

**Untersuchung von Parametern und Methoden  
der orts aufgelösten MALDI-MS  
mit Flugzeitspektrometern**

Inauguraldissertation zur Erlangung des  
akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Oliver Marc Schulz  
aus Wetzlar

am Fachbereich 08: Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität  
Giessen

2014

Dekan : PROF. DR. HOLGER ZORN  
Erstgutachter : PROF. DR. BERNHARD SPENGLER <sup>1</sup>  
Zweitgutachter : PROF. DR. HOLGER ZORN <sup>2</sup>  
Tag der Disputation : 28.01.2014

---

<sup>1</sup>Institut für Anorganische und Analytische Chemie, JLU Giessen

<sup>2</sup>Institut für Lebensmittelchemie & Lebensmittelbiotechnologie, JLU Giessen



VERSICHERUNG NACH § 17.2 DER PROMOTIONSORDNUNG VOM 04.02.2005

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Oliver Schulz

(Dipl.-Biol.)

Gießen, den 15.11.2013

„Sag Freund, was ist denn Theorie ?  
Wenn's stimmen soll und stimmt doch nie.  
Und was ist Praxis ?  
Frag nicht dumm, wenn's stimmt  
und keiner weiß warum. “

*E. Wittmann (1976)*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1	Kurzzusammenfassung . . . . .	1
1.2	Abstract . . . . .	2
<b>I</b>	<b>Einleitung, Grundlagen und Methoden</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1	Zielsetzung . . . . .	11
2.1.1	Gliederung der experimentellen Arbeiten . . . . .	17
2.1.2	Motivation der Experimente . . . . .	18
2.1.3	Vorüberlegungen . . . . .	19
2.2	Ortsaufgelöst abbildende Massenspektrometrie . . . . .	24
2.2.1	Aufnahmetechniken . . . . .	26
2.2.2	Analytische Auflösung . . . . .	29
2.2.3	Alternative Desorptions-/Ionisierungsverfahren . . . . .	29
2.3	Präparationstechniken zur ortsaufgelösten MALDI-MS . . . . .	31
2.3.1	Einflussgrößen . . . . .	31
2.3.2	Präparation nativer biologischer Proben . . . . .	32
2.3.3	Thermischer Droplet-On-Demand Generator . . . . .	33
2.3.4	Zweikomponentensprühtechnik . . . . .	35
2.3.5	Sprüh- und Tropfenbildung . . . . .	35
2.3.6	Fazit . . . . .	37
<b>3</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>41</b>
3.1	Probenpräparation und Ionenextraktion . . . . .	41
3.1.1	MALDI-Matrix und Matrixsysteme . . . . .	41
3.1.2	Desorption, Ablation und Ionisierung . . . . .	44
3.1.3	Gasexpansion im Vakuum . . . . .	56
3.2	Aufbau und Struktur nativer biologischer Proben . . . . .	62
3.2.1	Eukaryotisches Plasmalemma . . . . .	63
3.2.2	Gewebe . . . . .	71
3.2.3	Fazit . . . . .	76
3.3	MALDI-Massenspektrometrie . . . . .	76
3.3.1	Signalcharakteristik und Verarbeitung . . . . .	76
3.3.2	Messwertlage und Beurteilung . . . . .	90
3.3.3	Native biologische Proben . . . . .	95
3.3.4	Arbeitshypothese . . . . .	97
3.3.5	Rauschen und Pegel . . . . .	99
3.3.6	Fazit . . . . .	109
3.3.7	Elektrostatische Ionenquelle . . . . .	109
3.3.8	Exakte Flugzeitgleichung . . . . .	110
3.3.9	Näherung der Ionenflugzeit . . . . .	114
3.3.10	Empirische Kalibrierfunktion(en) . . . . .	122
3.4	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) . . . . .	127

3.4.1	Reflexions-Modus (3D-CTF)	127
3.4.2	TEM <sub>00</sub> – Laserstrahlprofil	132
3.4.3	Taille-zu-Taille Abbildung	134
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>141</b>
4.1	Verwendete Geräte	141
4.1.1	Massenspektrometer ALADIM II	141
4.1.2	Massenspektrometer LAMMA 2000	146
4.1.3	Labormikroskop Olympus BX 41	156
4.2	Material	159
4.2.1	Chemikalien zur Analyse und Präparation	159
4.2.2	Probenträger und Zubehör für die Massenspektrometrie	168
4.2.3	Native biologische Proben	172
4.3	Messmethoden	176
4.3.1	Probenorientierung und optische Kontrolle	177
4.3.2	Ablationsbestimmung	177
4.3.3	Desorptionsbestimmung	178
4.3.4	Laseroptische Infokusmessungen	178
4.3.5	Laseroptische Defokusmessungen	179
4.3.6	Beschreibung der MS-Methoden	179
4.3.7	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	184
4.4	Messaufbauten zur Systemcharakterisierung	185
4.4.1	Vermessung der Laserstrahltaillen	185
4.4.2	Bestimmung des elektronischen Rauschverhaltens der Spektrometer	185
4.4.3	Ermittlung der Fluidtransportraten bei der Sprühpräparationsmethode	187
4.4.4	Bestimmung der effektiven Signalverstärkung bei den MS-Messungen	189
4.5	Protokolle der Präparationstechniken	190
4.5.1	Vorversuche und Bewertung	190
4.5.2	Zweikomponenten-Sprühtechnik	193
4.5.3	Drucktechnik	202
<b>II</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>203</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse der Experimente zur Präparation und MS-Charakteristik</b>	<b>205</b>
5.1	Probenpräparation	205
5.1.1	Beobachtungen zum Lösungsmiteleinschluss und Salzkontamination	205
5.1.2	Beobachtungen zur Kristallisation der MALDI-Matrix 2,5-DHB	209
5.2	Zweikomponentensprüh- und Drucktechnik	213
5.2.1	Testprotokoll für die Matrixpräparation	214
5.3	Aufbau der Sprühapparatur und der Druckeinrichtung	215
5.3.1	Sprühpräparationen nach Testprotokoll	219
5.3.2	Sprühpräparationen an nativen biologischen Proben	223
5.3.3	Quantitativer Matrixauftrag bei Overspray-Bedingungen	227
5.3.4	Sprühpräparation an artifiziellen Proben	227
5.3.5	Druckpräparation nach Testprotokoll	232
5.3.6	Fazit	235
5.4	Signalcharakteristik in MALDI-TOF-Massenspektren	237
5.4.1	Signalintensität als Funktion des Desorptionsortes und der Pulszahl	237
5.4.2	Signalintensität in Abhängigkeit von der Matrix- und Analytverteilung	246
5.4.3	Signal-zu-Rausch Entwicklungen	247
5.4.4	Sensitivitätsvergleich der Spektrometer ALADIM II und LAMMA 2000	256
5.4.5	Fragmentierungsversuche an Peptidanalyten	262
5.4.6	Durchschnitts-SNR über alle MS-Messungen	268
5.4.7	SNR- und SAR-Entwicklung	268
5.4.8	Fazit	270
5.4.9	Massenrichtigkeit, Massengenauigkeit und Kalibrierung	274

5.4.10	Fazit . . . . .	286
5.4.11	Laserablationsbestimmung . . . . .	288
5.4.12	3D-Intensitätsverlauf der Laserprofile . . . . .	298
5.4.13	Angewandte Messmethodiken . . . . .	310
5.4.14	Fazit . . . . .	324
5.5	Vergleich unterschiedlicher biologischer Spezies . . . . .	325
5.5.1	Vergleichsanalyse anhand erstellter Ranglisten . . . . .	326
5.5.2	Mikrosondenmessungen an Endoparasit in quergestreifter Mausmuskulatur . . . . .	329
5.5.3	Mikrosondenmessungen an humanen Einzelzellen . . . . .	337
5.5.4	Mikrosondenmessungen an Hefezellen . . . . .	341
5.5.5	Fazit . . . . .	346
<b>6</b>	<b>Ergebnisse der bildgebenden Experimente</b>	<b>349</b>
6.1	Artifizielle Matrix-Präparationen . . . . .	349
6.1.1	Abbildung von Hohlraumlinien nach Sprühpräparation . . . . .	349
6.1.2	Abbildung von Hohlraumlinien nach Dried droplet-Präparation . . . . .	353
6.1.3	Abbildung von Hohlraumkreuzen nach Sprühpräparation . . . . .	355
6.2	Laterale analytische Auflösung am Beispiel artifizieller Proben . . . . .	360
6.2.1	MALDI-Vermessung von Linienstrukturen auf einer Goldoberfläche mit räumlicher Submikrometerauflösung . . . . .	360
6.3	In- und Defokussmessungen zur Charakterisierung von Abbildungseigenschaften . . . . .	365
6.3.1	Abbildung von Hohlraumkreuzen nach Sprühpräparation der Matrix . . . . .	365
6.4	Native biologische Präparate . . . . .	371
6.4.1	Vermessung von Hefezellen und Valinomycin in Kreuzhohlräumen nach Sprühpräparation der Matrix . . . . .	371
6.4.2	Vermessung eines Nierengewebeschnittes nach Sprühpräparation und Umkristallisation der Matrix . . . . .	376
6.4.3	Vermessung von Hefezellen auf einer Goldoberfläche nach Sprühpräparation der Matrix . . . . .	380
6.4.4	Komplementäre MS-Analytik an Drüsengewebepräparaten des Kopffüßlers <i>Nautilus pompilius L.</i> . . . . .	383
6.4.5	Fazit . . . . .	397
6.5	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie . . . . .	399
6.5.1	Blendenauswahl und Messmethodik . . . . .	399
6.5.2	Rauheit einer Targetoberfläche . . . . .	401
6.5.3	Ablationsprofil von Hohlraumlinienstrukturen . . . . .	403
6.5.4	Fazit . . . . .	414
<b>7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>415</b>
<b>A</b>	<b>Tabellen und Ergänzungen</b>	<b>417</b>
A.1	Systematik der vermessenen nativen biologischen Proben . . . . .	417
A.2	Naturkonstanten und isotopspezifische Nachkommastellen . . . . .	419
A.3	Lipidzusammensetzung und Lipidmassen . . . . .	422
A.3.1	Phosphatidylcholine . . . . .	423
A.3.2	Phosphatidylethanolamine . . . . .	428
A.3.3	Sphingomyeline . . . . .	433
A.3.4	Plasmalogene und Methyl-PC . . . . .	436
A.4	Glucane . . . . .	437
<b>B</b>	<b>Erläuterungen zur Massenspektrometrie</b>	<b>439</b>
B.1	Aufbau- und Funktionsprinzip . . . . .	439
B.1.1	Trennung von bewegten Ladungen . . . . .	439
B.1.2	MALDI-Ionenquellen . . . . .	442
B.1.3	Analysatortechnik . . . . .	443
B.1.4	Häufig verwendete TOF-MS-Detektoren . . . . .	445
B.1.5	Ionenstrahleigenschaften und Strahlparameter . . . . .	448

B.1.6	Ionentrajektorien in elektrostatischen Längsfeldern . . . . .	453
<b>C</b>	<b>Erläuterungen zur Lichtmikroskopie</b>	<b>459</b>
C.1	Geometrische Optik und Bildkonstruktion . . . . .	459
C.1.1	Abbe'sche Sinusbedingung . . . . .	459
C.1.2	Paraxiale Strahlengleichung . . . . .	460
C.1.3	Paraxiale Schnittweitengleichung . . . . .	461
C.1.4	ABCD-Matrix . . . . .	463
C.1.5	Abbildung am Lichtmikroskop . . . . .	464
C.1.6	Abbildungsgleichung einer dünnen Linse . . . . .	465
C.1.7	Abbildungsmaßstab eines Mikroskopes . . . . .	465
C.1.8	Normalvergrößerung eines Mikroskopes . . . . .	465
C.1.9	Stereoskopische Tiefenwahrnehmung . . . . .	466
C.1.10	Aberrationen und Absorption in dielektrischen Medien . . . . .	468
C.2	Intensität und Wellenausbreitung . . . . .	474
C.2.1	Beugung . . . . .	478
C.2.2	Fourieroptik . . . . .	480
C.2.3	Stigmatische Infokuspunktabbildung . . . . .	480
C.2.4	Ringblende . . . . .	485
C.2.5	Poisson-Spot . . . . .	485
C.2.6	OTF und SR . . . . .	485
C.3	Bewertung optischer Abbildungen . . . . .	486
C.3.1	Kontrast . . . . .	486
C.4	Räumliche Ortsauflösung . . . . .	492
C.4.1	Laterale Auflösung nichtkonfokaler Systeme . . . . .	493
C.4.2	Laterale Auflösung konfokaler Systeme . . . . .	497
C.4.3	Axiale Auflösung . . . . .	498
C.4.4	Nyquist-Kriterium . . . . .	499
<b>D</b>	<b>Einige statistische und physikalische Definitionen</b>	<b>501</b>
D.1	Die Gaussverteilung . . . . .	503
D.1.1	Drittes und viertes Moment einer eingipfligen Verteilung . . . . .	508
D.1.2	Der Korrelationskoeffizient . . . . .	508
D.1.3	Vertrauensbereiche für Punktschätzer . . . . .	509
D.1.4	$\chi^2$ -Verteilung, Cauchy-Lorentz-Verteilung und Entropie der Information . . . . .	510
D.1.5	Die Kombinatorik diskreter Ereignisse und die Poisson-Verteilung . . . . .	512
D.2	Allgemeine Strahlungsparameter . . . . .	513
D.3	Farbsysteme, Farbmodelle, Farbraum und Normung . . . . .	515

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Relative Ionensignalintensität . . . . .	9
2.2	Ionengeschwindigkeit und Impuls . . . . .	9
2.3	Bildgebungsdreieck der orts aufgelösten Massenspektrometrie ( <i>Imaging-triangle</i> ) . . . . .	15
2.4	Pulsprofil und Signalintensität . . . . .	16
2.5	Lasermikrosondenverfahren . . . . .	25
2.6	Aufnahmearten bildgebender MS-Verfahren . . . . .	26
2.7	Bildgebende Massenspektrometrie . . . . .	28
2.8	TIC und Intensitätsverhältnisse . . . . .	30
2.9	Präparation nativer biologischer Proben . . . . .	32
2.10	Artifizielle MALDI Proben: Dried droplet- und Druckpräparation . . . . .	33
2.11	Diskrete Tropfen: Droplet-On-Demand-Verfahren . . . . .	34
2.12	Sprühcharakterisierung: Tropfenbildung und Abriss . . . . .	38
2.13	Sprühcharakterisierung: Strahlzerfallslänge und Zerfallsbereiche . . . . .	39
2.14	Sprühregime in Abhängigkeit von den Rahmenbedingungen . . . . .	40
3.1	Laserpulscharakteristik und Ionenbildungsrate . . . . .	51
3.2	Desorption und Phasenexplosion . . . . .	56
3.3	Schwellenergie ausgewählter Peptidanalyte . . . . .	57
3.4	Kollisionsquerschnitte ausgewählter Peptidionen in der Gasphase . . . . .	58
3.5	Eukaryotischer Zellzyklus . . . . .	64
3.6	Zellen und Micellenmodelle . . . . .	65
3.7	Zellmembran und Zellwand der Bäckerhefe ( <i>S.cerevisiae</i> ) . . . . .	69
3.8	Beispiel-Ionophormolekül: Gramicidin S . . . . .	70
3.9	Absorption . . . . .	74
3.10	Signalform in Massenspektren . . . . .	80
3.11	Signalhäufigkeiten in Massenspektren . . . . .	81
3.12	Phosphatidylcholine . . . . .	83
3.13	HPLC-ELSD-Chromatogramm einiger Lipide . . . . .	84
3.14	Signalverteilungen . . . . .	87
3.15	Theoretische Isotopverteilung von DPPC . . . . .	88
3.16	Charakteristischer Massendefekt am Beispiel ausgewählter Lipide . . . . .	89
3.17	Die Horwitz-Trompete . . . . .	92
3.18	Fehler erster und zweiter Art . . . . .	95
3.19	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) . . . . .	103
3.20	Signal-zu-Rausch-Verhältnis einer typischen PMT-Detektion . . . . .	105
3.21	TOF-Spektren und Rauschen . . . . .	106
3.22	Energiefehlerkorrektur und Ionenspiegel . . . . .	125
3.23	Axiale (Flugzeit)Dispersionen . . . . .	126
3.24	Ideale Modulationsübertragungsfunktion . . . . .	128
3.25	PSF in der Mikroskopie . . . . .	130
3.26	Aberrationen als Isophotenprofil und Ablationsmuster . . . . .	131
3.27	Abbildung von TEM-00-Profilen . . . . .	134
3.28	Gaußstrahl: Abschwächung und Lage . . . . .	138
3.29	Gauss- und Top-hat-Profile . . . . .	139
3.30	Linsenformel und Vergrößerung . . . . .	140



4.1	Aufbauskizze des Spektrometers ALADIM II . . . . .	142
4.2	Ionenquelle am Spektrometer ALADIM II . . . . .	143
4.3	Laserenergie und Strahlabschwächung . . . . .	145
4.4	Ionenquelle am Spektrometer LAMMA 2000 . . . . .	148
4.5	Übersichtsskizze des Spektrometers LAMMA 2000 . . . . .	149
4.6	Wellenfrontkrümmung des Triton 250 Nd:YLF-Laser . . . . .	151
4.7	Laserenergieverlauf im Messaufbau am LAMMA 2000 . . . . .	152
4.8	CLSM-Aufbau am Spektrometer LAMMA 2000 . . . . .	153
4.9	Rise-Time und Transit-Maximum des verwendeten PMT . . . . .	154
4.10	UV-VIS-Labormikroskop Olympus BX 41 . . . . .	157
4.11	Maßstabskalibrierung am Olympusmikroskop . . . . .	158
4.12	Strukturen verwendeter UV-MALDI-Matrizes . . . . .	159
4.13	2,5-Dihydroxybenzoesäure (Gentisinsäure) . . . . .	161
4.14	2,5-DHB-Absorptions- und Fluoreszenzspektrum . . . . .	162
4.15	Spektren von Filzstiftfarbstoff und PEG . . . . .	164
4.16	Industriediamanten . . . . .	167
4.17	Standardprobenträger für biologische MALDI-Proben . . . . .	168
4.18	Strukturierte Silizium-Wafer . . . . .	170
4.19	Vertikal gemittelte horizontale Linienraster . . . . .	171
4.20	A498-Zellen . . . . .	173
4.21	HELA-Zellen . . . . .	173
4.22	T2-Zellen . . . . .	174
4.23	Hefezellen ( <i>S. cerevisiae</i> ) . . . . .	174
4.24	Nierengewebeschnitt (Maus) . . . . .	175
4.25	Kopffüßlergewebe ( <i>Nautilus pompilius</i> l.) . . . . .	175
4.26	<i>Trichinella spiralis</i> in Muskelgewebe der Maus . . . . .	175
4.27	Rasternde bildgebende Laser-Massenspektrometrie . . . . .	176
4.28	3D-Ablationsvermessung . . . . .	178
4.29	Ablaufplan der MS-Messungen . . . . .	181
4.30	Abbildungsprinzip unter Berücksichtigung von Oversampling . . . . .	183
4.31	CLSM-Schema am Spektrometer LAMMA 2000 . . . . .	184
4.32	Aufbau zur Laserstrahltaillenvermessung . . . . .	185
4.33	Rauschmessung am digitalen Speicheroszilloskop . . . . .	186
4.34	Flussratenbestimmung mit thermischem Sensor . . . . .	188
4.35	Relative Signalverstärkung und Netto-MCP-Verstärkung (Gain) am Spektrometer LAM- MA 2000 . . . . .	189
4.36	Evaporation und Analytmigration an MALDI-Proben . . . . .	191
4.37	Lösung und Kristallisation . . . . .	192
4.38	AMCA-Fluoreszenz . . . . .	192
4.39	Optische Matrix-Farbcodierung . . . . .	194
4.40	Zweikomponentensprühapparat . . . . .	195
4.41	Pixelintensität als Funktion von Sprühparametern . . . . .	199
4.42	Sprühverteilung bei 1-D Translation des Sprühkopfes . . . . .	200
4.43	Flussratenvergleich Spritzenpumpe - manuell . . . . .	201
4.44	Tropfenbildung und Abtropfen . . . . .	201
4.45	Modifizierter HP-Deskjet-Drucker . . . . .	202
5.1	2,5-DHB-Spektren . . . . .	207
5.2	Dried droplet-Präparationen . . . . .	211
5.3	Fluoreszenzshift an 2,5-DHB-Präparationen . . . . .	212
5.4	Sprühapparat Skizze 1 . . . . .	216
5.5	Sprühapparat Skizze 2 . . . . .	217
5.6	Sprüh auf Standardtargets - schematischer Vergleich . . . . .	218
5.7	Druckaufbau - Skizze . . . . .	218
5.8	Sprühpräparationen mit Testprotokoll . . . . .	219
5.9	Relative Matrixabdeckung unterschiedlicher Sprühvorgänge . . . . .	220
5.10	Sprühpräparation mit 2,5-DHB: Tropfengröße . . . . .	221

5.11	Sprühpräparation: diskrete Auftragungsbereiche . . . . .	222
5.12	Sprühpräparation von 2,5-DHB zur hochaufgelöst bildgebenden MS-Analytik . . . . .	223
5.13	Sprühpräparationen an nativen Proben: Beispiel 1 . . . . .	225
5.14	Sprühpräparationen an nativen Proben: Beispiel 2 . . . . .	226
5.15	Sprühpräparation an artifiziellen Peptidproben . . . . .	229
5.16	Round-Robin-Experiment: Lipide und Peptide . . . . .	230
5.17	Sprühpräparation an Silizium-Wafer . . . . .	231
5.18	Druckpräparation diskreter Bereiche . . . . .	233
5.19	Druckpräparationen mit flächigem Matrixauftrag . . . . .	234
5.20	Datensatz 2: Intensitätsverteilung benachbarter Desorptionsorte . . . . .	238
5.21	Datensatz 2: Summenintensität in Abhängigkeit der Präparationstechnik und Messstelle . . . . .	239
5.22	Datensatz 1: Kumuliertes Summensignal an Spraypräparationen . . . . .	242
5.23	Datensatz 3: Kumulierte Pulsintensität an identischer Messstelle . . . . .	243
5.24	Summensignale unterschiedlicher Matrices und Analyte . . . . .	245
5.25	Intensität in Abhängigkeit von der Matrix- und Analytverteilung . . . . .	246
5.26	Intensitätsentwicklung: Peptidanalyte und unspezifisches Rauschen . . . . .	248
5.27	SNR kumulierter Signale artifizieller MALDI-Proben . . . . .	249
5.28	Kumuliertes Summensignal von Cholesterol und Substanz P . . . . .	250
5.29	Kumulierte Intensitäten von Phospholipiden aus quergestreifter Mausmuskulatur und He- fezellen . . . . .	251
5.30	Direkter SNR-Vergleich zwischen Linear- und Reflektormodus am ALADIM II . . . . .	253
5.31	PEG- und Substanz P-Intensitäten in Abhängigkeit der Sprühzyklen . . . . .	255
5.32	Gerätevergleich anhand des Peptidanalyten Dynorphin a . . . . .	257
5.33	Substanz P-Konzentrationsreihe am LAMMA 2000 . . . . .	258
5.34	Sprühpräparationen von Myoglobin und Cytochrom C am LAMMA 2000 . . . . .	260
5.35	SNR der Messungen von Myoglobin und Cytochrom C . . . . .	261
5.36	Insulin und Mehrfachladung . . . . .	263
5.37	Fragmentierungsversuche an Valinomycin . . . . .	264
5.38	Round-Robin-Experiment einer Druckpräparation . . . . .	266
5.39	SNR der artifiziellen Druckpräparationen der Round-Robin-Messung . . . . .	267
5.40	SNR als Funktion der Pulsleistung . . . . .	268
5.41	Relatives Signal-zu-Ablationsverhältnis . . . . .	269
5.42	Flugzeitspektren in Abhängigkeit der DELAY-Zeit . . . . .	275
5.43	Flugzeit in Abhängigkeit der DELAY-Zeit . . . . .	276
5.44	Systematischer Einfluss der DE-Schaltung . . . . .	277
5.45	Leistungsspektrum der Schaltpulse charakteristik . . . . .	278
5.46	Nachkalibrierung von TOF-Spektren . . . . .	280
5.47	Massenabweichung und Kalibrierung . . . . .	283
5.48	Laserstrahlführung und Ablationsprofile bei Infokussmessungen . . . . .	288
5.49	Schlüssellochlaserprofil am Spektrometer LAMMA 2000 . . . . .	289
5.50	LDI-Ablationscharakteristik bei In- und Defokussmessungen . . . . .	291
5.51	Ablationsvermessung: 4 und 8 Pulse pro Pixel . . . . .	292
5.52	Ablationsdurchmesser an rotem Farbstoff . . . . .	293
5.53	Ablationsdurchmesser an 2,5-DHB-Matrix . . . . .	294
5.54	Ablation vergleichbarer axialer Probenpositionen: Matrix-Farbstoff . . . . .	295
5.55	Ablationsvolumen und -masse in Matrix und Farbstoff . . . . .	296
5.56	Farbstoffablation bei exzentrischer Justierung des Laser . . . . .	297
5.57	Strahlprofil des Triton 250 Nd:YLF-Laser (LAMMA 2000) . . . . .	299
5.58	Laserintensität als Funktion dynamischer Abschwächung . . . . .	300
5.59	Vermessung der Strahltaile und Fokuslage am Spektrometer LAMMA 2000 . . . . .	301
5.60	Laserfokus am LAMMA 2000 . . . . .	302
5.61	Axialer Intensitätsverlauf des Laserprofils (LAMMA 2000) . . . . .	303
5.62	Theoretische xz-iPSF- und xy-iPSF-Projektionen: Triton 250 (LAMMA 2000) . . . . .	304
5.63	Theoretische xz-iPSF- und xy-iPSF-Projektionen: VSL-337 ND-S (ALADIM II) . . . . .	305
5.64	xz-iPSF- und xy-iPSF-Projektionen mit linearer Intensitätsskalierung (ALADIM II, LAM- MA 2000) . . . . .	306
5.65	VSL-337 ND-S Laserstrahlprofil am Spektrometer ALADIM II . . . . .	307

5.66	VSL-337 ND-S Laserprofil am ALADIM II: Abbildung 1 . . . . .	308
5.67	VSL-337 ND-S Laserprofil am ALADIM II: Abbildung 2 . . . . .	309
5.68	Bildgebende Aufnahmemethoden . . . . .	311
5.69	Oversampling am Beispiel einer 2,5-DHB-Sprühpräparation . . . . .	315
5.70	Undersampling am Beispiel einer 2,5-DHB-Sprühpräparation . . . . .	316
5.71	Undersampling Diagramme . . . . .	317
5.72	TIC im Geschwindigkeits- und Teleskopmodus . . . . .	319
5.73	TIC bei unterschiedlicher Laserstrahljustierung . . . . .	321
5.74	Exzentrische Laserstrahljustierung: LAMMA 2000 . . . . .	322
5.75	SNR bei nichtzentrischer Strahljustierung: LAMMA 2000 . . . . .	323
5.76	Quergestreifter Muskel (Maus) - Hefezellen . . . . .	327
5.77	Vektorplot der Vergleichsmessung: Mausegewebe - Hefezellen . . . . .	328
5.78	Rangvergleich: Mausegewebe - Hefezellen . . . . .	328
5.79	Trichinella spiralis-Kapsel in quergestreifter Mausmuskulatur . . . . .	329
5.80	Dried droplet-Präparation an quergestreiftem Muskelgewebe der Maus . . . . .	331
5.81	DHB-Sprühpräparation an quergestreiftem Muskelgewebe der Maus . . . . .	335
5.82	Rangvergleich der Maus-Gewebemessungen . . . . .	336
5.83	Zellkulturmessungen . . . . .	337
5.84	Rangdifferenz-Plot der Zellkulturmessungen . . . . .	338
5.85	Sprühpräparation an Hefezellen . . . . .	342
6.1	MS-Abbildung von Hohlraumlinien eines Si-Wafer . . . . .	351
6.2	Epifluoreszenz der Matrix in Hohlraumlinien . . . . .	352
6.3	MS-Abbildung von Peptiden in Hohlraumlinien . . . . .	354
6.4	MS-Abbildung von Hohlraumkreuzen . . . . .	356
6.5	Logische Operationen bei Überlagerung von MS-Abbildungen . . . . .	357
6.6	Lichtmikroskopisches Kontrollbild mit 2,5-DHB-Matrix . . . . .	358
6.7	Lichtmikroskopisches Kontrollbild mit Farbstoff . . . . .	359
6.8	Positionierungsfehler: Piezotisch LAMMA 2000 . . . . .	359
6.9	Laterale Ortsauflösung: LAMMA 2000 . . . . .	361
6.10	Laterale Ortsauflösung am Spektrometer LAMMA 2000 (1) . . . . .	363
6.11	Laterale Ortsauflösung am Spektrometer LAMMA 2000 (2) . . . . .	364
6.12	Laserprofil bei In- und Defokussmessungen . . . . .	366
6.13	In- und Defokussmessungen an Kreuzhohlräumen mit 4 $\mu\text{m}$ bis 500 nm Pixelgröße . . . . .	368
6.14	In- und Defokussmessungen an Kreuzhohlräumen mit 250 nm Pixelgröße . . . . .	369
6.15	Oversampling bei 1 $\mu\text{m}$ Laserspot- $\varnothing$ und 500 nm Pixelgröße . . . . .	369
6.16	Oversampling bei 1 $\mu\text{m}$ Laserspot- $\varnothing$ und 250 nm Pixelgröße . . . . .	370
6.17	LDI-TOF-Spektren von Valinomycin . . . . .	374
6.18	Valinomycin an Hefezellen in Kreuzhohlraumstrukturen . . . . .	375
6.19	SMALDI-MS an Nierengewebe . . . . .	378
6.20	Nierengewebe Überlagerungsbilder . . . . .	379
6.21	SMALDI-MS an Hefezellen . . . . .	382
6.22	Kombinierte MS-Analytik . . . . .	390
6.23	MSI von Nautilusgewebe . . . . .	391
6.24	Nautilus-Präparat: Online TIC-Chromatogramme (Summit-HPLC) . . . . .	392
6.25	Nautilus-Präparat: Online nanoHPLC-MS (Ultimate-HPLC) . . . . .	393
6.26	Nautilus-Präparat: Glucane und MSMS-Messung . . . . .	394
6.27	Nautilus-Präparat: Flugzeitspektrenvergleich . . . . .	395
6.28	SMALDI an Nautilus pompilius L. . . . .	396
6.29	CLSM-Messung an einer goldbeschichteten Aluminiumoberfläche . . . . .	400
6.30	Halbseitiges Airy-Profil im Bereich der CLSM-Blende . . . . .	401
6.31	Rauheit eines Standardprobenträgers . . . . .	402
6.32	CLSM-Messung: Linienhohlstruktur nach MALDI-Präparation . . . . .	405
6.33	Überlagerung der CLSM und MS-Messungen . . . . .	406
6.34	CLSM an Hohlraumlinien . . . . .	408
6.35	Histogramme der 20 $\mu\text{m}$ -Messungen . . . . .	409
6.36	Diagramm gemittelter Linienraster . . . . .	409

6.37	MTF der CLSM-Aufnahmen von Linienstrukturen . . . . .	410
6.38	Kombination der bildgebenden Methoden am Beispiel der Hohlraumlinien . . . . .	412
6.39	UV-MS-Vergleich der Hohlraumlinien . . . . .	413
B.1	Parabelspektrograph . . . . .	441
B.2	Dichteverteilung im Ionenstrahlprofil . . . . .	451
B.3	Simulation von Ionentrajektorien . . . . .	453
B.4	Ionentrajektorien und Potentialverlauf . . . . .	457
B.5	Elektrostatische Elemente . . . . .	457
C.1	Brechung an Sphären . . . . .	462
C.2	Lichtoptische Sammellinse . . . . .	463
C.3	Mikroskopobjektiv und Strahlengang . . . . .	467
C.4	Reflexion . . . . .	470
C.5	Sphärische Längs- und Queraberration . . . . .	473
C.6	Aberrationen und Zernike Polynome . . . . .	474
C.7	Die SinC-Funktion . . . . .	478
C.8	Laterale Bildpunktauflösung . . . . .	482
C.9	Apodisation . . . . .	484
C.10	Beugung am Doppelspalt . . . . .	488
C.11	Kontrast . . . . .	491
D.1	Dichte- und Verteilungsfunktionen . . . . .	506
D.2	Fehler des Fehlers . . . . .	507
D.3	Raumwinkel, CTF, Lambert-Gesetz . . . . .	515
D.4	Farbigkeit der Strahlung und ihre Darstellung . . . . .	517

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

# Tabellenverzeichnis

3.1	Dissoziationsenergien einiger kovalenter Bindungen . . . . .	46
3.2	Häufige natürliche Fettsäuren . . . . .	73
3.3	Die 20 kanonischen L-Aminosäuren . . . . .	74
3.4	Molekulare Zusammensetzung biologischer Membranen . . . . .	75
3.5	Relative Lipidzusammensetzung . . . . .	75
3.6	Relative Peakintensitäten von DPPC . . . . .	86
4.1	Dimensionen am Spektrometer ALADIM II . . . . .	143
4.2	VSL-337 ND-S Laserdaten . . . . .	144
4.3	HV-Schalter Behlke HTS 31-GSM . . . . .	144
4.4	Vorfokussierlinsen der Laseroptik . . . . .	144
4.5	Dimensionen am Spektrometer LAMMA 2000 . . . . .	150
4.6	Nd:YLF basierter DPSS-Laser: Triton 250 ICTHG-349-C . . . . .	150
4.7	Hamamatsu PMT 1P28, Spezifikation . . . . .	155
4.8	Mikroskopobjektive, Spezifikation . . . . .	157
4.9	Verwendete Chemikalien . . . . .	160
4.10	Polyethylenglykolmassen . . . . .	166
4.11	Dynamische Viskosität einiger Fluide . . . . .	193
5.1	Targetablation . . . . .	208
5.2	Versuchsparameter der goldbeschichteten Aluminiumtellervermessung . . . . .	208
5.3	Versuchsparameter der Matrixvermessung . . . . .	210
5.4	Quantitativer Matrixauftrag bei Standard-Sprühpräparationen . . . . .	227
5.5	Standardparameter der Sprühpräparation . . . . .	228
5.6	Versuchsparameter zu Datensatz 2 . . . . .	238
5.7	Test auf Normalverteilung an Datensatz 2 . . . . .	240
5.8	Steigerung der Signalintensität: Datensatz 2 . . . . .	240
5.9	Versuchsparameter zu Datensatz 1 und 3 . . . . .	241
5.10	Steigerung der Signalintensität: Datensatz 1 . . . . .	241
5.11	Test auf Normalverteilung an Datensatz 1 . . . . .	243
5.12	Versuchsparameter: Mehrfachladungen am Peptidanalyten Insulin . . . . .	262
5.13	Durchschnittliches SNR-Verhältnis . . . . .	268
5.14	Maximaler systematischer DE-Restfehler . . . . .	274
5.15	Tryptische Verdaupeptide von Myoglobin (P68082) . . . . .	280
5.16	Kalibrierkonstanten . . . . .	281
5.17	Kalibrierkonstanten der PEG-Nachkalibrierung . . . . .	282
5.18	Polyethylenglykolmassen zur Nachkalibrierung . . . . .	282
5.19	Ergebnisse der Nachkalibrierungen . . . . .	284
5.20	Lage der Restabweichung zur Referenz . . . . .	285
5.21	VSL-337 ND-S Laserstrahlprofil in der ALADIM II-Ionenquelle . . . . .	299
5.22	Einzelpuls- und Doppelpulsablation bei Oversampling . . . . .	313
5.23	Einzelpulsablation bei Undersampling . . . . .	314
5.24	2,5-DHB-Spektrum bei $\lambda = 349$ nm . . . . .	314
5.25	Peakliste: T.spiralis in quergestreifter Mausmuskulatur . . . . .	330
5.26	Peakliste: Dried droplet-Präparation an quergestreiftem Muskelgewebe (Maus) . . . . .	332

5.27	Peakliste 1: Sprühpräparation an quergestreiftem Muskelgewebe (Maus)	333
5.28	Peakliste 2: Sprühpräparation an quergestreiftem Muskelgewebe (Maus)	334
5.29	Peakliste: A498-Zellen	339
5.30	Peakliste: T2-Zellen	340
5.31	Peakliste 1: Sprühpräparation an Hefezellen	343
5.32	Peakliste 2: Sprühpräparation an Hefezellen	344
5.33	Mikrosondenmessung an Hefezellen	345
6.1	Experimentelle Parameter zu Abbildung 6.1	350
6.2	Experimentelle Parameter zu Abbildung 6.3	353
6.3	Experimentelle Parameter zu Abbildung 6.4	355
6.4	Experimentelle Parameter zu Abbildung 6.9 und 6.10	362
6.5	Experimentelle Parameter zu Abbildung 6.13-16	367
6.6	Experimentelle Parameter zu Abbildung 6.18	373
6.7	Experimentelle Parameter zu Abbildung 6.19	377
6.8	Experimentelle Parameter zu Abbildung 6.21	381
6.9	Peakliste der HPLC-Fraktion b	388
6.10	Peakliste potenzieller Lipidsignale aus Nautilus-Gewebe	388
6.11	Peakliste: MSMS-Messungen des Nautilus-Sekrets	389
6.12	Versuchsparameter der CLSM-Messungen zu Abbildung 6.29	400
6.13	Versuchsparameter der CLSM-Messungen zu Abbildung 6.32	404
6.14	Versuchsparameter der CLSM-Messungen zu Abbildung 6.34	407
6.15	Versuchsparameter der CLSM-Messungen zu Abbildung 6.38	411
A.1	Naturkonstanten, Massen und Massedifferenzen	420
A.2	Nachkommastellen relevanter Isotopmassen	421
A.3	Kombination der Fettsäureketten	422
A.4	Massen PC(nn:0), nn=24-52	423
A.5	Massen PC(nn:1), nn=24-52	424
A.6	Massen PC(nn:2), nn=24-52	425
A.7	Massen PC(nn:3), nn=24-52	426
A.8	Massen PC(nn:4), nn=24-52	427
A.9	Massen PE(nn:0), nn=24-52	428
A.10	Massen PE(nn:1), nn=24-52	429
A.11	Massen PE(nn:2), nn=24-52	430
A.12	Massen PE(nn:3), nn=24-52	431
A.13	Massen PE(nn:4), nn=24-52	432
A.14	Massen SM(nn:0), nn=12-30	433
A.15	Massen SM(nn:1), nn=12-30	434
A.16	Massen SM(nn:2), nn=12-30	434
A.17	Massen SM(nn:3), nn=12-30	435
A.18	Massen SM(nn:4), nn=14-30	435
A.19	Plasmalogene und Methyl-PC	436
A.20	Glucane	438
B.1	Relative Effizienz eines MCP-Detektors	448

# Abkürzungsverzeichnis

A	Area.
A498	Zelllinienbezeichnung.
ACN	Acetonitril.
AD, ad	Aussendurchmesser.
ADC	Analog To Digital Conversion.
AGC	Automatic Gain Control.
ALADIM	Advanced Laser Desorption/Ionization Mass Analyzer.
AMCA	Aminomethylcoumarin Acetate.
AMS	Accelerator Mass Spectrometry.
AOM	Akustisch-Optische Modulation.
AP	Atmospheric Pressure.
APD	Avalanche Photodiode.
Apo	Apochromat.
aPSF	Amplitude PSF.
As	Aminosäure.
AU	Airy Unit.
av	Average.
BA	Barrier.
B & B	Hydrophobizitätsindex [ <i>cal/mol</i> ] .
BBO	Beta-Bariumborat.
BEM	Boundary Element Method.
BK	Bor-Silicat Kronglas.
BNC	Bayonet Neill Concelman.
BP	Band Pass.
CA	Cinnamic Acid.
CAM	Cell Adhesion Molecule.
CBS	Composition Based Sequencing.
CCD	Charge Coupled Device.
CD	Critical Dimension.
CE	Capillary Electrophoresis.
Cer	Ceramide.
CFD	Computational Fluid Dynamics.
CHCA	Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid.
CHIP	Chemical-Ink-Jet-Printer.
CID	Collision-Induced Dissoziation.
CL	Diphosphatidylglycerol.
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy.
CMY	Cyan, Magenta, Gelb.
CODATA	NIST-Reference of Constants, Units, and Uncertainty.
CP	Center Pixel.
CPO	Charged Particle Optics.
CSM	Confocal Scanning Microscopy.
CTF	Coherent Transfer Function.
cts	Counts.
CV	Coefficient of Variation.



D	Dissipation(sgrad), Durchmesser.
dB	Decibel.
DC	Direct Current.
DE	Delayed Extraction.
DESI	Desorption Electrospray Ionization.
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure.
DIC	Differential interference contrast.
DIOS	Desorption/Ionization on porous Silicon.
DLPC	Dilinoleylphosphatidylcholin.
DM	Dichromatic Mirror.
DNA	Desoxyribonucleic Acid.
DOD	Droplet On Demand.
DOF	Depth of Field.
dp	Data Point.
DPPS	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoserine.
DPSS	Diodengepumpter Festkörperlaser.
dpt	Dioptrie.
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.
DSPC	1,2-Dioctadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine.
ECD	Electron Capture Dissoziation.
ED	Extra low Dispersion.
EDV	Elektronische Datenverarbeitung.
ELSD	Evaporative Light Scattering Protection.
ENI	Equivalent Noise Input.
ENOB	Effective Number of Bits.
ESI	Electrospray Ionization.
EtOH	Ethanol.
f	Frequency, Flussrate.
FA	Formic Acid.
FAB	Fast Atom Bombardment.
FFT	Fast Fourier Transformation.
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization.
FOV	Field of View.
FT	Fourier Transformation.
FT-ICR	FT-Ionen-Cyclotron-Resonanz.
Fuc	Fucose.
FWHM	Full Width at Half Maximum.
FWTM	Full Width at Tenth Maximum.
Gal	Galactose.
GB	Gasphase Basicity.
GC	Gaschromatographie.
GFP	Green Fluorescent Protein.
GI-SID	Grazing Incidence SID.
GLP	Gute Laborpraxis.
Gluc	Glucose.
Gl(u)cNAc	N-Acetylglucosamin.
GMTF	Geometrische MTF.
GPI	General Purpose Interface.
GRAVY	Grand Average of Hydropathicity.

HELA	Zelllinienbezeichnung, Initialen der Zellspenderin.
Hex	Hexose.
HI	Hydrophobizitätsindex [ $kcal/mol$ ].
HLA	Human Leukocyte Antigen.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography.
HV	High Voltage or High Vacuum.
HWBA	Halbwertsbreitenabstand.
HWHM	Half Width at Half Maximum.
ICP	Inductive Coupled Plasma.
ID, id	Inner Diameter.
IEC	International Electrotechnical Commission.
IEEE	Institute of Electrical and Electronics Engineers.
IFT	Inverse FT.
ILM	Ionic Liquid Matrix.
IMS	Ion-Mobility-Spectrometry.
IP	Ionisierungspotential.
iPSF	Intensity PSF.
IR	Infrared.
IRMPD	Infrared Multiphoton Dissociation.
ISA	Industry Standard Architecture.
ISD	In Source Decay.
IT	Ion Trap.
KzF	Kurzflintglas.
LA	Laser Ablation.
LAESI	Laser Ablation Electrospray Ionization.
LAMMA	Laser Microprobe Mass Analyzer.
L(A)MMS	Laser Micro Mass Spectrometry.
LC	Liquid Chromatography.
LDI	Laser Desorption/Ionization.
LIF	Laser Induced Fluorescence.
LL	Lysophosphatidylcholin.
LSA	Longitudinale Sphärische Aberration.
LSB	Least Significant Bit.
LSI	Laserspray Ionization.
LSMD	Lipid Molecular Structure Database.
MALDI	Matrix-assisted-Laser-Desorption/Ionization.
MC	Missed Cleavages.
MCM	Monte Carlo Methods.
MCP	Microchannel Plate.
MD	Molecular Dynamics.
MeCN	Acetonitril.
MeOH	Methanol.
MOSFET	Metal-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor.
MR-TOF	Multireflexions-TOF.
MS	Mass Spectrometry.
MSB	Most Significant Bit.
MSE	Mean Squared Error.
MSI	Mass Spectrometry Imaging.
MTF	Modulation Transfer Function.
MW	Molecular Weight.

n	Platzhalter, ganze Zahlen.
NA	Numerische Apertur.
NANA	N-Acetyl-Neuraminsäure.
ND-Filter	Neutraldichte-Filter.
NeuAc	Sialinsäure.
NFD	Noise Floor Drop.
NIST	National Institute of Standards and Technology, USA.
OP	Oversampling Pixel.
OPA	Optical Parametric Amplifier.
OPD	Optical Path Difference.
OPL	Optical Path Length.
OPO	Optical Parametric Oscillator.
OPV	Operationsverstärker.
OSR	Oversampling Rate.
OTF	Optical Transfer Function.
P	Probability, Pressure, Power.
PA	Phosphatidic Acid.
PC	Phosphatidylcholin.
PCA	Principal Component Analysis.
PCI	Peripheral Component Interconnect.
PDMS	Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie.
PE	Phosphatidylethanolamin.
PEEK	Polyetherketon.
PEG	Polyethylenglycol.
PET	Polyethylenterephthalat.
PETG	Polyethylenterephthalat, Glycol modifiziert.
PG	Phosphatidylglycerol.
PI	Phosphatidylinosit(ol).
PMF	Peptide Mass Fingerprint.
PMT	Photomultiplier Tube.
ppb	Parts Per Billion.
ppm	Parts Per Million.
PS	Phosphatidylserin, Power Spectrum.
PSD	Post Source Decay, Power Spectral Density.
pSi	Poröses Silizium.
PSF	Point Spread Function.
PSPF	Post Source Pulse Focusing.
PTF	Phase Transfer Function.
PTFE	Polytetrafluorethylen.
PV	Peak to Valley.
QE	Quanteneffizienz.
Q-TOF, qTOF	Quadrupol-TOF.

R	(Mass) Resolution, Reflexion(sgrad).
r	Radius, Korrelationskoeffizient.
RC	HPLC-Retentionskonstante, pH = 2.1.
RE-TOF	Reflektor-TOF.
RF	Radio Frequency.
RGB	Rot, Grün, Blau (additiv) oder Rot, Gelb, Blau (multiplikativ).
RM	Rückenmark.
RMS	Root Mean Square.
RRKM	Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus-Modell.
RSD	Relative Standard Deviation.
RT	Raumtemperatur, Retentionszeit.
SA	Sinapinic Acid.
SAR	Signal to Ablation Ratio.
sDHB	Super DHB.
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate.
SEM	Sekundärelektronenmultiplikator.
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher.
SFG	Sum Frequency Generation.
SHG	Second Harmonic Generation.
SIAMS	Scanning Secondary Ion Accelerator Mass Spectrometry.
SID	Surface Induced Dissociation.
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry.
SM	Sphingomyelin.
SMALDI	Small MALDI oder Scanning MALDI.
SMI	Spatially Modulated Illumination.
SNR	Signal to Noise Ratio.
SOP	Standard Operating Procedure.
SP	Sphingomyelin.
SPP	Schuss Pro Pixel.
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences.
SR	Strehl ratio, strehlsche Definitionshelligkeit.
Std	Standardabweichung.
STED	Stimulated Emission Depletion.
STI	Shallow trench Isolation.
T	Transmission(sgrad), Temperatur.
TAG	Triacylglycerol.
T2	Zelllinienbezeichnung.
TCC	Transmission Cross Coefficient.
TDC	Time to Digital.
TE	Transversal Elektrisch.
TEM	Transversale elektromagnetische Moden.
TFA	Trifluoroacetic Acid.
THF	Tetrahydrofuran.
THG	Third Harmonic Generation.
TIC	Total Ion Current.
TIFF	Tagged Image File Format.
TM	Transversal Magnetisch.
TOF	Time of Flight.
TSA	Transversale Sphärische Aberration.
TTL	Transistor-Transistor-Logik.
UFMP	Ultra Fine Metal Powder.
USB	Universal Serial Bus.
UV	Ultraviolett.
V, v	Volume, Velocity.
Var	Varianz.
VIS	Visible.

## TABELLENVERZEICHNIS

# Kapitel 1

## Zusammenfassung

### 1.1 Kurzzusammenfassung

In dieser experimentellen Arbeit werden Kombinationen von apparativen Parametern an LDI-TOF Spektrometern mit präparativen Parametern an biologischen MALDI-Proben und artifiziellen MALDI- und LDI-Testproben untersucht. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Darstellbarkeit von Analyten in voneinander unabhängigen Untersuchungen mit einzelnen Laserpulsen an wechselnden Messstellen und einer Ionenemissionsfläche von  $\leq 1 \mu\text{m}^2$ . Die Ergebnisse dieser Situation sind dabei nicht ohne Anpassung auf voneinander abhängige Untersuchungen, mit mehreren Laserpulsen an einer Messstelle, übertragbar. Betrachtet man die bildgebende Massenspektrometrie im *Microprobe mode* mit nativen biologischen Proben als Projektion mit Punkt-zu-Punkt-Charakteristik, ermöglicht dies, Kriterien für eine Klassifizierung von geeigneten apparativen und präparativen Parametern, für gegebene Probenvoraussetzungen, darzustellen. Es kann in dieser Arbeit, in Abhängigkeit der Probenbeschaffenheit und Analytverteilung innerhalb einer MALDI-Probe, durch geeignete Kombinationen von apparativen Parametern mit präparativen Parametern (z.B. die Matrixverteilung), die Abbildbarkeit von Analytmolekülen aus ihrer jeweiligen Umgebung erreicht werden. Weiterhin kann es bei Präparaten zu alternativen Abbildungen kommen, die in ihrer Qualität, ähnlich den Ergebnissen anderer optischer Methoden, aufgrund eintretender Aberrationen, mehr oder weniger voneinander abweichen. Die erhaltene Information daraus kann einerseits zur Interpretation der Probe, andererseits aber auch zur Optimierung der Messungen, genutzt werden. Der letztgenannte Aspekt steht in dieser Arbeit im Vordergrund. Wegen des destruktiven Charakters einer massenspektrometrischen Messung ist bei einzelnen nativen biologischen Proben leider nur eine begrenzte Anzahl von Einzelmessungen, mit unterschiedlichen Parameterkombinationen, zu einer sinnvollen Informationssammlung möglich. Artifizielle Testpräparate, mit, im Vergleich zu nativen Proben relativ gut kontrollierbarer Beschaffenheit und robuster Struktur, heben diese Restriktion dagegen, zumindest teilweise, auf und ermöglichen dadurch eine eingehendere Untersuchung. Neben den Parametern der elektrostatischen LDI-Ionenquelle und der Probenbeschaffenheit sind die Präparationstechniken der Matrixapplikation dabei entscheidend für die, von einer Probenmessstelle mittels MALDI, maximal emittierbare Ionenanzahl. Ein besonders sensibler Schritt während der Präparation ist dabei die beginnende Matrixkristallisation, die vor allem an biologischen Oberflächen mit unterschiedlichen Präparationstechniken nicht identisch verläuft. Sehr entscheidend ist dies im Zusammenhang mit der bildgebenden Mikrosondentechnik, hinsichtlich der erzielbaren Abbildungsqualität aber auch generell für die Darstellung der Analytsubstanzen. Ein weiterer Teil dieser Arbeit beinhaltet die apparative und methodische Einbindung einer konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) in ein bestehendes LDI-Flugzeitspektrometer mit nur einem Laser. Die konfokalen Aufnahmen können dabei im Wechsel an einer identischen Probe

durchgeführt werden, wobei so im doppelten Sinne konfokale Messungen möglich werden.

## 1.2 Abstract

The aim of this experimental thesis is the optimization of case-by-case strategy and sample preparation for MALDI-TOF mass spectrometry. Two time-of-flight mass spectrometers were used to investigate the main limitations of high spatial resolution in mass spectrometry imaging (MSI, SMALDI). Therefore small and medium sized burn pattern produced by Gaussian and multimode laser profiles on top of the sample were analyzed. This was done for conventional (MALDI-MS) and mass spectrometry imaging (MSI). Another part of this work was the integration of a CLSM-setup (confocal laser scanning microscopy) into a mass spectrometer allowing for confocal light microscopic and mass spectrometric analysis of one specimen in parallel and batch-mode by using only one laser. In detail, the ablated volumes of numerous laser pulses were investigated. In the same way, this was done for single-pulse ablation and repeated single-pulse ablation. Furthermore the influences of different axial and spatial desorption plume distributions were examined by changing the sample-plane-position along the ion optical path (optical axis) stepwise. The ablated volume and the mass resolution in spectra were found to be influenced by this procedure, too. Different preparation techniques were tested for the light microscopic and mass spectrometric analysis of biological specimens and test-pattern objects aiming for a method which gives comparable results for both analysis techniques. The evolution of *signal-to-noise-ratio* (SNR), *signal-to-ablation-ratio* (SAR), *base-peak* (maximum level) and *baseline-intensities* (instrument's Zero-level) was studied and used to characterize the quality of the (two-dimensional) ion intensity maps. Based on these studies it is possible to describe the desorption/ablation and ionization efficiency of the different operation modes. This kind of fundamental investigations are necessary for a better understanding of the still controversially discussed desorption/ionization mechanisms in MALDI of native biological samples. In order to generate more specific strategies for investigating native biological samples, it is crucial to know, what are the essential key-limitations and which parameters of the operating procedure results in the desired optimization. This might be the basis for further applications in this field of science.

## Teil I

# Einleitung, Grundlagen und Methoden





# Kapitel 2

## Einleitung

Diese experimentelle Arbeit stellt einen Beitrag zur Untersuchung des Einflussbereiches von Präparationstechniken und Messmethodiken auf MALDI-TOF-Spektren biologischer Proben dar. Hieraus lässt sich die Qualität der Messergebnisse, vor allem mit nativen biologischen Proben, optimieren. Es ist innerhalb bestimmter Modellvorstellungen bei *apparativen* Grenzbereichen hinsichtlich der Laserfokusgröße und der Laserpulsdauer nicht eindeutig bekannt, wie der genaue Ablauf der physikalischen Prozesse, die insgesamt zu einer Desorption/Ablation und Ionisierung der Analyte führen, stattfindet [1] [2]. Dies erschwert eine planbare Optimierung jeder Vermessung *nativer* biologischer Proben und ist nicht zuletzt auch bei der orts aufgelöst abbildenden (bildgebenden) Massenspektrometrie problematisch. Es besteht die Möglichkeit, daß die während einer Lasereinwirkung in kristallinen Matrixproben in Frage kommenden physikalischen Prozesse, präparationsbedingt, eine Verschiebung in ihrer relativen Gewichtung, d.h. im Rahmen der insgesamt ablaufenden Ablationscharakteristik erfahren können. Bedingt durch experimentelle Ergebnisse, die nahelegen, daß eine Inkorporation einzeln vorliegender Analyte (aus bestimmten Substanzklassen) in den Matrixkristall nicht mehr als absolute Voraussetzung für die Darstellbarkeit anzusehen ist, erlangen zunehmend alternative MALDI-Präparationstechniken an Bedeutung [3] [4] [5]. Im Besonderen in Experimenten mit biologischen Zell- und Gewebepräparaten sind hier Techniken, mit denen sehr kleine Kristalle erzeugt werden bzw. eine Matrixkristallisation aus einer Lösung heraus im Präparationsprozess ausbleibt, neu zu bewerten. Hierzu zählen z.B. *amorphe* Präparationen, lösungsmittelfreie Auftragungs- und auch trockene Sprühverfahren. Eine für die Analytsignalintensität entscheidende Größe ist das Verhältnis von erzeugten Analytionen zum insgesamt ablatierten Material und hier speziell dem Ionenanteil, der als chemisches Rauschen in den Spektren auftritt. Es ist bekannt, das die effektive Ionisierungsrate bei MALDI generell gering ist, wobei die Ionisierung i.d.R. in zwei Schritte unterteilt beschrieben wird. Einerseits in die *primäre* Ionisierung, vorwiegend von Matrixmolekülen während der Desorption/Ablation und andererseits in eine sich unmittelbar anschliessende *sekundäre* Ionisierung, hauptsächlich von Analyten, in der Gasphase. Die zweite Phase enthält, je nach Ausgangsbedingungen, eine unterschiedlich effektive Verminderung von freien Ladungen bzw. eine Neutralisierung bereits desorbierter, vorgeformter Analytionen. Dieser Vorgang kann aus mehreren Teilreaktionen bestehen. Ausschlaggebend für die Qualität eines Spektrums ist letztlich das *Signal-zu-Rauschverhältnis*, d.h. der Anteil von *nackten* Analytionen im Verhältnis zu *unspezifischen* oder *spezifischen* Rauschionen aus beiden Ionisierungsphasen. Unspezifisch deutet dabei die unklare Rauschzusammensetzung an. Spezifisch bedeutet, in diesem Zusammenhang, daß Matrix und oder Analyte zum Rauschen beitragen. Trägt der Analyt wesentlich zum Rauschanteil im betrachteten Massenbereich bei (überwiegend spezifisches Rauschen), verändert sich das Signal-zu-Rauschverhältnis und damit insgesamt auch die Rauschcharakteristik einer Messung. Ein Teil dieser Arbeit beschreibt das Verhalten der beiden Größen *Signal-zu-Ablationsverhältnis* (SAR) und *Signal-zu-Rauschverhältnis*

(SNR) bei unterschiedlichen Messbedingungen und Präparationstechniken (Parameterkombinationen). Beide Größen können als eine Art Marker, auch zur Optimierung von *Messmethodiken*, eingesetzt werden. Als Proben werden in dieser Arbeit native biologische Präparate, d.h. Eukaryotenzellen (humane Zellkulturen, Bäckerhefe), Gewebeschnitte und Gewebeteile (Maus, Kopffüßler), artifizielle Teststrukturen (Siliziumwafer) sowie MALDI-Matrixpräparationen mit und ohne Analyt verwendet. Diese werden mit unterschiedlichen Präparationstechniken (Spraytechnik, Drucktechnik, Dried droplet) und Targetmaterialien vermessen. Weiterhin werden weitfeldmikroskopische und konfokale Techniken eingesetzt, um die MS-Analysen in sinnvoller Weise zu ergänzen. Die MS-Analysen stellen bildgebende und konventionelle MALDI-Messungen der untersuchten Proben dar.

Mit den grundlegenden Untersuchungen von Karas und Hillenkamp mitte der 1980er Jahre wurde die *Matrix-Assistierte-Laser-Desorption/Ionisierung* mit organischen Matrices – MALDI – in der analytischen Massenspektrometrie eingeführt [6] [7]. Der genaue Ablauf, der dieser Technik zugrundeliegenden physikalischen Mechanismen, ist dagegen im Detail bis heute nicht restlos aufgeklärt [8] [9]. Den Schwierigkeiten, die dabei einerseits einer Beschreibung der ablaufenden physikalischen Vorgänge im Wege sind, stehen andererseits die faszinierenden Ergebnisse auf der Anwendungsseite gegenüber. Der Fortschritt bei den praktischen Anwendungen ist dabei durchweg nicht nur von akademischem Wert, da sich bislang sehr schnell ein direkter Nutzen z.B. in der Medizin oder im Bereich molekular arbeitender Disziplinen, aus den unterschiedlichsten Gebieten der Umwelt- und Lebenswissenschaften erkennen lässt [8]. Basierend auf der initialen Entwicklung der beiden, zweifelsfrei als die massenspektrometrischen Schlüsseltechniken der Bioanalytik des letzten Jahrhunderts anzusehenden Verfahren, MALDI und ESI (*Elektro-Spray-Ionisierung*, Fenn) [10] [11], ist die Massenspektrometrie nach insgesamt fast drei Anwendungsjahrzehnten in der biochemischen Analytik fest etabliert und aus der modernen molekularen Routineanalytik nicht mehr wegzudenken. Der Schritt zur Routine übertrifft dabei bereits den Status der rein molekularen Identifikation und Charakterisierung einzelner chemischer Stoffe. Es können teilweise bereits darüberhinausgehend, anhand artspezifischer molekularer Merkmale (Marker im weiteren Sinne), *phylogenetische* Zuordnungen von pro- und eukaryotischen Organismen erfolgen [12] [13]. Die Funktionalität der *apparativen* Entwicklungen führt dabei in Kombination mit Abwandlungen dieser beiden „weichen“ Desorptions-/Ionisierungs-Verfahren zu immer neuen Anwendungen. Diese verschieben die absolute Nachweisgrenze in Kombination mit leistungsfähigeren Spektrometern zu niedrigeren absoluten Werten, und vergrößern i.d.R. dabei gleichzeitig auch die Menge der darstellbaren Vertreter aus einzelnen chemischen Substanzklassen.

### Flugzeitmassenspektrometrie

Aufgrund der gepulsten Ionenerzeugung ist MALDI zunächst für die Kombination mit Flugzeitanalysatoren prädestiniert. Flugzeitanalysatoren werden im Zusammenhang mit Massenspektrometern seit Ende der 1940er Jahre beschrieben und können direkt oder indirekt mit unterschiedlichen Ionenquellen gekoppelt werden. In Abhängigkeit des Verwendungszwecks ist eine Ausstattung z.B. mit Elektronenstoß-, Primärionen- (SIMS, PDMS), Laserquellen (LDI/MALDI) oder auch mit Teilchenbeschleunigern technisch möglich [8] [14].

Im Zusammenhang mit der Desorptions- und Ionisierungscharakteristik aus der festen Phase einer MALDI-Probe heraus, sind prinzipielle Begrenzungen mit elektrostatisch arbeitenden Ionenquellen (*cathode lens geometry*) in der Kombination mit *linearen* Flugzeitanalysatoren unvermeidlich. Diese wirken

sich limitierend auf die erreichbare *Massenrichtigkeit* und die *Massenauflösung* aus. Zu nennen ist hier, in der Reihenfolge der Bedeutung, die Verteilung der *initialen kinetischen Energie* der Ionen und eine initiale *Orts-* sowie eine *Zeit-* und *Startwinkelverteilung* innerhalb einer Pulspopulation. In den Quellen für Flugzeitanalysen werden überwiegend axialsymmetrische elektrostatische Felder eingesetzt. Diese sind allein nicht dazu geeignet, einige auftretende systematische Abweichungen in den erhaltenen Ionenverteilungen, bis in höhere Ordnungen<sup>1</sup>, auszugleichen. Das bedeutet, daß einige Aberrationen bei einer Analyse mit linearen Flugzeitspektrometern erhalten bleiben und eine Messung negativ beeinflussen können [15] [16]. Für die genannten initialen Fehler sind entsprechende apparative Korrekturmöglichkeiten, oft bereits seit Jahrzehnten, bekannt. Diese werden teilweise kombiniert eingesetzt. Es handelt sich dabei um Einrichtungen wie Ionenspiegel (*ion mirrors, reflector*), die verzögerte Ionenextraktion (*Delayed-extraction, DE*), die nachgelagerte Pulsfokussierung (*Post-Source-Pulse-Focusing, PSPF*) oder auch um geeignete Kombinationen von Felddimensionen, die eine *Ortsfokussierung* höherer Ordnung in zweistufigen Quellen ermöglichen [17] [18] [19] [20]. Das grundlegende physikalische Korrekturprinzip beruht dabei i.d.R. auf einer abgestuften positiven/negativen Beschleunigung der zeitlich streuenden Ionenpopulationen. Im Falle von DE und PSPF erfolgt das Anlegen der Felder zeitverzögert zum Einsetzen des Ionenpulsstroms. Die Ortsfokussierung wird durch eine Kombination der Felddimensionen, der zwei Beschleunigungsstufen, erreicht. Die Korrektur jeder Einrichtung (außer der Ortsfokussierung) ist i.d.R. (immer nur) für einen begrenzten Massenbereich optimal. Eine Kombination von elektrostatischen mit magnetischen Elementen ist in MALDI-Quellen technisch ebenfalls möglich [21].

Ein deutlich erkennbarer Trend, bei der Konstruktion kommerzieller TOF-Spektrometer mit elektrostatischen Quellen, geht zur Verwendung gitterloser Elektroden. Teilweise werden dabei nichtlineare (parabolische) Potentialverläufe realisiert (*curved field*). Ein Verzicht auf Gitter an Elektroden erhöht dabei die Akzeptanz der entsprechenden Einrichtung und verringert i.d.R. die apparativ bedingten Fehlereinflüsse. Dieses Konzept führt, konsequent angewandt, aber auch zu gewissen Einschränkungen, wie z.B. im Falle eines *curved field reflectron*. Ein nichtlinearer Potentialverlauf in einem gitterlosen Reflektor lässt in der Ebene des Reflektorein-/ausgangs keinen planen Äquipotentialverlauf zu ( $\rightarrow$  Linseneffekt), wodurch die Lage des Detektors zwingend auf den Reflektorausgang festgelegt ist. Die Gesamtflugstrecke der Ionen wird dadurch prinzipiell eingeschränkt.

Außer den genannten apparativen Einrichtungen bedarf es zudem kontinuierlicher Anpassungen im Bereich der Matrixpräparation, der Messmethodik und letztlich auch der Kalibrierverfahren und hier speziell der Nachkalibrierungsmethoden, um praktisch den theoretisch erreichbaren Nutzen der *apparativen* Entwicklungen, für einen möglichst großen Massenbereich, zugänglich zu machen. Einige der genannten apparativen Korrekturen schränken den zusammenhängend in einer Messung darstellbaren Massenbereich ein und beinhalten zudem, gleichzeitig wiederum die Möglichkeit *systematische* Fehler in eine Messung einzubringen. Das kann einerseits durch Streuung von Ionen an Gitterelektroden, örtliche Fledinhomogenitäten z.B. aufgrund von Felddurchgriffen (*field fringes*, Linseneffekt) und andererseits durch zeitlich nichtkonstante Felder an beschalteten Elektroden hervorgerufen werden (DE, PSPF). Die apparativen Optimierungen werden deshalb oft mit mathematischen Nachkalibrierungsmethoden ergänzt, die versuchen, diese Fehler auszugleichen. Gelingt dies hinreichend, kann dadurch der Restfehler der Massenrichtigkeit in einem größeren Massenbereich, in Abhängigkeit von der Dichte der Stützstellen, unter die oft auch als „magische Grenze“ von  $\delta = 5$  ppm bezeichnete Schwelle gesenkt werden [22] [23]. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die *Genauigkeit* einer Massenbestimmung und die erreichbare Massenauflösung

---

<sup>1</sup>Dies sind explizit sphärische Aberrationen 3. Ordnung, winklabhängige chromatische Aberrationen 2. Ordnung und geometrische Aberrationen 2. Ordnung.

in Spektren einer MALDI-TOF-Messung, durch unkorrigierte initiale Fehler und weitere *systematische* Fehler mit Auswirkungen auf die Flugzeit limitiert wird. Aufgrund des Nyquist-Kriteriums begrenzt auch bei optimaler Minimierung aller systematischen Fehler, aus den methodischen (MALDI-Prozess) und apparativen Einflüssen, die Charakteristik des Detektors sowie letztlich die Frequenz der digitalen Abtastung, die erreichbare *Massenrichtigkeit* und *Massenauflösung*. Während der Digitalisierung muss ein analoger Signalzug möglichst unverfälscht umgewandelt werden. Erst dies gewährleistet eine folgerichtige Weiterverarbeitung der Rohdaten. Bei der Rohdatenverarbeitung kann es sich im einzelnen um eine *Mittelwertbildung*, eine *Peakerkennung* mit Centroidbildung, eine relative *Quantifizierung* und/oder eine *Klassifizierung*, also sehr allgemein um eine *vergleichende Ordnung* der erhaltenen Signalintensitäten handeln. Oftmals ergeben dabei bereits die deskriptiven Statistiken der Rohdaten ausreichende Erkenntnisse über die vermessene Probe, um die zu einer chemischen Interpretation der Probe gestellte Frage direkt beantworten zu können. Die Methoden der Datenbehandlung können dennoch weit über die rein deskriptive Statistik hinausgehen. In den letzten Jahren werden verstärkt, im Bereich der massenspektrometrischen Bioanalytik, immer häufiger Methoden aus der Inferenz-Statistik eingesetzt, wie z.B. *Clusteranalysen*, *Regressions-* oder *Varianzanalysen* etc. .. [24] [25] [26].

Flugzeitspektrometer mit LDI/MALDI-Quellen zeichnen sich i.d.R. durch sehr hohe relative Ionen-transmissionsraten aus ( $T \geq 90\%$ ). Eine neben der Massenrichtigkeit und Massenauflösung analytisch bedeutsame Größe ist die *Nachweisgrenze* eines Spektrometers. Diese wird einerseits, prozessbedingt, durch in diesem Zusammenhang unerwünschten molekularen Zerfall (ISD, *in source decay*; PSD, *post source decay*) und andererseits durch das destruktive Detektionsprinzip einiger Detektortypen begrenzt. Die Signalintensität der detektierten Ionen ist bei einer Flugzeitanalyse dann abhängig von ihrer Geschwindigkeit und damit (auch) von ihrer Masse. Weiterhin kann die Nachweisspezifität deutlich verringert werden, je komplexer eine chemische Probenzusammensetzung wird und je häufiger dabei auftretende Signalüberlappungen einzelner Isotopverteilungen von unterschiedlichen Molekülionenspezies (*isotopic multiplets*) in den Spektren sind. Die Nachweisspezifität ist dann unmittelbar mit der Massenauflösung und der erzielbaren Massengenauigkeit verknüpft [8] [27].

Parallel zur technischen Weiterentwicklung der TOF-Spektrometer ist im Rahmen der chemischen Analytik an kleineren Biomolekülen, verstärkt in den letzten Jahren, eine Nutzung von elektrostatischen MALDI-Quellen unter Atmosphärendruck (AP-MALDI) in Kombination mit den, als erwiesenermaßen sehr leistungsfähigen, FT-Methoden an Ionenfallenanalysatoren vorangetrieben worden [8] [28] [29]. Solche Quellen ermöglichen eine Äquilibrierung der kinetischen Energie aus dem Desorptions/Ionisierungsprozess (*collisional cooling*) vor Eintritt der Ionen in den Massenanalysator und können so metastabile Zerfälle von relativ großen intakten Biomolekülen deutlich reduzieren [30]. Der Einsatz von Edelgasen kann dabei, aufgrund der fehlenden Rotations- und Schwingungsenergien der Residualgasteilchen, gegenüber einer Luft- oder Stickstoffatmosphäre vorteilhaft sein. Einige AP-MALDI Entwicklungen eröffnen in Kombination mit leistungsfähigen Massenanalysatoren, vor allem im Bereich der ortsauflösenden bildgebenden MALDI-Massenspektrometrie an nativen biologischen Proben, neue analytische Möglichkeiten in bisher unbekannter Qualität [31] [32]. In den Abbildungen 2.1 und 2.2 sind die bei einer MCP-Detektion zu erwartende relative Ionensignalintensität in Abhängigkeit von der Ionengeschwindigkeit sowie die angenommenen Ionengeschwindigkeiten und Impulse in Abhängigkeit von der Ionenmasse, entsprechend der angegebenen Referenzen, aufgetragen.

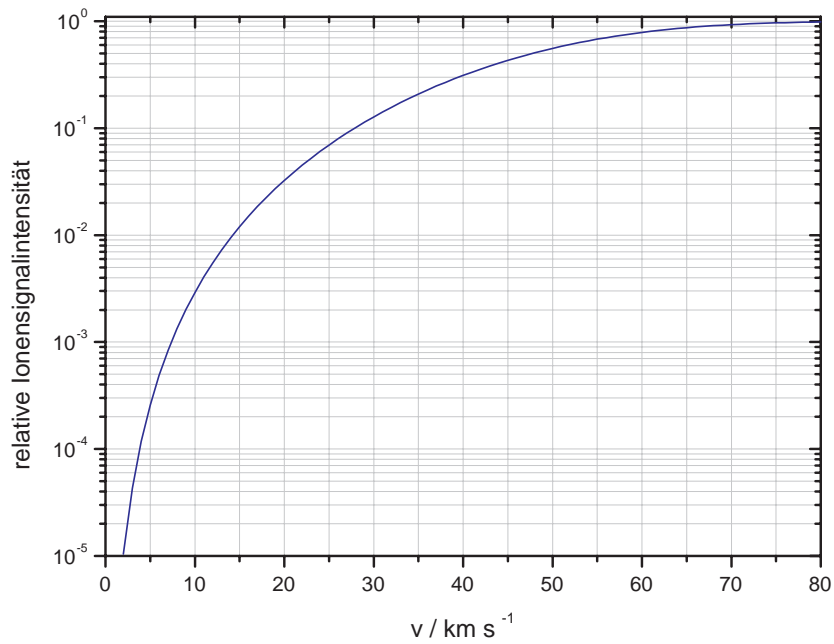


Abbildung 2.1: Theoretische relative Ionensignalintensität in Abhängigkeit von der Ionengeschwindigkeit  $v$  bei Nachweis durch destruktive Detektionsverfahren z.B. MCP. Berechnung nach  $I \approx I_0 - \exp\left(-\left(\frac{v}{k}\right)^{3.5}\right)$ . Mit der Konstante  $k = 53 \text{ km s}^{-1}$ , nach [33].

Schätzung von Teilchengeschwindigkeit und -impuls

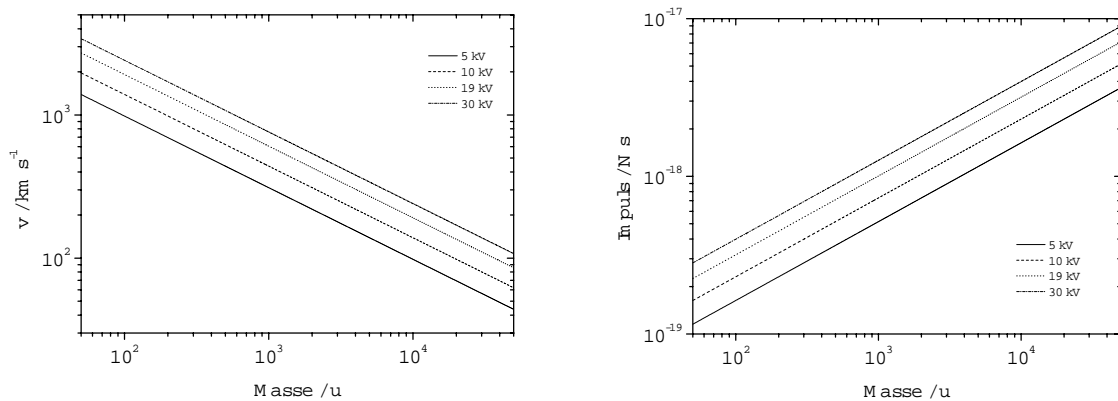


Abbildung 2.2: (Links) Theoretische Ionengeschwindigkeit in Abhängigkeit des anliegenden Beschleunigungspotentials, nach [34]. Die Geschwindigkeit ergibt sich als Abschätzung aus der TOF-Flugzeitbeziehung,  $v \approx 13.891332 \sqrt{\frac{Vq}{m}}$ . Praktisch können die Geschwindigkeiten großer Molekülionen aus der MALDI-Methode hiervon abweichen. (Rechts) Ionenimpuls nach Berechnung mit den angenommenen Geschwindigkeiten.

