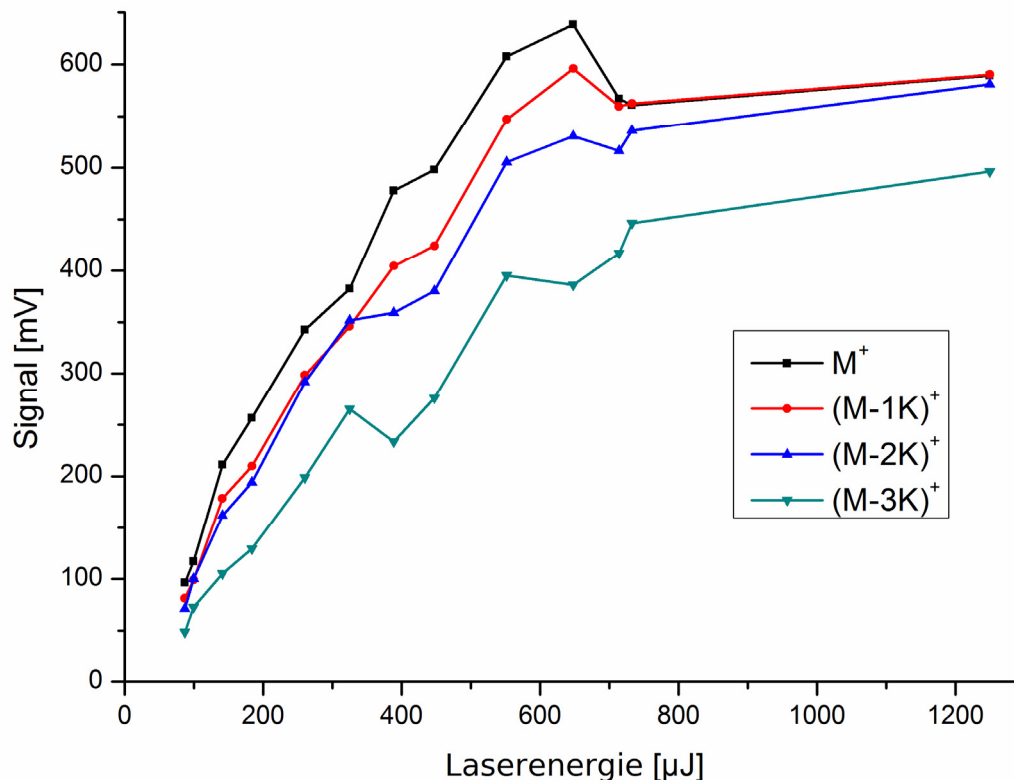


Abbildung 5.23: Gemessenes Signal von TPPF₁₂₀ mit unterschiedlich vielen Fluor-Ketten in Abhängigkeit von der Energie des Postionisationslasers. (Für die Peakzuordnung vgl. Abbildung 5.18)

Die Abbildung 5.24 zeigt noch einmal die Abhängigkeit des Ionensignals des intakten TPPF₁₂₀ und dessen Fragmenten– diesmal mit Messfehlerbalken und den Fits gemäß Formel 8. Die angegebenen Fehler in x-Richtung stammen aus der ungenauen Kenntnis der Laserenergie, im Speziellen der Verluste aufgrund der N₂-Spülung, der Linse, des Fensters und des Vakuums. Unter der Annahme, dass die gemessenen Signalthöhen einer Poisson-Verteilung genügen, wurden die Fehler in y-Richtung mit der Wurzel aus dem Signal abgeschätzt.

Durch das Fitten lässt sich der Ionisationsquerschnitt von TPPF₁₂₀ bei 157 nm Licht bestimmen: $\sigma = 1,33 \pm 1 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$. Der Fehler ergibt sich aus der besagten Energie und der Fläche des Laserspots (vgl. Abschnitt 4.3.2). Die Ionisationsquerschnitte der Fragmente sind in Tabelle 5.8 aufgelistet.

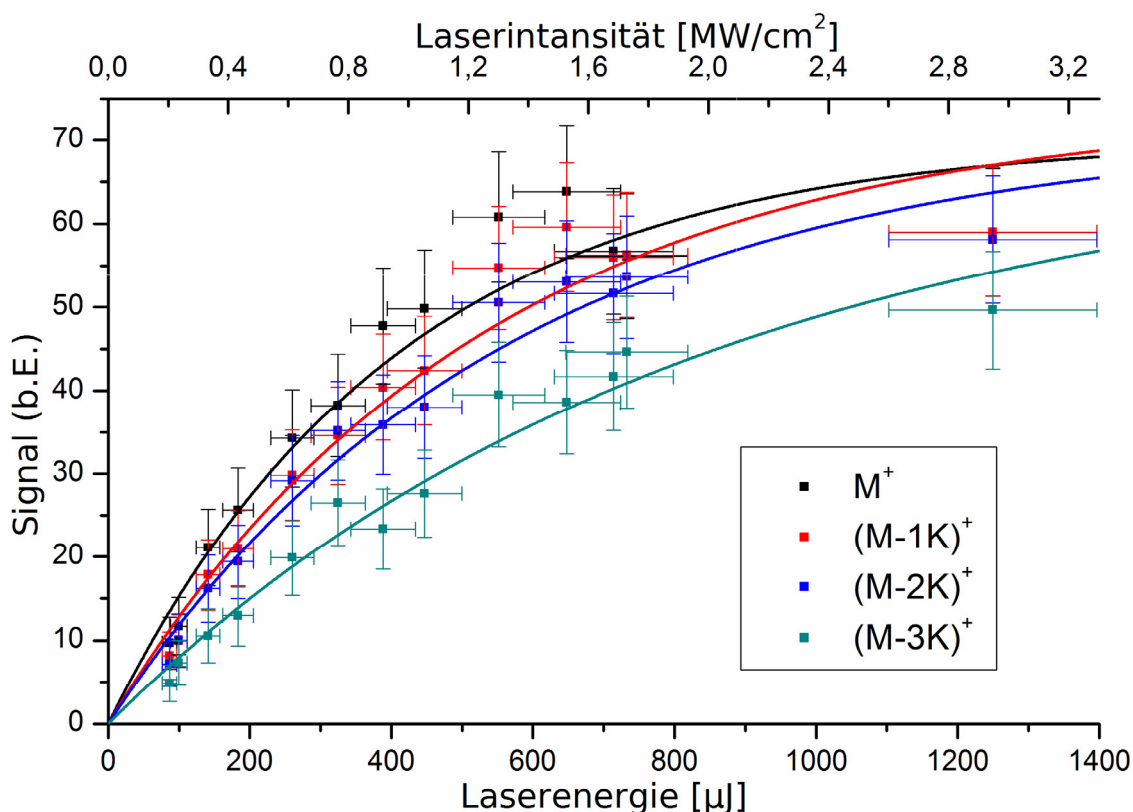


Abbildung 5.24: Ionensignal von TPPF₁₂₀ und dessen Fragmenten in Abhängigkeit der Intensität des VUV (157nm) Lasers. Die gezogenen Kurven stellen Fits gemäß Formel 8 dar. (Für die Peakzuordnung vgl. Abbildung 5.18)

Fluorketten	σ [10^{-16} cm^2]	$\Delta\sigma$ [10^{-16} cm^2]
M	1,33	0,9
M-K	1,03	0,7
M-2K	0,98	0,65
M-3K	0,66	0,55

Tabelle 5.8: Ionisationsquerschnitte von TPPF₁₂₀ und dessen Fragmenten.

Die Abbildung 5.25 und Abbildung 5.26 zeigen die PI-Abhängigkeit von $\text{TPPF}_{20-x+17 \cdot x}$ mit $x = 10 - 17$. Zu erkennen ist eine unterschiedliche Häufigkeit der Derivate in der Probe. Die mittels der Fits erhaltenen Photoionisationsquerschnitte der Moleküle sind in Tabelle 5.9 aufgelistet.³⁴

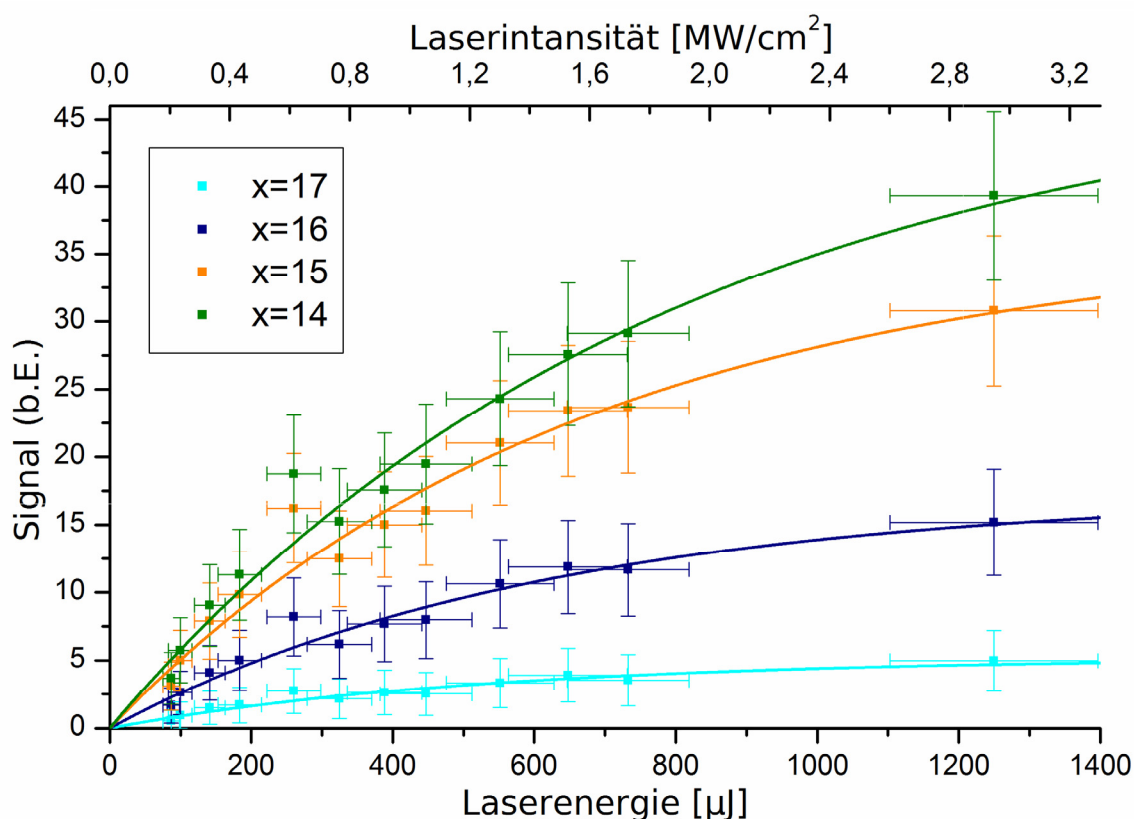


Abbildung 5.25: Gemessenes Signal von $\text{TPPF}_{20-x+17 \cdot x}$ mit unterschiedlich vielen Fluor-Ketten ($x=14-17$) in Abhängigkeit von der Energie des Postionisationslasers. Die vollen Kurven entsprechen Fits gemäß Formel 8. (Für die Peakzuordnung vgl. Abbildung 5.19)

Fluorketten	σ [10^{-16} cm^2]	$\Delta\sigma$ [10^{-16} cm^2]	Fluorketten	σ [10^{-16} cm^2]	$\Delta\sigma$ [10^{-16} cm^2]
17	1,00	0,70	13	0,50	0,50
16	0,90	0,65	12	0,10	0,40
15	0,80	0,60	11	0,0005	0,45
14	0,70	0,60	10	0,0004	0,60

Tabelle 5.9: Ionisationsquerschnitte von $\text{TPPF}_{20-x+17 \cdot x}$ mit unterschiedlicher Anzahl von Fluor-Ketten ($x=10-17$).

³⁴ Die Fehler ergeben sich wie bei den obigen Messungen von TPP_{120} aus der ungenauen Kenntnis der Pulsenergie und der Spotgröße des Ionisationslasers.

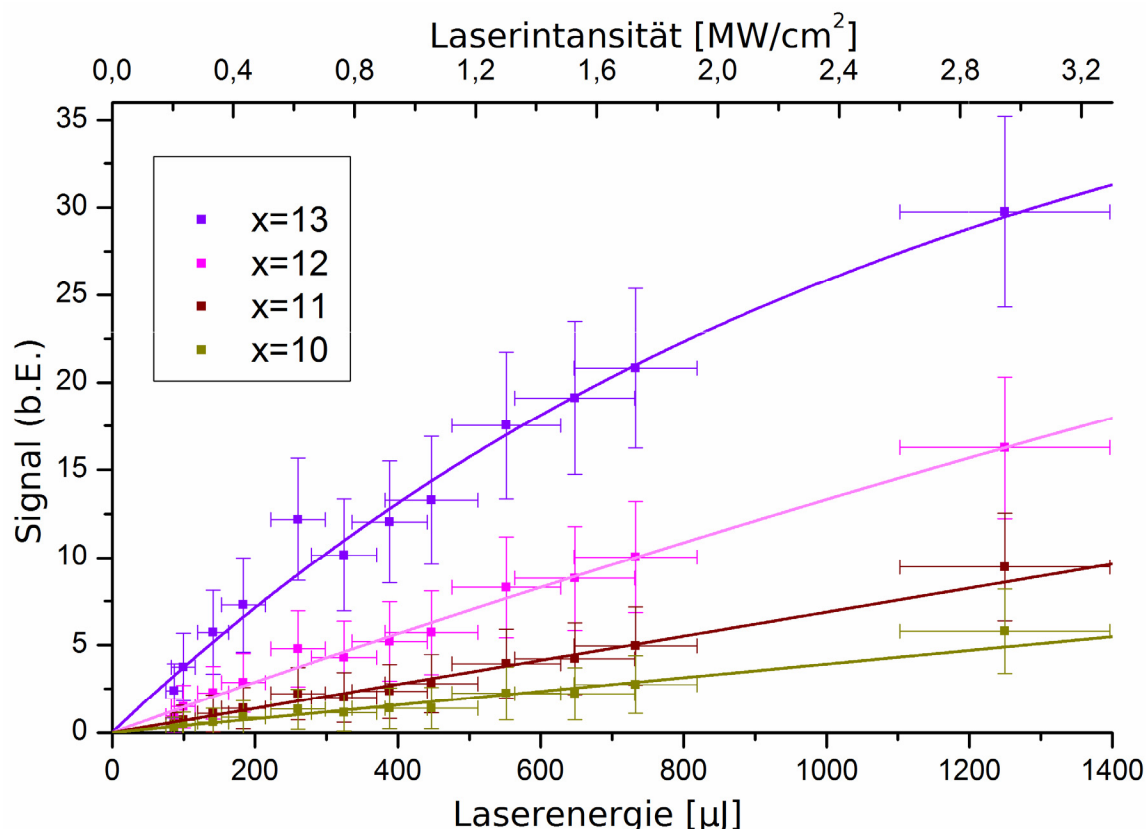


Abbildung 5.26: Gemessenes Signal von $\text{TPPF}_{20-x+17*x}$ mit unterschiedlich vielen Fluor-Ketten ($x=13-10$) in Abhängigkeit von der Energie des Positionisationslasers. Die vollen Kurven entsprechen Fits gemäß Formel 8. (Für die Peakzuordnung vgl. Abbildung 5.19)

5.2.6. Fragmentationsverhalten

Die gemessenen Massenspektren von TPPF_{84} , TPPF_{120} und $\text{TPPF}_{20-x+17*x}$ beinhalten neben dem jeweils intakten Molekül auch Fragmentente. Ursprünglich sind auf dem Probenhalter hauptsächlich intakte Moleküle vorhanden. Dies lässt sich aufgrund von Massenspektren sagen, welche mittels eines kommerziellen Massenspektrometers aufgenommen wurden³⁵. Es kann zwei Quellen geben, die zu einer Fragmentation führen: Den Desorptions- und den Photoionisationsprozess. In den folgenden Abschnitten wird der Einfluss jeweils einer dieser Quellen auf das Fragmentationsverhalten untersucht.