## MALDI-TOF-MS - apparativer Status

An MALDI-Flugzeitspektrometern kann mit der Dried droplet-Präparationsmethode und unter optimalen Bedingungen<sup>2</sup>, bezogen auf den Bereich der Peptid- und Proteinanalytik, eine Massenauflösung von bis zu  $R \approx 30000$  bei einem relativen Restfehler von minimal  $\delta \approx 2$  ppm mit einer Grenzkonzentration von ungefähr  $1 \text{ amol}/\mu\text{l}$  erreicht werden. Die Ergebnisse sind dabei von der UV-Laserrepetitionsrate ( $\leq 5$  kHz) nahezu unabhängig und der UV-Laserspotdurchmesser überwiegend  $\geq 100 \mu\text{m}$  [22]. Sehr häufig werden diese extrem guten Ergebnisse mit TOF-Spektrometern aber nicht und erst recht nicht innerhalb des gesamten dynamischen Bereichs, von ca  $10^5$ , erhalten [8]. Entscheidend ist bei einem interapparativen Vergleich immer, für welchen Massenbereich die angegebene Massenauflösung und Massenrichtigkeit zutrifft. Theoretisch steigt bei einem TOF-Analysator die erzielbare Massenauflösung, in etwa mit der Wurzel der detektierten Ionenmasse, an. Bei den Desorptions-/Ionisierungsverfahren LDI/MALDI ist dies dagegen praktisch oft nicht mehr feststellbar. Es kann hier mit zunehmender Bestrahlung zu einer sinkenden Massenauflösung, bei steigender Ionenmasse kommen. Der Grund hierfür liegt in der MALDI/LDI-Methodik. Da bei MALDI, außer dem Anteil der ionisierten Analytmoleküle, auch die Anzahl der ionisierten Matrixmoleküle gesteigert wird und diese in hohem molaren Überschuss vorliegt, führt dies kurzzeitig (sehr wahrscheinlich) zu einem relativ dichten Plasma in unmittelbarer Nähe der Elektrode. Hierbei kann es teilweise zu einer vollständigen Abschirmung des elektrostatischen Beschleunigungsfeldes in dieser Region kommen, wie dies z.B. von klassischen Kathodenemissionen bekannt ist (*cathode emission effect*). Da die initiale Geschwindigkeit der Ionen in erster Näherung unabhängig von der Ionenmasse ist, breiten sich leichte Matrixspezies und schwere Analytspezies, zunächst, gleich schnell aus. Die initiale Geschwindigkeit, die alle Spezies im „Plasmaschirm“ erreichen, bevor eine entsprechende Verdünnung des Plasmas durch Neutralisation und Ausdehnung eintritt und somit das elektrostatische Feld für die Ionen spürbar wird, nimmt für leichte Ionen im Verhältnis zu ihrer erlangten Endgeschwindigkeit einen geringeren Anteil ein, als dies bei schweren Molekülonen der Fall ist [34]. Techniken, wie z.B. die verzögerte Ionenextraktion, die ein auf bestimmte Ionenmassen abgestimmtes zeitversetztes elektrisches Feld anlegen, reduzieren diese Abhängigkeit aber deutlich, da dann nicht mehr die Dichte der Plasmawolke bei einer gegebenen Feldstärke für eine Ionenspezies den Zeitpunkt einer einsetzenden elektrostatischen Beschleunigung (alleine) bestimmt, sondern bei geeigneter Wahl auch die Verzögerungszeit des ersten Beschleunigungsfeldes.

## MS-Analytik in Umwelt- und Lebenswissenschaften

Eine generelle Stärke der Massenspektrometrie ist ihre Fähigkeit *komplementär*, d.h. im weiteren Sinne als molekulares/atomares Detektionssystem eingesetzt werden zu können. Diese Tatsache hat zugleich ihren universellen Einsatz in der Umwelt- und Bioanalytik manifestiert. Eine der wichtigsten apparativen Kopplungen in den letzten Jahrzehnten ist dabei, mit Sicherheit, diejenige von Massenanalysatoren mit den *chromatographischen Techniken* (GC, LC, vereinzelt auch CE<sup>3</sup>). Wichtige neuere Entwicklungen sind aber auch auf dem Gebiet der Prozessminiaturisierung zu sehen, wie z.B. bei der *Lab-On-Chip-Technologie* [35] [36] und der oft im Zusammenhang mit MALDI stehenden Vermessung *mikrostrukturierter* (funktionalisierter) Oberflächen und Arrays zu finden [37] [38]. Ebenso wird die Vermessung weitestgehend unbehandelter nativer biologischer Proben immer häufiger [8]. Letzteres wird dabei in zunehmendem Maße in der Form einer *ortsaufgelösten* und *bildgebenden* molekularen Analytik durchgeführt [39]. Die größte apparative Innovation der letzten Zeit auf dem Gebiet der Massenspektrometrie geht aber, zweifelsfrei, von den *ambienten* Verfahren aus. Diese kommen gänzlich ohne Probenpräparation aus und einige von ihnen eignen sich, wenngleich eingeschränkt, auch zu einer ortsaufgelösten bzw. bildgebenden

<sup>2</sup>Bei ausreichender Korrektur systematischer Fehler (Bias).

<sup>3</sup>GC = Gaschromatographie, LC = Flüssigkeitschromatographie, CE = Kapillarelektrophorese.



Analytik [40].

## 2.1 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit stellt einen Vergleich von zwei Messmethoden an. Diese werden mit unterschiedlichen Präparationstechniken kombiniert und an artifiziellen wie nativen biologischen Proben, unter anderem auch zur bildgebenden Darstellung, eingesetzt. Der zentrale Bereich jeder molekularen *in situ* Analytik ist die unverfälschte Ermittlung realer (natürlicher oder veränderter) Häufigkeiten einzelner Substanzen. Die Bestimmung der absoluten Menge einer Substanz ist mit MALDI-Massenspektrometern i.d.R. nur semiquantitativ möglich, da die Nachweisgrenze eines Spektrometers in Abhängigkeit von der Komplexität einer Probe und des Verlaufes des Desorptions-/Ionisierungsprozesses steht. Deshalb können auch bei einer gleichbleibenden Gerätesensitivität einzelne einander folgende Messungen (teilweise starken) *systematischen* Schwankungen unterliegen. Anhand des angestellten Vergleiches sollen Erkenntnisse über die Charakteristik der Vermessung gewonnen werden, die letztlich zu einer *Optimierung* von Messungen an nativen biologischen Proben verwendet werden können.

Zu den Messungen werden zwei LDI-TOF-Spektrometer herangezogen. Beide Spektrometer besitzen dabei ein nahezu identisches Aufbau- und Funktionsprinzip. Die Laserstrahleinkopplung in die Hochvakuumquellen erfolgt hier coaxial zur Ionenflugrichtung sowie zur TOF-Achse. Die optische Achse des elektrostatischen Linsensystems ist damit identisch mit der TOF-Achse und der optischen Achse der Laserstrahlführung. Im linearen Modus sind beide Spektrometer hinsichtlich lateraler Ortsdifferenzen in der Startebene und unterschiedlicher Startwinkel korrigiert (*linear isochron*), d.h. initiale Unterschiede in diesen Koordinaten führen innerhalb einer auf den Detektor abgebildeten Ionenpopulation - in erster Ordnung - zu keiner Flugzeitabweichung. Die Spektrometer unterscheiden sich im aktuellen Aufbau sowohl in den Quell- und TOF-Dimensionen, als auch in der Anzahl der Quellelektroden und vor allem im verwendeten Laser und der Laseroptik. Ein weiterer Unterschied besteht in der digitalen Abtastfrequenz der Analog-zu-Digitalumsetzung (ADC) mittels Transientenrekordern und der Möglichkeit an einem Spektrometer mit verzögerter Ionenextraktion (*Delayed Extraction*) zu messen. Es werden in dieser Arbeit die Auswirkungen von auftretenden *apparativen* und *präparativen* Grenzbedingungen bei der Vermessung *nativer* biologischer Proben untersucht und weiterhin die Anforderungen der bildgebenden Massenspektrometrie, speziell mit kleinen Laserfoki. Unterschiedliche Aufnahmemethoden der Mikrosonden-Analytik werden im Zusammenhang mit der oberen Massengrenze biologischer Moleküle untersucht und dabei wesentliche Unterschiede identifiziert sowie auftretende Veränderungen bei unterschiedlichen Präparationstechniken diskutiert.

### Limitierende Parameter

Die Grenzbedingungen zur Erzeugung und Transmission einer gepulsten Ionenmenge in einer (transmissionsoptimierten) elektrostatischen MALDI-Quelle werden entscheidend über folgende Parameter bestimmt (*key limitations*):

- Eine *apparative* Einflussgröße stellt die *Querschnittsfläche* des auf die Probe treffenden Laserstrahles dar [1]. Untersuchungen konnten zeigen, daß darüberhinaus aber auch das *TEM-Profil*, im Besonderen bei wiederholten Messungen an einer identischen Probenposition, Auswirkungen auf das insgesamt erhaltene Ionensignal haben kann. Interessant ist in diesem Zusammenhang das Signal-zu-Rausch- (SNR) und das Signal-zu-Ablations-Verhältnis (SAR) bzw. dessen ggf. unterschiedliche



Entwicklung im Messverlauf. Ein  $TEM_{00}$ -Profil erzeugt dabei, im Vergleich zu einem *Multimode*-Profil und ähnlicher Fokussierung, besonders an MALDI-Präparationen mit kleiner Matrixkristallgröße und homogener Analytverteilung, eine abweichende Effizienz im Gegensatz zu Präparationen mit größeren Kristallen und lokal konzentrierten Analytverteilungen [41].

- Eine bei *nativen* Proben feststehende aber in der Regel nicht bekannte Größe, ist die *Absolutmenge* eines Analyten in Kombination mit seiner *Verteilung* innerhalb der Probe bzw. Präparation [42] [43].
- Es wirken sich darüberhinaus weitere, überwiegend *präparative*, Einflüsse limitierend aus. Diese hängen direkt mit der verwendeten Matrixsubstanz zusammen. Es handelt sich dabei um die *Kristallgröße*, den *Absorptionskoeffizienten*, die *Dichte* und den *Schmelzpunkt* sowie die *Hydrophobizität* bzw. *Hydrophilie* und den Grad der *Acidität* einer Matrix.

Im Wesentlichen sind durch die Art der Präparationstechnik dann die *Verteilung* der Matrix, die *Kontaktzeit* mit dem Analyten in der flüssigen Phase und die im Mittel erreichbare Kristallgröße beeinflussbar. Die Bedeutung der Präparationstechnik im Zusammenhang mit dem häufigsten Ladungszustand eines Analyten ist dagegen umstritten [8].

Präparative Einflüsse können teilweise zur Klärung der apparativen Grenzbedingungen herangezogen werden. Das Bindeglied zwischen apparativen und präparativen Parametern stellt die *Messmethodik* dar. Sie wird auf die Probenbedingungen abgestimmt und umfasst die Art und Weise, wie eine Messung letztlich im einzelnen abläuft. Aufwendigere Messungen erfordern eine *Strategie* aus Präparation und Messmethodik. Ein hier wohl treffender Vergleich innerhalb der Präparationsebene ist dabei die Standardoperationsvorschrift (SOP, *standard operating procedure*), im Sinne der GLP-Richtlinien („Gute Laborpraxis“<sup>4</sup>). Die Anwendung einer Messmethodik ist deshalb insgesamt immer mehr, als eine bloße Gerätebedienung mit wechselnden Parameterwerten.

### Apparative Parameter

Im Zusammenhang mit der matrixassistierten Laserdesorption/Ionisierung sind im apparativen Bereich, neben der Dimensionierung der elektrostatischen Einrichtung(en) in der Quell-, Korrektur- und Detektionsregion, eine Reihe weiterer Parameter zu nennen, die direkt oder indirekt die transmittierte Ionenmenge beeinflussen können. Hierzu zählen zum einen unverhältnismäßig veränderte Potentiale in der Quellregion sowie zum anderen

- der nicht notwendigerweise konstante *Betrag* der *Laserpulsenergie* und die i.d.R. für einen Laser charakteristische Pulsdauer und Pulsform<sup>5</sup>,
- die *dreidimensionale Orientierung* der Probe im Bezug auf das Laserprofil und die Lage der Messebene im elektrostatischen Beschleunigungsfeld,
- die *Anzahl* und auch die *Frequenz* der Laserpulse sowie
- die *Richtungsorientierung* relativ zur Probenstruktur bei nichtortsfesten bzw. rasternden Messungen.

---

<sup>4</sup>OECD-Schriftenreihe über die Grundsätze der Guten Laborpraxis und die Überwachung ihrer Einhaltung, OECD Environment Directorate, Environment, Health and Safety Division, 75775 Paris Cedex 16, France.

<sup>5</sup>Ähnlich wie bei anderen Laserverfahren z.B. Trenn- bzw. Schweißtechniken zur Materialbearbeitung.

Untersuchungen an MALDI-Proben mit unterschiedlichen Laserprofilen lassen einen Zusammenhang der Intensitätsverteilung im Profil, mit der erreichbaren Signalintensität bei Mehrfachmessungen an einer Probenstelle erkennen (siehe Abb. 2.4). Die Abstimmung der einzelnen Parameterwerte ist nicht immer im gesamten Wertebereich möglich. Teilweise wird bereits durch die Festlegung der Parameterwerte der transmissionsoptimierten elektrostatischen Einrichtung eine Einschränkung bei anderen Parameterwerten bedingt. Weiterhin ist z.B. die Laserpulsdauer eine Größe, die mit dem verwendeten Laser bzw. seinen Betriebsmodi i.d.R. feststeht. Gleiches gilt auch für die Pulsform (Intensität als Funktion der Zeit). Immer dann, wenn die Pulsdauer im Bereich des sogenannten *thermal confinement regime* eines Matrix-/Probenmaterials liegt kann bei Messungen mit einer Bestrahlung im Bereich der Schwellbestrahlung einer Substanz (i.d.R. Einsetzen der Clusterdesorption) und hoher Pulsfrequenz lokale Wärmeakkumulation in bestrahlten aber (noch) nicht ablatierten Bereichen eintreten. Die Temperatur einer MALDI-Probe kann die Signalintensität der Matrix messbar beeinflussen [44]. Das Targetmaterial kann z.B. über die Anzahl freigesetzter Elektronen, die Ionisierung von Matrix und Analytmolekülen verändern. Die maximale Laserrepetitionrate und der Zeitbedarf, der zu einer Datenspeicherung notwendig ist, begrenzen prinzipiell die Frequenz iterativer Messungen und dadurch insgesamt die Messdauer. Weiterhin ist die erforderliche Synchronisation der Steuerungen des Desorptionslasers mit der Probenpositionierungseinheit, dem Detektionsprozess und dem Speicherzyklus des Messrechners zu berücksichtigen. Eine oftmals kritische Größe in diesem Zusammenhang ist der i.d.R. mit einem Jitter behaftete Zeitraum, der bei einem mechanischen Ortswechsel der Probe in einem Messzyklus anfällt. Aufgrund der meistens fehlenden (direkten) Rückkopplung (bzw. Steuerung), muss eine geeignete Einstellung (bzw. Regelung) zunächst empirisch ermittelt werden.

### Präparative Parameter

Die präparativen Parameter beziehen sich hier, in erster Linie, auf die notwendige Matrixpräparation einer Probe. Diese ist bei nativen und artifiziellen Proben in ihrer Art und Weise häufig für die prinzipielle Freisetzbarkeit einer ausreichenden Anzahl von Analytmolekülonen entscheidend. Präparative Parameter sind dabei:

- der Ablauf der *Kristallbildung* und das *Kristallwachstum* der Matrixsubstanz,
- die *Größe* und die *Verteilung* der erzeugten Kristalle,
- die Übereinstimmung der Matrix- und Analytverteilung bei nicht vollständiger Mischung,
- eine möglichst geringe Analytmigration innerhalb der Probe, aufgrund der Matrix-Präparation (vor allem im Zusammenhang mit bildgebenden Messungen) sowie
- der Einbau oder die Anlagerung der Analyte in bzw. an die wachsenden Matrixkristalle.

### Kombination apparativer und präparativer Parameter

Eine Messmethodik beinhaltet die Abstimmung der apparativen und präparativen Parameter. Eine robuste Methodik gewährleistet eine erfolversprechende Analytvermessung, auch bei stark variierenden Ausgangsbedingungen bzw. Probenbeschaffenheiten. Schematisch stellt Abbildung 2.3 die Triangulation in der bildgebenden MALDI-Massenspektrometrie dar, zwischen

1. der physikalischen und chemischen Beschaffenheit der Probe(noberfläche),
2. den physikochemischen Eigenschaften der Matrix, der Präparationstechnik sowie

### 3. den apparativen Parametern des Spektrometers.

Ein gleichschenkliges Dreieck symbolisiert einen ausgeglichenen Einfluss von apparativen und präparativen Parametern auf ein Messergebnis, innerhalb einer Methodik. D.h. die Vorgaben, die durch die Beschaffenheit der Probe feststehen aber nicht notwendigerweise alle im Vorhinein bekannt sind, erfordern eine Regelung apparativer und präparativer Einstellungen in vergleichbarem Umfang. Diese müssen generell zunächst empirisch ermittelt werden und gewährleisten dann die Vermessung einer oder mehrerer chemisch ähnlicher, ggf. aber auch unterschiedlicher Substanzen sowie eine Bilddarstellung der entsprechenden Verteilungen. Manche Proben erfordern dagegen eine einseitig stärkere Anpassung, entweder der apparativen oder der präparativen Parameter. Einige Proben sind wiederum unter keinen Bedingungen darstellbar. Eine Methodik ist dann als *robust* anzusehen, wenn sie auch bei unterschiedlichsten Probenbedingungen, mit nahezu identischen Parameterwerten angewandt werden kann. Als in diesem Sinne klassisches Beispiel kann die Dried droplet-Präparation unter Verwendung hochreiner Lösungsmittel mit Peptidanalyten gelten. In diesem speziellen Fall trifft es in der Regel zu, dass, an transmissionsoptimierten elektrostatischen MALDI-Quellen, robuste Parametereinstellungen für erfahrene Anwender relativ leicht zu finden sind. Diese führen zu einer vergleichsweise hohen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, mit der Ausnahme der „Hot-spot-Charakteristik“ der Matrix 2,5-DHB. Die Einstellung der apparativen Parameter kann bei einer unveränderten Position der Probenebene auf der optischen Achse und gleichbleibenden Detektionsbedingungen, dann oft auf die Regulierung der Bestrahlung und eine Abstimmung der Potentiale<sup>6</sup> an den Elektroden der Extraktionsstufen, hinsichtlich einer Ortsfokussierung, reduziert werden. Bei der Vermessung nativer biologischer Proben ist dies dagegen i.d.R., aus einer Reihe später noch zu erläuternden Gründen, nicht der Fall. In Abbildung 2.4 wird der Einfluss des Laserstrahlprofils bzw. der Laserenergieverteilung im Desorptionsquerschnitt auf die Signalintensitätszunahme von Peptidionen bei wiederholten Messungen dargestellt.

### Ermittlung signifikanter Größen im Analyseprozess

Wesentliche Fortschritte bei der Optimierung von Präparationstechniken, die im Rahmen der MALDI-Analytik eingesetzt werden, können nur bei starker Korrelation des veränderten Parameters mit der Meßgröße direkt, d.h. ohne deskriptive Statistik(en) identifiziert werden. Dies steht i.d.R. im deutlichen Gegensatz zur apparativen Optimierung. Es zeigt sich oftmals ein Fortschritt erst in kleinen mittleren Steigerungen der Messgröße. Ein statistisch nachweisbarer Einfluss präparativer Parameter auf ein Messergebnis erfordert deshalb immer einen feststehenden Satz apparativer Parameterwerte und eine gute Kenntnis der Streuung standardisierter Messungen.

Dieser Umstand macht auch die Vermessung unbekannter Analyte in einer gänzlich anderen Umgebung, als die einer kontrollierten Testprobe, zu einer Gratwanderung bei der Interpretation der Daten. Einerseits können geringe Schwankungen apparativer Parameter zu einem deutlichen Sprung statistischer Mittelwerte führen, andererseits können aber auch deutliche Änderungen innerhalb einer Präparation ähnliches hervorrufen. Die einzige Möglichkeit zur Klarheit in solchen Fällen, liegt in einem großen Umfang der Untersuchungen sowie der Kenntnis aller systematischen Einflussgrößen.

Es ist prinzipiell zwar durchaus möglich auch einen feststehenden Satz präparativer Parameterwerte anzunehmen. Die einzelnen Parameterwerte sind aber hier nur selten mit einer ausreichenden Präzision und Genauigkeit bestimmbar, um sie vergleichbar gut von statistischen Schwankungen trennen zu können.

<sup>6</sup>Zur Auflösungsoptimierung können noch DE- bzw. PSPF-Einstellungen hinzukommen.

Der Satz der apparativen Parameter in Hochvakuum-Apparaturen kann dagegen, prinzipiell, aus den Simulationen zur Dimensionierung einer Ionenquelle bzw. des gesamten Spektrometers hervorgehen und ist damit, theoretisch, für ein beliebiges Referenzion zugänglich. Die Bestimmung eines Elektrodenpotentials ist i.d.R. im Verlauf mehrerer Messungen mit deutlich größerer (personenunabhängiger) Präzision möglich, als z.B. die Ermittlung eines Präparationseinflusses aufgrund eines manuell pipettierten Volumens im Mikro- oder Nanoliterbereich.

Ein nachweisbarer Einfluss apparativer Parameter und Messmethodiken sollte, aufgrund der größeren Varianz im präparativen Bereich, mit unterschiedlichen Präparationstechniken und jeweils identischen Analyten und Matrices bestimmt werden.

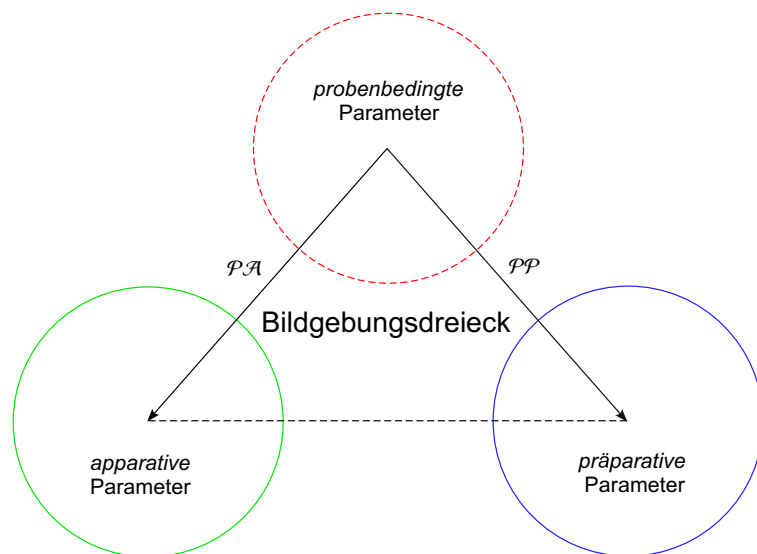


Abbildung 2.3: Schemadiagramm zur orts aufgelösten Massenspektrometrie als bildgebendes Verfahren. Ein gleichschenkeliges Dreieck symbolisiert eine Probe, bei der sowohl die präparativen, wie auch die apparativen Parameter in etwa gleich stark von einem oder mehreren limitierenden Parametern der Probe beeinflusst werden und deshalb eine Anpassung erfordern.

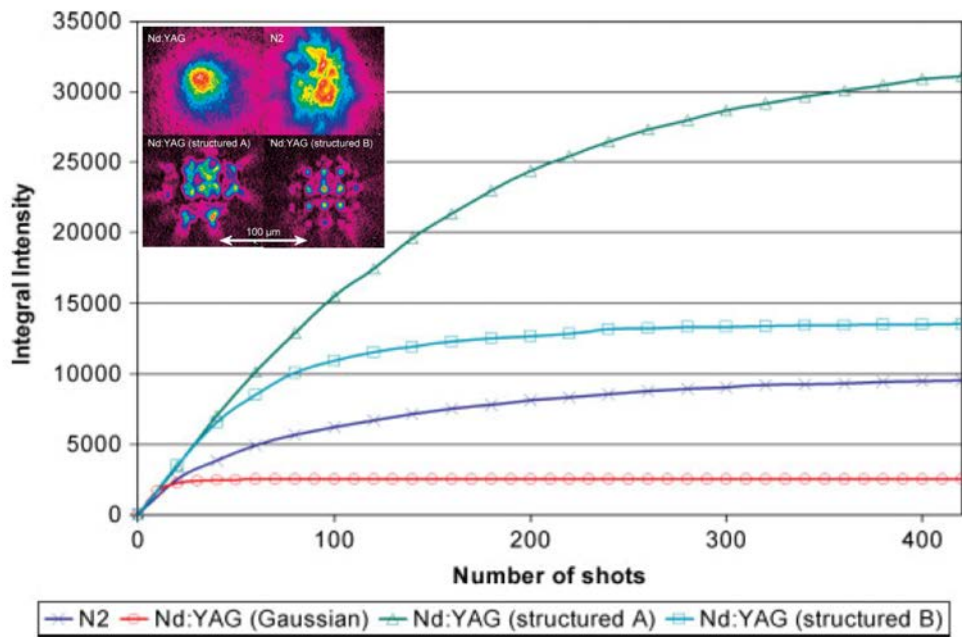


Abbildung 2.4: Strukturierte  $TEM_{00}$ -Profile und Multimode-Profil. Stickstofflaser Multimode-Profil (Gauss-Fit, FWHM-Fläche  $\approx 52 \mu\text{m} \cdot 75 \mu\text{m}$ ), defokussiertes Nd:YAG-Monomodeprofil (Gauss-Fit, FWHM-Durchmesser  $\approx 45 \mu\text{m}$ ), modulierte Nd:YAG-Monomodeprofil A (Gauss-Fit, FWHM-Durchmesser  $\approx 60 \mu\text{m}$ ), modulierte Nd:YAG-Monomodeprofil B (Gauss-Fit, FWHM-Durchmesser  $\approx 45 \mu\text{m}$ ). Laserenergien: N<sub>2</sub>-Laser:  $E \approx 0.14 \mu\text{J}$ , Nd:YAG:  $E \approx 2.55 \mu\text{J}$ , Nd:YAG A:  $E \approx 0.14 \mu\text{J}$ , Nd:YAG B:  $E \approx 0.23 \mu\text{J}$ . Untersucher Zusammenhang zwischen dem Pulsprofil und der integrierten Signalintensität des Peptides ACTH (18-39) als Funktion der Laserpulszahl pro Meßstelle. Abbildung modifiziert und entnommen aus [41]. Beschrieben wird die günstigere Wirkung eines pro Schuss (Puls) wechselnden Intensitätsprofils auf die Signalintensität bei Präparationen mit der Matrix CHCA.

### 2.1.1 Gliederung der experimentellen Arbeiten

Die vorliegende Dissertation hat zwei *experimentelle* Schwerpunkte:

1. Die Parametrisierung der untersuchten artifiziellen Test- sowie der nativen biologischen Proben, anhand einer Oberflächenanalyse (im weiteren Sinne) mittels der Lasermikrosonden-Massenspektrometrie und soweit dies sinnvoll ist auch mit der Konfokalen-Laser-Rastermikroskopie.
2. Die Weiterentwicklung und Untersuchung von Probenpräparationstechniken zur orts aufgelösten MALDI-Analytik an artifiziellen und nativen biologischen Proben.

#### Darstellung und Auswertung der durchgeführten Messungen

Die Plots der Massenspektren in dieser Arbeit beziehen sich i.d.R. auf die digitalisierten analogen Signalintensitäten. Diese werden gegen die Flugzeit bzw. das über die Flugzeit berechnete  $m/z$ -Verhältnis aufgetragen. Einzelspektren sind dabei mit einer 8-Bit-Auflösung (256 Werte), Summenspektren mit einer 16-Bit-Auflösung (65536 Werte) dargestellt. Die verwendeten Transientenrekorder ermöglichen eine Empfindlichkeitsregelung der Messkanäle. Das maximale (verstärkte) analoge Signal umfasst dabei eine Spanne von 16 mV bis 4 V. Die Auswertungen der Messungen beinhalten deskriptive Statistiken, ggf. bildgebende Darstellungsverfahren und vereinzelt Operationen aus der Analysis, der Kombinatorik und der Inferenzstatistik. Es wird im Einzelnen nicht jedes (angewandte) Verfahren detailliert beschrieben. Im Anhang findet sich eine kurze Übersicht einiger statistisch relevanter Definitionen. Ein Vergleich von Massenspektren erfolgt zunächst immer direkt mit der Spektrometersoftware ULISSES. Zusätzlich wird eine Rangbildung der ermittelten Datenpunktintensitäten durchgeführt. Diese wird bei den Ergebnissen aber nur dort mitangegeben, wo dies sinnvoll erscheint. Erfolgt ein Vergleich zwischen unterschiedlichen Massenspektrometern mit abweichenden Abtastraten (*sampling rate*) und daraus resultierend, mit einer unterschiedlichen Anzahl von Datenpunkten in einem Spektrum, erfordert dies zunächst die Anpassung der Daten mit der höheren Auflösung. Eine Vergrößerung der Klassen (Datenpunktzusammenfassung) führt zu einer Reduktion der Datenpunktzahl. Aus theoretischen Überlegungen folgt, daß die mindestens für eine korrekte Peakbestimmung (Centroid-Label) erforderliche Auflösung von vier Datenpunkten pro Peak dabei nicht unterschritten werden darf. Zudem wird eine Intensitätsauflösung von 8 Bit gewählt. Die intensivsten Signale besetzen in den Darstellungen die unteren Ränge, schwache Signale die oberen Ränge. Bindungen, d.h. Werte mit identischen Rängen werden zugelassen. Mit der Rangbildung wechselt die *metrische* Skalierung der Daten in die *ordinale* Skalierung. Dies führt einerseits dazu, daß die absoluten Unterschiede der Intensitäten in den Spektren nicht mehr verglichen werden können, andererseits aber auftretende charakteristische Muster, aufgrund der erhaltenen Relation, weiterhin untersucht werden können. Peaks bekannter chemischer Strukturen werden i.d.R. anhand der (integrierten) Signalintensitäten (bezogen auf die Centroid-Masse) verglichen (siehe S. 146 ff.).

Bei den dargestellten CLSM-Messungen handelt es sich um Aufnahmen mit einer digitalen 8 Bit Tiefe. Pro Pixel werden dabei die reflektierten Photonen aus einer Pulszeit von im Mittel  $16.8 \text{ ns} \pm 0.4 \text{ ns}$  detektiert und anschliessend das entsprechende analoge Signal digitalisiert (siehe S. 148 f., S.184 f.).

### 2.1.2 Motivation der Experimente

Eine im Bereich der Forschung auf dem Gebiet der MALDI-Massenspektrometrie mit *nativen* biologischen Proben immer noch aktuelle Frage ist, wo, im Zusammenhang mit *Flugzeitanalysatoren* und einem Ionennachweis mittels MCP-Detektoren, im Mikrosondenverfahren (*Microprobe mode*) die *Grenze* hinsichtlich der erreichbaren *lateralen Ortsauflösung* (*spatial resolution*) und gleichzeitig auch der darstellbaren *Ionenmasse* verläuft. Aus mehreren unabhängigen Untersuchungen ist z.B. bekannt, daß mit einer MCP-Detektion bei erhöhter Bestrahlung eine gesteigerte Matrixclusterentstehung im niedrigen Massenbereich ( $m/z < 800$  u) eine Sättigung des Detektors hervorrufen kann. Dies führt dann, totzeitbedingt, auch zu einer Beeinträchtigung der Sensitivität im höheren Massenbereich. Eine Ausblendung des niedrigen Massenbereiches z.B. mittels Deflektorschaltungen oder eine verzögerte elektronische „Aktivierung“ des MCP-Detektors kann bei schnellen rasternden Messungen mit mehreren Pulsen pro Rasterposition aber eine zusätzliche Quelle für Jitter im Messzyklus sein. Ein solches Vorgehen verbietet sich deshalb i.d.R. bei bildgebenden MALDI-Messungen. Weiterhin erfordern native biologische Proben, aufgrund von störenden Substanzen aus der chemischen Umgebung und oft niedrigen absoluten Analytmengen im Desorptionsvolumen, fast immer, eine gegenüber konventionellen MALDI-Messungen, erhöhte Bestrahlung [8] [46]. Der Begriff „konventionell“ wird hier im Sinne einer Dried droplet-Präparation aufgereinigter Analyte in hochreinen Lösungsmitteln verwendet, da diese Art der Präparation bei der Einführung der MALDI-Methode eingesetzt wurde [8] (Kapitel 1).

Als ein Beispiel einer Untersuchung der Kombination einer hohen Ortsauflösung und einer hohen Peptidmasse kann [47] herangezogen werden. Hier wird an einem linearen Flugzeitspektrometer des Typs *Voyager Elite* (Applied Biosystems) mit koaxialer MALDI-Quelle und MCP-Detektion (40 mm, Chevron) ein erreichbares analytisches Ergebnis mit einem Laserfokus von ca.  $7 \mu m$  bis  $10 \mu m$  im Durchmesser ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ), in Verbindung mit Peptidmassen bis zu 27 kDa und 25 Laserpulsen pro Messstelle, an nativem biologischen Gewebe genannt. Die Matrix wird hierzu mit einem Sprühverfahren auf das Gewebe aufgebracht<sup>7</sup>. Zahlreiche vorhergehende Arbeiten, i.d.R. unter Verwendung von konventionellen Dried droplet MALDI-Präparationen mit Peptiden, stellen die praktische Anwendbarkeit von Laserfokussdurchmessern  $\leq 10 \mu m$  mit UV-MALDI generell in Frage und verbinden dies mit grundsätzlich mechanistischen Überlegungen zum Desorptions-/Ionisierungsprozess [1] [8] (Kapitel 1).

Weiterhin ist überwiegend unklar ob bzw. wie solche Grenzen *gezielt* durch den Einsatz spezialisierter *Präparationstechniken* und *Messmethodiken* beeinflusst werden können [39] [42] [47] [48] [49] [50] [51] [53].

Eine dahingehende Untersuchung erfordert zunächst allgemeine Überlegungen zur Messmethodik und im Rahmen der abbildenden Massenspektrometrie dann auch eine Berücksichtigung der allgemeinen Prinzipien bildgebender Rasterverfahren. Letzteres ist im Verlauf der Bewertung der Qualität der Daten geboten und lässt darüberhinaus einen Vergleich mit den erhaltenen CLSM-Messungen zu. Es ist im Rahmen solcher Untersuchungen auch notwendig, die verwendeten Spektrometer mit den entsprechenden Proben in den jeweiligen Betriebsmodi, hinsichtlich des *Signal-zu-Rausch-Verhaltens* zu betrachten und weiterhin einen möglichen Einfluss systematischer Fehlergrößen zu berücksichtigen. Hierdurch können dann letztlich begrenzende *apparative* (im weiteren Sinne) und *präparative* (Matrix-Präparation) Faktoren genauer, im Bezug auf ihre physikalischen Ursachen und Dimensionen, bezeichnet werden.

Die bildgebende Massenspektrometrie an biologischen Proben wurde vor ungefähr 20 Jahren erst-

---

<sup>7</sup> $12 \mu m$  Schnittdicke, Schnitt des Nebenhodenschwanzes (cauda epididymis) der Maus, *peptidsezernierende* Zellen.



mals auf einer internationalen Tagung erwähnt [54]. Trotz dieser langen Zeitspanne liegt der Fokus der Methode noch immer vorrangig im Bereich der Grundlagenforschung. Die Zahl der neu veröffentlichten Publikationen auf diesem Gebiet in den letzten Jahren spiegelt dabei in Summe aber das enorme Potenzial dieser Technik, vor allem im diagnostischen Bereich, wider [39].

### 2.1.3 Vorüberlegungen

#### Chronologie der verwendeten Instrumentierung

Das Massenspektrometer LAMMA 2000 steht in einer (Entwicklungs)Reihe mit den Spektrometern LAMMA 500 und LAMMA 1000 (L(A)MMS/LAMMA-Technologie<sup>8</sup>). Diese Technologie wurde von Hillenkamp und Kaufmann bereits in den 1970er Jahren eingeführt. Die kommerzielle Form (Leybold Heraeus) verwendete erstmalig einen Ionenreflektor und UV-Laserfokusbereich von  $d \leq 1 \mu\text{m}$  in einem Gerät zur Untersuchung biologischer Proben (LAMMA 500). Das Spektrometer LAMMA 500 kann deshalb als instrumenteller Wegbereiter der Lasermikrosondenmassenspektrometrie im Zusammenhang mit einer chemischen Analytik an *nativen* biologischen Proben angesehen werden [55] [56] [57].

Es handelt sich bei den zu dieser Arbeit (hauptsächlich) verwendeten Spektrometern um Eigenkonstruktionen der Arbeitsgruppe Spengler. Sie stammen in ihrem Grundaufbau aus den 1990er Jahren, werden seitdem aber kontinuierlich ergänzt und verändert [51] [53] [58].

#### Aktuelle apparative Anpassungen

Das Massenspektrometer LAMMA 2000 ist in dieser Arbeit, abweichend zu vorhergehenden Arbeiten, mit einem *DPSS-Nd:YLF-Laser* (Diodengepumpter Festkörperlaser) mit einer maximalen Repetitionsrate von 1 kHz bei einer Ausgabewellenlänge von  $\lambda = 349 \text{ nm}$  für CLSM-, LDI- und MALDI-Messungen ausgestattet. Der Einsatz nur einer Wellenlänge bei der Kombination der massenspektrometrischen und lichtmikroskopischen Analysetechniken umgeht dabei die, bei einer Verwendung unterschiedlicher Wellenlängen, auftretenden chromatischen Aberrationen. Das im LAMMA 2000 eingesetzte Laserobjektiv ermöglicht, prinzipiell, für ein schmales Frequenzband im UV auch eine Korrektur chromatischer Aberrationen erster Ordnung, ausgehend von einer Bezugswellenlänge von  $\lambda = 266 \text{ nm}$ , durch Variation der Abstände einzelner Elemente.

Im laseroptischen Aufbau wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere (alternative) Vorfokussieranordnungen mit Linsen unterschiedlicher Brennweite getestet sowie im CLSM-Aufbau unterschiedliche Blendengrößen. Zur Erfassung und Digitalisierung der CLSM-Aufnahmen wurde ein USB-ADC verwendet. Außerdem kam am Spektrometer LAMMA 2000 ein neu aufgebauter MCP-Detektor (Chevron-Anordnung, 40 mm) zum Einsatz. Der zweistufige Gitterreflektor wurde für die Messungen mit genau parallel zur optischen Achse der Ionenoptik justiertem Laserstrahl aus dem Flugrohr entfernt, um den Transmissionsverlust im linearen Messmodus zu verringern. Auch mit Gittern, die eine einfache Transmission von ca. 90 % der generierten Ionen gewährleisten, verringert sich der Ionenstrom mit zwei Gittern in etwa um 36 % [20]. Zusätzlich wurde eine veränderte Kontaktführung zur ersten Elektrode der Ionenquelle eingesetzt. Diese ermöglicht das Anlegen eines höheren Targetpotentials. Die Kontaktführung ist, aufgrund der Bewegung des Targets während der rasternden Messungen, ein sensibler Bereich, da sich die Abstände zu anderen leitenden Bauteilen der Quelle geringfügig und i.d.R. sprunghaft ändern können.

---

<sup>8</sup>L(A)MMS = Laser Micro Mass Spectrometry, LAMMA = Laser Microprobe Mass Analyzer.



Das Massenspektrometer ALADIM II wurde zeitweise mit einem Piezoverfahrtisch zu Linienscannaufnahmen betrieben. Im Rahmen der DE-Experimente sind unterschiedliche Koaxkabelnängen und Abschlusswiderstände getestet worden, um die Messanordnung hinsichtlich des maximal möglichen systematischen Fehlereinflusses auf die Massenrichtigkeit bzw. Genauigkeit bei der Ermittlung der Flugzeiten zu untersuchen. Die erste Elektrode der Ionenquelle wurde hier ebenfalls mit einer veränderten, flexibleren Kontaktführung ausgestattet.

### Zusammensetzung auftretender Ionen

Mit UV-MALDI-Hochvakuumquellen gehen hauptsächlich einfachgeladene Ionenspezies aus dem Desorptions-/Ionisierungsprozess hervor. Deshalb kann der dynamische Massenbereich zur Darstellung *nativer* biologischer Proben drei Größenordnungen umfassen, wenn alle relevanten Ionenspezies in einer einzigen Messung abgebildet werden sollen [8]. Es kann sich dabei generell um strukturell sehr heterogene Analytationen handeln z.B. anorganische bzw. Elementionen

- einwertige atomare Ionen:  $[A-e]^+$  und atomare Clusterionen  $[nA+A-e]^+$  und  $[(n+1)A-e+nB]^+$ , etc. ...

( $A$ , Kation;  $B$ , Anion oder Atom;  $e$ , Elektron) wobei prinzipiell auch negativ geladene Elementionen, mehrwertige Ionen (z.B.  $Ca^{2+}$ ) oder Komplexkationen und Komplexanionen auftreten können. Die Betrachtung von Elementionen in biologischen Proben ist ein Fokus der LAMMA/LAMMS-Technologie in wissenschaftlichen Untersuchungen [59]. Seit dem Aufkommen von MALDI wird hierzu aber weitaus häufiger die ICP-MS-Technik eingesetzt.

Im organischen Bereich treten molekulare Ionen wie (Phospho)Lipide, Kohlenhydrate, Stoffwechselprodukte und Hormone (chemisch uneinheitlich), Peptide, Proteine aber auch Nukleinsäuren und „Arzneimittel“ in den Vordergrund der massenspektrometrischen Untersuchungen an biologischen Proben [8]. Ab einer Masse von ca. 1300 Da können Biomoleküle bzw. organische Moleküle mit Flugzeitspektrometern, routinemäßig<sup>9</sup>, und strukturell intakt aber erst seit der Einführung von MALDI vermessen werden. Auftretende Ionenspezies umfassen:

- molekulare Ionen:  $[M]^{\bullet+}$ ,  $[M+H]^+$ ,  $[M+A]^+$  und molekulare Clusterionen oder Fragmentionen (z.B. mit Matrix  $[ma_n+M+H]^+$  etc. ...).

Einige molekulare Analyte, wie z.B. Phospholipide können teilweise besser als negative MALDI-Ionen vermessen werden [8] (Kapitel 7). Es überwiegen aber in der Literatur für Vertreter der meisten Substanzklassen, die Messungen positiver Ionen in Kombination mit aciden MALDI-Matrizes. Prozentual kommt im Bereich der Forschung mit MALDI der Proteinanalytik der größte Anteil an den untersuchten Substanzklassenspezies zu [8]. Das Screening molekularer *Marker* (im weiteren Sinne) erhält dabei mit der bildgebenden Massenspektrometrie eine zusätzliche Qualität. Es wird hierüber eine direkte Vergleichsmöglichkeit mit anderen optischen Methoden erreicht [31] [60] [61]. Der Begriff des Markers ist z.B. im Rahmen der Evaluierung klinischer Studien, hinsichtlich bestimmter Kriterien, charakterisiert. Diese grenzt die Vertreter aber oft nicht strukturell (chemisch) ein. So können z.B. neben *zelleigenen* Substanzen unterschiedlicher chemischer Substanzklassen auch „Pharmazeutika“ bzw. diagnostische „molekulare Medizinprodukte“ oder chemische Elemente die Kriterien eines Markers erfüllen, jenachdem was identifiziert werden soll. Jedes diagnostische bildgebende Verfahren ist allgemein darauf angewiesen, aus den

<sup>9</sup>Die unmittelbare Vorläufertechnik der Plasmadesorptions-Massenspektrometrie (PD-MS) hat diesen Entwicklungsstatus nicht (mehr) erreicht.

detektierten Primärdaten den Anteil spezifischer Information herausbilden zu können, der auf einen Teil der physikalischen oder chemischen Eigenschaften der Marker zurückführbar ist, die Gegenstand der Untersuchung sind. Die Analytikmethode bestimmt dabei i.d.R. den Grad der erreichbaren Spezifität. Die größte molekulare Spezifität im Bereich der Proteinanalytik erreichen dabei, ohne Zweifel, die immunologischen Methoden (antikörperbasierte Markierungen). Im Bereich der *in situ* Nukleinsäureanalytik kann hier als Beispiel die FISH-Methode genannt werden (hybridbasierte Markierung von DNA).

### Charakteristik der erhaltenen MS-Rohdaten

Die Primärinformation einer massenspektrometrischen Messung (Hochvakuum-MALDI) ist die Masse und die relative Intensität der betrachteten Signale, da mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p > 95\%$  einfachgeladene Ionen in den Spektren vorkommen [8] (Kapitel 1). Die *Signalcharakteristik* biologischer Analyte ist diejenige organischer (Makro)Moleküle mit einer Zusammensetzung aus Isotopen einer (sehr) begrenzten Anzahl chemischer Elemente. Diese erfordert trotzdem unbedingt die Kenntnis der Leistungsfähigkeit des Spektrometers, hinsichtlich der zu erwartenden *Massenrichtigkeit* und *Massenauflösung*. Die Massenrichtigkeit bezieht sich dabei i.d.R. auf die Massengenauigkeit der Peakzentroide (*accuracy of the mean*) und die Massenauflösung auf die Halbwertsbreite der einzelnen Peaks in *Summenspektren* (FWHM). Im Einzelfall, z.B. bei bildgebenden Messungen mit nur einem Laserpuls pro Messstelle und Pixel oder bei nicht orts aufgelösten Messungen, bei denen die Probenstelle ohne Aufsummierung der Spektren wechselt, beziehen sich die Massenrichtigkeit im Sinne der Genauigkeit (*accuracy*) und die Massenauflösung (*resolution*) dann aber auf die jeweilige Einzelmessung. Häufig wird in Publikationen nicht näher zwischen Massenrichtigkeit (Genauigkeit des Mittelwertes) und Massengenauigkeit (ohne Bias = Präzision, i.d.R. von Einzelmessungen) unterschieden, gelegentlich wird beides synonym verwendet. Die chemische Analytik intakter organischer Substanzen mit einem dominierenden Kohlenstoffanteil, basiert auf der exakten Zuordnung der monoisotopischen<sup>10</sup> Masse eines vollständig oder teilweise aufgelösten *Multiplets* und damit der Zuordnung der leichtesten Masse der Verteilung im Spektrum. Im Falle von Linearmessungen kann eine Zuordnung anhand der sehr genauen Bestimmung des Peakzentroides einer unaufgelösten Multipletverteilung möglich sein (*average mass*) [34] (siehe auch 3.3).

### Relativer Restfehler der Massenrichtigkeit und apparative Grenze der Massenauflösung

Betrachtet man zunächst eines der klassischen Einsatzgebiete der MALDI-Massenspektrometrie in den Lebenswissenschaften können dabei Rahmenbedingungen, bezüglich des maximal tolerierbaren Restfehlers bei der Massenrichtigkeit und der mindestens notwendigen Massenauflösung, angegeben werden. Die Betrachtungen beziehen sich dabei auf die Bestimmung der monoisotopischen Peakmasse eines aufgelösten Multiplets biologischer Moleküle, das bis zu einer Masse von ca. 1500 u i.d.R. von der Kohlenstoffverteilung dominiert wird.

Ein heute als klassisch zu bezeichnendes Einsatzgebiet der MALDI-Massenspektrometrie ist die datenbankgestützte *Peptidsequenzierung* bzw. die Protein-Identifizierung mittels PMF-Messungen (*Peptide mass fingerprint*) [62]. Es lässt sich aus Messungen dieser Art ein noch tolerierbarer relativer Fehler bei der Massenrichtigkeit von  $\delta \approx 50$  ppm (*parts per million*) in einem mittleren Massenbereich<sup>11</sup> identifizieren. Massen unterhalb von 500 u sind dann aber bereits, aufgrund der Anwesenheit von Matrixsignalen, nur sehr eingeschränkt bei einer Datenbanksuche nutzbar. Das Ergebnis wird dabei im allgemeinen erst dann eindeutiger werden, wenn die Sequenzabdeckung des Proteins ausreichend hoch ist ( $\geq 60\%$ ) und gleich-

---

<sup>10</sup>Peak der häufigsten Isotope.

<sup>11</sup>Wenn zusätzlich eine hohe Sequenzabdeckung des Proteins durch die PMF-Peptide gegeben ist.

zeitig die Anzahl der zuordbaren Peptide  $n > 5$  beträgt. Sogenannte „One-hit-wonder“ sind aufgrund der i.d.R. sehr geringen Sequenzabdeckung, aus statistischen Gründen, eher abzulehnen ( $\rightarrow$  MASCOT, <http://www.matrix-science.com>). Relativ hohe Massen  $M_r > 4000$  u kommen z.B. in *tryptischen* Verdauungen eher selten vor (ausgelassene Spaltstellen, *missed cleavages*), so dass i.d.R. der Massenbereich von 500 u bis 4000 u im Fokus liegt. Die mindestens zu einer Isotopauflösung einfachgeladener Multiplets erforderliche Massenauflösung, lässt sich dann an biologisch relevanten Molekülen bei MALDI mit Hochvakuumquellen, in etwa auf den Wert der nominalen Masse des entsprechenden einfachgeladenen Ions abschätzen. Die *nominale* Massedifferenz der aufgelösten Multipletpeaks ist bis zu einer Masse von ca. 1300 - 1500 u überwiegend durch die Kohlenstoffisotope bestimmt und beträgt deshalb eine atomare Masseneinheit (siehe auch Tabelle A.1). Verfahren zur Primärstrukturaufklärung biologischer Moleküle anhand der exakten Masse monoisotopischer Peaks, wie z.B. *Composition based sequencing (CBS)*, erfordern hingegen die Bestimmung der akkuraten Masse ( $\delta \approx 1$  ppm in einem Massenbereich  $\leq 1.5$  u) [63] [64] [65] [66].

## Native biologische Proben: Molekulare Diversität als analytische Problemstellung bei *in situ* Messungen

Bei der MALDI-MS-Untersuchung nativer biologischer Proben treten generell zunächst Unwägbarkeiten im Rahmen der Probenbehandlung auf, da diese überwiegend als *Mischung* fester und flüssiger Bestandteile vorliegen sowie neben organischen Komponenten auch anorganische Salze, in teilweise hoher Konzentration<sup>12</sup>, enthalten sind. Massenspektrometer sind als sehr leistungsstarke und präzise Messgeräte der qualitativen und teilweise auch der semiquantitativen chemischen Analytik i.d.R. vorgetrennter Stoffgemische bekannt [8]. Je heterogener dabei allerdings die chemische Stoffzusammensetzung einer Probe wird, umso höher werden dann i.d.R. die Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der vorgelagerten chemischen/physikalischen Trennungstechniken. Diese nehmen einen Großteil der Methodenentwicklungen bei entsprechenden Kopplungen ein [67] [68]. Die bildgebende Mikrosondenmassenspektrometrie an nativen biologischen Proben ist hingegen eine Technik die keine Vorabtrennung und Reinigung der Analyte, in vergleichbarer Weise, zulässt. Bei nativen Proben, bei denen die Größe der physikalischen Sonde (hier also das Desorptionsvolumen in der Probe) eine Ortsauflösung im Mikrometermaßstab bedeutet, würde eine chemische/physikalische Trennung heterogener Substanzgemische mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Veränderung der Probenstruktur führen und damit i.d.R. einen Verlust der analytischen Ortsinformation bedeuten.

In Abhängigkeit der Art der verwendeten MALDI-Probe sind dennoch unterschiedliche Vorbehandlungen notwendig. Nach dem Beladen von i.d.R. Glasobjektträgern mit getauten Gefrierschnittproben von unfixiertem Weichteilgewebe (*thaw mounting*) wird i.d.R. eine kurze Lagerung in Exikkatoren, der eigentlichen Matrixpräparation, vorangestellt. Nicht selten sind bei Weichteilgewebe und auch bei Zellpräparaten aus der Kultur vorsichtige Waschschrte mit unterschiedlichen Lösungsmitteln notwendig, besonders bei der Peptidanalytik. Die Waschschrte, die üblicherweise mit kalten Lösungsmitteln (ca. 4° C) durchgeführt werden, sollen einerseits die natürlichen Salzkonzentrationen der Probe verringern und andererseits gegenüber den Analyten besser lösliche Substanzen (z.B. Lipide) abreichern. Außerdem wird dadurch, bei Verwendung organischer Lösungsmittel, eine Fixierung einzelner Probenbestandteile stattfinden [69]. Phospholipide (und andere Lipide, wie auch Fettsäuren), zum Beispiel, beeinflussen die Vermessung von Peptiden i.d.R. deutlich negativ. Ausgeprägtere Fixierungen von Gewebepräparaten, z.B. durch alkoholische Konzentrationsreihen mit längerer Einwirkzeit oder chemischen Fixierlösungen, führen dagegen zu chemischen Modifikationen an den meisten Analytmolekülen und kommen deshalb bei den meisten Anwendungen nicht in Frage. Im Einzelfall kann aber auch eine ausgeprägte chemische Fixierung hilfreich sein, um z.B. die Signalintensität von Strukturbildenden Peptiden/Proteinen zu steigern, wie z.B. durch den Einsatz von Glutaraldehyd. Die Einbettung biologischen Gewebes mit PEG-haltigen Präparaten verbietet sich dagegen, da hierdurch eine Kontamination erfolgt, die in den Massenspektren zu entsprechenden Störsignalen führen kann [8] (Kapitel 1).

Die molekulare Zusammensetzung nativer biologischer Proben besteht aus einer großen Zahl von Vertretern unterschiedlicher Substanzklassen. Diese sind zudem in ihrer physikalischen Charakteristik hinsichtlich ihrer Festigkeitseigenschaften aber auch im Bezug auf ihre räumliche Organisation bzw. Vernetzung sehr heterogen. Neben chemischen Aspekten erlangen auf mikroskopischer Ebene deshalb auch elastische und plastische Formungsprozesse an Bedeutung. Diese können die Energie aus der Bestrahlung teilweise binden bzw. in joulesche Wärme umwandeln. Tierisches Gewebe mit einem großen Anteil faserartiger Proteine weist dabei z.B. deutlich andere *mechanische* Eigenschaften auf, als ein Phospholi-

<sup>12</sup>Humane isotonische Kochsalzlösung enthält ca. 154 mmol/l NaCl, was 308 mosmol/l entspricht.

pidbilayer mit teilweise integrierten und assoziierten Proteinanteilen unterschiedlicher und lokal wechselnder Zusammensetzung [71]. Die Präparationstechniken zur Matrixapplikation müssen also einerseits die chemische Zusammensetzung der biologischen Probe berücksichtigen und darauf abgestimmte Lösungsmittel verwenden. Andererseits darf im Falle der bildgebenden Analytik durch die Präparation aber auch keine wesentliche (Um)Verteilung mobiler Analyte stattfinden (Migration) [43]. Beides widerspricht dabei, mehr oder weniger, dem Vereinzelnprinzip von Analytmolekülen im MALDI-Prozess in Dried droplet-Präparationen. Dieses wird als eine Funktion einer klassischen organischen MALDI-Matrix in konventionellen Dried-droplet Präparationen mit einer erwünschten Durchmischung der Probe vor der einsetzenden Kristallisation angesehen [1] [8] (Kapitel 1).

## 2.2 Ortsaufgelöst abbildende Massenspektrometrie

Im Bereich der Lebenswissenschaften<sup>13</sup> hat mit der Entwicklung der bildgebenden MS-Analytik an Oberflächen eine direkte Verbindung zwischen massenspektrometrischen und licht- bzw. elektronenoptischen Techniken stattgefunden [51] [72] [73]. Es wird dabei auch an nativen biologischen Proben möglich, anhand von rasternden Messungen, eine Kombination der erhaltenen chemischen Information über die detektierte relative Häufigkeit von Analyten mit ihrer örtlichen Verteilung im Präparat zu erlangen. In der Literatur finden sich bislang hauptsächlich Darstellungen der Daten in der Form zweidimensionaler Pixelbilder. In Abbildung 2.5 ist schematisch eine Übersicht der Rasterung am verwendeten Spektrometer LAMMA 2000 mit einer UV-MALDI-Quelle im Hochvakuum zu erkennen. Prinzipiell ist aber auch eine dreidimensionale Darstellung denkbar und praktisch bereits möglich. Theoretisch sind im Falle der Flugzeitmassenspektrometrie als Analysortechnik dabei sogar axiale Submikrometerraufösungen realistisch [58]. Einige Autoren rechnen auch sequenzielle Messfolgen, die aus unterschiedlichen Höhenebenen einer Probe (variable z-Position) nacheinander erhalten werden, hinzu. In diesem Sinne ist eine 3-D-Darstellung mit Massenspektrometern dann nicht nur auf Flugzeitanalysatoren beschränkt. An die Stelle der Flugzeiten, die dort als axiales Tiefenmaß verwendet werden können treten dann entweder die Schnittdicken der Präparate selbst oder aber die genau ermittelten Ablationstiefen, die pro Laserpuls bei der jeweiligen Rasterung erreicht werden [8] (Kapitel 4) [74]. Die Ablationstiefe stimmt dann im günstigsten Fall mit der Desorptionstiefe überein.

Die räumliche Anordnung von Analyten und diesen eindeutig zuordbare chemische Veränderungen, die sich in der Summenformel niederschlagen, können mittels der bildgebenden Massenspektrometrie, im Vergleich zu *präparativ* wesentlich aufwendigeren optischen Verfahren, theoretisch allein durch eine sehr genaue Bestimmung der (i.d.R. monoisotopischen) Massen identifiziert werden. An die Stelle einer Markierung der Analyte im klassischen Sinne tritt hier die Identität einer chemischen Substanz anhand ihrer Masse, als eine Art physikalischer „Fingerabdruck“. Die Eindeutigkeit dieses Fingerabdruckes ist theoretisch nur durch das Auftreten von chemischen Strukturisomeren begrenzt. Praktisch sind dagegen aber auch *isobare* Verbindungen mit identischen *nominalen* Massen eine weitere Barriere, die aber bei einer entsprechend hohen Massenaufösung eines Spektrometers technisch handhabbar werden. Diese Limitierung verschiebt sich deshalb zu immer kleineren absoluten Massedifferenzen. Die Spezifität von *histochemischen* Antikörper-Fluorophor-Markierungen [75] kann so theoretisch erreicht werden, wenn für eine Massenanalyse höchstaufösende Analysatoren eingesetzt bzw. Ionenmobilitätszellen einer MS-Messung vorangestellt werden können [32]. Zusätzlich zu der eigentlichen Identifikation einzelner Analyte können bei jeder vollständigen Messung (über einen größeren Massenbereich) immer auch Informationen über die molekulare (chemische) Umgebung der Analyte erhalten werden. Eine Verwertung dieser Zu-

<sup>13</sup>Bildgebende Mikrosondentechnologien waren bislang, routinemäßig, weitestgehend technischen, physikalischen oder anorganisch-chemischen Untersuchungen vorbehalten.

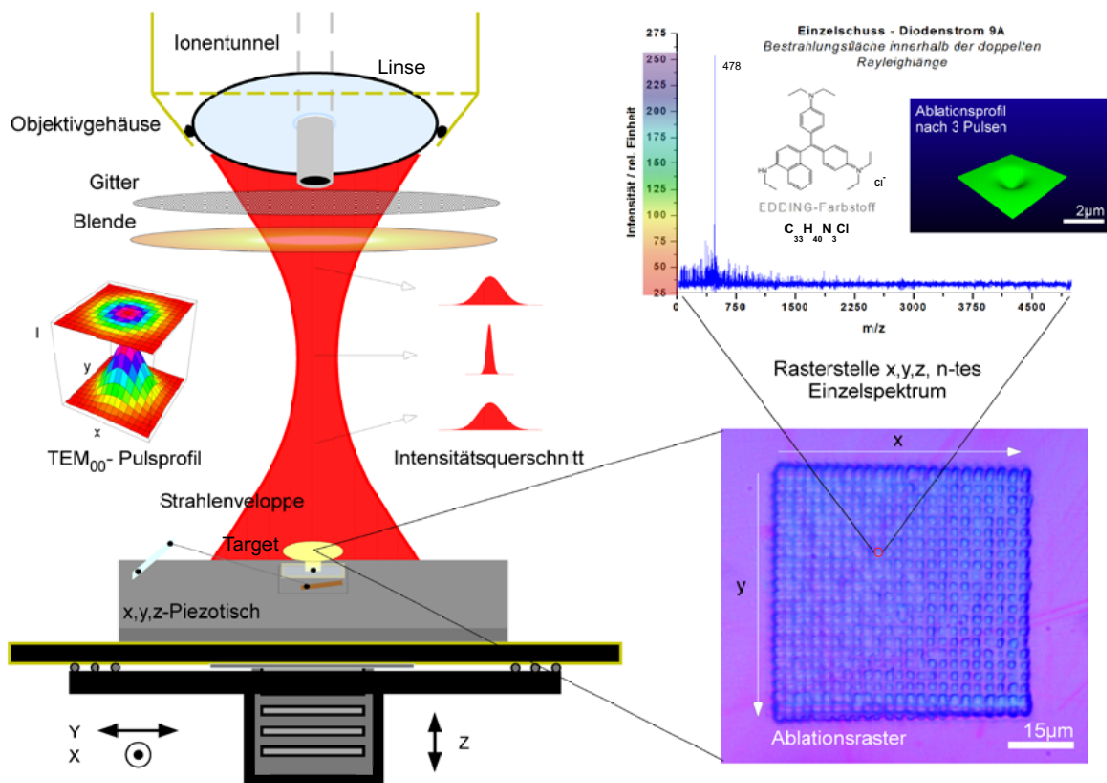


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des rasternden Mikrosonden-Messprinzips, anhand der Verhältnisse am Spektrometer LAMMA 2000. Die Darstellungen sind nicht maßstabsgerecht. Unten rechts ist eine Oberflächenrauerung einer dünnen blauen Farbstoffschicht zu erkennen. Prinzipiell kann jedem einzelnen Messpunkt im Raster, neben der Signalintensität (i.d.R. die des Massenzentroides) und den lateralen Ortsparametern, weitere Information zugeordnet werden. Hierzu zählt z.B. die Anzahl der Pulse pro Messstelle, die Pulsenergie, die Massenauflösung des Peakzentroides und dessen Symmetrie.

satzinformationen setzt dabei allerdings eine genaue Kenntnis der *geräte-* und *präparationsspezifischen* Einflüsse in den Spektren voraus. Ein praktisches Beispiel, das die potenzielle Nützlichkeit der bildgebenden Massenspektrometrie an biologischen Proben verdeutlicht, kann z.B. anhand eines Vergleiches mit der „klassischen“ Histologie und Färbetechniken an Gewebepreparaten erfolgen [31] [76] [77]. Histologische Färbetechniken sind als Grundlagenverfahren zur Diagnostik in der medizinischen Anwendung sowie auch in der biologischen Forschung etabliert. Ein Ziel der abbildenden Massenspektrometrie liegt in der spezifischen Molekularstrukturerkennung von Gewebe- oder Zellbestandteilen, die dann in unmittelbar einsichtiger Weise eine Beurteilung des „gesehenen“ Befundes, aufgrund der immer hinterlegten exakten molekularen Aussagen der Massenspektren ermöglichen. Eine molekulare Unterscheidung zwischen krankhaft verändertem und gesundem Gewebe in medizinischen Präparaten stellt damit eine mehr als nützliche Ergänzung zu herkömmlichen histologischen Methoden dar. Vor allem vor dem Hintergrund, daß diese in Grenzfällen, mit Ausnahme der antikörperbasierten histochemischen Verfahren, nicht molekular eindeutig sind. Nicht zuletzt zeigt sich die wachsende Bedeutung der bildgebenden Massenspektrometrie auch in der steigenden Zahl von Lehrbuchbeiträgen zu dieser Thematik [8] (Kapitel 4) [78].



### 2.2.1 Aufnahmetechniken

Prinzipiell kann die bildgebende Massenspektrometrie durch drei, teilweise apparativ wie methodisch unterschiedliche, Ansätze realisiert werden. Diese sind schematisch in Abbildung 2.6 nebeneinander dargestellt. Eine mögliche Einteilung erfolgt nach der Verwandtschaft zu den licht- bzw. elektronenoptischen Aufnahmetechniken, einerseits in den (Weitfeld)Mikroskopmodus (*microscope mode*) und andererseits in den rasternden Mikrosondenmodus (*microprobe mode*) [79]. Besonders im Zusammenhang mit alternativen Desorptions-/Ionisierungsverfahren wird die Einführung eines weiteren Modus sinnvoll. Hierzu zählt z.B. DESI-Imaging bzw. allgemein alle rasternden Verfahren, bei denen ein kontinuierlicher Desorptionsprozess auch während des Messstellenwechsels erfolgt bzw. die Rasterfrequenz die Aufnahmefrequenz der Spektren erreicht oder übertrifft [80] [81]. Wenn die Spektrenaufnahme entlang einer Richtung demnach kontinuierlich und nicht mehr diskret erfolgt, ist der Begriff des Linienrasterverfahrens (*linescan mode*) wohl deutlich treffender, wenngleich er in dieser Weise im Zusammenhang mit der Massenspektrometrie in der Literatur (noch) nicht eingeführt ist. Eine weitere Differenzierung des Sondenmodus wird hier mit manchen Proben notwendig, da besonders an Objektkanten (Bereiche mit hohem Kontrast) in Abhängigkeit der Rasterrichtung qualitative Unterschiede zu einer vollständig diskreten Rasterung eintreten können. Es ist in diesem Fall dann nicht egal, wie die Rasterrichtung über der abzubildenden Struktur verläuft bzw. mit welcher Geschwindigkeit der mechanische Messstellenwechsel erfolgt [82]. Das trifft ganz allgemein auch bei den diskreten Verfahren zu, ist dort aber nicht immer entscheidend. Es gilt generell zunächst, daß bei rasternden d.h. fokussierenden optischen Systemen, die MTF (Modulationsübertragungsfunktion) über die Geometrie der PSF (Punktverwaschungsfunktion), von der Lage einer periodischen Struktur d.h. von ihrer Orientierung im Messaufbau abhängt (Definitionen siehe Anhang).

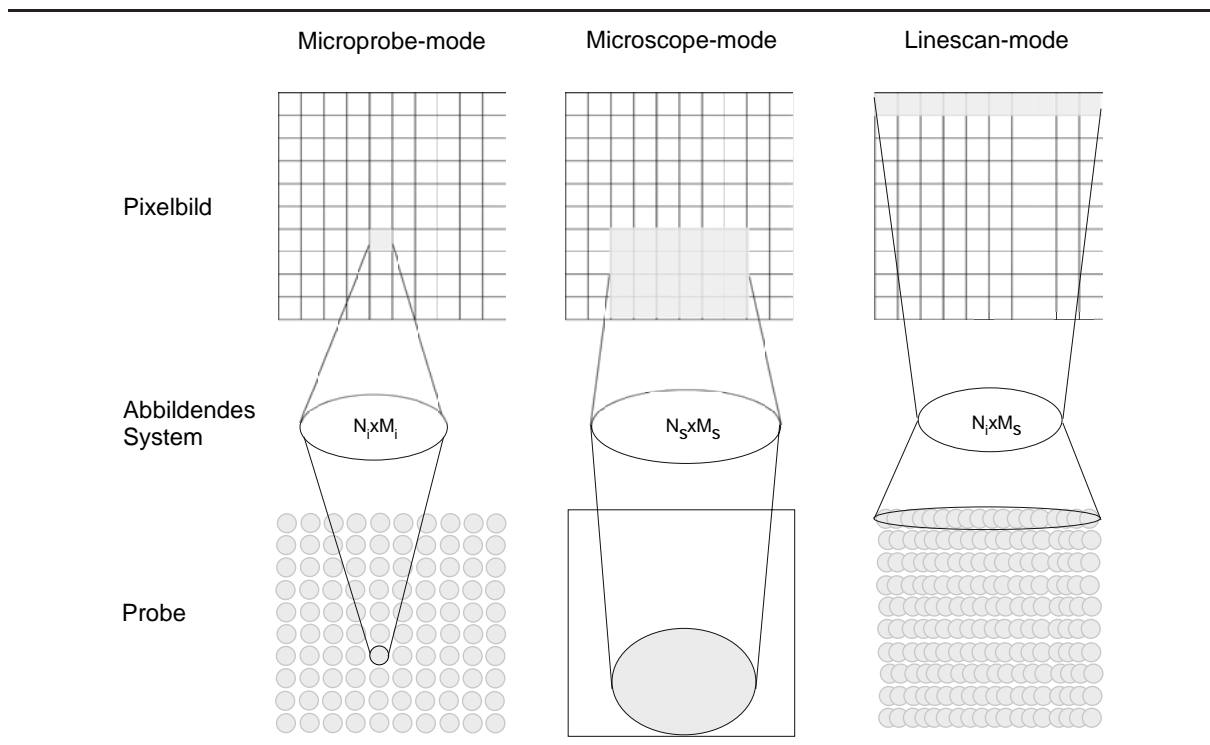


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der unterschiedlichen bildgebenden Aufnahmeverfahren: *Microprobe Mode*, *Microscope Mode*, *Linescan Mode*.

Im Microscope mode wird ein relativ großer Bereich der vermessenen Probe gleichzeitig in einem Puls

desorbiert/ionisiert und die erzeugten Ionen i.d.R. eines  $m/z$ -Verhältnisses werden dann als *Punkt-zu-Punkt* und *Parallel-zu-Parallel* Abbildung auf einen ortsauflösenden Detektor projiziert. Bei dem *Microprobe mode* erfolgt die Detektion *jedes* diskreten ortsauflösenden Messpunktes dagegen einzeln und die Registrierung des vollständigen Pulsspektrums am Detektor ist intensitäts- und zeitaufgelöst. Im *Microscope mode* wird die Ortsauflösung über die laterale Auflösungsfähigkeit der Detektionseinheit erzielt, im *Microprobe mode* dagegen über die laterale Auflösung der erfolgten Desorption/Ionisierung an der Probe selbst (Desorptionsvolumen). Der *Microscope mode* liefert immer (nur) Teilbilder einzelner Ionenspezies aus einem über die Probenfläche erzeugten Ionenpuls mehrerer Ionenspezies. Das Mikrosondenverfahren kann theoretisch von jeder detektierten Ionenmasse in einem Pulsspektrum Bilder erzeugen. Die Darstellung der generierten Ionensignalintensitätsverteilungsbilder erfolgt mit beiden Verfahren in digitaler Form und i.d.R. als zweidimensionales Pixelbild. Denkbar sind aber auch dreidimensionale Voxelquader. Die Pixel/Voxel haben aufgrund der derzeit (noch ausschliesslich) angewandten Darstellungstechniken eine rechtwinklige Form, sind prinzipiell aber nicht auf eine bestimmte Geometrie festgelegt. Die Kantenlänge eines Pixel sollte im *Microprobe mode* im wesentlichen mit dem Ablationsquerschnitt einer Messstelle übereinstimmen, entspricht methodisch aber dem Desorptionsquerschnitt der Ionenemission. Das zeigt sich deutlich immer dann, wenn unterschiedliche Aufnahmearten verwendet werden, bei denen z.B. die Rasterschrittweite eine überlappende (*oversampling*) oder eine lückenhafte (*undersampling*) Ablation über der vermessenen Rasterfläche aufweist. Im Gegensatz zu licht- bzw elektronenoptischen Techniken gilt in der bildgebenden Massenspektrometrie keineswegs der Grundsatz, daß ein Oversampling immer Vorteile bringt.

Die in kommerziellen MALDI-Quellen eingesetzten Laserquerschnittsprofile sind meistens unsymmetrisch, da sie i.d.R. unter einem Winkel  $\neq 0^\circ$  zur optischen Achse der elektrostatischen Beschleunigungseinrichtung eingekoppelt werden<sup>14</sup>. Die angewandten Fokusbereiche sind dabei mehrheitlich ebenfalls deutlich größer als  $d \approx 50 \mu\text{m}$  (mit wenigen Ausnahmen z.B. Smartbeam, Bruker Daltonics). Im Mikrosondenmodus kann die Rasterung entweder immer nur in eine Richtung oder aber meandrierend ablaufen. D.h. die Endorientierung einer Rasterzeile ist die Startorientierung der nächst folgenden Zeile, die dann senkrecht um (mindestens) den Betrag einer Pixelkantenlänge versetzt ist. Bei symmetrischen Strahlprofilen entspricht die Pixelkantenlänge oft genau dem geometrischen Strahldurchmesser des Laserquerschnitts. Wie später noch näher erläutert, ist der optische Strahldurchmesser gaussförmiger Laserpulsprofile nicht immer identisch mit dem wirksamen Desorptionsdurchmesser im Probenmaterial [51] [53]. Im *Microscope mode* ist die Ortsauflösung i.d.R. durch die primären Stossereignisse (z.B. SIMS, Unschärfe durch auftretende Stosskaskade) im Präparat und zum anderen durch die laterale Auflösung am Sensor begrenzt (*Punkt-zu-Punkt* u. *Parallel-zu-Parallel* Abbildung des Ionenstrahls). Meistens wird über die theoretisch erreichbare Ortsauflösung das zusätzlich verwendete bildgebende System, z.B. eine CCD-Array-Einheit, entscheiden (ca.  $4 \mu\text{m}$  in [72]). In Abbildung 2.7 ist ein Beispiel eines im *Microprobe mode* erstellten artifiziellen Ionenintensitätsverteilungsbildes dargestellt.

---

<sup>14</sup>Stickstoff-Laser besitzen i.d.R. bereits unsymmetrische Ausgangsprofile.



## Spektrale Information in bildgebender Darstellung

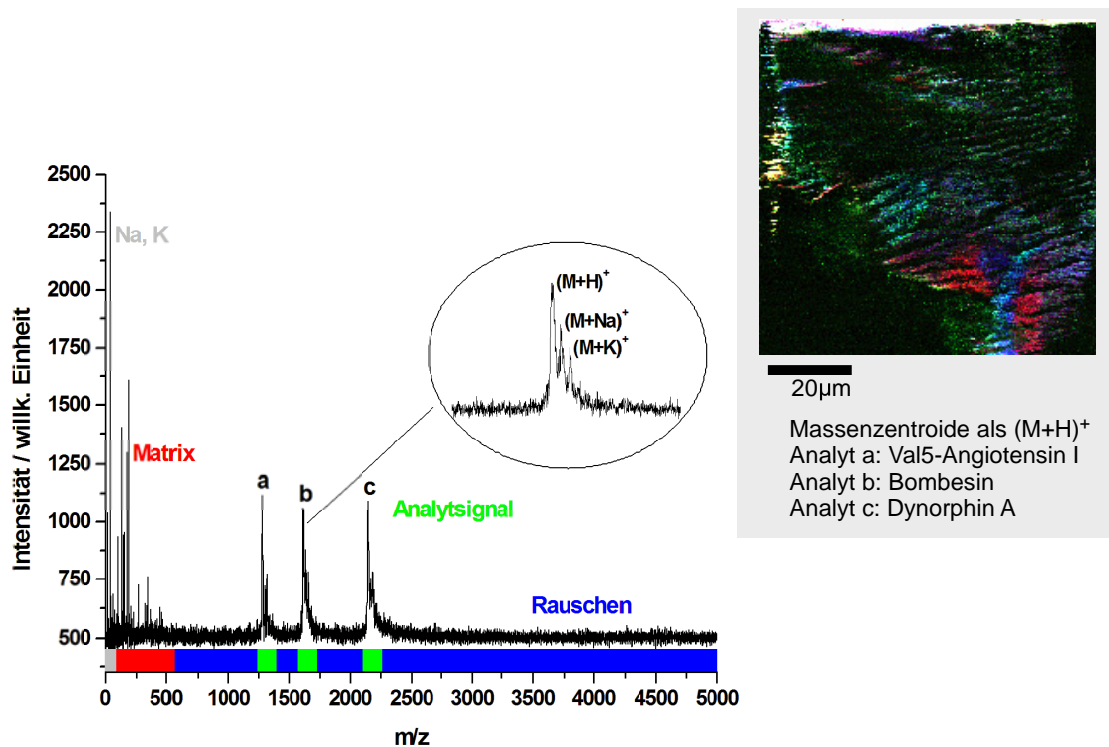


Abbildung 2.7: MALDI-TOF-Messung von drei Peptiden (a,b,c) mit der Matrix 2,5-DHB. Äquimolare Peptidkonzentration  $c = 10^{-5} M$ ,  $c_{DHB} = 10 \text{ mg/ml}$  in Ethanol/0.1% TFA 3:7 v/v. Linearmessung am Spektrometer LAMMA 2000. Das erstellte Falschfarbenbild der Ionenintensitätsverteilungen setzt sich aus der Überlagerung der drei betrachteten Ionenintensitäten bei relativer Intensitätsnormierung für jeden Peak im Pixel zusammen. Pixelgröße  $1 \mu\text{m} \cdot 1 \mu\text{m}$ , ein Spektrum pro Pixel. Die Probenoberfläche liegt während der Messung innerhalb der Rayleighlänge des Nd:YLF-Strahlprofils. Präparation durch flächige Benetzung der Goldoberfläche des Probenträgers mit einem *Micro-Gel-Loader-Tip*. Präparationsvolumen ca.  $5 \mu\text{l}$ . Matrixkristallisation an Atmosphärendruck bei Raumtemperatur ca.  $23^\circ\text{C}$ . Dynorphin A =  $C_{99}H_{155}N_{31}O_{23}$ ,  $M_r = 2147.5$  Da; Bombesin =  $C_{71}H_{110}N_{24}O_{18}S$  Da (freie Base),  $M_r = 1619.9$ ; Val<sup>5</sup>-Angiotensin I =  $C_{61}H_{87}N_{17}O_{14}$ ,  $M_r = 1282.5$  Da.

Im Zusammenhang mit der bildgebenden MALDI-TOF-Massenspektrometrie sind besonders das *Quantification Limit* und der kleinste analog erfassbare Signalarzuwachs hervorzuheben. Zusammen mit dem (apparativen) Signalsättigungsbereich und der Speichertiefe der folgenden Analog-zu-Digitalumsetzung (z.B. 8 Bit- oder 16 Bit-ADC), legen diese Parameter den (theoretisch) maximalen Kontrastbereich und seine diskreten Abstufungen in einem erstellten Pixelbild fest. Im Falle der 8 Bit-Umsetzung entspricht das einer Kontrastauflösung von 1 Byte/Pixel bzw. 2 Byte/Pixel bei einer 16 Bit-Umsetzung. Die Rohdatengröße des benötigten Speichers für ein Pixelbild kann über die Anzahl der Pixel berechnet werden z.B. für ein 100 x 100 Pixel umfassendes Bild ( $10^4$  Pixel) gemäß:

$$10^4 \cdot \frac{n \text{ Byte}}{\text{Pixel}} \cdot \frac{1024 \text{ Byte}}{1 \text{ kB}} = \#\# [ \text{kB} ] \quad (2.1)$$

Das *Quantification Limit* und der Bereich der (theoretischen) analogen Signalsättigung ist bei TOF-Spektrometern, in Kombination mit den meisten destruktiven Detektoren, masseabhängig. Das bedeutet, daß zudem ein nichtkonstanter maximaler Intensitätspegel in Ionenintensitätsverteilungsbildern aus unterschiedlichen Massenbereichen eines einzelnen Spektrums berücksichtigt werden muss, wenn Verteilungsbilder stark abweichender Ionenmassen erstellt und korreliert werden sollen. Bei einem großen Massenbereich ist deshalb eine Bestimmung des maximalen Pegels nach Massenbereichen getrennt sinnvoll. In der Literatur findet man auch eine Normierung, die den Totalionenstrom (*total ion current*, TIC) heranzieht. Der maximale TIC repräsentiert i.d.R. die Akzeptanz des Detektors. Zu bedenken ist, daß ein (identischer) TIC prinzipiell, von im Meßbereich verschiedenen SNR-Kombinationen erzeugt werden kann. Dies macht eine TIC-Normierung sehr unterschiedlicher Massenspektren, hinsichtlich eines Vergleiches von daraus erzeugten Bildern, problematisch. Wenn dagegen bei einer rasternden Messung bekannt ist, daß es sich z.B. um eine Präparation mit inhomogenem Matrixauftrag handelt, dann kann eine TIC-Normierung die Bildqualität erheblich steigern [46]. In Abbildung 2.8 werden am gezeigten Beispiel Ähnlichkeiten und Unterschiede bei der Ermittlung von „Signalintensitäten“ aus Spektren deutlich, je nachdem, welche Methode zur relativen Quantifizierung herangezogen wird.

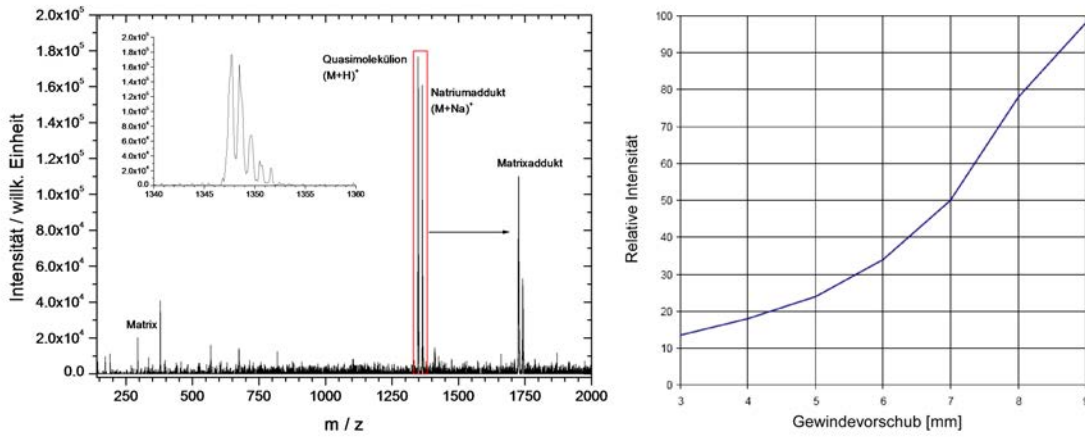
## 2.2.2 Analytische Auflösung

Neben den im Anhang (C) dargestellten Betrachtungen über die räumliche Auflösung der rasternden (optischen) Methoden ist im Rahmen der orts aufgelöst abbildenden Massenspektrometrie der Begriff der *analytischen Auflösung* eine anwendbare Bezeichnung [29] [51] [53]. Die erzielbare analytische Ortsauflösung bezieht sich dabei auf die laterale und/oder axiale räumliche Zuordnung von Desorptionseignissen, die wesentlich für die detektierte Signalintensität sind. Neben dem gut bestimmbaren Laserstrahldurchmesser sind darüberhinaus auch weniger gut zu ermittelnde, probenspezifische, physikalisch-chemische Größen zu berücksichtigen. Hierbei handelt es sich um die Ablationsenthalpie bzw. die physikalische *Wirkung* der Pulse im Probenmaterial [71]. Die erzielbare analytische Ortsauflösung bei Messungen kann deshalb höher sein, als z.B. allein durch den  $1/e^2$ -Durchmesser des fokussierten Laserstrahlprofiles angenommen. Bei der Abbildbarkeit von Strukturen in einer Aufnahme greift dennoch in jedem Fall das Nyquist-Kriterium (siehe C.4.4, S. 499).

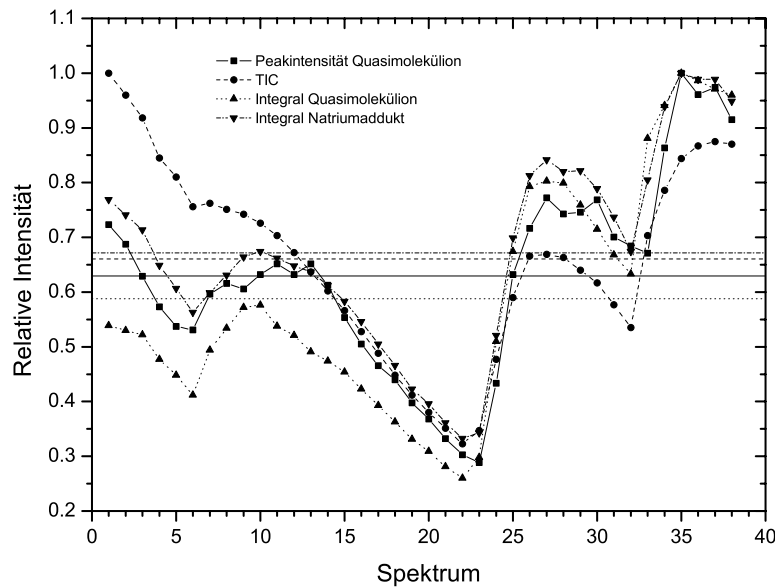
## 2.2.3 Alternative Desorptions-/Ionisierungsverfahren

Neben den Techniken LDI, MALDI und den prinzipiell sehr ähnlichen Lasertechniken (LSI, LAESI, etc.) sind auch noch weitere Massenspektrometrierverfahren zur bildgebenden Analyse einsetzbar. Zu nennen sind dabei vor allem die *Sekundärionen-Massenspektrometrie* (SIMS und Matrix enhanced SIMS bzw. Liquid-SIMS = FAB, Primärstrahlenergie  $K \approx 5 \text{ keV}$  bis  $25 \text{ keV}$ ) [59] [72] [83], DESI, die Laser-

AP-MALDI-Quelle von MASSTECH an LCQ DECA XP



(a)



(b)

Abbildung 2.8: (a) Summenspektrum der Messungen und relative Laserenergie in Abhängigkeit des Stellschraubenvorschubs (Quelle: MASSTECH AP-MALDI Manual). (b) Gegenüberstellung der relativen Intensitäten des TIC (Integral, Rot) sowie einzelner Intensit tsbeziehungen. Peakintensität des monoisotopischen Massensignals von Substanz P, Integral des monoisotopischen Massensignals von Substanz P und Integral des monoisotopischen Massensignals des Na-Adduktes von Substanz P. Es handelt sich um Messungen mit der AP-MALDI-Ionenquelle der Firma MASSTECH am 3D-Quadrupolionenfallen-spektrometer LCQ DECA XP. Dried droplet-Präparation, 0,5  $\mu$ l ca.  $7.5 \cdot 10^{-5}$  M Substanz P gemischt mit  $4 \times 2 \mu$ l ca. 4 mg/ml CHCA. Target-Voltage: 3.5 kV, Capillary temp.: 300°C, Capillary Voltage: 45 V, Tube lens offset: 55 V, Multipole 1 Offset: -6.75 V, Lens Voltage: -24 V, Multipole 2 Offset: -9.5 V, Multipole RF Amplitude: 400 V, Entrance lens: -48 V, AGC Off, IT-time: 1000 ms, 1 Microscan/Spectrum. AP-MALDI-MASSTECH Einstellungen: External timing: Synchro pulse duration = 350 ms. Variation der Laserenergie von ca. 6.5 mm bis 9 mm Stellschraubenvorschub während der Messungen. Die Signalintensitäten zeigen eine positive Korrelation mit der Bestrahlung. Der auf den TIC normierte relative Intensitätsvergleich zeigt, daß unterschiedliche Auswertungen der Signale der Hauptsubstanz in Spektren, keinen signifikanten Einfluss auf den relativen Verlauf haben, Unterschiede aber dennoch feststellbar sind.

Ablations-ICP-MS (LA-ICP-MS) [84] [85] und die Beschleunigermassenspektrometrie (AMS) [86]<sup>15</sup>. Die hohe physikalische Ortsauflösung von SIMS (Emissionsmikroskopie, Mikrostrahlsonde [87]) macht diese theoretisch auch für die biologische Einzelzellanalytik interessant [88]. Allerdings ist sie wegen der starken Fragmentierung größerer organischer Moleküle, wie auch LDI i.d.R. auf Molekularmassen bis ca. 1 kDa begrenzt. Die laterale Auflösung von SIMS-Abbildungen ist dabei im Vergleich zu LDI- und MALDI-Anwendungen wesentlich höher und liegt oft im Bereich der Größenordnung des Primärstrahldurchmesser z.B.  $d \approx 10 \text{ nm}$  [89] [90]. LA-ICP-MS und AMS sind wegen der hohen erreichten Temperaturen ( $T \approx 5 \cdot 10^3 \text{ K}$  bis  $1 \cdot 10^4 \text{ K}$ ) bzw. der hohen erreichten Beschleunigungsenergien ( $K \approx 10^6 \text{ eV}$ ) dagegen nur indirekt, d.h. in Kombination mit einer chemischen Elementanalytik für biologische Fragestellungen einsetzbar. Eine sehr interessante und vollkommen *matrixfreie* Methode ist die sogenannte DIOS-Technik. Sie wird in Kombination mit LDI (Desorption/Ionization on porous Silicon) angewandt. Hierbei wird auf eine poröse bzw. mesoporöse Siliziumschicht, die sich i.d.R. auf einem strukturell unterscheidbaren Siliziumwafer befindet, die biologische Probe in der Form dünner Gewebeschnitte (vergleichbar zur Transmissions-Elektronenmikroskopie, Präparatdicke  $\approx 50 \text{ nm}$ , fixiertes Präparat) oder auch einzelner Zellen aufgebracht und direkt vermessen. Eine konventionelle aber auch eine abbildende Massenspektrometrie ist damit prinzipiell denkbar [91]. Wie bei SIMS bzw. Liquid-FAB und LDI existiert aber auch hier, aufgrund einsetzender Fragmentierung, ein oberes Massenlimit bei ca. 1 kDa.

## 2.3 Präparationstechniken zur ortsaufgelösten MALDI-MS

### 2.3.1 Einflussgrößen

Die Präparationstechniken zur Applikation kristalliner MALDI-Matrizes auf native biologische Probenoberflächen stellen, neben den Extraktionsbedingungen der Quellgeometrie, den zweiten direkten Einflussbereich auf die pro Puls und Messstelle freisetzbare Ionenmenge im Mikrosondenverfahren dar. Bei allen Präparationsmethoden, die dabei einen Auftrag aus Lösungen heraus anwenden, liegt ein sensibler Schritt bei der Kristallisation bzw. beim Erstarrungsprozess in amorphen Präparationen. Der Vorgang der Kristallisation kann i.d.R. in die Schritte der Keimbildung (*nuclei formation*) und das Kristallwachstum (*crystal growth*) unterteilt werden [8] (Kapitel 1) [92]. Für jede Matrix ergeben sich zunächst, in Abhängigkeit der verwendeten Lösungsmittel, maximale Löslichkeiten. Die Lösungsmittelverdampfung im eigentlichen Präparationsprozess wird dann durch die physikalischen Eigenschaften des Probenträgermaterials, die Konzentrationen der löslichen ionischen Probenbestandteile und der Matrix sowie durch die Art der Präparationsmethode und der Gasphasenzusammensetzung über der Probe beeinflusst. Es sind deshalb bei der Keimbildung und der Kristallisation folgende Parameter in ihrem Einfluss empirisch zu betrachten:

- Die Konzentration der Lösungsmittel in einem i.d.R. positiv *azeotropen* Gemisch von zwei in einem Verhältnis mischbaren Anteilen (X/Wasser; X = Ethanol, Propanon, Acetonitril, 2-Propanol, etc.. Siehe Ergebnisteil S. 219 ff).
- Die Matrixkonzentration und die *kolligativen* Eigenschaften der Matrix.
- Die chemische und physikalische Oberflächenbeschaffenheit einer Probe und die des Probenträgers.
- Die Temperatur der Probe bzw. des Targets während einer Präparation.
- Der Atmosphärendruck der Präparationsumgebung,

---

<sup>15</sup>Gallium-Ionenquelle, SIAMS = Scanning secondary ion accelerator mass spectrometry.

und ggf. auch die Zusammensetzung der Atmosphäre während der Präparation zumindest bei Methoden, bei denen eine Trocknung nicht an Luft stattfindet. In Abbildung 2.9 ist eine Schemazeichnung von mit Matrixkristallen bedecktem Gewebe zu erkennen. Abbildung 2.10 zeigt exemplarisch MALDI-Peptidproben, die mit unterschiedlichen Präparationstechniken erstellt worden sind.

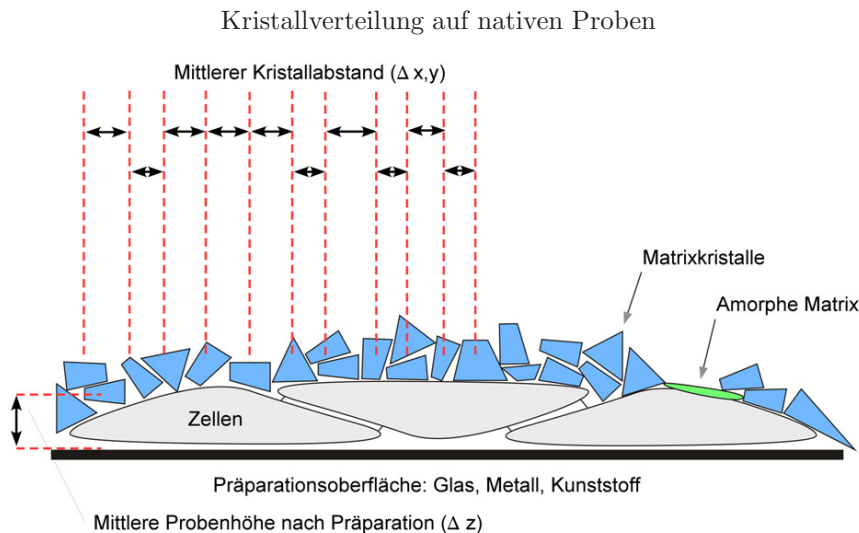


Abbildung 2.9: Matrixpräparation auf nativen biologischen Oberflächen. Höhentopologie und (theoretische) mittlere Kristallabstände in der Präparationsebene als Schemadarstellung.

### 2.3.2 Präparation nativer biologischer Proben

Die Eignung einer MALDI-Präparationstechnik speziell zu einer Oberflächenanalyse (im weiteren Sinne) nativer biologischer Proben, richtet sich einerseits nach der zu erreichenden Ortsauflösung und andererseits danach, ob neben einer qualitativen Beurteilung der Probe auch (semi-)quantitative Aussagen über die vermessenen Analyte angestrebt werden. Topologische Analysen die nur eine niedrige Ortsauflösung erreichen, dafür aber einen relativ großen Intensitätsbereich abdecken können und damit über die geringe Ortsauflösung eine Art flächenhomogenisierende Wirkung besitzen, werden oft auch als *Profiling* bezeichnet. Analysen die eine relativ hohe Ortsauflösung erreichen und die Daten dann bildgebend darstellen, werden i.d.R. als *Imaging* bezeichnet [39]. Eine exakte Grenze, die eine Trennung zwischen der Zuordnung der Begriffe Profiling und Imaging auf massenspektrometrische Techniken festlegt, hat sich bislang aber noch nicht etablieren können und hängt in hohem Maße auch davon ab, was letztendlich die Aussage entsprechender Untersuchungen sein soll. Man findet in der Literatur deshalb oft einen uneinheitlichen Gebrauch beider Begriffe. Eine Trennung zwischen hoher und niedriger Ortsauflösung erscheint aber als sinnvoll, da zum Profiling (niedrige Ortsauflösung) auch andere massenspektrometrische Verfahren, als die oberflächenrasternden Methoden geeignet sind. Profiling stellt somit im Vergleich zu Imaging, absolut gesehen, noch die häufigere Anwendung mit Massenspektrometern innerhalb der Bioanalytik dar.

Als Präparationstechniken zur Darstellung von Analyten aus nativen biologischen Proben eignen sich, neben Bedampfungs/Sublimations-, Druck- und Ultraschallpräparationen, besonders für die ortsauflösende bildgebende Massenspektrometrie (hier eindeutig als Imaging verstanden), Verfahren zum gleichmässigen und sehr feinen Auftrag der Matrix (Pneumatisches Spray, Elektrospray, mechanisches Streuen) [39]. Mit Ausnahme des Elektrosprayverfahrens sind mittlerweile eine Auswahl kommerzieller Systeme zur

## MALDI-Präparationstechniken

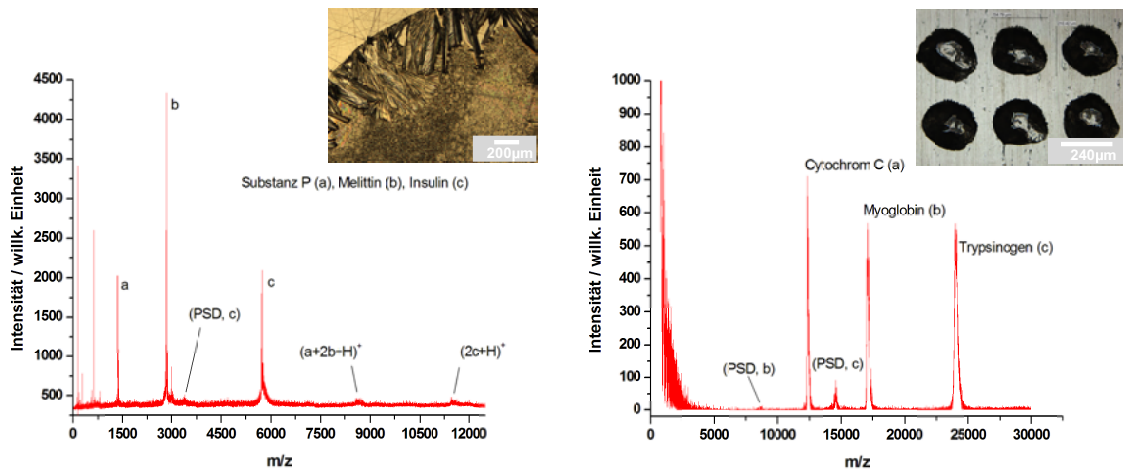


Abbildung 2.10: Artifizelle MALDI Proben zeichnen sich i.d.R. durch ein  $\text{SNR} \gg 2$  in Summenspektren aus. Links: Goldbeschichteter Aluminiumteller. *Dried-droplet*-Präparation einer Mischung der Peptide Substanz P, Melittin, und Rinderinsulin in äquimolarer Konzentration  $c = 10^{-6} \text{ M}$  und DHB  $c_{\text{DHB}} = 10 \text{ mg/ml}$  in Ethanol/0.1% TFA 3:7 v/v, Auftragsvolumen ca.  $1 \mu\text{l}$ , Massenspektrometer LAMMA 2000, Linearmessung. Substanz P,  $M_r = 1347.63 \text{ Da}$ ,  $\text{C}_{63}\text{H}_{98}\text{N}_{18}\text{O}_{13}\text{S}$ ; Melittin,  $M_r = 2846.46 \text{ Da}$ ,  $\text{C}_{131}\text{H}_{229}\text{N}_{39}\text{O}_{31}$ ; Rinderinsulin,  $M_r = 5733.49 \text{ Da}$ ,  $\text{C}_{254}\text{H}_{377}\text{N}_{65}\text{O}_{75}\text{S}_6$ . Rechts: Proben-träger Edelstahlplatte. Druckpräparation mit kommerziellem Drucksystem (Shimadzu CHIP-1000) mit einem Drucktropfen-volumen von ca.  $87 \text{ pl}$ , Tropfendurchmesser ca.  $55 \mu\text{m}$ . Peptidkonzentrationen  $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  (1:3:10), Cytochrom C (Pferd), Myoglobin (Pferd) und Trypsinogen. Cytochrom C (P62894),  $M_r = 11701.4 \text{ Da}$ ,  $\text{C}_{522}\text{H}_{832}\text{N}_{144}\text{O}_{151}\text{S}_5$  plus Hämgruppe c,  $M_r = 684.65 \text{ Da}$ ,  $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2\text{Fe}$ ,  $M_{\text{equine}} = 12384 \text{ Da}$ ; Myoglobin (equine),  $M_r = 16951.27 \text{ Da}$ ,  $\text{C}_{769}\text{H}_{1212}\text{N}_{210}\text{O}_{218}\text{S}_2$ ; Trypsinogen als  $(M + H)^+$   $M_r = 23981 \text{ Da}$  (Sigma-Aldrich T1143); Anionisches Trypsinogen (Q547S4)  $M_r = 26282.60 \text{ Da}$ ,  $\text{C}_{1163}\text{H}_{1771}\text{N}_{305}\text{O}_{363}\text{S}_{14}$ . Nachträgliche Matrixspraypräparation mit 2,5-DHB, Linearmessung am Massenspektrometer ALADIM II. Näheres dazu im Diskussions- und Ergebnisteil.

Matrixpräparation an biologischen Proben erhältlich. Elektrosprayverfahren erzeugen, neben der Technik des Streuens von feinkristalliner Matrix durch Netze mit feiner Maschenweite, dabei die kleinsten Kristalle und bilden eine sehr dichte und homogene Verteilung auf einer Targetoberfläche. Es ist bislang aber unklar, ob Elektrosprayverfahren bei Messungen an nichtleitenden biologischen Proben, ohne zusätzliche Behandlung z.B. einer vorhergehenden Beschichtung mit Gold oder ähnlichem, vergleichbare Ergebnisse zu den pneumatischen Methoden ermöglichen. Ein gleichmäßiger Matrixauftrag ist i.d.R. wichtig, da Unregelmäßigkeiten im Zusammenhang mit unterschiedlichen Analytverteilungen in Proben, zu Formen der Artefaktbildung führen können.

### 2.3.3 Thermischer Droplet-On-Demand Generator

Untersucht wird in dieser Arbeit, neben einem speziell entwickelten Zweikomponenten-Sprühverfahren auch das Drucken von Matrix- und Matrix/Analytlösungen mit einem modifizierten kommerziellen thermischen DOD-Jet-Drucker (Modell: HP-Deskjet 550 D) [51]. Kommerzielle vollautomatische Matrix/Analyt-Drucksysteme sind mittlerweile von mehreren Herstellern erhältlich (z.B. CHIP, Piezokapillaren, Shimadzu Corp.). Als Drucken wird hier im weiteren Sinne der Auftrag von gelösten oder suspendierten Stoffen verstanden, die nach durchlaufen einer Transportstrecke in Tropfenform oder als Feststoff auf die zu präparierende Oberfläche oder die zur Messung notwendige Targetfläche gelangen. Weiterhin sind auch Verfahren bekannt, die feinkristalline Matrices direkt durch ein Sieb mit enger Maschenweite aufbringen [52]. Eine andere Methode besteht darin, einen gebildeten Tropfen direkt und noch



vor dem Abriss an der Bildungsstelle auf eine Oberfläche, gewissermaßen abzulegen (Pipettieren). Mit einem, zu dem in dieser Arbeit vergleichbaren, HP Ink-Jet-Drucker konnten Arbeitsgruppen bereits zeigen, daß sogar lebende und mit einem fluoreszierenden Vitalfarbstoff markierte Pro- und Eukaryotenzellen, in Alginatmikropartikeln, strukturiert auf Oberflächen gedruckt werden können <sup>16</sup>.

Ein generelles Problem bereitet beim Drucken diskreter Tropfen immer das mehrmalige Anfahren, bereits einmal positionierter Bereiche. Erforderlich wird dies z.B. bei der gezielten Matrixbeschichtung von zuvor diskret verdauten Probenstellen. Im Gegensatz zu Pipettierverfahren ist zu einer Kontrolle der Druckpositionierung im Wiederholverfahren, deshalb i.d.R. ein *aktives* Korrektursystem (Rückkopplung) notwendig, um ein reproduzierbares Ergebnis gewährleisten zu können. Ein solches nichtkommerzielles System wird z.B. für Piezo-Röhrendrucker beschrieben [95] [98]. Eine anschauliche Abbildung über die DOD-Tropfenerzeugung ist in Abbildung 2.11 zu erkennen.

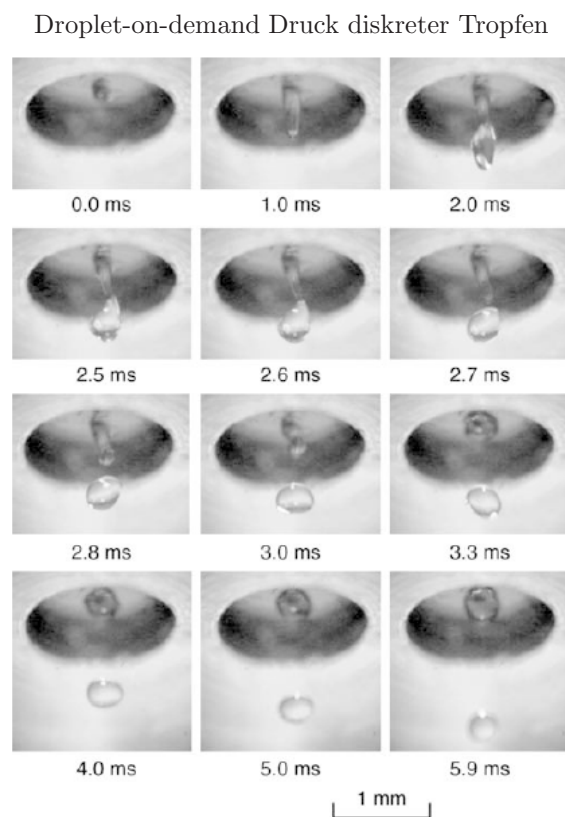


Abbildung 2.11: Erzeugung eines einzelnen Wassertropfens an einen pneumatischen Droplet-On-Demand Generator. Abbildung entnommen aus [96]. Die Darstellung zeigt die Tropfenbildung nach einem 4.61 ms Triggerpuls zur Öffnung des pneumatischen Ventils. Kamera: Nikon E3, Nikon Canada, Mississauga, Ont., Canada, ausgestattet mit einem Mikroskop: Questar QM100, Company Seven, Astro-Optics Division, Montpelier, Md., USA (Auflösung  $1.1 \mu\text{m}$  in 0.15 m Arbeitsabstand). Beleuchtung: Stroboskop: Model X1200, Perkin-Elmer Optoelectronics, Fremont, Calif., USA (Blitzdauer  $10 \mu\text{s}$ ), Glasfaserleitung.

<sup>16</sup>Beta TC6-Zellen mit ca. 89% Überlebensrate, US-Patent 7051654 - Ink-jet printing of viable cells [93] [94].

### 2.3.4 Zweikomponentensprühtechnik

Die Zweikomponentensprühtechnik bildet den methodischen Schwerpunkt dieser Arbeit, im Rahmen der Untersuchung der vorbereitenden Präparationstechniken. Bei den Sprühtechniken zur Matrixpräparation sind u.a., im Zusammenhang mit der bildgebenden Massenspektrometrie, Anordnungen mit rein *pneumatisch* arbeitenden Apparaturen sowie auch *Elektrosprayverfahren* bekannt. Die Elektrosprayverfahren erzeugen eine besonders kleine mittlere Kristallgröße und erreichen dadurch eine sehr homogene Beschichtung *leitfähiger* Oberflächen [99]. Die pneumatischen Sprühtechniken eignen sich besonders zur Beschichtung *nichtleitender* biologischer Oberflächen, da hier i.d.R. aufgrund der heterogeneren Tropfengrößenverteilung in einem Sprüh, eine höhere Restfeuchte auf der Präparatoberfläche resultiert.

Es wird in dieser Arbeit eine strömungsoptimierte Sprühtechnik mit statischer Düse und Stickstoff sowie einem während des Sprühvorgangs bewegten Targethalter untersucht. Diese Apparatur basiert auf einem bekannten Prinzip bzw. einem Aufbau ohne Sprühkammer und Targetbewegung [42] [97].

Das weltweit stärker werdende allgemeine Interesse an der bildgebenden MALDI-Massenspektrometrie in den letzten Jahren, führte zur Entwicklung und Verbreitung einer Reihe von kommerziellen Matrixpräparationsapparaten. So wird z.B. ein Sprayapparat mit beheizbarer Kapillare von der Firma LEAP-Technologies unter der Bezeichnung TM-Sprayer<sup>TM</sup> angeboten [101]. Ein automatisches Matrix-Pipettier- bzw. Druck-System wird außerdem von der Firma SunChrom hergestellt. Dieses Gerät kann mit einem Adapter zur Sprüherzeugung erweitert werden [102]. Ein weiteres vollautomatisches Matrixauftragungssystem, das allerdings auf anderer technischer Basis arbeitet (*vibrational vaporization*, Ultraschallverneblung), wird von der Firma Bruker Daltonik angeboten [103]. Fast alle kommerziellen Sprayverfahren basieren auf einer während des Sprühvorgangs bewegten Düse und einem ruhenden Proben target.

### 2.3.5 Sprüh- und Tropfenbildung

Der Prozess der Sprühbildung an Düsen wird seit etwa 150 Jahren mit unterschiedlicher Motivation wissenschaftlich untersucht [104]. Bei Wechselwirkungen zwischen zwei newtonschen Fluiden<sup>17</sup> werden, in Abhängigkeit der relativen Strömungsgeschwindigkeit an der Phasengrenze des Strahles, Störungen ausgebildet. Diese führen zum Strahlzerfall und zur Tropfenbildung. Neben der Geometrie der Düse sind hierbei die physikalischen Eigenschaften der Fluide entscheidend, für die Art und den Verlauf dieses Prozesses. Dabei können sprunghafte Änderungen zwischen einzelnen Prozesscharakteristiken auftreten. Aus den induzierten Störungen resultieren transversale Schwingungen, deren Amplituden im Verlauf der zunehmenden Strahlänge größer werden. Der sogenannte primäre Strahlzerfall (Lamellenzerfall) kann direkt auf diese Störungen zurückgeführt werden. Dem primären Strahlzerfall folgt i.d.R. ein weiterer (sekundärer) Strahlzerfall (Ligamentzerfall mit Tropfenbildung). Dieser wird im Wesentlichen durch die Gasdichte und die Ausprägung(en) der Fluidströmung beeinflusst.

Insgesamt kann zwischen Charakteristiken unterschieden werden, bei denen der Zerfallsprozess jeweils hauptsächlich durch einzelne Ursachen dominiert wird [105]. Diese Strömungsregime werden in Anlehnung an die Hauptursachen bezeichnet als:

- *Rayleigh Regime*
- *First-wind-induced Regime*

---

<sup>17</sup>Newtonsche Fluide zeichnen sich durch einen linearen Zusammenhang zwischen Scherspannung ( $\tau$ ) und Schergeschwindigkeit ( $\frac{du}{dy}$ ) aus:  $\tau = \mu_F \frac{du}{dy}$ , mit  $u$  = Strömungsgeschwindigkeit,  $y$  = Koordinate orthogonal zur Rohrwand,  $\mu_F$  = dynamische Viskosität.



- *Second-wind-induced Regime*
- *Atomization Regime*

Abbildung 2.14 zeigt fotografische Aufnahmen dieser Charakteristiken. Der Strömungsfluss inkompressibler newtonscher Flüssigkeiten in vertikal und/oder horizontal verlaufenden Rohrsystemen kann durch die, aus der Stromfadentheorie stammende, Bernoulli-Gleichung genähert werden. Aufgrund der Massenerhaltung wirken sich rohrquerschnittsabhängige Druckänderungen und ggf. hydrostatische Einflüsse (Änderung der potentiellen Energie) auf die Strömung aus. Die Bernoulli-Gleichung<sup>18</sup> ermöglicht das Aufstellen einer Energiebilanz im Rohrsystem, wobei prinzipiell die kinetische Energie, die Druckenergie und die potentielle Energie einer (verlustfreien) Strömung berücksichtigt werden. Da real i.d.R. nicht nur reine laminare Strömungen vorliegen und auch (Energie)Verluste z.B. durch Reibung etc. zu berücksichtigen sind, wird in der Praxis eine empirische Anpassung der Bernoulli-Gleichung notwendig. Dies führt dann i.d.R. zu getrennten Ausdrücken, einerseits für laminare und andererseits für turbulente Strömungen [106]. Die Strömung(en) im Düseninneren und am Übergangsbereich zur Atmosphäre werden über die Düsengeometrie beeinflusst, nicht selten erfolgt dabei eine Strukturierung des Düseninnenraumes (Leitkörper etc.). Die (reine) Bewegung newtonscher Fluide kann über die Navier-Stokes-Gleichungen (Impulserhaltung) theoretisch erfasst werden. Sie wird weiterhin zusammen mit der Kontinuitätsgleichung (Volumenstrom) und der Energieerhaltung aus der Thermodynamik in manchen Anwendungen zur mathematischen Modellierung herangezogen (CFD, *computational fluid dynamics*).

Bei sehr geringen relativen Strömungsgeschwindigkeiten erfolgt vor dem Einsetzen der Rayleigh Charakteristik, bei einer Strömung in eine statische Gasatmosphäre, zunächst, ein einfaches Abtropfen der Flüssigkeit (siehe hierzu Abbildung 2.12). Die Flüssigkeit benetzt dabei die Oberfläche des Kapillarausgangs und ggf. in Abhängigkeit des Materials auch die Außenflächen. Der nachfolgende Volumenstrom vergrößert den Tropfen solange, bis die Gewichtskraft der Masse des Tropfenvolumens die Oberflächenspannungskraft am Umfang der Tropfenverjüngung betragsmäßig erreicht. Weiterer Flüssigkeitszufluss führt dann zum Atropfen. Beim Abtropfen des gesamten Volumens vergrößert sich i.d.R. die freie Oberfläche gegenüber der freien Oberfläche im Reservoir. Die Oberfläche des Reservoirs kann deshalb gegenüber der Oberfläche der erzeugten Tropfen vernachlässigt werden. Um die wirksame Oberflächenspannung der Flüssigkeit zu überwinden, muss eine gewisse Arbeit geleistet werden. Die Energie hierzu kommt aus den Fluidströmungen bzw. der Wirkung des Erdschwerefeldes. Bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten bildet sich i.d.R. zunächst ein Strahl aus und die Tropfenbildung setzt sekundär ein.

Der Hauptprozess des Rayleigh Regimes (mit niedrig viskosen newtonschen Flüssigkeiten) wird durch Störungen auf der Strahloberfläche mit Amplituden verursacht, deren Wellenlängen ungefähr dem 1.44-fachen Betrag (143.7 %) des Strahlumfanges entsprechen. Dieser Vorgang wird auch als aerodynamisches Zerwellen bezeichnet. Berechnungen konnten zeigen, daß eine höhere Viskosität der Flüssigkeit als Tendenz zu einer Verminderung der Strahlaufbruchrate an der Phasengrenze führt und damit letztlich die durchschnittliche Tropfengröße steigert [104]. Bei einem höheren Volumenstrom setzt die erste windinduzierte Charakteristik ein. Ab hier gewinnt zunehmend auch die Dichte der Gasatmosphäre an Bedeutung. Mit Einsetzen der ersten windinduzierten Charakteristik kann eine deutliche Schrumpfung des zusammenhängenden Strahlkerns festgestellt werden, die laminare Strömung wird zunehmend instabil und die Strahllänge nimmt ab. Im Rahmen der zweiten windinduzierten Charakteristik setzt eine turbulente Strömung ein, die Tropfen auch seitlich vom Strahlkern absichert. Die erzeugten Tropfen besitzen dabei

---

<sup>18</sup>  $\frac{\bar{u}_1^2}{2} + \frac{p_1}{\rho} + g h_1 = \frac{\bar{u}_2^2}{2} + \frac{p_2}{\rho} + g h_2.$

Durchmesser, die deutlich kleiner als die Düsenöffnung sind. Wird der Volumenstrom der Flüssigkeit weiter gesteigert, kommt es schliesslich zu einer drastischen Verkürzung der Strahllänge. Der Strahlkern endet in der Nähe des Kapillarendes und die Tropfendurchmesser werden sehr viel kleiner, als der verbleibende Strahldurchmesser. Diese Charakteristik wird als Atomization Regime bezeichnet. Eine detaillierte Diskussion der einzelnen Prozesse findet man z.B. im Übersichtsartikel [104].

Eine mögliche Art der Beschreibung eines Zweikomponentensystems besteht in der Darstellung als Ohnesorge-Diagramm. Hierbei wird die Ohnesorgezahl als Funktion der Reynoldszahl aufgetragen (Abb. 2.13 b). Die Ohnesorgezahl  $Oh$  bildet das Verhältnis aus der dynamischen Viskosität und den Oberflächenkräften [105]:

$$Oh = \frac{\mu_F}{\sqrt{\rho_F d_d \sigma_O}} \quad (2.2)$$

Die Reynoldszahl stellt den Einfluss der auftretenden Turbulenzen dar:

$$Re = \frac{\rho_F d_d u}{\mu_F} \quad (2.3)$$

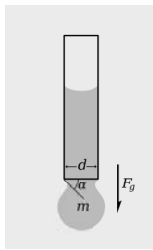
mit dem Düsendurchmesser  $d_d$ , der relativen Strömungsgeschwindigkeit  $u$ ,  $\mu_F$  der dynamischen Viskosität,  $\rho_F$  der Flüssigkeitsdichte und  $\sigma_O$  der Oberflächenspannung. Für newtonsche Flüssigkeiten kann die Länge des zusammenhängenden Flüssigkeitskerns zur Unterscheidung der einzelnen Charakteristiken durch die Beziehung:

$$L = K_c d_d We^{0.32} \quad (2.4)$$

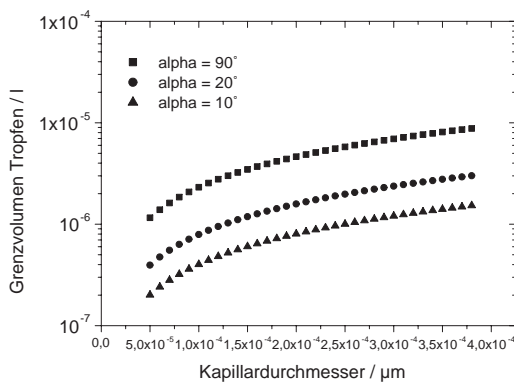
bestimmt werden [105]. Hierbei entspricht  $K_c$  einer Konstante die Werte zwischen 4 und 16 einnimmt und  $We$  der Weber-Zahl mit  $We = \frac{\rho u^2 r}{\sigma}$  (Strahlradius =  $r$ ) [104]. Die Weberzahl bildet das Verhältnis aus dynamischem und statischen Druck. Ab einer kritischen Weberzahl von  $We = 8$  geht das einfache Abtropfen in eine Strahlbildung über [106].

### 2.3.6 Fazit

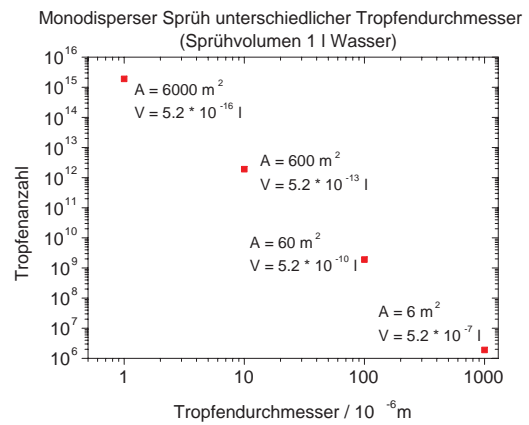
Die qualitative Leistungsfähigkeit der Analysemethode MALDI ist besonders im Zusammenhang mit der bildgebenden Darstellung der Messergebnisse, stark abhängig von der Charakteristik des verwendeten Analysatortyps, dem Detektionsprinzip und der Art der Matrixpräparation. Die Präparationstechniken zur flächendeckenden Beschichtung biologischer Proben mittels Druck- und Sprüheinrichtungen erlangen hierbei eine immer größere Bedeutung. Die physikalischen Bedingungen während solcher Präparationen unterscheiden sich i.d.R. von denen typischer Präparationstechniken, die sich überwiegend ausreichend mit dem Ablegen vorgemischter Analyt-/Matrixlösungen in definiertem Volumen auf Targetoberflächen beschreiben lassen (z.B. Dried droplet, Layer-Techniken). Die veränderten physikalischen Bedingungen bringen zusätzliche Parameter in den Präparationsprozess ein, die berücksichtigt werden müssen. Hierzu zählen u.a. die Größe und/oder die Verteilung der erzeugten Tropfen.



Schema der Tropfenbildung in statischer Gasatmosphäre

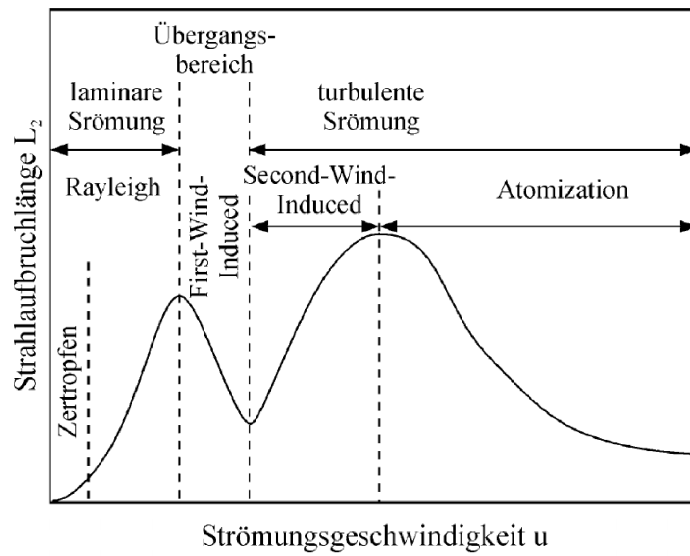


(a)

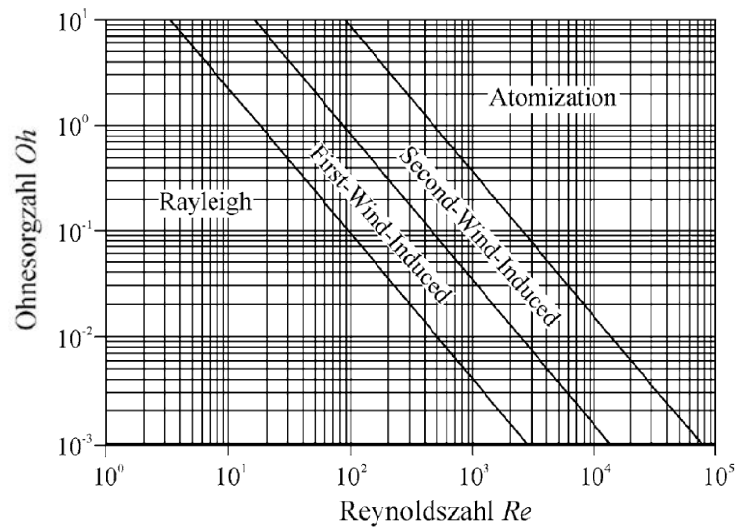


(b)

Abbildung 2.12: (a) Tropfen­volumen in Abhängigkeit des Kapillardurchmessers und des Schnürungswinkels  $\alpha$  am offenen Kapillarende. Winkel von  $\alpha = 90^\circ$  kommen real nicht vor. Abtropfung einer newtonschen Flüssigkeit am Kapillarausgang in eine statische Gasatmosphäre (Benetzbarkeit des Kapillarmaterials und Oberflächen­spannung der Flüssigkeit). Abbildung der Tropfenbildung aus Wikipedia entnommen. (b) Theoretische Tropfenanzahl bei der Erzeugung einer einheitlichen Tropfen­größe in einem Sprüh (*monodisperser Sprüh*), nach [106]. Die freie Oberfläche der insgesamt erzeugten Tropfen vergrößert sich gegenüber der freien Oberfläche des Reservoirs. Die Arbeit die zur Tropfenbildung erbracht werden muss entspricht näherungsweise  $W \approx \sigma A_T$ . Gesamtoberfläche aller erzeugten Tropfen =  $A_T$ .



(a)



(b)

Abbildung 2.13: (a) Darstellung der Strahlzerfallslänge in Abhängigkeit der Strömungsgeschwindigkeit, nach Leroux S. et al.: *The stability curve of Newtonian liquid jets. Atomization and Sprays*, Vol. 6, 1996. (b) Die Strahlzerfallsbereiche im Ohnesorgediagramm nach, Ohnesorge VW: *Die Bildung von Tropfen und die Auflösung flüssiger Strahlen*, ZAMM, 16, 6, 355 - 358, 1936.

## Sprühregimedarstellung

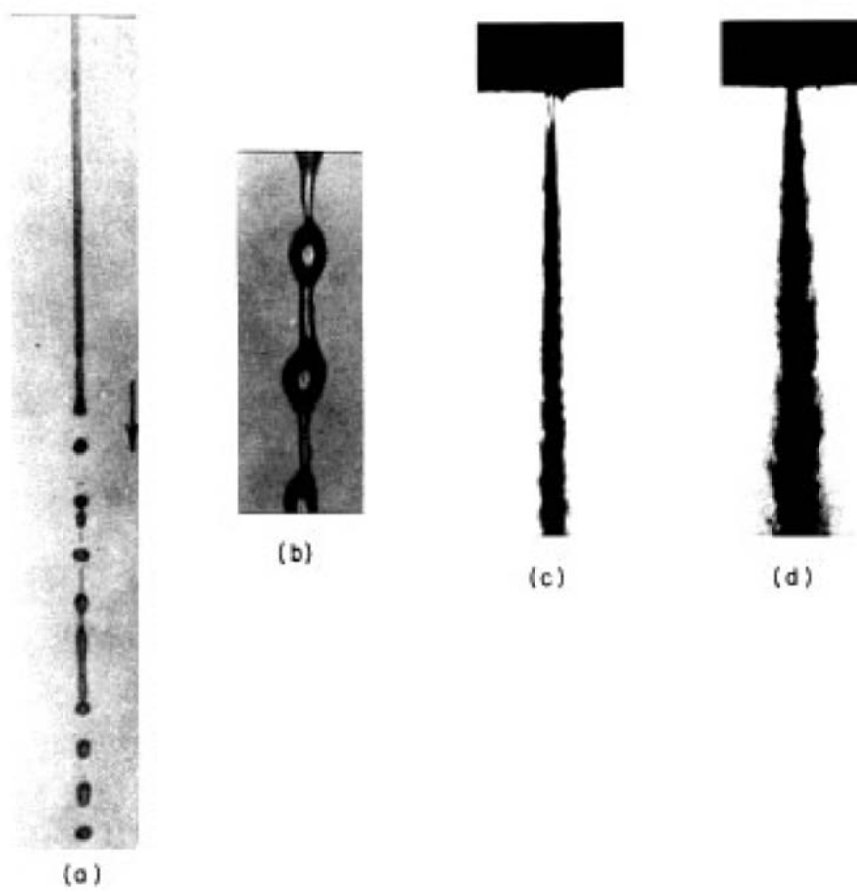


Abbildung 2.14: Photographische Dokumentation der Strahlzerfälle mit wechselnden Hauptkomponenten. (a) Rayleigh Regime. (b) First-wind-induced Regime. (c) Second-wind-induced Regime. (d) Atomization Regime. Abbildung entnommen aus [104].

# Kapitel 3

## Grundlagen

### 3.1 Probenpräparation und Ionenextraktion

Eine Entwicklung spezieller Probenpräparationstechniken sowie die Anwendung bestimmter Messmethodiken, d.h. die Planung des gezielten Ablaufes einer Messung und die Wahl apparativer Parameter, können die Anwendungsbereiche der MALDI-MS an *nativen* biologischen Proben mit Flugzeitspektrometern deutlich erweitern. Präparationsprotokolle und Meßmethodiken sind aber nur systematisch zu verbessern, wenn bekannt ist, welche Parameter in direktem Zusammenhang mit den hauptverantwortlichen physikalischen Prozessen stehen. Bei der Betrachtung aller bis heute über den Vorgang der Desorption/Ionisierung bei MALDI und angrenzender Laserverfahren erlangten Erkenntnisse, wird allerdings schnell deutlich, daß es sich sehr wahrscheinlich hierbei eher um den kombinierten Ablauf mehrerer physikalischer Prozesse handelt, als um einen einzelnen einheitlichen Vorgang, auf den hin eine Optimierung stattfinden könnte [1] [71] [107] [108] [109] [110] [111] [112] [113] [114]. Es ist somit eher anzunehmen, daß sich je nach Lage der Ausgangsbedingungen, d.h. der physikalischen und chemischen Beschaffenheit einer Probe und der in Kombination mit einer bestimmten Präparationstechnik und Messmethodik verwendeten Matrix, im wesentlichen der relative Anteil einzelner Prozesse (ver)ändert. Diese Interpretation liefert damit mehrere Ansatzpunkte für eine Optimierung mit einer Matrix, zum einen über die Präparationstechniken und Präparationsprotokolle und zum anderen über die apparativen Parameter.

#### 3.1.1 MALDI-Matrix und Matrixsysteme

Vor der Probenpräparation steht zunächst bei der konventionellen, wie bei der orts aufgelösten Messung, eine Entscheidung über die einzusetzende Matrix an. Neben entsprechenden kristallinen Aromaten [115] [116] [117] [118] [119] [120] sind bei Raumtemperatur auch flüssige ionische Matrizes (ILM, *ionic liquid matrix*) bekannt. Die Matrizes eignen sich dabei zur Darstellung von Analyten aus unterschiedlichen Substanzklassen<sup>1</sup> [121] [122] [123] [124]. Glycerol ist neben Bernsteinsäure (Succinic acid) eine häufig verwendete Matrix für IR-MALDI-Anwendungen mit Nukleinsäuren und Proteinen [1]. Bei den flüssigen ionischen Matrizes handelt es sich überwiegend um bekannte saure aromatische MALDI-Matrizes wie 2,5-DHB, CHCA ( $C_{10}H_7NO_3$ ,  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxycimtsäure) und SA (Sinapinsäure,  $C_{11}H_{12}O_5$ , trans-3,5-Dimethoxy-4-hydroxycimtsäure), die in Kombination mit organischen Basen wie z.B. Pyridin oder 1-Methylimidazol verwendet werden. In der Literatur ist auch der Einsatz von Titandioxid als Zusatz zur UV-Matrix zu finden.

Neben der Wahl der Matrix wird auch ein direkter Einfluss der Targetmaterialien<sup>2</sup> auf die Desorption

---

<sup>1</sup>Peptide/Proteine, Phospholipide, Oligonucleotide und neutrale Oligosaccharide

<sup>2</sup>Entsprechende Methoden ohne Matrix wie z.B. DIOS (Desorption ionization on porous silizium) sind mit kleineren Biomolekülen  $M_r \approx 1$  kDa anwendbar.

und die Effizienz der primären Matrixionisierung diskutiert sowie ein indirekter Einfluss auf die Matrixkristallisation [125] [126]. Bei der Planung eines Experimentes kann die Auswahl einer Matrix nur sehr eingeschränkt nach systematischen Überlegungen erfolgen. Abgesehen von einer vergleichbar guten Löslichkeit, muss die Matrix eine spektrale Absorption im Wellenlängenbereich der verwendeten Laserstrahlung aufweisen. Darüberhinausgehende Feststellungen basieren oft auf Erfahrungswerten, die nicht direkt aus den physikalisch-chemischen Daten einer Matrix hergeleitet werden können. Aufschlussreich in dieser Hinsicht sind u.a. physikalische Betrachtungen an Strukturisomeren einzelner Matrices.

### Dihydroxybenzoesäure (DHB)

Ein gutes Beispiel einer UV-MALDI-Matrix ist die sehr häufig verwendete und deshalb relativ gut untersuchte Dihydroxybenzoesäure (*gentisic acid*,  $C_7H_6O_4$ ) [116]. Ihre sechs Strukturisomere (2,3-; 2,4-; 2,5-; 2,6-; 3,4-; 3,5-) zeigen qualitativ, teilweise, starke Unterschiede im Hinblick auf ihre Eignung als UV-MALDI-Matrix. Die ursächlichen physikochemischen Zusammenhänge sind dabei nicht immer eindeutig zu benennen [127]. Mit Lösungsmittelpräparationen ist es z.B. einigen Autoren möglich mit den Isomeren 2,6- und 2,5-DHB ( $pK_{a_1} \approx 3.0$ ) annähernd vergleichbare Ergebnisse mit Peptidanalyten zu erzielen, wobei 2,5-DHB von der Mehrzahl der Anwender in MALDI-Experimenten klar bevorzugt wird. Mit Phospholipiden nimmt die Eignung bei Messungen im positiven Ionenmodus in der Reihenfolge 2,5-, 2,6-, 2,3-, 2,4-DHB ab. Die Isomere 3,4- und 3,5-DHB ergeben vor allem mit sauren Phospholipiden niedrige Signalintensitäten im positiven Ionenmodus. Im negativen Ionenmodus sind die geeignetsten Isomere 2,5-, 2,4-, 3,5-DHB, in abnehmender Reihenfolge. Das Isomer 2,6-DHB eignet sich, sehr wahrscheinlich aufgrund seiner relativ hohen Acidität ( $pK_{a_1} \approx 1.3$ ), überhaupt nicht für Messungen von Phospholipiden im negativen Ionenmodus [128]. Eine naheliegende Schlussfolgerung ist, daß eine relativ hohe Acidität der Matrix einer Analytprotonierung im positiven Ionenmodus förderlich ist. Aus röntgenkristallographischen Untersuchungen sind bisher zwei unterscheidbare Kristallstrukturen des 2,5-DHB-Isomers bekannt<sup>3</sup> (*Polymorphism in crystal structure*) [129]. Einige weitere Arbeiten stellen eine Reihe von Untersuchungen an Kokristallisationen (*syncrystallization*) von DHB-Strukturisomeren mit unterschiedlichen Analyten vor. Darunter sind Untersuchungen nach einer Kokristallisation von Matrix mit Peptiden/Proteinen aus definierter Umgebung [116] [127] [130] oder die Kokristallisation mit pH-Indikatoren wie z.B. Methylrot (*dye, methyl red*) [131]. Die Experimente in [131] beziehen dabei die unterschiedlichen polymorphen Kristallstrukturen (Form I, II) von 2,5-DHB sowie die explizit während der Laserexposition bestrahlten Kristallflächen ([100], [010], [001]) in ihre Betrachtungen mit ein. Interessant sind dabei auch Untersuchungen zum Kristallisationsverhalten derselben Arbeitsgruppe mit 2,5-, 2,6-, 2,6-DHB  $\cdot H_2O^4$ , Phthalsäure ( $pK_{a_1} \approx 2.95$ ) und Indikatorfarbstoff [132]. Einige Phthalsäurederivate zählen zu den weltweit am häufigsten verwendeten Weichmachern in der Kunststoffverarbeitung und sind als Verunreinigung in Oberflächenwasser weitverbreitet. In Abwässern sind die häufigsten Derivate nahezu immer nachweisbar [133]. Die in den Arbeiten untersuchten Phthalsäure/Farbstoff Kokristalle enthalten neutrales Methylrot. Die 2,5-DHB/Farbstoff-Kokristalle enthalten die zwitterionische Form des Methylrot und die 2,6-DHB Kokristalle die protonierte Form sowie möglicherweise die 2,6-DHB  $\cdot H_2O$  Kokristalle auch die neutrale Form des Farbstoffs. 2,6-DHB  $\cdot H_2O$  zeigt bei den Kokristallisationsversuchen vergleichbare Ergebnisse zur Kristallstruktur der Form II des 2,5-DHB-Isomers. Als Fazit können aus den Untersuchungen über die Kristallstruktur und den physikalischen Eigenschaften der Kokristalle aber (bislang) keine Aussagen getroffen werden, die etwa ein eindeutiges Urteil über die Eignung einer

<sup>3</sup>Monoklines Gittersystem, Form I:  $P2_1/c$ ,  $a = 4.9110(3)\text{Å}$ ,  $b = 11.8280(7)\text{Å}$ ,  $c = 11.0580(6)\text{Å}$ ,  $\beta = 91.059(3)^\circ$ ,  $V = 642.22\text{Å}^3$  und Form II:  $P2_1/c$ ,  $a = 5.5610(2)\text{Å}$ ,  $b = 4.8690(1)\text{Å}$ ,  $c = 23.6880(8)\text{Å}$ ,  $\beta = 100.191(1)^\circ$ ,  $V = 631.27\text{Å}^3$ , die Notation entspricht der aus [131] und berücksichtigt die statistisch häufigste Konformation.

<sup>4</sup> $Pnma$ ,  $a=6.778(1)\text{Å}$ ,  $b=9.411(1)\text{Å}$ ,  $c=11.890(2)\text{Å}$  [?].

Substanz, als UV-MALDI-Matrix erlauben würden [1] [131].

In [131] wird angemerkt, daß bei der Kokristallisation in den Experimenten der DHB-Isomere (2,5-, 2,6-) und Methylrot, stark unterschiedliche photophysikalische Eigenschaften des Farbstoffs in einem erhaltenen Kokristall festzustellen sind, je nachdem welche Wachstumsbereiche in ein und demselben Matrixkristall gerade betrachtet bzw. laserexponiert werden. Durch CLSM-Untersuchungen konnte an 2,5-DHB-Präparationen der Einbau fluoreszenzmarkierter Peptide/Proteine in einzelne Matrixkristalle nachgewiesen werden, wohingegen an 2,6-DHB dieser Einbau unterbleibt [134]. Es ist bekannt, daß der Kristallwasseranteil in reinen Proteinkristallen zwischen ca. 30% und 70% betragen kann. Durchschnittswerte des absoluten Wassergehaltes für ein globuläres Protein betragen ca. 0.35 g Wasser pro 1 g Protein [135] [136]. In [137] wird an einzelnen Kokristallen von Sinapinsäure mit Peptid/Proteinanalyten eine von der Kristallfläche und der Lasereinstrahlungsrichtung unabhängige Signalintensitätsabnahme bei wiederholten Messungen an einer identischen Probenstelle mit Bestrahlungen nahe der Schwellbestrahlung beschrieben. Dieses Verhalten lässt sich nach nur wenigen Laserschüssen mit hohen Bestrahlungen auf die identische Probenstelle erneut reproduzieren und wird von den Autoren als *Hysteresis-Effekt* bezeichnet. Mit der in der Proteinanalytik ebenso verbreiteten Matrix CHCA werden erst ab dem dritten oder vierten Laserimpuls überhaupt Analytsignale in den Massenspektren nachweisbar. Beide Effekte sind an 2,5-DHB-Kristallen bislang mit keiner Präparationstechnik beschrieben worden. Die genannten Effekte mit den Matrices CHCA und SA scheinen in direktem Zusammenhang mit dem Kristallisationsverhalten der jeweiligen Matrix und/oder der Messmethodik zu stehen.

### Korrelation einiger Matrixeigenschaften mit physikalischen Parametern

Insgesamt besteht die größte positive Korrelation zwischen dem Absorptionskoeffizienten ( $\alpha$ ) einer kristallinen aromatischen Matrixsubstanz und der angewandten Laserwellenlänge. Die Absorptionskoeffizienten der häufigsten Matrices im (nahen) UV-Bereich liegen zwischen  $\alpha \approx 5 \cdot 10^4$  und  $\alpha \approx 5 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}$  (2,5-DHB bei  $\lambda = 337$ ,  $\alpha \approx 7.95 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1}$ ). Der Kehrwert des Absorptionskoeffizienten ( $\delta$ ) wird als die Eindringtiefe des Laserlichtes bei (überwiegender) Absorption der Strahlung angesehen [8]. Der molare dekadische Extinktionskoeffizient ( $\varepsilon$ ) der meisten MALDI-Matrices erreicht bei den eingesetzten Wellenlängen (im nahen UV) Werte um  $\varepsilon = 5 \cdot 10^3$  bis  $\varepsilon = 5 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [138]. Die Absorptionsspektren der Matrixfeststoffe sind im Vergleich zu den Messungen in Lösung, zu längeren Wellenlängen verschoben (*bathochromic shift*) und die Peaks sind verbreitert [127]. Einige Autoren geben weiterhin eine Übereinstimmung zwischen der Säurestärke einer Matrix und der Signalintensität protonierter Analyte in den Massenspektren an. Vermutet werden können diesbezüglich u.a. sekundäre Reaktionen der Analytmoleküle mit protonierten Matrixmolekülen in der Gasphase, z.B. durch Protonen-Transfer Reaktionen [139]. Die Gasphasenbasizität (GB) von nicht angeregten 2,5-DHB Molekülen beträgt ca. 822 kJ/mol und liegt meist unter den GB von Peptidanalyten. Die Protonenaffinität (PA) des 2,5-DHB-Radikalkations beträgt ca. 854 kJ/mol, während die PA von untersuchten Peptiden meist deutlich größer als 900 kJ/mol sind [139] [140]. Eine direkte Ionisierung von neutralen Matrixmolekülen oder Analyten in der Gasphase, etwa durch nichtangeregte oder angeregte neutrale Matrixmoleküle, wird von den meisten Autoren dagegen ausgeschlossen. Die zusätzliche Verwendung von organischen Säuren (typischerweise: Trifluoressigsäure, TFA,  $\text{pK}_a = 0.23$  oder Ameisensäure, FA,  $\text{pK}_a = 3.77$ ) in Konzentrationen um 0.1% ist in der biochemischen MS-Analytik mit Peptiden sehr häufig in der Literatur zu finden. Ebenso wird manchmal der Zusatz von potenziell *chaotropen* Reagenzien, in allerdings geringen Konzentrationen, wie z.B. SDS (Natriumdodecylsulfat) oder Harnstoff in der Präparationslösung beschrieben. Besonders, wenn es sich bei den Analyten um Peptide aus enzymatischen Verdauproben handelt, ist diese Vorgehenswei-



se effektiv und eine Vermutung über den zugrundeliegenden Mechanismus, liegt in der Beeinflussung der enzymatischen Spaltungseffizienz. Die Wirkung steht also nicht im direkten Zusammenhang mit dem „MALDI-Prozess“. Nicht selten ist auch der Zusatz weiterer aromatischer Verbindungen zur Matrixlösung zu finden, so z.B. die unter der Bezeichnung „Super-DHB“ geführte Mischung (sDHB, 2,5-DHB plus 5 % bis 10 % 2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure) oder die Kombination von zwei MALDI-Matrizes mit größeren Unterschieden in den Absorptionsmaxima [141].

### Alternativen zu organischen Matrizes

Weiterhin eignen sich unter bestimmten Bedingungen auch metallische Nanopartikel<sup>5</sup> (z.B. UFMP in Glycerol, *ultra fine metal powder*,  $d \approx 10^1 \text{ nm}$  bis  $10^2 \text{ nm}$ ) zur Anwendung im Rahmen der Bioanalytik [9]. Sie sind z.B. zusammen mit Glycerol als UV-Matrix einsetzbar. Die Nanopartikel absorbieren die Laserstrahlung teilweise. Außerdem verteilen Sie die eingestrahlte Energie durch Streuung im Präparat. Es ist anzunehmen, daß neben einem schnellen und lokal begrenzten Temperaturanstieg, aufgrund der Absorption einiger Nanopartikel, die von den Streuwellen ausgehende Energie auch zur resonanten Einkopplung in aromatische Reste von Aminosäuren zur Verfügung steht [9]. Diese ist dann nicht mehr so intensiv, das hierüber mehrheitlich intramolekulare Bindungen in Analytmolekülen gebrochen werden. Die Dissipation wird aufgrund des Glycerols zwischen den Nanopartikeln, nicht durch die guten Wärmeleitungseigenschaften des Metalls bestimmt, sondern sehr wahrscheinlich durch diejenigen des umgebenden Mediums. Insgesamt haben sich bislang diese Materialien im Vergleich zu den organischen Matrizes, gemessen an den publizierten Arbeiten, nicht durchsetzen können. Ein neuer Trend in diesem Bereich geht zu eindimensional nanostrukturierten Materialien.

### 3.1.2 Desorption, Ablation und Ionisierung

Bei der Beschreibung der physikalischen Vorgänge, die dem „MALDI-Prozess“ zugrundeliegen, wird in der Regel eine getrennte Betrachtung der einerseits einsetzenden Desorption/Ablation sowie andererseits der Ionisierung vorgenommen. Es ist dennoch eher davon auszugehen, daß beides (zumindest) teilweise parallel abläuft und deshalb mechanistisch nur schwer zu trennen ist. Der Begriff der Desorption ist von der Methode der Felddesorption<sup>6</sup> (echte Felddesorption) übernommen. Diese leitet eine direkte Extraktion von Ionen unpolarer Verbindungen aus dem festen Aggregatzustand in starken inhomogenen elektrostatischen Feldern an der Oberfläche von aktivierten Wolframdrähten ein [142]. Im Zusammenhang mit MALDI wird dieser Begriff aber nicht nur im Sinne einer Vakuumsublimation weniger neutraler Matrixmoleküle und der Desorption einzelner Ionen verwendet. Diese Ereignisse bleiben quantitativ i.d.R. unterhalb der Nachweisgrenze (Bestrahlung < „Schwellbestrahlung“) der eingesetzten MALDI-TOF Spektrometer, für die entsprechende Substanz. Der Begriff Desorption ist in diesem Sinne eher im Zusammenhang mit dem Prozess einer „Clusterablation“ (Bestrahlung  $\geq$  Schwellbestrahlung) zu verstehen. Die in Experimenten ermittelte Sublimationstemperatur des 2,5-DHB-Isomers liegt bei Normalbedingungen nach [143] bei ca.  $T_{sub} = 443 \text{ K}$  bzw. die Sublimationsenthalpie bei ca.  $-\Delta H_{sub} = 109 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Einige Autoren teilen die MALDI-Matrizes in Anlehnung an ihre Sublimationstemperatur auf, im Sinne von „heißen“ bzw. „kalten“ Matrizes. Die Reihenfolge steht dabei aber im Widerspruch zu anderen Untersuchungen (siehe S.71). Heiße Matrizes (harte) rufen bei Analyten häufiger Fragmentierungen hervor als kalte (weiche) Matrizes [144]. Zum Vergleich, die Sublimationstemperatur von SA beträgt ca.  $T_{sub} = 426 \text{ K}$  und die von CHCA ca.  $T_{sub} = 455 \text{ K}$  [145]. Die Clusterablation erzeugt letztlich effektiv zusammen mit den folgenden

<sup>5</sup>Nobelpreis für Chemie 2002 u.a. zu einem viertel vergeben an K. Tanaka (MALDI) und J.B. Fenn (ESI).

<sup>6</sup>Die organische Analytsubstanz wird dazu auf aktivierten dünnen Wolframdrähten (bei Temperaturen von ca.  $1200^\circ\text{C}$  mit Benzonnitrid,  $d \approx 10\mu\text{m}$ ) aufgebracht. Durch Stromfluss werden die Drähte erhitzt. Ab einer bestimmten Temperatur setzt die Desorption von Analytionen im inhomogenen elektrostatischen Feld ( $U \approx \frac{10^7 \text{ V}}{\text{cm}}$ ) ein.

sekundären Reaktionen in der Gasphase Ionenströme, die in Einzelspektren über der Rauschschwelle liegen [139].

### Energy-Pooling

Ein als sehr wahrscheinlich angesehener Mechanismus, der zur Erklärung der primären Matrixionisierung geeignet ist, wird mit dem Begriff *Energy Pooling* bezeichnet. Es handelt sich hierbei um einen nichtlinearen photochemisch induzierten Prozess (*Singlet-Singlet annihilation*) [146]. Bereits vor der Diskussion im Zusammenhang mit MALDI ist im Rahmen von Untersuchungen an Biomolekülen mittels Laserdesorption ein solcher Prozess vermutet worden [147]. Entstehende Exzitonen, die als Wellen beschreibbar sind, können an diskreten Gitterplätzen im Molekülkristall interferieren. Man geht davon aus, daß einzelne Moleküle auf diesem Wege angeregte elektronische Energiezustände ( $S_n$ ) erreichen können, die der doppelten Photonenenergie der absorbierten Laserstrahlung entsprechen. Die Werte bleiben dennoch i.d.R. unterhalb des ersten Ionisierungspotentials einer typischen MALDI-Matrix. Im Einzelnen können unmittelbar benachbarte und angeregte Moleküle ( $S_1$ -Zustand), ihre aus der resonanten Einkopplung in das delokalisierte  $\pi$ -Elektronensystem erhaltene Energie sammeln, wobei ein Molekül dabei in den elektronischen Grundzustand ( $S_0$ ) zurückfällt, während das andere Molekül weiter angeregt wird ( $S_n$ ). Von da an sind prinzipiell zwei alternative Wege in der Diskussion, die beide zu einer primären Ionisierung der Matrixmoleküle zu Radikalkationen ( $ma^{\bullet+}$ ) führen können. Zum einen besteht die Möglichkeit einer *direkten* Ionisierung des angeregten Moleküls im  $S_n$ -Zustand, aufgrund eines erniedrigten Ionisierungspotentials im Kristallverband [146]. Es könnte aber ebenso ein erneutes Poolen zwischen einem benachbarten angeregten Molekül im elektronischen Zustand  $S_1$  und einem bereits im  $S_n$ -Zustand befindlichen Molekül stattfinden. Hierbei fällt dann das  $S_1$ -Molekül in den Grundzustand zurück, während das  $S_n$ -Molekül ionisiert wird. Die dabei anfallende Überschussenergie könnte in Wärme umgewandelt oder als Fluoreszenz emittiert werden [148]. Für ein Energy pooling sprechen vor allem Fluoreszenzuntersuchungen (LIF, *Laser induced fluorescence*) an 2,5-DHB Präparaten (Feststoff und Lösung). Diese zeigen einen nichtlinearen, abfallenden Verlauf der Fluoreszenzintensität (*quenching*) bei steigender Laserfluenz. Als dessen Ursache wird das Energy-Pooling vermutet. Der absolute Verlauf des Fluoreszenzabfalls in den Experimenten ist dabei von der Präparation und dem Aggregatzustand bzw. der Temperatur der Matrix abhängig (LIF,  $\lambda=355$  nm, Nd:YAG frequenzverdreifacht). Die Photonenenergie<sup>7</sup> der jeweiligen UV-Wellenlänge -  $\lambda=337$  nm (ca. 3.7 eV),  $\lambda=349$  nm (ca. 3.6 eV),  $\lambda=355$  nm (ca. 3.5 eV) - ist zu gering, um eine direkte Photoionisierung der Matrix 2,5-DHB ( $IP \approx 8.05$  eV, gemessen<sup>8</sup> nach [149]) herbeizuführen. Die in den Anregungsvolumina erreichten Photonendichten (Flux, in Abhängigkeit der Lasereindringtiefe<sup>9</sup>), ergeben zusammen mit der Dichte der kristallinen Matrix ( $\rho \approx 1$  g/cm<sup>3</sup>) und der notwendigen zeitlichen Kopplung der Ereignisse dann eine Situation, die eine direkte resonante Zweiphotonenionisation sehr unwahrscheinlich macht. Es wird deshalb angenommen, daß der photochemisch induzierte Prozess des Energy pooling (Exziton Pooling), entweder im Zusammenhang mit einem verminderten Ionisierungspotential der Matrix im Kristallverband ( $IP \leq 7.82$  eV), oder über einen Zweischrittprozess, im Wesentlichen für die primäre Ionisierung der Matrixmoleküle verantwortlich ist [139]. Bei entsprechenden Berechnungsmodellen sind die Annahmen über die Lebenszeiten<sup>10</sup> bzw. die Gleichgewichtskonstanten der angeregten Zustände im Pooling-Prozess, neben den Absorptionskoeffizienten der einzelnen Anregungszustände ( $\sigma_{01} = S_0 \rightarrow S_1$ ,  $\sigma_{1n} = S_1 \rightarrow S_n$ ) und der stimulierten Emission ( $\sigma_{10} = S_0 \leftarrow S_1$ ) bzw. der Zerfallsrate der angeregten Moleküle ( $S_1 \leftarrow S_n$ ), sensible Parameter der Simulationsrechnung(en).