Fragmentation in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Abbildung 5.27 zeigt die relative Häufigkeiten der Fragmente des Moleküls TPPF_{84} in den Massenspektren zu unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Die Intensität des Nachionisationslasers beträgt ca. 1 MW/cm^2 und die Desorptionsfluence 18

³⁵ Zur Verfügung gestellt von Marcel Mayor und Jens Tüxen der Universität Basel. (Voyager™)

mJ/cm^2 . Es lässt sich erkennen, dass bei niedrigen Geschwindigkeiten beginnend, zu höheren Geschwindigkeiten hin, die Häufigkeit von Fragmenten zunimmt.

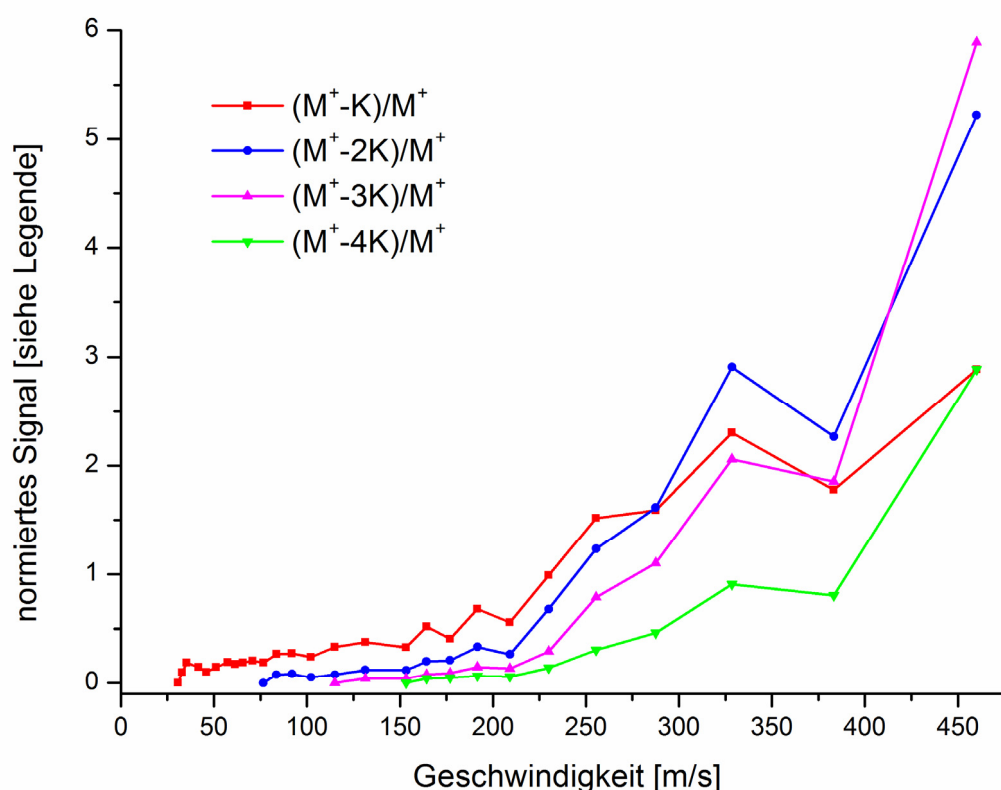


Abbildung 5.27: Verhältnis des Ionensignals der vier Fragmente von TPPF84 (M^+) zum Ionensignal des intakten Moleküls in Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Teilchenwolke. Bei den Fragmenten fehlt jeweils eine bis vier Fluorketten (K). Fehler werden hier insofern nicht berücksichtigt, als das qualitative Verhalten im Fokus steht. (Für die Peakzuordnung vgl. Abbildung 5.17)

Während bei niedrigen Geschwindigkeiten das Signal des um einen Fluorkomplex reduzierten TPPF₈₄-Moleküls überwiegt, nehmen die Signale des um zwei, drei und vier Fluorkomplexe reduzierten TPPF₈₄ bei höheren Geschwindigkeiten zu. Bei der höchsten gemessenen Geschwindigkeit ist das Signal des um drei Komplexe reduzierten Moleküls das höchste. Ab einer Geschwindigkeit von ca. 230 m/s überwiegen die Signale der Fragmente, das Signal des intakten Moleküls.

In der Abbildung 5.28 sind die Geschwindigkeitsverteilungen von TPPF₈₄ und dessen Fragmenten gezeigt. Es lässt sich erkennen, dass die Fragmente allgemein schneller sind als das intakte Molekül. Dies drückt noch mal den in der Abbildung 5.27 dargestellten Sachverhalt aus, dass bei höheren Geschwindigkeiten die Fragmente überwiegen. In der Tabelle 5.10 sind die Charakteristiken der einzelnen Geschwindigkeitsverteilungen aufgeführt.

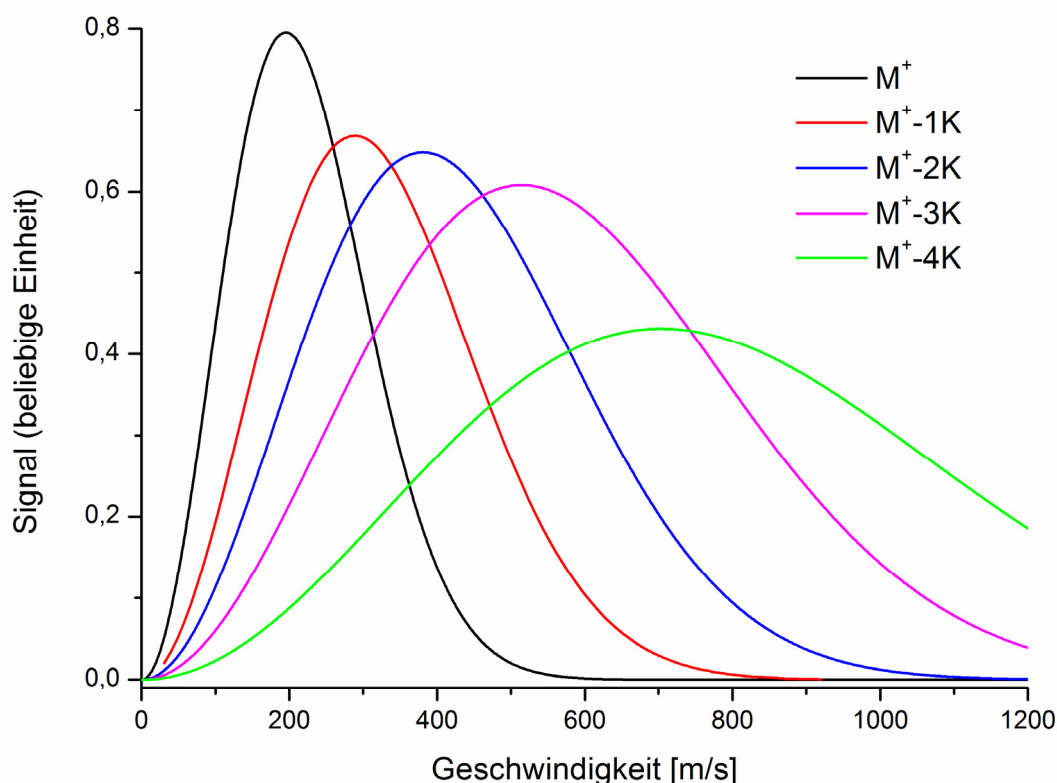


Abbildung 5.28: Geschwindigkeitsverteilungen von TPPF_{84} und dessen Fragmenten. Die Datenpunkte werden der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt und sind gemäß Formel 7 gefittet. (Für die Peakzuordnung vgl. Abbildung 5.17)

Peak	Masse [amu]	Geschwindigkeit [m/s]	kinetische Energie [eV]	Temperatur [K]
M	2815	196	0,56	6504
M-K	2369	291	1,04	12066
M-2K	1923	381	1,45	16789
M-3K	1477	514	2,02	23470
M-4K	1031	703	2,64	30646

Tabelle 5.10: Wahrscheinlichste Geschwindigkeiten, kinetische Energien und Temperaturen der in Abbildung 5.28 dargestellten Maxwell-Boltzmann-Verteilungen.

Angenommen es herrscht anfänglich während des Laserpulses ein thermisches Gleichgewicht und die Moleküle liegen auf der Probenplatte sowohl in intakter wie auch in fragmentierter Form vor, so würden alle Moleküle nach der Desorption dieselbe kinetische Energie besitzen. Das um vier Fluorkomplexe reduzierte Fragment besitzt allerdings eine ca. 5mal so hohe kinetische Energie wie das intakte Molekül. Durch den Laserpuls und den Expansionsprozess, entstehen also „unterschiedlich heiße“ Moleküle, d.h. mit unterschiedlich internen Energien. Dabei bleiben die kälteren intakt und die heißeren fragmentieren. Die Laserdesorption kann demnach für das Entstehen von Fragmentation verantwortlich gemacht werden.

Fragmentation in Abhängigkeit der Intensität des Desorptionslasers

Es wurde untersucht wie sich die Massenspektren von TPPF₈₄ mit Zu- und Abnahme der Fluence vom Desorptionslaser ändern. Die Variable in diesem Experiment stellt die Spotgröße des Desorptionslasers dar – die Energie wurde konstant auf 120 µJ gehalten (vgl. Abschnitt 4.3.1).

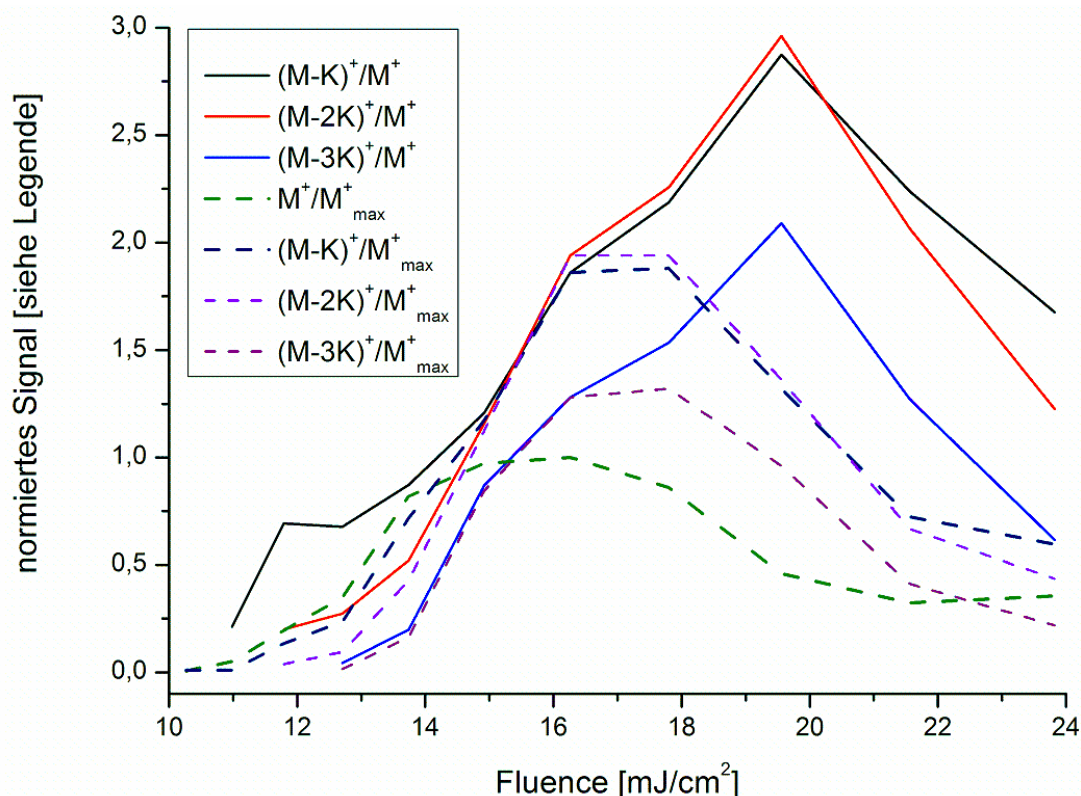


Abbildung 5.29: Relative Signale von postphotoionisiertem TPPF₈₄ (M^+) in Abhängigkeit der Stärke des Desorptionslasers. Die vier gestrichelten Kurven geben das Signal des intakten Moleküls, sowie dessen drei Fragmenten an, bei denen jeweils eine, zwei oder drei Fluorketten (K) fehlen. Zur Vergleichbarkeit sind die Signale auf den maximal gemessenen Wert des intakten Moleküls normiert. Die vollen Linien geben jeweils das Signal des um eine, zwei oder drei Fluorketten reduzierten Moleküls im Verhältnis zum intakten Molekül an. Die Energie des Photoionisationslasers beträgt 12 kV. Das Delay ist 100 µs. (Für die Peakzuordnung vgl. Abbildung 5.17)

Die Abbildung 5.29 zeigt bei einer Intensität von ca. 0,6 MW/cm² des Ionisationslasers und einer Geschwindigkeit der Teilchenwolke von ca. 400 m/s die Abhängigkeit des Ionensignals von der Fluence des Desorptionslasers (für Details siehe Bildunterschrift). Es ist allgemein festzustellen, dass ein Optimum für die Desorption existiert, welches für das intakte Molekül und dessen Fragmente gleich ist und bei einem Durchmesser des Spots des Desorptionslasers von 970 µm bei ca. 16 mJ/cm² liegt. Weiters ist zu erkennen, dass der Bereich der Fluence, wo überhaupt ein Ionensignal zu erkennen ist, auf grob 10 - 24 mJ/cm² eingeschränkt ist, wobei am unteren Ende ein größerer Anstieg als am oberen Ende ein Abfall des Ionensignals stattfindet. Das

Überwiegen der Fragmente gegenüber dem intakten Molekül ist auf die betrachtete hohe Geschwindigkeit der Teilchenwolke zurückzuführen. Bei einer niedrigen Fluence ist allerdings auch ein geringes Überwiegen des intakten Moleküls zu erkennen.

Die Verhältnisse der Fragmentsignale zum Signal des intakten TPPF₈₄ (in der Abbildung 5.29 durch volle Linien dargestellt) nehmen mit steigender Fluence zu. Bis zu einer Fluence von ca. 14 mJ/cm² überwiegt das intakte Molekül. Bei einer Fluence von ca. 19 mJ/cm² sind die Signale der Fragmente 2 bzw. 3mal höher als das intakte TPPF₈₄.