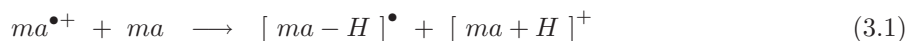
<sup>7</sup>  $E_{Photon} = \frac{h \cdot c}{\lambda} \approx 1.239841939 \text{ eV} \mu\text{m}/\lambda$ ; 1 eV  $\approx$  96.14 kJ; 4.18 J  $\approx$  1 cal.

<sup>8</sup> Ermittlung aus DHB-Molekularstrahlexperimenten.

<sup>9</sup> Mit Wellenlängen im nahen UV werden Eindringtiefen  $\delta \leq 200$  nm vermutet, an 2,5-DHB ca. 110 nm.

<sup>10</sup>  $S_1$  Lebenszeiten gängiger UV-Matrizes liegen zwischen 1/10 ns und 10ns.

Der primären Matrixionisierung im Energy-Pooling Prozess, die sowohl für das Modell der *Lucky-Survivor*-Ionisierung der Analytmoleküle, als auch für die primäre Gasphasenionisierung der Analyte herangezogen werden kann (für erstere ist sie allerdings nicht zwingend erforderlich), folgt die primäre Protonierung der Matrix ( $ma$ ), entsprechend:



Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von DHB-Kristallen (2,5-, 2,6-Isomere) ist bekannt, daß sich in größeren Matrixkristallen Hohlräume ( $cavities \leq 2 \mu m$ ) ausbilden können. In diese Hohlräume ist eine Einlagerung von Lösungsmittel und Analyten während des Kristallwachstums denkbar. An 2,5-DHB-Präparationen konnten einige Autoren mit CLSM-Messungen eine Analyteinlagerung im Matrixkristall belegen, die dagegen bei dem 2,6-DHB-Isomer nicht festgestellt werden konnte. Analytische Messungen des Wassergehaltes in 2,5-DHB Kristallen ergaben Werte von ca. 4.3 mol-%  $H_2O$  [150].

Es muss mittlerweile weiterhin angenommen werden, daß eine echte Kokristallisation von Matrix und Analyt, sehr wahrscheinlich nicht für Analyte aus allen Substanzklassen eine unabdingbare Voraussetzung zum Einleiten eines „MALDI-Prozesses“ ist. Dies legen Präparationen mit veränderten Kristallisationsbedingungen bzw. vollständig lösungsmittelfreie Präparationen, d.h. Präparationen ohne erfolgtes Kristallwachstum in der Gegenwart von Analytmolekülen nahe (Fast evaporation) [3] (*Solvent free preparation*) [151]. Bei Peptiden kann eine Korrelation der Nachweisgrenze mit dem Einbau in Matrixkristallen angenommen werden. Vieles spricht dafür, daß eine Physisorption oder Chemisorption von Analytmolekülen, zumindest aus bestimmten Substanzklassen, an einzelne Matrixmoleküle bzw. Kristallflächen für eine MS-Darstellung bereits ausreichend sein kann. Ob diese dabei während der Präparation oder erst im Verlauf der Einwirkung des Laserimpulses stattfindet, ist dagegen unklar.

In [152] wird eine quantitativ absteigende Reihenfolge, der bei unterschiedlichen Präparationen erforderlichen Schwellbestrahlungen aufgestellt, die zu einer vergleichbaren Signaldetektion von Peptiden über einem entsprechenden Signal-zu-Rausch-Verhältnis an einem Spektrometer erforderlich ist:

„Perfekter Kristall“ > „Intakter Kristall mit Defektflächen“ > „Pulverisierter Kristall“.

Der pulverisierte Kristall zeigt dabei eine statistische Verteilung aller Raumstrukturfragmente. Die Schlussfolgerung folgt der Annahme, daß ein Aufbrechen unregelmäßiger Strukturanordnungen sowie ein kleineres Oberfläche-zu-Volumenverhältnis die benötigte Prozessenergie derart beeinflusst. Die Autoren

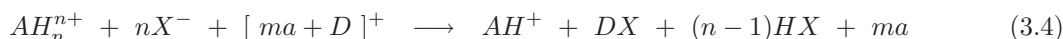
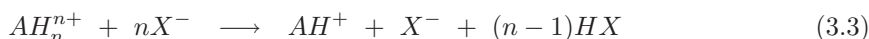
Tabelle 3.1: Dissoziationsenergien ausgewählter Bindungen.

Bindung	Dissoziationsenergie [eV]	Bindung	Dissoziationsenergie [eV]
$C = O$	7.3	$C - O$	3.6
$C = C$	6.4	$C - C$	3.6
$O - H$	4.8	$S - H$	3.5
$C - H$	4.3	$C - N$	3.0
$N - H$	4.1		

Quelle: Vogel A., Venugopalan, V.: *Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues*, Chem. Rev. 103, 577-644, 2003.

geben an, daß mit den pulverisierten Isomeren 2,4-, 2,5- und 2,6-DHB und ebenfalls pulverisierten Analyten (Cytochrom C) ohne Lösungsmittelsatz qualitativ vergleichbare Massenspektren zu Lösungsmittelpräparationen erhalten werden können. Sie folgern daraus, zusammen mit Ergebnissen aus weiteren Messungen, das je kleiner die eingesetzten Matrixkristalle sind, umso „milder“ der dann ablaufende MALDI-Prozess sein müsse. Es kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, daß einige Analyte, wie z.B. Peptide, bereits in der kristallinen Präparation als mehrfachgeladene Ionen vorliegen (*performed ions*). Eine Verringerung der Ladungen in desorbierten Clustern, die aus überwiegend neutralen Matrixmolekülen, mehrfachgeladenen Analyten und entsprechenden Gegenionen bestehen, auf hauptsächlich einfach geladene Ionen, erfolgt dann in der Gasphase in einem oder mehreren Schritten von sekundären Reaktionen bzw. Clusterzerfall (*lucky survivor*) [150] [153]. Neuere Experimente an AP-MALDI-Quellen und Ionenfallenspektrometern mit IR- und UV-Wellenlängen zeigen weiterhin, daß auch bei MALDI mehrfachgeladene Ionen entstehen und als solche mit überwiegenden Häufigkeiten vermessen werden können [154] [155] [156]. Einige Autoren erhalten etwa mit IR-Wellenlängen und flüssigen Matrices bzw. Wasser an kommerziellen AP-MALDI-Quellen mit Targetpotentialen zwischen 2.5 kV bis 4 kV mehrfachgeladene Ionen von größeren Peptidanalyten (Myoglobin und Cytochrom C). Mehrfachgeladene Peptidionen (Cytochrom C) sind demnach auch mit einer flüssigen Matrix und UV-Wellenlängen bei vergleichbaren Targetpotentialen erzeugbar. Ebenso scheint es möglich zu sein mehrfachgeladene Peptidionen mit kristallinen Matrices auf Glasobjektträgern nach Dried droplet-Präparation und etwa der Einstrahlung des Lasers von der Präparatrückseite zu erhalten (*Backside illumination*) [157]. Die meisten Autoren geben bei ihren Messungen dann eine gegenüber normalen MALDI-Messungen erhöhte Bestrahlung und relativ hohe Temperaturen an der Ionentransferkapillare des Spektrometers an. In [157] wird zudem berichtet, daß sich aus lösungsmittelfreien Präparationen keine Mehrfachladungen erzeugen lassen. Erst nach einer Lösungsmittelzugabe treten auch Mehrfachladungen, neben Einfachladungen entsprechender Analyte auf. Um die Messungen mit Mehrfachladungen von HV-MALDI-Messungen mit hauptsächlich einfachgeladenen Analytionen abzugrenzen, wird die Bezeichnung LSI (*Laserspray Ionization*) verwendet, die gleichsam eine elektrospray-ähnliche Tropfenbildung aus desorbierten und zerfallenden Clustern mehrfachgeladener Analyt/Matrix-Lösungsmittel Zusammensetzungen in der Gasphase unter Atmosphärendruck nahelegt. Die „Backside illumination“ ermöglicht es prinzipiell der Transferkapillare der Massenspektrometer sehr nahe zu kommen, setzt allerdings die Verwendung von transparenten Probenträgern voraus. Diese Anordnung wird aber nicht als zwingend notwendig angesehen, um mehrfachgeladene Ionen erzeugen zu können. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang die Untersuchungen von [158], die ein kontrolliertes Erzeugen von Mehrfachladungen im Wechsel mit Einfachladungen an einer kommerziellen AP-MALDI-Quelle mit metallischem Probentarget, kristallinen UV-MALDI-Matrices und einer Laserwellenlänge von  $\lambda = 355 \text{ nm}$  beschreiben. Die Autoren geben an, allein durch das Anlegen eines Targetpotentials von +1 kV (Transferkapillare  $T \approx 300 \text{ }^\circ\text{C}$ ) die Mehrfachladungen positiver Ionen unterdrücken zu können, um dann einfachgeladene Analytionenpektren zu erhalten. Nach einem veränderten Targetpotential von  $\pm 0 \text{ V}$  sollen dann erneut Mehrfachladungen detektiert werden können. Obgleich die zugrundeliegenden Mechanismen noch weitestgehend unklar sind, könnten diese unmittelbar mit sekundären Reaktionen in der Gasphase bzw. deren Ausbleiben zusammenhängen. Diese Ergebnisse eröffnen, sofern sie reproduzierbar sind, dann prinzipiell die Möglichkeit auch größere Biomoleküle ( $M_r \gg 2 \text{ kDa}$ ) mit AP-MALDI-Quellen an Ionenfallenspektrometern vermessen zu können. Diese sind bei klassischen MALDI-Experimenten nur als einfachgeladene Ionen darstellbar und übertreffen somit i.d.R. die obere Massengrenze zur Darstellung an Ionenfallenanalysatoren.

Eine (relativ) aktuelle Arbeit zeigt dabei einen möglichen Weg auf, nähere Erkenntnisse über die ablaufenden Vorgänge bei einer Gasphasenprotonierung der Analyte und einer (Lucky-Survivor) Ladungsreduktion sowie der damit verbundenen Mechanismen erhalten zu können [159]. Die Autoren verwenden deuterierte Matrixester und untersuchen so die bei unterschiedlichen Bedingungen (z.B. Laserenergie, Matrixacidität) auftretenden deuterierten Analyt- und Matrixspezies. Auf diese Weise wird es möglich, eine direkte Zuordnung zu den ablaufenden Mechanismen zu treffen:



(3.2) Gasphasenprotonierung des Analyten ( $A$ ) mit deuterierten Matrixionen ( $[ma + D]^+$ ) tritt ein, (3.3) klassisches Lucky-Survivor Modell der vorgeformten Analytionen mit einer erwarteten Gegenionenseparation ( $X^-$ ) und Gegenionenneutralisierung durch Bildung deuterierter Spezies ( $DX$ ) und Lucky-Survivor Analytionen ( $AH^+$ ).

Bei der Beurteilung eines physikalischen Prozesses auf einen möglichen Beitrag zu einem beobachteten Phänomen oder Mechanismus gilt generell, daß alle Betrachtungen auf die Dimensionen der physikalischen Rahmenparameter zu beziehen sind. Im Falle der Desorption/Ablation bei der UV-MALDI-Methodik sind das der Zeitraum der Laserpulsdauer<sup>11</sup> und die lineare(n) Dimension(en), die während der Ausbreitung der Strahlung zur Umwandlung der Energie im Medium<sup>12</sup> erreicht werden. Die dann im Vordergrund stehenden physikalischen Vorgänge sind die *Absorption* (Einphotonenabsorption im UV) und die *Dissipation*.

Die mit organischen MALDI-Matrizes und biologischen Molekülen/Ionen beobachtbaren Desorptions-/Ablationscharakteristiken<sup>13</sup> lassen sich sehr wahrscheinlich im Wesentlichen auf thermische Prozesse zurückführen. Die Laserpulsdauer ist zudem unmittelbar mit der Umsetzungsrate der analogen Signale während der Digitalisierung verknüpft. Funktional stellt dieser Prozess eine Faltung dar. In UV-MALDI Präparationen betragen die Lasereindringtiefen in 2,5-DHB-Kristalle bei einzelnen Nanosekundenlaserpulsdauern ungefähr  $\delta \approx 10^2 \text{ nm}$  (Stickstofflaser,  $\tau \approx 3 \text{ ns}$ ). Die Zeit, die dabei zum vollständigen Ablauf einer thermischen Relaxation (*thermische Relaxationszeit*,  $\tau_{the} = \frac{\lambda}{4\alpha\rho c}$ ) in den bestrahlten Bereichen erforderlich ist, übersteigt i.d.R. deutlich die Laserpulsdauer von gängigen kommerziellen Stickstofflasern ( $\tau_{the} > 3\tau$ ). Aufgrund der Volumendimensionen, die sich aus dem Strahlungsdurchmesser ( $d \approx 1 \mu\text{m}$  bis  $\geq 100 \mu\text{m}$ ) und der Eindringtiefe in die Kristalle ergeben, sollte der Wärmefluss, vor allem bei homogenen Strahlprofilen, hauptsächlich in Richtung des Probeninneren stattfinden. Der Wärmefluss ( $\frac{dQ}{dt} \propto \frac{dT}{dx}$ ) ist i.d.R. proportional zur Temperaturänderung in der Ausbreitungsrichtung des Gradienten. Bereits ab Pulsdauern von  $\tau \approx 10 \text{ ns}$  scheint dann auch eine vollständige Dissipation in Richtung des Probeninneren, innerhalb einer Pulszeit möglich zu werden. Das wiederum würde die Wahrscheinlichkeit einer Wärmediffusion aus der bestrahlten Stelle einer Präparation nach sich ziehen, andererseits aber auch einen Kochvorgang einleiten können. Neben dem Hauptprozess der Energieeinkopplung in den Matrixkristall, der durch das *Energy-pooling* und einer direkt damit gekoppelten Erwärmung erfolgt, könnten deshalb weiterhin theoretisch zwei Kochprozesse, zumindest eingeleitet werden. Zum einen

<sup>11</sup>Üblicherweise eine Halbwertsbreitendefinition der longitudinalen Pulsmoden.

<sup>12</sup>Üblicherweise der Kehrwert des Absorptionskoeffizienten der Matrix und der Laserspotdurchmesser.

<sup>13</sup>Die im Zusammenhang mit Laserwellenlängen im nahen UV (337 nm bis 355 nm), Laserpulsdauern im ein- bis zweistelligen Nanosekundenbereich und Foki  $> 10 \mu\text{m}$  ablaufen<sup>14</sup>

- ein normaler Kochvorgang mit heterogener Gasblasenbildung an Grenzflächen fest/flüssig → *normal boiling*
- sowie zum anderen eine Phasenexplosion, als Folge einer homogenen Gasblasenbildung in einer metastabilen Flüssigkeit → *explosive boiling*.

Unterstützt werden könnten beide Prozesse von den im Vakuum gasförmigen Lösungsmiteileinschlüssen in den Kristallhöhlräumen (*nucleation sites*). In diesem Zusammenhang wird auch von einigen Autoren die Zersetzung angeregter Matrixmoleküle während der Energieaufnahme (z.B. Decarboxylierung,  $\text{CO}_2 \uparrow$ ) ab gewissen Bestrahlungen diskutiert<sup>15</sup> (*pneumatic assistance*). Bei nativen biologischen Proben erhöht sich dabei die Wahrscheinlichkeit einer möglichen zusätzlichen Gasbildung aus potenziellen Zersetzungsreaktionen, allein durch die Anwesenheit von Resten an z.B. Puffersubstanzen aus der Präparationsumgebung (Kulturmedien etc., Ammonium-, Carbonat-, Bicarbonatpuffer) bzw. dem biologischen „Material“ selbst. Einen nicht unwesentlichen Beitrag zur Gasbildung könnte der i.d.R. hohe Wassergehalt in nativen biologischen Proben liefern, der teilweise bei einer einsetzenden Kristallisation von Analyten oder der Matrix gebunden werden kann. Die Diffusion von stabilen Gasblasen in der während der Bestrahlung entstandenen flüssigen Matrix erfolgt nun aber nur sehr langsam. Es wird im Mittel ungefähr eine Zeit von einstelligen Nanosekunden ( $10^{-9}$  s) zum Zurücklegen von Diffusionsstrecken von 1  $\mu\text{m}$  bis 10  $\mu\text{m}$  ( $10^{-12}$  m) angenommen. Ein vollständig ablaufender normaler Kochvorgang mit heterogener Gasblasenbildung gilt deshalb im Zusammenhang mit UV-Laserpulsdauern von  $\tau \leq 10$  ns in Verbindung mit den meisten kristallinen UV-Matrizes, als eher unwahrscheinlich bzw. insgesamt unbedeutend. Hierzu wird auch 2,5-DHB gezählt, allerdings ohne experimentelle Falsifizierung im entsprechenden Maßstab [160]. Zur Erzeugung einer Phasenexplosion ist wiederum das schnelle Aufheizen lokaler Bereiche über die Siedetemperatur<sup>16</sup> nötig. Der hohe Strahlungsdruck könnte eine metastabile überhitzte Flüssigkeit erzeugen, aus der heraus dann spontan eine homogene Gasblasennukleation erfolgt. Beim Erreichen der *spinodalen* Temperatur der Matrix kommt es dann zu einem explosionsartigen Kollabieren der metastabilen flüssigen Phase.

Die Vorgänge unmittelbar vor dem Phasenwechsel, die während der Lasereinwirkung in den mikroskopischen Bereichen der Probe stattfinden, sind aber aufgrund der geringen Dimensionen, der kurzen Zeiträume sowie der Unzugänglichkeit der Probe für geeignete Sonden während einer Messung, bislang nur unzureichend (*in situ*) untersucht worden. Es ist deshalb weder falsifiziert, daß der Zustand einer metastabilen Flüssigkeit erreicht wird, noch, daß der Zwischenschritt einer flüssigen Phase mit einer anschließenden Erstarrung erfolgt. Elektronen- und lichtmikroskopische Untersuchungen an Messstellen (*burn pattern*) entsprechender Präparationen legen bei manchen UV-MALDI Matrizes (hierunter auch 2,5-DHB) das Erstarren einer Schmelze, als einen ablaufenden Vorgang, aufgrund der hinterlassenen Oberflächenmorphologie in den Kraterstrukturen aber nahe [1].

Neben den Kochprozessen wird der Wärmeleitung im Matrixkristallgefüge eine noch geringere Bedeutung zum Beitrag im „MALDI-Prozess“ eingeräumt [8] (Kapitel 1). Weiterhin wird noch eine photoakustisch induzierte Ablation (photomechanische Ablation) von Probenmaterial diskutiert, bei der die Entstehung und Ausbreitung von bipolaren Druckwellen im Kristall erfolgt (*thermoelastic stress wave*). Diese können sehr wahrscheinlich ihre quantitative Bedeutung (über Druck-/Zugspannungen) bei der Ablation aber hauptsächlich unter den Bedingungen des sogenannten „stress confinement“ einnehmen, d.h.

<sup>15</sup>Für DHB z.B.,  $\text{DHB} \rightarrow p - \text{Hydrochinon} + \text{CO}_2$ ,  $\Delta H = -20.6 \text{ kJ/mol}$ .

<sup>16</sup>Die Schmelztemperatur von 2,5-DHB liegt bei Atmosphärendruck zwischen ca. 205 C° und 208 C°, eine anhand der Vakuumdeposition erkennbare Sublimation setzt bei  $p \approx 10^{-6}$  mbar aber bereits ab ca. 50 C° ein [58] [46].

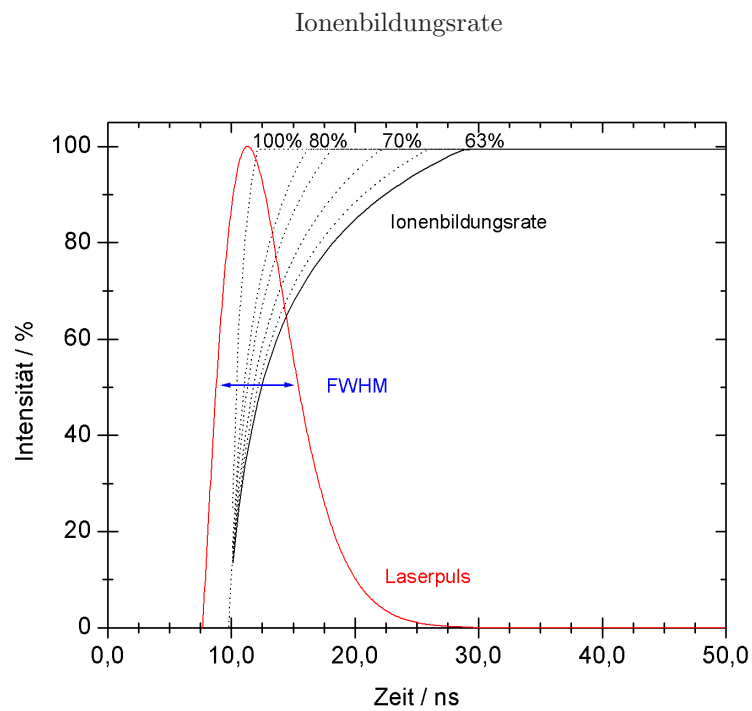


dann, wenn die Laserpulsdauer geringer (maximal gleichlang), als der Ausbildungs- und Ausbreitungszeitraum der thermoelastischen Druckwellenfortpflanzung im letztlich abgetragenen Anregungsvolumen ist (*mechanical equilibration*,  $\tau_{me} = \frac{1}{\delta_{abl.} v_s} \geq \tau$ ,  $v_s$  Schallgeschwindigkeit im Medium). Experimentelle Daten mit einigen UV-Matrizes legen akustische Relaxationszeiten von  $\tau_{me} < 100$  ps nahe [8] (Kapitel 1). Es kommt dabei durch schnelles Aufheizen, zunächst an der heißesten Stelle (*heat source*, Probenoberfläche), zur Bildung einer (bipolaren) thermoelastischen Druckwelle. Diese breitet sich einerseits im nahezu isochor (keine Volumenänderung) erhitzenden Kristall mit Schallgeschwindigkeit aus und kann, wenn andererseits die von der Probe wegstrebende Druckwelle in der obersten Schicht zur Ablation führt, mit der Welle des Rückstossimpulses der Ablation überlagern. Aus der Höhe des Rückstossdruckes, der bei UV-MALDI und Nanosekundenlaserpulsen deutlich überwiegt, kann dann direkt auf die Masse des abgetragenen Materials geschlossen werden. Untersuchungen an einer flüssigen UV-MALDI Matrix (3-Nitrobenzylalkohol [161]) u.a. zur Messung des Rückstossdruckes (*recoil stress*) von abgetragenen Matrixmaterial (Piezoelementsensoren am Target), legen allerdings wiederum eher wechselnde thermische Prozesse zur quantitativen Beschreibung des erhaltenen Ionensignals, in Abhängigkeit der Bestrahlung nahe<sup>17</sup> [162]. Bei sehr dünnen Proben könnte der nach aussen gerichtete Anteil, durch Zugspannungen innerhalb des angeregten Bereichs, allein zur Ablation führen oder aber durch eine Überlagerung<sup>18</sup> mit Reflexionen des nach innen gerichteten Druckpulses, ebenso über ein mechanisches Zerreißen der Probe, an manchen Stellen zur Ablation beitragen. Möglich wäre dieser Prozess auch an dünnen amorphen Matrixschichten, ähnlich dem „Zersplittern“ von Glas. Dieser Mechanismus ist außerdem bei Präparation mittels Vakuumsublimation/Resublimation der Matrix (*vapor deposition*) denkbar. An solchen Proben kann etwa mit der Matrix 2,5-DHB ein großflächiges „Abplatzen“ nach diskreten Laserpulsen im Vakuum festgestellt werden, das unter Atmosphärendruck dagegen weitestgehend ausbleibt [58] [46]. Weiterhin denkbar aber eher unwahrscheinlich ist ein photoakustischer Einfluss bei der Ablation mancher biologischer Bindegewebe mit sehr hohem Faseranteil unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften. Bei den Faserstrukturen dominieren im Masseanteil bei Wirbeltieren (so auch beim Menschen) die Kollagene (Proteine). Diese treten dabei in unterschiedlichen Formen auf [71]. Abbildung 3.1 zeigt unterschiedliche Verläufe der Ionenbildungsrate im Zusammenhang mit einer Laserpulsform bei angenommenen (willkürlichen) Bedingungen in einem MALDI-Experiment.

---

<sup>17</sup>Quasithermische Gleichgewichtsdesorption unterhalb einer Schwellbestrahlung und Moving-Heat-source Modell einer Phasenexplosion ab der Schwellbestrahlung.

<sup>18</sup>Der „Widerstand“ für die Ausbreitung akustischer Druckwellen zur Vakuumseite geht ins Unendliche, weshalb die Wirkung der nach aussen gerichteten Druckwelle noch durch eine Reflexion in dünnen Proben überlagert werden kann.



---

Abbildung 3.1: (Rote Kurve) Laserpulscharakteristik und angenommene (schwarze Linien) Ionenbildungsraten innerhalb der FWHM-Zeit eines Laserimpulses (Startzeitpunkt  $t = 9$  ns). Angenommene relative Ionisierungsraten zwischen ca. 63% und ca. 100%, bezogen auf den für einen Pulspeak notwendigen Ionenstrom. Nach neueren Erkenntnissen wird angenommen, daß bis in die Größenordnung von  $10^2$  ns nach dem Beginn eines UV-Laserimpulses noch Ionen aus einer UV-MALDI-Probe desorbiert werden können ([8], Kapitel 1, Seite 1 ff.)



### Numerische Simulation

Aus numerischen Simulationsrechnungen von Zhigilei et al. wird an Modellsystemen (MD, *Molecular Dynamics*) mit angenommenen Laserpulsdauern von 15 ps und 150 ps, innerhalb des verwendeten Modells erkennbar, daß unterhalb einer Schwellbestrahlung sehr wahrscheinlich nur die Desorption weniger Moleküle erfolgt und erst ab Erreichen einer Schwellbestrahlung die Extraktion größerer Molekülverbände, sogenannter *Cluster*, einsetzt (*breathing-sphere model*). Aus diesen Simulationen ergibt sich, daß unter den gewählten Ausgangsannahmen<sup>19</sup> und Modellvorstellungen (*Atomic level simulations*) eine thermoelastische Druckwellendesorption/Ablation an reinen Matrixpräparationen nur mit den kurzen 15 ps-Laserpulsen realistisch ist. Mit den 150 ps-Laserpulsen erfolgt unterhalb der Schwellbestrahlung eine thermische Desorption und ab der Schwellbestrahlung dann eine thermisch induzierte Clusterablation bzw. eine Layer-by-layer Phasenexplosion [2]. Ab einer Bestrahlung (Fluenz)  $H$ , die die substanzspezifische Schwellbestrahlung  $H_{th}$ <sup>20</sup> erreicht,  $H \geq H_{th} = \delta(E - cT)$ , kann der experimentell messbare primäre und protonierte Ionenanteil  $N$  mit Einschränkungen durch eine thermische Phasenexplosion beschrieben werden [1] [2]:

$$N_{(A,H,\theta)} \propto \delta A \cos(\theta) \ln^n \left( \frac{H}{H_{th}} \right) \quad (3.5)$$

mit  $n=1$  für Flat-Top-Laserprofile,  $n=2$  für Gaussprofile,  $E$  einer *kritischen* Energie,  $c$  der spezifischen Wärmekapazität,  $\delta$  der Eindringtiefe der Laserstrahlung,  $T$  der Proben temperatur und  $A \cos(\theta)$  der bestrahlten Probenfläche bei einem Einstrahlwinkel  $\theta$ . Der Term  $cT$  entspricht der *thermischen* Energie<sup>21</sup>, die vor der Laserbestrahlung im potentiellen Ablationsvolumen (der Matrix) angenommen wird. Ange wandt auf den messbaren Anteil an MALDI-Analytionen, sind die Zusammenhänge aber deutlich unklar er. Es ist besonders auffällig, daß Postionisierungsmessungen, bei denen die primäre Ionisierung nach der Desorption erst durch einen zweiten Laser (in der Gasphase) erfolgt, quantitativ besser in Einklang mit einer Phasenexplosion zu bringen sind, als diejenigen Experimente, die mit einer direkten Desorption/Ionisierung der MALDI-Matrix und Analyte erfolgen. Dies gibt einen Hinweis auf den Einfluss, den die sekundären Reaktionen und Vorgänge im Plume auf die bei MALDI letztlich vermessenen Matrix- und Analytionen haben müssen. Ihr Beitrag sollte bei einem dichteren frühen Plume und damit bei steigender Bestrahlung stark überproportional, im Vergleich zur primären Ionisierung (der Matrix), zunehmen. Die Abschwächung der Laserstrahlung durch eine sehr wahrscheinlich stark überwiegende Einphotonenabsorption in der kristallinen Matrix folgt dem *Lambert-Beerschen-Gesetz*. Die Änderung der *inneren* Energie  $U$  eines molekularen Kristalls entspricht unter isochoren Bedingungen (konstantes Volumen) seiner Wärmekapazität  $c_v = (\partial U / \partial T)_v$  (Die spezifische Wärmekapazität  $c$ ,  $c_v$  bezieht sich auf die Masse). Bestrahlungen mit Beträgen, die moderat über der Schwellbestrahlung einer Substanz in einer bestimmten Messumgebung liegen, führen im Anregungsprozess dann hauptsächlich zum Lösen intermolekularer Wechselwirkungen<sup>22</sup> zwischen den Peptidanalyten und Matrixmolekülen und ganz überwiegend nicht zum Bruch atomarer Bindungen z.B. in Analyten, durch eine Steigerung der inneren Energie über den Anteil der intramolekularen Bindungskräfte. Die Matrix 2,5-DHB zeigt dagegen fast immer einen deutlichen Anteil an Fragmentionen in den Massenspektren, wie typischerweise z.B.  $[M - H_2O + H]^+$ . Ihr Anteil steigt i.d.R. mit zunehmender Bestrahlung an.

Geht man davon aus, daß in oberflächennahen Bereichen eine Art Layer-by-Layer Phasenexplosion

<sup>19</sup>Dichte  $\rho=1.2 \text{ g/cm}^3$ , Molekülanzahl zwischen ca.  $7 \cdot 10^4$  und  $1 \cdot 10^5$ ,  $M_r=100 \text{ Da}$ .

<sup>20</sup>Diese ist in Abhängigkeit der Sensitivität eines Spektrometers zu sehen und kann daher bei geeigneten Verfahren auf die Desorption einzelner bzw. weniger Ionen reduziert werden.

<sup>21</sup>Thermische Energie,  $E_{th} = Q = c \cdot m \cdot T$ .

<sup>22</sup>Überwiegend Wasserstoffbrückenbindungen ( $\leq 17 \text{ kJ/mol}$ ) und van-der-Waals-Wechselwirkungen ( $\leq 5 \text{ kJ/mol}$ ).

stattfindet, so muss der entstehende Temperaturgradient innerhalb der Laserpulsdauer  $t \leq \tau$  die Temperatur im desorbierten Layer über die Sublimationstemperatur steigern können ( $T_{Layer} > T_{subl}$ ). Wird der Kristall als homogen und isotrop angesehen, erfolgt eine Wärmeleitung prinzipiell in alle Raumrichtungen gleich schnell. Wenn zudem die Temperaturleitfähigkeit  $\kappa$  unabhängig von der Temperatur ist, gilt  $\partial T(\vec{x}_i, t)/\partial t = \kappa \Delta T(\vec{x}_i, t)$ , mit  $i = 1, 2, 3$ . Geht man weiterhin von einer homogen bestrahlten Oberfläche (größerer Flat-Top-Laserprofile<sup>23</sup>) aus, dann erhält man als Lösung der partiellen Differentialgleichung für den eindimensionalen Fall, die Wärmeleitung in Richtung des Probeninneren. Es handelt sich dabei um eine (einseitige) Gaussfunktion [163]:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{E_{th}}{\rho c} + \frac{\lambda}{\rho c} \nabla^2 T \quad (3.6)$$

$$\Delta T(x, t) = \frac{E_x}{\rho c_v} = \frac{E_0}{\lambda} \left( \frac{e'}{\sqrt{\pi}} - \frac{1}{\alpha} \left( 1 - \exp\left(\frac{\alpha e'}{2}\right)^2 \operatorname{erfc}\left(\frac{\alpha e'}{2}\right) \right) \right) \quad (3.7)$$

$$T(x, t) = \frac{E_{th}}{2\rho c \sqrt{\pi \kappa t}} \exp\left(-\frac{x^2}{4\kappa t}\right) \quad (3.8)$$

Hierbei ist  $E_{th}$  [J] die thermische Energie, die als Wärmequelle auf der Probenoberfläche anzusehen ist,  $\lambda$  [W/m K] die Wärmeleitfähigkeit und  $\alpha$  der Absorptionskoeffizient der Matrix. (3.5) ist die allgemeine Wärmeleitungsgleichung und  $\nabla^2$  entspricht dem Laplace-Operator<sup>24</sup>.  $E_0$  ist die Bestrahlungsstärke, für die bei MALDI typischerweise  $E_0 \approx 10^6$  W/cm<sup>2</sup> angenommen wird und  $E_x$  die Bestrahlungsstärke am Ort  $x$ . Weiterhin entsprechen  $e' = 2(\kappa t)^{0.5}$ ,  $\kappa = \lambda/\rho c$  [m<sup>2</sup>/s] der Temperaturleitfähigkeit,  $\rho$  der Dichte und  $c$  bzw.  $c_v$  der spezifischen molaren Wärmekapazität bei konstantem Volumen. Der Term  $\operatorname{erfc}(x) = 1 - \operatorname{erf}(x)$  ist die konjugierte Funktion der gaußschen Fehlerfunktion  $\operatorname{erf}(x)$  (siehe Anhang).

Mit der Annahme einer Gleichgewichtsdesorption in einigen Simulationen geht meistens einher, daß der limitierende Schritt der sekundären Ionisierung (der Analyte) bei konstant angenommener primärer Ionisierungsrate (der Matrix), der Phasenübergang ist [164]. Eine quantitative Beschreibung der erzeugten (Analyt)Ionen folgt damit zunächst einer Exponentialfunktion erster Ordnung ( $N \approx H^x$ ). Ihr Exponent wird auf Experimente angewandt i.d.R. in einem Wertebereich zwischen 4 und 8 gewählt [1] [163]. Besonders bei höheren Bestrahlungen ist aber eine Vorhersage der erzeugten Ionenintensitäten, gegenüber der tatsächlich in den meisten Experimenten erhaltenen Signalstärke zu groß. Dies könnte einerseits an einer Sättigung der Detektion liegen, andererseits aber auch darauf hindeuten, daß der Anteil der sekundären Ionisierung/Neutralisierung im Plume quantitativ nicht adäquat berücksichtigt wird. Die Nettoionisierungsrate (Ionen-zu-Neutralteilchen Verhältnis) einer MALDI-Matrix wird an der Schwellbestrahlungsgrenze in etwa auf ca. 0.0001 % bis 0.001 % (0.001 - 0.01 Promille) angenommen. Eine realistische relative Ionisierungsausbeute von z.B. Peptidanalyten wird an der Schwellbestrahlungsgrenze mit zwischen 0.1 % bis 1 % angenommen. In Ausnahmefällen kann sie aber bis zu 10 % betragen [1].

### Ablationsberechnung

Das ab einer Schwellbestrahlung abgetragene Volumen kann bei Flat-Top-Laserstrahlprofilen mit größerem Durchmesser theoretisch aus der Eindringtiefe und der bestrahlten Probenoberfläche berechnet werden. Im Falle einer gaußförmigen Intensitätsverteilung zeigt sich in Experimenten, daß bei der Schwellbestrahlung i.d.R. bei Einzelpulsexperimenten laterale Bereiche ablatiert werden, die innerhalb der  $1/e^2$ -Definition (optischer Fokusedurchmesser) der Strahltaile des TEM-Profiles liegen [46] [53] [58].

<sup>23</sup>Durchmesser von einigen  $10^2 \mu\text{m}$ .

<sup>24</sup> $\nabla = \vec{e}_x \frac{\partial}{\partial x} + \vec{e}_y \frac{\partial}{\partial y} + \vec{e}_z \frac{\partial}{\partial z}$ , Nabla-Operator mit  $\|e\| = 1$ . Laplace-Operator,  $\Delta f(x, y, z) = \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial z^2}$

Die maximal erreichbare Bestrahlung ( $H_{max}$ ) hängt dabei von der Pulsenergie des Lasers ( $E_\tau$ ) und der effektiven Bestrahlungsfläche ( $A_{eff}$ ), hier als unbestimmtes Zweifachintegral dargestellt, ab:

$$H_{max} = \frac{E_\tau}{A_{eff}} \quad (3.9)$$

$$A_{eff} = \frac{E_\tau}{H_{max}} = \frac{\int \int H(x, y) dx dy}{H_{max}} \quad (3.10)$$

Für ein relativ großes, radialsymmetrisches Flat-Top Profil ergibt sich die effektive Fläche und der effektive Durchmesser aus den geometrischen Maßen, da die Pulsenergie mehr oder weniger homogen verteilt wird (3.10). Bei radiärsymmetrischen Gaussprofilen wird i.d.R. die  $1/e^2$ -Definition des Intensitätsabfalls bzw. die  $1/e$ -Definition des Amplitudenabfalls an den Profillanken und damit der  $d_{86.5\%}$ -Durchmesser als Begrenzung der effektiven Bestrahlungsfläche angenommen:

$$A_{eff} = \frac{H_{max} \pi d_{TH}^2}{4} = \frac{\pi d_{TH}^2 H_{max}}{4} \quad (3.11)$$

$$A_{eff} = \frac{2\pi H_{max} \int_0^{d_{86.5\%}} e^{-8 \frac{r^2}{d_{86.5\%}^2}} r dr}{H_{max}} = \frac{\pi d_{86.5\%}^2}{8} \quad (3.12)$$

Das Suffix  $_{TH}$  steht hier für das Synonym „Top-Hat“ und bezeichnet ein Flat-Top Profil, das aus einem entsprechenden Gaussprofil, nach einer geeigneten Transformation erhalten werden kann. Der effektive Durchmesser eines radialsymmetrischen Pulsprofils beträgt allgemein:

$$d_{eff} = 2 \sqrt{\frac{A_{eff}}{\pi}} \approx 1.128 \sqrt{A_{eff}} \quad (3.13)$$

und ist damit definitionsabhängig unterschiedlich. Er entspricht im Falle des homogenen Strahlprofils dem Top-Hat-Durchmesser ( $d_{TH} = \sqrt{2}\omega$ ). Dieser ist im Vergleich zu einem Gaussprofil identischer Peakintensität verringert ( $d_{86.5\%} = 2\omega$ ). Die Pulsenergie ergibt sich aus der Pulsverteilung, die effektive Pulslänge  $t_{Puls}$  i.d.R. aus dem Zusammenhang der Laserleistung, der Güte und der Repetitionsrate des Laser. Bei Nanosekundenimpulsen die keine lang abfallende Pulsflanke (exponentiell abfallende Flanke) aufweisen, entspricht die effektive Pulslänge in etwa der Halbwertsbreite des zeitlichen Pulsprofils  $t_{Puls} \approx t_{FWHM}$ .

Ein wesentlicher Unterschied zwischen einer angenommenen Gleichgewichtsdesorption/Ablation und einer explosionsartigen Desorption/Ablation ist, daß im Falle der Gleichgewichtsablacion nicht zwingend der Absorptionskoeffizient  $\alpha$  die Abtragtiefe  $\delta_{abl}$  allein bestimmt, sondern auch die Ablationsenthalpie,  $h_{abl}$ , nämlich über  $H_{th} = \rho h_{abl}/\alpha$  einen Einfluss haben kann. Zunächst wird angenommen, daß hierbei keinerlei Wärmediffusion aus dem betrachteten Volumen auftritt. Die Situation wird aber unübersichtlich, wenn während der Ablation unterschiedliche Stufen mit ungleichen „Ablationsenthalpien“ erreicht werden können, weil z.B. der Laser Matrix und biologisches Material gleichzeitig erreicht und einmal eine Ablation in Form einer Sublimation (Gleichgewichtsablacion) sowie einmal in der Form einer Verdampfung aus flüssiger Phase (quasi explosionsartige Ablacion) eintritt. Für die Eindringtiefe, die bei einer Gleichgewichtsablacion einer Substanz erreicht werden kann, gilt zunächst die Annahme

$$\delta_{abl} = \frac{H - H_{th}}{\rho h_{abl}} \quad (3.14)$$

Führt eine Ablation der Probe dazu, daß während der Laserpulsdauer ein nennenswerter Beitrag an der Absorption der Laserstrahlung von bereits einmal abgetragenem Material in der Gasphase oder in einem

auftretenden Niederschlag erfolgen kann (*Debris - Absorption*), so lässt sich die Ablationstiefe auch gemäß

$$\delta_{abl.} = \frac{1}{\alpha \gamma} \ln \left( \gamma \frac{H}{H_{th}} - \gamma + 1 \right) \quad (3.15)$$

angeben. Gleichung 3.15 kann mit  $\gamma = \alpha_D/\alpha$ , dem Verhältnis des Absorptionskoeffizienten der Debris zu dem der ursprünglichen Festphase, sowohl die Situation einer Gleichgewichtsablation  $\gamma \rightarrow 0$ , als auch die Situation einer explosionsartigen Ablation  $\gamma \rightarrow 1$  approximieren [71]. Es ist auf diesem Wege möglich, eine spezifische *Ablationsenergie*  $E_{abl.}$  [ $J/m^3$ ] zu ermitteln. Geht man dabei zunächst von einem zylindrischen Ablationsvolumen aus, das durch den Radius  $\omega$  des 100%-Durchmessers eines Flat-Top-Profiles und der Eindringtiefe  $\delta_{abl.}$  bestimmt wird, erhält man eine Beziehung der Gestalt:

$$E_{abl.} = \frac{E_0 \pi \omega^2}{\delta_{abl.} \pi \omega^2} \quad (3.16)$$

Weiterhin wird dann eine Abschätzung über eine ideale Energiedichte, die zu einem optimalen Ablationsergebnis führt möglich. Was ein optimales Ablationsergebnis ist, hängt immer von der Fragestellung bzw. der Messprobe ab und kann deshalb nicht allgemein definiert werden. Es zeigt sich aber auf jeden Fall, vor allem bei der Verwendung von gaussförmigen Intensitätsprofilen und kleinen Laserfoki, daß eine differenzierte Betrachtung der Profildbereiche geboten ist, um die Materialablation adäquat beschreiben zu können [46]. Ein symmetrisches Gaussprofil liefert i.d.R. ein kraterförmiges Ablationsvolumen gemäß:

$$V_{abl.} = \frac{\pi d_{86.5\%}^2 \delta_{abl.}}{8} \left( 1 + \ln \frac{H}{H_{th}} \right) \quad (3.17)$$

Ersetzt man die Ablationstiefe durch den Ausdruck (3.15), erhält man die allgemeine Beziehung, die nur auf die Schwellbestrahlung abzielt:

$$E_{abl.} = \frac{E_0 \alpha \gamma}{\ln \left( \gamma \frac{H}{H_{th}} - \gamma + 1 \right)} \quad (3.18)$$

Eine experimentell bestimmbare Größe ist die *Ablationseffizienz*  $\eta_{abl.}$ . Diese kann allgemein, anhand der pro Bestrahlung abgetragenen Masse an Probenmaterial definiert werden:

$$\eta_{abl} = \frac{\rho \delta_{abl}}{H} \quad (3.19)$$

Zur Messung kleinster Ablationsmengen einer Probe bietet sich z.B. eine Quarzmikrowaage an. Es ergeben sich dann mit diesem Ansatz formal zwei unterschiedliche Ablationseffizienzen, je nachdem welche Bedingung entscheidend ist. Für eine explosionsartige Ablationscharakteristik z.B. nach dem *moving heatsource*-Modell:

$$\eta_{abl} = \frac{\rho}{\alpha H} \ln \left( \frac{H}{H_{th}} \right) \quad (3.20)$$

und für eine Gleichgewichtsablationscharakteristik:

$$\eta_{abl} = \frac{H - H_{th}}{h_{abl} H} \quad (3.21)$$

Legt man eine explosionsartige Ablation zugrunde, erfolgt eine maximale Ablationseffizienz erst bei einer Bestrahlung von  $H \approx 2.7 H_{th}$  und fällt dann bei noch höheren Bestrahlungen monoton ab. Die maximale Ablationseffizienz ist hier immer dann unabhängig vom Absorptionskoeffizienten, wenn die Schwellbestrahlung ausschliesslich eine (Material)Konstante ist. Bei einer Gleichgewichtsablation ist die maximale Ablationseffizienz dagegen unabhängig vom Absorptionskoeffizienten, sie steigt stetig und asymptotisch

bis zu  $\eta_{abl} = \frac{1}{h_{abl}}$  an.

In Abbildung 3.2 sind angenommene Peakintensitätsentwicklungen in Abhängigkeit von der Bestrahlung und bei der Verwendung entweder eines Gauss- oder aber eines Flat-Top-Laserprofils sowie eines Gaussprofils in Abhängigkeit von der wirksamen (effektiven) Laserenergie gezeigt. Abbildung 3.3 stellt den gefundenen Zusammenhang zwischen der (angenommenen) Schwellenergie in einem MALDI-Experiment und dem Molekulargewicht von Peptidanalyten her.

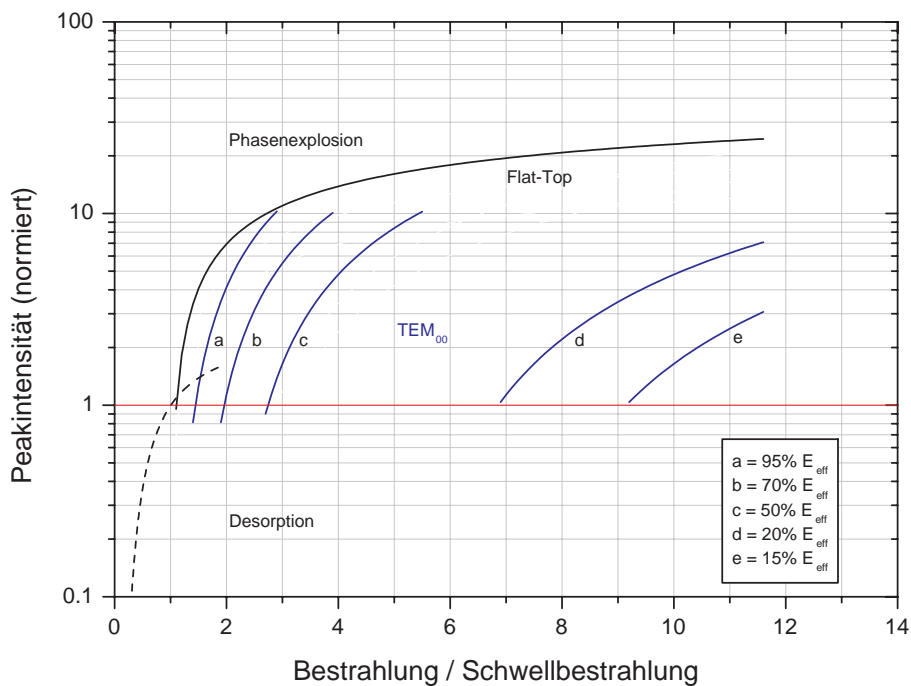


Abbildung 3.2: (Gestrichelte schwarze Linie) Verlauf der vermuteten Quasigleichgewichtsdesorption bis zur Schwellbestrahlung. (Schwarze Linie) *Layer-by-Layer* Phasenexplosion ab der Schwellbestrahlung, beide Kurven bei angenommenem Flat-Top-Laserprofil einer identischen Querschnittsfläche. (Blaue Linien) Annahme einer *Layer-by-Layer* Phasenexplosion mit einem gaussförmigen Laserprofil identischer Querschnittsfläche aber unterschiedlichen *wirksamen* Energieanteilen (a-e).

### 3.1.3 Gasexpansion im Vakuum

Der Phasenwechsel begleitet bzw. folgt unmittelbar einer primären Ionisierung einzelner Matrixmoleküle und beinhaltet die Änderung intensiver Größen (Druck, Temperatur) im Teilchensystem. Diesem folgt die irreversibel *adiabatische* Expansion der unterschiedlichen Spezies (Neutralteilchen, Ionen, Protonen, Elektronen) in der Gaswolke (*Plume*). Hierbei ändern sich die extensiven Größen Volumen, Teilchenzahl und ab einem bestimmten Zeitpunkt bis zum Erreichen von (ggf. lokalen) Gleichgewichtsbedingungen auch die Entropie. Die Zunahme der Entropie kann isoliert auf *sortenreine* Teilchenwolken zu einer Beschreibung des theoretischen N6d-Phasenraumes verwendet werden (*Liouville Theorem*) [21] [165] [166] (siehe Anhang). Die im zeitlichen Verlauf abnehmende Dichte eines entstandenen Plasmas bzw. der expandierenden Gaswolke, führt dabei zu wachsenden mittleren freien Weglängen im Teilchensystem. Besonders die frühe

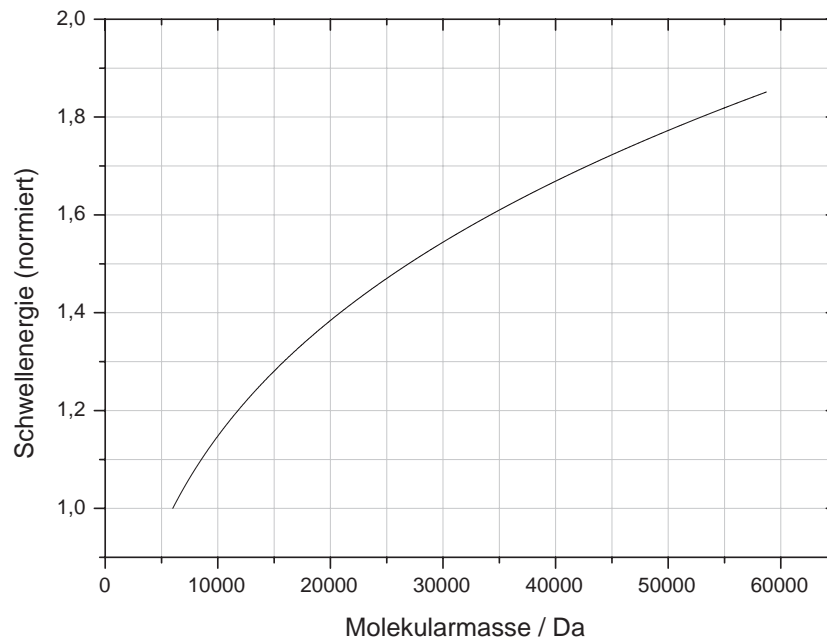


Abbildung 3.3: Darstellung der Beziehung zwischen angenommener Schwellenergie zur Analytdarstellung und dem Molekulargewicht von Peptid/Proteinanalyten ( $M_r = 5700 \text{ Da}$  bis  $M_r = 66000 \text{ Da}$ ). Der Zusammenhang lässt sich nach Messdaten von [167] mit einer Fitfunktion  $E_{th} = 3.27 M_r^{0.27}$  beschreiben. In dieser Arbeit wird ein nahezu winkelunabhängiger Zusammenhang der Schwellbestrahlung mit der Molmasse von Peptidanalyten gefunden. Der verwendete Laser ist ein Nd:YAG-Laser (YG780, Quantel,  $\lambda = 355 \text{ nm}$ ,  $\tau = 7 \text{ ns}$ ). Der Fokus ist im ursprünglichen Aufbau elliptisch und hat die Abmaße  $400 \mu\text{m} \cdot 200 \mu\text{m}$ . Der Bestrahlungswinkel kann zwischen  $30^\circ$  und  $65^\circ$  verändert werden. Die Querschnittsfläche  $A^2$  auf der Probe verändert sich dabei maximal um den Faktor 1.64.

Phase der Expansion mit einer relativ hohen Dichte, ermöglicht nach Ansicht einiger Autoren dabei das Einsetzen einer *stochastischen* Kühlung (*collisional cooling*) und bietet gleichzeitig die Gelegenheit zu sekundären (chemischen) Reaktionen. Hierzu wird auch die überwiegende Neutralisierung mehrfachgeladener, vorgeformter Analytionen gerechnet. Die sekundäre Ionisierung (Gasphasenionisation) der Analyte ist anhand einer Reihe von Reaktionen<sup>25</sup> denkbar [139]. Die abnehmende Dichte der Gaswolke und der Restgasdruck im Spektrometer sind hierbei, neben dem effektiven Kollisionsquerschnitt der unterschiedlichen Spezies (Ionen und neutralen Moleküle) sowie der Zusammensetzung des Restgases, wesentliche Bestimmungsgrößen der Stoss- und Reaktionswahrscheinlichkeiten. Daten über Kollisionsquerschnitte sind anhand mehrerer Untersuchungen, hauptsächlich für Peptidanalyte in der Literatur zu finden. Eingesetzt werden dazu ESI- aber auch MALDI-Quellen in Kombination mit Ionenmobilitätszellen vor den eigentlichen Massenanalysatoren. Auf diese Art ermittelte Kollisionsquerschnitte von einfach geladenen desolvatisierten Peptidionen<sup>26</sup> in einem Massenbereich von ca. 150 Da bis 1600 Da, ergeben nach Untersuchungen von [168] Werte in einem Bereich zwischen ca.  $A = 75 \text{ \AA}^2$  und  $A = 350 \text{ \AA}^2$  (ESI Experimente). Unter bestimmten Voraussetzungen sind auch allgemeinere Abschätzungen im Zusammenhang mit der Molekularmasse eines Peptides unbekannter *Sekundärstruktur* bzw. *Supersekundärstruktur* möglich. Der Kollisionsradius folgt dabei in etwa einer Beziehung gemäß,  $r \approx 7.58 \cdot 10^{-9} M_r^{1/3} \text{ cm}$ .

<sup>25</sup>Protonentransfer, Kationentransfer, Elektronentransfer, Elektroneneinfang.

<sup>26</sup>Diese wurden aus Verdauansätzen mit Trypsin von insgesamt 34 Proteinen erzeugt und mittels ESI ionisiert.

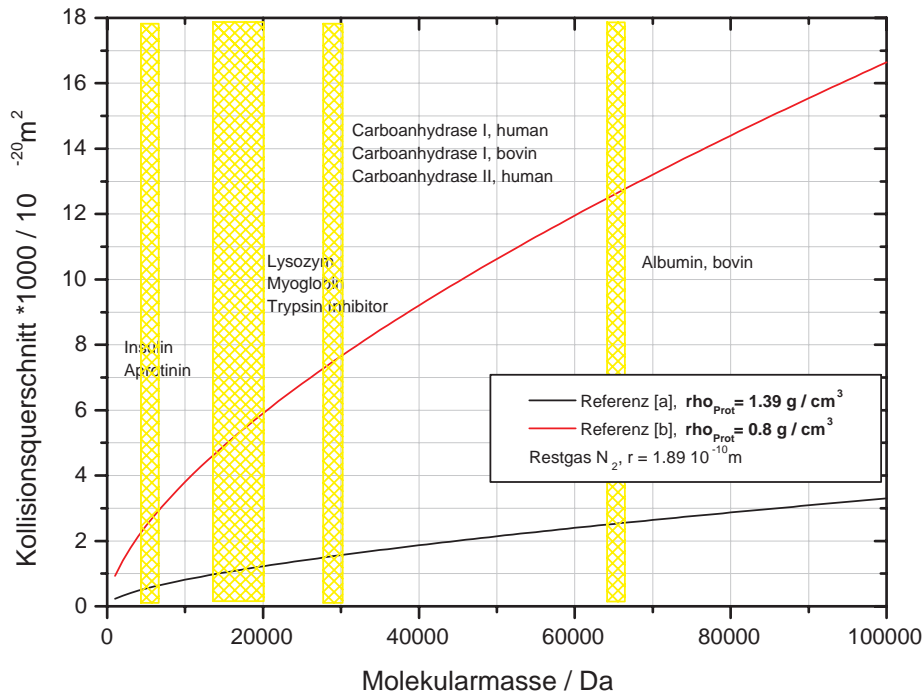


Abbildung 3.4: Angenommene Kollisionsquerschnitte von Peptid/Proteinionen in Stickstoff nach Ref. a [169] und Ref. b [170].

In [169] [170] werden für Peptide massenabhängige Kollisionsquerschnitte in Abhängigkeit der angenommenen *konformationsabhängigen* Dichte angegeben. Die ebenfalls unter ESI-Bedingungen angenommene Dichte für eher *globuläre* Peptide in der Gasphase schwankt hier in der Literatur zwischen ca.  $0.7 \text{ g/cm}^3$  und  $1.36 \text{ g/cm}^3$  (Abbildung 3.4, Kollisionsgas  $\text{N}_2$ ). Untersuchungen an MALDI-IMS-TOF Hybridgeräten mit einem He-Druck in der Ionenquelle von  $P \approx 1.9 \text{ mbar}$ , ergeben dabei recht ähnliche Werte für Peptide eines identischen Massenbereiches [171]. Die theoretische *mittlere freie Weglänge* bei einem Restgasdruck (Gas = Luft) im Spektrometer von ca.  $P = 10^{-7} \text{ mbar}$  liegt bei ungefähr  $\lambda = 500 \text{ m}$ ,  $\lambda = 1/\sqrt{2} n A$  ( $n = \text{Restgasteilchendichte}$ ) [172] [288]. Die tolerierbare untere Grenze der mittleren freien Weglänge in linearen TOF-Spektrometern (ohne Kollisionszellen o.ä.) liegt über der Größenordnung der Gesamtflugstrecke der nachzuweisenden Ionen im Spektrometer, wird aber außerdem noch durch das Detektionsprinzip und die elektrostatischen Einrichtungen beeinflusst (Akzeptanz).

Bei MALDI-Experimenten ist die Anfangsgeschwindigkeit der desorbierten Ionen ein wichtiger experimenteller Parameter. Die transversale und auch die halbseitig axiale Anfangsgeschwindigkeit der hauptsächlich neutralen Matrixmoleküle, wird als durch eine Maxwell-Verteilung beschreibbar angenommen. Die experimentell ermittelten Daten lassen sich dabei im Falle der transversalen Geschwindigkeitskomponenten mit zweiseitigen und im Falle der einseitig axialen Komponente mit einer einseitigen Gaussverteilung nähern. Die in Experimenten ermittelte Anfangsgeschwindigkeitsverteilung der Analyte zeigt transversal, im Vergleich zur axialen Komponente, eine deutlich niedrigere Spreizung [173]. Weiterhin



wird deutlich, daß die axiale Verteilung aus zwei Komponenten besteht, aus einer langsamen und zusätzlich aus einer schnellen, also insgesamt eher zweigipflig ist. Die geladenen Analytgasteilchen scheinen aber hauptsächlich in einem zentralen Bereich um die optische Achse zu expandieren. Bereits frühzeitig ist deshalb für die in axialer Richtung ablaufende Bewegung, eine Beschreibung als hydrodynamischer Fluss bzw. Jet ins Auge gefasst worden [163]. Hierbei sollte die Analytgeschwindigkeit durch die im hohen Überschuss vorhandene Matrix und ihre axiale Komponente dann direkt beeinflusst werden und folglich nahezu unabhängig von der Analytmasse werden. Eine direkte Vergleichbarkeit mit Molekularstrahlen wird aber aufgrund der geringen Zeitskala während einer Extraktion und Strahlbildung ( $t < 10^{-7}$  s) von einigen Wissenschaftlern in Frage gestellt. Zur Ausbildung eines Molekularjets werden i.d.R. Zeiten im Millisekundenbereich ( $10^{-3}$  s) erwartet [11] [174]. In gasdynamischen Simulationen unter zunächst isentropen Jet-Bedingungen konnte die Matrixexpansion dennoch in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen aus realen Experimenten gebracht werden. Berechnungen für größere biologische Analytionen (Peptide) zeigen dagegen deutlich schlechtere Übereinstimmungen mit den experimentellen Daten [173] [175].

### Simulation

Knochenmuss hat unter der Modellannahme des in zwei Schritten ablaufenden Exciton-Pooling (Energy-Pooling) mit dem letzten Schritt der (primären) Ionenbildung (der Matrix):

$$\frac{d[ \text{Ionen} ]}{dt} = k_{therm}[ S_n ] + D k_{1n}[ S_1 ] [ S_n ] - D k_{10}[ \text{Ionen} ] \quad (3.22)$$

$$k_{therm} = 9 \cdot 10^{15} \cdot e^{(E_{(S_1)} - IP)/kT} \quad (3.23)$$

sowie einer sich unmittelbar daraus einstellenden quasi Gleichgewichtsdesorption (Arrhenius-Form), die in der weiteren Strahlbildung letztlich zu einer Überschallstrahllexpansion führt, ein quantitatives Modell der primären Ionisierung der MALDI-Matrix 2,5-DHB aufgestellt. Im wesentlichen beschreibt es die Ionisierung nach den aus [176] bekannten Ratengleichungen und die Expansion nach den *isentropen* numerischen Simulationen die u.a. in [175] und [173] verwendet werden. In den obigen Gleichungen entsprechen  $D$  der Anzahl der *nächsten Nachbarn*,  $E_{(S_1)}$  der Energie des  $S_1$ -Zustandes und  $IP$  dem (ersten) Ionisierungspotential der Matrix [148]. Die Plume wird dabei (vereinfacht) als ideales Gas aus Matrixmolekülen mit einem Isentropenexponent  $\gamma = \frac{C_p}{C_v} = 1.05$  (konstanter adiabatischer Index<sup>27</sup>) angenommen. Die Randbedingungen der Expansion sind gegeben durch das Verhältnis  $X$ , aus linearer Expansionsstrecke  $x$  zum Durchmesser  $d$  der Extraktionsfläche, der Machzahl  $M$ , der Schallgeschwindigkeit im Plume  $v_s$  und dem aktuellen Druck  $P$  eines Volumenelementes im Verhältnis zum Restgasdruck im Spektrometer  $P_0$ . Die Extraktionsfläche wird wesentlich durch das auf die Probe treffende Querschnittsprofil des Lasers bestimmt:

$$X = \frac{x}{d} \quad (3.24)$$

$$M = c - ae^{-AX} - be^{-BX} \quad (3.25)$$

$$v_s = \sqrt{\frac{\gamma R T}{(MW)}} \quad (3.26)$$

$$\frac{P}{P_0} = \left(1 + \frac{\gamma}{\gamma - 1} M^2\right)^{-\gamma/\gamma - 1} \quad (3.27)$$

<sup>27</sup>Über die Schallgeschwindigkeit im Medium ermittelbar.



Die Endgeschwindigkeit ( $v(X) = M \cdot v_s$ ) der Ionen ergibt sich aus dem Produkt der (statischen) Machzahl  $M$  und der Schallgeschwindigkeit  $v_s$  in einem Gas mit Teilchen eines Molekulargewichts  $MW$ . Die Temperatur ist in diesem Fall ein komplexer Wert, da sich während der Expansion kein Gleichgewichtszustand einstellt und die Freiheitsgrade der Teilchen (Translation, Rotation, Vibration) unterschiedliche Temperaturen besitzen können<sup>28</sup>. In den obigen Gleichungen entspricht  $T \geq T_{sub}$  der Temperatur der Translation und  $R$  ist die allgemeine Gaskonstante. Die Konstanten (a,b,c,A,B) zur Interpolation der Machzahl sind Fitparameter [148]<sup>29</sup>. Die Machzahl ist per Definition das dimensionslose Verhältnis der Strömungsgeschwindigkeit zur temperaturabhängigen Schallgeschwindigkeit im betrachteten Medium. Bei einer Machzahl  $M > 1$  liegt eine *Überschallgeschwindigkeit* vor<sup>30</sup>. Die Momentangeschwindigkeit ( $v_x$ ) der expandierenden Teilchen erlangt asymptotisch ihre Endgeschwindigkeit. Erst bei Erreichen der Endgeschwindigkeit wird die Machzahl statisch und die Expansion geht in eine (nicht-isentrope) Expansion über. Wenn die relative Strömungsgeschwindigkeit genau der Schallgeschwindigkeit entspricht ( $M = 1$ ) nehmen die Zustandswerte kritische Werte an und die (kritische) Machzahl hängt dann nur vom (bekannten) Expansionsverhältnis ( $p/p_0$ ) ab, d.h. die kritische Strömungsgeschwindigkeit kann daraus berechnet werden<sup>31</sup>. Die mit den Simulationen ermittelten Endgeschwindigkeiten für 2,5-DHB Ionen entsprechen dabei in etwa Spitzenwerten aus experimentellen Ergebnissen der Initialgeschwindigkeitsermittlung (einer folgenden elektrostatischen Beschleunigung) für 2,5-DHB Ionen, die anhand der Feldfreimethode ermittelt werden können,  $v_{end} \approx 1200 \text{ ms}^{-1}$ . Sie übertreffen deutlich die anhand der DE-Methode ermittelten Initialgeschwindigkeiten für 2,5-DHB Ionen, die z.B. in [144] mit ca.  $v_{ini} \approx 543 \text{ ms}^{-1}$  angegeben wird (Voyager DE,  $\lambda = 337 \text{ nm}$ ,  $\tau = 3 \text{ ns}$ ,  $U_{acc} = 25 \text{ kV}$ ). Das Modell zeigt gegenüber MD-Simulationen zu niedrige Beschleunigungen für geringe Werte  $X=x/d$ . Entsprechende Anpassungen des Parameters A führen zu höheren Beschleunigungen, ohne dabei wesentlich die erreichte Endgeschwindigkeit zu beeinflussen. Das Modell legt nahe, daß eine Schwellbestrahlung in erster Linie von der Desorption und nicht von der Ionisierung bestimmt wird.

Die Hauptbeschleunigung erfolgt in der Simulation während der ersten 5 ns nach der Desorption ( $\tau = 4 \text{ ns}$ ,  $\lambda = 355 \text{ nm}$ ,  $H_{th} = 20 \text{ mJ/cm}^2$ ), die gesamte Simulation erreicht nach etwa 30 ns bis 40 ns Geschwindigkeiten, die mit experimentellen Werten verglichen werden können. Es werden dabei Höchsttemperaturen an der Probenoberfläche ( $d=0.1 \text{ mm}$  bis  $d=0.5 \text{ mm}$ ) von  $T_{surf} = 525 \text{ K}$  bis  $T_{surf} = 550 \text{ K}$  angenommen. Ab einer Temperatur von  $T = 450 \text{ K}$  setzt eine Gleichgewichtsdesorption ein. Die Absorptionsquerschnitte der 2,5-DHB Matrixmoleküle in den Zuständen  $S_0$ ,  $S_1$  sind wellenlängenabhängig. Für die Wellenlänge  $\lambda = 337 \text{ nm}$  sind sie um etwa das Siebenfache größer, als für die Wellenlänge  $\lambda = 355 \text{ nm}$  (d.h. cross section  $\lambda=337\text{nm} \approx 7 \times$  cross section  $\lambda=355\text{nm}$ ) [148]. In [164] wird das Modell auf die primäre Analytisationierung in der Gasphase erweitert.

Eine Computersimulation (*molecular dynamics*, MD) mit Modellannahmen die ebenfalls kein Gleichgewicht voraussetzt, basiert auf dem Verfahren der *Monte-Carlo-Integration* (MCM). Es werden dabei quasi Ensemble-Bedingungen für Molekülgruppen bzw. Cluster im Zusammenhang mit einer *Layer-by-Layer Phasexplosion* (Clusterablation) angenommen [2]. Diese Modelle zeigen höhere Beschleunigung-

<sup>28</sup>Die Wirkungsquerschnitte der Matrixmoleküle zur Umwandlung von Schwingungs- in Translationsbewegungen und Schwingungs- in Rotationsbewegungen sind i.d.R. niedriger als der Wirkungsquerschnitt zur Umwandlung von Rotations- in Translationsbewegungen.

<sup>29</sup>Die gewählten Parameter in [148] sind A=1.5, B=0.4282, a=1.489, b=3.036, c=6.982.

<sup>30</sup>Bei der Ausbildung von Molekularstrahlen aus einem Hochdruckreservoir wird im allgemeinen von Überschallstrahlen gesprochen, wenn die mittlere freie Weglänge der Teilchen im Reservoir geringer ist, als der Durchmesser der Einlassdüse in den Hochvakuumbereich. Strahlen mit einer Machzahl  $M < 1$  werden i.d.R. als *effusive* Strahlen bezeichnet.

<sup>31</sup>Exemplarisches Vorgehen z.B. in [288]

gen. In [177] wird die Zweischritt Energy-Pooling Primärionisation der Matrix 2,5-DHB dann mit einer MD-Simulation gekoppelt. Diese setzt nur Annahmen über interatomare Wechselwirkungen voraus und benötigt dabei keinerlei Spezifikation des zugrundeliegenden initialen physikalischen Prozesses. Den eher thermodynamischen Überlegungen zu der Expansion und den Reaktionswahrscheinlichkeiten, die in der modulierten Gasexpansion ablaufen, müssen zusätzlich noch die Unterschiede in der Ausbreitung von Ionen, im Vergleich zu Neutralteilchen während der Propagation im elektrostatischen Feld hinzugerechnet werden. Die Unterschiede bestehen in erster Linie in der prompten oder verzögerten (DE) Beschleunigung der Ladungsträger sowie einer möglichen Coulombabstossung und eintretenden Raumladungseffekten in dichten Strahlbereichen. Eine Berücksichtigung in entsprechenden Modellen ist explizit aber sehr schwierig, da die Parameter der Randbedingungen einer Simulation dann selbst zeitveränderliche Variablen werden. Eine Näherung an reale Trajektorien expansionsüberlagerter Einzelionen in elektrostatischen Ionenquellen ist deshalb immer stark idealisiert [166].

Die bei einer Überschallstrahlexpansion zu erwartenden initialen Geschwindigkeiten von Matrix- und Analytationen konnten in mehreren unabhängigen Experimenten ermittelt werden. Insgesamt ist in der Literatur aber eine große Differenz in den einzelnen Ergebnissen feststellbar. Es zeigt sich eine Spanne von ca.  $v_{ini} = 200 \text{ ms}^{-1}$  bis  $2000 \text{ ms}^{-1}$  [1]. Einerseits kann man die erhaltenen Unterschiede, zumindest teilweise, auf die abweichenden Absorptionskoeffizienten der verwendeten Matrices bei nicht identischen Laserwellenlängen zurückführen, andererseits kann die große Streuung der experimentellen Werte identischer Analyte und Matrices, auf die im Detail unterschiedlichen apparativen Messvoraussetzungen in den Spektrometern bzw. die abweichenden Messverfahren zurückführbar sein (Feldfreimethode, DE-Methode, Postionisierung). Unterschiedliche Messverfahren gewichten die einzelnen Bereiche einer Populationsverteilung im Messprozess nicht gleich ( $\rightarrow$  DE-Methode, Feldfreimethode) [1] [177]. Die Größenordnungen der initialen Ionengeschwindigkeiten, die aus der DE-Methode ermittelt werden können, werden mittlerweile als die realistischeren Geschwindigkeiten angenommen [8]. In diesem Zusammenhang ist auch die Bedeutung des Lasereinstrahlwinkels ( $\theta$ ) bzw. die des Fokussierungsgrades der Strahlung auf die Geschwindigkeitsverteilung und die richtungsbezogene Ionenausbeute bei UV-MALDI Anwendungen untersucht worden [144] [167] [173] [174] [178] [179].

Die initiale axiale Endgeschwindigkeit kann aufgrund der jetähnlichen Expansion der Matrix als nahezu masseunabhängig angesehen werden, wobei die initiale kinetische Energie  $K$  in erster Näherung linear mit der Ionenmasse ansteigt ( $K = 0.5 \text{ mv}^2$ ). Die Wahl der Matrix und die Bestrahlung haben dadurch einen deutlich stärkeren Einfluss auf die initiale Geschwindigkeit der Analyte, als deren Molekularmasse. Die Initialgeschwindigkeit ist aber durchaus von der chemischen Struktur der Analytmoleküle bzw. von ihren physikalischen Wechselwirkungen, die während der Desorption/Ionisation stattfinden, beeinflussbar. Die initiale kinetische Energie kann durch die Desorption mit UV-Laserpulsen (nahes UV) Werte erreichen, die in der Größenordnung von  $K \approx 10^2 \text{ eV}$  oder höher liegen. Dies entspricht in etwa der oberen Grenze der Energie (Stossenergie im weiteren Sinne), die in Low Energy CID-Experimenten mit Peptiden verwendet wird (zum Vergleich: High Energy CID,  $E \geq 1 \text{ keV}$  bis  $3 \text{ keV}$  bzw. mit Lipiden bis zu  $E \approx 20 \text{ keV}$  [180]). Die Bestrahlung bzw. der Fokussierungsgrad des Lasers besitzt dabei einen messbaren Einfluss auf die initiale axiale Ionengeschwindigkeit, wohingegen unterschiedliche UV-Laserpulsdauern (nahes UV), zumindest in entsprechenden Simulationen, keinen wesentlichen Einfluss auf die initiale Geschwindigkeit zeigen. Die experimentellen Ergebnisse hinsichtlich der Anfangsgeschwindigkeit bzw. ihrer Verteilung, werden dabei wesentlich durch neuere MD-Simulationen mit realistischen UV-MALDI-Laserpulsdauern im *thermal confinement*-Bereich ( $\tau=3 \text{ ns}$ ,  $\lambda=355 \text{ nm}$ ) in [177] bestätigt.

### Fazit

Eine gezielte Beeinflussung der einsetzenden Desorption/Ablation und auch der primären Ionisierung der Matrix muss über die zwei skalaren physikalischen Größen, zum einen die *Temperatur* und zum anderen über die insgesamt in der Probe deponierte Energie erfolgen. Eine Gleichgewichtsdesorption alleine reicht nicht aus, um die experimentell ermittelten Ionenströme (intakter positiver Analytmolekülionen) bei UV-MALDI-Experimenten mit Bestrahlungen, die über einer Schwellgrenze liegen und Laserpulsdauern im einstelligen Nanosekundenbereich verwenden, erklären zu können. Die direkte Energieeinkopplung, aufgrund resonanter Einphotonenabsorption an biologischen Molekülen tritt i.d.R. hinter dem „Matrixeffekt“ zurück, wodurch die i.d.R. geringe In-source-Fragmentierung von Analytmolekülen resultiert. Im Falle der Energieeinkopplung in einzelne Matrixmoleküle und deren primärer Ionisierung, ist aufgrund des relativ geringen Photonenflusses, der relativ niedrigen Photonenenergien und der typischen Dichte der Matrixkristalle ein nichtlinearer Prozess sehr wahrscheinlich. Dieser wiederum kann, bei der energetischen Lage der elektronischen Anregungszustände der meisten UV-Matrizes, für einzelne Moleküle nur aus einem kollektiven Vorgang heraus erklärt werden, dem sogenannten *Exciton-Pooling*. Aus diesem Prozess kann die primäre Ionisierung einzelner Matrixmoleküle erfolgen, die dann als einfachgeladene Radikalkationen vorliegen. Die freiwerdende Überschussenergie aus der Ionisierung kann weiterhin z.B. als Joule'sche Wärme abgeführt werden und so zu einer Temperaturerhöhung aller Bewegungen bzw. Freiheitsgrade der Teilchen (Translation, Rotation, Schwingung) beitragen. Insgesamt ist es sehr wahrscheinlich, daß bei höherer Bestrahlung eine Layer-by-Layer Phasenexplosion molekularer Aggregate einsetzt (Cluster). Einen wesentlichen Anteil an den in einem MALDI-Massenspektrum erhaltenen n-fach geladenen Ionenpezies ( $n \geq 1$ ) haben sehr wahrscheinlich aber auch Sekundärreaktionen in der Gasphase. Deren Ablauf scheint an AP-MALDI-Quellen, aufgrund der gegenüber einer Expansion und Strahlformung im Vakuum abweichenden Situation, besser beeinflussbar zu sein. Dies legt nahe, daß der Einfluss eines *collisional cooling*-Prozesses (stochastische Kühlung) in AP-MALDI-Quellen bislang sehr wahrscheinlich unterbewertet wurde. In Hochvakuum-MALDI-Quellen kommt es neben einer Kollisionskühlung während der Plumebildung i.d.R. auch zu einer adiabatischen Dämpfung im Verlauf der Strahlformung. Die Expansionscharakteristik der Analytionen ist dabei sehr wahrscheinlich jet-ähnlich.

## 3.2 Aufbau und Struktur nativer biologischer Proben

Jede *apparative* Untersuchungsmethode besitzt mehr oder weniger spezifische Besonderheiten, die unmittelbar die Menge der möglichen Untersuchungsobjekte einschränkt. Ist man in der Lage sein Untersuchungsobjekt (im weiteren Sinne) frei wählen zu können, kommt einem Experimentator dabei dann die Vielfalt in der belebten Natur entgegen. Diese Vielfalt ist in ihren Grundlagen konservativ und basiert i.d.R. auf dem Prinzip der Evolution. Eine wissenschaftliche Fragestellung, die mit einem für eine Untersuchungsmethode ungeeigneten „Objekt“ unlösbar ist, kann dann durchaus mit einem besser geeigneten „Objekt“ zufriedenstellend beantwortet werden. Eine treffende Aussage hierzu ist sinngemäß wiedergegeben [181]:

„Wahrscheinlich gibt es in der Gesamtheit aller lebenden Organismen für viele spezielle Probleme und Untersuchungsmethoden mindestens ein geeignetes Untersuchungsobjekt, das nahezu ideale Bedingungen aufweist. Die Schwierigkeit jedes Experimentators besteht jetzt lediglich darin, ein solches für seine Zwecke zu finden.“

Eine Gemeinsamkeit aller biologischen Organismen ist der *zelluläre* Aufbau (*Zelltheorie* von Schlei-

den und Schwann) [182]. Die Zelle gilt als kleinste autonome Einheit eigenständigen Lebens, nach den heute gültigen Definitionen bzw. auf der Grundlage aller (bislang) bekannten Organismen. Zur Erhaltung einer positiven Energiebilanz und eines nur in engen Grenzen variierenden Ordnungszustandes sind dabei strukturelle Abgrenzungen innerhalb jeder Zelle, in Eukaryonten sogenannte *Organellen*, und weiterhin auch gegen die äußere Umgebung notwendig (Zellmembrane). Eine *funktionelle* und *systematisch* begründete Gliederung der Organismen ist zunächst die Einteilung in *Prokaryonten* und *Eukaryonten*. Prokaryonten sind relativ einfach aufgebaute Organismen ohne echten Zellkern und geringer intrazellulärer Strukturierung. Eukaryonten zeichnen sich durch einen (echten) Zellkern aus und weisen zudem eine ausgeprägte Kompartimentierung auf. Sie sind in weitaus höherem Maße als Prokaryonten zu einer speziellen Zelldifferenzierung und einem Zusammenschluss zu funktionellen Einheiten in der Lage (z.B. Gewebe). Prokaryonten neigen dagegen eher zur Koloniebildung (*cönozytische* Organisation) und symbiotischen Verbindungen mit mehrzelligen Organismen. Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit den massenspektrometrischen Untersuchungen ist im weiteren die Zellmembran, das sogenannte *Plasmalemma*. Sie bildet i.d.R. die extrazelluläre Oberfläche einer tierischen und menschlichen Zelle.

### 3.2.1 Eukaryotisches Plasmalemma

Der molekulare Aufbau und somit auch die Dicke einer tierischen Zellmembran ist vom jeweiligen Zelltyp abhängig und kann mitunter im intra- und interartlichen Vergleich erhebliche Unterschiede aufweisen. In der Regel beträgt die Zellmembrandicke aber zwischen 5 nm und 20 nm. Die Funktion der Zellmembran besteht in erster Linie darin, ein im thermodynamischen Verständnis offenes System zu schaffen, das es möglich macht die Summe der zum Leben gezählten Funktionen und Ordnungszustände im Stoff- und Energieaustausch mit der Umgebung aufrecht zu erhalten. Kybernetisch betrachtet ist die einzelne Zelle ein weitgehend autonomes Rückkopplungssystem, was immer dann besonders deutlich wird, wenn bei einem mehrzelligen Organismus einzelne Zellen entarten (Krankheitsbild Krebs). Diese dann potenziell unsterblichen Zellen ändern ihr „Verhalten“ und ignorieren Signale der Zellkommunikation. Ihre lokale Selbstorganisation ist i.d.R. auf Wachstum und Teilung beschränkt. Krebs stellt in Deutschland gegenwärtig die zweithäufigste Todesursache, hinter den Herz-Kreislaufkrankungen dar und bildet einen Schwerpunkt medizinischer/klinischer Forschung.

Vor allem im Bereich der Detektion qualitativer Veränderungen ubiquitärer Zellbestandteile einer entarteten Zelle, im direkten Vergleich zu einer gesunden Zelle, können die massenspektrometrischen *in situ* Analysemethoden einen Beitrag zum Erkenntnisgewinn leisten.

#### Zellzyklus

Man geht heute davon aus, daß Zellen ihre Lebenszeit in der Form mehrerer Stadien durchlaufen. Diese Stadien gehen ineinander über und werden als geschlossener *Zyklus* betrachtet. Alle wesentlichen *metabolen* chemischen Reaktionen auf zellulärer Ebene werden dabei mit spezifischen Prozessen, wie etwa dem der Vermehrung und/oder dem genetischen Austausch (je nach Zelltyp), in einem chronologisch gerichteten Ablauf angeordnet. Abbildung 3.5 zeigt eine schematische Übersicht der Zyklusbestandteile.

#### Zelladhäsion und Zell-Zellkontakte

Neben der äußeren Zellmembran ist für die mechanische Stabilität und die Bewegung von Zellen das Zytoskelett von enormer Bedeutung. Es besteht aus Proteinen (Actin, Myosin u.a.) und ist über integrale Membranproteine teilweise direkt mit der Zellmembran verbunden. Je nach Zusammensetzung und

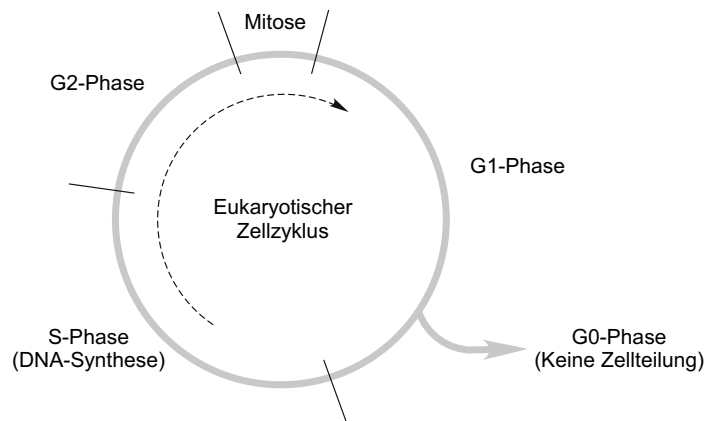


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des eukaryotischen Zellzyklus. Neben der *normalen* Zell- und Zellkernteilung (*Mitose*) unterscheidet man noch die Reife- oder Reproduktionsteilung (*Meiose*). Diese läuft in zwei Phasen ab (Meiose I = Reduktionsteilung, Meiose II = Äquationsteilung). Die 2. meiotische Teilung läuft ähnlich einer Mitoseteilung ab, wohingegen die 1. meiotische Teilung eine Reduktion der homologen Chromosomen zu haploiden Zellen mit doppeltem Chromosomensatz bedeutet.

Funktion wird i.d.R. zwischen Mikrofilamenten (hauptsächlich Aktin), Intermediärfilamenten und sogenannten Mikrotubuli (Tubulin) unterschieden. Die Adhäsion von Zellen an andere Zellen, Gewebe oder ein geeignetes Substrat wird unmittelbar über einzelne „Adhäsionszonen“ in der Membran vermittelt. Diese Adhäsionszonen werden von einzelnen Rezeptormolekülen (Zell-Adhäsions-Moleküle = Proteine) in der Zellmembran gebildet. Man geht heute davon aus, daß in einer eukaryotischen Zelloberfläche ca.  $10^4$  Adhäsionsmoleküle ausreichend sind, um alle erforderlichen Bewegungsabläufe zu ermöglichen. Die dabei unmittelbar am intermolekularen Kontakt wirksamen Kräfte sind meist Wasserstoffbrückenbindungen oder Salzbrücken. Ein Adhäsionsprozess kann im allgemeinen in zwei Phasen eingeteilt werden. In der ersten Phase separieren sich z.B. bei Zell-Zell-Kontakten Rezeptormoleküle und ihre entsprechenden Liganden im Gegenpart innerhalb der Plasmamembranbereiche und bilden so Bindungspaare aus. Die Liganden sind meist an Lipide gekoppelte zyklische Proteine/Peptide mit z.B. *Arginin-Glycin-Asparagin* Sequenzen enthaltenden Primärstrukturabschnitten. Diese lokalen Bereiche werden auch als Adhäsionsdomänen bezeichnet. In der zweiten Phase werden die Adhäsionsproteine der Membran über Kopplungen mit Actin des Zytoskelettes verknüpft und so stabilisiert. In diesem Falle wird manchmal auch der Begriff der „Mikromuskeln“ für ausgebildete Actinbündel verwendet. Bei den in Phase 2 ablaufenden biochemischen Reaktionen wird Energie verbraucht. Adhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecule*, CAM) sind z.B. Angehörige der Klasse der Cadherine (Zell-Zell-Kontakte, etc.), Immunglobuline und Integrine.

Im weiteren wird nur die äußere Zellmembran mit ihren unterschiedlichen Zell-Zellkontakten (morphologisch) betrachtet. Die Einheitsmembran (*unit membrane*) kann nach dem *Flüssig-Mosaik-Modell* als eine aus zwei gegensätzlich angeordneten Lagen von bipolaren Phospholipiden bestehende *Doppelschicht* angesehen werden [185]. Neben diesen Phospholipiden, Glykolipiden und Cholesterol sind auch Protei-



## Zellen und Micellen

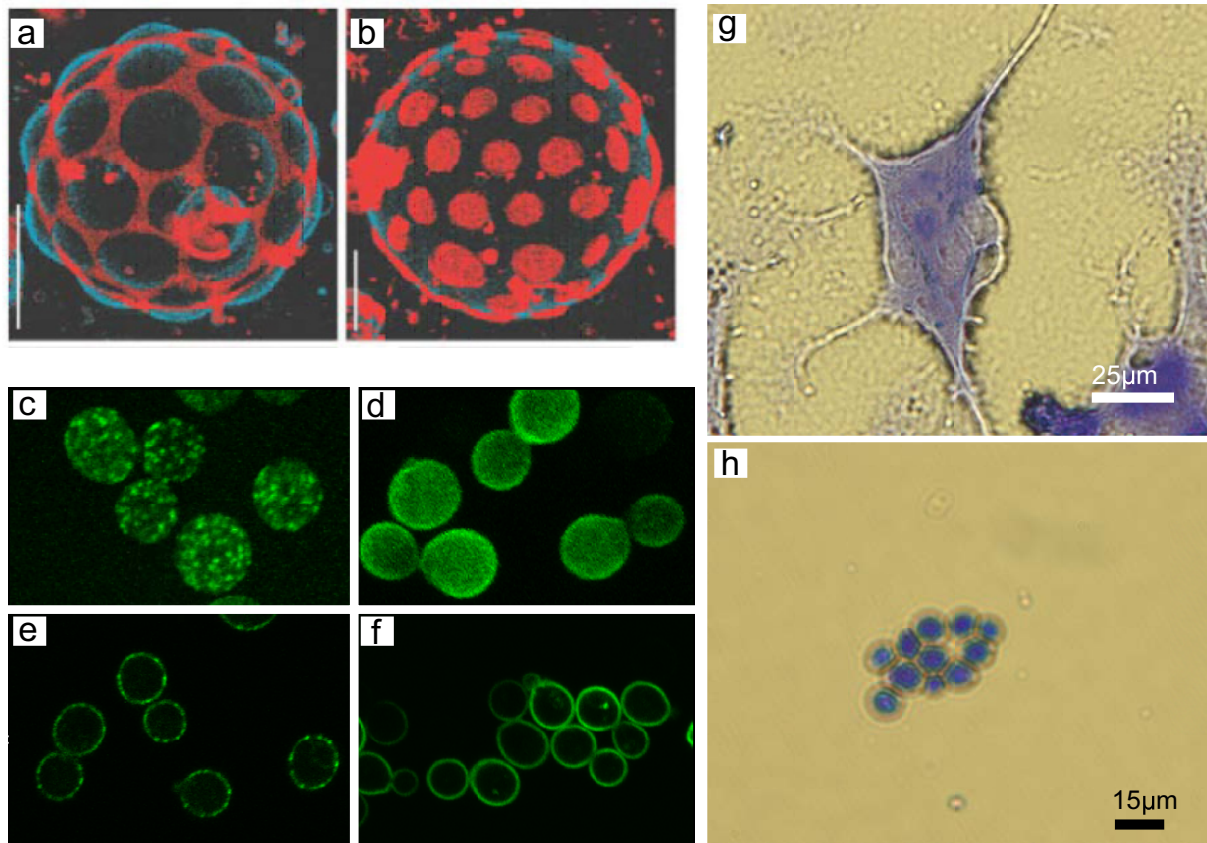


Abbildung 3.6: (a, b) Micellenbildung eines künstlichen Phospholipidmonolayers aus je drei Bestandteilen (a) Sphingomyelin : Dioleoylphosphatidylcholin : Cholesterol, 56 : 24 : 20; (b) 61.5 : 13.5 : 25. Blaue Bereiche: „Lipid ordered state“, rote Bereiche: „Lipid disordered state“. Die Abbildungen (a), (b) sind entnommen aus [183]. (c) - (f) Mit GFP markierte spezifische Proteine der Zellmembran einer Hefeart und konfokale Fluoreszenzmessungen unterschiedlicher optischer Schnitt Ebenen. Die Abbildungen (c) - (f) sind entnommen aus [184]. (g) Färbepreparat von HELA-Zellen. Die Zellen sind in Kultur auf Glasobjektträger aufgewachsen. Verwendet wurde der besonders in der Gelelektrophorese eingesetzte Proteinfarbstoff *Coomassie blue*. (h) Färbepreparat von Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) in Suspension, Farbstoff *Coomassie blue* [46].

ne bzw. Peptide, teils beide Membranlagen durchdringend oder aber an einer Membranseite angelagert enthalten. Nach diesem *Flüssig-Mosaik-Modell* existiert für biologische Membranen eine physiologische *Schmelztemperatur*, oberhalb derer sich die Anordnung der Lipidmoleküle untereinander und auch die Orientierung der einzelnen Lipidseitenketten zueinander ständig verändert. Die Membran wird dadurch im physiologisch aktiven Zustand in zwei Dimensionen flüssig. Lipide und Proteine sind dabei lateral beweglich, die grundsätzliche Membranstruktur bleibt erhalten, d.h. einzelne Lipide wechseln i.d.R. nicht zwischen den separaten Monolayern. Proteine/Peptide wechseln die Schichten i.d.R. nur unter Energieverbrauch. Das Zweischichtprinzip der biologischen Membran ist in verschiedenen Untersuchungen durch Vesikel bildende Lipide simuliert und nachgebildet worden. Es wird vermutet, daß die Zellmembran die Fähigkeit besitzt sogenannte *Überstrukturen* zu bilden. Diese stellen Areale mit hohem Anteil an Lipiden bzw. Rezeptorproteinen dar, die sich in bestimmter Weise anordnen und z.B. auch im Zusammenhang mit Adhäsionsprozessen die Membran falten können [183] [186] [187] [188]. Numerische Modelle zur Beschreibung von Membranundulationen, aufgrund thermischer Einflüsse, legen oft die von Helfrich aufgestellte

freie Krümmungsenergie<sup>32</sup> für kleine Deformationen zu Grunde [189] [190]:

$$H = \frac{K_c}{2} \int dx dy (\nabla^2 h(x, y))^2 \quad (3.28)$$

$$= \frac{K_c}{2L^2} \sum k^4 |h_k|^2 \quad (3.29)$$

Mit der Auslenkung  $h(x, y)$  der Membranebene von der Null-Energie-Konfiguration im Ortsraum. Mit  $K_c$  dem Biegemodul,  $L$  der Längendimension der betrachteten Membranfläche und den Wellenvektoren  $k$  im Fourierraum ( $h_k = \int dx dy e^{-ikr} h(r)$ ). Eine Betrachtung als Fouriertransformation wird notwendig, da alle möglichen  $h_k$  unabhängig voneinander auftreten und überlagern können [191]. Membranundulationen beeinflussen die (laterale) Proteinbeweglichkeit in der Membran, können aber auch durch diese hervorgerufen werden. Membranbewegungen im Zusammenhang mit der Zelladhäsion sind prinzipiell bereits weitestgehend verstanden. Eine rigorose (mathematische) Beschreibung ist allerdings nur ansatzweise vorhanden. Ein bekannter Ansatz ist die Kombination des Modells der *elastischen Schalen* mit thermodynamischen Betrachtungen von Mischungen, für den Spezialfall homogener Adhäsion mittels Rezeptoren ohne Abstandshalter (Glykoproteine, Polysaccharide). Ein Übersichtsartikel hierzu ist z.B. [192]. Einige Proteine/Peptide in der Membran fungieren als sogenannte *Membrankanäle*, *Rezeptoren* oder *Carrier* und regeln aktiv (unter Energieverbrauch) oder passiv den Stoff- bzw. Ionenaustausch mit der Umgebung und oft auch Bewegungen einer Zelle. Teilweise handelt es sich bei Membranproteinen aber auch um Enzyme. Für einige lipophile kleine Moleküle und physikalisch gelöste Gase wie  $CO_2$ <sup>33</sup> sind die meisten Zellmembrane durchlässig. Für Wasser, Ionen mit Hydrathülle und Zuckermoleküle dagegen i.d.R. nicht. Diese Funktionalität wird im allgemeinen mit der Bezeichnung *semipermeabel* umschrieben [193].

Der Masseanteil von Lipiden und Proteinen in einer Zellmembran (Trockenmasse) kann von einem Verhältnis 1 : 5 in einigen Epithelzellen bis zu 5 : 1 in den elektrisch isolierenden *Myelinscheiden* der „markhaltigen“ Nervenfasern schwanken. In den meisten tierischen Zellmembranen beträgt das Lipid-zu-Protein Verhältnis aber in etwa 1 : 1. Extrazellulär bildet die *Glycocalyx* als dünne Schicht von Polysaccharidseitenketten der Glykoproteine und Glykolipide (*cell coat*; 2.5 nm bis 5 nm) ein *genetisch* festgelegtes und fortlaufend nachgebildetes art- und zellspezifisches Erkennungsschild, als Basis für die Gewebebildung und das Immunsystem eines mehrzelligen Organismus aus. Die Zellmembran umschließt damit den Zellkörper in dem sich das *Cytosol* mit dem *Zytoskelett*, die *Organellen* und der Zellkern (*Perikaryon*) befinden. Die Zellmembran kann eine zelltypspezifische Gestalt annehmen. Sie kann entweder mehr oder weniger glatt bzw. straff oder mit Ein- und Ausstülpungen (*Mikrovilli*, *Kutikularsaum*, *Bürstensaum*) versehen sein. Ihre molekulare Zusammensetzung ist auf jeden Fall nicht statisch, sondern unterliegt ständigen Veränderungen (Umbau, Aufbau, Abbau). Diese hängen mit der Funktion der Zelle aber auch den Umgebungsbedingungen zusammen. Zellmembrane können in einigen Zelltypen zur *elektrischen* Signalleitung fähig sein und/oder auf chemischem Wege an einem Informationsaustausch mit ihrer Umgebung teilnehmen (*Signaltransduktion*). Dabei werden Interaktionen zwischen einzelnen Zellen eines Gewebes häufig durch direkte Zell-Zell Kontakte (*junctions*) vermittelt [76].

Man unterscheidet häufig zwischen *Gap junctions*, *Tight junctions* und *Desmosomen*. *Tight junctions* bilden einen leistenförmigen Verschlusskontakt zwischen den Zellmembranen zweier benachbarter Zellen. Die Verbindung betrifft dabei die oberste (erste) Phospholipidschicht der beiden gegenüberliegenden Membrane. Der Interzellulärspalt ist an den Stellen der Verknüpfung unterbrochen (geschlossen),

<sup>32</sup>In der Form einer Hamiltonfunktion.

<sup>33</sup>Ungefähr 99% des  $CO_2$  liegen in Wasser unter Atmosphärendruck und physiologischen Temperaturen physikalisch gelöst vor.

was namensgebend für diesen Typ der Zell-Zell Kontakte ist. Die häufigste Ausprägung ist dabei die „gürtelförmige“ *Zonula occludens* die u.a. bei kubischen und prismatisch ausgebildeten Darmepithelzellen vorkommt. Möglich ist auch die Ausprägung als streifenförmiger Verschlusskontakt *Fascia occludens* oder wesentlich seltener als punktförmiger Verschlusskontakt *Macula occludens*. Diese Art der Zell-Zell Kontakte dient nicht der Kommunikation zwischen den benachbarten Zellen. Hauptsächlich ist hierbei ein Schritt zur Osmoregulation und zur Ausbildung einer *Zellpolarität* in einem Epithelgewebe von der (*basolateralen* zur *apikalen*) Seite zu sehen. Der *gap junction* (*Nexus*) Zell-Zell Kontakt ist dagegen ein „kommunizierender“ Kontakt (chemisch und/oder elektrisch). Der Interzellularspalt ist im Bereich dieses Kontaktes auf ca. 3 nm verkleinert aber immer noch durchlässig. Die Zellmembranen der benachbarten Zellen bilden im Bereich eines geschlossenen Kontaktes regelmäßig angeordnete Tunnelproteine<sup>34</sup> aus, die den Interzellularspalt an ihrer Kontaktstelle dabei verschliessen. Das Innere des so gebildeten Kanales ist ca. 1.5 nm breit und durchgängig für Moleküle bis zu einer Molekularmasse von ca. 1000 Da (glatte Muskelzellen, Herzmuskelzellen, Osteozyten). *Gap junctions* können innerhalb von Millisekunden von benachbarten Zellen ausgebildet werden. Das *Desmosom* (Haftplatte) kennzeichnet einen Zell-Zell Kontakt über den auch Teile des Zytoskelettes vom Inneren der Zelle beteiligt sind. Man unterscheidet dabei zwei Typen von *Desmosomen*. Das Typ-I-Desmosom bezieht *Tonofilamente* mit ein, das Typ-II-Desmosom dagegen *Actinfilamente* (Zytoskelett). Ein *Desmosom* setzt sich aus zwei *Halbdesmosomen* zusammen, je eines pro Zelle. Als Beispiel soll hier das *tonofilamentassoziierte Fleckdesmosom* etwas genauer beschrieben werden (Typ-I-Desmosom). Bei dieser Art *Desmosom* ist der Interzellularspalt (20 nm) etwas erweitert auf ca. 25 nm bis 45 nm. Aus dem Zellinneren jeder Zelle ziehen Filamentbündel in einen mit Zytoplasma verdichteten schmalen Bereich an die Zellmembran heran. Im elektronenmikroskopischen Bild entsteht der Eindruck einer Verankerung der Filamente in diesem Abschnitt. Der Interzellularspalt zwischen den beiden Halbdesmosomen ist mit einer „Kittsubstanz“ aus Glycoproteinen angefüllt. Besonders ausgeprägt ist dies bei Plattenepithelien auch lichtmikroskopisch als „Knötchenbildung“ zu erkennen. Ein weiterhin vorkommender Zustand wird *junctional complex* (Haftkomplex) genannt und bezeichnet das gemeinsame Auftreten von *zonula occludens*, *zonula adhaerens* und *macula adhaerens*. Dieser Haftkomplex ist häufig bei prismatischen Epithelzellen ausgebildet.

Es bleibt festzuhalten, daß die Zellen in tierischem (und menschlichem) Gewebe durch bestimmte molekulare Strukturen miteinander verbunden sein können, die über Zellmembrane vermittelt werden. Die strukturbildenden Hauptbestandteile der Zellmembrane sind Phospholipide und Proteine. Diese sind teilweise mit anderen Molekülen wie z.B. Kohlenhydraten modifiziert. Abbildung 3.6 stellt einzelne (künstliche) Micellen mit Aggregationsmerkmalen, gefärbte Hefezellen und HELA-Zellen dar. Abbildung 3.7 zeigt den besonderen Aufbau der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit Zellwand und Zellmembran.

## Glycane

Glycane kommen in unterschiedlichen Formen vor (N-Glycane, O-Glycane, Glycolipide). Bei den strukturbildenden Glycanen handelt es sich überwiegend um Poly-Hexosen. Es ist möglich die Zusammensetzung komplexer Glycane (Strukturisomere) analytisch zu bestimmen. Strukturbildende Oligosaccharide treten als N-Glycane (N-acetylglucosamine, GlcNAc), O-Glycane oder im Verbund mit Phosphatidylinositol (Glycosyl-Phosphatidylinositol), gebunden an Proteine auf. Allen N-Glycanen ist dabei ein Kernbereich, bestehend aus drei Mannose- und zwei GlcNAc-Einheiten gemein. Teilweise wird auch eine Fucose-Einheit gefunden. Außerhalb dieses Kernbereiches können zwei bzw. drei Verzweigungen (Antennen) fortgesetzt

<sup>34</sup>Als Testpeptid mit „Kanalfunktion“ für monovalente Kationen in biologischen Membranen kann das Antibiotikum Gramicidin eingesetzt werden (Gramicidin A, B, C und S).



werden, die Neuraminsäureeinheiten enthalten. Bei den O-Glycanen ist kein vergleichbarer Konsensbereich in den auftretenden Primärstrukturen zu finden. N-Glycane mit acider Neuraminsäure-Einheit (NeuAc) kommen in positiven MALDI-Spektren als Quasimolekülion mit mehreren Kationen vor, neutrale Glucane i.d.R. überwiegend nur als Natriumaddukt. Besonders häufig in Säugetierzellmembranen ist dabei Neu5Ac ( $C_{11}H_{17}N_1O_8$ ). Für Oligosaccharide besteht, wie für Peptide und Lipide, eine Nomenklatur der Fragmentionen - hier nach Domon und Costello [8] (Kapitel 6).

### Lipide

Eine durchschnittliche tierische (und humane) Zellmembran besteht aus ca.  $10^9$  bis  $10^{10}$  Lipidmolekülen [196]. Diese können sich aus  $H^{35} \leq 100$ , nach chemischen und/oder physikalischen Kriterien, unterscheidbaren Lipidarten zusammensetzen. Die häufigsten Vertreter sind dabei PC (Phosphatidylcholine), PE (Phosphatidylethanolamine), SM (Sphingomyeline) und Cholesterin (Sterine). Der überwiegende Anteil an PC und PE sind Diacylglyceride (*phosphoric-acid-diester*). Es kommen weiterhin auch Anteile von sogenannten Plasmalogenen vor, die dabei ca.  $70\% \geq P \geq 10\%$  der jeweiligen Lipidklasse betragen können. Hierbei handelt es sich um Etherlipide (PC, PE), die eine der beiden Fettsäureketten über eine Vinyl-Ether-Bindung ausbilden. Diese Kette ist dann i.d.R. gesättigt (16:0, 18:0 aber auch 18:1), wohingegen die zweite Kette dann sehr häufig mehrfach ungesättigt vorliegt (18:1, 20:1, 20:4, 22:4, 22:6) [194]. Bei PC sind außerdem Methylierungen und ggf. Cyclisierungen anzutreffen. Die (für Vertebraten) häufigsten Fettsäuren sind die Ölsäure (Oleic acid) und die Arachidonsäure (Arachidic acid) (siehe Tab. 3.2).

Geht man größenordnungsmäßig bei dem Molekulargewicht eines durchschnittlichen Membranlipides (Phospholipid) von ca.  $M_r \leq 1$  kDa aus und bei einem durchschnittlichen Membranprotein von ca.  $M_r = 100$  kDa<sup>36</sup>, dann erhält man bei einem angenommenen Masseverhältnis von 1:1, eine im Vergleich zur Lipidanzahl um zwei Zehnerpotenzen geringere absolute Anzahl an Membranproteinen. Durchschnittlich also zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Proteinmoleküle. Berücksichtigt man dabei die Masse bereits bekannter *ubiquitärer* Membranproteine und Lipide, so sind eher im Mittel noch größere Differenzen zu erwarten. Obwohl das Masseverhältnis durchaus gleich sein kann, besteht also meist bei einer durchschnittlichen Zellmembran ein großer Überschuss an Lipidmolekülen aus zum Teil unterschiedlichen Substanzklassen. Das wirkt sich u.a. in der MALDI-Massenspektrometrie auf die Darstellbarkeit von Proteinen und Peptiden aus nativen biologischen Proben aus. Zum einen besteht die Möglichkeit der Micellenbildung während der Laserdesorption z.B. an Überstrukturen. Andererseits kann es zu einer direkten Konkurrenzsituation bei der Ladungsübertragung während der sekundären Ionisierung in der Gasphase, zwischen Peptiden und Lipiden kommen.

### Peptide

Unter methodischen Gesichtspunkten besonders interessant sind für die bildgebende Massenspektrometrie kleine Peptide mit einer Molekularmasse von ca.  $M_r < 2$  kDa, bei denen eine unmittelbare Identifizierung bzw. eine Identifizierung, anhand weniger  $MS^n$ -Experimente möglich ist. Solche Peptide werden in ausreichender Menge hauptsächlich durch spezielle Zellen sezerniert und üben dann oft Funktionen im Rahmen der Signaltransduktion oder ähnlicher Prozesse aus (Peptidhormone etc.) [185]. Peptide dieser Größe kommen aber auch in Zellmembranen vor. Einige von ihnen sind als sogenannte *Ionophore* (Kanäle) und/oder *Carrier* (Transportermoleküle) in den Membranen enthalten. Sie transportieren oder

<sup>35</sup>H = absolute Häufigkeit.

<sup>36</sup>Zum Beispiel das membranassoziierte Protein S171, Protein numb homolog (P49757, NUMB-HUMAN), 651As,  $M_r=70.804$  kDa in radialen Gliazellen.

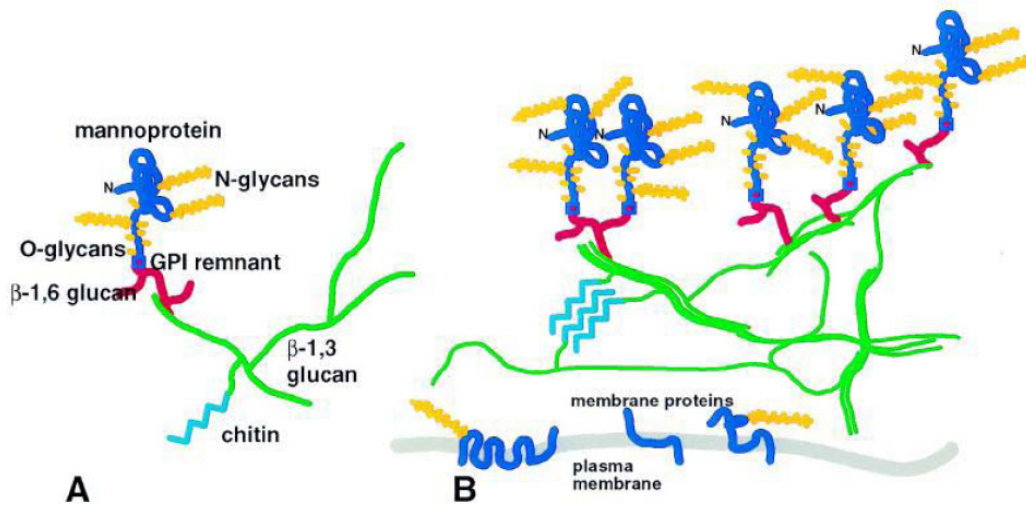
Zellwandaufbau der Hefe *S.cerevisiae*

Abbildung 3.7: Schematischer Zellwandaufbau der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Abbildung entnommen aus [195]. *Saccharomyces cerevisiae* ist ein Vertreter der *Ascomyceten* (Schlauchpilze). Die Familie der *Saccharomycetaceae* wird als die eigentlichen Hefen bezeichnet. Diese Hefen bilden kein *Myzel* aus. Die industriell genutzten Bäcker- und Bierhefen sind physiologische Rassen von *S. cerevisiae* mit meist *diploidem* oder *polyploidem* Genom. Die haploiden Zellen können verschmelzen und nach der *Karyogamie* die *Meiose* und Bildung von vier *Ascosporen* einleiten. Die diploide Zelle ist ebenfalls durch *Sprossung* vermehrungsfähig. Sie ist in der Regel größer und stoffwechselaktiver als die *haploide* Zelle. Die Größe einer Hefezelle liegt zwischen  $5\ \mu\text{m}$  und  $13\ \mu\text{m}$ . Das haploide Genom von *S. cerevisiae* hat ungefähr den dreifachen Umfang des Genomes von *Escherichia coli* und besteht aus 16 Chromosomen (linear, von je 200 kb bis 2200 kb). Die Verdopplungszeit von *S. cerevisiae* beträgt ca. 90 Minuten. *S. cerevisiae* ist *fakultativ anaerob* und wächst bei Temperaturen zwischen  $20^\circ\text{C}$  bis  $30^\circ\text{C}$  am besten. Das pH-Optimum liegt bei  $\text{pH} = 4,5$  und  $\text{pH} = 6,5$ . Toleranz wird in einem Bereich von  $\text{pH} = 3$  bis  $\text{pH} = 8$  angetroffen. *S. cerevisiae* ist ein Modellorganismus für molekulargenetische Fragestellungen an eukaryotischen Mikroorganismen geworden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen lassen ein Zellwandvolumen von 25% bis zu 50% des Gesamtvolumens annehmen. Die Zellwand hat dabei einen Durchmesser von ungefähr 200nm und macht ca. 15% bis 20% der Trockenmasse aus. Sie hält einem Innendruck von bis zu 15 bar stand. Ihre Funktionen werden zum Teil von ihren physikalischen Eigenschaften abgeleitet, sind aber nicht nur auf diese begrenzt. Weiterhin wird durch die Zellwand osmotische Stabilität vermittelt. Sie kann Kationen binden und die Zell-Zellerkennung vermitteln. Wie auch die Zellmembran, so ist auch die Zellwand der Hefe nicht statisch. Sie kann während Zellzyklusübergängen, Wachstumsphasen und bei veränderten Umgebungsbedingungen umgebaut und an Veränderungen angepasst werden. 85%-90% der Trockenmasse der Zellwand sind Polysaccharide, davon 50%-55% 1,3- $\beta$ -D-Glucane und 5%-10% 1,6- $\beta$ -D-Glucane. 10%-15% der Zellwandtrockenmasse sind reine Proteine. Der Anteil der Mannoproteine von der Zellwandtrockenmasse beträgt ca. 35%-40%. Chitin ist zu ca. 2% enthalten. In noch geringeren Mengen sind weiterhin Glycogen, Lipide, Pigmente und anorganische Ionen vorhandene Bestandteile [198].

leiten dort Ionen oder polare Moleküle von einer Seite durch die Zellmembran. Bekannte Vertreter sind z.B. als *Antibiotika* für die Anwendung an Mensch und Tier zugelassen und beeinflussen gezielt die Osmoregulation von Prokaryonten bzw. infizierten Eukaryotenzellen. Das Molekulargewicht solcher Peptide beträgt oft weniger als 3 kDa. Ein Beispiel hierfür ist *Gramicidin* (Ionophor), das in unterschiedlichen Formen vorkommt. In der Variante S liegt es als *zyklisches* Decapeptid vor. Ein weiterer Vertreter dieser Antibiotika ist auch *Valinomycin* (Carrier), ein zyklisches Peptid aus 12 Aminosäuren, das *selektiv* Kaliumionen transportiert. Es wird von einigen Bakterienarten der Gattung *Streptomyces* produziert ( $\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{N}_6\text{O}_{18}$ ,  $M_r = 1111,32\ \text{g mol}^{-1}$ ).

Eine andere Möglichkeit, im weiteren Sinne, Peptide aus Zellmembranbestandteilen für massenspektrometrische Untersuchungen zugänglich zu machen, besteht in der enzymatischen Spaltung von Membranproteinen. Beide Ansätze werden in der aktuellen Forschung verfolgt [197].

## Kleine physiologisch wirksame Peptide

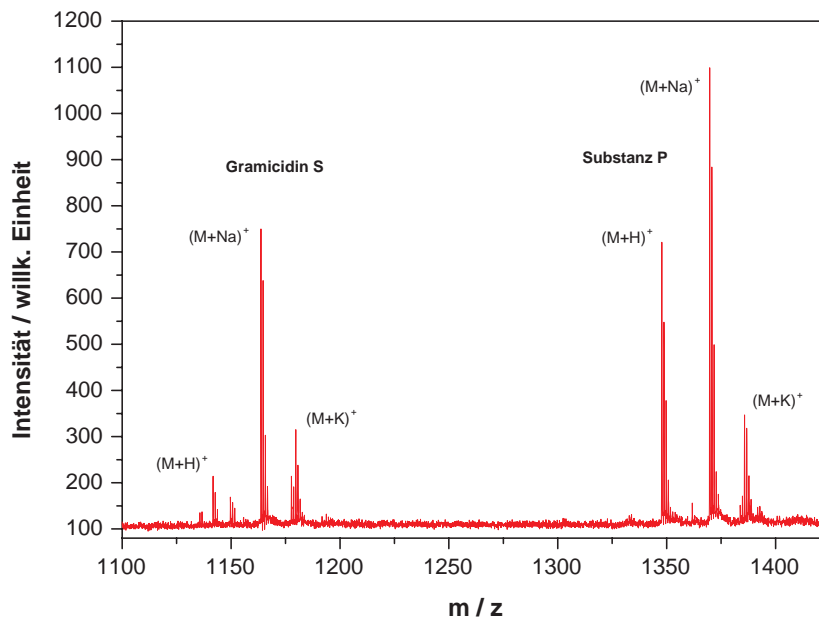


Abbildung 3.8: Gramicidin S (cyclisches Decapeptid) gemessen in äquimolaren Konzentrationen mit Substanz P (11 Aminosäuren). Dried droplet MALDI-Präparation aus hochreinen (HPLC) Lösungsmitteln bei gleichmäßiger Durchmischung der Probe. Laserwellenlänge  $\lambda = 337\text{nm}$ , Pulsdauer ca. 3ns, Multimodeprofil, Stickstofflaser. Polypeptid-Antibiotika haben in der Regel eine hohe Bindungsspezifität an Cytoplasmamembranen von Pro- und Eukaryonten. Aus Messungen an Modell-Lipidsystemen, d.h. Unilamellare Vesikel von *1-Palmitoyl-2-Oleoylphosphatidylcholin* und *1-Palmitoyl-2-Oleoylphosphatidylglycerol* sowie Mischungen davon mit und ohne Cholesterol, konnte die Bindungsaffinität von Gramicidin S an einen künstlichen Lipidmembranmonolayer bestimmt werden.  $\Delta G = -10.9$  bis  $-12.1\text{kcal/mol}$  (freie Bindungsenergie),  $\Delta H = 2.6$  bis  $4.4\text{kcal/mol}$  (endotherme Bindungsenthalpie) und  $T\Delta S = 13.4$  bis  $16.4\text{kcal/mol}$  ( $\Delta H = \Delta G + T\Delta S$ ) [199].

Besonders interessant ist im Zusammenhang mit massenspektrometrischen Imaging-Messungen dabei, ob sich ein in eine Zellmembran integriertes Peptid direkt darstellen läßt. Die zuvor genannten Peptide sind mittels LDI bzw. MALDI, anhand artifizieller Dried-droplet oder Spraypräparationen prinzipiell darstellbar (siehe Abbildung 3.8).

### Fragmentierungswahrscheinlichkeit bei Peptiden

Aufgrund der Ringstruktur dieser Peptide ist eine Vermessung aber auch hinsichtlich mechanistischer Überlegungen interessant. Das sogenannte RRKM-Modell (*Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus*) besagt, daß der Zerfall eines Moleküles unter bestimmten Voraussetzungen mit der Anzahl der Oszillatoren  $s^{37}$  zusammenhängt. Wird die in ein Molekül eingekoppelte Energie gleichmäßig auf alle Schwingungsmoden verteilt, dann erfolgt ein Zerfall in Abhängigkeit der Bindungsenergie  $E_0$  eines kritischen Oszillators (potenziell brechende Bindung) und der Frequenz der Oszillation  $\nu$ , wenn ein Verhältnis von der Anzahl eingekoppelter Energiequanten  $n > \text{Anzahl der Oszillatoren } s$  zutrifft, gemäß einer Ratengleichung mit der Zerfallskonstante  $k(E) = \nu \left( \frac{E-E_0}{E} \right)^{s-1}$  [200]. In der Regel ist ein solcher Ansatz zur theoretischen Bestimmung von Zerfallsraten geeignet, wohingegen zur praktischen Modellierung häufiger andere

<sup>37</sup>In diesem Fall = Anzahl chemischer Bindungen, bzw. Atome im Molekül.

Berechnungen bevorzugt werden [201]. Interessant ist, das im Rahmen von Untersuchungen mit sogenannten Thermometer-Molekülen (Benzyl-substituierte R-Benzylpyridin-Salze), anhand der entstehenden Fragmentierungsprodukte eine Kategorisierung der häufig verwendeten MALDI-Matrizes CA, SA und 2,5-DHB gefunden werden kann. Diese kehrt die zuvor beschriebene Einteilung in „heiße“ und „kalte“ Matrizes aber um [202] (siehe auch S.43 ff.).

Eine noch weitgehend unbeantwortete Frage ist, ob sich hinsichtlich der möglichen LDI-Vermessung z.B. von Gramicidin oder Valinomycin im Zusammenhang mit MALDI und einzelnen Präparationstechniken ein wesentlicher Unterschied im Fragmentierungsverhalten feststellen lässt, der ursächlich eindeutig auf Präparationsphänomene zurückgeführt werden kann.

### Zellgröße und Anzahl in mehrzelligen Organismen

Die durchschnittliche Zellgröße eines mehrzelligen (tierischen) Organismus ist unabhängig von der Größe des Organismus selbst. *Amphibien* z.B. besitzen durchweg relativ große Zellen. Die durchschnittliche Größe einer eukaryotischen tierischen Zelle korreliert dagegen sehr stark mit der Differenzierung im jeweiligen Organ und mit der biochemischen Leistungsfähigkeit. Die durchschnittliche Zellgröße kann bei mehrzelligen Tieren zwischen ca. 0.01 mm bis 0.2 mm im Durchmesser betragen, allerdings sind auch extreme Abweichungen z.B. in einer Dimension möglich, wie etwa bei Säugetierneuronen. Die Zellform richtet sich i.d.R. nach der Funktion und den physikalischen Umgebungsbedingungen. Bislang sind nur einige mehrzellige Organismen mit artspezifisch exakter (d.h. konstanter) Zellzahl bekannt z.B. das Rädertier (*Epiphanes senta*) mit genau 959 Zellkernen (Eutelie). Der adulte Mensch besitzt in etwa zwischen  $10^{13}$  und  $10^{14}$  Zellen (ohne Blutzellen). In der Regel gilt eine *Kern-Plasma-Relation* der Gestalt, daß große Zellen z.B. Eizellen (*Oocyten*) auch große Kerne besitzen. Funktionell bedingte Kernvergrößerungen treten in schnell proliferierenden Geweben, embryonalen Zellen aber auch in entarteten Zellen (Krebszellen) sowie in Zellen sehr stoffwechselaktiver Gewebe auf. Es ist bekannt, daß in einem mehrzelligen Organismus verschiedene Kerngrößeklassen anzutreffen sind. So bilden die relativen Kernvolumina in verschiedenen Zelltypen z.B. beim Menschen eine *geometrische* Reihe: 1 (kleine *Lymphocyten*), 2 (*Spermatiden*), 4, 8, 16 (*Hepatocyten*), 32, 64, 128 (*Spinalganglienzellen*) [203].

### 3.2.2 Gewebe

#### Definition und Struktur

*Gewebe* werden als Funktionseinheiten gleichartig differenzierter Zellen in einem mehrzelligen Verband verstanden. Neben dem eigentlichen Funktionsgewebe kommt noch sogenanntes *Bindegewebe* vor. Bindegewebe besitzt auch eine Funktion, diese hängt aber stark von seiner wechselnden chemischen Zusammensetzung und der physikalischen Beschaffenheit der einzelnen Bestandteile ab. Aufgrund dessen ist eine *einheitliche* Funktionsbeschreibung von Bindegewebe im allgemeinen schwierig und deshalb oft auf einzelne Gemeinsamkeiten begrenzt. Das zellige Binde- oder Stützgewebe der Wirbeltiere (*Mesenchym*) bildet sich während der Embryonalentwicklung zwischen den drei *Keimblättern* aus und beteiligt sich am Aufbau *aller* Organe. Mit dem Bindegewebe gelangen z.B. Nerven und Gefäße in die Organe. Es dient u.a. der *Stoffwechselregulation*, der *Osmoregulation* und der *Abwehr*. Aus dem Bindegewebe entstehen auch die Stützgewebe Knorpel und Knochen. Das „Bindegewebe“ besteht nur teilweise aus Zellen, überwiegend dagegen aus Interzellulärsubstanzen z.B. *Kollagen*, Elastin, Glycosaminoglykanen und Glykoproteinen. Kollagen ist dabei das häufigste Protein im Bindegewebe von Säugetieren und macht beim Menschen zwischen 25% und 35% der Gesamtproteinmasse aus. Man unterscheidet zwischen mehreren

Kollagentypen, auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll [76] [204].

Unter dem Begriff Typisierung wird vor allem im medizinischen Sprachgebrauch die genetisch determinierte molekulare Ausstattung (z.B. HLA-Moleküle) zur Erkennung von Eigengewebe im Rahmen der spezifischen Immunabwehr eines mehrzelligen Organismus verstanden. Diese kann dabei auf verschiedenen Ebenen (genetisch, proteinbiochemisch) erfolgen bzw. durchgeführt werden. Während einer massenspektrometrischen Analyse an nativen biologischen Proben, die zur Gewinnung von Übersichtsspektren erfolgt, steht zunächst die molekulare Zusammensetzung der Gewebe, abgrenzbarer Bereiche innerhalb von Gewebestrukturen und ggf. auftretende signifikante qualitative und/oder quantitative Unterschiede einzelner Komponenten zu einer Referenz im Vordergrund. Spezielle massenspektrometrische Messungen können aber auch zur Typisierung von Gewebe im Sinne der medizinischen Definition eingesetzt werden.

### Präparation

Hier ist die Präparation der biologischen Objekte vor der Applikation der MALDI-Matrix gemeint. Bei mikroskopischen *Gewebepräparationen* handelt es sich überwiegend um Schnittpräparate. Diese werden i.d.R. mit *Mikrotomen* hergestellt. Wird das verwendete tierische/humane Organ oder Gewebe dabei zuvor nicht mit aushärtenden Chemikalien behandelt (Einbetten), gibt es noch die Möglichkeit der *Gefrierbruchtechnik* [205]. Beide Techniken können Präparate mit einer Dicke von wenigen Mikrometern herstellen. Sogenannte Ultramikrotome werden für die Präparatherstellung in der Elektronenmikroskopie (TEM) verwendet und lassen auch wesentlich dünnere Schnittpräparate zu ( $d < 1 \mu\text{m}$ ). In der MALDI-MS-Analytik sind neben Schnittpräparaten mit einer Dicke von einigen Mikrometern, teilweise aber auch wesentlich dickere Präparate geeignet. Dabei kann es sich z.B. um Schnittpräparate, die mit Rasierklingen oder Skalpell hergestellt werden handeln [206]. Pflanzliche Gewebe sind bei der Anfertigung von Schnitten i.d.R. deutlich anspruchsvollere Präparate, als die meisten tierischen und humanen Gewebe. Vollständig uneingebettete Präparate sind vor allem für die bildgebende Massenspektrometrie, fixierten Proben eindeutig vorzuziehen, da Fixierungen i.d.R. chemische Modifikationen an Analytmolekülen verursachen können. Dies kann besonders bei einer nichtausreichenden Massenauflösung und ungenügender Massenrichtigkeit in Spektren zu *falsch positiven* Analytidentifizierungen führen. Es ist aber bei manchen tierischen und humanen Gewebeschnittpräparaten oft notwendig, *Fixierungen* und *Waschungen* vor der eigentlichen MALDI-Matrixpräparation durchzuführen, um die Wahrscheinlichkeit von Artefaktmessungen, die während der Präparatherstellung entstehen können zu verringern und außerdem das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) zu steigern. Nicht jedes tierische oder humane Gewebe eignet sich generell in jeder möglichen Orientierung gleich gut zu einer Schnittpräparation ohne stabilisierende Einbettungsmedien. Die bisher beste Alternative zur Verwendung von Einbettmedien im Zusammenhang mit der Schnittpräparaterstellung aus tierischen/humanen Weichgeweben, stellt die *Kryotechnik* mit *Kryomikrotomen* dar. Das Gewebe wird dabei zunächst möglichst in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um inter- und intrazellulär die Bildung größerer Wasserkristalle zu vermeiden und dann im Anschluss bei Temperaturen um ca.  $-80^\circ\text{C}$  für kurze Zeit gelagert. In der Kryokammer des Mikrotoms werden tiefgefrorene Proben bei in etwa  $-20^\circ\text{C}$  bis  $-30^\circ\text{C}$  geschnitten. Solche Kryopräparationen können manchmal strukturelle Unterschiede zu entsprechend fixierten histologischen Präparaten mit (klassischer) Einbettung und Färbung aufweisen, was bei einer Interpretation im direkten Vergleich mit erstellten MS-Bildern immer beachtet werden muss.

Biologische Präparate sind im allgemeinen elektrisch nichtleitend und beeinflussen daher als Dielektrika den Äquipotentialverlauf in der Targetregion der Ionenquelle nicht. Im Wesentlichen gilt im Umgang



mit Zellpräparationen aus Kulturbedingungen, im Bezug auf Fixierungen und Waschungen, ein ähnliches Vorgehen wie bei tierischen/humanen Gewebepräparaten. Dies zeigen z.B. ausführliche Untersuchungen an Zellkulturen zur Vorbereitung bildgebender MS-Messungen [207]. In Abbildung 3.9 sind die Extinktionskoeffizienten aromatischer Aminosäuren und Nucleobasen gezeigt. Außerdem erkennt man die Absorptionscharakteristik von häufigen Bestandteilen in biologischem (eukaryotischem) Gewebe.

### Orientierung und Strukturidentifizierung

Die *Orientierung* einer Schnittebene in Gewebepräparaten ist für die Interpretation der erhaltenen *Ionintensitätsverteilungsbilder* im Zusammenhang mit Vergleichen an *histologischen* Färbepreparaten immer entscheidend. Der Schnittebenenverlauf muss immer eindeutig bekannt sein, da während einer bildgebenden Messung die dreidimensionale Ordnung eines Präparates auf eine zweidimensionale Darstellung projiziert wird. Die Sicherheit mit der aus zweidimensionalen Projektionen die Ähnlichkeit von untersuchten dreidimensionalen Präparatbereichen mit bekannten Strukturen in *medizinisch* diagnostischen Abbildungen bestimmt werden kann, wird oft nach dem sogenannten *Rose-Kriterium* klassifiziert. In der Regel übertrifft die laterale Auflösung, der komplementär zu MS-Bildern verwendeten lichtmikroskopischen Aufnahmen, die in den MS-Bildern erlangte laterale Auflösung deutlich. Bisher sind nur wenige bildgebende MALDI-MS-Verfahren bekannt, die eine laterale Ortsauflösung  $\leq 5 \mu\text{m}$  an nativen biologischen Proben erreichen und dabei ein ausreichendes Signal-zu-Rauschverhältnis zeigen, um sowohl kontrastreiche Abbildungen, als auch qualitative Strukturerkennungen, anhand der Bestimmung von exakten Analytmassen in einer einzigen Messung zu gewährleisten [8] (Kapitel 4) [32].

Tabelle 3.2: Häufige natürliche Fettsäuren mit ihren auf die zweite Nachkommastelle gerundeten monoisotopischen Massen. Einheit Da.

Symbol <sup>4</sup>	Trivialname	Masse (mon.)	Schmelzpunkt (°C)	Summenformel
12 : 0	<i>Lauric acid</i>	200.17763	44.2	$C_{12}H_{24}O_2$
14 : 0	<i>Myristic acid</i>	228.20893	52.0	$C_{14}H_{28}O_2$
16 : 0	<i>Palmitic acid</i>	256.24023	63.1	$C_{16}H_{32}O_2$
18 : 0	<i>Stearic acid</i>	284.27153	69.6	$C_{18}H_{36}O_2$
20 : 0	<i>Arachidic acid</i>	312.30283	75.4	$C_{20}H_{40}O_2$
22 : 0	<i>Behenic acid</i>	340.33413	81.0	$C_{22}H_{44}O_2$
24 : 0	<i>Lignoceric acid</i>	368.36543	84.2	$C_{24}H_{48}O_2$
16 : 1 ( $\omega$ 7)	<i>Palmitoleic acid</i>	254.22458	-0.5	$C_{16}H_{30}O_2$
18 : 1 ( $\omega$ 9)	<i>Oleic acid</i>	282.25588	13.4	$C_{18}H_{34}O_2$
18 : 2 ( $\omega$ 6)	<i>Linoleic acid</i>	280.24023	-9.0	$C_{18}H_{32}O_2$
18 : 3 ( $\omega$ 6)	$\alpha$ - <i>Linolenic acid</i>	278.22458	-17.0	$C_{18}H_{30}O_2$
18 : 3 ( $\omega$ 6)	$\gamma$ - <i>Linolenic acid</i>	278.22458		$C_{18}H_{30}O_2$
18 : 4 ( $\omega$ 3)	<i>Stearidonic acid</i>	276.20893		$C_{18}H_{28}O_2$
20 : 2 ( $\omega$ 6)	<i>Eicosadienoic acid</i>	308.27153		$C_{20}H_{36}O_2$
20 : 3 ( $\omega$ 6)	<i>Dihomo-<math>\gamma</math>-Linolenic acid</i>	306.25588		$C_{20}H_{34}O_2$
20 : 4 ( $\omega$ 6)	<i>Arachidonic acid</i>	304.24023	-49.5	$C_{20}H_{32}O_2$
20 : 5 ( $\omega$ 3)	<i>Eicosapentaenoic acid</i>	302.22458	-54.0	$C_{20}H_{30}O_2$
22 : 4 ( $\omega$ 6)	<i>Adrenic acid</i>	332.27153		$C_{22}H_{36}O_2$
22 : 5 ( $\omega$ 3)	<i>Docosapentaenoic acid</i>	330.25588		$C_{22}H_{34}O_2$
22 : 6 ( $\omega$ 3)	<i>Docosaheptaenoic acid</i>	328.24023	-44.0	$C_{22}H_{32}O_2$
24 : 1 ( $\omega$ 9)	<i>Nervonic acid</i>	366.34978	39.0	$C_{24}H_{46}O_2$

<sup>4</sup> = Anzahl der Kohlenstoffatome : Anzahl der Doppelbindungen

Quellen: Dawson et al., *Data for Biochemical Research (2. Auflage)*, Clarendon Press (1969). und Wikipedia. Alle Angaben zu Schmelzpunkten der ungesättigten Fettsäuren beziehen sich auf die Cis-Isomere.

Tabelle 3.3: Proteinogene Aminosäuren ohne Selenocystein. Die monoisotopischen Massen sind auf die fünfte Nachkommastelle gerundet. Einheit Da.

	Aminosäure	Masse	$pK_s$	RC	B&B	HI	$\Delta(M)$	Summenformel
(A)	Alanin	89.04767	6.00	- 0.1	- 200	1.8	- 47.8	$C_3H_7NO_2$
(R)	Arginin	174.11167	10.76	- 4.5	- 120	- 4.5	37.3	$C_6H_{14}N_4O_2$
(N)	Asparagin	132.05349	5.41	- 1.6	80	- 3.5	- 4.8	$C_4H_8N_2O_3$
(D)	Aspartat	133.03750	2.77	- 2.8	- 200	- 3.5	- 3.8	$C_4H_7NO_4$
(C)	Cystein	121.01975	5.07	- 2.2	- 450	2.5	- 15.7	$C_3H_7NO_2S$
(E)	Glutamat	147.05315	3.22	- 7.5	160	- 3.5	10.2	$C_5H_9NO_4$
(Q)	Glutamin	146.06914	5.65	- 2.5	- 300	- 3.5	9.2	$C_5H_{10}N_2O_3$
(G)	Glycin	75.03202	5.97	- 0.5	0	- 0.4	- 61.8	$C_2H_5NO_2$
(H)	Histidin	155.06947	7.59	0.8	- 120	- 3.2	18.3	$C_6H_9N_3O_2$
(I)	Isoleucin	131.09462	6.02	11.8	- 2260	4.5	- 5.7	$C_6H_{13}NO_2$
(L)	Leucin	131.09462	5.98	10.0	- 2460	3.8	- 5.7	$C_6H_{13}NO_2$
(K)	Lysin	146.10552	9.74	- 3.2	- 350	-3.9	9.2	$C_6H_{14}N_2O_2$
(M)	Methionin	149.05105	5.74	7.1	- 1470	1.9	12.3	$C_5H_{11}NO_2S$
(F)	Phenylalanin	165.07897	5.48	13.9	- 2330	2.8	28.3	$C_9H_{11}NO_2$
(P)	Prolin	115.06332	6.30	8.0	- 980	- 1.6	- 21.8	$C_5H_9NO_2$
(S)	Serin	105.04259	5.68	- 3.7	- 390	- 0.8	- 31.8	$C_3H_7NO_3$
(T)	Threonin	119.05824	5.60	1.5	- 520	- 0.7	- 17.8	$C_4H_9NO_3$
(W)	Tryptophan	204.08987	5.89	18.1	- 2010	- 0.9	67.3	$C_{11}H_{12}N_2O_2$
(Y)	Tyrosin	181.07389	5.66	8.2	- 2240	- 1.3	44.3	$C_9H_{11}NO_3$
(V)	Valin	117.07897	5.96	3.3	- 1560	4.2	- 19.8	$C_5H_{11}NO_2$
	Wasser	18.01056						

RC = HPLC Retentionskonstante, pH = 2.1;  
 B&B Hydrophobizitätsindex als freie Enthalpie in cal/mol  
 HI = Hydrophobizitätsindex als freie Enthalpie in kcal/mol  
 $\Delta(M) = As-H_2O - DAs-H_2O$ .  
 Medianmasse der Aminosäuren (MAs- $H_2O$ ): 114.60 Da  
 Arithmetische Durchschnittsmasse der Aminosäuren (DAs- $H_2O$ ): 118.88 Da

Quelle **RC** : Seiler, N., Askar, A. : *J. Chromatogr.* 62, S.121, (1971).  
 Quelle **B&B** : Bull, H., Breese, K. : *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 665-670, (1974).  
 Quelle **HI** : Kyte, J., Doolittle, R. : *J. of Molecular Biology* 157, 105-132, (1982).

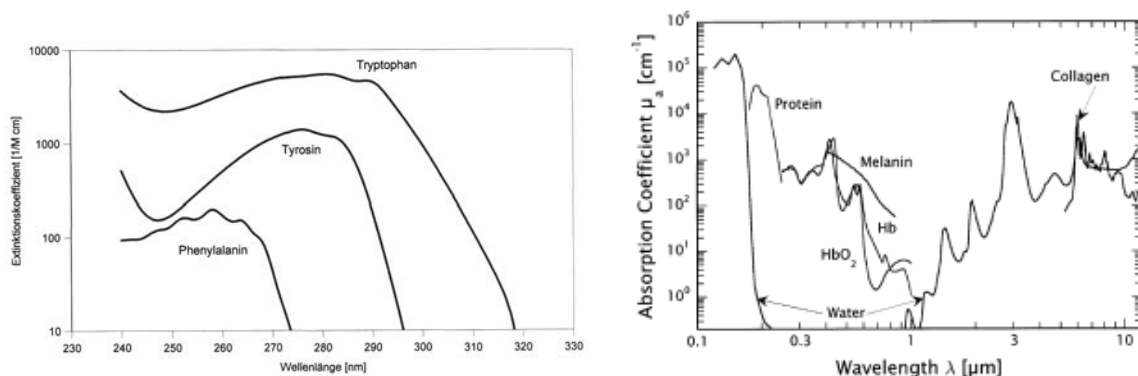


Abbildung 3.9: (Links) Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient aromatischer Aminosäuren in logarithmischem Auftrag. Neben den dargestellten Aminosäuren sind einige weitere wichtige Chromophore der Nucleinsäuren: Adenosin ( $\lambda_{max} = 260 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 14900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), Guanosin ( $\lambda_{max} = 276 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 9000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und Thymin ( $\lambda_{max} = 267 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 9700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), Uridin ( $\lambda_{max} = 261 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 10100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), Cytidin ( $\lambda_{max} = 271 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 9100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).  
 Abbildung entnommen aus [70]. (Rechts) Absorptionskoeffizienten von Gewebebestandteilen, entnommen aus [71].

Tabelle 3.4: Durchschnittliche relative Zusammensetzung biologischer Membranen [ % ] und Protein zu Lipidverhältnis.

Membran	Protein (P)	Lipid (L)	Kohlenhydrat	P/L
<b>Plasmalemmata</b>				
Leber, Maus	46.0	54.0	2.0-4.0	0.85
Erythrozyt, human	49.0	43.0	8.0	1.10
Amöben	52.0	42.0	4.0	1.30
<b>Kernmembran</b>				
Rattenleber	59.0	35.0	2.0	1.60
Mitochondrien, außen	52.0	48.0	(2.0-4.0) <sup>1</sup>	1.10
Mitochondrien, innen	76.0	24.0	(1.0-2.0) <sup>1</sup>	3.20
Myelin	18.0	79.0	3.0	0.23
Bakterien, gram +	75.0	25.0	(10.0) <sup>1</sup>	3.00

<sup>1</sup> : Analytisch abgeleitete Werte

Quelle: Guidotti, G., *Annu. Rev. Biochem.* 41, 732 (1972)

Tabelle 3.5: Durchschnittliche relative Lipidzusammensetzung einiger ausgesuchter Beispiele [ % ].

Lipid	Erythrocyten <sup>2</sup>	Myelin	Mitochondrien <sup>3</sup>	E.coli
Phosphatidsäure	1.5	0.5	0.0	0.0
Phosphatidylcholin (PC)	19.0	10.0	39.0	0.0
Phosphatidylethanolamin (PE)	18.0	20.0	27.0	65.0
Phosphatidylglycerin (PG)	0.0	0.0	0.0	18.0
Phosphatidylinosit (PI)	1.0	1.0	7.0	0.0
Phosphatidylserin (PS)	8.5	8.5	0.5	0.0
Cardiolipin	0.0	0.0	22.5	12.0
Sphingomyelin (SM)	17.5	8.5	0.0	0.0
Glycolipide	10.0	26.0	0.0	0.0
Cholesterin	25.0	26.0	3.0	0.0

<sup>2</sup> : human; <sup>3</sup> : Rinderherz

Quelle: Tanford, C. *The Hydrophobic Effect*, S.109, Wiley (1980)



### 3.2.3 Fazit

Eine abbildende massenspektrometrische Untersuchung *nativer* biologischer Proben auf zellulärer Ebene erfordert i.d.R. für die meisten Fragestellungen, die auf molekulare Aussagen abzielen, eine laterale Auflösung die im Bereich der Größe einer halben Zelldimension in den lateralen Raumrichtungen liegt. Pixelbilder abbildender MS-Methoden, die eine laterale Auflösung im Bereich zwischen 50  $\mu\text{m}$  und mehreren 100 Mikrometern erreichen, sind deshalb nur eingeschränkt (direkt) mit lichtmikroskopischen Methoden vergleichbar, wenn dabei Effekte durch Oversampling, arithmetische Signalmittelung und Undersampling unberücksichtigt bleiben. Entsprechend große Bereiche mancher Proben topologien sind auch mit einer lateralen Auflösung von 50  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$  und deutlichem Undersampling mit einer gewissen Umrissähnlichkeit darstellbar, da i.d.R. der massenspektrometrische Hintergrund hinsichtlich der Basislinie und der Rauschwertverteilung zwischen biologischem Gewebe und blankem Proben target nahezu immer deutliche Unterschiede aufweist. Die laterale Auflösungsfähigkeit des vollfunktionsfähigen helladaptierten menschlichen Auges, ermöglicht im Abstand der deutlichen Sehweite in etwa die Erkennung einer Punkt-zu-Punkt Distanz von ca. 100  $\mu\text{m}$  (siehe Anhang). Eine bildgebende analytische Methode die chemische Stoffinformation mit optischer Strukturinformation verbindet, sollte nach Möglichkeit mindestens die laterale Auflösungsfähigkeit des menschlichen Auges erreichen. Fast alle bildgebenden MS-Techniken erreichen bereits heute die Größenordnung der lateralen Auflösungsfähigkeit eines menschlichen Auges. Im Gegensatz hierzu ist allerdings bereits eine fünfzigfache mikroskopische Vergrößerungsoptik eines Weitfeld-Labormikroskopes in der Lage, eine laterale Auflösung in der Form einer Punkt-zu-Punkt Distanz von ca. 2  $\mu\text{m}$  zu projizieren. Ein Richtwert für orts aufgelöste massenspektrometrische Darstellungen sollte daher im Bereich der lateralen Auflösung eines qualitativ hochwertigen Weitfeldmikroskopes liegen, als in dem Bereich des menschlichen Auges. Die meisten angewandten MS-Methoden erreichen diesen Bereich, im Zusammenhang mit *nativen* biologischen Proben und molekularen Analytitionen, bis auf wenige Ausnahmen, nicht.

## 3.3 MALDI-Massenspektrometrie

### 3.3.1 Signalcharakteristik und Verarbeitung

UV-MALDI-TOF Spektren enthalten in ihrer Signalinformation insgesamt die Summe mehrerer Vorgänge. Die Signalform<sup>38</sup> eines Peaks in einem erzeugten Einzelspektrum stellt zunächst eine (analoge) Faltung der Pulsverteilung (Zeitauflösung) einer desorbierten Ionenpopulation mit der totzeitbegrenzten (analogen) Detektion dar. Im MCP-Detektor wird der Ionenstrom in einer Verstärkungskaskade in einen Elektronenstrom umgewandelt und i.d.R. nochmals elektronisch nachverstärkt (mit Operationsverstärkern, OPV). Die folgende *Analog-zu-Digital* Umsetzung<sup>39</sup> überträgt die kontinuierlichen analogen Signale (i.d.R. Spannungen) und führt so insgesamt zu einer zweifachen *Klassifizierung* (Diskretisierung) hinsichtlich der Pulsintensität und Zeitauflösung. Geht man dabei von einer durchschnittlich verstärkten und gewandelten Einzelionenintensität (Gain  $\approx 10^6$ ) in der Form eines Spannungspulses von effektiv ca. 10 mV in einem digitalisierten Massenspektrum aus, so repräsentiert der Peak einer Ionenpopulation<sup>40</sup> in einem Spektrum in etwa zwischen  $10^1$  bis  $10^4$  Ionen [22] (siehe auch Anhang). Die Signalform des Peaks trägt dabei Informationen über die Desorption/Ionisierung, den Ionen transfer im Massenspektrometer (Abbildung), die analoge Konversion und Verstärkung sowie über die Digitalisierung. Eine weitere (digitale) Signalverarbeitung, zu der z.B. eine *Peakerkennung* zählen kann, ist dabei nicht (mehr) in der Lage zwischen den

<sup>38</sup>Peakwert, Peaksymmetrie.

<sup>39</sup>Abtastrate bzw. Datenpunktintervall und Speichertiefe des ADC-Codes.

<sup>40</sup>In Abhängigkeit der Gerätesensitivität und Zeitauflösung der AD-Wandlung (*sampling rate*).

initialen Einflüssen zu differenzieren.

Die Flugzeit eines Ions der Masse  $m$  kann allgemein als Funktion der Ortskoordinaten  $(x, y, z)$  der initialen Richtungskomponenten ( $a = \tan \alpha = v_x/v_z, b = \tan \beta = v_y/v_z$ ) und der relativen Energieunschärfe ( $\delta_K = \Delta K/K$ ) angegeben werden.  $C$  stellt dabei eine geräteabhängige Konstante dar [14] [21]:

$$t = C(x, y, z, \alpha, \beta, \delta_K) \sqrt{m} \quad (3.30)$$

Prinzipiell kann man bei einer elektrostatischen Fokussierung zwischen einer Punkt-zu-Punkt (1.), Parallel-zu-Punkt (2.), Punkt-zu-Parallel (3.) oder Parallel-zu-Parallel (4.) Abbildung unterscheiden. Für einzelne Ionentrajektorien gelten dazu die Bedingungen (dargestellt nur für eine laterale Richtung):

1. Der Fokus ist unabhängig vom Startwinkel ( $x|a = 0$ ).
2. Der Fokus ist unabhängig vom (lateralen) Startort ( $x|x = 0$ ).
3. Die Austrittsrichtung der Ionen ist unabhängig vom initialen Winkel ( $a|a = 0$ ).
4. Die Austrittsrichtung ist unabhängig vom (lateralen) Startort ( $a|x = 0$ ).

Durch die Kombination der Bedingung einer Punkt-zu-Punkt (1.) mit der Bedingung einer Parallel-zu-Parallel (4.) Abbildung erreicht man eine Taille-zu-Taille Abbildung [166]. In rotationssymmetrischen Fokussierungseinrichtungen können die Richtungen der Ebene getrennt (d.h. unabhängig) voneinander betrachtet werden, d.h. es gilt  $(x|y) = (x|b) = (a|y) = (a|b) = 0$  und  $(y|x) = (y|a) = (b|x) = (b|a) = 0$ . Es ergeben sich daraus, ausgehend von einer Bezugsebene bei  $z_0$ , für jede weitere Ebene in einem longitudinalen Abstand  $\Delta z$  die Abhängigkeiten der aktuellen Parameter zur Referenz  $t_0 = C(0, 0, 0, 0, 0, 0) \sqrt{m}$ , mit  $x_0, a_0, y_0, b_0, z_0, \delta_0$ :

$$\begin{aligned} x(z) &= x(x_0, a_0, y_0, b_0, z_0, \delta_0) \\ y(z) &= y(x_0, a_0, y_0, b_0, z_0, \delta_0) \\ a(z) &= a(x_0, a_0, y_0, b_0, z_0, \delta_0) \\ b(z) &= b(x_0, a_0, y_0, b_0, z_0, \delta_0) \\ \delta_K(z) &= \delta_K(x_0, a_0, y_0, b_0, z_0, \delta_0) \end{aligned}$$

und damit eine entstehende absolute Zeitspreizung,  $\Delta t = t - t_0$ . In der Regel werden Flugzeitspektrometer so konstruiert, daß sie *in erster Ordnung* bezüglich der Startposition(en) und Winkel (mindestens) einer Richtung in der Referenzebene sowie hinsichtlich einer Energiespreizung korrigiert sind (*isochron*):

$$(t|x) = (t|y) = (t|a) = (t|\delta_K) = 0 \quad (3.31)$$

Punkt-zu-Punkt fokussierende (stigmatische) axiale Flugzeitspektrometer müssen dabei die Bedingungen einer winkel- und energieunabhängigen Ortsfokussierung in erster Ordnung erfüllen:

$$(x|a) = (y|b) = (x|\delta_K) = 0 \quad (3.32)$$

Wenn eine winkel- und energieunabhängige Fokussierung z.B.  $(x|a) = (x|\delta_K) = 0$  erreicht werden kann, ist es sogar bei einer energieabhängigen Winkeleinstellung ( $a|\delta_K \neq 0$ ) noch möglich eine winkelunabhängige Flugzeitbeziehung  $(t|a) = 0$  zu erreichen, wohingegen die Zeitspreizung aufgrund des Einflusses der Ortskoordinate dann aber einen Restbetrag  $(t|x) \neq 0$  aufweist. In nicht axialsymmetrischen Anordnungen kann dies durch eine entsprechende Verkipfung des Detektors korrigiert werden [14].