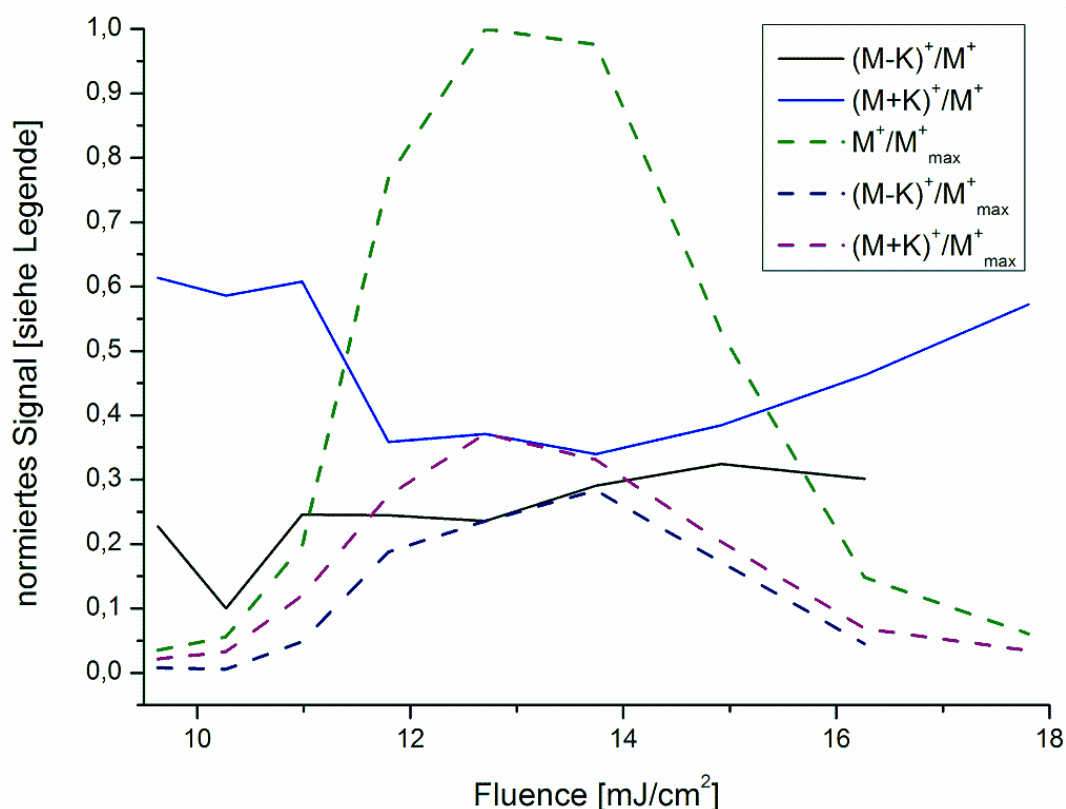


Abbildung 5.30: Relative Signale von bereits bei der Desorption ionisiertem TPPF₈₄ (M_+) in Abhängigkeit der Stärke des Desorptionslasers. Die drei gestrichelten Kurven geben das Signal des intakten Moleküls, des um eine Fluorkette (K) reduzierten Moleküls und des um eine Fluorkette ergänzten Moleküls an. Zur Vergleichbarkeit sind die Signale auf den maximal gemessenen Wert des intakten Moleküls normiert. Die vollen Linien geben jeweils das Signal des um eine Fluorkette reduzierten bzw. ergänzten Moleküls im Verhältnis zum intakten Molekül an. Das Delay ist 200 μ s. (Für die Peakzuordnung vgl. Abbildung 5.17)

Die Abbildung 5.30 zeigt dasselbe wie Abbildung 5.29 – allerdings ohne Nachionisation und ohne Spannung an den Ablenkelektroden, d.h. die direkt bei der Desorption erzeugten Ionen. Es ist wiederum ein Optimum der Fluence zu erkennen, das nun aber niedriger bei ca. 13 mJ/cm² und bei einem Spotdurchmesser von ca. 1,1 mm liegt. Das Signal des intakten Moleküls überwiegt im gesamten Bereich der Fluence, was auf die betrachtete Geschwindigkeit von 250 m/s zurückzuführen ist (vgl. Seite

90). Im Optimum der Fluence ist das Signal des intakten Moleküls dreimal so groß wie die der fragmentierten Moleküle. Die Verhältnisse zwischen intaktem Molekül und Fragmenten bleibt annähernd konstant. Werden Teilchen mit einer Geschwindigkeit von 400 m/s betrachtet, liegt das Optimum ebenfalls bei ca. 13 mJ/cm^2 und die Signale der Fragmente sind, wie bei der oben besprochenen Laserdesorption mit anschließender Photoionisation, deutlicher ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

Ebenfalls erwähnenswert ist, dass die absolut gemessenen Signale der postionisierten Moleküle allgemein viel höher sind als die der direkt bei der Desorption erzeugten Ionen (Daten nicht gezeigt). Bei einer Geschwindigkeit der Teilchen von 250 m/s ist das maximale Signal der direkt bei der Desorption entstandenen intakten TPPF₈₄-Ionen 100 mV, während bei mit 2 MW/cm^2 nachionisierten Molekülen das maximale Signal über 3,5 V liegt (bei sonst gleichen Einstellungen). Das Signal des intakten Moleküls ist jeweils auch das im Spektrum überwiegende Signal. Dies ist insofern beträchtlich, als dass aufgrund des beschränkten Volumens des PI-Lasers nur ein kleiner Teil der ganzen Teilchenwolke photoionisiert wird. Es lässt sich deshalb einerseits auf eine effiziente Nachionisation und andererseits darauf schließen, dass viel mehr neutrale Moleküle als Ionen desorbiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Die Desorption verursacht Fragmentation und zwar abhängig von der Fluence. Die Fluence, bei der am meisten Teilchen desorbiert werden, liegt im Fall für nachionisierte neutrale Moleküle höher, als für direkt bei der Desorption erzeugte Ionen und ist, zumindest fast, unabhängig von der betrachteten Geschwindigkeitsklasse der Teilchenwolke. Im unteren Bereich der Fluence kommt es, zumindest bei der Laserdesorption mit anschließender Photoionisation, zu einem geringeren Anteil von fragmentierten Molekülen im Massenspektrum, während bei höheren Fluences, Fragmente das Spektrum überwiegen. Die Nachionisation funktioniert sehr effizient und/oder es werden im Vergleich zu Ionen übermäßig viele neutrale Moleküle desorbiert.

Fragmentation bei der Photoionisation

Um den Einfluss des Ionisationslasers auf die Fragmentation von desorbierten Molekülen zu untersuchen, wurde die Energie des Ionisationspulses, bei gleicher Desorptionsfluence und Geschwindigkeit der Teilchen, variiert und die erhaltenen Massenspektren ausgewertet. Als Testmolekül wurde TPPF_{20-x+17*x} ($x=17-10$) verwendet. Der

Durchmesser des Desorptionslaserspots betrug 1 mm, die Desorptionsfluence 14,9 mJ/cm² und die Verzögerung zwischen Desorption und Ionisation 300 µs, entsprechend einer Teilchengeschwindigkeit von ca. 140 m/s.

Die Abbildung 5.31 zeigt die relative Häufigkeit der Moleküle mit unterschiedlich vielen Fluorkomplexen in Abhängigkeit des F₂-Lasers.

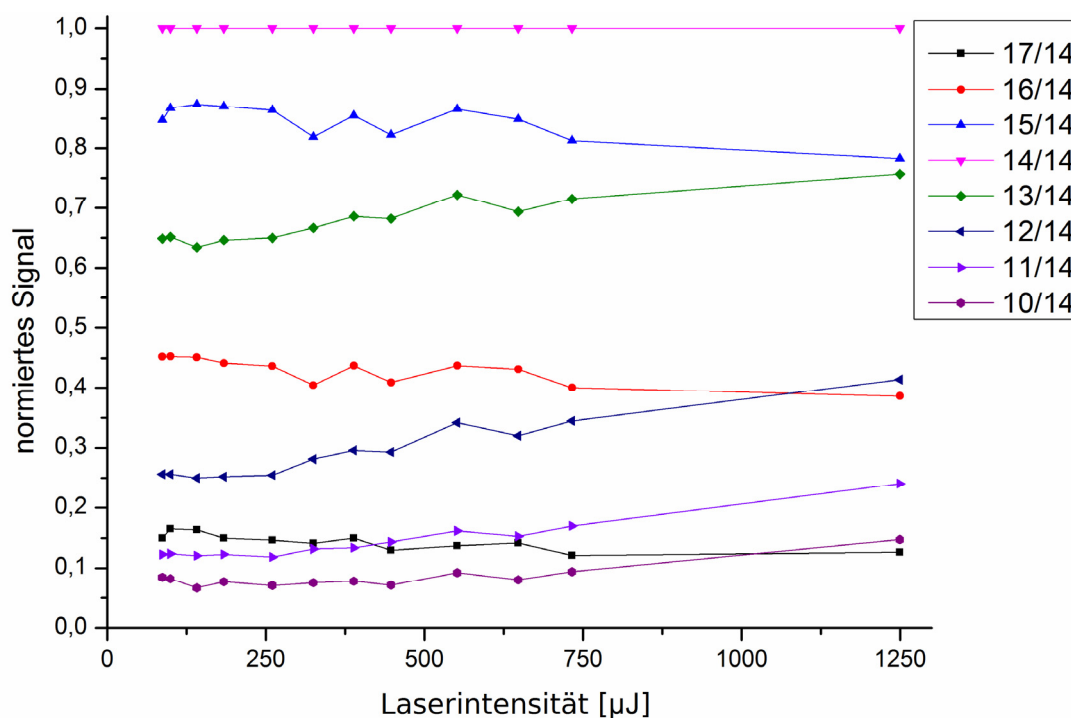


Abbildung 5.31: Vorhandensein der einzelnen Hauptpeaks (17-10) von postphotoionisiertem TPPF_{20-x+17*x} (x=17-10) in Abhängigkeit der Stärke des Postionisationslasers. Es wird jeweils das Verhältnis zum Signal des intakten Moleküls mit 14 Fluorketten dargestellt. (Für die Peakzuordnung vgl. Abbildung 5.19)

Es lässt sich erkennen, dass unabhängig der Energie des Ionisationspulses, die Verhältnisse der Molekülpeaks untereinander konstant bleiben. Würden sich während der Photoionisation ein oder mehrere Fluorkomplexe von den Molekülen lösen, so würde dies einer Verschiebung der Häufigkeit der Molekülpeaks im Spektrum zu Peaks mit weniger Fluorkomplexen gleichkommen. Es gilt zu beachten, dass z.B. ein Molekül das ursprünglich 14 Fluorkomplexe hatte und durch den Ionisationslaser einen davon verliert, bei einer um ca. 12 amu höheren Masse landet als ein Molekül mit 13 Fluorkomplexen, weil der angebrochene Komplex statt eines Fluoratoms, ein Schwefel- und ein Wasserstoffatom am Molekül zurücklässt. Eine photoinduzierte Fragmentation würde also nicht nur die relative Höhe der Peaks beeinflussen, son-

dern auch deren Breite (wegen der geringen Massenauflösung), bzw. neue, knapp daneben befindliche Peaks entstehen lassen. Die Abbildung 5.32 zeigt einzelne Massenspektren von $\text{TPPF}_{20-x+17^*x}$ bei Verwendung unterschiedlicher Energien für die Postionisation. Es ist kein Anzeichen einer Peakverbreiterung, wie auch keine Veränderung in den Verhältnissen zwischen den Höhen der Peaks 10-17 erkennbar.

Die Abbildung 5.33 zeigt die Signalhöhen der im Massenspektrum ebenfalls vorhandenen Fragmente F1-F14 von $\text{TPPF}_{20-x+17^*x}$ im Verhältnis zum Molekül mit 14 Fluorkomplexen (vgl. Abbildung 5.19). Es ist zu sehen, dass mit steigender Energie des Ionisationslasers der relative Anteil von detektierten Fragmenten zunimmt. Dies liegt jedoch nicht so sehr an einer möglichen photoinduzierten Fragmentation, sondern daran, dass die Signale der intakten Moleküle eine Maximum in der Sättigung erreichen. Die Photoionisationsquerschnitte wären demnach kleiner für die fragmentierten als für die intakten Moleküle. Während beinahe alle sich im Ionisationsvolumen befindenden Moleküle 10-17 ionisiert werden, sind noch reichlich Fragmente F1-F14 vorhanden, die noch nicht ionisiert werden. Es ist zu erwarten, dass auch die Signale der Fragmente bei einer weiter steigenden Laserintensität gänzlich sättigen.

5.2.7. Zusammenfassung

Es wurde die gepulste Laserdesorption (LD) von perfluoroalkyl-funktionalisierten Tetraphenylporphyrinen untersucht. Mittels Photoionisation (PI) wurde der neutrale Anteil des erzeugten Teilchenstrahles betrachtet. LD und PI stellten sich als effiziente Techniken für die Erzeugung und Ionisation von Molekularstrahlen heraus – inwiefern diese in Materiewelleninterferometern zum Einsatz kommen können, wird in Abschnitte 6.2 und 6.3 diskutiert. Durch Variieren von für die Desorption bzw. für die Postionisation relevanten Parametern konnten die jeweiligen Einflüsse auf eine Fragmentation der Moleküle untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Teilchen vorwiegend beim Desorptionsprozess fragmentieren. Die Geschwindigkeitsverteilungen der Teilchenstrahlen konnten gemessen werden und lassen auf eine thermische Desorption schließen. Die Photoionisationsquerschnitte der Moleküle konnten bestimmt werden.

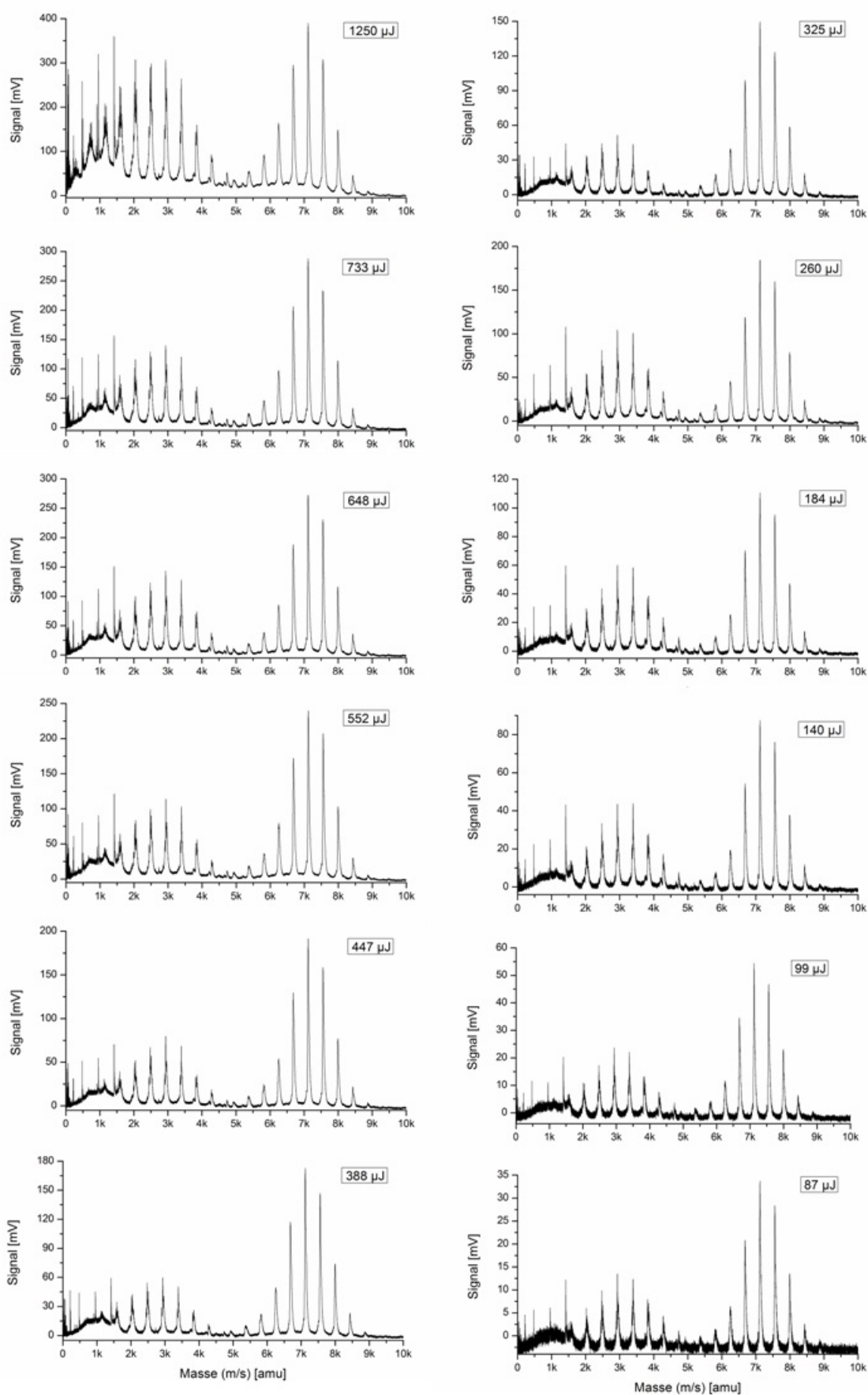


Abbildung 5.32: Massenspektren von $\text{TPPF}_{20-x+17x}$ bei unterschiedlichen PI-Energien

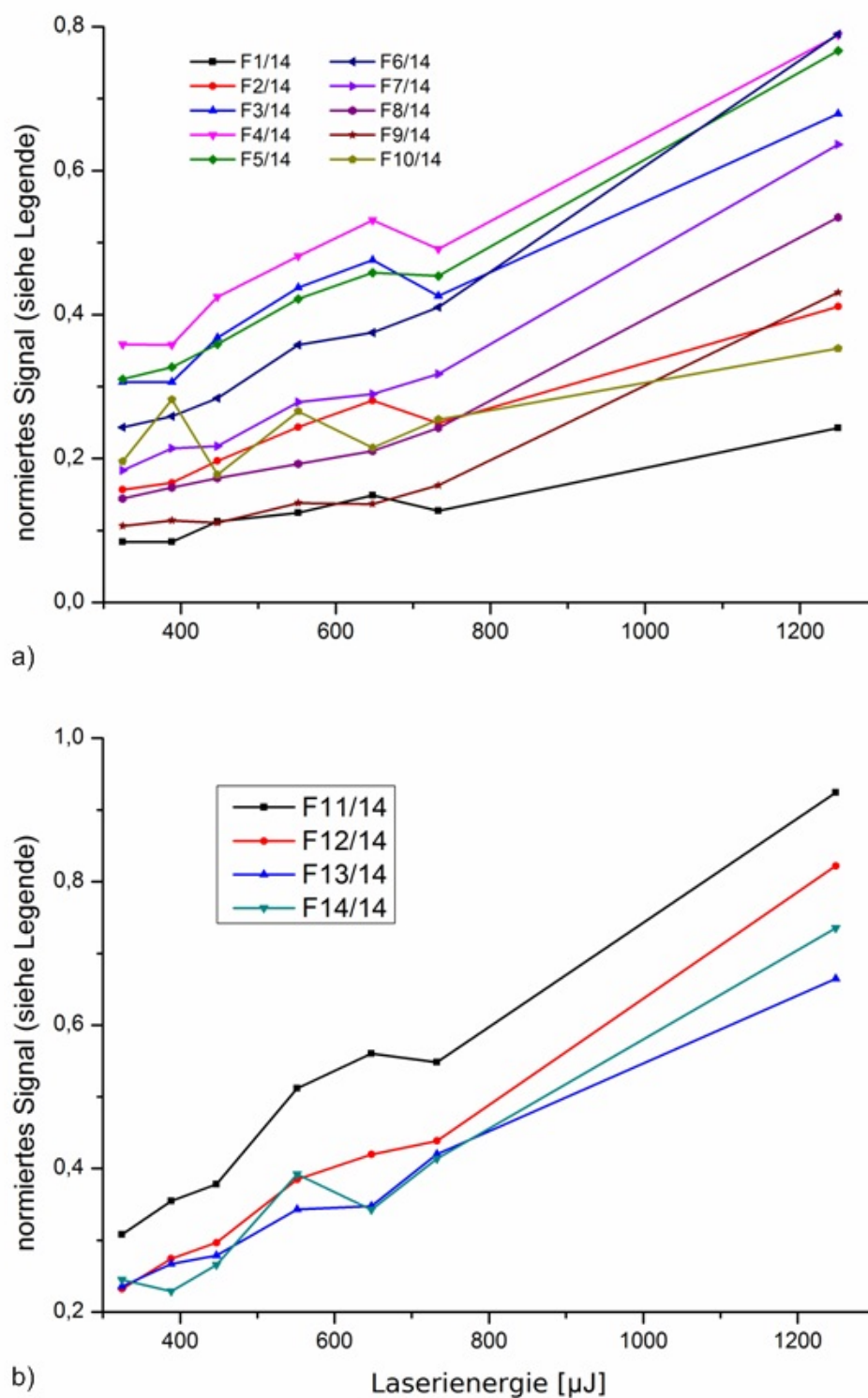


Abbildung 5.33: Relative Signale der Fragmente (1-10) (a) und der Fragmente (11-14) (b) von post-photoionisiertem TPPF_{20-x+17x} in Abhängigkeit der Stärke des Postionisationslasers. Es wird jeweils das Verhältnis zum Signal des intakten Moleküls mit 14 Fluorketten dargestellt. (Für die Peakzuordnung vgl. Abbildung 5.19)

Dritter Teil: Diskussion

6. Reflexionen, Folgerungen und Ausblick

6.1. Anwendbarkeit von MALDI zur Erzeugung von Molekularstrahlen

Die Resultate in Abschnitt 5.1 von zu MALDI durchgeführten Experimenten zeigen, dass sich Biomoleküle desorbieren lassen. Der dabei gewonnene Teilchenstrahl kann auf zwei Weisen für die Materiewelleninterferometrie genutzt werden. Er kann entweder direkt das Interferometer passieren. Oder er kann eine Ionenfalle füllen, in welcher die Ionen von mehreren Laserschüssen zunächst gefangen und abgekühlt werden und anschließend in das Interferometer entlassen werden. Beide Möglichkeiten sollen hier kurz diskutiert werden.

6.1.1. Die direkte Verwendung von MALDI als Teilchenquelle

Die Interferometer arbeiten mit neutralen Molekülen. Bei MALDI ist der Großteil der desorbierten Moleküle neutral, weshalb im Weiteren nur die Matrix unterstützte Desorption ohne Ionisation gemeint ist. Dabei sind die Eigenschaften des Molekülstrahles entscheidend – besonders dessen Geschwindigkeit und dessen Intensität, d.h. die Anzahl desorbierter Teilchen pro Puls.

Die wahrscheinlichste Geschwindigkeit der Moleküle wurde zu 500 m/s bestimmt³⁶ (vgl. Abschnitt 5.1.6). Bei den derzeit aufgebauten Interferometern, wie sie in Abschnitt 1.2 beschrieben sind, ergeben sich daraus Einschränkungen auf zugängliche Massen der Moleküle³⁷. Beim KDTLI wäre hiermit das Massenlimit bei 1.000 amu und beim OTIMA 3.000 amu. Somit könnte zwar kein neuer Massenrekord in der Materiewelleninterferometrie erreicht werden, allerdings werden so Teilchen zugänglich, welche sich bisher mittels eines Ofens nicht verdampfen ließen. Es könnten innere

³⁶ Diese Geschwindigkeit soll hier exemplarisch für mittels MALDI desorbierten Moleküle gelten. Sie hängt von verschiedenen Faktoren ab und kann sich von Analyt zu Analyt unterscheiden, wie es in Abschnitt 3.5.1 beschrieben ist.

³⁷ Durch Änderung der Dimensionen des Interferometers kann sich der zugängliche Massenbereich ändern. So können eine Vergrößerung des Abstands zwischen den Gittern und/oder eine Verkleinerung der Gitterkonstante höhere Massen zugänglich machen.

Eigenschaften von Molekülen bestimmt und so Beiträge zur physikalischen Chemie geleistet werden [35].

Die Anzahl der mittels MALDI in einem Puls desorbierten Teilchen muss so hoch sein, dass nach der Transmission des Teilchenstrahls durch das Interferometer noch genügend viele Teilchen beim Detektor ankommen. Aus den gewonnenen Massenspektren können die tatsächliche Anzahl desorbierter Moleküle nicht bestimmt werden. Dazu wären Werte für die Effizienz des MCPs und der Transmission des TOFs erforderlich. Die in Abschnitt 3.5.3 gemachte Abschätzung, sagt insgesamt 10^{11} Analytmoleküle pro Laserpuls bei einem Spotdurchmesser von 1 mm und einer Desorptionstiefe von 50 nm voraus.

Für das KDTLI kann weiters folgende Abschätzung gemacht werden: Angenommen die Desorption könnte 10 cm vor dem ersten Gitter und die Detektion 10 cm nach dem dritten Gitter stattfinden, so wäre bei einer Länge des Interferometers von 25 cm die gesamte Flugstrecke ungefähr 45 cm. Auf einer Detektorfläche von 1 mm^2 , wären unter Berücksichtigung der Divergenz der Teilchenwolke (16° Öffnungswinkel, vgl. Abschnitt 3.5.2) und des absorptiven Gitters (60% Verlust) noch 3×10^5 Teilchen zu erwarten. Eine Geschwindigkeitsselektion mit $v/\Delta v = 10\%$ verringert die ankommenden Teilchen weiters auf 10^4 . Unter Verwendung von Elektronenstoßionisation mit einer geschätzten Effizienz von 10^{-4} , wäre so noch 1 Teilchen zu detektieren. Könnte die Detektionseffizienz gesteigert werden, z.B. durch den Einsatz von Photoionisation³⁸ (vgl. Abschnitt 2 und 6.3) oder Oberflächenionisation [53], so wäre MALDI eine einsetzbare Alternative als Molekülquelle im KDTLI.

Im Falle des OTIMA ist die Wahl der desorbierten Teilchen auf solche beschränkt, die eine Ionisierungsenergie besitzen, welche unterhalb der Energie der Photonen liegt, aus welchen die Lichtgitter bestehen, und sich mittels eines einzigen Photons ionisieren lassen. Kleine Biomoleküle, z.B. Gramicidin [31] können dafür in Frage kommen, doch sinkt die Ionisationseffizienz bei größeren (vgl. Abschnitt 2.5). Silizium-Nanoteilchen [161] oder ähnliche Kügelchen könnten von Interesse sein, wenn diese in der gewünschten Größe erhältlich wären.³⁹ Aufgrund der kompakteren Bau-

³⁸ Bei einem Laser zur Photoionisation mit einer Pulslänge von 10 ns wäre die Anzahl potentiell ionisierbarer Teilchen im Ionisationsvolumen 700.

³⁹ Durchmesser von 5-10 nm entsprechend einer Masse von 10^4 - 10^6 amu sind wünschenswert, weil solche Kügelchen noch mittels eines MCPs in einem TOF detektiert werden können. Firmen wie

weise und dem Wegfall der Geschwindigkeitsselektion stehen mehr Teilchen zur Detektion einer Interferenz zur Verfügung.

Ein Problem, das bei der Verwendung von MALDI als Quelle auftritt, ist die mangelnde Signalstabilität, d.h. das Fluktuieren der tatsächlich desorbierten Moleküle von Schuss zu Schuss. Dies würde für einen Datenpunkt das Mitteln über viele Laserschüsse notwendig machen und den Materialverbrauch drastisch erhöhen. Dazu müsste eine ausreichend große Fläche an desorbierbarem Probenmaterial vorhanden sein, welche rasterförmig verfahren werden kann.

6.1.2. Die indirekte Verwendung von MALDI als Teilchenquelle: Entwicklung einer Ionenfalle

In der Einleitung wurde bereits im Umriss eine Möglichkeit skizziert, Strahlen mit Teilchen großer Massen zu erzeugen, die den Erfordernissen der Materiewelleninterferometer genügen (vgl. Abschnitt 1.3).

Füllen einer Ionenfalle

Dabei sollen Moleküle mittels MALDI in eine Ionenfalle desorbiert und dort gefangen werden. Die Falle kann mit mehreren MALDI-Pulsen gefüllt werden, bis, aufgrund der Coulombabstoßung zwischen den Molekülen, keine weiteren Teilchen Platz haben. Aufgrund der hohen kinetischen Energie der Teilchen von 200 eV (bei 150.000 amu und 500 m/s) müssen die Teilchen, um gefangen werden zu können, abgebremst werden. Dazu wird ein Buffergas verwendet, das durch inelastische Stöße die Geschwindigkeiten der Moleküle reduziert. Ein Lademechanismus muss garantieren, dass Teilchen kontinuierlich gefangen werden und über mehrere Ladezyklen gefangen bleiben.

Durch die Wahl der Fallenfelder, besonders durch das Verhältnis des Gleich- zum Wechsellspannungsanteil, kann die Falle zusätzlich massenselektiv wirken.

Kühlen der Falle

Mittels des Buffergases und einer Kühlung der gesamten Falle mittels eines Kryostaten können Temperaturen der Ionen von bis zu 10 K erreicht werden [164, 165]. Da-

PlasmaChem GmbH oder American Elements haben Teilchen ≥ 10 nm im Angebot. Eine Schwierigkeit stellt die weite Größenverteilung der erhältlichen Teilchen dar. In [162] und [163] wird ein Überblick über Methoden zur Herstellung von Si-Nanoteilchen gegeben.

zu wird mittels eines gepulsten Ventils z.B. Helium in die Vakuumkammer gelassen (10^{-6} - 10^{-5} mbar), welches nach dem Kühlvorgang, wieder entfernt wird. Weitere Methoden wie sympathisches Kühlen [166], oder Laserkühlen [37, 167] kann die Temperatur noch weiter reduzieren.

Das Laserkühlen von Molekülen ist, aufgrund deren komplexer interner Strukturen, im Gegensatz zur Laserkühlung von Atomen noch keine etablierte Technik und steht mitten in der Entwicklung. Für nicht-resonantes Laserkühlen mit Hilfe optischer Resonatoren werden Teilchen mit hoher Polarisierbarkeit, kleinem Absorptionsquerschnitt bei der Wellenlänge des verwendeten Lasers und geringer Geschwindigkeit benötigt. Nanosphären aus Siliziumoxid, mit deren geringen Absorption bei 1064 nm, wären geeignet [168] und für Versuchszwecke könnten diese mittels akustischer Laserdesorption (LIAD – Laser induced accoustic desorption) desorbiert werden [49, 169, 170].

Entladen der Falle

Es muss ein geeigneter Entlademechanismus entwickelt werden, der die Ionen in die Richtung des Interferometers, mit einer möglichst kleinen Divergenz entlässt. Würden dafür elektrische Felder zum Einsatz kommen, würde dies wiederum zu einer Beschleunigung der Ionen führen und dem davor liegenden Kühlvorgang entgegenwirken. Ein bloßes Ausschalten der Fallfelder würde zu einer Expansion des Ionenpaketes in alle Raumrichtung führen und so die verwendbaren Teilchen für die Interferometrie enorm reduzieren – im Falle eines kompakten Interferometers, wie des OTIMAs, und bei einer ausreichend hohen anfänglichen Anzahl der Ionen in der Falle, würde der übrigbleibende Teilchenfluss ausreichen um Interferenz beobachten zu können.