Die linearen (paraxialen) Terme stellen immer den größten Beitrag einer Zeitabweichung zu einer Referenz. In der Regel sind die verbleibenden Flugzeitabweichungen (zweiter Ordnung) bei einer Eliminierung der Terme erster Ordnung, durch die Wahl der Elektrodenabstände und Potentiale nicht zu vernachlässigen. Die Terme zweiter Ordnung können erst mit weiteren Maßnahmen (DE, Ionenspiegel) eliminiert werden:

$$\begin{aligned}
(t|xx) &= (t|xa) = (t|aa) = (t|yy) = (t|yb) \\
&= (t|bb) = (t|x\delta_K) = (t|y\delta_K) = (t|a\delta_K) \\
&= (t|b\delta_K) = (t|\delta_K\delta_K) = (t|xy) \\
&= (t|ab) = (t|ya) = 0
\end{aligned} \tag{3.33}$$

Flugzeitabweichungen ab der zweiten Ordnung werden allgemein als *Aberrationen* bezeichnet. Bezogen auf ein Referenzion ergibt sich die Flugzeit eines Ions mit Orts-, Startwinkel- und Energiedifferenz, dann aus einer Reihenentwicklung der Gestalt (*aberration expansion*):

$$\begin{aligned}
t(z) &= t_0 + (t|\delta_K)\delta_0 + (t|x)x_0 + (t|y)y_0 + (t|a)a_0 + (t|b)b_0 \\
&+ (t|xx)x_0^2 + (t|xa)x_0a_0 + (t|aa)a_0^2 + (t|x\delta_K)x_0\delta_0 \\
&+ (t|yy)y_0^2 + (t|yb)y_0b_0 + (t|bb)b_0^2 + \dots + (t|\delta_K\delta_K)\delta_0^2 \\
&+ (t|xx\delta_K)x_0^2\delta_0 + (t|xa\delta_K)x_0a_0\delta_0 + (t|aa\delta_K)a_0^2\delta_0 + \dots
\end{aligned} \tag{3.34}$$

In axialsymmetrischen elektrostatischen Einrichtungen ist die Bedingung  $(x|aa) = 0$  meist erfüllt, sodaß bei rotationssymmetrischen Strahlprofilen der Einfluss der Winkel in zweiter Ordnung auf den Fokussierungsort, bezogen auf eine Referenzebene, ganz entfallen kann (für beide laterale Richtungen). In Populationen muss neben der Zeitspreizung aufgrund unterschiedlicher Startorte, initialer Impulskomponenten (Startwinkel) und initialer Energiedifferenzen zusätzlich noch eine initiale Zeitspreizung  $\Delta t_0$  berücksichtigt werden. Diese kann einerseits durch abweichende Ionisierungszeitpunkte innerhalb des Laserpulses (Halbwertsbreite der Pulsintensität) oder andererseits durch axiale Richtungsumkehrungen („Turn-around time“) hervorgerufen werden (4-Pi-Extraktionsgeometrie). Erhaltene Flugzeitabweichungen setzen sich damit aus initialen Flugzeitfehlern ( $\Delta t_0$ ) und unkorrigierten Aberrationen ( $\Delta t_{ab}$ ) zusammen [21]:

$$\Delta t = \Delta t_0 + \Delta t_{ab} \tag{3.35}$$

Geht man davon aus, daß in einem linearen Mikrosonden-Flugzeitspektrometer mit einer Ortsfokussierung zweiter Ordnung ohne DE nur der Einfluss voneinander unabhängiger Startebenen-, Geschwindigkeits- und Zeitdifferenzen berücksichtigt werden muss, so kann eine Betrachtung für infinitesimale Differenzbeträge zu einer Referenz erfolgen. Hierzu ist die Kenntnis der Streuung der Verteilung(en) notwendig. Man erhält für die Varianz der Flugzeit den Ansatz [209]:

$$\sigma_t^2 = \left(\frac{\partial t}{\partial z}\right)^2 \sigma_{\Delta z_0}^2 + \left(\frac{\partial t}{\partial v}\right)^2 \sigma_{\Delta v_0}^2 + \sigma_{\Delta t_0}^2 \tag{3.36}$$

Ein Ionenintensitätspeak in einem Massenspektrum kann damit als zweiseitige, dreidimensionale (gaußsche) Dichteverteilung beschrieben werden:

$$f(z, v, t) = \frac{1}{(2\pi)^{3/2} \sigma_t \sigma_z \sigma_v} e^{-((t-t(z_0, v_0))^2/2\sigma_t^2) + ((z-z_0)^2/2\sigma_z^2) + ((v-v_0)^2/2\sigma_v^2)} \tag{3.37}$$

Das Integral über die axiale Ortskoordinate und die Geschwindigkeit erlaubt dann die Bestimmung der eindimensionalen zweiseitigen Dichteverteilung  $f(t)$  des Peaks, als Projektion auf die Zeitachse:

$$f(t) = C \int \int e^{-((t-t(z_0, v_0))^2/2\sigma_t^2) + ((z-z_0)^2/2\sigma_z^2) + ((v-v_0)^2/2\sigma_v^2)} dx dv \tag{3.38}$$

Sehr effektive Methoden einer Peakauswertung bzw. Peakerkennung basieren auf einer diskreten Fouriertransformation, die sehr häufig angewandt wird (und hier z.B. einer FFT, *Fast Fourier Transformation*) [8] [210] [211] [212] [213] [214] [215] [216].

Schlussfolgerungen auf physikalische Prozesse, die während einer durchlaufenen Stufe im Massenspektrometer stattfinden können und deren Auswirkungen Veränderungen der Signalform bedeuten, sind i.d.R. nicht ohne zusätzliche Messverfahren, bzw. vom normalen Messbetrieb abweichende Experimente, aufzudecken und näher zu charakterisieren.

### Muster in Massenspektren

Ein analytisch wichtiger Aspekt ist die Mustererkennung in Massenspektren. Die Ursachen für das Auftreten von Signalmustern lassen sich dabei auf grundlegende physikalische Zusammenhänge zurückführen. Spezifische Muster entstehen z.B. einerseits, bedingt durch die diskreten absoluten Isotophäufigkeiten der in Molekülen enthaltenen chemischen Elemente (Isotopauflösung der Summenformel = Multiplet) sowie andererseits durch charakteristische Signalabstände polymer aufgebauter Verbindungen mit unterschiedlichem Polymerisierungsgrad. Weiterhin ergeben Verteilungen mehrfachgeladener Ionen Muster, die z.B. in ESI-Spektren zur Massenbestimmung einer chemischen Verbindung herangezogen werden können [217]. In übersichtlichen Massenspektren können gruppierte Signalmuster von Polymeren oft nach ihrem Entstehungsursprung (natürlich/künstlich) aufgrund ihrer charakteristischen Polymereinheiten und den auftretenden Serien identifiziert werden. Ein gutes Beispiel ist das künstliche Polymer PEG<sup>41</sup>. Zudem treten PEG als Adduktionen mit vorwiegend Natrium und Kalium auf. PEG kann auch in Einbettungsmedien biologischer Proben vorkommen (Dauerpräparat oder Gefriermedium). Enthält eine Matrixpräparation PEG, werden i.d.R. die Verteilungen von Natrium- und Kaliumquasimolekülionenserien erzeugt. Die Anwesenheit von PEG kann die Spektren analytisch vollständig unbrauchbar machen [8] (Kapitel 1).

### Relatives Quantifizieren

In Massenspektren der Messungen von biologischen Proben ist es einerseits möglich einen *relativ quantifizierenden* Vergleich von Signalen identifizierter Peaks zu einem Referenzwert durchzuführen (*semiquantitative Messungen*). Der Intensitätsreferenzwert kann dabei zum einen *absolut*, d.h. auf die Intensität der Nachweisgrenze des jeweiligen Spektrometers in einem bestimmten Massenbereich bezogen werden oder aber *relativ*, z.B. durch die Lage der Intensität eines internen Standards bestimmt werden. Der interne Standard kann dabei entweder die gesuchte Substanz sein (additives Verfahren) oder eine Substanz mit, im Verhältnis zum Analyten, sehr ähnlich verlaufender Desorption/Ionisierung aber abweichender Masse. Generell sind hierbei immer drei Größen entscheidend. *Erstens* ist dies ein gewisser „Sicherheitsabstand“ eines potenziellen Analytsignals (Intensität) zu einer mittleren, genau zu definierenden, Rauschsignalstärke (*Detection Limit*). Es ist darüberhinaus *zweitens* für relativ quantifizierende Messungen der Intensitätswert heranzuziehen, der eine ausreichende Präzision von Signalen bei wiederholten Messungen (Genauigkeit, Streuungsmaß) eines relativ niedrigen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses sicherstellt, um den Beginn des *linearen* Messbereiches für diesen Analyten festlegen zu können (*Quantification Limit*). *Drittens* ist dann noch die innerhalb des linearen Messbereiches kleinste, analog erfassbare Signalintensitätssteigerung (Wachstumsrate), zu nennen. Diese ist besonders im Zusammenhang mit der digitalen Speichertiefe ( $ADC_{code}$ ) zu sehen, da hiermit, wie bereits zuvor erwähnt, eine Klassifizierung

---

<sup>41</sup>PEG = Polyethylenglykol. Dieses ist aufgrund seiner charakteristischen Signalverteilung auch zum Einsatz in Nachkalibrierverfahren geeignet. Hierbei sind allerdings die physikochemischen Unterschiede bei der Desorption/Ionisierung aus einer MALDI-Matrixumgebung im Vergleich zu biologischen Molekülen wie z.B. Peptiden vergleichbarer Masse teilweise nicht unerheblich [261].

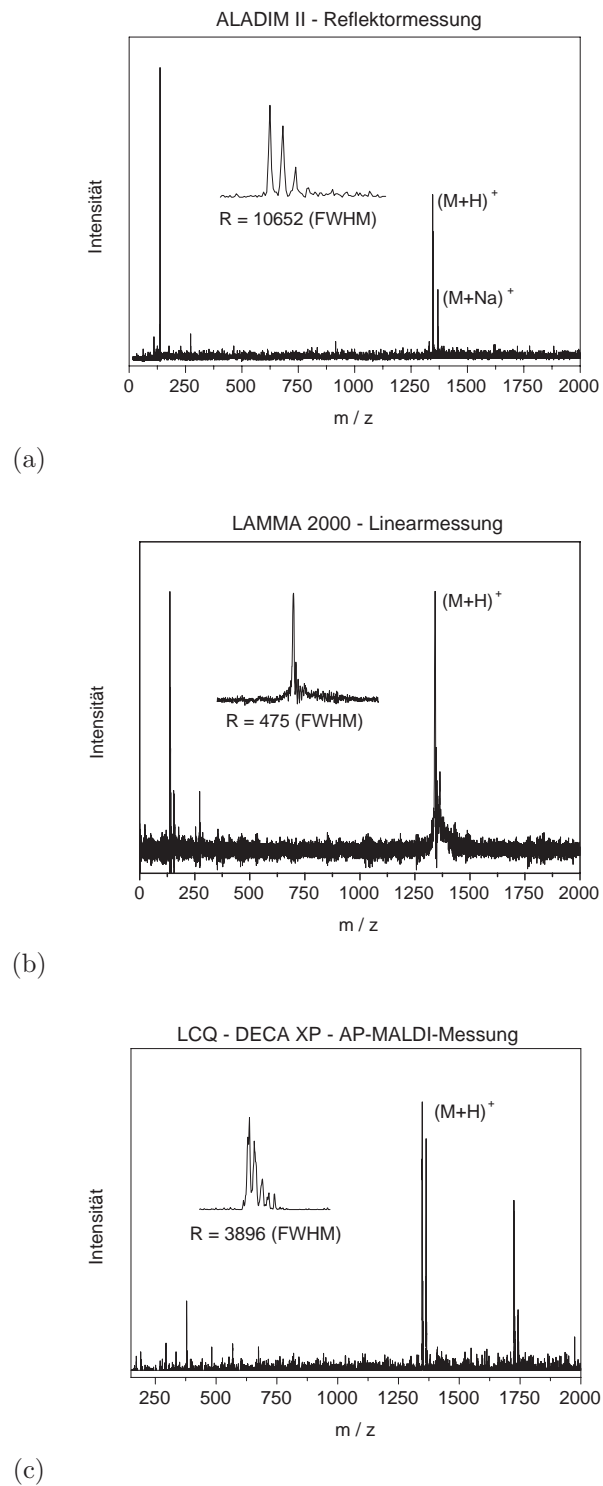


Abbildung 3.10: Massenspektren des Analyten Substanz P. Vergleich der durchschnittlichen Massenaufösungen der Spektrometer (a) ALADIM II (Reflektor; Zeitauflösung 2 ns; Matrix 2,5-DHB), (b) LAMMA 2000 (Linear; Zeitauflösung 5 ns; Matrix 2,5-DHB) und (c) LCQ DECA XP (3d-IT; Mass-TEC AP-MALDI-Quelle; Matrix CHCA; IT-Öffnungszeit pro Microscan: 1000 ms external timing; AGC off, minimale Laserabschwächung) im Massenbereich um 1350  $m/z$ . Die Auflösung bezieht sich, außer bei dem LAMMA 2000 Spektrum, auf den monoisotopischen Peak der Verteilung. CHCA =  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymzimtsäure.

Signalverteilung bei unterschiedlicher Zeitauflösung

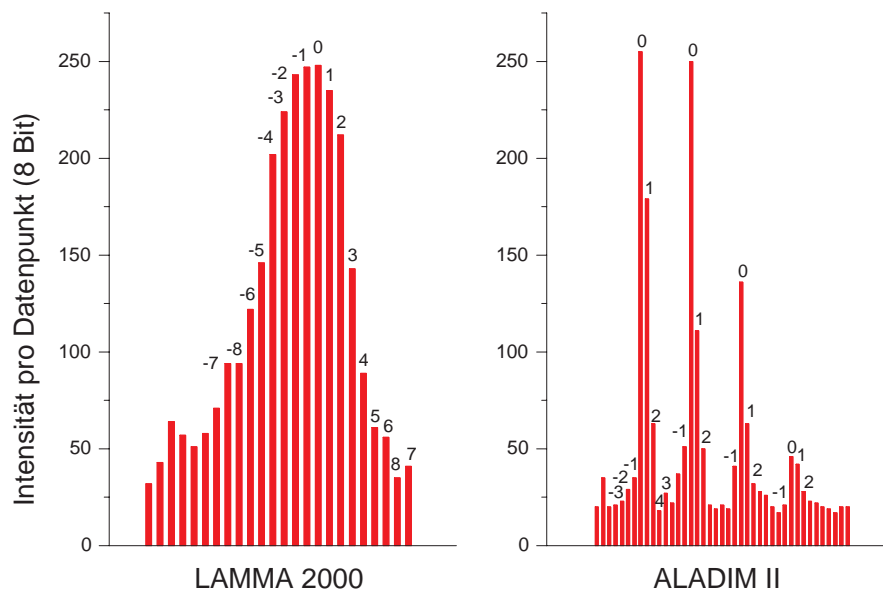


Abbildung 3.11: Häufigkeitsverteilung diskreter Detektionsereignisse (Fensterfunktion) des Analyten Substanz P als  $[M + H]^+$  und Kennzeichnung nach Lage des lokalen Maximums der aufgelösten Verteilung. Die Intervallgröße eines Datenpunktes entspricht jeweils zwei Time-bins. (Links) Zeitauflösung 5 ns (*time-bin*),  $2 \cdot 5 \text{ ns} \approx 0.39 \text{ u}$ , mit der Transientenrekorderkarte *Precision Instruments 9825*, 200 MHz (maximale Zeitauflösung = 5 ns) am Massenspektrometer LAMMA 2000 im Linearmodus. (Rechts) Zeitauflösung 2 ns (*time-bin*),  $2 \cdot 2 \text{ ns} \approx 0.12 \text{ u}$ , mit dem digitalen Speicheroszilloskop Le Croy 9350, 500 MHz (maximale Zeitauflösung pro Kanal = 1 ns) am Massenspektrometer ALADIM II im Reflektormodus mit DE.

der analogen Werte einhergeht und außerdem der Quantifizierungsfehler mit der Bitzahl verknüpft ist [218] [219] [220] [221] [222]. Der Prozess einer Quantifizierung ist damit immer mit der Ermittlung einer Basislinie und des Rauschpegels in einem Spektrum verbunden. In Abbildung 3.10 ist der Peptidanalyt Substanz P nach der Vermessung an unterschiedlichen Massenspektrometern/Ionenquellen gezeigt, wobei dieser teilweise zuvor mit verschiedenen Matrices präpariert worden ist. Aus Abbildung 3.11 geht der Einfluss der Zeitauflösung bei der Aufnahme von Massenspektren eines identischen Analyten hervor. In Abbildung 3.14 ist die (technische) Herangehensweise bei der Markierung/Identifizierung unterschiedlich gut aufgelöster Ionensignale in Massenspektren erkennbar.

### Isotopverteilung – Ionenmultiplets

Bei manchen Betrachtungen kann auch das relative Intensitätsverhältnis der Isotopenpeaks einer chemischen Verbindung Gegenstand von Untersuchungen sein. Das theoretisch zu erwartende Signalaufkommen organischer Verbindungen in Massenspektren lässt sich dabei durch kombinatorische Berechnungen ermitteln. Aufgrund der unterschiedlichen Massenzahlen chemischer Elemente mit ihrem spezifischen Massendefekt ist unter Berücksichtigung der relativen natürlichen Isotophäufigkeiten dann eine eindeutige Vorhersage über die relativen Intensitäten möglich [223] [225] [226] [227] [228]. Für jedes in der Verbindung (Summenformel) vorkommende chemische Element bedeutet dies explizit die Berechnung der einzelnen Isotopkombinationen, entsprechend der Stöchiometrie in der Verbindung. Chemische Elemente die mit mehr als zwei Isotopen vorkommen, erzeugen dabei eine *Multinomialverteilung*. Bei genau zwei

Isotopen erhält man den Spezialfall einer *Binomialverteilung*. Aus einer Verbindung die nur ein chemisches Element mit maximal zwei Isotopen besitzt, kann die relative Intensität der Peaks  $I_n(k)$  im Spektrum mit  $n$  Atomen und  $k$  der Anzahl des selteneren Isotops dann direkt erhalten werden über eine Berechnung gemäß

$$\begin{aligned} I_n(k) &= \binom{n}{k} p^{n-k} (1-p)^k \\ &= \frac{n!}{k! (n-k)!} p^{n-k} (1-p)^k \end{aligned} \quad (3.39)$$

Es ist dabei  $p$  die natürliche Wahrscheinlichkeit des häufigeren Isotops und  $(1-p)$  die des selteneren Isotops. Besteht ein hypothetisches Molekülion z.B. aus der Summenformel  $A_{20}B_{xx-1} + B^+$  mit insgesamt 20 Atomen des Elementes mit zwei Isotopen  ${}^zA$ ,  ${}^{z+y}A$  und einer beliebigen Anzahl  $xx$  des Reinelementes  $B$  mit einem Ladungsträger, erhält man die theoretischen Intensitäten von Kombinationen aus

- 20 häufigen Isotopen ( $k=0$ )  ${}^zA_{20}B_{xx-1} + B^+$ ,
- 19 häufigen Isotopen plus einem seltenen Isotop ( $k=1$ )  ${}^zA_{19} {}^{z+y}A_1 B_{xx-1} + B^+$ ,
- 18 häufigen Isotopen plus zwei seltenen Isotopen ( $k=2$ )  ${}^zA_{18} {}^{z+y}A_2 B_{xx-1} + B^+$ , ... u.s.w. .

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Reinelementes in dieser Verbindung ist konstant und trägt zur relativen Intensitätsverteilung deshalb nicht bei. Die Multinomialverteilung muss z.B. bei den Elementen Sauerstoff (3 Isotope) und Schwefel (4 Isotope) verwendet werden, um die relative Intensität  $I_n$  einer Isotopkombination  $\sum_{j=1}^k x_j = n$  berechnen zu können. Man erhält für  $k \leq n$ :

$$\begin{aligned} I_n(X_1 = x_1, X_2 = x_2, \dots, X_k = x_k) &= \binom{n}{x_1, \dots, x_k} p_1^{x_1} \cdot p_2^{x_2} \cdot \dots \cdot p_k^{x_k} \\ &= \frac{n!}{x_1! \cdot x_2! \cdot \dots \cdot x_k!} p_1^{x_1} \cdot p_2^{x_2} \cdot \dots \cdot p_k^{x_k} \\ &= \frac{n!}{\prod_{j=1}^k x_j!} \prod_{j=1}^k p_j^{x_j} \end{aligned}$$

wobei  $X_j$  das  $j$ -te Isotop des Elements  $X$  ist,  $x_j$  dessen abzählbare Anzahl und  $p_j$  dessen natürliche Wahrscheinlichkeit darstellt (relative Häufigkeit). Das Element  $X$  kommt insgesamt mit der Stöchiometrie  $n$  in der Verbindung vor. Zur Berechnung der monoisotopischen Peakintensität (i.d.R. handelt es sich dabei um die leichtesten Isotope) tragen nur die häufigsten Isotope aller beteiligten Elemente bei (sortenreine Kombinationen). „Sortenrein“ soll in diesem Zusammenhang alle identischen Isotope eines Elementes bezeichnen. Alle weiteren Peakintensitäten erhält man dann, durch elementbezogene Berechnungen aller Isotopwahrscheinlichkeiten. Sofern die Massenaufösung eine reale Trennung nicht ermöglicht, können die durch die nicht sortenreinen Kombinationen (Isotopkombinationen eines Elementes mit gleichem Neutronenzuwachs aber unterschiedlichem Massendefekt)<sup>42</sup> erhaltenen Wahrscheinlichkeiten eines Neutronenzuwachses multipliziert und dann mit allen weiteren sortenreinen Möglichkeiten aufsummiert werden. Variationen müssen i.d.R. nur dann beachtet werden, wenn sie chemisch sinnvoll sind, also nur bei Strukturisomeren wie z.B. im Falle der Aminosäuren Leucin/Isoleucin. Die Begriffe Kombination und Variation werden im Anhang nochmals erläutert. Insgesamt entspricht das Vorgehen im Prinzip einer

<sup>42</sup>Praktisch wird der Massendefekt auf ein neutrales Atom bezogen, also zusammen mit den Elektronen der Hülle berechnet. Er entspricht dann dem Differenzbetrag aus der Summe der einzelnen Neutronen- und Protonenmassen in einem Kern plus der Elektronenmassen (Ruhmassen) zur tatsächlich messbaren Masse. Da eine Atommasseneinheit per Definition  $\frac{1}{12} {}^{12}C = 1.0 u$  entspricht (unified atomic mass unit), ist er hier relativ, durch den Unterschied zur nominellen Masse gegeben.



Klassifizierung der Neutronenunterschiede bzw. einer Neutronenverteilung [224]. Es erfolgt immer eine Normierung auf den intensivsten Peak (100%, Basispeak). Zu einer Berechnung mit entsprechenden numerischen Routinen werden dabei mehrere Ansätze verfolgt [225] [226] [227] [228]. In [229] wird z.B. gezeigt, daß eine Berechnung ebenso über eine Fourier Transformation möglich ist. Das Problem ist originär, wie bereits gezeigt, die Berechnung eines Polynoms, das sich aus der mathematischen Kombinatorik ergibt. Die Umsetzung in besonders effiziente Algorithmen kann aber auf mehreren Wegen erfolgen. Auch das Problem von Rundungsfehlern ist dabei nicht zu unterschätzen. In [230] wird die Berechnung als Markov-Kette behandelt (Programm IsoDalton).

### Phosphatidylcholine als Beispielverbindungen

Die klassische massenspektrometrische Analytik an Lipiden aus festen Proben erfordert (fast immer) eine aufwendige Aufreinigungs-/Trennungsmethode als vorbereitende Maßnahmen. Die Präparation von Lipiden mit organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Methanol oder Aceton bedingt zudem durchweg die Verwendung von Glasmaterial. In Abbildung 3.13 sind beispielhaft HPLC-Chromatogramme häufiger Lipide dargestellt. Eine geeignete Offline-Methode in Kombination mit MALDI im kleinen Maßstab ist dabei z.B. die Dünnschichtchromatographie [231]. Bei der bildgebenden in situ MALDI-Analytik an Gewebe(schnitten) oder einzelnen Zellen wird dagegen weitestgehend auf eine physikalische/chemische Trennung, bis auf die, im Zusammenhang mit der Matrixpräparation, ablaufenden Vorgänge verzichtet. Es kommen deshalb bei dieser Art der Analyse komplexe Lipidgemische zur Vermessung, bei der, je nach ihrer Ionisierbarkeit, eine Lipidverteilung unterschiedlicher Vertreter erhalten wird (siehe auch Ergebnisteil der Arbeit).

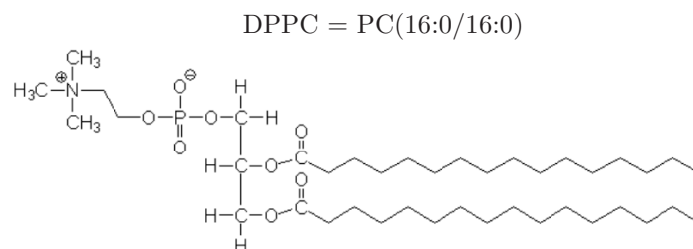


Abbildung 3.12: Struktur der Phosphatidylcholine (Lecithine), hier am Beispiel von 3-sn-Phosphatidylcholin<sup>44</sup> DPPC, PC(32:0): polare Kopfgruppe Cholin (Alkohol), Phosphorsäure, Glycerol und unpolare gesättigte (oder ungesättigte) Fettsäureketten, hier 2 x Palmitinsäure ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), dargestellt als neutrales Molekül („Zwitterion“).

Als biologische Beispielverbindung wird hier das Phospholipid *1,2-Dipalmitoyl-Glycerol-3-sn-Phosphatidylcholin* betrachtet (Abbildung 3.12). Es ist sehr häufig ein Bestandteil der echten Zellmembrane von Pro- und Eukaryoten bzw. ein intermediäres Lipid. DPPC gehört zur Klasse der *Glycerophospholipide* - PC(32:0) - und besitzt zwei gesättigte Fettsäuren (Palmitin) mit je 16 Kohlenstoffatomen PC(16:0,16:0). Es entspricht damit der Summenformel  $C_{40}H_{80}NO_8P$  mit einer relativen Molekularmasse von  $M_r=734.039$  g/mol<sup>45</sup>. Aufgrund der stöchiometrischen Verhältnisse in dieser Verbindung und der natürlichen Häufigkeiten aller vorkommenden Isotope ( $^{12}C$ ,  $^{13}C$ ,  $^1H$ ,  $^2H$ ,  $^{16}O$ ,  $^{17}O$ ,  $^{18}O$ ,  $^{14}N$ ,  $^{15}N$ ,  $^{31}P$ ) wird schnell deutlich, daß zur Signalverteilung im Massenspektrum hauptsächlich der Kohlenstoff beiträgt. Lediglich im dritten Isotopenpeak erreicht  $^{18}O$  eine Wahrscheinlichkeit, die nennenswert zu einem Signalintensitätsbeitrag führt (Abbildung 3.15). Betrachtet man zunächst nur die kombinatorischen Möglichkeiten ohne sehr ge-

<sup>45</sup>Lipidnomenklatur: IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, CBN: *Nomenclature of Lipids*, Recommendations, 1976, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid/>, World Wide Web Version prepared by G.P. Moss.

## HPLC-Beispielchromatogramme ausgewählter Lipide

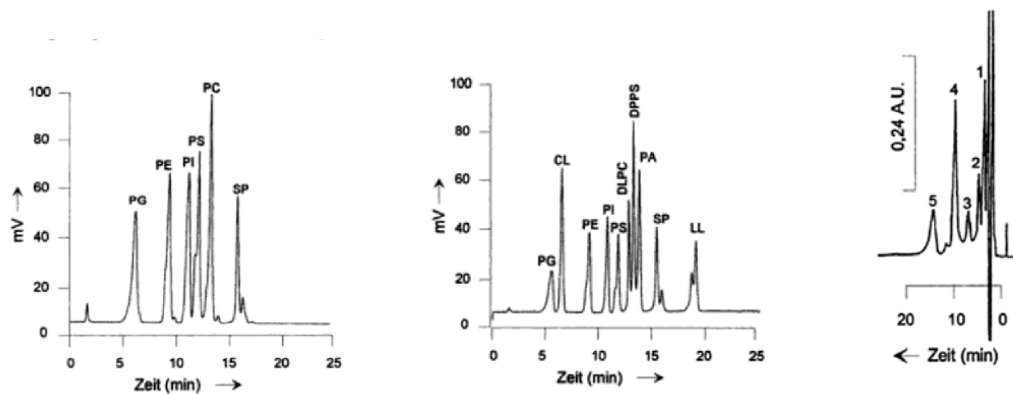


Abbildung 3.13: (Links) HPLC-ELSD-Chromatogramm (*evaporative light scattering detection*) eines Standardgemisches unterschiedlicher Vertreter von: PG = Phosphatidylglycerol, PE = Phosphatidylethanolamin, PI = Phosphatidylinositol, PS = Phosphatidylserin, PC = Phosphatidylcholin, SP = Sphingomyelin. Vorsäule: 20 x 2.1mm i.D., Hauptsäule: 120 x 4.6mm i.D., stationäre Phase = Encapharm 100, dp = 5 $\mu$ m, mobile Phase A: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 80:19.5:0.5 v/v/v. (Mitte) Verbesserte Auftrennung mit den zusätzlich erkennbaren Peaks: CL = Diphosphatidylglycerol, DLPC = Dilinoleylphosphatidylcholin, DPPS = 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphat, PA = 1,2-Diacyl-sn-Glycero-3-Phosphat (Phosphatidic acid) = strukturell einfachstes Phospholipid, LL = Lysophosphatidylcholin. (Rechts) Chromatogramm aus einem Hefeextrakt mit: 1 = PE, 2 = Lysophosphatidylethanolamin, 3 = Lysophosphatidylcholin, 4 = PC, 5 = Sphingomyelin (SP oder SM). Glassäule: 150 x 3.8mm i.D., stationäre Phase: Silasorb 600, 5 $\mu$ m, mobile Phase: MeOH/ACN/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100:100:3 v/v/v. Flussrate: 0.3ml/min, Vordruck: 4MPa, Detektion mittels UV-Detektor bei  $\lambda = 203\text{nm}$ . Abbildungen entnommen aus der QUELLE: Manfred H. Gey: *Instrumentelle Bioanalytik*, Vieweg 1998.

ringe relative Häufigkeiten als Ausschlusskriterium anzusehen, ergeben sich folgende Zusammensetzungen für den ersten und den zweiten bis vierten (nicht vollständig aufgelösten) Peak:

**1. Peak**

$$(1): \quad 40 m(^{12}\text{C}) + 81 m(^1\text{H}) + m(^{14}\text{N}) + 8 m(^{16}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) = 734.569432 \text{ u}$$

**2. Peak**

$$\begin{aligned} (1): \quad & 39 m(^{12}\text{C}) + m(^{13}\text{C}) + 81 m(^1\text{H}) + m(^{14}\text{N}) + 8 m(^{16}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 735.572786 \text{ u} \\ (2): \quad & 40 m(^{12}\text{C}) + 81 m(^1\text{H}) + m(^{14}\text{N}) + 7 m(^{16}\text{O}) + m(^{17}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 735.573649 \text{ u} \\ (3): \quad & 40 m(^{12}\text{C}) + 80 m(^1\text{H}) + m(^2\text{H}) + m(^{14}\text{N}) + 8 m(^{16}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 735.575708 \text{ u} \\ (4): \quad & 40 m(^{12}\text{C}) + 81 m(^1\text{H}) + m(^{15}\text{N}) + 8 m(^{16}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 735.566467 \text{ u} \end{aligned}$$

**3. Peak**

$$\begin{aligned} (1): \quad & 38 m(^{12}\text{C}) + 2 m(^{13}\text{C}) + 81 m(^1\text{H}) + m(^{14}\text{N}) + 8 m(^{16}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 736.576141 \text{ u} \\ (2): \quad & 39 m(^{12}\text{C}) + m(^{13}\text{C}) + 80 m(^1\text{H}) + m(^2\text{H}) + m(^{14}\text{N}) + 8 m(^{16}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 736.579063 \text{ u} \\ & p_2 \approx 3.9265 \cdot 10^{-3} \\ (3): \quad & 39 m(^{12}\text{C}) + m(^{13}\text{C}) + 81 m(^1\text{H}) + m(^{15}\text{N}) + 8 m(^{16}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 736.569821 \text{ u} \\ & p_3 \approx 1.5729 \cdot 10^{-3} \\ (4): \quad & 39 m(^{12}\text{C}) + m(^{13}\text{C}) + 81 m(^1\text{H}) + m(^{14}\text{N}) + 7 m(^{16}\text{O}) + m(^{17}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 736.577004 \text{ u} \\ & p_4 \approx 1.3119 \cdot 10^{-3} \\ (5): \quad & 40 m(^{12}\text{C}) + 81 m(^1\text{H}) + m(^{14}\text{N}) + 6 m(^{16}\text{O}) + 2 m(^{17}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 736.577866 \text{ u} \\ (6): \quad & 40 m(^{12}\text{C}) + 80 m(^1\text{H}) + m(^2\text{H}) + m(^{15}\text{N}) + 8 m(^{16}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 736.572743 \text{ u} \\ & p_6 \approx 3.350 \cdot 10^{-5} \\ (7): \quad & 40 m(^{12}\text{C}) + 80 m(^1\text{H}) + m(^2\text{H}) + m(^{14}\text{N}) + 7 m(^{16}\text{O}) + m(^{17}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 736.579925 \text{ u} \\ & p_7 \approx 2.794 \cdot 10^{-5} \\ (8): \quad & 40 m(^{12}\text{C}) + 81 m(^1\text{H}) + m(^{15}\text{N}) + 7 m(^{16}\text{O}) + m(^{17}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 736.570684 \text{ u} \\ & p_8 \approx 1.1119 \cdot 10^{-5} \\ (9): \quad & 40 m(^{12}\text{C}) + 81 m(^1\text{H}) + m(^{14}\text{N}) + 7 m(^{16}\text{O}) + m(^{18}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 736.573678 \text{ u} \\ (10): \quad & 40 m(^{12}\text{C}) + 79 m(^1\text{H}) + 2 m(^2\text{H}) + m(^{14}\text{N}) + 8 m(^{16}\text{O}) + m(^{31}\text{P}) - m(e^-) &= 736.581985 \text{ u} \end{aligned}$$

## 4. Peak

(1):	$37 m(^{12}C) + 3 m(^{13}C) + 81 m(^1H) + m(^{14}N) + 8 m(^{16}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$	= 737.579496 u
(2):	$38 m(^{12}C) + 2 m(^{13}C) + 80 m(^1H) + m(^2H) + m(^{14}N) + 8 m(^{16}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_2 \approx 8.218698 \cdot 10^{-4}$	= 737.582418 u
(3):	$38 m(^{12}C) + 2 m(^{13}C) + 81 m(^1H) + m(^{15}N) + 8 m(^{16}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_3 \approx 3.292316 \cdot 10^{-4}$	= 737.573176 u
(4):	$38 m(^{12}C) + 2 m(^{13}C) + 81 m(^1H) + m(^{14}N) + 7 m(^{16}O) + m(^{17}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_4 \approx 2.745921 \cdot 10^{-4}$	= 737.580358 u
(5):	$39 m(^{12}C) + m(^{13}C) + 79 m(^1H) + 2 m(^2H) + m(^{14}N) + 8 m(^{16}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_5 \approx 1.77296 \cdot 10^{-5}$	= 737.585340 u
(6):	$39 m(^{12}C) + m(^{13}C) + 80 m(^1H) + m(^2H) + m(^{15}N) + 8 m(^{16}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_6 \approx 1.43844 \cdot 10^{-5}$	= 737.576098 u
(7):	$39 m(^{12}C) + m(^{13}C) + 80 m(^1H) + m(^2H) + m(^{14}N) + 7 m(^{16}O) + m(^{17}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_7 \approx 1.19972 \cdot 10^{-5}$	= 737.583280 u
(8):	$39 m(^{12}C) + m(^{13}C) + 81 m(^1H) + m(^{15}N) + 7 m(^{16}O) + m(^{17}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_8 \approx 4.8059 \cdot 10^{-6}$	= 737.574038 u
(9):	$39 m(^{12}C) + m(^{13}C) + 81 m(^1H) + m(^{14}N) + 7 m(^{16}O) + m(^{18}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_9 \approx 7.0633981 \cdot 10^{-3}$	= 737.577033 u
(10):	$39 m(^{12}C) + m(^{13}C) + 81 m(^1H) + m(^{14}N) + 6 m(^{16}O) + 2 m(^{17}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_{10} \approx 1.7536 \cdot 10^{-6}$	= 737.581221 u
(11):	$40 m(^{12}C) + 78 m(^1H) + 3 m(^2H) + m(^{14}N) + 8 m(^{16}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$	= 737.588262 u
(12):	$40 m(^{12}C) + 79 m(^1H) + 2 m(^2H) + m(^{15}N) + 8 m(^{16}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_{12} \approx 1.513 \cdot 10^{-7}$	= 737.579020 u
(13):	$40 m(^{12}C) + 79 m(^1H) + 2 m(^2H) + m(^{14}N) + 7 m(^{16}O) + m(^{17}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_{13} \approx 1.262 \cdot 10^{-7}$	= 737.586202 u
(14):	$40 m(^{12}C) + 80 m(^1H) + m(^2H) + m(^{15}N) + 7 m(^{16}O) + m(^{17}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_{14} \approx 1.024 \cdot 10^{-7}$	= 737.576960 u
(15):	$40 m(^{12}C) + 80 m(^1H) + m(^2H) + m(^{14}N) + 6 m(^{16}O) + 2 m(^{17}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_{15} \approx 3.776 \cdot 10^{-7}$	= 737.584143 u
(16):	$40 m(^{12}C) + 80 m(^1H) + m(^2H) + m(^{14}N) + 7 m(^{16}O) + m(^{18}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_{16} \approx 1.504451 \cdot 10^{-4}$	= 737.579955 u
(17):	$40 m(^{12}C) + 81 m(^1H) + m(^{15}N) + 6 m(^{16}O) + 2 m(^{17}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_{17} \approx 1.50 \cdot 10^{-8}$	= 737.574901 u
(18):	$40 m(^{12}C) + 81 m(^1H) + m(^{15}N) + 7 m(^{16}O) + m(^{18}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_{18} \approx 6.02666 \cdot 10^{-5}$	= 737.570713 u
(19):	$40 m(^{12}C) + 81 m(^1H) + m(^{14}N) + 5 m(^{16}O) + 3 m(^{17}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$	= 737.582083 u
(20):	$40 m(^{12}C) + 81 m(^1H) + m(^{14}N) + 6 m(^{16}O) + m(^{17}O) + m(^{18}O) + m(^{31}P) - m(e^-)$ $p_{20} \approx 5.02647 \cdot 10^{-5}$	= 737.577895 u

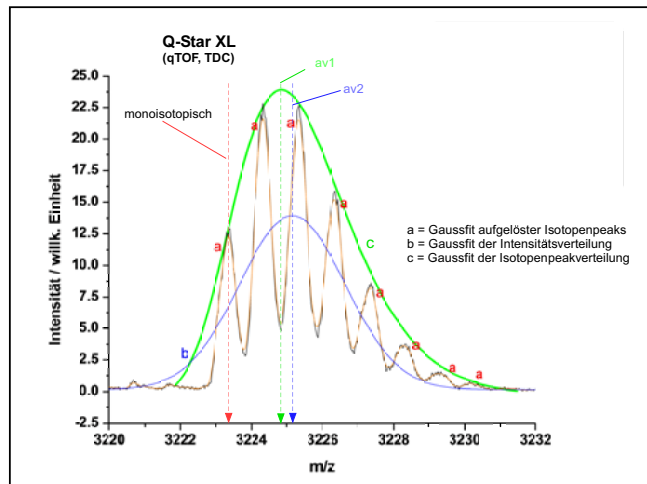
Tabelle 3.6: Relative Häufigkeit der sortenreinen und nichtsortenreinen (in Klammern) schweren Isotope von DPPC als  $[M+H]^+$  im Verhältnis zum monoisotopischen Peak. Es tritt im Vergleich zu einer reinen Kohlenstoffisotopendifferenz ( $^{13}C-^{12}C$ ) von angenommenen + 1.00335483781 u, aufgrund der weiteren Isotope  $^2H$ ,  $^{17}O$ ,  $^{15}N$  eine theoretische Differenz von + 1.003367947 u zwischen dem monoisotopischen Peak und dem Zentroid des zweiten (nichtvollständig aufgelösten) Peaks der Verteilung auf und damit ein Shift von ca. + 13 ppm. Je nach Massenaufklärungsvermögen des Spektrometers und der Symmetrie der Peakform ist demnach generell eine praktische Massenabweichung zwischen z.B. dem ersten und zweiten bzw. dem dritten und zweiten Peak bei signifikant abweichender Isotopzusammensetzung einer chemischen Verbindung zu erwarten. Ein weiteres Kriterium, neben dem Peakabstand ist der Massendefekt selbst bzw. die absolute Massendifferenz zur nominalen Masse des monoisotopischen Peaks. Während zur Peakdifferenz nur die schwereren Isotope beitragen, sind für den Massendefekt des monoisotopischen Peaks die absoluten Häufigkeiten aller relativ häufigsten Isotope, also z.B. auch die des Reinelements  $^{31}P$  von Bedeutung. In der Tabelle wird das Proton  $^1H^+$  zur Häufigkeit der  $^1H, ^2H$ -Verteilung gerechnet. Es bedeuten (n.e.) = nicht enthalten, (n.s.K.) = nicht sortenreine Kombinationen.

Isotop	2. Peak (1x)	3. Peak (2x)	4. Peak (3x)
$^2H$	$9.145045 \cdot 10^{-3}$	$4.12932 \cdot 10^{-5}$	$(1.227 \cdot 10^{-7})$
$^{13}C$	$4.29359801 \cdot 10^{-1}$	$8.98705 \cdot 10^{-2}$	$1.2219 \cdot 10^{-2}$
$^{17}O$	$3.05542 \cdot 10^{-3}$	$4.08432 \cdot 10^{-6}$	$(3.1 \cdot 10^{-9})$
$^{18}O$	n.e.	$1.6451 \cdot 10^{-2}$	n.e.
$^{15}N$	$3.6634 \cdot 10^{-3}$	n.e.	n.e.
+ n.s.K.	n.e.	(2), (3), (4) (6), (7), (8)	(2) - (10), (12) - (18), (20)
$I_n/I_1$ *	44.5	11.3	2.1

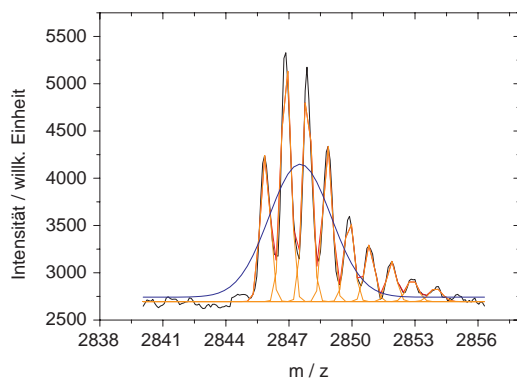
\* Berechnete Werte nach (2.3), (2.4), normierte Wahrscheinlichkeiten in [%]

Quelle: Nat. Inst. of Standards and Technology, U.S. Commerce Department (NIST).

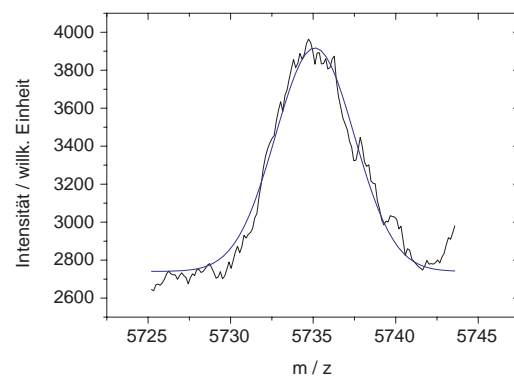
## Multiplet-Verteilung und Näherung



(a)



(b)



(c)

Abbildung 3.14: (a) Näherungen an die Peakverteilung eines potenziellen Peptidmoleküls nach unterschiedlichen Kriterien. Die alle Peaks einhüllende Näherung c, wie auch die jeden aufgelösten Peak einhüllende Näherung a, beziehen sich auf eine angenommene Multinomial- bzw. Gaussverteilung der Messwerte, wobei die Lage des Massencentroides die höchste Intensität erreicht bzw. übertrifft. Die andere Näherung b (av2) geht von einer flächennormierten symmetrischen Kurve aus, die alle Messwerte der Peakgruppe berücksichtigt. Die Kurven a und b können durch Bildung der Kovarianzmatrix  $(x,y)$  und Optimierung bis zur Konstanz des  $\chi^2$ -Wertes erhalten werden. Fitprozeduren, die dabei das *Levenberg-Marquardt*-Verfahren [232] verwenden, sind Bestandteil kommerzieller Software. (a) MALDI-Messung am orthogonalen Hybridspektrometer Q-Star XL mit TDC-Detektion ( $t_{bin} = 625ps$ ). (b) Messungen am Flugzeitspektrometer ALADIM II mit optimierter Auflösung des Analyten Melittin und (c) geringer Auflösung des Analyten Insulin.

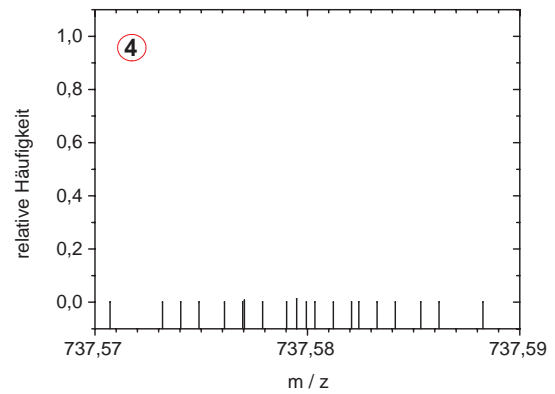
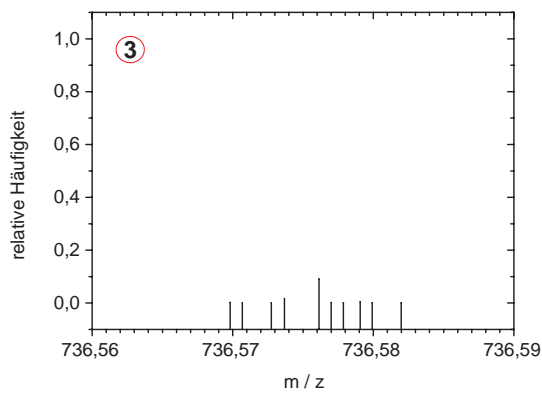
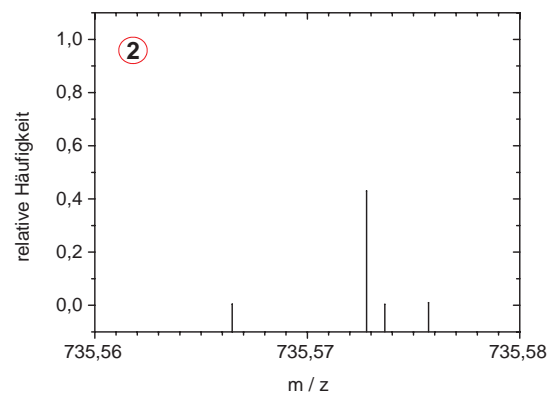
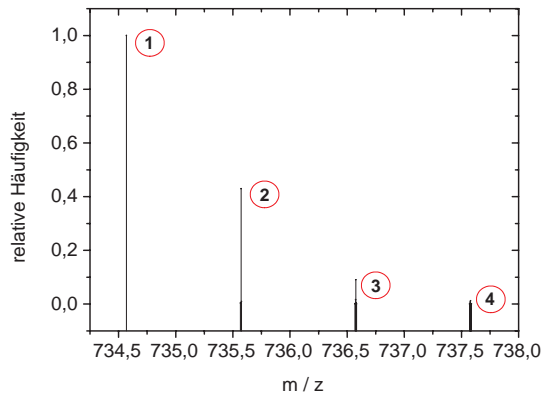
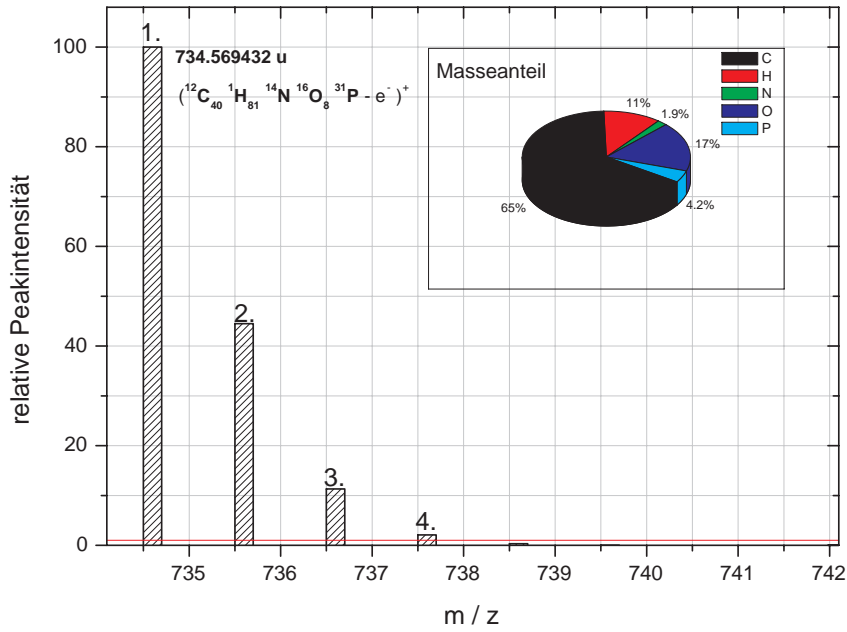
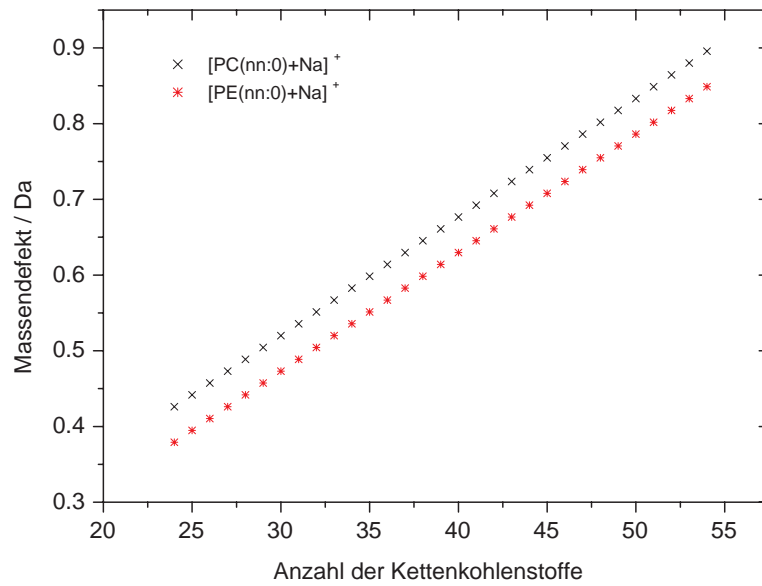


Abbildung 3.15: Theoretische relative Isotopintensitäten in einem MALDI-Massenspektrum von DPPC als  $[M + H]^+$  unter Berücksichtigung der häufigsten Spezies (Tabelle 3.6). Außer im monoisotopischen (1.) Peak eines Einzelspektrums tragen zu allen anderen Peaks (2. - 4.) mehrere Isotopspezies bei, die in den entsprechenden Häufigkeiten der Centroidmassen zusammengefasst sind. Dies führt insgesamt zu einem Multiplet. Die statistische Verteilung der Signale einzelner Spezies ist nicht berücksichtigt (Strichdarstellung).



---

Abbildung 3.16: Charakteristischer Massendefekt ausgewählter Lipidverbindungen mit  $nn =$  Anzahl der Kettenkohlenstoffe. Neben Elutionszeiten chromatographischer Trennverfahren kann auch der Massendefekt in Spektren als analytische Information zur Identifikation von Peakgruppen bestimmter Substanzklassen verwendet werden.



In Abbildung 3.16 ist die linear ordnende Eigenschaft des (praktisch) bei der Fettsäurekettenverlängerung identischen Massendefektes von  $\text{CH}_2$ -Einheiten einzelner Phospholipide zu erkennen. Die Berechnung eines aufgelösten Isotopenpeaks einer bekannten chemischen Verbindung kann ab dem Unterschreiten einer bestimmten relativen Intensität gegenüber dem monoisotopischen Peak oft abgebrochen werden, da ein entsprechender Peak im realen Spektrum sehr wahrscheinlich nicht mehr vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden sein wird (siehe auch Abbildung 3.15). Bei einem Multiplet einer Verbindung kann ab einer bestimmten Molekularmasse, die den Betrag der Massenauflösung einfachgeladener Ionensignale übersteigt, eine explizite Berechnung jedes Isotopenpeaks durch die Berechnung der Multiplet-Einhüllenden ersetzt werden. Eine Näherung ist aber auch für das symmetrische Signal einer aufgelösten Isotoppopulation (i.d.R. der monoisotopische Peak) bzw. das Zentroid unvollständig aufgelöster Mischpopulationen möglich. Nimmt man eine Gaussverteilung an, dann kann die Peakmasse  $m_z$  (i.d.R. das Massenzentroid von Rein- und Mischpopulationen) und die FWHM-Massenauflösung  $R$  dabei zur Ermittlung des Lagemaßes der Standardabweichung  $\sigma$  sehr einfach herangezogen werden,  $\sigma = \frac{m_z}{2R\sqrt{2\ln(2)}}$ . Bei symmetrischen Peakformen ist darüber eine Abschätzung der Varianz innerhalb der Isotopverteilung möglich. Der Massenschwerpunkt eines Multiplets entspricht im Spektrum i.d.R. keinem diskreten Isotopenpeak, sondern der Durchschnittsmasse aller beteiligten Isotopspezies, gemäß ihrer Häufigkeit ( $\rightarrow$  *average mass*). Ein (vollständig) unaufgelöstes Multiplet kann aber dazu verwendet werden, um die *monoisotopische* Masse zu nähern. Bei kleinen (nichtmodifizierten) Peptiden ist dies in MALDI-TOF-Spektren in guter Näherung über die Beziehung  $M_{mon} = M_{av} - \frac{M_{av}}{1463}$  möglich [223] [234] [235].

Besonders die kohlenstoffreichen Biomoleküle<sup>46</sup> ermöglichen eine Vorhersage über das masseabhängige Intensitätsverhalten der höheren Isotopenpeaks gegenüber dem 1. Peak (monoisotopischer Peak) der Verteilung (relative Intensitätsentwicklung). Die „relative Intensitätsentwicklung“ jedes höheren Peaks innerhalb einer Isotopverteilung ergibt sich bis zu einer Molekularmasse von etwa 2 kDa in erster Näherung aus der Binomialverteilung des Kohlenstoffs [234]. Interessant wird in diesem Zusammenhang das gegenüber dem natürlichen Vorkommen der Isotope erhöhte Auftreten seltenerer Isotope oder Elemente in einer bekannten Verbindung. Es kann sich dabei z.B. um Deuterium, Schwefel oder Selen (Selenocystein) handeln. Eine Anreicherung ist entweder durch biologische Prozesse (posttranslationale Modifikationen), Mutation bzw. Umwelteinfluss bedingt oder kann durch Experimente bewusst hervorgerufen werden.

### 3.3.2 Messwertlage und Beurteilung

Die stark empirisch ausgerichtete massenspektrometrische Analytik beinhaltet in der Regel *semiquantitative* Messungen. Diese erfordern, im Rahmen der Ergebnisvalidierung, einen gewissen Anteil an stochastischen Überlegungen. Nimmt man alle quantitativ bedeutsamen Aussagen zusammen und berücksichtigt bei der Vielzahl an praktischen wie theoretischen Arbeiten zu MALDI, die allgemein sehr niedrigen *Nachweisgrenzen* der Massenspektrometer<sup>47</sup> und die damit verbundenen geringen Substanzmengen, so muss die Frage nach der Vergleichbarkeit von Ergebnissen zwischen einzelnen Laboratorien sehr kritisch betrachtet werden. In der Regel gelten für alle der Massenspektrometrie vorgelagerten (apparativen) Methoden der Probenbehandlung (Kolbenhubpipetten, Feinwaagen, etc.), die zu einer Präparation der Proben notwendig sind Standardabweichungen, deren absoluter Betrag allein, die Nachweisgrenze der Massenspektrometer i.d.R. deutlich übertrifft. D.h. quantitative Schwankungen über der MS-Nachweisgrenze (die im Vorfeld von Messungen auftreten), sind sehr wahrscheinlich und größer, als die statistischen Schwankungen, die während der Desorption/Ionisierung auftreten können (soweit die Messmethoden und die Präparations-

<sup>46</sup>Vor allem Peptide/Proteine, Kohlenhydrate und Lipide.

<sup>47</sup>Substanzmengen von ca. 1 fmol =  $10^{-12}$  mol für synthetische, aufgereinigte Peptide werden angenommen [8].

techniken identisch sind). An transmissionsoptimierten und kalibrierten Spektrometern ist der Einfluss der gerätebedingten statistischen Schwankungen eine bestimmbare Größe und bei regelmäßiger Kontrolle i.d.R. experimentell gut handhabbar.

### Relative Standardabweichung der Interlaborvergleichbarkeit

Die Unsicherheit quantitativer Aussagen bei massenspektrometrischen Messungen beruht im direkten Interlaborvergleich, mit großer Wahrscheinlichkeit, auf der Ungenauigkeit die durch die vorbereitenden Probenbehandlungen verursacht werden können. Aus einer Untersuchung von HORWITZ zur *relativen Standardabweichung der Interlabor-Vergleichbarkeit* von analytischen Messergebnissen, im folgenden mit der Abkürzung int. *RSD* bezeichnet, geht eindeutig ein exponentieller Zusammenhang mit geringer werdender Substanzmenge hervor [236]. Diese Untersuchungen basieren auf apparativ methodenübergreifend gesammelten Daten, hauptsächlich aus dem Bereich der Lebensmittelchemie. Diese wurden hinsichtlich der während einer Analyse eingesetzten *relativen* Analytmengen verglichen. Es lässt sich anhand der Approximation in Abbildung 3.17 erkennen, daß bei einer Analyse in der Größenordnung des relativen Sub-ppm-Bereichs, in den Massenspektrometer i.d.R. vordringen, eine int. *RSD* > 10 % auftreten kann.

Vor diesem Hintergrund sind die in der Literatur oft zu findenden Unterschiede in semiquantitativen Messungen identischer Fragestellungen, Analyte und Methoden in massenspektrometrischen Analysen erklärbar und nicht überraschend. Problematisch wird eine relativ hohe int. *RSD* i.d.R. immer dann, wenn bereits bei Messungen in einem Labor (Intralabormessungen) mit insgesamt geringer Experimentanzahl ( $n < 50$ )<sup>48</sup> unter identischen Bedingungen operiert wird. In diesem Fall besteht sehr leicht die Möglichkeit bei Interlaborvergleichen einen Trend zu beschreiben, der initial auf Unterschiede in den *apparativen* Bedingungen, den *individuellen* Probenansätzen und Messmethoden beruht, d.h. auf *systematische* Einflüsse oder *zufällige* Einflüsse mit einem Erwartungswert *ungleich* null. Dieses Risiko tritt besonders häufig bei Proben auf, die nicht standardisiert vorliegen können bzw. die nicht aliquotiert vermessen werden können [218] [220]. Ein Beispiel dieser Art sind *native* biologische Proben, die zu einer bildgebenden MS-Analytik im Rahmen von Imaging-Experimenten herangezogen werden.

### Fehler, Statistik und Bestimmungsgrenzen

Im Falle der Unterscheidung zwischen Rauschwerten und Analytmesswerten ist von einer einseitigen Teststatistik auszugehen. Basierend auf einer Gaussverteilungsannahme der Messwerte und Überlegungen die auf Kaiser zurückgehen, ist eine Signalthöhe zu ermitteln, die eine gewisse „Sicherheit“ beinhaltet nicht fälschlich eine Analytanwesenheit anzunehmen (*Falsch Positive* Ergebnisse, Fehler 1.Art,  $\alpha$ ) [222]. Der Wert  $\alpha$  wird auch als Irrtumswahrscheinlichkeit bezeichnet. Eine daraus resultierende Formulierung ist ein echtes Analytsignal erst dann anzunehmen, wenn die Signalthöhe den Basislinienmittelwert plus dem dreifachen der Standardabweichung erreicht hat. Diese Annahme berücksichtigt allerdings nur unzureichend die Möglichkeit einer Analytsignalverwerfung, obwohl Analyt vorhanden ist (*Falsch Negative* Ergebnisse, Fehler 2.Art,  $\beta$ ), vor allem dann, wenn der kritische Wert  $L_C = c$  dem Detection Limit  $L_D$  gleichgesetzt wird. Bei unveränderter 3 Sigma-Annahme ( $\text{Sigma} = \sigma_B = \text{Standardabweichung des Rauschens einer Blindprobe}$ ), beträgt das Risiko-II einer falsch negativen Interpretation des Analytvorkommens dabei, wenn  $\alpha = 0.15$  Prozent angenommen wird, gerade 50 Prozent. Eine Steigerung des Analytsignalerwartungswertes  $L_D$  (Sollmittelwert der Stichprobe) auf einen Basislinienmittelwert plus 6 Sigma erniedrigt die  $\beta$ -Wahrscheinlichkeit, bei  $\alpha = 0.15$  Prozent auf  $\beta = 0.12$  Prozent. Nimmt man

<sup>48</sup>Wenn nicht bekannt ist, ob es sich um normalverteilte Daten handelt.

## Interlaborvergleichbarkeit - Horwitztrompete

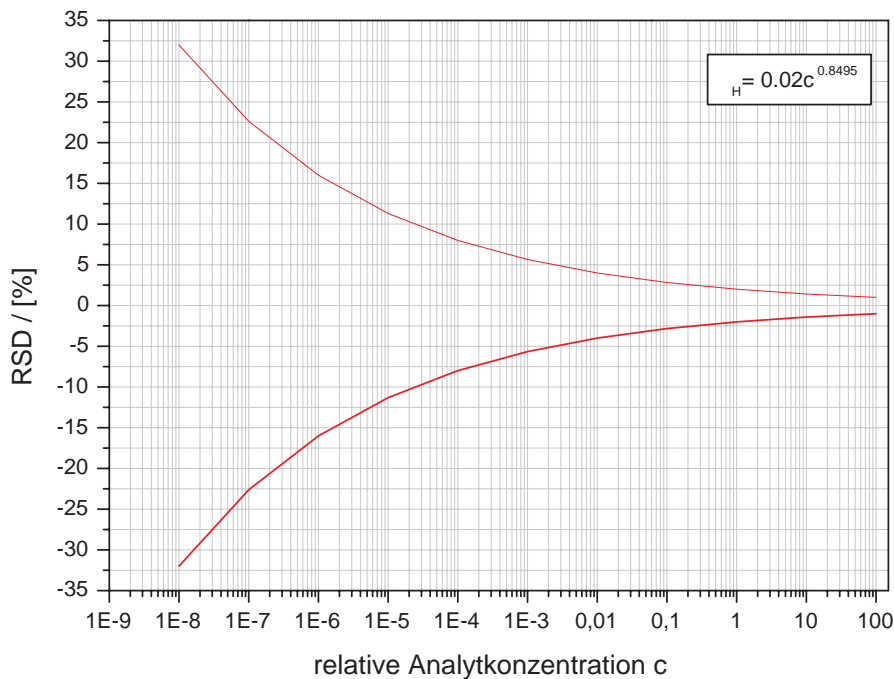


Abbildung 3.17: Relative Standardabweichung der Vergleichbarkeit  $\sigma_H$  von Interlaborergebnissen, nach Horwitz. Exponentielle Beziehung der interlabor RSD zur relativen Analytkonzentration.

bei Kaisers Ursprungsdefinition der Nachweisgrenze ( $L_D = 3\sigma_B$ ) für  $\alpha = 5$  Prozent an, so ergibt sich daraus für  $\beta = 8.77$  Prozent, wenn der kritische Wert  $c = L_C = L_D$  angenommen wird. Erhöht man das Kriterium auf die Formulierung Basislinienmittelwert plus  $3.3\sigma_B$ , so erreicht  $\beta$  in etwa den Wert für  $\alpha = 5$  Prozent. Eine Voraussetzung solcher Rechnungen ist dabei die Kenntnis der Varianzen der Rausch- und Analytwertverteilungen und die Wahl eines kritischen Wertes  $c$  bzw.  $L_C$ . Es handelt sich bei normalverteilten Daten dann um parallelverschobene Normalverteilungen  $N(\mu, \sigma^2)$ . In der Regel ist eine Vorhersage von  $\beta$  aber so nicht beliebig zu treffen, d.h.  $\beta$  kann unabhängig von  $\alpha$  sein. In der Praxis können viele Alternativhypothesen für das unterschiedlich ausgeprägte Auftreten von  $\beta$  verantwortlich sein (sinkende Power<sup>49</sup> für viele Alternativen). Da  $\beta$  also meistens unbekannt ist, kann bei normalverteilten Daten mit vorzugebendem  $\alpha$ , dieses bestenfalls in Abhängigkeit von  $\alpha$  geschätzt werden. Eine Abschätzung des Risiko-II-Fehlers für einen konkreten Wert wird unter der Voraussetzung einer bekannten Varianz i.d.R. in Form einer Bereichsschätzung mit der Angabe eines maximal akzeptablen  $\beta$  für einen kritischen Wert der Stichprobe gesetzt. Bei der Frage nach der Hypothesenannahme wird aus einer Teilpopulation (Stichprobe) zunächst ein Testwert  $T$  herangezogen, der eine Prüfgröße für die Annahme oder Ablehnung der Nullhypothese ( $H_0$ ) bereitstellt. Für die Nullhypothese gilt im Falle zufälliger Rauschwerte

$$H_0 : \mu \leq \mu_0$$

<sup>49</sup>Als Power eines statistischen Tests wird der Wert  $1-\beta$  bezeichnet.

Handelt es sich dagegen um signifikante (zufällig verteilte) Analytmesswerte, gilt die Annahme der Alternativhypothese  $H_1$

$$H_1 : \mu > \mu_0$$

Das heißt der Testwert  $T$  sollte größer sein, als ein *kritischer* Wert  $c_{1-\alpha}$ , der aus der Stichprobenverteilung derart ermittelt werden muss, sodaß die Wahrscheinlichkeit  $P_\mu(T > c_{1-\alpha}) \leq \alpha$  für alle Stichprobenmittelwerte  $\mu$  aus rein zufälligen Rauschwertverteilungen (Blank) gilt. Die Formulierung als Ungleichung berücksichtigt dabei speziell diskrete Verteilungen wie z.B. die Poisson-Verteilung, die i.d.R. zufällige Rauschwertverteilungen beschreibt. Der Wert  $\mu_0$  steht für den wahren Erwartungswert der Rauschwertverteilung, bei dessen zu definierendem Überschreiten eine Detektionsentscheidung geboten ist. Bei stetigen Verteilungen, wie der Normalverteilung entspricht  $c_{1-\alpha} = z_{1-\alpha}\sigma$  dann dem entsprechenden Wert der Standardnormalverteilung. Mit  $\alpha = 5\%$  also ca.  $L_C = 1.645\sigma_B$ . Man nimmt die Nullhypothese dann an, falls  $T \leq c_{1-\alpha}$  ist und lehnt sie andernfalls ab (Annahme von  $H_1$ ). Dieser Test sichert dabei aber nur die Entscheidung für  $H_1$  zu einem Niveau  $\alpha$  mit der sogenannten Gütefunktion  $g(\mu) \leq \alpha$  ab. Definiert man jetzt eine Wahrscheinlichkeit  $\gamma$ , bei der ein willkürlicher Messwert  $x = \mu_1$  sicher als Analytsignal erkannt werden soll, entspricht das maximale Beta, welches noch toleriert werden kann  $\beta_{max} = 1 - \gamma$ . Dieser Wert legt dabei gleichzeitig die mindestens erforderliche Stichprobenanzahl bei einem gewählten  $\alpha$  und bekannter Varianz(en) fest, nämlich  $n \geq \frac{\sigma^2}{(\mu_1 - \mu_0)^2} (z_{1-\alpha} - z_{1-\gamma})^2$  mit  $z$  der normierten Zufallsvariable der Standardnormalverteilung. Die Funktion  $1 - g(\mu)$  wird als Operationscharakteristik bezeichnet. Ein statistischer Test ist entweder über die Gütefunktion oder über die Operationscharakteristik ausreichend (eindeutig) bestimmt. Statistische Tests werden als konsistent bezeichnet, wenn bei größeren Teilpopulationen genauere Testergebnisse erhalten werden und sie arbeiten unverfälscht, wenn die Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese abzulehnen, da die Alternativhypothese ( $H_1$ ) zutrifft größer ist, als die Wahrscheinlichkeit für eine Ablehnung der Nullhypothese, obwohl diese zutreffend ist.

Die IUPAC-Richtlinien legen das angepasste 3.3-Sigma-Kriterium ( $3.3\sigma_B$ ) von Kaiser für die Ermittlung des Detection Limit ( $L_D$ ) normalverteilter und voneinander unabhängiger, metrisch skalierten Messwerte bei bekannter Varianz sowie der Annahme  $\alpha = \beta = 5\%$  und Homoskedastizität (Varianzhomogenität) nahe. Zieht man die nicht mehr normalverteilte Verteilung von Mittelwerten aus normalverteilten Stichproben heran, aus denen zusätzlich die unbekannte Varianz geschätzt werden muss, erhält man ein größeres  $L_D$  aus einer entsprechenden t-Verteilung. Gilt weiterhin  $\alpha = \beta = 5\%$  und liegt ein Stichprobenumfang von z.B.  $n = 4$  vor, steigt der Wert für  $L_D$  auf  $4.26\sigma_B$ . Das Quantification Limit  $L_Q$ , als Wert ausreichender Präzision und Beginn des linearen Messbereiches, wird nach IUPAC in Abhängigkeit der RSD (relative Standardabweichung) definiert und beträgt bei normalverteilten Messwerten bekannter Varianz und identischer Fehlerwahrscheinlichkeiten (5%)  $L_Q = 3.04 L_D$  (mit der IUPAC-Default-RSD = 10%). Kann eine Varianzhomogenität (Homoskedastizität bei steigender Messgröße) nicht vorausgesetzt werden, muss mit einem in Abhängigkeit des Rauschverhaltens exponentiellen Wachstum der Varianz und einem in erster Näherung linearen Anstieg der Standardabweichung gerechnet werden (Heteroskedastizität). Steigt beispielsweise die Standardabweichung, als Funktion der Messwertgröße mit einer konstanten Rate  $\frac{d\sigma}{dx} = 0.04$  an, erhält man mit  $L_C = 1.645\sigma_B$ ,  $L_D = L_C + 1.645\sigma_D = 3.52\sigma_B$ , mit  $\sigma_D = \sigma_B + 0.04L_D$  für das Quantification Limit  $L_Q = k_Q\sigma_B = 10\sigma_Q = 16.67\sigma_B$ , mit  $k_Q = 1/RSD = 10$  und  $\sigma_Q = \sigma_B + 0.04L_Q$ . Dies ist gleichbedeutend mit einem Anstieg auf  $L_Q = 4.73L_D$  [218]. Der Parameter  $k_Q$  ist dabei der *Variationskoeffizient*.

Es sind unterschiedliche statistische Testverfahren bekannt, die dabei nicht alle eine Normalverteilung der untersuchten Daten zugrundelegen bzw. voraussetzen [219]. Man kann statistische Tests allgemein in parametrische Prüfverfahren und nicht-parametrische (parameterfreie) Prüfverfahren unterteilen. Para-

metrische Tests machen konkrete Aussagen über Kenngrößen (Momente) einer Verteilung wie z.B. das erste Moment (arithmetischer Mittelwert) einer Messwertverteilung. Nicht-parametrische Tests treffen dagegen Aussagen über die Verteilungsart der Daten (z.B. Normalverteilung) die getestet werden. Übereinstimmend liegen jedem Test dabei definierte Arbeitshypothesen zugrunde die sich nicht verifizieren (auf den Wahrheitsgehalt hin überprüfen) sondern nur falsifizieren (verfälschen, widerlegen) lassen. Die Nullhypothese  $H_0$  besagt dabei, daß der vermutete Einfluss auf ein untersuchtes System für dessen Untersuchungszustand nicht signifikant war, die Beobachtungen also mit einem gewissen Risiko zufälliger Natur sind. Geht man von normalverteilten Daten aus und verwendet parametrische Tests mit einer Risiko I-Wahrscheinlichkeit ( $\alpha$ , Irrtumswahrscheinlichkeit) von z.B. 5 Prozent, besagt dies, daß die Nullhypothese immer dann anzunehmen ist, wenn ihre Wahrscheinlichkeit mindestens 5 Prozent beträgt. Ist die Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese geringer als 5 Prozent, ist diese abzulehnen. Wählt man für  $\alpha \rightarrow 0$ , läuft man dabei Gefahr fast keinen (potenziell signifikanten) Unterschied mehr zu erkennen. Wählt man  $\alpha$  dagegen relativ groß ( $\alpha \gg 5\%$ ), erkennt man auch sehr kleine (potentiell signifikante) Unterschiede, um den Preis eines größeren Risikos I (Fehler 1. Art). In Abbildung 3.18 sind die Fehlerarten und ihre „Lage“ innerhalb der Blank und Analytverteilungen exemplarisch dargestellt.