Neutralisieren der Ionen

Die Interferometer arbeiten mit neutralen Molekülen und deshalb müssen die Ionen neutralisiert werden. Dazu könnte mit negativ geladenen Ionen gestartet werden und, nachdem ein gebündelter langsamer Teilchenstrahl gewonnen wurde, mittels Laserlicht die überschüssigen Elektronen abgetrennt werden (Photodetachment). Das Ionenpaket könnte auch bereits innerhalb der Falle neutralisiert werden – allerdings würde wiederum das Problem auftreten, dass die Teilchen in alle Raumrichtungen expandieren würden. Beim „Photodetachen“ ist entscheidend, dass die Moleküle

durch das Laserlicht nicht fragmentiert werden. Das Neutralisieren von kleinen Molekülen wurde bereits gezeigt [171]. Goto et al. zeigten das Detachen von Porphyrin Anionen [172]. Von größeren organischen Molekülen sind nur Untersuchungen bekannt, die eine Ladungsreduzierung, aber keine vollkommene Neutralisation, zeigen [173, 174].⁴⁰ Larrailett et al. berichten von der Verringerung der Ladung des Peptids Melittin von 2- auf 1- mit einer Effizienz von 90% nach der Anwendung von 5 Laserpulsen mit je 600 μJ eines OPOs bei 260 nm, wobei kaum Fragmentation auftritt [175]. Weiters wurde die fragmentarme Ladungsreduzierung von den Proteinen Ubiquitin und Beta-Casein von 8- auf 7- bzw. von 16- auf 15- durchgeführt. Das Zeigen von Neutralisation mittels Photodetachen bedarf allerdings einer eigenen Untersuchung, welche mit dem Problem des Nachweises der neutralen Moleküle verbunden wäre. Auch wenn man zeigen könnte, dass mittels Photodetachment die in einem Teilchenstrahl vorhandenen Ionen reduziert werden können, schließt dies nicht eine Fragmentation der Teilchen aus.

Photoelektronenspektroskopie zeigt das Detachen von C_{60} [176], von Anthracen [177], Metall- [178] und Oxidclustern [179]. Die Verwendung von Metallclustern hätte den Vorteil, dass diese, aufgrund deren Stabilität und niedrigen Ionisierungsenergien, wiederum zum Zwecke der Detektion photoionisiert werden könnten.

⁴⁰ Das Problem stellt die Detektion der neutralisierten Moleküle dar. Es stehen mehrere Wege offen, die Neutralisation von Molekülionen zu untersuchen. Wird Photodetachment an einem Teilchenstrahl erprobt, so kann der Einfluss auf das Signal eines Ionendetektors betrachtet werden – im Speziellen dessen Abnahme. Dabei kann allerdings nicht festgestellt werden, bis zu welchem Grad neben der Neutralisation ebenfalls eine Fragmentation der Moleküle stattfindet. Mittels eines Ablenkens könnte der ionische Anteil des Teilchenstrahles vom neutralisierten Anteil getrennt und durch Anwendung einer erneuten Ionisation der neutralen Moleküle der Einfluss des Photodetachments untersucht werden. Dabei müsste allerdings der Einfluss der erneuten Ionisation bereits bekannt sein. Fluoreszenzdetektion kann ergänzend zur Bestimmung der Neutralisationseffizienz verwendet werden. Fragmentation wird dabei allerdings nicht berücksichtigt.

6.2. Überlegungen zur Anwendung von Laserdesorption als Teilchenquelle

Für das KDTLI

In Abschnitt 5.2 wurde gepulste Laserdesorption erfolgreich eingesetzt um synthetisierte perfluoroalkyl-funktionalisierte Porphyrine zu verdampfen. Mit diesen Teilchen wurde bereits im KDTLI Interferenz von Materiewellen gezeigt [12]. Dabei kam ein thermischer Ofen zum Einsatz und bei größeren Teilchen wurde damit nur ein geringer Teilchenfluss gewonnen, sodass der Höhenbegrenzer, der zur Geschwindigkeitsselektion genutzt wird, weiter geöffnet werden musste, um eine ausreichende Anzahl an Molekülen detektieren zu können. Dies hatte eine Verschlechterung des Interferenzkontrastes zur Folge.

Dieses Problem lässt sich entweder dadurch umgehen, dass eine effizientere Ionisation verwendet wird (vgl. Abschnitt 6.3), oder dass eine Quelle verwendet wird, welche intensivere Molekularstrahlen produziert.

Ob Laserdesorption eine Alternative zum Ofen darstellt, lässt sich zurzeit nicht sagen. Es müsste versucht werden, über die reale Länge des Interferometers inklusive den Gittern und den Aperturen, Teilchen zu detektieren. Es wurde gezeigt, dass sich die Teilchen alle desorbieren lassen und die detektierten Signale bei den größeren Teilchen nur geringfügig kleiner sind. Bei TPPF_{84} beträgt das Signal 600 mV und bei $\text{TPPF}_{20-x+17 \cdot x}$ 400 mV, bei sonst gleichen Einstellungen und einer MCP Spannung von 1,75 kV, welche bei abnehmendem Teilchenfluss auf bis zu 2,4 kV erhöht werden kann. Die Eintrittsblende des TOFs ist ca. 5 cm vom Ort der Desorption entfernt und ist 4x8 mm groß. Angenommen alle Ionen, welche durch diese in das TOF eintreten, werden auch detektiert, so kann daraus folgendes abgeschätzt werden: Befände sich die Blende 1 m vom Ort der Desorption entfernt und wäre 1x1 mm groß, so wäre das Signal nicht mehr 400 mV, sondern nur mehr 0,03 mV und würde somit im Rauschen untergehen. Bei Verwendung eines gepulsten Detektionsschemas, also eines TOFs in Kombination mit einem gepulsten Laser zur Ionisation, stellt sich aus dieser Sicht Laserdesorption nur bedingt als Alternative Quelle heraus.

Für das Fernfeld-Interferometer

Im Falle des Fernfeld-Interferometers (vgl. Abschnitt 1.2.1) wäre zwar die Effizienz der Fluoreszenzdetektion im Vergleich zu den Ionendetektoren viel höher, allerdings sind höhere Anforderungen an die Kollimation des Teilchenstrahls gestellt.

Angenommen die 600 mV entsprechen 600 Ionen und die Detektionseffizienz beträgt 10^{-4} . Es ist keine Geschwindigkeitsselektion vorgesehen, weshalb über die Geschwindigkeitsverteilung (vgl. Abbildung 5.20) integriert werden muss. Der Desorptionslaserspot würde auf einen Durchmesser von 10 μm reduziert werden, um die Rolle der ersten Apertur zu übernehmen und damit die räumliche Kohärenz sicherstellen. Es wären dann pro Schuss ca. 3×10^4 Moleküle vorhanden. Würden diese sich wie bei MALDI mit einem Öffnungswinkel von 16° ausbreiten und anschließend eine 0,5 m entfernte Apertur mit $10 \times 100 \mu\text{m}$ zur Kollimation passieren so wären auf dem Schirm noch 10^{-3} Teilchen pro Schuss zu erwarten. Das Gitter reduziert den Teilchenfluss noch weiter. Um 10^4 Teilchen zu erhalten, welche zur Detektion eines Interferenzmusters ausreichend wären, würde man 10^7 Schuss benötigen.

Von den in Abschnitt 5.2.4 gezeigten Geschwindigkeitsverteilungen lässt sich auf einen thermischen Desorptionsprozess schließen. Statt eines gepulsten Lasers kann daher auch ein Dauerstrichlaser verwendet werden und dadurch der Teilchenfluss erheblich gesteigert und die Integrationszeit für das Erhalten eines detektierbaren Interferenzmusters verkürzt werden. Wegen des erhöhten Flusses kann dann auch die Intensität des Lasers so niedrig gewählt werden, dass kaum Fragmentation auftritt (vgl. Abbildung 5.29) und so scharfe Interferenzstreifen entstehen.

6.3. Überlegungen zum Einsatz von Photoionisation als Detektionsschema

Wie bereits erwähnt wurde, kommt im KDTLI derzeit Elektronenstoßionisation in Kombination mit einem Quadrupol-Massenspektrometer zum Einsatz um die Teilchen zu detektieren und Interferenz zu messen. In Kombination mit dem Ofen, welcher einen kontinuierlichen Teilchenstrahl liefert, ergibt sich daraus der Vorteil, dass kontinuierlich die ankommenden Teilchen pro Sekunde gemessen werden können. Der Nachteil liegt in der geringen Effizienz der Elektronenstoßionisation selbst.

In Abschnitt 5.2 wurde die Photoionisation von perfluoroalkyl-funktionalisierten Porphyrinen TPPF₈₄, TPP₁₂₀ und TPPF_{20-x+17*x} (x=10-17) gezeigt. Anhand der Ab-

hängigkeit der Ionensignale von der Laserintensität wurde festgestellt, dass ein Einphotonenprozess stattfindet und dass die Ionensignale sättigen. Einphotonenionisation mit VUV-Licht stellt also eine Alternative zur Elektronenstoßionisation dar.

Im Falle von TPPF₁₂₀ konnte ab einer gewissen Höhe der Intensität des Ionisationslasers photoinduzierte Fragmentation beobachtet werden – diese konkurriert mit der Ionisation. Unterhalb einer solchen Intensität wurde für TPPF₁₂₀ und TPPF_{20-x+17*x} keine photoinduzierte Fragmentation festgestellt. Diese ist allerdings insofern nicht auszuschließen, als die dadurch möglicherweise entstandenen Fragmente neutral sind und daher nicht detektiert werden.

Der Nachteil von PI liegt in den Lichtquellen. Es sind zwar kontinuierliche VUV-Lichtquellen erhältlich – diese geben allerdings nur 10^{15} Photonen pro Sekunde aus. Im Vergleich dazu, waren 10^{15} Photonen pro 8 Nanosekunden erforderlich, um eine Sättigung zu erreichen. Ein Excimer Laser, wie er in dieser Arbeit verwendet wurde, kann mit Repetitionsraten bis zu 1000 Hz betrieben werden. Über eine Sekunde betrachtet, ist es daher möglich jedes 100.000ste Teilchen zu detektieren. Oder anders gesagt, angenommen die bisherige Detektionseffizienz der Elektronenstoßionisation betrug 10^{-4} und die Detektionseffizienz mit PI ist wirklich 100%, so müsste 10mal so lange gemessen werden, um die gleiche Anzahl von Teilchen zu detektieren.

In Kombination mit einem Flugzeitmassenspektrometer sind höhere Beschleunigungsspannungen als bisher zugänglich, wodurch auch auf der Seite der Ionendetektion selbst eine höhere Effizienz erwartet werden kann. Wird der aus dem Ofen kommende Strahl mittels eines Choppers in Pakete geteilt, so findet durch die gepulste Ionisation bereits eine Geschwindigkeitsselektion statt, wodurch die Aperturen, welche bisher eine Flugparabel festgelegt haben, hinfällig werden und der allgemeine Teilchenfluss gesteigert werden kann.

6.4. Die Eignung von perfluoroalkyl-funktionalisierten Phenylporphyrinen für das OTIMA

Wie in Abschnitt 6.3 bereits festgestellt wurde, lassen sich die eigens für die Materiewelleninterferometrie synthetisierten Moleküle mittels eines Einphotonenprozess ionisieren. (In Abschnitt 1.2.3 wurde dies als Voraussetzung für die Eignung eines Teilchens für das OTIMA dargestellt.) Die Ionisationsenergien sind nicht bekannt – sie können allerdings durch die bekannte Ionisierungsenergie von TPP abgeschätzt

werden, liegen daher im Bereich von 6,4 eV [159] und unterhalb der Energie der Photonen (7,9 eV) aus denen die Lichtgitter bestehen. Die Ionensignale sättigen bei hoher Laserintensität und erreichen ein Maximum (vgl. Abschnitt 5.2.5) – stehende Lichtwellen würden so absorptive Gitter darstellen. Oberhalb der Sättigungsintensität findet photoinduzierte Fragmentation statt. Unterhalb der Sättigungsintensität, konnte eine solche Fragmentation nicht ausgeschlossen, aber auch nicht beobachtet werden. Im Falle von $\text{TPPF}_{20-x+17*x}$ wurde festgestellt, dass die Verhältnisse zwischen den Signalen der Molekülionen mit unterschiedlich vielen Fluorketten gleichbleiben – dies kann bei Interferenzmessungen dazu dienen, durch die Lichtgitter verursachte Fragmentation zu berücksichtigen. Das Vorhandensein von Fragmenten ist vorwiegend dem Desorptionsprozess und nicht der Photoionisation zuzuordnen (vgl. Abschnitt 5.2.6).

Aus diesen Gründen stellen die untersuchten Moleküle Kandidaten zum Testen des OTIMA dar. Weil die Gesamtlänge des OTIMA relativ klein ist und keine Geschwindigkeitsselektion notwendig ist, kann gepulste Laserdesorption als Quelle, wie sie für das KDTLI und das Fernfeld-Interferometer ausgeschlossen wurde, beim OTIMA angewandt werden.

Anhang A

Flugzeit-zu-Massen-Konverter

Es wird ein MATLAB-Programm zur Umskalierung von Flugzeitspektren (FS) auf Massenspektren (MS), zum Glätten der Spektren und zur Ausgabe der umskalierten Dateien, sowie der Spektren als Bilddateien abgebildet. Als Eingabedateien sind nur csv-Dateien von der Art geeignet, wie sie von einem Tektronix TDS1000C-EDU digitalem Speicher-Oszilloskop ausgegeben werden. In Kommentaren sind die Befehle für txt-Dateien eines LeCroy Waverunner Oszilloskops angegeben. Die zu bearbeitenden Dateien müssen sich alle in einem Ordner befinden.

```
Speicherort='J:\Diagramme\MALDI\14.2. Cytochrome C Spots\size\Data Rescaled\';
Ladeort='J:\Diagramme\MALDI\14.2. Cytochrome C Spots\size\Data Raw\';
Anfang=64; % Letzte Ziffern der Namen von der ersten...
Ende=69; % ...und der letzten Datei, die bearbeitet werden sollen
a=2.78732e6; % Kalibrationskonstanten
b=1.2294;

range = 50000; % maximale Masse die im Spektrum angezeigt wird
prefix = 'F'; % Präfix der Dateien des FS für Tektronix Oszilloskop
% prefix = 'C228.06.-TPPF120-1-'; % LeCroy
suffix = 'CH2.csv'; % Suffix der Dateien des FS für Tektronix Oszilloskop
% suffix = '.txt'; % LeCroy

X = Anfang;
Y = Ende+1;

K = 1; % Sgolay Parameter: k muss kleiner f und f ungerade sein.
F = 21; % k bestimmt wie grob die Glättung wird.

while Y>X
    name = [ prefix, num2str(Anfang,'%04i'), suffix ]; % Der Dateiname wird zusammengestellt.
    % name = [ prefix, num2str(Anfang,'%05i'), suffix ]; % LeCroy

    B = csvread([Ladeort,name], 1, 3); % Laden einer Datei mit einem Flugzeitspektrum.
    % B = importdata([Ladeort,name]); % LeCroy
    % B=OsziFileDaten.data; % LeCroy

    A = B;
    vorzeichen = sign(B(:,1)); % Für negative Flugzeiten
    A(:,1) = (B(:,1)*a+b).^2; % Umskalierung
    A(:,1) = vorzeichen .* A(:,1); % Erstellen "negativer Massen"
    A(:,2) = (A(:,2)-0.0685); % Offset

    B(:,2) = sgolayfilt(A(:,2),k,f); % Savitzky-Golay FIR Smoothing Filter
    B(:,1) = A(:,1);

    minmass = min(A(:,1));
    bereich = max(A(:,2))-min(A(:,2));
    c=min(A(:,2))-abs(bereich/10); % Ordinate Range
    d=max(A(:,2))+abs(bereich/10);
    figure; %mehrfache Grafik Ausgabe
```

```

plot(A(:,1),A(:,2),'LineWidth',1);      % Das Massenspektrum wird geplottet
hold on                                % In dieselbe Grafik wird...
plot(B(:,1),B(:,2),'r','LineWidth',2);  % ...das geglättete Massenspektrum geplottet
hold off
xlabel('mass (amu)');                   % Beschriftung der Abszisse
ylabel('signal (V)');                   % Beschriftung der Ordinate
axis([minmass range c d]);              % Bereich der Abszisse und der Ordinate

name1 = [prefix, num2str(Anfang,'%04i'), '.txt' ];      % Die Namen der Ausgabedateien des MS,...
name2 = [prefix, num2str(Anfang,'%04i')];              % ...des geglätteten MS und der...
name3 = ['sgolay', prefix, num2str(Anfang,'%04i'), '.txt' ];      % ...Bilddateien werden festgelegt.
Speicherort1 = [Speicherort,name2,'.txt'];              % Die genaue Domänen der Ausgabedateien
Speicherort2 = [Speicherort,name2];                     % werden festgelegt.
Speicherort3 = [Speicherort,name3];

save (Speicherort3,'B','-ASCII');      % MS werden als Text- und Bilddateien gespeichert.
save (Speicherort1,'A','-ASCII');      % txt File Ausgabe
%print ( '-dtiff', '-r300', name2);    % tiff File Ausgabe
print ( '-djpeg', Speicherort2);       % jpeg File Ausgabe
%print ( '-depsc', Speicherort2);      % ps File Ausgabe

Anfang = Anfang+1;
Y = Y-1;
end

%close all;                            % Alle offenen Grafikfenster schließen.