Im Falle diskreter oder stetiger Verteilungen von Zufallsgrößen (Zuallsvariablen), für die eine Dichte angegeben werden kann, sind zusammen mit konkreten Angaben über die Erwartungstreu und die Konsistenz eines Punktschätzers Fehlerdefinitionen anwendbar. Vertrauensbereiche sind dabei Erweiterungen der Schätzung (Intervallschätzer). Eine Schätzung liefert einen Erwartungswert  $\mathbf{E}$  und gilt als erwartungstreu, wenn sie mindestens im Mittel den richtigen Wert abbildet. Liefert die Schätzung dabei immer genauere Werte, je mehr Beobachtungen zugrundegelegt werden, nennt man dieses Verhalten konsistent. Als Beurteilungskriterium für die Güte eines Punktschätzers, z.B. den arithmetischen Mittelwert  $\bar{X}$  für den wahren Wert  $X$ , eignet sich im besonderen der mittlere quadratische Fehler *MSE* (*mean squared error*). Dieser ist definiert als:

$$\text{MSE} = \text{Varianz} + (\text{Bias})^2 = \mathbf{E}(\bar{X} - X)^2$$

mit der Größe  $\mathbf{E}\bar{X} - X$ , dem Bias oder auch Verzerrung des Schätzers. Im Falle der Erwartungstreu (kein Bias) entspricht der MSE gerade der Varianz. Bezogen auf eine Einzelmessung wird oft eine Fehlerabschätzung in Form des sogenannten *RMS-Fehlers* (*rms-error*) angegeben, der auf akzeptierte Werte bezogen wird<sup>50</sup> (siehe Anhang D). Eine Abweichung der Erwartungstreu ist prinzipiell auf unterschiedliche Ursachen zurückführbar. Zum einen auf das Vorkommen eines systematischen Fehlers z.B. während der Messungen oder auf einen zufälligen Fehler, dessen Erwartungswert ungleich 0 ist [220]. Wendet man z.B. die Maximum-Likelihood-Methode<sup>51</sup> auf den Schätzer der Stichprobenvarianz einer normalverteilten Zufallsgröße an, folgt daraus, daß diese nicht erwartungstreu für die (unbekannte) Varianz der Verteilung ist. Ihr Erwartungswert ist  $\mathbf{E}s^2 = \frac{n-1}{n} \sigma^2$  mit dem Bias  $\mathbf{E}s^2 - \sigma^2 = -\frac{1}{n}\sigma^2$ . Der Bias wird asymptotisch kleiner und der Schätzer deshalb erst für große Stichprobenumfänge  $n$  erwartungstreu<sup>52</sup>.

<sup>50</sup>Im mathematischen Sinne besteht ein Unterschied zwischen dem RMS und der Standardabweichung. Der RMS bezieht sich auf akzeptierte Werte, die Standardabweichung auf den Mittelwert. Gelegentlich wird der RMS auch synonym zur Standardabweichung RMSE (ohne Bias) verwendet.

<sup>51</sup>Die Maximum-Likelihood-Methode ist ein parametrisches Testverfahren, das anders als z.B. die Methode der kleinsten Quadrate von der maximal möglichen Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses ausgeht.

<sup>52</sup>Da die Verzerrung in diesem Fall aber bestimmt werden kann, ist es durch einen entsprechenden Faktor  $\frac{n}{(n-1)}$  möglich, diese zu berücksichtigen.

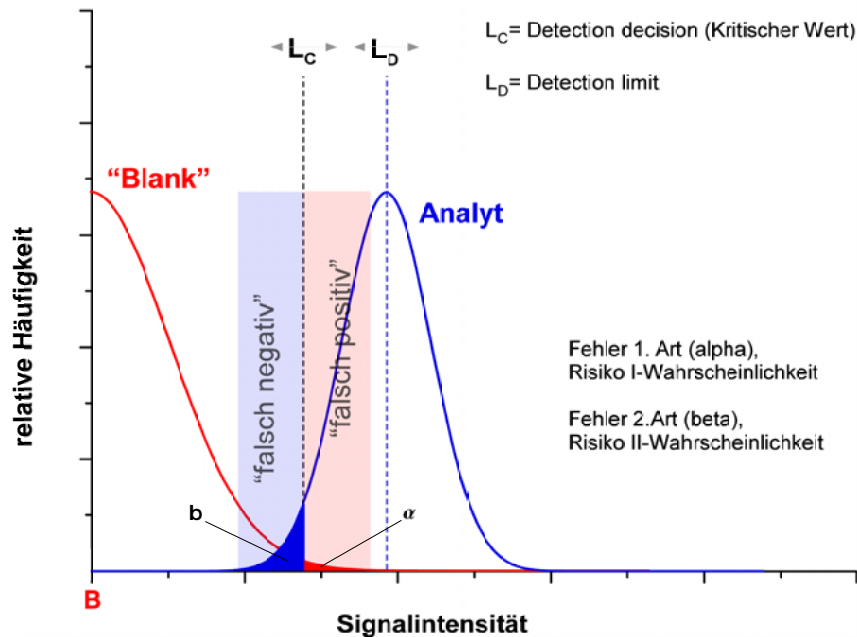


Abbildung 3.18: Illustration der Fehler 1. Art und 2. Art, anhand der angenommenen Dichtefunktion(en) einer Leerprobenverteilung (Blank, rot) und einer Messprobe mit Analytwertverteilung (blau).

### 3.3.3 Native biologische Proben

Im Gegensatz zu konventionellen MALDI-Proben liegt bei nativen Proben überwiegend eine veränderte Rauschlast vor, da die Anzahl potenziell desorbier- und ionisierbarer Spezies zunimmt. Dies wirkt sich im allgemeinen negativ auf die Darstellbarkeit einzelner Analyte aus da, bei direkter Überführung in den Massenanalysator, kein (verwendbarer) Unterschied zwischen Nutz- (Analyt) und Störsignal (Rauschen) identischer  $m/z$  besteht.

Bei MALDI-Messungen handelt es sich pro Puls, soweit nicht bis zum vollständigen Abtrag an einer Position gemessen wird, hauptsächlich um eine Analyse der oberflächennahen Bereiche einer Probe. Dabei muss der Begriff der „Oberfläche“ vor allem strukturell, als im weiteren Sinne geltend verstanden werden, da in der Regel ein deutlicher Volumenabtrag erfolgt. Dieser weist zudem an den meisten (biologischen) „Materialien“ ein deutliches Tiefenprofil (Topologie) auf [71]. Die Eindringtiefe der verwendeten Laserstrahlung sowie die Abtragsrate an Probenmaterial (Ablation) bestimmen dabei, in erster Linie, im Zusammenhang mit einer gerätespezifischen *Sensitivität* (Gerätesensitivität), die pro Laserimpuls erforderliche absolute Menge eines Analyten im Messprozess.

Die Kristallgröße und die Proben-topologie erzeugen zudem bereits vor einer Messung ein Höhenprofil, wobei die vertikalen Unterschiede entsprechender Ionentrajektorien bei linearen TOF-Messungen ohne DE vollständig erhalten bleiben. Unterschiedliche Analytverteilungen innerhalb der Präparation führen mit auskristallisierenden Matrices zu einer „Kontakteffizienz“, die insgesamt stark von der Kristallgröße, der Verteilung der Matrix und der Mobilität der Analyte innerhalb der Präparation abhängt. Besonders an *nativen* biologischen Proben ist der Kristallisationsvorgang während einer Matrixpräparation nur bedingt über die Präparationstechnik selbst beeinflussbar und sehr stark von der chemischen (Hydrophilie, Polarität) und physikalischen (Topologie, Permeabilität) Oberflächenbeschaffenheit der biologischen Probe abhängig.



Als die effektiv für eine Desorption/Ionisierung biologischer Moleküle in „typischen“ Extraktionsvolumina entscheidende physikalische Größe, wird die pro Extraktionsvolumen deponierbare Energie angesehen [1] [8] (Kapitel 1).

Sehr viel ungenauer sind dagegen die Kenntnisse über die tatsächliche Ionisierungseffizienz bei der Vermessung nativer Proben. Gleiches gilt für den Mechanismus der maßgeblich für den Hauptanteil der letztlich detektierten Analytionen verantwortlich ist. Die Daten hierüber sind i.d.R. aus artifiziellen Messungen an Ein- bzw. Zweikomponentensystemen abgeleitet [8] (Kapitel 1) [71].

Biologische Zell- und Gewebepräparate machen es demnach generell erforderlich, experimentell mit den natürlich vorkommenden absoluten Mengen einzelner Analyte aus den unterschiedlichen chemischen Substanzklassen umzugehen. Es handelt sich dabei quantitativ vor allem um Lipide, Kohlenhydrate, Proteine und Peptide sowie auch um Stoffwechselmetabolite und Nukleinsäuren. Die Analyte liegen dabei i.d.R. als Gemisch vor und es kann im Gegensatz zu „klassischen“ MALDI-Untersuchungen an kontrolliert aufgereinigten und (auf)konzentrierten Analyten, keine Anpassung der chemischen Umgebungsbedingungen in einem qualitativ vergleichbaren Ausmaß erfolgen. Ein solches Vorgehen würde die Probenzusammensetzung bzw. die Analytverteilung der nativen Probe direkt beeinflussen und verbietet sich deshalb vor allem bei ortsauflösenden (bildgebenden) Messungen. Solche Bedingungen widersprechen aber grundsätzlich einer Vorgehensweise, wie sie zu einer *absoluten* Quantifizierung in Messproben mit sehr nachweisempfindlichen Messgeräten prinzipiell erforderlich ist. Bei absoluter Quantifizierung ist eine Homogenisierung und Aliquotierung einer zu analysierenden Probe eine Voraussetzung, um eine statistisch gesicherte Auswertung erhalten zu können. Weiterhin bedeutet dies, daß teilweise erheblich störende Substanzen, wie z.B. anorganische Salze oder potenzielle Analyte aus anderen chemischen Substanzklassen, zunächst an Ort und Stelle verbleiben und ggf. zu einer „Maskierung“ der eigentlich unter Betrachtung stehenden Analyte führen können. Es kommen dabei mehrere Mechanismen in Frage, die z.B. zu einer Unterdrückung der Ionisierung oder einer Beeinflussung der Ladungserhaltung in der Gas- oder Festphase beitragen können. Aussagen über den tatsächlichen Einfluss einer möglichen Ursache erfordert experimentell eine gesonderte Untersuchung jedes einzelnen Mechanismus, soweit aus theoretischen Überlegungen vorab kein Ausschluss möglich ist. Denkbare Mechanismen sind in diesem Zusammenhang z.B. *Protonenaustauschreaktionen*, *Clusterbildung* oder sehr allgemein, die Steigerung der *Rauschentwicklung* [8] (Kapitel 1).

Profiling-Experimente ermöglichen hier, gegenüber Imaging-Experimenten, oft eine gezieltere Extraktion von Analyten aus bestimmten Bereichen der nativen Probe, da sie ggf. auch mit aufwendigeren Aufreinigungs- bzw. Trennschritten ergänzt werden können, die teilweise dann auch eine Aliquotierung zulassen. Der Nachteil der Profiling-Ansätze ist aber der relativ größere Aufwand und die, im Vergleich zu Imaging-Messungen, schlechtere räumliche Auflösung sowie die notwendige stärkere Veränderung der Probe vor der Messung. In dieser Arbeit wird ein besonderes Augenmerk auf das *Signal-zu-Rauschverhältnis* und damit die Rauschentwicklung (Rauschrate) gelegt. Das chemische Rauschen ist dabei hinsichtlich seiner Entwicklung bei mehreren voneinander unabhängigen Messungen sowie bei voneinander abhängigen (Mehrfach)Messungen an einer Probenstelle zu betrachten. Elektrostatische MALDI-Quellen an Flugzeitmassenspektrometern sind i.d.R. auf eine *maximale* Ionentransmission hin optimiert, können aber initial nicht zwischen Rauschionen und Analytionen unterscheiden, wenn diese ähnliche Massen bei einer identischen Ladung besitzen. Obwohl die exakte Zusammensetzung des chemischen Rauschens bei MALDI-TOF-Experimenten nur mit einigem Aufwand zu ermitteln ist, ist dennoch bekannt, daß ein wesentlicher Teil durch Matrixcluster verursacht werden kann. Wird während einer Messung die Bestrahlung erhöht,



steigt i.d.R. auch bis zu einem Grenzwert die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Matrixfragmentclustern an. In diesem Zusammenhang wird eine Aussage über einen messbaren Beitrag des jeweils betrachteten Analyten zur Rauschentwicklung in der Umgebung eines entsprechenden Multiplets möglich, da dieser in Referenzspektren fehlt. Analytionen können ebenso fragmentieren und/oder Cluster mit der Matrix und/oder anderen Bestandteilen einer Probe bilden.

### 3.3.4 Arbeitshypothese

Grundlegend für eine qualitative und *quantitative* Analyse komplexer Massenspektren ist die Bestimmung des Rauschpegels (*noise level*). Es gilt hierbei eine *Fallunterscheidung* für einen *definierten* Massenbereich zu berücksichtigen. Diese ergibt sich aus der (allgemeinen) Kombinatorik [45]:

- **Fall 1:** Analyt (A) und Rauschen (R) treten *unabhängig* voneinander auf. Die Einzelwahrscheinlichkeiten multiplizieren sich,  $P(A \cap R) = P(A) P(R)$ .  
**(Spezifisches Rauschen)** Der Analyt trägt zum Rauschen bei, der Beitrag richtet sich nach dem jeweiligen zugrundeliegenden physikalischen Prozess z.B. eine Fragmentierung und/oder eine Clusterbildung etc... .
- **Fall 2:** Analyt und Rauschen können *nicht gemeinsam* auftreten (disjunkte Ereignisse). Die Einzelwahrscheinlichkeiten addieren sich,  $P(A \cup R) = P(A) + P(R)$ .  
**(Unspezifisches Rauschen)** Der Analyt trägt insgesamt nicht zum Rauschen bei. Die Rauschwahrscheinlichkeit wird um die Wahrscheinlichkeit des Analyten reduziert,  $P(R \setminus A) = P(R) - P(A)$ .

Trägt der Analyt nicht zum chemischen Rauschen bei und wird für die chemischen Rauschsignale eine permanente Anwesenheit unterstellt,  $P(R) \neq 0$ , bedeutet dies, daß für das Auftreten von Analytsignalen eine bedingte Wahrscheinlichkeit anzunehmen ist,  $P(A|R) := \frac{P(A \cap R)}{P(R)}$ . D.h. Analytsignale treten auf, obwohl Rauschsignale vorhanden sind. Dies umfasst auch die Situation eines niedrigen Rauschpegels bei deutlich erkennbaren Analytsignalen ( $\text{SNR} \approx 2$ ).

Diese Fallunterscheidungen sind experimentell bei

1. voneinander *unabhängigen* Einzelmessungen  
 → *Einzelpulsspektren* oder  
 → *Summenpulsspektren* (Mehrpulsmessungen an wechselnden Probenstellen) und
2. voneinander *abhängigen* Messungen  
 → *Summenspektren* (Mehrpulsmessungen an derselben Probenstelle)

näher zu untersuchen. Neben der Bestimmung der Basislinie und dem Rauschpegel in Spektren wird zu weiteren Vergleichen i.d.R. eine Normierung durchgeführt. Diese Normierung bezieht sich entweder auf den Basispeak eines betrachteten (einzelnen) Signales, einer Signalgruppe oder dem Basispeak des gesamten Massenspektrums. Im Rahmen von bildgebenden Darstellungen mehrerer Signalverteilungen in einer gerasterten Probe kann ggf. eine Normierung auf den Totalionenstrom sinnvoll sein. Der Totalionenstrom entspricht der Summenintensität, der, über alle Peakflächen in einem Spektrum gebildeten Integrale.

Weiterhin wird das Signal-zu-Rauschverhältnis (SNR) untersucht. Die erhaltenen Intensitäten der Multiplets oder aufgelöster Isotopensignale können darüberhinaus mit dem Ablationsvolumen bzw. der Ablationsmasse an einer Probenmessstelle in Verhältnis gesetzt werden. Eine daraus resultierende Größe wird hier als Signal-zu-Ablationsverhältnis (SAR) bezeichnet. Neben dem SNR wird auch die Entwicklung der *n-ten* Pulsintensität bzw. der Intensität der *n-ten* Kumulation betrachtet.

### Einzelpuls und Summenspektren

Einzelpulsspektren zeichnen sich dadurch aus, daß die aus einem Laserpuls (an einer Probenmessstelle) erzeugten Ionen zunächst analog vermessen werden (Ionenstrom  $\rightarrow$  Elektronenstrom) und i.d.R. das zeitaufgelöste (graduierte) Spannungssignal digitalisiert und dann gespeichert wird (Transientenrekorder). Summenspektren können entweder mehrere analoge Ionenpulse, die von einer Messstelle erzeugt wurden repräsentieren oder aber solche, die von unterschiedlichen Messstellen (separat) erfasst, digitalisiert und nachträglich summiert wurden. Sehr häufig erfolgt auch eine arithmetische Mittelung nach z.B. jeder 10. Summation, um nicht in den Sättigungsbereich einer Empfindlichkeitseinstellung zu gelangen. Weiterhin kann es vorkommen, daß bereits eine analoge Summierung z.B. bei Mehrkanalmessungen an einigen Transientenrekordern vor der Digitalisierung erfolgt. Eine Methodik, die das elektronische Rauschen in Einzelpulsmassenspektren *nach* der Digitalisierung aber *vor* der Aufsummierung berücksichtigt, wird teilweise in kommerzieller (Flugzeit)Massenspektrometersoftware angewandt und unterscheidet sich von der weitaus üblicheren Methode der nachträglichen Bestimmung der Basislinie aus einem generierten Summenspektrum [237]. Da statistisches elektronisches Rauschen sich von statistischem chemischen Rauschen in seiner Charakteristik nicht unterscheidet, ist dieses Verfahren i.d.R. aber nur dann sinnvoll, wenn Ionen in Spektren erwartet werden, die aus Zerfalls-, Streu- oder Clusterprozessen stammen und somit ebenfalls in Summenspektren zu einem zeitlich breiten, diffusen Hintergrund beitragen. Dieser Beitrag lässt i.d.R. auch die Basislinie des Spektrums merklich driften. Um den Beitrag solcher Signale an einer Verschiebung der Basislinie in Summenspektren, unabhängig vom elektronischen Rauschen bestimmen zu können, muss das elektronische Rauschen vorab eliminiert werden. In einigen Messungen dieser Arbeit wird dies zudem dann notwendig, wenn die Charakteristik des chemischen Rauschens, aufgrund z.B. hoher Bestrahlung der Probe (nur eine mögliche Ursache), überproportional zum Anstieg der Basislinie in Summenspektren beiträgt.

Die eindeutige Nachweisbarkeit einzelner Substanzklassenanalyse ist, wie bereits mehrfach erwähnt, stark von der Komplexität der Probe, der Massenauflösungsfähigkeit des verwendeten Spektrometers und der erreichten Massengenauigkeit in Einzelpulsspektren abhängig. Die Massenrichtigkeit definiert dabei den *Restfehler* eines Mittelwertes. Dieser kann bei linearen TOF-Spektrometern an einer Einzelpulsverteilung direkt mit der dreidimensionalen Position des Desorptionortes und des Ionisierungszeitpunktes korreliert werden. Erfolgen mehrere Messungen an einer kalibrierten festen Position der Ebene, hängt es entscheidend von der Anzahl der Messungen pro Probenstelle, der Laserenergie, dem Pulsprofil und der Ausmaße des Laserspots ab, wie groß die Differenz der Ionentrajektorien und damit ihre Flugzeitabweichungen maximal werden können. In der Regel ist nur die axiale Abweichung von Bedeutung. Die Bedeutung der Eindringtiefe des Lasers in Matrixkristalle wird relativ geringer, je mehr Pulse an einer Messstelle akkumuliert werden. Bei Einzelpulsmessungen ist sie dagegen von zentraler Bedeutung. Bei kleinen fokalen Laserspotgrößen kann die axiale Längendifferenz generierter Ionentrajektorien den transversalen Abstand in der Probenebene erreichen oder ggf. betragsmäßig übertreffen. Erfolgen Einzelpulsmessungen jeweils an unterschiedlichen Positionen, kommt zudem die Höhentopologie, aufgrund der Oberflächenrauheit einer Probe hinzu. Diese ist bei den meisten Laserspotgrößen deutlich kleiner, als der Desorption-/Ablationsdurchmesser aber i.d.R. immer noch wesentlich größer, als die Lasereindringtiefe in einzelne Matrixkristalle. Die Aufzählung zeigt, dass jeweils eine differenzierte Betrachtung notwendig ist, um die Desorption/Ablation an einer Probe mit dem entsprechenden SNR-Verhältnis in den erzeugten Massenspektren sinnvoll korrelieren zu können.

Präparationen nativer biologischer Proben (Gewebeschnitte, einzelne Zellen etc.) können eine aus-

geprägte Höhentopologie aufweisen. In Abhängigkeit des Zelltyps, des Präparationsverfahrens und der Schnittdicke sind Schwankungen von  $\Delta z < 1 \mu\text{m}$  bis  $\Delta z \approx 30 \mu\text{m}$  möglich. Die aus rein apparativer Sicht am stärksten limitierende Voraussetzung für eine ausreichende *Signalstärke* bei MALDI-Messungen an nativen biologischen Proben ist eine hinreichende Anzahl von Analytionen bzw. ein entsprechendes Signal-zu-Rauschverhältnis bei einer gegebenen Gerätesensitivität. Die Gerätesensitivität bezieht sich dabei auf die probenunabhängige Mindestzahl an detektierten Ionen, entweder im Einzelpulsexperiment oder bei akkumulierenden Messungen auf ein Summensignal.

Die *Sensitivität* im Allgemeinen wird dagegen oft in Abhängigkeit der Probe definiert z.B. als Menge/Volumen oder Absolutmenge einer entsprechenden Präparation und muss dann auch in Abhängigkeit der Präparationstechnik gesehen werden. Die Sensitivität, in diesem Sinne, ist nicht gleich der Gerätesensitivität. Diese wird rein von apparativen Voraussetzungen bestimmt [8] (Kapitel 1 und 2).

Eine praktikable Analytik erfordert deshalb zur Darstellung geringer Analytmengen eine auf die jeweilige Probe abgestimmte *Präparationstechnik* sowie *apparative Messbedingungen* die es ermöglichen ein Maximum der erzeugten Analyte, als stabile „nackte“ Molekül- bzw. Quasimolekülonen zur Detektion zu bringen. Hierdurch kann dann eine Sensitivität, bezogen auf die Probe bzw. ein Probenvolumen angegeben werden, bei dem die Gerätesensitivität als Limit der Messungen erreicht werden kann. Dabei muss zwangsläufig der Einfluss der Verteilung des Analyten und der chemischen Umgebung (Rauschen) beachtet werden. Der Einfluss der Verteilung von Analyten kann dann im weiteren durch angepasste apparative und präparative Parameter in den Messungen quantitativ beeinflusst werden.

### 3.3.5 Rauschen und Pegel

Das in MALDI-Massenspektren auftretende Rauschen lässt sich in zwei Kategorien einteilen. Zu nennen ist einmal das „*elektronische Rauschen*“ sowie andererseits das „*chemische Rauschen*“. Quantitativ bedeutsamer ist in der Regel aber das chemische Rauschen.

#### Elektronisches Rauschen

Das „elektronische“ Rauschen<sup>53</sup> kann mehrere physikalische Ursachen haben. Es ist auf die elektronischen Bauteile und Komponenten, die in unmittelbarer Beziehung zur Signaldetektion und Konvertierung stehen, zurückzuführen. Metallische Leiter zeigen zunächst (fast alle) ein frequenzunabhängiges *thermisches Grundrauschen*. Dieses besteht aus statistischen Spannungsschwankungen zwischen den Enden eines Leiters, als Folge der thermischen Bewegungen der Ladungsträger. Die effektive Spannung dieser Art des Rauschens, das auch als weißes oder farbloses Rauschen bezeichnet wird, beträgt nach Nyquist:

$$U_{th} = \sqrt{4kTRB} \quad (3.40)$$

und die entsprechende Rauschleistung sowie der RMS-Strom im Kurzschlussfall:

$$P_{th} = \frac{U_{th}^2}{R} = 4kTRB \quad ; \quad I_{rms} = \sqrt{\frac{4kTB}{R}} \quad (3.41)$$

sowie die spektrale (Rausch)Leistungsdichte (PSD, *power spectral density*)  $P_{th}/B$  und die effektive Leistung  $P_{eff}$ :

$$\frac{P_{th}}{B} = 4kT \quad ; \quad P_{eff} = kTB \quad (3.42)$$

<sup>53</sup>Thermisches oder Nyquist-Rauschen (Widerstandsrauschen), Generations-Rekombinationsrauschen (Halbleiter), sowie Flickerrauschen (1/f-Rauschen) oder rotes Rauschen (1/f<sup>2</sup>-Rauschen).

Mit  $k$  der Boltzmann-Konstante,  $T$  der Temperatur,  $R$  dem ohmschen Widerstand und der Frequenzbandbreite  $B = \Delta f$ . Es gilt im Zusammenhang mit statistischen Überlegungen für die mittlere Induktivität  $L$  einer Spule und für die mittlere Kapazität  $C$  eines Kondensators im thermischen Gleichgewicht  $\langle \frac{1}{2}LI^2 \rangle = \frac{1}{2}kT$  und  $\langle \frac{1}{2}CU^2 \rangle = \frac{1}{2}kT$  ( $kT \neq 0$ ). Frequenzabhängiges Rauschen wird auch als *farbiges Rauschen* bezeichnet z.B. 1/f-Rauschen ( $f$ =Frequenz). Diesem liegen auch statistische Prozesse zugrunde, wie z.B. Schwankungen der Ladungsträgerdichte, des Stromübergangs in Mikrobereichen<sup>54</sup> des Leitermaterials oder Schwankungen in der Stromverteilung zwischen mehreren Anschlüssen eines Bauelementes [238]. Statistische Schwankungen des Emissionszeitpunktes von z.B. Elektronen an Kathoden in Elektronenstrahlröhren erzeugen Schwankungen im Stromfluss, die unabhängig vom thermischen Rauschen sind. Dieser Effekt wurde von Schottky als *Schrotrauschen* bezeichnet. Der Mittelwert des quadratischen Rauschstroms beträgt:

$$\overline{i_{schrot}^2} = 2e I_{anode} \Delta f \quad (3.43)$$

Jede (elektrotechnische) Baugruppe liefert einen Beitrag zur Rauschleistung und damit zum Signal-zu-Rauschverhältnis  $A_{s/n}$ :

$$A_{s/n} = \frac{P_s}{P_n} \quad (3.44)$$

mit  $P_s$  = Signalleistung,  $P_n$  = Rauschleistung. Als Vergleich der Rauscheigenschaften von realen Verstärkerbauelementen wird der äquivalente Rauschwiderstand  $R_{aeq}$  definiert. Er gibt an, wie hoch ein fiktiver (metallischer) ohmscher Widerstand sein müsste, um am Ausgang, bezogen auf die Eingangsleistung und einer Rauschtemperatur (i.d.R.  $T = 290\text{ K}$ ), die gemessene Rauschleistung eines Bauelementes als thermisches Rauschen zu erzeugen:

$$R_{aeq} = \frac{U_{n,e}^2}{4kTB} \quad (3.45)$$

Mit  $U_{n,e}$  der Rauschspannung am Eingang des Bauelementes. Das effektive „elektronische“ Rauschen wird also aus vielen Einzelbeiträgen zusammengesetzt. Die Verringerung des Signal-zu-Rauschverhältnisses am Ausgang einer Baugruppe wird i.d.R. über die Rauschzahl  $F$  angegeben,  $A_{s/n,ein} = F A_{s/n,aus}$ ,  $F > 1$ . Jede reale Verstärkung hat damit auch einen Rauschbeitrag, dieser nimmt dabei insgesamt zu. Die Verstärkung, der vom Detektor kommenden Meßsignale, kann stufenweise erfolgen. Ein Vorverstärker kann als Impedanz-, Kapazitäts- oder Pegelanpassung vor dem eigentlichen (Signal)Verstärker eingesetzt werden. Dieser ist z.B. über Schaltungen aus (aktiven) Operationsverstärkern (OPV, Instrumentenverstärker) aufgebaut. Das Verhältnis elektrischer Leistungen bzw. Spannungen wird in der Regel mit der dimensionslosen Beziehung des Dezibel (dB,  $10^{-1}$  Bell), auf einer logarithmischen Skala angegeben. Hier als Berechnungsbeispiel an Vierpolen<sup>55</sup>:

$$G = 10 \cdot \lg \left( \frac{P_2}{P_1} \right) = 10 \cdot \lg \left( \frac{U_2^2/Z_2}{U_1^2/Z_1} \right) \quad [ \text{dB} ] \quad (3.46)$$

bzw.

$$G = 20 \cdot \lg \left( \frac{U_2}{U_1} \right) - 10 \cdot \lg \left( \frac{Z_1}{Z_2} \right) \quad [ \text{dB} ] \quad (3.47)$$

und bei identischer Eingangs- und Ausgangsimpedanz  $Z_2 = Z_1$  vereinfacht durch:

$$G = 20 \cdot \lg \left( \frac{U_2}{U_1} \right) \quad [ \text{dB} ] \quad (3.48)$$

<sup>54</sup>Halbleiter, diskrete Verteilung von Elektronen und Löchern.

<sup>55</sup>Als Vierpole werden elektrische Netzwerke bezeichnet die mit vier von außen zugänglichen Anschlüssen versehen sind, von denen je zwei als Paar dem Ein- und Ausgang zugeordnet werden können. Ein anderer Name dafür ist auch Zweiter.

Mit  $G$  der Verstärkung (*Gain*) eines Systems mit einer Eingangsleistung  $P_1$ , einer Ausgangsleistung  $P_2$  und  $U_1$  der Eingangsspannung sowie  $U_2$  der Ausgangsspannung. Die Dämpfung  $a$  ist als Kehrwert von  $G$  definiert. Die Angabe von Spannungsverstärkungen ist streng genommen nur bei gleicher Impedanz sinnvoll. Die Impedanz ist die Bezeichnung für den komplexen Wechselstromwiderstand. Je nach Baugruppe und Schaltung können induktive Anteile = die Spannung eilt dem Strom voraus, oder kapazitive Anteile = die Spannung folgt dem Strom nach überwiegen. Ihr Betrag wird als Scheinwiderstand bezeichnet. Die Impedanz ist frequenzabhängig. Bei Gleichstrom ( $f = 0$  Hz) wird die Frequenzabhängigkeit gewissermaßen eliminiert (Spezialfall). Die Definition eines Eingangswiderstands bei einer Signalleitung eines Gleichstrom- oder Spannungspulses in z.B. Koaxialkabeln mit metallischer Seele und Außenleiter, wird über den sogenannten Leitungswellenwiderstand (*characteristic impedance*,  $Z_L$ ) bestimmt. Der Leitungswellenwiderstand hängt von dem Leitungsmaterial und der Geometrie der Leiter sowie dem Isolator, d.h. der Dielektrizitätskonstanten des Isolierungsmaterials zwischen Innen- und Außenleiter ab (Freiraumwellenwiderstand oder Feldwellenwiderstand). Der Feldwellenwiderstand kann aber experimentell nur mit Wechselstrom ermittelt werden. Ein dem Leitungswellenwiderstand  $Z_L$  entsprechender Abschlusswiderstand wird zwischen dem Innen- und Außenleiter eines Koaxialkabels zur Vermeidung von Signalreflexionen am Leitungsende gesteckt (BNC-Steckverbinder,  $f_{Grenz} \leq 1$  GHz). Der Abschlusswiderstand eines Koaxialkabels des Typs RG-58 beträgt  $Z_L \approx 50 \Omega$ . Typische Werte für den Kapazitätsbelag von  $50 \Omega$  Koaxialkabeln sind  $C' = \frac{dC}{dx} = 100$  pFm<sup>-1</sup> (Picofarad/Meter) und für den Induktivitätsbelag  $L' = \frac{dL}{dx} = 250$  nHm<sup>-1</sup> (Nanohenry/Meter). Ein solches Koaxialkabel entspricht einem Tiefpassfilter 1. Ordnung (RC-Glied), wobei die Bandbreite i.d.R. durch die -3 dB Intensität am unteren Ende der Potential-Skala begrenzt wird (SNR  $\approx 0.7$ ).

Von experimenteller Bedeutung in der Flugzeitmassenspektrometrie ist die Impedanz von Bauteilen und Leitungen u.a. im Zusammenhang mit der schnellen Push-Pull-Schaltung von HV-Gleichstrompotentialen an Elektroden. Diese werden in TOF-Massenspektrometerquellen des Wiley-McLaren-Typs mit Delayed Extraction-Einrichtung oder PSPF-Anordnungen aber auch in Hybridspektrometern mit orthogonaler Ionenextraktion (qTOF, *Pulser*) oft mit schnellen MOSFET-Push-Pull-Schaltern betrieben. Die kapazitiven und induktiven Einflüsse einzelner Bauteile und Leitungen bzw. parasitäre Ströme sind i.d.R. im Messaufbau nicht immer zu optimieren bzw. können nicht vollständig unterdrückt werden. Aufgrund dessen eintretende Störgrößen müssen bei der Signalverarbeitung berücksichtigt werden.

Durch Festlegung einer Bezugsgröße kann aus dem dimensionslosen Dezibelwert ein Pegel (*level*) ermittelt werden. Für die Leistung  $L_P$  ist dies definitionsgemäß oft  $P_0 = 1$  mW (Milliwatt, [ dBm ]) und für die Spannung  $L_U$  häufig  $U_0 = 1$   $\mu$ V (Mikrovolt, [ dB $\mu$ V ]):

$$L_P = 10 \cdot \lg \left( \frac{P}{1 [mW]} \right) [dBm] ; \quad L_U = 20 \cdot \lg \left( \frac{U}{1 [\mu V]} \right) [dB\mu V] \quad (3.49)$$

Die Berücksichtigung beider Pegel ergibt bei identischen Bezugsgrößen  $P_0$  ein Maß  $G_P$ :

$$G_P = L_{P_2} - L_{P_1} = 10 \cdot \lg \left( \frac{P_2}{P_0} \right) - 10 \cdot \lg \left( \frac{P_1}{P_0} \right) = 10 \cdot \lg \left( \frac{P_2}{P_1} \right) [dB] \quad (3.50)$$

Dieses Maß entspricht der effektiven Verstärkung  $\frac{P_2}{P_1}$  oder Dämpfung  $\frac{P_1}{P_2}$  des Systems in dB, wenn  $P_2 > P_1$  gilt und ist per Definition physikalisch kein Pegel mehr. Der Pegel am Systemausgang kann aber auch über die Verstärkung und den Pegel am Systemeingang angegeben werden:

$$L_{P_2} = \frac{L_{P_1}}{[dBm]} + \frac{G}{[dB]} [dBm] ; \quad L_{U_2} = \frac{L_{U_1}}{[dB\mu V]} + \frac{G}{[dB]} [dB\mu V] \quad (3.51)$$

Eine Verstärkung der Leistung z.B. um den Faktor  $\frac{P_2}{P_1} = 20$  entspricht einem  $G_P \approx 13$  dB. Man erhält z.B. bei einheitlichen Impedanzen  $Z = Z_1 = Z_2 = 50 \Omega$  mit der Beziehung  $P = U_{eff}^2/Z$ ,

$1 \mu V|_{50 \Omega} = 0 dB\mu V|_{50 \Omega}$ , für einen Spannungspegel von  $0 dB\mu V$  am Systemausgang (1:1-Übertragung) einen Leistungspegel von  $-107 dBm$ . Die Unterschiede der Leistungs- und Spannungspegel basieren also lediglich auf den unterschiedlichen Bezugsgrößen  $P_0, U_0$ . Bleiben die Impedanzen und die Bezugsgrößen im System gleich, kann ausgehend von diesem Wert schnell auf den Leistungspegel bei anderen Spannungspegeln umgerechnet werden. Entsprechend der Beziehung [239]:

$$\frac{L_P}{[dBm]} = \frac{L_U}{[dB\mu V]} - 107 \quad (3.52)$$

Bei anderen Bezugsgrößen ändern sich die Absolutwerte.

### Chemisches Rauschen

Eine qualitative Charakterisierung des chemischen Rauschens ist aber weitaus schwieriger möglich, als im Falle des elektronischen Rauschens. Der physikalische Ursprung (Entstehungsort/-prozess) und die chemische Struktur der detektierten „Rauschionen“ ist bei Messungen oftmals (zunächst) unbekannt [240]. Es äußert sich messtechnisch quantitativ zum einen in breitbandigen analogen Signalen niedriger Intensität und wird durch unspezifische Verstärkerschaltungen oder eine Nachbeschleunigungsdetektion i.d.R. unselektiv mitverstärkt. In dieser Ausprägung ähnelt es damit stark dem elektronischen Schrotrauschen. Eine apparative Art der Reduktion, die allerdings nicht an der Wurzel des Problems, d.h. der Rauschentstehung dieser Art des chemischen Rauschens ansetzt, liegt in der gezielten Ausblendung von Teilen des erzeugten Ionenstroms durch Deflektoranordnungen (*Iongate*) und wird in der Literatur mehrfach beschrieben [241] [242]. Eine solche Vorgehensweise kann eine Detektorsättigung durch Matrixclustersignale bzw. Fragmente niedriger Ionenmassen verhindern. Sie ist aber im pulsbetriebenen ADC-Verfahren i.d.R. nutzlos, wenn das chemische Rauschen und das Analytsignal nahezu identische Massen besitzen. Quantitativ können die Werte des chemischen Rauschens aber auch den Werten intensiver Analytsignale entsprechen. Letztlich entscheidend für die Spektrenqualität ist immer das Signal-zu-Rauschverhältnis. Interpretiert man dieses rein statistisch, d.h. man geht nur von Intensitäten aus, die das elektronische Rauschen im Mittel geringfügig übertreffen, kann dieses sinnvoll als das reziproke Verhältnis des Variationskoeffizienten<sup>56</sup> aufgefasst werden. Der Variationskoeffizient einer Verteilung von Messwerten ist dabei das Verhältnis des Mittelwertes einer Stichprobe zur Standardabweichung und das Signal-zu-Rauschverhältnis:

$$SNR = \frac{\mu}{\sigma} \quad (3.53)$$

Über die Definition in (3.53) kann weiterhin die Situation einer mit dem Messumfang  $n$  veränderlichen Standardabweichung berücksichtigt werden. Die Standardabweichung einer wachsenden zufallsveränderlichen Stichprobe voneinander unabhängiger Messwerte wächst unter Homoskedastizitätsannahme um den Faktor  $\sqrt{n}$ . Geht man also davon aus, daß das chemische Rauschen die Charakteristik von statistischem Schrotrauschen aufweist, ergibt sich bei diskreten Messereignissen eine Steigerung des Analytsignals um den Faktor  $n$  und damit ein theoretisches Signal-zu-Rauschverhältnis von:

$$SNR = \frac{n}{\sqrt{n}} = \sqrt{n} \quad (3.54)$$

an einer bestimmten Messstelle.

Eine Steigerung der generierten Analytionenanzahl  $N$  in MALDI-Einzelpulsmessungen kann aufgrund einer höheren Bestrahlung erhalten werden. Wird durch die gesteigerte Bestrahlung kein proportionaler Einfluss auf das Rauschen festgestellt, verbessert dies das SNR. Die Entwicklung verläuft dann, ähnlich

<sup>56</sup>Der Kehrwert des Variationskoeffizienten wird als *relative Standardabweichung* kurz RSD bezeichnet.

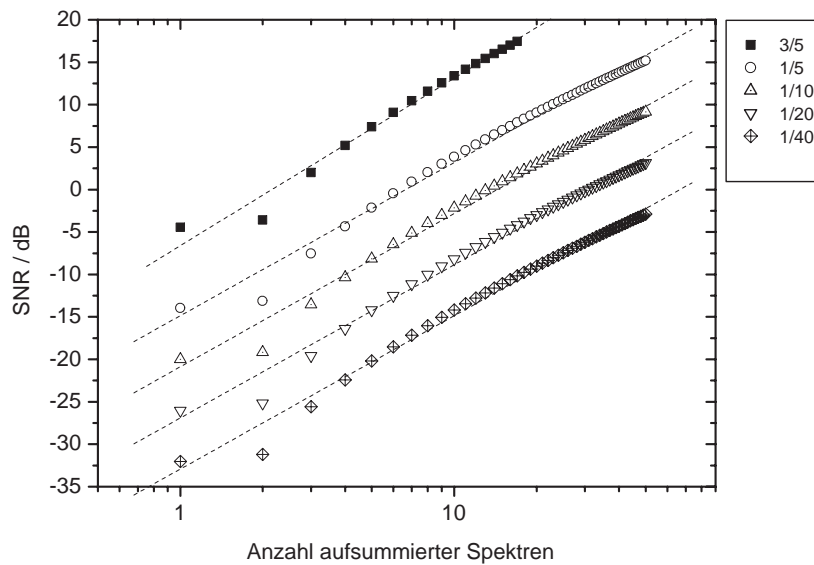
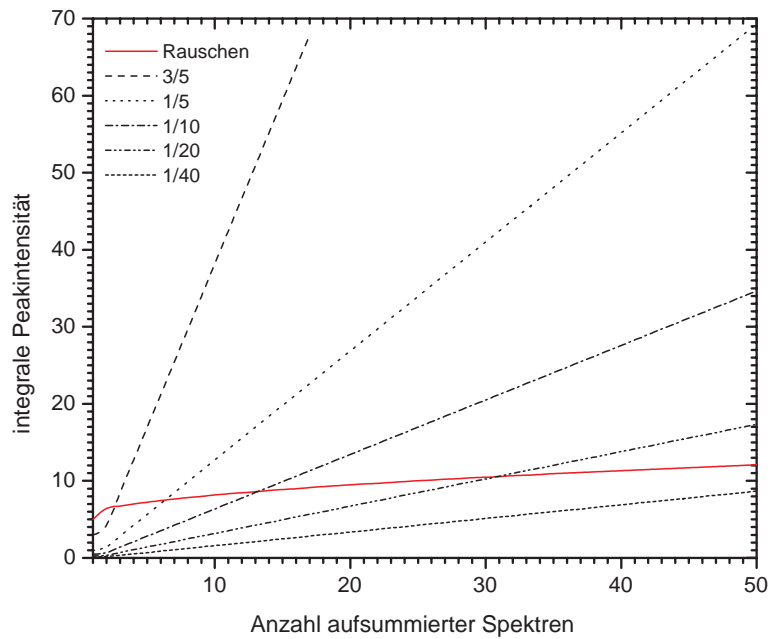


Abbildung 3.19: (Oben) Willkürliche Annahme einer analogen Signal- (schwarz) und Rauschwertentwicklung (rot) bei wechselnden Startintensitäten und unterschiedlichen Gesetzmäßigkeiten für das Signal- (Signalrate) und Rauschwertwachstum (Rauschrate). (Unten) SNR der oberen Darstellung. Näheres siehe Text.

einer Steigerung anhand einer verlängerten Integrationszeit während der Photonendetektion mittels PMT-Detektoren, d.h. in etwa gemäß  $SNR = \sqrt{N}$ . Abbildung 3.19 zeigt eine beispielhafte Darstellung von Signal- und Rauschwerten sowie das SNR bei angenommenen (feststehenden) Bedingungen.



### Analog-zu-Digital Umsetzung

Berücksichtigt werden muss weiterhin, daß das Signal-zu-Rauschverhältnis während einer folgenden Digitalisierung von der Speichertiefe der Umsetzung abhängt und damit zusätzlich durch das LSB (*Least significant Bit*) des Registers bzw. des Speichers begrenzt wird. D.h., das letztlich die effektive Speichertiefe (ENOB) zur Signalerfassung von der Nennzahl in Bit abweichen kann. Sogenanntes *Quantifizierungsrauschen* tritt auf, da die kontinuierlich verteilten analogen Meßsignale diskretisiert werden und hierbei *Rundungsfehler* nicht vernachlässigt werden können. Für einen idealen Analog-zu-Digital-Umsetzer (ADC) und beispielhaft angenommenen analogen *Dreieckssignalen* mit Puls-Code-Modulation<sup>57</sup> durch eine Rechteckfensterfunktion (*boxcar function*) liegt der Quantifizierungsfehler  $F_q$  zwischen  $\pm 1/2$  LSB und ist *gleichverteilt*. Es gilt ansatzweise, daß das  $SNR \approx k^2 \approx 2^{2n}$  entspricht. Der Quantifizierungsfehler als RMS-Wert (*root-mean-square*) ist in diesem Fall (ohne Bias) gleichzusetzen mit der Standardabweichung der Bit-Auflösung, also näherungsweise  $\frac{1}{\sqrt{n\text{Bit}}}$  LSB. Bezogen auf gemessene Spannungen beträgt er  $F_q = k \cdot Q - U_{ein}$ . Man erkennt, daß, je größer eine digitale Quantisierungsstufe für ein analoges Signal ist, umso größer wird der Quantisierungsfehler. Die Auflösung  $Q$  eines ADC für Spannungspulse bezieht sich auf den maximal darstellbaren Spannungsbereich (Referenzbereich)  $U_{ref,max} - U_{ref,min} = \Delta U_{scale}$ ,  $Q = \frac{\Delta U_{scale}}{k}$ , mit der maximalen Anzahl von  $k - 1 = 2^n - 1$  Intervallen. Beträgt die minimale Umsetzung  $0.5 Q$  und die maximale Umsetzung  $1.5 Q$ , gilt für die mittleren  $k - 2$  Intervalle eine einheitliche Breite und damit insgesamt eine Auflösung von  $Q$  (*uniform quantization*). Das Signal-zu-Rauschverhältnis (SNR) einer linearen Puls-Code-Modulation von *sinusförmigen* Analogsignalen mit  $k$  Quantisierungsschritten und einem  $n$  Bit-Speicher ( $n = 1, 2, 3, \dots$ ) beträgt bei maximaler analoger Pegelaussteuerung dann:

$$\begin{aligned} SNR &= 1.5 \cdot 2^{2n} = n \cdot 6.02 \text{ dB} + 1.761 \text{ dB} \\ &= (ENOB \cdot 6.02) \text{ dB} + 1.761 \text{ dB} \end{aligned}$$

Für eine 16-Bit ADC bedeutet das ein theoretisch maximales Signal-zu-Rauschverhältnis von  $SNR \approx 98.08 \text{ dB}$  und für eine 8-Bit ADC von ungefähr  $SNR \approx 49.92 \text{ dB}$  [243]. Das effektive analoge Signal im Register (bzw. Speicher) für eine Abtaststelle wird hierbei auf die Mitte des digitalen Intervalls bezogen (*mid-tread-coding*):

$$ADC_{code} = \text{round} \left( \left( \frac{2^n}{U_{ref,max} - U_{ref,min}} \right) \cdot (U_{ein} - U_{ref,min}) \right)$$

$U_{ref,min} \geq 6.02 \text{ dB}$ . Ein  $U_{ref,min} \approx 6.02 \text{ dB}$  entspricht einem analogen Intensitäts-SNR von 2. Die Art der Rundung erfolgt dabei nach dem Prinzip *round half to even* – d.h. es wird immer zu der *nächsten* geraden ganzen Zahl ( $x \in \mathbf{Z}$ )<sup>58</sup> der signifikanten Stelle gerundet und damit eine statistische Verteilung der Rundungsargumente angenommen (*gaussian rounding*, mathematische Rundung). Die sogenannte effektive Anzahl von Bits – ENOB (*effective number of bits*) – die während einer Digitalisierung erreicht wird, bezieht sich auf das mögliche Signal-zu-Rauschverhältnis das ggf. durch ein zusätzliches sinusförmiges Störsignal (Verzerrung) belastet sein kann. Das ENOB gibt die Zahl, der bei einer Weiterverarbeitung des digitalen Signals verwertbaren Bits an. Ein zusätzliches Störsignal kann z.B. während der Digitalisierung hervorgerufen werden, wenn ein sinusförmiges analoges Signal in eine Sättigung läuft und dadurch abgeschnitten wird.

Der Standard für Gleitpunktzahlen ist in den verwendeten Mikroprozessoren (Le Croy, Precision Instruments) der IEEE-754-Standard (*Institute of Electrical and Electronics Engineers*, USA 1985). Er

<sup>57</sup>Ein kontinuierliches analoges Signal (Zeit, Intensität) wird in ein diskretes digitales Signal (Zeit, Intensität) gewandelt.

<sup>58</sup>Ganze Zahlen.

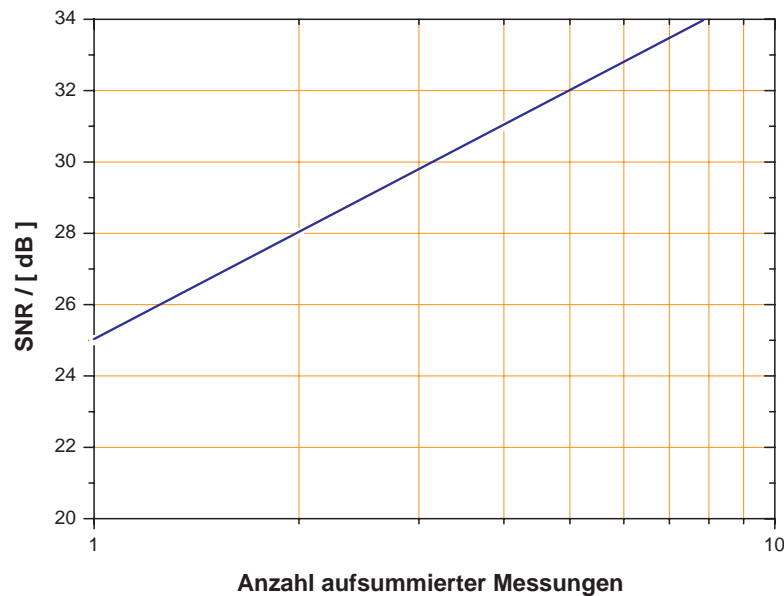


Abbildung 3.20: SNR-Steigerung um ca. 3 dB pro Summation eines gepulsten Photonensignals bzw. bei vergleichbarer Verlängerung der Messzeit eines kontinuierlichen Signales (PMT).

stellte die erste Norm für eine binäre Gleitpunktarithmetik dar. In diesem Standard werden alle benutzbaren Datenformate, Rundungsvorschriften und die Vorgehensweise bei z.B. einem Bereichsüberlauf festgelegt. Der IEEE-754-Standard definiert zwei sogenannte Basis-Gleitpunktformate: 1. einfach-genaue Zahlen = 32 Bit (single), und 2. doppelt-genaue Zahlen = 64 Bit (double). Jede Zahl wird dabei durch drei separate Bitfelder dargestellt. Das höchstwertige Bit (MSB) enthält die Information über das Vorzeichen der Zahl (VZ=0, positiv; VZ=1, negativ). Die Mantisse ist normalisiert, der höchstwertige Binärwert liegt vor dem Punkt = 1.M. Die Mantisse 1.M wird auch als *Significand* bezeichnet, der Teil M alleine, als *Fractional*. M hat im 32-Bit-Format eine Länge von 23 Bit und im 64-Bit-Format eine Länge von 52 Bit. Die Zahl 0 wird durch 0 Bit in allen Bereichen dargestellt. Das 32-Bit-Format besitzt eine Genauigkeit von 7 Dezimalstellen, das 64-Bit-Format eine Genauigkeit von 15 Dezimalstellen<sup>59</sup> [244]. Zum Datentransfer wird der parallele 8-Bit GPI-Bus (*General purpose interface bus*, IEEE 488 Standard, IEC-625) verwendet. In Abbildung 3.20 ist ein Beispiel einer typischen SNR-Steigerung in Abhängigkeit von der Anzahl aufsummierter (Einzel)Messungen bei einer PMT-Detektion dargestellt. In Abbildung 3.21 ist die Lage theoretisch abgrenzbarer Verteilungen von Signalintensitäten in einem Massenspektrum angedeutet.

In diesem Kontext soll hier das sogenannte *Rose-Kriterium*, das zur Beurteilung der über den Kontrast definierten Strukturidentifizierung in medizinischen Abbildungen verwendet wird, erwähnt werden. Dieses besagt, daß eine *bekannte* Struktur nur mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ( $100\% \geq p > 90\%$ ) sicher identifiziert werden kann, wenn das zugrundeliegende SNR mindestens einem  $SNR \geq 5$  (Potential) bzw.  $SNR \geq 14 \text{ dB}$  entspricht [245]. Die häufigsten Kontrastaufösungen in Pixelbildern sind i.d.R. ein Byte/Pixel (8 Bit) und 2 Byte/Pixel (16 Bit).

<sup>59</sup>Es ergibt sich eine Wertigkeit von  $W_i = 2^{i-k}$  für  $k =$  Anzahl der Bits in der Mantisse  $M$  und der Nachpunktstelle  $m_i$  ( $i = 0, \dots, k - 1$ ) der Mantisse.

**Jitter**

Eine weitere Fehlereinflussgröße, die sich direkt oder indirekt auf die vorher beschriebenen Größen auswirkt, sind sogenannte *Jitter* (Schwankungen). In der allgemeinsten Definition wird als Jitter ein plötzlicher Wechsel in der Charakteristik von periodischen Signalen beschrieben. Dies kann sich dabei sowohl auf eine statistische, wie eine nicht-statistische Schwankung der Amplitude oder der Phase beziehen. Im Falle statistischer Schwankungen ist die physikalische Ursache i.d.R. auf den frequenzabhängigen Fehler einer Zeitbasis entsprechender Taktgeber<sup>60</sup> zurückzuführen. Dieser ist aber im Allgemeinen niedrig,  $RMS \leq 1\%$ . In MALDI-TOF Anordnungen ergeben sich mögliche (statistische und nicht-statistische) Jitter meistens aus der Triggerung der Laserelektronik und der AD-Wandlung oder bei der Verwendung von Puls-Schaltungen an Elektroden (DE, PSPF, Deflektor, PSD-Scan, etc.). An Hochspannungsnetzgeräten können vor allem im Zusammenhang mit Temperaturänderungen Potentialabweichungen vom eingestellten Sollwert auftreten [246] [247].

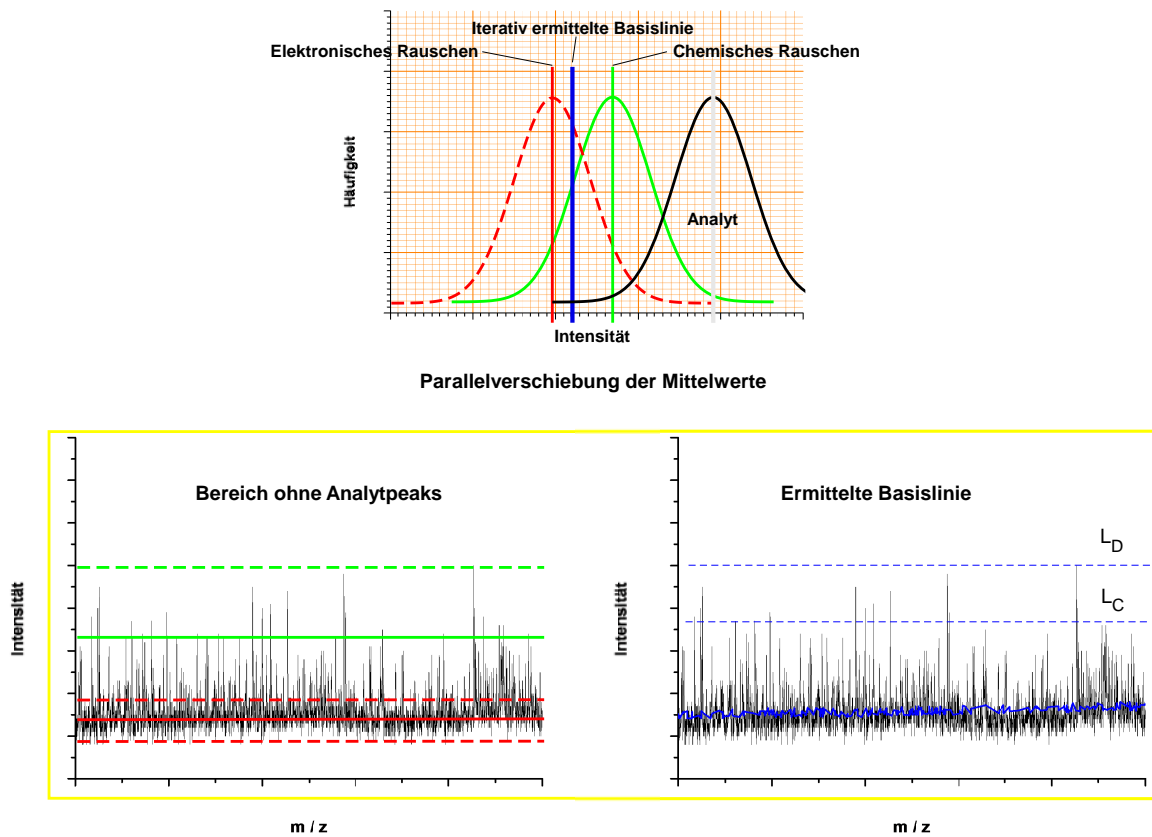


Abbildung 3.21: Skizzierung der Basislinienermittlung anhand der Rauschwertanteile in (Massen)Spektren.

**Apparative und methodische Ansätze zur Rauschreduktion**

**1. Kontinuierliche Ionenbildung (*continuous ion sources*)**

Ein Ansatz das Signal-zu-Rausch-Verhältnis mit kontinuierlichen Ionenquellen zu verbessern (z.B. an on-

<sup>60</sup> Crystal based clocks, VCXO, OCXO, XO, SMD, etc.

axis TOF-Hybridspektrometern) besteht im Aufbau einer gezielten aber zufallsgesteuerten (schnellen) Schaltung eines Iongates<sup>61</sup>. Hierbei wird eine sequenzielle Kurzpulsextraktion aus einem kontinuierlichen Ionenstrahl erreicht (Sequenzmodulation, Pseudorandom TOF-analyses) [248] [249] [250]. Die potenzielle Verbesserung dieses Verfahrens hängt dabei nicht direkt mit der Entstehung des chemischen Rauschens zusammen. Solange der wesentliche Rauschbeitrag aber durch ein statistisches Rauschen und einen „thermischen“ Anteil beschreibbar ist verbessert sich das Signal-zu-Rauschverhältnis, bei sequenzieller Pulsung mit z.B.  $2^{n_{Bit}}$  Durchlasspulsen und  $n = 13$  für einen ADC-Überlagerungstransienten, theoretisch um den Faktor  $\sqrt{8192 - 1} \approx 91$  gegenüber einem unmodulierten Transienten gleicher (Gesamt)Messzeit. Im on-axis Hybridverfahren wird aus einer, im Vergleich zur Driftzeit der durchgelassenen Ionenpopulationen im Flugzeitanalysator ( $t_{drift} \approx 10^1 \mu s$ ), sehr schnellen<sup>62</sup> wechselnden Kurzpulsfensterfolge aus Durchlass- und Diskriminierungsschaltung (Pulslänge  $t_{puls} = 200 ps$  bis  $500 ps$ ), ein Überlagerungstransient ADC-detektiert. Die Kurzpulsfolge ist dabei pseudozufallsgeneriert und bekannt. Da die Schaltung sehr schnell arbeitet, können langsame Ionen aus dem n-ten Kurzpuls mit schnelleren Ionen aus dem (n+1)-ten Kurzpuls, aufgrund der Startzeitentkopplung gemeinsam detektiert werden. Im Ergebnis führt dies zunächst zu einem vollständig verrauschten Spektrum in einem Massenbereich, der zudem keine durchweg korrekte Zuordnung der Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse darstellt<sup>63</sup>. Die Modulation der Iongate-Schaltung liegt in Form digitaler Matrizen vor. Diese können als Hadamard-Transformation interpretiert werden. Das erhaltene Primärspektrum wird nach einer inversen Hadamard-Transformation, was einer Dekonvolution gleichkommt, zu einem korrekten Massenspektrum mit richtig zugeordneten Ionenmassen. Der Vorteil dieser Methode liegt dabei einerseits in der effektiveren Ausnutzung des kontinuierlichen Ionenstroms. Bei identischer Anzahl der Pulsmodulationen (Detektionspuls, binär 1; Diskriminierungspuls, binär 0) der anschliessenden „Kurzpuls-Überlagerungsdetektion“ beträgt die Pulsverwertung gegenüber nicht modulierten on-axis TOF-ADC Messungen (5% bis 15%) formal 50%. Andererseits kann unter den Bedingungen einer konstanten Rauschcharakteristik auch eine Rauschreduktion bei wachsenden Pulsfolgen festgestellt werden [248].

Ein Ansatz zur Rauschcharakterisierung und Minderung durch IRMPD (*infrared multiphoton dissociation*) wird in [251] für ESI-Quellen in Kombination mit linearen Ionenfallen beschrieben. Ein kommerzieller Einsatz von IRMPD in Fallenspektrometern ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand (noch) nicht erhältlich.

## 2. Gepulste Ionenbildung (*pulsed ion sources*)

Weitaus häufiger ist die Kopplung von kontinuierlichen Quellen und auch die von gepulsten Quellen mit orthogonalen Hybridspektrometern und dann ggf. auch mit einer TDC-Detektion (*time-to-digital-conversion*). Kommerzielle Geräte die beide Funktionalitäten vereinen sind z.B. die Spektrometer der Baureihe Q-Star (Applied Biosystems) [252]. Diese verwenden i.d.R. Push-Pulszeitfenster im Bereich von ca.  $t_{puls} = 625 ps$  [30]. Die TD-Umsetzung entspricht einer binären Detektion der analogen Signale. Es wird dabei wiederholt in einem schmalen Zeitfenster (time-bin) z.B. mit einem ADC-Detektor die absolute Häufigkeit der analogen Detektionsereignisse ausgezählt (counts per time-bin). Gezählt wird entweder der Beginn des Pulses, das Ende oder ein Zwischenwert. Dies führt insgesamt, in Abhängigkeit der gewählten Registrierungsschwelle, zu einer Rauschreduktion und einer sehr konstanten Basislinie in Spektren. In Abhängigkeit der absoluten Ionenanzahl pro Bin und einer idealerweise gaussförmigen

<sup>61</sup>Iongate nach BRADBURY und NIELSEN.

<sup>62</sup> $f_{puls} = 10 MHz$  bis  $f_{puls} = 20 MHz$ ,  $1/f = 100 ns$  bzw.  $1/f = 50 ns$ .

<sup>63</sup>Theoretisch entspricht dies der Situation einer simultanen Wägung mehrerer unterschiedlich schwerer Gegenstände an einer einzelnen Waage. Erst nach Differenzwägung mit wechselnder Zusammensetzung der Gegenstände kann dann aus Differenzbildungen die Masse eines Gegenstandes, sehr genau, ermittelt werden.

Flugzeitverteilung (einer Population) können so nach interner Kalibrierung relative Massenabweichungen von  $\delta_m \leq 10 \text{ ppm}$  erreicht werden. Im Prinzip sind mit TDC-Detektion Einzelionennachweise möglich [8]. Dies erfordert dann aber, je nach Probe entsprechend viele Iterationen, um ein einzelnes Ion gemäß seiner Wahrscheinlichkeit und in Abhängigkeit der Größe der Detektionsfläche registrieren zu können.

### Rauschen und native Proben

Das Vermessen nativer biologischer Proben erfordert sehr häufig, gegenüber aufgereinigten bzw. aufgetrennten und aufkonzentrierten Analyten in konventionellen Dried droplet-Proben, eine höhere Bestrahlung. Dieses Phänomen verstärkt sich i.d.R. mit kleiner werdendem Laserfokus. Das chemische Rauschen ist bei moderaten Bestrahlungen, die in etwa dem zwei- bis vierfachen Wert der Schwellbestrahlung potenzieller Analyte entsprechen, (gut) durch eine *Poissonverteilung* zu charakterisieren. D.h. bei einer relativ geringen Zählrate diskreter Teilchen wie z.B. Ionen ist auch der Anteil des zufälligen Rauschens der Gestalt, daß nur wenige abzählbare Ereignisse wahrscheinlich sind [45] (siehe Anhang D.1.5). Wird die Bestrahlung darüberhinaus aber noch weiter erhöht, kann hierdurch auch eine veränderte Rauschzusammensetzung im Spektrum (bei identischer Probenzusammensetzung) resultieren [46]. Die Signalstärke lässt sich bei nativen Proben oft auch mit Bestrahlungen die über der 10-fachen Schwellbestrahlung liegen weiter steigern. Hierbei kann dann aber die veränderte Rauschcharakteristik die Messungen hinsichtlich des SNR deutlich verschlechtern. Die Rauschrate bei aufsummierten Messungen kann zu einem linearen Verlauf übergehen. In Pixelbildern hat das unmittelbare Auswirkungen auf den Kontrast. Das chemische Rauschen dominiert dann und lässt Analytsignale auf einer deutlich erhöhten Basislinie aufsitzen [46].

In MALDI-Summenspektren muss neben dem Einfluss einer chemischen *Schrotrauschcharakteristik* weiterhin, aufgrund der thermischen Gleichgewichtsdesorption bis zum Erreichen einer Schwellbestrahlung, auch ein Temperatureinfluss ähnlich dem des *thermischen* Rauschens angenommen werden. Untersuchungen im Zusammenhang z.B. mit der Matrix 2,5-DHB legen nahe, daß eine gesteigerte Targettemperatur einen Einfluss auf das messbare Ionensignal bzw. den Anteil desorbiertes neutraler Moleküle hat und damit zwangsläufig auch auf *spezifische* Rauschsignale [253].

### Präparative Ansätze zur Rauschreduktion

Die präparativen Ansätze zur Rauschreduktion beziehen sich in erster Linie auf eine Vermeidung der Anwesenheit potentieller Rauschquellen in einer Messprobe. Entsprechende Aufreinigungsprotokolle zur „konventionellen“ MALDI-MS Analytik sind bekannt wie z.B. die Aufreinigung in Mikropipettenspitzen (z.B. Zip-Tip, Millipore etc.), konventionelle chromatographische Off-Line Trennungen oder das Verwenden von Ionenaustauschergelen zur Abreicherung störender Salzkationen. Wie bereits zuvor erwähnt, ist ein solcher Ansatz mit nativen biologischen Proben, zumal mit Imaging-Proben aber nur sehr beschränkt möglich, da diese intakt und so gut wie unverändert zu einer Untersuchung vorliegen sollen. Wie im unmittelbar vorhergehenden Abschnitt dargestellt, kann zudem der Analyt selbst zum Rauschen beitragen und somit unter bestimmten Voraussetzungen eine Rauschreduktion gleichzeitig auch eine Analytreduktion bedeuten, was i.d.R. unsinnig ist, solange im Messverfahren nicht der Bereich der Signalsättigung des Detektionssystems für den entsprechenden Analyten erreicht wird. In den meisten Fällen ist aber die Analytsignalintensität nicht so hoch, daß eine Sättigung des Detektionsprozesses hierdurch eintritt. In der Regel verursachen eher die Signale im unteren Massenbereich eine Detektorsättigung.

Die präparativen Ansätze zur Rauschreduktion an nativen biologischen Proben reduzieren sich damit auf eine sehr saubere und sorgfältige Probenvorbereitung bzw. der Anwendung hochreiner Lösungsmittel im Matrixansatz und ggf. in zusätzlichen Waschschrritten mit unterschiedlichen Lösungsmitteln.

### 3.3.6 Fazit

Neben einigen grundlegenden *empirischen* Erkenntnissen über die geeigneten Lösungsmittel für verwendete kristalline Matrizes und die vermeintlich optimale Matrix für eine bestimmte Analytsubstanz, sind alle weiteren Eckdaten - wie die *Schwellbestrahlung*, die optimale *Kristallgröße* oder die zur Analytdetektion erforderliche *Laserpulsanzahl* pro Messstelle - sehr eng mit den gerätespezifischen Parametern des Massenspektrometers bzw. des Lasers, der angewandten Präparationstechnik und der Probenbeschaffenheit bzw. deren chemischer Zusammensetzung (Komplexität) verbunden. Es handelt sich dabei um überwiegend im Vorfeld unbekannte und erst experimentell zu ermittelnde Parameterwerte. Dieser Prozess stellt eine meist recht aufwendige *Methodenentwicklung* dar. Da eine solche Methodenentwicklung aber oft nur bedingt robust ist, können vergleichsweise geringfügige Veränderungen in den apparativen Rahmenbedingungen und/oder der Komplexität der Proben eine erneute Methodenentwicklung, im Bezug auf die veränderten Bedingungen, erfordern. Dies steht dabei generell im Einklang mit Erfahrungen aus der Anwendung anderer Ionisierungsmethoden im Zusammenhang mit massenspektrometrischen Messungen und ist somit nicht spezifisch für die Methode MALDI [223].

Eine entscheidende MALDI-spezifische Frage ist in diesem Zusammenhang aber, ob aus empirischen Daten über die Kristallgröße und eine Präparationstechnik, allgemeine Schlussfolgerungen möglich sind, die eine Einschränkung des Wertebereiches anderer Parameter zulassen. Hierzu zählt z.B. die erforderliche Mindestlaserpulsanzahl pro Messstelle bei einer gegebenen bzw. angenommenen Schwellbestrahlung für eine Matrix und native biologische Proben. Da die Unterschiede hinsichtlich der Matrixverteilung und letztlich auch der Analytdesorption präparationsbedingten Schwankungen unterliegen können, kann ein relatives molares Verhältnis von mehreren Analyten bei nicht vollständigem Probenabtrag während der Messungen mit einer RSD > 15 % oder höher auftreten. Bei semiquantitativen Messungen ist deshalb ein vollständiger Probenverbrauch an einer Messstelle vorteilhaft. Dies erfordert i.d.R. Präparationstechniken, die eine sehr homogene Verteilung der Matrix erzeugen, wie dies z.B. durch die in dieser Arbeit entwickelte Sprühmethode möglich ist.

### 3.3.7 Elektrostatische Ionenquelle

In den elektrostatischen MALDI-Quellen erhalten die erzeugten Ionen gleicher Polarität masseunabhängig (theoretisch) alle eine nominelle kinetische Energie pro Ladung. Prinzipiell ist es aber auch möglich die Beschleunigung in einer Ionenquelle nicht elektrostatisch durchzuführen (variable Pulszeit, variables Potential). Die Ionen erreichen am Ende der Beschleunigungsstrecke dann nominell denselben Impuls. Durch eine solche Anordnung könnte bei der folgenden Flugzeitanalyse gegenüber dem Fall der elektrostatischen Beschleunigung, theoretisch ein Gewinn an Massenauflösung resultieren ( $\approx$  Faktor 2) [254] [255]. Dieser Effekt wäre praktisch aber mit LDI/MALDI-Quellen, aufgrund der hohen Streuung der *initialen* kinetischen Energie aus dem Desorptions/Ionisierungsprozess ( $\Delta K \geq 50$  eV) sehr wahrscheinlich nicht erkennbar. Die Ionen in einer elektrostatischen Einrichtung erreichen eine einheitliche nominelle kinetische Energie (K):

$$K = q \int_{s_{start}}^{s_{end}} E \cdot ds = \frac{mv^2}{2} \quad (3.55)$$

Bei homogenen elektrostatischen Feldern kann als (gute) Näherung eine Integration durch eine Multiplikation ersetzt werden,  $K = q \cdot E \cdot S = zeU$ ,  $q := ze$ . Die effektive Ladung setzt sich dabei aus der Anzahl der Ladungen multipliziert mit der Elementarladung zusammen. Ein als Punktladung  $q$  angenommenes Ion an einem Referenzstartort mit den Koordinaten  $x = y = z = 0$  erfährt dann eine Kraft,

$F_{el.} = -qU/S$  (Coulomb-Kraft), die insgesamt beschleunigend wirkt. Gemäß dem *zweiten newtonschen* Gesetz der klassischen Mechanik gilt der Zusammenhang:

$$m \frac{dv}{dt} = \frac{qE}{m} = a = \ddot{z} \quad (3.56)$$

Weist die aus der Desorption/Ionisierung stammende initiale Trajektorie eines einzelnen Ions, die in Hochvakuumquellen (ohne externe Kräfte, z.B. DE) zunächst als linear angenommen werden soll, einen Winkel  $\theta \neq 0^\circ$  gegenüber der optischen Achse des axialsymmetrischen homogenen Längsfeldes auf, wird die initiale Flugrichtung während der (elektrostatischen) Beschleunigung verändert. Dabei werden nur die den Feldvektoren parallelen Geschwindigkeitsbeträge erhöht. In Analogie zur geometrischen Optik (elektromagnetischer Strahlung) entsteht eine Brechung der linearen Ausbreitung. Durchquert dabei ein aus einem feldfreien Bereich kommendes Ion ein homogenes elektrostatisches Feld und verlässt dieses in einen zweiten feldfreien Bereich, kann hierzu ein Brechungsindex angegeben werden. Dieser entspricht der Wurzel der Potentialdifferenz an den Elektroden, zwischen denen das Feld ausgebildet wird,  $n = \sqrt{U}$ .