```

Anhang B

Verwendete Moleküle

Es wird eine Tabelle mit allen im Laufe dieser Arbeit verwendeten Molekülen, samt deren Molekulargewichten und Lösbarkeiten gezeigt.

	Gramm/mol	Löslichkeit
Matrix		
DHB	154	Aceton, Acetonitril, Methanol, H ₂ O
a-CHCA	190	10mg/ml Methanol
Sinapinsäure	224	Aceton; 1,04M Methanol; 0,79M Ethanol
3-HPA	139	1:1 H ₂ O/ACN
Analyte		
Beta-Karotin	536	Aceton
Rhodamin B	479	Aceton, 50g/l H ₂ O
Bradykinin	1.060	Aceton
Vitamin B12	1.355	Aceton
Gramicidin	1.882	Aceton
Ubiquitin	8.564	H ₂ O
Insulin	5.800	Aceton
Cytochrom C	12.000	H ₂ O
Myoglobin	17.000	H ₂ O
Albumin Chicken	45.000	40mg/ml H ₂ O
Albumin Bovine	66.776	H ₂ O
Hemoglobin	68.000	H ₂ O
Immunoglobulin G	149.000	H ₂ O
Fluoreszierend		
Rhodamin B	479	Aceton
m-TPP	614,8	Kein H ₂ O, ACN
Ni-TPP	671,45	Kein H ₂ O; schlecht in ACN and Toluol; Aceton
Zn-TPP	678,11	Kein H ₂ O; schlecht in ACN and Toluol; Aceton
Tryptophan	204,23	10g/l H ₂ O
TPPF84	2.815,26	Aceton; kein Acetonitril; kein Methanol
TPPF120	3.991,72	Aceton
TPPF152	5.310	Aceton
TPPF20-x+17x	7.415	Ether
TPPF20-x+26x	9.363	Ether

Literaturverzeichnis

1. Arndt, M., O. Nairz, and A. Zeilinger, *Interferometry with Macromolecules: Quantum Paradigms Tested in the Mesoscopic World*, in *Quantum (Un)speakables*, R.A. Bertlmann and A.E. Zeilinger, Editors. 2002, Springer Verlag: Berlin. p. 333-350.
2. Hackermüller, L., K. Hornberger, B. Brezger, A. Zeilinger, and M. Arndt, *Decoherence in a Talbot–Lau interferometer: the influence of molecular scattering*. Applied Physics B: Lasers and Optics, 2003. **77**(8): p. 781-787.
3. Hackermüller, L., K. Hornberger, B. Brezger, A. Zeilinger, and M. Arndt, *Decoherence of matter waves by thermal emission of radiation*. Nature, 2004. **427**(6976): p. 711-714.
4. Hornberger, K., S. Uttenthaler, B. Brezger, L. Hackermüller, M. Arndt, and A. Zeilinger, *Collisional Decoherence Observed in Matter Wave Interferometry*. Physical Review Letters, 2003. **90**(16): p. 160401.
5. Joos, E. and H.D. Zeh, *The emergence of classical properties through interaction with the environment*. Zeitschrift für Physik B Condensed Matter, 1985. **59**(2): p. 223-243.
6. Zurek, W.H., *Decoherence and the Transition from Quantum to Classical — Revisited*, in *Quantum Decoherence*, B. Duplantier, J.M. Raimond, and V. Rivasseau, Editors. 2007, Birkhäuser Basel. p. 1-31.
7. Arndt, M., K. Hornberger, and A. Zeilinger, *Probing the limits of the quantum world*. Physics World, 2005. **March**: p. 35–40.
8. Ghirardi, G.C., A. Rimini, and T. Weber, *Unified dynamics for microscopic and macroscopic systems*. Physical Review D, 1986. **34**(2): p. 470.
9. Bassi, A. and et al., *Breaking quantum linearity: Constraints from human perception and cosmological implications*. EPL (Europhysics Letters), 2010. **92**(5): p. 50006.
10. Nimmrichter, S., K. Hornberger, P. Haslinger, and M. Arndt, *Testing spontaneous localization theories with matter-wave interferometry*. Physical Review A, 2011. **83**(4): p. 043621.
11. Nimmrichter, S., P. Haslinger, K. Hornberger, and M. Arndt, *Concept of an ionizing time-domain matter-wave interferometer*. New Journal of Physics, 2011. **13**(7): p. 075002.
12. Gerlich, S., S. Eibenberger, M. Tomandl, S. Nimmrichter, K. Hornberger, P.J. Fagan, J. Tüxen, M. Mayor, and M. Arndt, *Quantum interference of large organic molecules*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 263.
13. Berninger, M., A. Stefanov, S. Deachapunya, and M. Arndt, *Polarizability measurements of a molecule via a near-field matter-wave interferometer*. Physical Review A, 2007. **76**(1): p. 013607.
14. Hackermüller, L., K. Hornberger, S. Gerlich, M. Gring, H. Ulbricht, and M. Arndt, *Optical polarizabilities of large molecules measured in near-field interferometry*. Applied Physics B: Lasers and Optics, 2007. **89**(4): p. 469-473.
15. Gerlich, S., M. Gring, H. Ulbricht, K. Hornberger, J. Tüxen, M. Mayor, and M. Arndt, *Matter-Wave Metrology as a Complementary Tool for Mass Spectrometry*. Angewandte Chemie International Edition, 2008. **47**(33): p. 6195-6198.
16. Nimmrichter, S., K. Hornberger, H. Ulbricht, and M. Arndt, *Absolute absorption spectroscopy based on molecule interferometry*. Physical Review A, 2008. **78**(6): p. 063607.
17. Gring, M., S. Gerlich, S. Eibenberger, S. Nimmrichter, T. Berrada, M. Arndt, H. Ulbricht, K. Hornberger, M. Müri, M. Mayor, M. Böckmann, and N.L. Doltsinis, *Influence of conformational molecular dynamics on matter wave interferometry*. Physical Review A, 2010. **81**(3): p. 031604.

18. Tüxen, J., S. Gerlich, S. Eibenberger, M. Arndt, and M. Mayor, *Quantum interference distinguishes between constitutional isomers*. Chemical Communications, 2010. **46**(23): p. 4145-4147.
19. Juffmann, T., S. Truppe, P. Geyer, A.G. Major, S. Deachapunya, H. Ulbricht, and M. Arndt, *Wave and Particle in Molecular Interference Lithography*. Physical Review Letters, 2009. **103**(26): p. 263601.
20. Marksteiner, M., G. Kieseewetter, L. Hackermüller, H. Ulbricht, and M. Arndt, *Cold beams of biomolecules for quantum optics*. Acta Physica Hungarica B) Quantum Electronics, 2006. **26**(1): p. 87-94.
21. Arndt, M., L. Hackermüller, and E. Reiger, *Interferometry with large molecules: exploration of coherence, decoherence and novel beam methods*. Brazilian Journal of Physics, 2005. **35**: p. 216-223.
22. Reiger, E., L. Hackermüller, M. Berninger, and M. Arndt, *Exploration of gold nanoparticle beams for matter wave interferometry*. Optics Communications, 2006. **264**(2): p. 326-332.
23. Deachapunya, S., P.J. Fagan, A.G. Major, E. Reiger, H. Ritsch, A. Stefanov, H. Ulbricht, and M. Arndt, *Slow beams of massive molecules*. The European Physical Journal D - Atomic, Molecular, Optical and Plasma Physics, 2008. **46**(2): p. 307-313.
24. Szewc, C., *Note: A helical velocity selector for continuous molecular beams*. Rev. Sci. Instrum., 2010. **81**(10): p. 106107.
25. Venn, P. and H. Ulbricht, *Coherent control of the motion of complex molecules and the coupling to internal state dynamics*. Faraday Discussions, 2011.
26. Tüxen, J., S. Eibenberger, S. Gerlich, M. Arndt, and M. Mayor, *Highly Fluorous Porphyrins as Model Compounds for Molecule Interferometry*. European Journal of Organic Chemistry, 2011. **2011**(25): p. 4823-4833.
27. Haberland, H., *Thin films from energetic cluster impact: A feasibility study*. J. Vac. Sci. Technol. A, 1992. **10**(5): p. 3266.
28. Goldfarb, F., S. Deachapunya, A. Stefanov, A. Stibor, E. Reiger, and M. Arndt, *Fluorescence of surface adsorbed dyes: investigation of a new detector for molecule interferometry*. Journal of Physics: Conference Series, 2005. **19**(1): p. 125.
29. Stibor, A., A. Stefanov, F. Goldfarb, E. Reiger, and M. Arndt, *A scalable optical detection scheme for matter wave interferometry*. New Journal of Physics, 2005. **7**(1): p. 224.
30. Dreas-Wlodarczak, A., M. Müllneritsch, T. Juffmann, C. C., M. Arndt, and M. Mayor, *Immobilization of Zinc Porphyrin Complexes on Pyridine-Functionalized Glass Surfaces*. Langmuir, 2010. **26**(13): p. 10822-10826.
31. Marksteiner, M., P. Haslinger, M. Sclafani, H. Ulbricht, and M. Arndt, *UV and VUV Ionization of Organic Molecules, Clusters, and Complexes*. The Journal of Physical Chemistry A, 2009. **113**(37): p. 9952-9957.
32. Marksteiner, M., A. Divochiy, M. Sclafani, P. Haslinger, H. Ulbricht, A. Korneev, A. Semenov, G. Gol'tsman, and M. Arndt, *A superconducting NbN detector for neutral nanoparticles*. Nanotechnology, 2009. **20**: p. 455501.
33. Gerlich, S., L. Hackermüller, K. Hornberger, A. Stibor, H. Ulbricht, M. Gring, F. Goldfarb, T. Savas, M. Müri, M. Mayor, and M. Arndt, *A Kapitza-Dirac-Talbot-Lau interferometer for highly polarizable molecules*. Nat Phys, 2007. **3**(10): p. 711-715.
34. Brezger, B., L. Hackermüller, S. Uttenthaler, J. Petschinka, M. Arndt, and A. Zeilinger, *Matter-Wave Interferometer for Large Molecules*. Physical Review Letters, 2002. **88**(10): p. 100404.
35. Hornberger, K., S. Gerlich, P. Haslinger, S. Nimmrichter, and M. Arndt, *Colloquium: Quantum interference of clusters and molecules*. Rev. Mod. Phys., 2011 (in press), arXiv:1109.5937
36. Dörre, N., *Design and development of an optical matter wave interferometer*. Diplomarbeit, Universität Wien. 2010.

37. Asenbaum, P., *Towards Cavity Cooling of a Molecular Beam*. Diplomarbeit, Universität Wien. 2009.
38. Schnell, M. and G. Meijer, *Kalte Moleküle: Herstellung, Anwendungen und Herausforderungen*. Angewandte Chemie, 2009. **121**(33): p. 6124-6147.
39. Bethlem, H.L., F.M.H. Crompvoets, R.T. Jongma, S.Y.T. van de Meerakker, and G. Meijer, *Deceleration and trapping of ammonia using time-varying electric fields*. Physical Review A, 2002. **65**(5): p. 053416.
40. Ashkin, A. and J.M. Dziedzic, *Optical Levitation by Radiation Pressure*. Applied Physics Letters, 1971. **19**(8): p. 283-285.
41. Romero-Isart, O., A.C. Pflanzer, M.L. Juan, R. Quidant, N. Kiesel, M. Aspelmeyer, and J.I. Cirac, *Optically levitating dielectrics in the quantum regime: Theory and protocols*. Physical Review A, 2011. **83**(1): p. 013803.
42. Reiger, E., *Novel Source and Detection Techniques for Matter Wave Interferometry*. Dissertation, Universität Wien. 2005.
43. Ding, D., J. Huang, R. Compton, C. Klots, and R. Haufler, *cw laser ionization of C60 and C70*. Physical Review Letters, 1994. **73**(8): p. 1084-1087.
44. von Helden, G., I. Holleman, A.J.A. van Roij, G.M.H. Knippels, A.F.G. van der Meer, and G. Meijer, *Shedding New Light on Thermionic Electron Emission of Fullerenes*. Physical Review Letters, 1998. **81**(9): p. 1825.
45. Arndt, M., O. Nairz, J. Vos-Andreae, C. Keller, G. van der Zouw, and A. Zeilinger, *Wave-particle duality of C60 molecules*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 680-682.
46. Mühlberger, F., R. Zimmermann, and A. Kettrup, *A Mobile Mass Spectrometer for Comprehensive On-Line Analysis of Trace and Bulk Components of Complex Gas Mixtures: Parallel Application of the Laser-Based Ionization Methods VUV Single- Photon Ionization, Resonant Multiphoton Ionization, and Laser-Induced Electron Impact Ionization*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(15): p. 3590-3604.
47. Schriemer, D.C. and L. Li, *Surface Analysis of Bulk Polymers Using Laser-Induced Photoelectron Ionization with Laser Desorption in a Time-of-Flight Mass Spectrometer*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(2): p. 250-256.
48. Vekey, K., *Internal Energy Effects in Mass Spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 1996. **31**(5): p. 445-463.
49. Habicht, S.C., L.M. Amundson, P. Duan, N.R. Vinuela, and H.I. Kenttämä, *Laser-Induced Acoustic Desorption Coupled with a Linear Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer*. Analytical Chemistry, 2009. **82**(2): p. 608-614.
50. Kiewewetter, G., *Laser Desorption as a Source for Molecule Interferometry*. Diplomarbeit, Universität Wien. 2006.
51. Amirav, A. and M.J. Cardillo, *Ion emission due to the scattering of hyperthermal Xe atoms from single crystal surfaces*. Surface Science, 1988. **198**(1-2): p. 192 - 206.
52. Weickhardt, C. and L. Draack, *Hyperthermal surface ionization in a time-of-flight mass spectrometer*. Eur. J. Mass Spectrom., 2000. **6**(4): p. 319-323.
53. Weickhardt, C., L. Draack, and A. Amirav, *Laser Desorption Combined with Hyperthermal Surface Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(20): p. 5602-5607.
54. Hanley, L., O. Kornienko, E.T. Ada, E. Fuoco, and J.L. Trevor, *Surface mass spectrometry of molecular species*. Journal of Mass Spectrometry, 1999. **34**(7): p. 705-723.
55. Hanley, L. and R. Zimmermann, *Light and Molecular Ions: The Emergence of Vacuum UV Single-Photon Ionization in MS*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(11): p. 4174-4182.
56. Akhmetov, A., J.F. Moore, G.L. Gasper, P.J. Koin, and L. Hanley, *Laser desorption postionization for imaging MS of biological material*. Journal of Mass Spectrometry, 2010. **45**(2): p. 137-145.

57. King, B.V., M.J. Pellin, J.F. Moore, I.V. Veryovkin, M.R. Savina, and C.E. Tripa, *Estimation of useful yield in surface analysis using single photon ionisation*. Applied Surface Science, 2003. **203-204**: p. 244-247.
58. Hilbig, R. and R. Wallenstein, *Enhanced production of tunable VUV radiation by phase-matched frequency tripling in krypton and xenon*. Quantum Electronics, IEEE Journal of, 1981. **17**(8): p. 1566-1573.
59. Kung, A.H., *Third-harmonic generation in a pulsed supersonic jet of xenon*. Opt. Lett., 1983. **8**(1): p. 24-26.
60. Schühle, U., J.B. Pallix, and C.H. Becker, *Surface analysis of bulk polymers using single- and multiple-photon ionization*. Vol. 6: AVS. 936-940. 1988.
61. Van Bramer, S.E. and M.V. Johnston, *Tunable, Coherent Vacuum Ultraviolet Radiation for Photoionization Mass Spectrometry*. Appl. Spectrosc., 1992. **46**(2): p. 255-261.
62. Shi, Y.J., S. Consta, A.K. Das, B. Mallik, D. Lacey, and R.H. Lipson, *A 118 nm vacuum ultraviolet laser/time-of-flight mass spectroscopic study of methanol and ethanol clusters in the vapor phase*. The Journal of Chemical Physics, 2002. **116**(16): p. 6990.
63. Tonokura, K., T. Nakamura, and M. Koshi, *Detection of Chlorobenzene Derivatives Using Vacuum Ultraviolet Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Analytical Sciences, 2003. **19**(8): p. 1109-1113.
64. Mühlberger, F., T. Streibel, J. Wieser, A. Ulrich, and R. Zimmermann, *Single Photon Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry with a Pulsed Electron Beam Pumped Excimer VUV Lamp for On-Line Gas Analysis: Setup and First Results on Cigarette Smoke and Human Breath*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(22): p. 7408-7414.
65. Heinbuch, S., M. Grisham, D. Martz, and J.J. Rocca, *Demonstration of a desk-top size high repetition rate soft x-ray laser*. Opt. Express, 2005. **13**(11): p. 4050-4055.
66. Wilson, K.R., M. Jimenez-Cruz, C. Nicolas, L. Belau, S.R. Leone, and M. Ahmed, *Thermal vaporization of biological nanoparticles: fragment-free vacuum ultraviolet photoionization mass spectra of tryptophan, phenylalanine-glycine-glycine, and beta-carotene*. The Journal of Physical Chemistry A, 2005. **110**(6): p. 2106-2113.
67. Plekan, O., V. Feyer, R. Richter, M. Coreno, and K.C. Prince, *Valence photoionization and photofragmentation of aromatic amino acids*. Molecular Physics, 2008. **106**(9-10): p. 1143-1153.
68. Lockyer, N.P. and J.C. Vickerman, *Multiphoton ionization mass spectrometry of small biomolecules with nanosecond and femtosecond laser pulses*. International Journal of Mass Spectrometry, 1998. **176**(1-2): p. 77-86.
69. Lubman, D.M., R. Naaman, and R.N. Zare, *Multiphoton ionization of azulene and naphthalene*. Journal of Chemical Physics, 1980. **72**(5): p. 3034-3040.
70. Ayre, C.R., L. Moro, and C.H. Becker, *Effects of Desorption Method and Photoionizing Laser Characteristics on Molecular Fragmentation*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(10): p. 1610-1619.
71. Weinkauff, R., P. Aicher, G. Wesley, J. Grotemeyer, and E.W. Schlag, *Femtosecond versus Nanosecond Multiphoton Ionization and Dissociation of Large Molecules*. The Journal of Physical Chemistry, 1994. **98**(34): p. 8381-8391.
72. Oudejans, L., A. Touati, and B.K. Gullett, *Real-Time, On-Line Characterization of Diesel Generator Air Toxic Emissions by Resonance-Enhanced Multiphoton Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(9): p. 2517-2524.
73. Houston, C.T. and J.P. Reilly, *Photoionization Studies of Chromophore-Labeled Amino Acids and Peptides*. The Journal of Physical Chemistry A, 2000. **104**(45): p. 10383-10391.
74. Witzel, B., C. Uiterwaal, H. Schröder, D. Charalambidis, and K.L. Kompa, *Analysis of multiphoton ionization of metal atoms in the saturation regime using subpicosecond KrF laser pulses*. Physical Review A, 1998. **58**(5): p. 3836-3848.

75. Grotemeyer, J. and E.W. Schlag, *Biomolecules in the gas phase: multiphoton ionization mass spectrometry*. Accounts of Chemical Research, 1989. **22**(11): p. 399-406.
76. Dixit, S.N. and V. McKoy, *Theory of resonantly enhanced multiphoton processes in molecules*. Journal of Chemical Physics, 1984. **82**(8): p. 3546.
77. Pallix, J.B., U. Schuhle, C.H. Becker, and D.L. Huestis, *Advantages of single-photon ionization over multiphoton ionization for mass-spectrometric surface analysis of bulk organic polymers*. Analytical Chemistry, 1989. **61**(8): p. 805-811.
78. Köster, C. and J. Grotemeyer, *Single-photon and multi-photon ionization of infrared laser-desorbed biomolecules*. Organic Mass Spectrometry, 1992. **27**(4): p. 463-471.
79. Ledingham, K.W.D. and R.P. Singhal, *High intensity laser mass spectrometry -- a review*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1997. **163**(3): p. 149-168.
80. Aicher, K.P., U. Wilhelm, and J. Grotemeyer, *Multiphoton ionization of molecules: A comparison between femtosecond and nanosecond laser pulse ionization efficiency*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1995. **6**(11): p. 1059-1068.
81. Marksteiner, M., *Production and detection of neutral molecular beams: From single amino acids to biomolecular complexes*. Dissertation, Universität Wien. 2010.
82. Edirisinghe, P.D., S.S. Lateef, C.A. Crot, L. Hanley, M.J. Pellin, W.F. Calaway, and J.F. Moore, *Derivatization of Surface-Bound Peptides for Mass Spectrometric Detection via Threshold Single Photon Ionization*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(15): p. 4267-4270.
83. Edirisinghe, P.D., J.F. Moore, W.F. Calaway, I.V. Veryovkin, M.J. Pellin, and L. Hanley, *Vacuum Ultraviolet Postionization of Aromatic Groups Covalently Bound to Peptides*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(16): p. 5876-5883.
84. Edirisinghe, P.D., J.F. Moore, K.A. Skinner-Nemec, C. Lindberg, C.S. Giometti, I.V. Veryovkin, J.E. Hunt, M.J. Pellin, and L. Hanley, *Detection of In Situ Derivatized Peptides in Microbial Biofilms by Laser Desorption 7.87 eV Postionization Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2006. **79**(2): p. 508-514.
85. Hanley, L., P.D. Edirisinghe, W.F. Calaway, I.V. Veryovkin, M.J. Pellin, and J.F. Moore, *7.87eV postionization of peptides containing tryptophan or derivatized with fluorescein*. Applied Surface Science, 2006. **252**(19): p. 6723-6726.
86. Zhou, M., C. Wu, A. Akhmetov, P.D. Edirisinghe, J.L. Drummond, and L. Hanley, *7.87 eV Laser Desorption Postionization Mass Spectrometry of Adsorbed and Covalently Bound Bisphenol A Diglycidyl Methacrylate*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007. **18**(6): p. 1097-1108.
87. Schlag, E.W., J. Grotemeyer, and R.D. Levine, *Do large molecules ionize?* Chemical Physics Letters, 1992. **190**(6): p. 521-527.
88. Schlag, E.W. and R.D. Levine, *Ionization, charge separation, charge recombination, and electron transfer in large systems*. The Journal of Physical Chemistry, 1992. **96**(26): p. 10608-10616.
89. Becker, C.H. and K. Wu, *On the photoionization of large molecules*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1995. **6**(10): p. 883-888.
90. Anex, D.S., M.S. de Vries, A. Knebelkamp, J. Bargon, H.R. Wendt, and H.E. Hunziker, *Resonance-enhanced two-photon ionization time-of-flight spectroscopy of cold perfluorinated polyethers and their external and internal van der Waals dimers*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1994. **131**: p. 319-334.
91. Marksteiner, M., P. Haslinger, H. Ulbricht, M. Sclafani, H. Oberhofer, C. Dellago, and M. Arndt, *Gas-Phase Formation of Large Neutral Alkaline-Earth Metal Tryptophan Complexes*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2008. **19**(7): p. 1021-1026.
92. Hillenkamp, F. and M. Karas, *Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience*. International Journal of Mass Spectrometry, 2000. **200**(1-3): p. 71-77.

93. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Analytical Chemistry, 1988. **60**(20): p. 2299-2301.
94. Hillenkamp, F., M. Karas, R.C. Beavis, and B.T. Chait, *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(24): p. 1193A-1203A.
95. Hackermüller, L., *Interferometrie mit großen Molekülen: Kohärenz, Dekohärenz und die Entwicklung neuer Laserdesorptionsquellen*. Dissertation, Universität Wien. 2005.
96. Hillenkamp, F. and J. Peter-Katalinic, *MALDI MS. A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH. 2007.
97. Knochenmuss, R., *Ion formation mechanisms in UV-MALDI*. Analyst, 2006. **131**: p. 966-986.
98. Dreisewerd, K., S. Berkenkamp, A. Leisner, A. Rohlfing, and C. Menzel, *Fundamentals of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with pulsed infrared lasers*. International Journal of Mass Spectrometry, 2003. **226**(1): p. 189 - 209.
99. Berkenkamp, S., C. Menzel, M. Karas, and F. Hillenkamp, *Performance of Infrared Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry with Lasers Emitting in the 3 μ m Wavelength Range*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1997. **11**(13): p. 1399–1406.
100. Menzel, C., S. Berkenkamp, and F. Hillenkamp, *Infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with a transversely excited atmospheric pressure carbon dioxide laser at 10.6 μ m wavelength with static and delayed ion extraction*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1999. **13**(1): p. 26-32.
101. Dreisewerd, K., *The Desorption Process in MALDI*. Chemical Reviews, 2003. **103**(2): p. 395-426.
102. Knochenmuss, R. and L.V. Zhigilei, *Molecular dynamics simulations of MALDI: laser fluence and pulse width dependence of plume characteristics and consequences for matrix and analyte ionization*. Journal of Mass Spectrometry, 2010. **45**(4): p. 333–346.
103. Zhigilei, L.V., E. Leveugle, B.J. Garrison, Y.G. Yingling, and M.I. Zeifman, *Computer Simulations of Laser Ablation of Molecular Substrates*. Chemical Reviews, 2003. **103**(2): p. 321-348.
104. Dreisewerd, K., M. Schürenberg, M. Karas, and F. Hillenkamp, *Matrix-assisted laser desorption/ionization with nitrogen lasers of different pulse widths*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1996. **154**(3): p. 171-178.
105. Menzel, C., K. Dreisewerd, S. Berkenkamp, and F. Hillenkamp, *The role of the laser pulse duration in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2002. **13**(8): p. 975-984.
106. Dreisewerd, K., M. Schürenberg, M. Karas, and F. Hillenkamp, *Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1995. **141**(2): p. 127 - 148.
107. Qiao, H., V. Spicer, and W. Ens, *The effect of laser profile, fluence, and spot size on sensitivity in orthogonal-injection matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**(18): p. 2779-2790.
108. Guenther, S., M. Koestler, O. Schulz, and B. Spengler, *Laser spot size and laser power dependence of ion formation in high resolution MALDI imaging*. International Journal of Mass Spectrometry, 2010. **294**(1): p. 7-15.
109. Holle, A., H. A., K. M., and J. Höhndorf, *Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance*. Journal of Mass Spectrometry, 2006. **41**(6): p. 705–716.
110. Batoy, S.M.A.B., E. Akhmetova, S. Miladinovic, J. Smeal, and C.L. Wilkins, *Developments in MALDI Mass Spectrometry: The Quest for the Perfect Matrix*. Applied Spectroscopy Reviews, 2008. **43**(6): p. 485-550.

111. Strupat, K., M. Karas, and F. Hillenkamp, *2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1991. **111**: p. 89 - 102.
112. Juhasz, P., C.E. Costello, and K. Biemann, *Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry with 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid matrix*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1993. **4**(5): p. 399-409.
113. Beavis, R.C., B.T. Chait, and K.G. Standing, *Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1989. **3**(12): p. 436-439.
114. Wu, K.J., A. Steding, and C.H. Becker, *Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1993. **7**(2): p. 142-146.
115. Tang, K., N.I. Taranenko, S.L. Allman, C.H. Chen, L.Y. Chág, and K.B. Jacobson, *Picolinic acid as a matrix for laser mass spectrometry of nucleic acids and proteins*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1994. **8**(9): p. 673-677.
116. Sauer, S., *The essence of DNA sample preparation for MALDI mass spectrometry*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2007. **70**(2): p. 311 - 318.
117. Cai, Y., W.P. Peng, S.J. Kuo, S. Sabu, C.C. Han, and H.C. Chang, *Optical Detection and Charge-State Analysis of MALDI-Generated Particles with Molecular Masses Larger Than 5 MDa*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(17): p. 4434-4440.
118. Nielen, M.W.F., *Maldi time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers*. Mass Spectrometry Reviews, 1999. **18**(5): p. 309-344.
119. Karas, M., H. Ehring, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat, F. Hillenkamp, M. Grehl, and B. Krebs, *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with additives to 2,5-dihydroxybenzoic acid*. Organic Mass Spectrometry, 1993. **28**(12): p. 1476-1481.
120. Landry, F., *A Method for Application of Samples to Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Targets That Enhances Peptide Detection*. Analytical Biochemistry, 2000. **279**(1): p. 1-8.
121. Kussmann, M., E. Nordhoff, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-Larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palm, and P. Roepstorff, *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Sample Preparation Techniques Designed for Various Peptide and Protein Analytes*. Journal of Mass Spectrometry, 1997. **32**(6): p. 593-601.
122. Krüger, R., *Untersuchungen zum Einbau von Analytionen in MALDI Matrices sowie zur Ionisation und Adduktbildung in der MALDI-Massenspektrometrie* Dissertation, Frankfurt am Main: Johann Wolfgang Goethe-Universität. 2003.
123. Glückmann, M. and M. Karas, *The initial ion velocity and its dependence on matrix, analyte and preparation method in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization*. Journal of Mass Spectrometry, 1999. **34**(5): p. 467-477.
124. Perera, I.K., J. Perkins, and S. Kantartzoglou, *Spin-coated samples for high resolution matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of large proteins*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1995. **9**(2): p. 180-187.
125. Cohen, S.L. and B.T. Chait, *Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(1): p. 31-37.
126. Keller, B.O. and L. Li, *Three-layer matrix/sample preparation method for MALDI MS analysis of low nanomolar protein samples*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006. **17**(6): p. 780-785.
127. Dai, Y., R.M. Whittall, and L. Li, *Two-Layer Sample Preparation: A Method for MALDI-MS Analysis of Complex Peptide and Protein Mixtures*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(5): p. 1087-1091.

128. Spengler, B. and V. Bökelmann, *Angular and time resolved intensity distributions of laser-desorbed matrix ions*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 1993. **82**(2): p. 379-385.
129. Juhasz, P., M.L. Vestal, and S.A. Martin, *On the initial velocity of ions generated by matrix-assisted laser desorption ionization and its effect on the calibration of delayed extraction time-of-flight mass spectra*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1997. **8**(3): p. 209 - 217.
130. Beavis, R.C. and B.T. Chait, *Velocity distributions of intact high mass polypeptide molecule ions produced by matrix assisted laser desorption*. Chemical Physics Letters, 1991. **181**(5): p. 479 - 484.
131. Johnson, R.E. and Y. LeBeyec, *Angular distribution of the ejecta in matrix-assisted laser desorption/ionization: model dependence*. International Journal of Mass Spectrometry, 1998. **177**(2-3): p. 111-118.
132. Ayala, E., C. Costa Vera, and P. Håkansson, *The angular distribution of neutral poly-alanine molecules produced in a matrix-assisted laser desorption/ionization process*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1999. **13**(9): p. 792-797.
133. Huth-Fehre, T., C.H. Becker, and R.C. Beavis, *Energetics of gramicidin S after UV laser desorption from a ferulic acid matrix*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1991. **5**(8): p. 378-382.
134. Puretzky, A.A. and D.B. Geohegan, *Gas-phase diagnostics and LIF-imaging of 3-hydroxypicolinic acid maldi-matrix plumes*. Chemical Physics Letters, 1998. **286**(5-6): p. 425 - 432.
135. Puretzky, A.A. and D.B. Geohegan, *LIF imaging and gas-phase diagnostics of laser desorbed MALDI-matrix plumes*. Applied Surface Science, 1998. **127-129**: p. 248-254.
136. Puretzky, A.A., D.B. Geohegan, G.B. Hurst, M.V. Buchanan, and B.S. Luk'yanchuk, *Imaging of Vapor Plumes Produced by Matrix Assisted Laser Desorption: A Plume Sharpening Effect*. Phys. Rev. Lett., 1999. **83**(2): p. 444-447.
137. Zhang, W. and B.T. Chait, *Radial velocity distributions of molecular ions produced by matrix-assisted laser desorption/ionization*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1997. **160**(1-3): p. 259-267.
138. Alexander, J.D., L. Graham, C.R. Calvert, O. Kelly, R.B. King, I.D. Williams, and J.B. Greenwood, *Determination of absolute ion yields from a MALDI source through calibration of an image-charge detector*. Measurement Science and Technology, 2010. **21**(4): p. 045802.
139. Dashtiev, M., E. Wäfler, U. Röhlting, M. Gorshkov, F. Hillenkamp, and R. Zenobi, *Positive and negative analyte ion yield in matrix-assisted laser desorption/ionization*. International Journal of Mass Spectrometry, 2007. **268**(2-3): p. 122-130.
140. Westmacott, G., W. Ens, and K.G. Standing, *Secondary ion and electron yield measurements for surfaces bombarded with large molecular ions*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 1996. **108**(3): p. 282-289.
141. Twerenbold, D., D. Gerber, D. Gritti, Y. Gonin, A. Netuschill, F. Rossel, D. Schenker, and J.-L. Vuilleumier, *Single molecule detector for mass spectrometry with mass independent detection efficiency*. PROTEOMICS, 2001. **1**(1): p. 66-69.
142. Park, M.A., J.H. Callahan, and A. Vertes, *An inductive detector for time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1994. **8**(4): p. 317-322.
143. Loboda, A.V., S. Ackloo, and I.V. Chernushevich, *A high-performance matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometer with collisional cooling*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**(22): p. 2508-2516.
144. Löwenich, D. and K. Kleinermanns, *Porphyrin Fluorescence Dominates UV Photoemission of Folded Cytochrome c*. Photochemistry and Photobiology, 2007. **83**(6): p. 1308-1312.

145. Hirayama, K., S. Akashi, M. Furuya, and K.-i. Fukuhara, *Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990. **173**(2): p. 639-646.
146. Lakowicz, J., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3 ed: Springer. 2006.
147. Hosotsubo, H., K. Arai, and J.-I. Iwamura, *Fluorescence immunological determination of immunoglobulin G in human serum by high-performance liquid gel-permeation chromatography*. Chromatographia, 1988. **25**(2): p. 129-133.
148. Jespersen, S., W.M.A. Niessen, U.R. Tjaden, and J. van der Greef, *Basic matrices in the analysis of non-covalent complexes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 1998. **33**(11): p. 1088-1093.
149. Zehl, M. and G.n. Allmaier, *Ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of intact hemoglobin complex from whole human blood*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004. **18**(17): p. 1932-1938.
150. Farmer, T.B. and R.M. Caprioli, *Determination of protein-protein interactions by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 1998. **33**(8): p. 697-704.
151. Alves, S., M. Kalberer, and R. Zenobi, *Direct detection of particles formed by laser ablation of matrices during matrix-assisted laser desorption/ionization*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**(18): p. 2034-2038.
152. Jackson, S.N., S. Mishra, and K.K. Murray, *Characterization of Coarse Particles Formed by Laser Ablation of MALDI Matrixes*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(47): p. 13106-13110.
153. Comsa, G. and R. David, *Dynamical parameters of desorbing molecules*. Surface Science Reports, 1985. **5**(4): p. 145-198.
154. Levis, R.J., *Laser Desorption and Ejection of Biomolecules From the Condensed Phase into the Gas Phase*. Annual Review of Physical Chemistry, 1994. **45**: p. 483-518.
155. Brown, R.S. and J.J. Lennon, *Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(13): p. 1998-2003.
156. Jones, A.C., M.J. Dale, G.A. Keenan, and P.R.R. Langridge-Smith, *Photoionisation and photodissociation of laser-vaporised metalotetraphenylporphyrins*. Chemical Physics Letters, 1994. **219**(3-4): p. 174-180.
157. Edwards, L., D.H. Dolphin, M. Gouterman, and A.D. Adler, *Porphyrins XVII. Vapor absorption spectra and redox reactions: Tetraphenylporphins and porphin*. Journal of Molecular Spectroscopy, 1971. **38**(1): p. 16-32.
158. Fenyo, D., B.T. Chait, T.E. Johnson, and J.S. Lindsey, *Laser desorption mass spectrometry of synthetic multiporphyrin arrays*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 1997. **1**(1): p. 93-99.
159. Khandelwal, S.C. and J.L. Roebber, *The photoelectron spectra of tetraphenylporphine and some metalotetraphenylporphyrins*. Chemical Physics Letters, 1975. **34**(2): p. 355-359.
160. Wahl, M. and A. Wucher, *VUV photoionization of sputtered neutral silver clusters*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 1994. **94**(1-2): p. 36-46.
161. Fuke, K., *Near threshold photoionization of silicon clusters in the 248-146 nm region: Ionization potentials for Si_n*. J. Chem. Phys., 1993. **99**(10): p. 7807.
162. Kang, Z., Y. Liu, and S.-T. Lee, *Small-sized silicon nanoparticles: new nanolights and nanocatalysts*. Nanoscale, 2011. **3**: p. 777-791.
163. O'Farrell, N., A. Houlton, and B.R. Horrocks, *Silicon nanoparticles: applications in cell biology and medicine*. International Journal of Nanomedicine 2006. **1**(4): p. 451-472.

164. Boyarkin, O.V., S.R. Mercier, A. Kamariotis, and T.R. Rizzo, *Electronic Spectroscopy of Cold, Protonated Tryptophan and Tyrosine*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(9): p. 2816-2817.
165. Mercier, S., *Electronic and Vibrational Spectroscopy of Cold Protonated Amino Acids in the Gas Phase*. Dissertation, École Polytechnique Fédérale de Lausanne. 2008. <http://library.epfl.ch/theses/?nr=4155> (18.1.2012)
166. Ostendorf, A., C.B. Zhang, M.A. Wilson, D. Offenberg, B. Roth, and S. Schiller, *Sympathetic Cooling of Complex Molecular Ions to Millikelvin Temperatures*. Physical Review Letters, 2006. **97**(24): p. 243005.
167. Nimmrichter, S., K. Hammerer, P. Asenbaum, H. Ritsch, and M. Arndt, *Master equation for the motion of a polarizable particle in a multimode cavity*. New Journal of Physics, 2010. **12**(8): p. 083003.
168. Romero-Isart, O., M.L. Juan, R. Quidant, and J.I. Cirac, *Toward quantum superposition of living organisms*. New Journal of Physics, 2010. **12**(3): p. 033015.
169. Golovlev, V.V., S.L. Allman, W.R. Garrett, N.I. Taranenko, and C.H. Chen, *Laser-induced acoustic desorption*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1997. **169-170**: p. 69 - 78.
170. Peng, W.-P., Y.-C. Yang, C.-W. Lin, and H.-C. Chang, *Molar Mass and Molar Mass Distribution of Polystyrene Particle Size Standards*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(21): p. 7084-7089.
171. Drzaic, P.S. and J.I. Brauman, *Infrared multiphoton induced electron detachment from SF₆*. Chemical Physics Letters, 1981. **83**(3): p. 508-511.
172. Goto, M., Y. Yasuda, S. Jinno, T. Takao, K. Hanada, H. Tanuma, T. Azuma, K.I. Sugiura, H. Shiromaru, and Y. Achiba, *Electron detachment of super-excited porphyrin anions in an electrostatic ion storage ring*. The European Physical Journal D - Atomic, Molecular, Optical and Plasma Physics, 2007. **43**(1): p. 65-68.
173. Guan, Z., N.L. Kelleher, P.B. O'Connor, D.J. Aaserud, D.P. Little, and F.W. McLafferty, *193 nm photodissociation of larger multiply-charged biomolecules*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1996. **157-158**(0): p. 357-364.
174. Gabelica, V., T. Tabarin, R. Antoine, F. Rosu, I. Compagnon, M. Broyer, E. De Pauw, and P. Dugourd, *Electron Photodetachment Dissociation of DNA Polyanions in a Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(18): p. 6564-6572.
175. Larrailet, V., R. Antoine, P. Dugourd, and J. Lemoine, *Activated-Electron Photodetachment Dissociation for the Structural Characterization of Protein Polyanions*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(20): p. 8410-8416.
176. Wang, X., *High resolution photoelectron spectroscopy of C₆₀⁻*. J. Chem. Phys., 1999. **110**(17): p. 8217.
177. Schiedt, J. and R. Weinkauff, *Photodetachment photoelectron spectroscopy of mass selected anions: anthracene and the anthracene-H₂O cluster*. Chemical Physics Letters, 1997. **266**(1-2): p. 201-205.
178. Wang, L., *Photoelectron spectroscopy of size-selected transition metal clusters: Fe_n⁻, n=3-24*. J. Chem. Phys., 1995. **102**(24): p. 9480.
179. Zhai, H.-J. and L.-S. Wang, *Probing the Electronic Structure and Band Gap Evolution of Titanium Oxide Clusters (TiO₂)_n- (n = 1-10) Using Photoelectron Spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(10): p. 3022-3026.

Danksagung

Markus Arndt habe ich die Chance zu verdanken, dass ich ein Teil seiner Gruppe sein durfte. Ebenfalls bin ich ihm für das Thema dieser Diplomarbeit und die Ressourcen für dessen Ausarbeitung dankbar. Ich bin dadurch mit soviel spannender Physik und Technologie in Kontakt gekommen, dass es mir schwer fallen würde, das Gebiet der Quanten und Moleküle zu verlassen.

Das Eingebundensein in eine Arbeitsgruppe, und im Weiteren in eine Vielzahl von Arbeitsgruppen durch regelmäßige Vorträge und Konferenzen, haben das letzte Jahr meines Diplomstudiums zu etwas Besonderem gemacht. Deshalb danke ich an dieser Stelle auch allen Professoren und allen administrativen Kräften des VCQ für die Möglichkeiten, die sie jungen Physikern bieten.

Ich bedanke mich bei Philipp Schmid für das vertraut machen mit Allem, was es in den Labors so gibt – für das Zeigen von Handgriffen, für das Erklären von kleinen Schrauben und großen Zusammenhängen. Ich bedanke mich für sein immer offenes Ohr für meine Anliegen und Probleme. Ich bedanke mich für die neun Monate Zusammenarbeit im Labor und schließlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiters danke ich Nadine Dörre und Philipp Haslinger – ich habe mich immer gefreut euch zu sehen. Dann danke ich Thomas Juffmann und Adriana Milic – euch zu sehen hat mich auch immer gefreut. Michele Sclafani bin ich für gute Musik und dem Wissen dankbar, wo sich der Parthenon befindet, sowie für die Zeit im Labor gemeinsam mit Markus Marksteiner. Sandra Eibenberger bin ich besonders dankbar für das Teilen der Teilchen aus Basel und der Chemie. Philipp Geyer für Ratschläge bezüglich Elektronik und Programmieren. Bei Jonas Rodewald, einem sehr angenehmen Sitznachbarn, bedanke ich mich für ebenso sehr angenehme Gespräche. Stefan Gerlich vor allem, weil er mich über das Quantenoptikpraktikum als erster mit Materiewellen in Kontakt brachte. Ich danke Mathias Tomandl, den ich hoffentlich in Zukunft kontaktieren kann, wenn ich Fragen bezüglich einer Karriere als Lehrer habe. Ich danke Peter Asenbaum, bei dem es immer coole Optik zu sehen gab und der mich zwischendurch mal aufmuntern durfte. Und besonders bedanke ich mich bei Stefan Nimmrichter für – manchmal haaresträubende – Diskussionen über was auch immer, für den gemeinsamen Besuch von Philosophievorlesungen und für regelmäßige Filmempfehlungen.

Die Werkstätte der Fakultät für Physik hat für die Fertigung von dringend benötigten Bauteilen gesorgt. Dafür bedanke ich mich besonders bei Ugur Yildirim und Gerald Prager, sowie bei Stefan Loyer.

Zu danken habe ich auch Marcel Major und Jens Tüxen auf der Universität Basel für das zur Verfügung stellen von perfluoroalkyl-funktionalisierten Porphyrinen, die bei mir nicht nur einmal für Überraschung gesorgt haben.

Für eine ausreichende Finanzierung des Projekts sowie ein Stipendium hat der Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung Österreichs gesorgt, wofür ich mich bedanke.

Ein Danke geht an alle, die nicht genau wussten, was ich machte, aber genau wussten, dass ich machte: Linda & Stefan, Lukas, Max, Dominik, Seba, Philipp, Selina, Benni, Nikolaus, Markus, Denise, Jonathan, Susa, Kristl, Alexia, Lotti & Stoffi, Jorge, Matthäus, Jakub, Jura, Flora & Lukas und Charlotte – ihr seid meine Besten!

Schließlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, die alle meine Höhen und Tiefen miterlebt haben und mir stets unterstützend zur Seite standen. Bei meinem Vater bedanke ich mich für die nicht selbstverständliche finanzielle Unterstützung, die mir meine Handlungsfreiheit und das Betreiben eines Doppelstudiums ermöglicht haben. Meiner Mutter verdanke ich ihre unendliche Fürsorge. Meine Schwester Bettina und mein Bruder Stefan stellen für mich Vorbilder dar und meine Schwester Katharina wird einmal eines für mich sein – schön, dass ich euch hab'.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anton Frederik Stöhr
Geburtsdatum:	27.02.1986
Geburtsort	Wien, Österreich
Eltern	Zora und Hans Georg Stöhr
Nationalität	Österreich

Ausbildung

2010-2012	Mitarbeit in der Forschungsgruppe Quantum Nanophysics & Molecular Quantum Optics von Professor Markus Arndt
2006-2007	Zivildienst
2005-2012	Universität Wien Studium der Physik und der Philosophie
2000-2005	HTL Ottakring Abteilung Elektronik und Technische Informatik
1996-2000	Gymnasium Albertus Magnus
1992-1996	Volksschule Lacknergasse

Berufliche Tätigkeiten

07/2006-03/2007	Zivildienst im Haus der Barmherzigkeit Krankenpflegeanstalt für chronisch Kranke Unterstützung und Entlastung des Pflegepersonals
07/2003	Ferialpraxis am Institut für biomedizinische Technik und Physik Mitarbeit am EU-Projekt RISE, Unterstützung der technologischen Infrastruktur, Duplizieren von Muskelstimulationsgeräten
07/2002	Ferialpraxis am Institut für biomedizinische Forschung

Wien, Januar 2012