### 3.3.8 Exakte Flugzeitgleichung

In Flugzeitspektrometern mit gerader Achse und axialsymmetrischen elektrostatischen Feldern ist die zurückgelegte Strecke  $S$  eines stabilen Ions im wesentlichen auf den Differenzbetrag der  $z$  (-axialen) Komponente reduzierbar. Die benötigte Flugzeit während einer Beschleunigung kann aus den Beziehungen der klassischen Mechanik erhalten werden:

$$S = \frac{q \cdot E}{2 \cdot m} \cdot t^2 ; t_s = S \sqrt{\frac{2m}{q \cdot E}} \quad (3.57)$$

Es gilt weiterhin für eine *konstante* Beschleunigung und den angenommenen axialen Momentangeschwindigkeiten eines Ions:

$$v = at \quad (3.58)$$

$$S = \frac{1}{2} at^2 = \frac{1}{2} a \left(\frac{v}{a}\right)^2 \quad (3.59)$$

$$S_{start} = \frac{1}{2} \frac{v_{start}^2}{a} \quad (3.60)$$

$$S_{end} = \frac{1}{2} \frac{v_{end}^2}{a} \quad (3.61)$$

Wobei man nach einer Integration, die während der konstanten Beschleunigung zurückgelegte Strecke erhalten kann:

$$S = S_{end} - S_{start} = \frac{1}{2} \frac{1}{a} (v_{end}^2 - v_{start}^2) \quad (3.62)$$

und für die erreichte Endgeschwindigkeit dann die Beziehung:

$$\begin{aligned} v_{end}^2 &= 2a S + v_{start}^2 \\ v_S &= \sqrt{v_{start}^2 + 2a S} = \left( v_{start}^2 + \frac{2qES}{m} \right)^{1/2} \end{aligned} \quad (3.63)$$

In einem *linearen* Flugzeitanalysator beträgt die Flugzeit des Ions in der feldfreien Driftstrecke  $d$  dann  $t_d = \frac{d}{v_S}$  oder anders:

$$t_d = d \cdot \sqrt{\frac{m}{2 \cdot q \cdot E \cdot S}} \quad (3.64)$$



Prinzipiell ergibt sich aus der Addition der beiden Flugzeiten letztlich die Gesamtflugzeit  $t_{Gesamt} = t_s + t_d$  und die für einen Flugzeitanalysator charakteristische Beziehung (Flugzeitformel):

$$t_{Gesamt} = \sqrt{\frac{m}{q}} \int_{s_{start}}^{s_{end}} \frac{ds}{\sqrt{2U_{Gesamt}}} \propto \sqrt{\frac{m}{q}}$$

$$t_{Gesamt} = \frac{v_S - v_{start}}{a} + \frac{d}{v_S} \quad (3.65)$$

In realen Puls-Experimenten werden nahezu immer Populationen einer bzw. mehrerer Ionenspezies erzeugt. Die entstehenden Ionen weisen dabei eine initiale kinetische Energieverteilung auf und mit dieser auch unterschiedliche initiale Geschwindigkeiten. Ionen einer Population (Masse bzw. isotonenreiner Summenformel) können ebenso innerhalb der Laserpulsdauer  $\tau^{64}$  zu unterschiedlichen Zeiten gebildet werden. Insgesamt lassen sich damit drei *ab initio* Ursachen identifizieren, die zu einer bestimmten *Varianz* in der gemessenen Flugzeit einer Ionenpopulation führen kann:

1. *initiale Energieverteilung*
2. *initiale Zeitverteilung*
3. *initiale Ortsverteilung*

Der Einfluss einer initialen kinetischen (Translations)Energie ( $K_{ini} = qU_{ini} \approx kT_z$ ) und der einer initialen longitudinalen Ortsabweichung können dabei zusammen behandelt werden. Sie sind ursächlich voneinander unabhängig aber in ihren Auswirkungen gleichartig. Im folgenden wird  $\Delta z$  im Sinne einer absoluten initialen Ortsabweichung zu einer Referenzposition innerhalb der ersten Beschleunigungsstrecke verwendet. Ein betrachtetes Ion erhält dann insgesamt eine kinetische Energie, die zusätzlich von seiner initialen kinetischen Energie und seiner z-axialen Startposition abhängt:

$$qU_{Gesamt} = q(U_{ini} + E_1(S_1 - \Delta z)) \quad (3.66)$$

Die Trennung der Ionen erfolgt dann aufgrund von Unterschieden in der kinetischen Energie  $\Delta K = K - K_0$  und der Masse  $\delta m = m - m_0$  relativ zu einer Referenz ( $K_0, m_0$ ). Es gilt für ein beliebiges Ion [14]:

$$\frac{K}{q} = \frac{K_0}{q_0} (1 + \delta_K) ; \quad \frac{m}{q} = \frac{m_0}{q_0} (1 + \delta_m) \quad (3.67)$$

Die relative Flugzeit beträgt dann für ein Spektrometer mit einstufiger Beschleunigung und der feldfreien Driftstrecke  $d$  mit der Referenzflugzeit  $t_0 = d \sqrt{m_0/2K_0}$  aber ohne Berücksichtigung initialer Differenzen im Ionisierungszeitpunkt:

$$t = d \sqrt{\frac{m}{2K}} = t_0 (1 + \delta_t) \quad (3.68)$$

Eine effektive Möglichkeit die Flugzeit der Ionen in einem TOF-Spektrometer unabhängig von Energiefehlern  $\delta_K$  zu machen, besteht in dem Einsatz homogener elektrostatischer Abbremsfelder hinter der feldfreien Flugstrecke (Reflektor). Am Beispiel des einstufigen Reflektors mit der Feldstärke  $E_{R1}$ , dringen die Ionen bis zu einer Tiefe von  $d_R = K/E_R$  in das Abbremsfeld ein, bevor sie umkehren und letztlich im wesentlichen die Flugzeit  $t = 2(d + 2d_R)/v$  für eine Strecke  $2(d + d_R)$  bis zu ihrer Detektion zurücklegen. Die Flugzeit für ein beliebiges Ion mit  $\delta_m \neq 0$ , relativ zu einer Referenz, ergibt sich dann aus der Beziehung [14]:

$$t = \frac{2 \sqrt{m/m_0}}{v_0 \sqrt{1 + \delta_K}} \left( d + 2 \frac{K_0}{E_R} (1 + \delta_K) \right)$$

$$\approx \frac{2}{v_0} \sqrt{m/m_0} \left( \left( d + 2 \frac{K_0}{E_R} \right) + \left( d - 2 \frac{K_0}{E_R} \right) \delta_K + \left( \frac{d}{6} - \frac{2K_0}{3E_R} \right) \delta_K^2 + \dots \right) \quad (3.69)$$

<sup>64</sup>Diese wird üblicherweise als Halbwertsbreite der Energieverteilung über die Emissionszeit angegeben.

Es wird hieraus einerseits ersichtlich, daß eine Korrektur hinsichtlich des linearen und des quadratischen Terms von  $\delta_K$  simultan mit einem einstufigen Reflektor nicht erreicht werden kann [14]. Wählt man für  $d = 2K_0/E_R = 2d_R$  kann der lineare Term eliminiert werden, während der quadratische Term verbleibt. Wählt man  $d = 4K_0/E_R = 4d_R$  wird der quadratische Term eliminiert und der lineare Term wird  $\neq 0$ . Eine simultane Eliminierung (am 2. Ortsfokus), also eine gleichzeitige Korrektur der Flugzeit hinsichtlich der Energiefehler in erster und zweiter Ordnung kann durch zweistufige Reflektoren oder durch Reflektoren mit inhomogenem Feldverlauf (gitterfreie Reflektoren) erreicht werden [14] [18].

Bezugnehmend auf Abschnitt 2.3 kann die Bewegungsgleichung für ein Ion relativ zu einem Referenzion durch die transversalen Abstände  $x(z)$ ,  $y(z)$ , die Impulskomponenten bzw. Richtungen  $a(z), b(z)$  und die Flugzeitdifferenz  $\Delta t = t_0 \delta_t$  zum Referenzion berechnet werden. Die Parameter am Ort der Detektion in der Form eines Spaltenvektors (Index = 1) ergeben sich dann in Matrixschreibweise aus den Parametern am Startort (Index = 0) [14]:

$$\begin{pmatrix} x_1 \\ a_1 \\ \delta_{t_1} \\ y_1 \\ b_1 \\ \delta_{K1} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} (x|x) & (x|a) & 0 & 0 & 0 & (x|\delta_K) \\ (a|x) & (a|a) & 0 & 0 & 0 & (a|\delta_K) \\ (\delta_t|x) & (\delta_t|a) & 1 & 0 & 0 & (\delta_t|\delta_K) \\ 0 & 0 & 0 & (y|y) & (y|b) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & (b|y) & (b|b) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_0 \\ a_0 \\ 0 \\ y_0 \\ b_0 \\ \delta_0 \end{pmatrix} \quad (3.70)$$

Es gilt dabei weiterhin, daß alle Ionentrajektorien Lösungen der *kanonischen* Bewegungsgleichungen (3.3.1) sind und damit zudem gilt:

$$(x|x)(a|a) - (x|a)(a|x) = 1 \quad (3.71)$$

$$(y|y)(b|b) - (y|b)(b|y) = 1 \quad (3.72)$$

$$(\delta_t|x) = (p_0 v_0 / K_0) [(a|x)(x|\delta_K) - (x|x)(a|\delta_K)] \quad (3.73)$$

$$(\delta_t|a) = (p_0 v_0 / K_0) [(a|a)(x|\delta_K) - (x|a)(a|\delta_K)] \quad (3.74)$$

Hieraus wird ersichtlich, daß eine Optimierung der longitudinalen Komponenten ( $\delta_t|...$ ) nur durch geeignete Anpassung der lateralen Komponenten ( $x|...$ ), ( $a|...$ ) erreicht werden kann. In vollständig symmetrischen Anordnungen gilt bei einer Punkt-zu-Punkt Abbildung (identische Bedingungen für die zweite laterale Richtung  $y$ ):

$$(x|a) = (x|\delta_K) = (a|\delta_K) = 0 \quad (3.75)$$

$$(\delta_t|x) = (\delta_t|a) = 0 \quad (3.76)$$

D. h. die Flugzeitspreizung ist in erster Ordnung unabhängig von der lateralen Ionenstartposition ( $x, y$ ), der Energiespreizung ( $\delta_K$ ) und dem Ionenstartwinkel ( $a, b$ ) bzw. kann eliminiert werden. Nicht vollständig symmetrische Anordnungen erreichen dies nur als Näherung. Ähnliches gilt für die Aberrationen zweiter u. höherer Ordnungen. Außer den Koeffizienten  $\delta_K, \delta_K^2, \dots$  können dabei alle anderen longitudinalen Koeffizienten aus den lateralen Koeffizienten gebildet werden. Eine hinreichende Korrektur hinsichtlich sphärischer Aberrationen erfolgt i.d.R. mit Ionenreflektoren. Eine detailliertere Besprechung findet man z.B. in [14] [21].

### Longitudinale Ortsfokussierung

HV-MALDI-Proben liegen im festen Aggregatzustand vor und die größte Abtragstiefe  $l_a$  pro Laserpuls ist im allgemeinen kleiner, als die mögliche transversale Ortsabweichung in einer bestrahlten runden

Querschnittsfläche  $(l_t/2)^2\pi$  der Probe. Je nach Fokussierung des Lasers z.B. auf Taillendurchmesser von  $d = 300 \mu\text{m}$  bis  $d = 600 \text{ nm}$ , beträgt das Verhältnis  $\frac{l_t}{d} \approx 3 \cdot 10^{-4}$  bis 0.17 (Lasereindringtiefe,  $\delta \approx 100 \text{ nm}$ ). Es kann deshalb bei Einzelpuls-Messungen an einer diskreten Probenstelle angenommen werden, daß der Einfluss der initialen Energieverteilung zumindest den der *longitudinalen* Ortsverteilung klar dominiert. Für das am weitesten von der Extraktionselektrode startende Ion soll dabei gelten,  $\Delta z \rightarrow S/2$ , wobei im Verhältnis zur Gesamtflugstrecke nur kleine Längendifferenzen vorliegen und in den Näherungsbeziehungen infinitesimale Ortsunterschiede angenommen werden. Über die initiale Geschwindigkeit der Ionen  $v_{ini} \approx v_z = v_{start}$  und die erreichte Endgeschwindigkeit nach einer Beschleunigungszone  $v_{S,n}$ , können dann die Flugzeiten approximiert werden. Die in einer einstufigen elektrostatischen Ionenquelle beschleunigten Ionen erhalten eine Ortsfokussierung (1. Ordnung).

### Annahme

Für alle weiteren Betrachtungen (3.3.4, Ausnahme DE) wird zunächst angenommen, daß Ionen ohne Initialgeschwindigkeit bzw. kinetische Translationsenergie ( $K_{ini} = 0$ ), zeitgleich, erzeugt werden.

Es wird dann der Ort gesucht an dem zwei Ionen mit einem longitudinalen (z-axialen) Startortunterschied, hinter der Beschleunigungsstrecke, zur gleichen Zeit vorliegen. Aufgrund der unterschiedlichen Flugstrecken (Referenzion  $\Delta z = 0$ ) in der ersten Beschleunigungszone erhalten diese Ionen verschiedene kinetische Energien nach dem Quelldurchlauf und deshalb unterschiedliche Endgeschwindigkeiten. Der gesuchte Ort wird als *Ortsfokus* (1. Ortsfokus) bezeichnet. An diesem werden schnellere Ionen mit relativ großer Beschleunigungsstrecke langsamere Ionen derselben Masse mit relativ kürzerer Beschleunigungsstrecke gerade eingeholt haben. Mit einer einstufigen Extraktion ist der Ortsfokus nicht verschiebbar, eine Korrektur 1.Ordnung legt diesen bereits, durch die Länge der Beschleunigungsstrecke  $S$ , vollständig fest. Wie später noch gezeigt wird, liegt der Ortsfokus dicht hinter der Beschleunigungsstrecke. Es entsteht so die Situation, daß theoretisch eine Verringerung der Extraktionsspannung ( $U = ES$ ) zwischen den Elektroden und damit eine Verlängerung der Flugzeit zu einem geringeren Einfluss einer Zeitabweichung, ausgelöst durch initiale axiale Ortsabweichungen führt. Gleiches gilt für eine Verlängerung der Beschleunigungsstrecke  $S$ . Starten die Ionen insgesamt in einem Bereich der nah an der ersten Elektrode (Targetoberfläche) liegt, wird der relative Beitrag einer gleichbleibenden axialen Ortsabweichung im Vergleich zur (maximalen) Beschleunigungsstrecke geringer (*virtuelles Flugzeitspektrometer*). Da bei MALDI aber die Laserenergie zu thermischen Prozessen führt, die eine größere initiale Geschwindigkeit und Spreizung der kinetischen Energie innerhalb der Analytioneverteilung<sup>65</sup> hervorruft, erhöht eine Absenkung der Extraktionsspannung den relativen Einfluss der initialen Energieverteilung<sup>66</sup>, soweit dieser nicht durch zusätzliche Korrekturvorrichtungen beseitigt wird.

### Zweistufige Ionenquelle

In Abbildung 3.23 wird schematisch eine zweistufige Ionenquelle mit einer sich anschliessenden Rohrlinse (Einzellinse) dargestellt. In MALDI-TOF-Spektrometern werden in der Regel *zweistufige* Ionenquellen nach dem Prinzip von Wiley und McLaren im Zusammenhang mit einer weiteren Zeit-/Geschwindigkeitskorrektur hinsichtlich des ersten Ortsfokus verwendet. Diese zusätzliche Korrektur, zunächst im Zusammenhang mit kontinuierlichen Einlasssystemen und gepulster Ionenerzeugung als *Time-lag-energy-focusing* bezeichnet, ist mit MALDI überwiegend unter dem Begriff *Delayed Extraction*, kurz DE bekannt [17]. Bei der zweistufigen Ionenquelle liegen zwei elektrostatische Felder in der Quelle an. Der Potentialgradient in der ersten Beschleunigungsstufe ist dabei i.d.R. deutlich niedriger, als der Gradient in der

<sup>65</sup>  $\Delta E_{kin,ini} \approx 50 \text{ eV}$  bzw. auch höher.

<sup>66</sup>  $\Delta E_{kin} = \frac{E_{kin,ini}}{E_{kin}}$

zweiten Stufe. Man erhält die Flugzeit eines Ions mit einer zweistufigen Quelle als zusammengesetzte Gesamtflugzeit,  $t_{Gesamt} = t_{S_1} + t_{S_2} + t_d$ :

$$\begin{aligned}
 t_{Gesamt} &= \underbrace{\sqrt{\frac{2m}{qE_1}} \left( \sqrt{U_{ini} + qE_1(S_1 - \Delta z)} \pm \sqrt{U_{ini}} \right)}_{t_{S_1}} \\
 &+ \underbrace{\sqrt{\frac{2m}{qE_2}} \left( \sqrt{U_{ini} + qE_1(S_1 - \Delta z) + qE_2 S_2} - \sqrt{U_{ini} + qE_1(S_1 - \Delta z)} \right)}_{t_{S_2}} \\
 &+ \underbrace{\sqrt{2m} \frac{d}{2\sqrt{U_{ini} + qE_1(S_1 - \Delta z) + qE_2 S_2}}}_{t_d} \tag{3.77}
 \end{aligned}$$

bzw. mit den Momentangeschwindigkeiten nach der jeweiligen Beschleunigungsstufe ausgedrückt

$$t_{Gesamt} = \frac{v_{S_1} - v_{ini}}{a_1} + \frac{v_{S_2} - v_{S_1}}{a_2} + \frac{d}{v_{S_2}} \tag{3.78}$$

$$v_{S_2} = \sqrt{v_{ini}^2 + 2a_1(S_1 - \Delta z) + 2a_2 S_2} \tag{3.79}$$

### 3.3.9 Näherung der Ionenflugzeit

Anhand der aufgestellten Wurzelausdrücke wird klar, daß eine analytische Lösung erschwert ist. Man verwendet deshalb bei numerischen Berechnungen Näherungen für die Wurzelbeziehungen. Die Wurzelausdrücke der Geschwindigkeiten in der Flugzeitgleichung können dabei explizit in der Form einer Reihenentwicklung approximiert werden. Die exakte Flugzeitgleichung wird dann über eine Taylor-Reihe approximiert. Eine beispielhafte Berechnung für unterschiedliche MS-Anordnungen zur Untersuchung größerer biologischer Molekülonen findet sich z.B. in [256].

#### Approximierung der Wurzelausdrücke

Zu einer Näherung müssen zunächst die Wurzelausdrücke in der Flugzeitgleichung umgestellt werden, um diese in einer Reihe entwickeln zu können. Es gilt dabei der Ansatz  $\sqrt{y} = h\sqrt{1+x}$  mit  $|x| < r$ . Die Koeffizienten einer solchen Reihe ergeben sich mit der Wahl der Entwicklungsstelle  $x = 0$  dann als Maclaurin-Reihe (Spezialfall der Taylorreihe):

$$g(x) = \sqrt{1+x} \Rightarrow g(0) = 1 \tag{3.80}$$

$$g'(x) = \frac{1}{2}(1+x)^{-\frac{1}{2}} \Rightarrow g'(0) = \frac{1}{2} \tag{3.81}$$

$$g''(x) = -\frac{1}{4}(1+x)^{-\frac{3}{2}} \Rightarrow g''(0) = -\frac{1}{4} \tag{3.82}$$

$$g'''(x) = \frac{3}{8}(1+x)^{-\frac{5}{2}} \Rightarrow g'''(0) = \frac{1 \cdot 3}{2 \cdot 4} = \frac{3}{8} \tag{3.83}$$

$$\Rightarrow 1 + \frac{1}{2}x - \frac{1}{2 \cdot 4}x^2 + \frac{1 \cdot 3}{2 \cdot 4 \cdot 6}x^3 \mp \dots \tag{3.84}$$

$$g(x) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{g^{(k)}(0)}{k!} x^k = g(0) + \frac{g'(0)}{1!} x + \frac{g''(0)}{2!} x^2 + \dots \tag{3.85}$$

Wie man erkennt, gilt für die Ableitungen an der Entwicklungsstelle  $g^{(k)}(0) \neq 0$ . Trifft dies für alle  $k \in \mathbf{N}$  ( $\mathbf{N}$  = Menge der natürlichen Zahlen) zu, folgt daraus letztlich, daß die Reihe dann konvergiert, wenn

$r = 1 \Rightarrow I \in (-1, 1)$ , d.h. die Funktion in einem Konvergenzintervall  $I$  stetig ist. Der Parameter  $r$  wird auch als Konvergenzradius bezeichnet. In einem Wurzelausdruck ist es deshalb notwendig, die Terme nach ihren Beträgen zu ordnen. Die Ableitungen der Wurzelnäherungen werden zu einer expliziten Berechnung, je nach der Entwicklung des dann im folgenden aufgestellten Taylor-Polynoms, zur Näherung der exakten Flugzeitgleichung bei infinitesimalen z-axialen Ortsunterschieden bis zur n. Ordnung berücksichtigt. Eine Wurzelnäherung ergibt dabei Reihen der folgenden Art:

$$\begin{aligned}\sqrt{1 \pm x} &\approx 1 \pm \frac{1}{2} x - \frac{1}{2 \cdot 4} x^2 \pm \frac{1 \cdot 1 \cdot 3}{2 \cdot 4 \cdot 6} x^3 - \frac{1 \cdot 1 \cdot 3 \cdot 5}{2 \cdot 4 \cdot 6 \cdot 8} x^4 \pm \dots \\ \frac{1}{\sqrt{1 \pm x}} &\approx 1 \mp \frac{1}{2} x + \frac{1 \cdot 3}{2 \cdot 4} x^2 \mp \frac{1 \cdot 3 \cdot 5}{2 \cdot 4 \cdot 6} x^3 + \frac{1 \cdot 3 \cdot 5 \cdot 7}{2 \cdot 4 \cdot 6 \cdot 8} x^4 \mp \dots\end{aligned}\quad (3.86)$$

### Approximierung der Flugzeitfunktion

Bei der Bildung eines Taylor-Polynoms geht man davon aus, daß für eine Funktion  $f(x)$  eine Approximation in der Form einer Reihenentwicklung anhand der Funktion  $f(x_0)$  an einer Entwicklungsstelle  $x_0$  möglich ist:

$$f(x) = f(x_0) + \frac{f'(x_0)}{1!}(x - x_0) + \frac{f''(x_0)}{2!}(x - x_0)^2 + \dots + \frac{f^{(n)}(x_0)}{n!}(x - x_0)^n \quad (3.87)$$

Die zu nähernde Funktion  $f(x)$ , die sich so in einem Punkt  $x_0$  als Taylor-Polynom entwickeln lässt (z.B. dritten Grades), entspricht dann letztlich der Form:

$$f(x) = b_0 + b_1(x - x_0) + b_2(x - x_0)^2 + b_3(x - x_0)^3 \quad (3.88)$$

Wobei die Koeffizienten  $b_k$  aus den Ableitungen der Funktion  $f(x_0)$  bestimmt werden. Es gilt dabei, wenn die Flugzeitgleichung als Funktion der ersten Beschleunigungsstrecke  $S_1$  unter Berücksichtigung infinitesimaler Ortsunterschiede (z-Achse) aufgestellt wird, mit der Entwicklungsstelle  $z_0$ :

$$\begin{aligned}t_{(S_1)} &= b_0 + b_1(S_1 - z_0) + b_2(S_1 - z_0)^2 + b_3(S_1 - z_0)^3 \\ t'_{(S_1)} &= b_1 + 2b_2(S_1 - z_0) + 3b_3(S_1 - z_0)^2 \\ t''_{(S_1)} &= 2b_2 + 6b_3(S_1 - z_0) \\ t'''_{(S_1)} &= 6b_3\end{aligned}\quad (3.89)$$

Die entstehende Flugzeitdifferenz, die im Verlauf der Reihenentwicklung ausgeglichen werden soll, ergibt sich dann aus den aufsummierten Beträgen bis zur n-ten Ableitung:

$$\Delta t_{Gesamt} = t_{S_1} - t_{S_{z_0}} = \sum_{n=0}^{\infty} b_k (S_1 - \Delta z)^n \quad (3.90)$$

Die Berechnung der Koeffizienten  $b_k$  folgt aus der Differentiation:

$$\begin{aligned}t_{(S_{z_0})} = b_0 &\Rightarrow b_0 = t_{(S_{z_0})} \\ t'_{(S_{z_0})} = b_1 &\Rightarrow b_1 = t'_{(S_{z_0})} = \frac{t'_{(S_{z_0})}}{1!} \\ t''_{(S_{z_0})} = 2b_2 &\Rightarrow b_2 = \frac{t''_{(S_{z_0})}}{2!} \\ t'''_{(S_{z_0})} = 6b_3 &\Rightarrow b_3 = \frac{t'''_{(S_{z_0})}}{3!} \\ \Rightarrow t_{(S_1)} = t_{(S_{z_0})} &+ \frac{t'_{(S_{z_0})}}{1!}(S_1 - \Delta z) + \frac{t''_{(S_{z_0})}}{2!}(S_1 - \Delta z)^2 + \frac{t'''_{(S_{z_0})}}{3!}(S_1 - \Delta z)^3\end{aligned}\quad (3.91)$$

Die Koeffizienten werden bei dieser Vorgehensweise aus den genäherten Wurzelausdrücken für jede Stufe der Beschleunigung und der Driftstrecke mit der entsprechenden Ableitung erhalten. Es gilt dabei die Korrektur einer Ortsfokussierung n. Ordnung hinsichtlich infinitesimaler z-Koordinatenunterschiede, wenn es möglich ist  $t_{(S_{z_0})}^{(n)} = 0$ , für die entsprechende Ordnung anhand der Parameterwahl zu erreichen [17].

Das Prinzip einer Ortsfokussierung für infinitesimale z-axiale Abweichungen soll hier kurz anhand einer zweistufigen Quelle bis zur 2. Ordnung dargestellt werden. Den betrachteten Ionen wird dabei keine initiale kinetische Translationsenergie bzw. Geschwindigkeit aus dem Desorptions-/Ionisierungsprozess zugeordnet die Parameter hierzu,  $U_{ini}$  (Biaspotential) bzw.  $v_{ini}$ , werden aber dennoch mitgeführt. Das betrachtete Ionenpaar (Referenzion, Ion mit Ortsabweichung) startet bzw. entsteht gleichzeitig<sup>67</sup>.

Aus der Flugzeitgleichung wird zunächst (ohne Substitutionen) die erste Ableitung gebildet:

$$\left( \frac{\partial t}{\partial S_{\Delta z}} \right)_{\Delta z=0} = \frac{\sqrt{2m}}{2} \left( \frac{1}{\sqrt{U_{ini} + qE_1 S_1}} \left( \frac{E_1}{E_2} - 1 \right) - \frac{E_1}{E_2} \frac{1}{\sqrt{U_{Gesamt}}} + \frac{qE_1 d}{2(U_{Gesamt})^{\frac{3}{2}}} \right) \quad (3.92)$$

Man erhält nach erneutem (partiellen) ableiten dann:

$$\left( \frac{\partial^2 t}{\partial S_{\Delta z}^2} \right)_{\Delta z=0} = \frac{\sqrt{2m}}{4} qE_1 \left( \frac{1}{(U_{ini} + qE_1 S_1)^{\frac{3}{2}}} \left( \frac{E_1}{E_2} - 1 \right) - \frac{E_1}{E_2} \frac{1}{(U_{Gesamt})^{\frac{3}{2}}} + \frac{d}{2} \frac{3qE_1}{(U_{Gesamt})^{\frac{5}{2}}} \right) \quad (3.93)$$

Um eine Ortsfokussierung erster Ordnung zu erreichen, muss die Bedingung (3.92) = 0 erfüllt werden können. Bei  $U_{ini} = 0$ ,  $v_{ini} = 0$ ,  $E_2, S_2 = 0$  ist dies für eine einstufige Quelle nur mit dem Parameterwert  $d = 2S_1$  zu erreichen. Bei einer zweistufigen Quelle ergeben sich dagegen (mehrere) Möglichkeiten die aus der erhaltenen Beziehung z.B. numerisch ermittelt werden können:

$$\begin{aligned} d &= 2S_1 k_{02}^{\frac{3}{2}} \left( 1 - \frac{1}{k_{02} + \sqrt{k_{02}}} \frac{S_2}{S_1} \right) \\ &= 2U_{Gesamt} \left( \frac{1}{qE_1} \frac{\sqrt{U_{Gesamt}}}{\sqrt{U_{ini} + qE_1 S_1}} + \frac{1}{qE_2} \left( 1 - \frac{\sqrt{U_{Gesamt}}}{\sqrt{U_{ini} + qE_1 S_1}} \right) \right) \\ &= 2v_{S_2}^2 \frac{S_1 v_{S_2} v_{S_1} + S_1 v_{S_2}^2 - S_2 v_{S_1}^2}{v_{S_1}^3 (v_{S_1} + v_{S_2})} \end{aligned} \quad (3.94)$$

Wobei die erste Beziehung mit der folgenden Substitution, die bereits von Wiley und McLaren angegeben wurde, erhalten werden kann. Diese setzt die kinetische Energie, die in der ersten Beschleunigungsstrecke insgesamt erreicht werden kann, in Relation zur kinetischen Energie die in der gesamten Beschleunigungseinrichtung erlangt wird [17]:

$$k_{02} = \frac{E_{kin,S_1} + E_{kin,S_2}}{E_{kin,S_1}} \equiv \frac{E_1 S_1 + E_2 S_2}{E_1 S_1} \quad (3.95)$$

Für eine Korrektur der Flugzeitabweichungen zweiter Ordnung müssen dann sowohl die Bedingung der ersten, als auch die der zweiten Ableitung, erfüllt werden können. Dazu substituiert man die gefundene

<sup>67</sup>Änderungen der Ionisierungszeitpunkte und der initialen kinetischen Energie sind bei MALDI-Experimenten an Oberflächen in weitaus stärkerem Maße von der Art der Desorption/Ionisierung, der Laserenergie, dem Pulsprofil, der Präparationsweise und dem betrachteten Matrix/Analytmodell abhängig, als der axiale Startort.

Beziehung für  $d$  aus (3.94) und bildet die zweite Ableitung, wobei dann die Bedingung einer gleichzeitigen Korrektur erster und zweiter Ordnung erreicht wird, wenn gilt:

$$0 = \frac{\sqrt{2m}}{4} qE_1 \left( \left( \frac{1}{(U_{ini} + qE_1 S_1)^{\frac{3}{2}}} - \frac{3}{U_{Gesamt} \sqrt{U_{ini} + qE_1 S_1}} \right) \left( \frac{E_1}{E_2} - 1 \right) + \frac{2E_1}{E_2} \frac{1}{(U_{Gesamt})^{\frac{3}{2}}} \right) \quad (3.96)$$

Die möglichen Parameterkombinationen zur Festlegung des Ortsfokus  $d$  anhand der zweiten Ableitung sind dabei:

$$\frac{S_2}{S_1} = \left( 1 - \frac{3}{k_{02}} \right) \frac{d}{2S_1} \quad (3.97)$$

$$d = 2S_2 \frac{k_{02}}{1-3} = 2S_2 \frac{v_{S_2}^2}{v_{S_2}^2 - 3v_{S_1}^2}$$

Wiley und McLaren hielten fest, daß wenn das Verhältnis  $\frac{S_2}{S_1}$  in einer Anordnung größer wird, als aus Gleichung (3.97) gefordert, die Flugzeitfunktion bis zum Erreichen des Ortsfokus ein Minimum einnimmt. Ist das Verhältnis dagegen größer, ein Maximum. Wird die Bedingung  $k_{02} \leq 3$  erfüllt, dann stellt die Flugzeit immer ein Minimum dar [17]. Die Lage des Ortsfokus einer zweistufigen Ionenquelle kann also über die Potentiale und das Verhältnis der Beschleunigungsstrecken hinsichtlich geringer axialer Ortsabweichungen bis zur 2. Ordnung optimiert werden.

Man erhält nach diesen Überlegungen, in Abhängigkeit der realen axialen Startposition der Ionen, in der ersten Beschleunigungsstrecke ( $S_1 - \Delta z$ ):

$$(S_1 - \Delta z) = \frac{d - 2S_2}{2(d + S_2)} \left( d \sqrt[3]{\frac{d - 2S_2}{3d}} + S_2 \right) \quad (3.98)$$

einen Ortsfokus und ebenso ein sich daraus ergebendes sinnvolles Verhältnis der zu wählenden Potentiale an den Beschleunigungselektroden. So ergibt sich für das Potential der zweiten Elektrode:

$$U_2 = U_{(S_1 - \Delta z)} \frac{2(d + S_2)}{3d} \quad (3.99)$$

Bei  $\Delta z = 0$  liegt der Startort unmittelbar auf der 1. Elektrodenoberfläche.

### Dreidimensionale orts aufgelöste Flugzeitspektrometrie

Es besteht außerdem die Möglichkeit aus Flugzeitabweichungen der Schwerpunkte einer shiftenden Isotopenverteilung (Multiplet, Massenzentroid), auf initiale z-axiale Ortsunterschiede in einer MALDI-Probe zu schließen. Neben der lateralen Ortsinformation kann damit auch die longitudinale Ortsinformation aus dem Desorptionsort bestimmt werden. Die relativen initialen Energieunterschiede ( $\delta_K$ ) der Verteilungen aus dem Desorptions-/Ionisierungspuls dürfen dabei aber nicht zu stark voneinander abweichen, d.h. die relative Standardabweichung muss gering sein. Es ist außerdem erforderlich ein geeignetes Korrekturverfahren zu etablieren, das mögliche systematische Einflüsse hinreichend berücksichtigen kann. Hierzu sind mindestens zwei z-axiale Kalibrierpunkte notwendig. Da die auftretenden Ortsunterschiede sehr gering sein können ist es sehr wahrscheinlich, daß eine entsprechende Näherungsformel nach dem bekannten Muster bis zu höheren Entwicklungsordnungen i.d.R.  $n \geq 3$  aufgestellt werden muss. Eine Betrachtung der Ionenhäufigkeiten in Abhängigkeit ihrer klassifizierten Flugzeit (time bins), im Rahmen zweidimensional bildgebender Mikrosondenuntersuchungen, zeigte bereits die prinzipielle Durchführbarkeit einer axialen Flugzeittopologie anhand der Auswertung deskriptiver Statistiken [58] [257] [258] [259].



### Berücksichtigung von Beschleunigungsstufen $n \geq 3$

Eine wesentliche formale Vereinfachung, in der Darstellung der approximierten Flugzeitgleichung für mehrstufige Anordnungen, kann erreicht werden indem man das Verhältnis der Geschwindigkeiten nach einer Beschleunigungsstufe  $c$  durchgängig im Verhältnis zur erreichten Geschwindigkeit nach der ersten Beschleunigungsstrecke betrachtet und folgende Substitutionen einführt:  $R_i = \frac{E_i}{E_1}$  und  $L_i = \frac{S_i}{S_1}$  sowie  $X = 1 + \frac{v_{ini}^2}{2a_1 S_1} = 1 + \frac{m v_{ini}^2}{2S_1 z e E_1} = 1 + \frac{U_{ini}}{S_1 E_1}$ . Hierdurch wird das Vorgehen insgesamt komplizierter und eignet sich in erster Linie zu einer numerischen Bestimmung der Parameter. Das Verhältnis der Endgeschwindigkeit zur Geschwindigkeit nach der ersten Stufe kann dann, abweichend zu der von Wiley und McLaren angestellten Substitution, auch den Einfluss initialer Geschwindigkeiten berücksichtigen [17]. Auf diese Weise wird eine allgemeine Gleichung erhalten die es ermöglicht die Bedingungen einer Korrektur  $n$ . Ordnung, hinsichtlich initialer axialer Ortsunterschiede, für eine Quelle mit  $c$ -Stufen aufzustellen. Die Näherung der exakten Flugzeitgleichung für lineare TOF-Spektrometer stellt sich dann, wie zuvor, als Summe der Flugzeiten in den entsprechenden Stufen dar. Unterteilt man die einzelnen Flugstrecken mit Indizes  $c$ , können prinzipiell beliebig viele Beschleunigungsstrecken berücksichtigt werden. Die letzte Strecke  $c+1$  ist immer die feldfreie Driftstrecke [260]:

$$t_c = \frac{v_1 - v_{ini}}{a_1} + \sum_{i=2}^c \frac{v_i - v_{i-1}}{a_i} + \frac{S_{c+1}}{v_c} \quad (3.100)$$

Die Ionengeschwindigkeit, die nach der  $c$ -ten Beschleunigungsstrecke erreicht wird, ist die bekannte Wurzelbeziehung, allgemein:

$$v_c = \sqrt{v_{ini}^2 + \sum_{i=1}^c 2a_i S_i} \quad (3.101)$$

bzw. in alternativer Schreibweise

$$\left(\frac{v_c}{v_1}\right)^2 = 1 + \sum_{i=2}^c \frac{R_i L_i}{X} = K_c \quad (3.102)$$

Die allgemeine Gleichung für die  $j$ -te (partielle) Ableitung mit  $j = 1 \rightarrow n$  für eine  $c$ -stufige Quelle mit der Fokussierungsbedingung entspricht dann:

$$\left(\frac{\partial^j t}{\partial S^j}\right) = 2XK_c \left( \frac{1}{R_c} + K_c^{j-\frac{1}{2}} \left(1 - \frac{1}{R_2}\right) + \sum_{i=2}^{c-1} \left(\frac{K_c}{K_i}\right)^{j-\frac{1}{2}} \left(\frac{1}{R_i} - \frac{1}{R_{i+1}}\right) \right) - (2j-1)L_{c+1} = 0 \quad (3.103)$$

Eine Ortsfokussierung erzeugter Ionenpopulationen gelingt am besten, wenn der überwiegende Teil der desorbierten Population von einer axialen Position in der ersten Beschleunigungsstrecke startet für den das Verhältnis  $\frac{v_{ini}^2}{2a_1(S_1 - \Delta z)} \rightarrow 0$  bzw.  $U_{ini} \ll E_1(S_1 - \Delta z)$  erfüllt wird.

### Verzögerte Ionenextraktion (DE)

In einer MALDI-Präparation können theoretisch zwei Isotope, die von einer identischen Position desorbiert werden, zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb des Laserimpulses ( $\tau \leq 15ns$ ) ihre Ladung erhalten. Unterstellt man eine identische initiale kinetische Startenergie und Startrichtung, erfolgt aufgrund eines permanent anliegenden elektrostatischen Feldes eine sofortige zusätzliche Beschleunigung des geladenen Isotops, wohingegen das neutrale Isotop zunächst nur die initiale Beschleunigung aus der Desorption erfährt (Translationsbewegung). Hieraus resultiert eine Flugzeitdifferenz, die im Wesentlichen

mit der als Umkehrzeit (*turn-around-time*) bezeichneten Verzögerung im Extraktionsraum kontinuierlicher Einlasssysteme (der  $4\pi$ -Geometrie) und gepulster Ionisierung vergleichbar ist. Der Effekt der Richtungsabhängigkeit reduziert sich bei MALDI aber, aufgrund des Targets, auf einen  $180^\circ$ -Halbraum ( $2\pi$ ,  $\pi$ ).

Ein initialer Energieunterschied einfachgeladener Ionen mit nahezu identischer Position und Entstehungszeitpunkt, der unter einem Prozent der gesamten potentiellen Energie der elektrostatischen Einrichtung beträgt (z.B.  $\frac{50eV}{20kV}$ ), führt i.d.R. aber bereits zu einer Flugzeitabweichung, die mit einer reinen Ortsfokussierung nicht mehr korrigiert werden kann. Zur Korrektur der energiebedingten Flugzeitabweichungen eignet sich dann der Einsatz eines Reflektors (Ionenspiegel) [17] [18].

Eine Möglichkeit die Situation unterschiedlicher Ionisierungszeitpunkte in MALDI-Quellen berücksichtigen zu können besteht darin, das elektrostatische Feld in der ersten Beschleunigungsstrecke nicht permanent, sondern zeitlich verzögert anzulegen. Eine DE-Einrichtung entkoppelt damit bis zu einem Restbetrag die initialen Geschwindigkeits-/Zeitunterschiede eines engen Massenbereiches von der Gesamtflugzeit der Ionen. Praktisch anwendbar sind dabei Delayzeiten  $t_{delay} > 100$  ns. Besonders für die initiale Energieverteilung bei MALDI ist diese Korrektur aber noch unzureichend. Ebenso muss berücksichtigt werden, daß eine initiale Geschwindigkeitsverteilung bei angenommener einheitlicher initialer kinetischer Energie der Ionen, die diese aus der Desorption erhalten, im feldfreien (DE)Raum von der Ionenmasse abhängen kann. Eine Delayed Extraction-Schaltung ist also immer nur für ein begrenztes Masseintervall n-fach geladener Ionen optimal.

Die Delayzeit ist proportional zur Gesamtflugzeit der Ionen. In linearer Näherung kann angenommen werden, daß eine Multiplikation eine Integration ersetzt. Die Ionen legen dann eine angenommene Wegstrecke  $\Delta z$  zurück:

$$v_{ini} t_{delay} = \Delta z \quad (3.104)$$

Die initiale Geschwindigkeit der Ionen ist, anders als bei einer Ionisierung aus äquilibrierten Teilchenstrahlen (*molecular jet*), nicht vom Zeitpunkt der Desorption/Ionisierung an konstant, sondern wird allmählich (asymptotisch) erreicht. Die eigentliche Startgeschwindigkeit der Ionen bei MALDI ist damit zunächst unbekannt. Sie kann aber aus Vergleichsmessungen approximiert werden, wie bereits eingangs erwähnt (Grundlagen). Für die aus der Desorption einsetzende Beschleunigung ist die Plumezusammensetzung und der Restgasdruck in der Ionenquelle entscheidend bei der Einstellung einer initialen Endgeschwindigkeit. Bei einem verzögerten Einsetzen des elektrostatischen Feldes entspricht sie dem jeweiligen Momentanwert. Da bei prompt anliegendem elektrostatischen Feld eine dichte Plumwolke bzw. ein relativ dichter Plasmaanteil eine Abschirmung hervorrufen kann, gilt dies im Prinzip auch in diesem Fall. Eine Approximierung der initialen Geschwindigkeit erfolgt z.B. anhand von Messungen mit mehreren Delayzeiten. Die Delayzeit kann in der Näherung der exakten Flugzeitfunktion einer mehrstufigen Ionenquelle berücksichtigt werden [261]. Sie ist proportional zur Wurzel der Ionenmasse,  $t_{delay} \approx \sqrt{m}$ . Eine Fokussierung wird dann erreicht, wenn folgende Bedingung erfüllt werden kann:

$$\frac{dt_{Gesamt}}{dS} v_{ini} t_{delay} + \frac{m}{E_{S_1}} v_{ini} = 0 ; t_{delay} = \frac{-m}{E_{S_1} \frac{dt_{Gesamt}}{dS}} \quad (3.105)$$

Hierbei wird deutlich, daß eine Geschwindigkeitsfokussierung mit positiven Delayzeiten nur möglich ist, wenn die Ungleichung  $\frac{dt_{Gesamt}}{dS} < 0$  erfüllt wird. Dies widerspricht aber der Ursprungsannahme einer Ortsfokussierung in zweistufigen elektrostatischen Ionenquellen ( $\frac{dt_{Gesamt}}{dS} = 0$ ).

Erwähnung soll außerdem eine zu DE alternative Methode zur Bestimmung der initialen Geschwindigkeiten finden, die sogenannte Feldfreie Methode. Hierbei wird eine feldfreie erste Beschleunigungsstrecke geschaffen, deren Länge in den Experimenten verändert wird. Es können dadurch die Ungenauigkeiten, aufgrund der nie vollständig eliminierbaren Zeitschalteneinflüsse, die bei DE auftreten umgangen werden. Auf der anderen Seite sind aber bei dieser Methode initiale elektrische Felder (Biaspotential) besonders kritisch, wie sie z.B. bei Felddurchgriffen in den feldfreien Raum vor der zweiten Elektrode entstehen können. Bei der DE-Methode kann der Einfluss initialer Felder durch Probemessungen mit schrittweise angepassten Potentialen an einer Elektrode experimentell ermittelt und i.d.R. ausreichend vermindert werden. Bei Feldfreimessungen muss der feldfreie Raum sehr gut abgeschirmt werden, um den Einfluss systematischer Fehler möglichst gering zu halten.

### Realisierung von DE-Schaltungen

Praktisch bestehen zwei Möglichkeiten eine DE-Schaltung einzurichten.

1. Es kann entweder die erste Elektrode beschaltet werden ( $V_1 = V_2$  nach  $V_1 = V_{1,\tau}$  mit  $V_{1,\tau} > V_2$ <sup>68</sup>)
2. oder die zweite Elektrode ( $V_2 = V_1$  nach  $V_2 = V_{2,\tau}$  mit  $V_{2,\tau} < V_1$ ).

Es folgt daraus für die Extraktionsspannungen zwischen den drei planparallelen Elektroden:

$$\begin{aligned} U_1 &= U_{Gesamt} - G U_{Gesamt} = (1 - G) U_{Gesamt} = V_1 - V_2 \\ U_2 &= G U_{Gesamt} = V_2 - V_3 \end{aligned}$$

Bei einer zweistufigen Quelle ist  $V_3 = 0$ . Die Delayzeit korreliert solange in erster Näherung linear mit der Gesamtflugzeit betrachteter Ionen, wie diese im ersten Fall mindestens so groß ist, daß die Ionen sich aus dem unmittelbaren Umfeld der beschalteten 1. Elektrode entfernt haben und im zweiten Fall solange, bis diese so groß ist, daß die Ionen der beschalteten 2. Elektrode zu nahe kommen, um einen etwaigen Einfluss inhomogener Äquipotentialflächen „spüren“ zu können. Die Potentialschaltung erfolgt i.d.R. mit schnellen MOS-FET PUSH-PULL HV-Schaltern, die eine steigende Flanke während des Schaltvorgangs (*Rise-On-time*) aufweisen. Diese Rise-On-time ist begrenzt und unter Referenzbedingungen spezifiziert, hängt aber wesentlich von dem kapazitiven und induktiven Verhalten der Zuleitungen und der beschalteten Elektrode in der Kondensatoranordnung der Ionenquelle ab. Möglichst kurze Zuleitungen ohne Schirmung ermöglichen dabei die geringste Rise-On-time, können aber andererseits ein ausgeprägtes Einschwingverhalten um das zu erreichende Sollpotential, durch parasitären Stromfluss verursachen. Das elektrische Feld ist währenddessen nicht konstant. Dieser Beitrag kann in der Flugzeitgleichung aber nicht berücksichtigt werden, da er unvereinbar mit den Ursprungsannahmen eines konservativen Kraftfeldes ist. Aus dem Einfluss des zeitlich veränderlichen Feldes entsteht ein masseabhängiger systematischer Fehler, der auch durch alle weiteren elektrostatischen Fokussierungselemente unkorrigiert bleibt und letztlich die absolut erreichbare Massenrichtigkeit limitiert. Aufgrund der größeren Elektrodenanzahl ist dieser Effekt in PSPF-Schaltungen weniger deutlich ausgeprägt, als in DE-Schaltungen, führt aber auch dort zu unkorrigierten Fehlern. Ein Lösungsansatz liegt in der gezielten Nachkalibrierung und der Korrektur dieser Abweichungen, durch gefittete Anpassungen der empirischen Flugzeitgleichung für Stützmassen im jeweiligen Messintervall.

### Postsource-Pulse-Focusing

Bei dem sogenannten *Postsource-Pulse-Focusing* (PSPF) wird eine gezielte Nachbeschleunigung hinter der letzten Beschleunigungselektrode der n-stufigen Ionenquelle erreicht. Es wird hierzu mindestens ei-

<sup>68</sup>V, skalares Potential.

ne weitere Elektrode benötigt (negatives Potential bei positiven Ionen), die ein theoretisch homogenes elektrostatisches PSPF-Feld zwischen der letzten Elektrode der Quellzone ( $\pm 0$  V bzw. Biaspotential) und der PSPF-Elektrode herstellt. Eine Anordnung mit mehreren Elektroden ist ebenso möglich. Das Residualfeld zwischen der PSPF-Elektrode und TOF-Rohr kann im Prozess i.d.R. aufgrund der geringen Pulszeit und der Dimensionen vernachlässigt werden. Ionen die sich in der PSPF-Region aufhalten, werden in Abhängigkeit ihrer Geschwindigkeit dann unterschiedlich stark nachbeschleunigt. D.h. die zum PSPF-Pulszeitpunkt weiter im PSPF-Feld vorgedrungenen Ionen erhalten eine geringere zusätzliche Beschleunigung, gegenüber den Ionen, die sich noch relativ am Anfang des Feldes befinden. Aus der exakten Flugzeitgleichung lässt sich dabei eine Beziehung zur Berechnung der Flugzeit eines Referenzions ableiten [20]:

$$t = C_0 + m^{1/2} \left( C_1 \left( 1 - C_2 m^{-1/2} \right)^{1/2} + C_3 + \frac{C_4}{\left( 1 - C_2 m^{-1/2} \right)^{1/2}} \right) \quad (3.106)$$

Eine PSPF-Anordnung ist in linearen und Reflektoranordnungen anwendbar [20] [23] [262].

### Massenauflösung

Nutzt man die Erkenntnisse über die eliminierten Flugzeitunterschiede bei initialen z-axialen Ortsabweichungen, kann dadurch auch eine Abschätzung über das *Massenauflösungsvermögen* eines hinsichtlich lateraler Orts- und Winkelunscharfen korrigierten Spektrometers erhalten werden [17]. Hierzu schliesst man wiederum eine initiale kinetische Energieverteilung und eine initiale Zeitverteilung bei der Ionisierung aus. Um eine Massenauflösung unmittelbar benachbarter Ionenmassen  $m$  und  $m + 1$  z.B. zweier Isotope einer Elementsorte zu erhalten, muss die Flugzeitdifferenz der benachbarten Ionenmassen mindestens der Flugzeitdifferenz z-axialer Ortsabweichungen entsprechen, die am Ortsfokus nicht durch die Wahl der Potentiale und Beschleunigungsstrecken korrigiert werden kann, gemäß  $\Delta t_S \leq t_{m+1} - t_m$ . Im Falle einer zweistufigen Beschleunigung ergeben die ersten beiden Ableitungen die Bedingungen zur Lage des Ortsfokus und korrigieren damit Zeitabweichungen bis zur 2. Ordnung. Die nächst höhere(n) Ordnung(en) muss/müssen also eine Zeitabweichung liefern, die mindestens der Flugzeitdifferenz der betrachteten Isotopenmassen entspricht (wenn diese vom selben Ort starten), um diese massenaufgelöst darstellen zu können. Wiley und McLaren verwendeten dazu in Analogie zum vorherigen Abschnitt folgende Beziehung:

$$t_{m+1} - t_m = t_m \left( \sqrt{\left( 1 + \frac{1}{m} \right)} - 1 \right) \approx \frac{t_m}{2m} \quad (3.107)$$

Die approximierte Flugzeitgleichung kann zu einer Abschätzung verwendet werden, indem man annimmt, daß  $k_{02} \gg 1$  und  $k_{02} \gg S_2/(S_1 - \Delta z)$  zutrifft,  $\Delta z$  zugleich aber ein Maximum einnimmt. Eine auch für MALDI sinnvolle Annahme für eine maximale axiale Ortsabweichung ist dabei die ursprünglich für eine kontinuierliche Ionenquelle verwendete Beziehung  $\Delta z = \frac{S_1}{2}$ . Eine Abschätzung über die Massenauflösung liefert dann die Beziehung:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \approx 16 \cdot k_{02} \left( \frac{(S_1 - \Delta z)}{\Delta z} \right)^2 \quad (3.108)$$

$$= \frac{t}{2\Delta t} \quad (3.109)$$

Hieraus wird ersichtlich, daß es sehr günstig für das Auflösungsvermögen ist, wenn  $S_1 - \Delta z$  etwas größer ist als  $\Delta z$ , d.h.  $S_1 - \Delta z > \frac{S_1}{2}$ . Ein möglichst großes  $S_2$ , das wiederum  $k_{02}$  steigert, erhöht generell die Auflösung. Erreicht das Verhältnis  $\frac{S_2}{S_1 - \Delta z} \approx k_{02}$ , steigert dies die zu erwartende Massenauflösung wesentlich gegenüber (3.109) [17].

### Zweistufiger Reflektor

Eine Kombination von DE mit z.B. einem zweistufigen Reflektor nach Mamyrin kann die Massenauflösung, vor allem für biologische Molekülonen, auf die Größenordnung  $R \approx 10^4$  steigern und zudem eine (simultane) Korrektur von Aberrationen hinsichtlich der Energie bzw. der z-Position und des Ionisierungszeitpunktes ermöglichen (Abbildung 3.22) [14] [18] [20] [172].

Exemplarisch betrachtet wird kurz die Situation einer einstufigen Ionenquelle, da hier der Ortsfokus festliegt und zunächst nur eine Ortsfokussierung 1. Ordnung hinsichtlich einer Energiespreizung bzw. einer z-axialen Verteilung möglich ist. Innerhalb der ersten Reflektorstufe erfahren die Ionen eine negative Beschleunigung und ihr z-axialer Geschwindigkeitsbetrag verringert sich, gemäß:

$$v_z = \frac{v_S}{\sqrt{U_{Gesamt}/U_{R1}}} \left( 1 + \delta \frac{U_{Gesamt}}{U_{R1}} \right)^{1/2} \quad (3.110)$$

mit  $U_{R1} = U_{Gesamt} - qE_{R1}d_{R1}$ , dem Potential der ersten Reflektorstufe. Der Faktor  $\delta_K$  entspricht der Unschärfe aufgrund der Energiespreizung in 1.Ordnung. Um eine Ortsfokussierung zweiter Ordnung hinsichtlich des Einflusses einer Energieverteilung bzw. der z-axialen Positionen erreichen zu können, müssen die Potentiale bzw. Feldstärken der Abbrems- und der Reflektorstufe (R1, R2;  $d_{R1}$  = Länge der Abbremsstufe) aufeinander abgestimmt werden, gemäß:

$$\frac{E_{R1}}{E_{R2}} = \frac{\left( (U_{Gesamt}/U_{R1})^{3/2} - 3 \sqrt{U_{Gesamt}/U_{R1}} + (S/d_{R1})(U_{Gesamt}/U_{R1} - 1)/U_{Gesamt}/U_{R1} \right)}{\sqrt{U_{Gesamt}/U_{R1}} (U_{Gesamt}/U_{R1} - 3)} \quad (3.111)$$

Die Gesamtflugzeit ergibt sich dann mit der Gesamtflugstrecke  $d$  zu:

$$t_{Gesamt} = \frac{2}{v_S} d \frac{((U_{Gesamt}/U_{R1}) - 1)}{U_{Gesamt}/U_{R1}} \quad (3.112)$$

$$d = 2 \frac{(2(U_{Gesamt}/U_{R1})d_{R1} + ((U_{Gesamt}/U_{R1}) - 1)S)}{(U_{Gesamt}/U_{R1}) - 3} \quad (3.113)$$

Die Ionen besitzen einen Umkehrpunkt im Reflektorfeld in der Distanz  $d_R$ , gemessen zum ersten Gitter ( $U = \pm 0$  V), und es verbleibt insgesamt (theoretisch) eine Flugzeitabweichung aufgrund der Energieunschärfe in 3. Ordnung:

$$d_R = \frac{d(\sqrt{U_{Gesamt}/U_{R1}} + 1)((U_{Gesamt}/U_{R1}) - 2)/4 - (\sqrt{U_{Gesamt}/U_{R1}} + 1)^2(S/2)}{(U_{Gesamt}/U_{R1}) - 3}$$

$$\Delta t(\delta_K \delta_K \delta_K) = \frac{((U_{Gesamt}/U_{R1}) - 1) d \delta^3}{8v_S}$$

#### 3.3.10 Empirische Kalibrierfunktion(en)

Der vorhergehende Abschnitt stellte kurz die Gegebenheiten zur Berechnung der Flugzeit einzelner Ionen dar, die in idealen *homogenen* elektrostatischen Feldern beschleunigt werden. Real treten so gut wie immer Verteilungen mehrerer Ionen einer Isotopspezies auf und selten werden homogene elektrostatische Felder 100%-ig realisiert. Weiterhin weisen Anordnungen mit geschalteten Potentialen häufig systematische Restfehler auf, deren Einfluss bei einer zu erreichenden relativen Massenrichtigkeit um 5 ppm nicht mehr vernachlässigt werden kann.

Die empirische Flugzeitformel zur Kalibrierung einer erfolgten Messung mittels Stützstellen entspricht einer Geradengleichung:

$$t = A + B m^{1/2} \quad (3.114)$$

Diese kann für lineare Anordnungen mit oder ohne DE sowie auch bei Spektrometern mit Reflektor verwendet werden. Die verbleibende Restabweichung gegenüber einer Referenz entspricht dabei:

$$t - t_0 = B m^{1/2} (1 + \beta(m)) \quad (3.115)$$

wobei  $\beta(m)$  die theoretisch berechnete Restabweichung der Flugzeit der betrachteten Masse  $m$  mit den Dimensionen des jeweiligen Spektrometers darstellt. Die real auftretende Restabweichung, aufgetragen als Funktion der Masse, zeigt bei Mehrpunktkalibrierungen mit DE, i.d.R. eine Gesetzmäßigkeit, die der TOF-Formel ähnelt [23]. Prinzipiell kann das Ergebnis der Restabweichung, das anhand der gewählten Gerätedimensionen ermittelt wird, oft bis auf eine sehr geringe relative Abweichung durch die mit den empirischen Koeffizienten  $B_0, B_1, B_2$  ermittelte Funktion genähert werden [261].

$$\beta(m) = \frac{h}{2S_1 L_e} \quad (3.116)$$

$$\approx B_0 + B_1 m^{1/2} + B_2 m \quad (3.117)$$

mit den Parametern der effektiven Länge und den Potentialen in einem Spektrometer mit zweistufiger Ionenquelle:

$$L_e = d + \frac{2S_2}{1 + (1 - G)^{1/2}} + \frac{2S_1}{(1 - G)^{1/2}} \quad (3.118)$$

$$h = (1 - G) d + \frac{2(1 - G)^{1/2} S_2}{1 + (1 - G)^{1/2}} - \frac{2S_1}{(1 - G)^{1/2}} \quad (3.119)$$

$G$  entspricht dem Faktor ( $G < 1$ ) der die Abstufung des Extraktionspotentials zum Gesamtpotential angibt. Der Ansatz einer vollständig empirischen Näherung an die Flugzeitgleichung ergibt sich dann mit den (empirischen) Koeffizienten zu:

$$\begin{aligned} t &\approx t_0 + B m^{1/2} (1 + B_0 + B_1 m^{1/2} + B_2 m) \\ &= C_0 + C_1 m^{1/2} + C_2 m + C_3 m^{3/2} \end{aligned} \quad (3.120)$$

Die Koeffizienten werden i.d.R. numerisch, anhand von Messdatenanpassung(en), ermittelt. Eine Nachkalibrierung bzw. eine interne Kalibrierung mit numerischer Anpassung aus den erhaltenen Meßdaten kann prinzipiell für eine beliebige Anzahl von Stützmassen im Spektrum durchgeführt werden. Dabei wird die Massenrichtigkeit der Analytpeaks um so mehr gesteigert, je ähnlicher ihre Masse der einer Stützmasse ist. Eine routinemäßige Reduzierung des relativen Restfehlers unter eine Grenze von ca. 5 ppm ist aber vor allem über einen größeren Massenbereich, aufgrund unzureichend oder nicht korrigierten systematischen Fehlerursachen oft schwierig.

In 2009 wurde ein patentiertes Verfahren veröffentlicht, das zur Korrektur des systematischen Restfehlers ein weiteres Glied in die Reihendarstellung der empirischen Flugzeitgleichung einführt. Das Glied  $C_{-1} m^{-1/2}$  (reduzierte Masse, Bruker Daltonik) [23]:

$$t = C_{-1} m^{-1/2} + C_0 + C_1 m^{1/2} + C_2 m + C_3 m^{3/2} \quad (3.121)$$

Die „reduzierte Masse“ ist dabei keine Masse im physikalischen Sinne sondern basiert auf den experimentellen Beobachtungen, daß der systematische Restfehler in den Spektren für Peaks kleinerer Massen

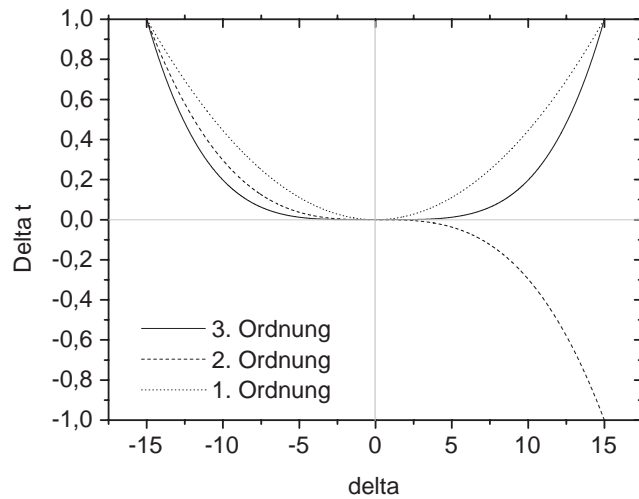
relativ größer wird. Da die Auswirkungen eines (zeitlich und örtlich) nichtkonstanten elektrostatischen Feldes auf kleinere Massen eine relativ größere Wirkung haben, als auf größere Massen identischer Ladung. Die reduzierte Masse kann formal aus dem Verhältnis der Koeffizienten  $2C_{-1}/C_1 = m - m_0$  angegeben werden, ist aber nicht analytisch herleitbar [23].

Eine empirische Formel zur Berechnung von PSPF-Anordnungen entspricht nach [262]:

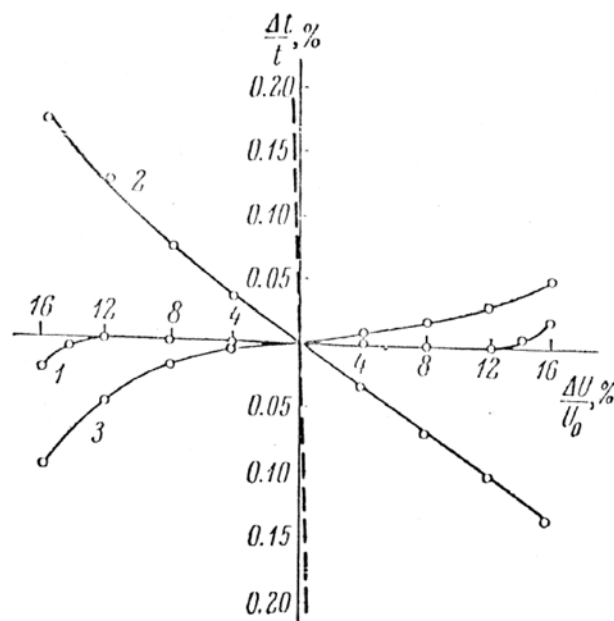
$$t = C_0 + C_1 m^{1/4} + C_2 m^{1/2} + C_3 m^{3/4} \quad (3.122)$$

Neben den bisher dargestellten empirischen Näherungsformeln werden oft auch Ansätze mit Polynomen höherer Ordnung  $n \geq 7$ , unter der Verwendung möglichst vieler Stützstellen angewandt. Hierbei ergeben sich allerdings sehr schnell Unwägbarkeiten im Zwischenbereich der Stützstellen.



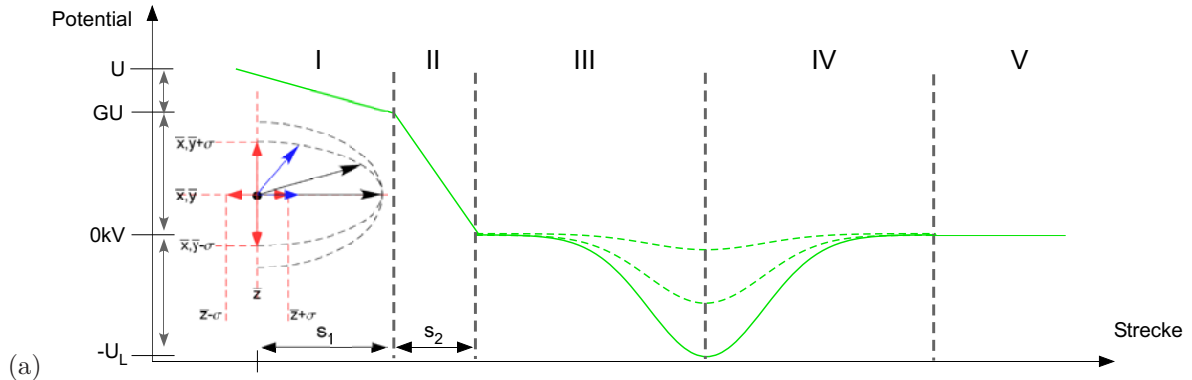


(a)

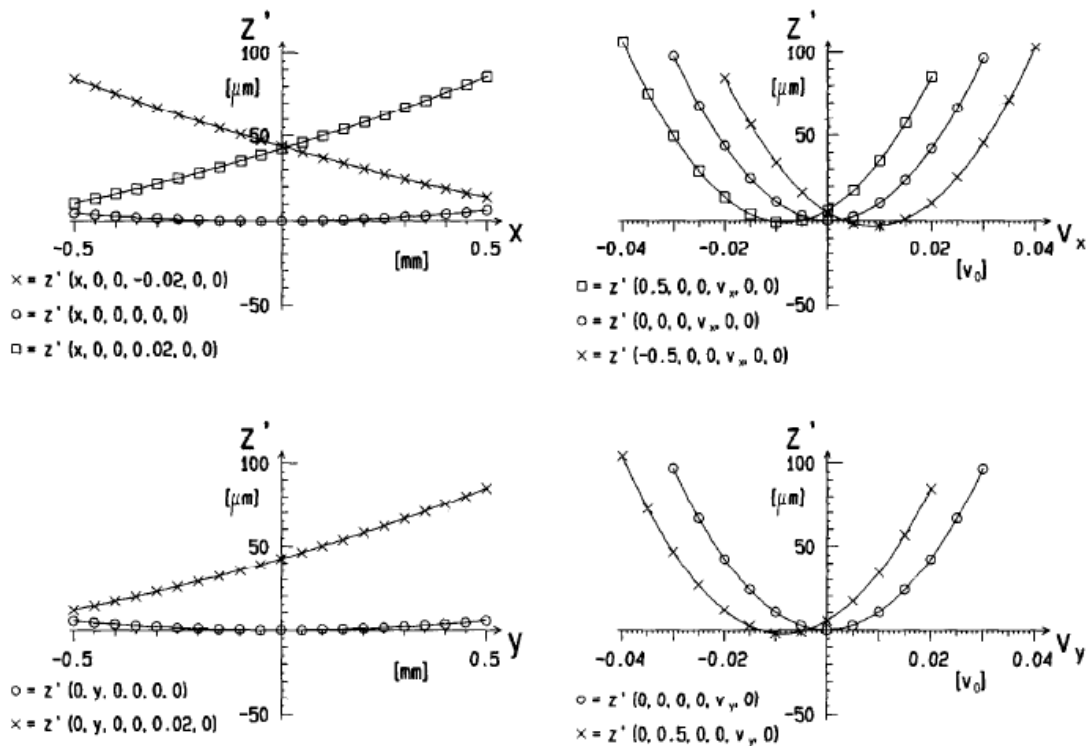


(b)

Abbildung 3.22: (a) Angedeuteter Verlauf der Flugzeitabweichung, als Funktion der Energiespreizung bei einer Korrektur 1., 2. und 3. Ordnung. (b) Axiale Energiefehlerkorrektur eines zweistufigen Gitterreflektors, übernommen aus [172] mit dem Verlauf 1 für eine relative Flugzeitabweichung bei optimaler Geräteabstimmung, aufgetragen als Funktion des relativen Energiefehlers. 2, wie 1 und der zusätzlichen Annahme einer um 6% abweichenden Potentialdifferenz in der ersten Reflektorstufe. 3, wie 1 mit einer zusätzlichen relativen Abweichung der Potentialdifferenz in der ersten Reflektorstufe um -4%. Die gestrichelte Linie zeigt eine Flugzeitabweichung eines zu 1 vergleichbaren linearen TOF-Spektrometers ohne Reflektor.



(a)



(b)

Abbildung 3.23: (a) Theoretischer Potentialverlauf in einer zweistufigen Ionenquelle mit anschliessender Einzellinse. (b) Abbildungen entnommen aus [263]. Dargestellt sind die berechneten Flugzeitabweichungen in der Form einer z-Koordinatendispersion am Bezugssystem der Detektion bei unterschiedlichen initialen Ausgangsbedingungen (kartesische Ortskoordinaten aller drei Raumrichtungen und Geschwindigkeitsanteile). Das Spektrometer verwendet axialsymmetrische elektrostatische Felder.  $Z'$ -Achsendispersion gegenüber einer initialen Referenzsituation mit der initialen Geschwindigkeit  $v_0$ . (b) Linke Seite, oben: Ionen mit Startposition in der Quellregion  $z=0, y=0$  und (x) initialer Geschwindigkeitsabweichung  $v_x = -0,02v_0$  als Funktion von x bzw. (o)  $Z'$ -Achsendispersion ohne initiale Geschwindigkeitsanteile und (#)  $v_x = 0,02v_0$  als Funktion von x. Links unten: (o)  $Z'$ -Achsendispersion ohne initiale Geschwindigkeiten bei Startpositionen  $x=0, z=0$  als Funktion von y und (x)  $Z'$ -Achsendispersion mit initialer Geschwindigkeit  $v_y = 0,02v_0$  als Funktion von y. (b) Rechte Seite:  $Z'$ -Achsendispersion als Funktion der initialen Geschwindigkeit  $v_x$  (oben) bzw.  $v_y$  (unten). Die Notation entspricht der Form eines 6d-Vektors im Koordinatensystem am Detektor mit den Ortskoordinaten und den Geschwindigkeitskomponenten  $z'(x, y, z, v_x, v_y, v_z)$ .

### 3.4 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM)

Die konfokale Raster-Mikroskopie CSM (*confocal scanning microscopy*) geht auf M. Minsky zurück [264]. In der einfachsten Reflexionsausführung wird der vorfokussierte Beleuchtungsstrahl einer Punktlichtquelle durch eine Blende begrenzt (*excitation pinhole*, Blende 1). Die Größe der ersten Blende ist dabei nicht kritisch, hinsichtlich der insgesamt erreichbaren Bildqualität. Sie gewährleistet einen beugungsbegrenzten Lichtfleck auf der Objektseite und dient dort als lateraler Filter (Tiefpassfilter). Der Beleuchtungs- oder Anregungsstrahl gelangt über ein Objektiv fokussiert in den Probenraum. Er regt dort entweder einzelne Fluorophore an (Selbstleuchter) oder beleuchtet den fokussierten Bereich der Probe (Nichtselbstleuchter). Fluoreszenzlicht oder reflektiertes Beleuchtungslicht wird dann über dasselbe Objektiv und einen Strahlteiler auf eine zweite Blende (*emission pinhole*, Blende 2) abgebildet. Die zweite Blende befindet sich unmittelbar am Detektor und ist entscheidend für die erreichbare Bildqualität. Das Besondere an dieser Anordnung tritt im Fluoreszenzmodus hervor. Wird in einem Aufbau eine sehr kleine Detektionsblende ( $D < 0.25$  AU, AU = Airy Unit) verwendet, so kann die Berechnung der dreidimensionalen iPSF (Intensitäts-PSF) des optischen Systems nahezu auf die Beleuchtungs-/Anregungs-iPSF reduziert werden, der Gestalt:

$$\begin{aligned} iPSF_{System} &= iPSF_{Bel} \cdot iPSF_{Detektion} \\ &\approx (iPSF_{Bel})^2 \end{aligned} \quad (3.123)$$

Es kann (bzw. muss) aber weiter differenziert werden, zwischen konfokalen Nicht-Fluoreszenz-Anordnungen im Transmissions- und Reflektionsmodus sowie dem Fall teilweise kohärenter Strahlung bei konfokalen Weitfeldanordnungen (3D-TCC Funktion, 3D *transmission cross coefficient*). Letzteres wird hier nicht weiter dargestellt. Im Transmissionsmodus entspricht die normierte 3D-MTF (3D-Modulationstransferfunktion) der 3D-OTF einer Durchlichtanordnung in der Weitfeldmikroskopie mit kleiner numerischer Apertur ( $NA < 0.7$ , paraxiale Approximation). Im Reflektionsmodus dagegen entspricht die 3D-MTF der 3D-CTF (*coherent transfer function*) [265]. Etwas mehr dazu findet man im Anhang. In Abbildung 3.24 ist zum Vergleich die (ideale) MTF an einer Kreis- und Rechteckapertur dargestellt. Abbildung 3.25 zeigt ein Schnittbild in der  $zx$ -Ebene einer fokussierten Weitfeldanordnung sowie zum Vergleich iPSF-Verteilungen in Weitfeld- und konfokalen Anordnungen. Abbildung 3.26 stellt theoretischen Aberrationsverteilungen mikroskopischer Isophotendarstellungen (Laser)Ablationsprofile in rotem Filzstiftfarbstoff gegenüber.

#### 3.4.1 Reflexions-Modus (3D-CTF)

Man erhält Lösungen der 3D-CTF mit zunächst kleiner NA (paraxiale Approximation) und den normierten Raumfrequenzen  $l, s$  (normalisiert mit  $l = 0, s = -2s_0$ ;  $l =$  transversal,  $s =$  longitudinal), wenn gilt:  $l^2/4 \leq s \leq 1 - l/(1 - l/2)$  von

$$CTF(l, s) = 1 \quad (3.124)$$

sowie bei:  $1 - l(1 - l/2) \leq s \leq 1$ , von

$$CTF(l, s) = \frac{2}{\pi} \sin^{-1} \left( \frac{(1-s)}{l \sqrt{\frac{s-l^2}{4}}} \right) \quad (3.125)$$

und andernfalls,  $CTF(l, s) = 0$ . Wichtig ist weiterhin, daß die 3D-CTF einen konstanten Shift in der axialen Raumfrequenz  $s$  aufweist, der Gestalt, daß  $s_0 = \frac{1}{2 \sin^2(\alpha/2)}$  und  $s$  in den Betrachtungen zuvor

ersetzt werden sollte durch  $s = s + s_0$ . Im Intervall  $0 \leq s \leq s_0$  bildet sich bei  $s_0 = 0$  der Bereich des sogenannten *Missing cone* aus. Werte der CTF ungleich 0 können nur erreicht werden, wenn gilt  $\frac{l^2}{4} \leq (s + s_0) \leq 1$ . Mit geringer numerischer Apertur nimmt ein Plot der Raumfrequenzen ( $s$  gegen  $l$ ) an der Grenze des Missing cone einen parabolischen Verlauf. Im Falle einer hohen numerischen Apertur dagegen einen radial konstanten Verlauf [265]. Mit Infokusabbildungen erhält man für die 2D-CTF die gleiche Lösung, wie im Falle der Infokusabbildung inkohärenter Durchlicht-Anordnungen. Die dreidimensionale CTF für optische Systeme mit einer hohen numerischen Apertur ( $NA > 0.7$ ) und Gültigkeit der Sinusbedingung entspricht [266]:

$$CTF = \frac{P(\sin \theta)}{\sqrt{1 - \sin^2 \theta}} \delta \left( \cos \theta + \sqrt{1 - \sin^2 \theta} \right) \quad (3.126)$$

wobei  $\delta(x)$  die Delta-Funktion des Argumentes  $x$  ist und  $P(x)$  die Pupillenfunktion darstellt. Zudem muss berücksichtigt werden, daß die laterale Grenzraumfrequenz für Infokusabbildungen der kohärenten 3D-MTF (3D-CTF) gegenüber derjenigen der 3D-MTF halbiert wird.

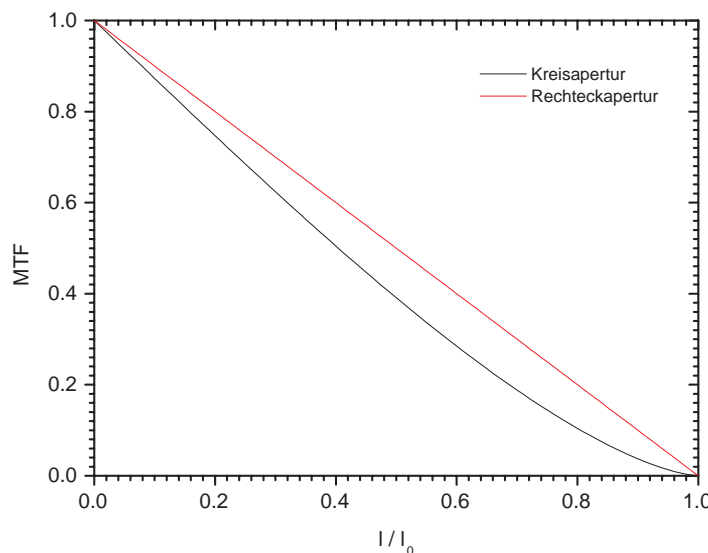


Abbildung 3.24: Ideale (normierte) MTF einer Kreis- und Rechteckapertur. Werte realer MTF liegen immer unterhalb der Werte idealer MTF. Man betrachtet i.d.R. den monochromatischen Fall oder eine mittlere bzw. gemittelte Wellenlänge. In Pixelbildern muss die Orientierung der Struktur im Bildfeld berücksichtigt werden. So erfordern diagonal über Pixel verlaufende Kanten i.d.R. eine gesonderte Berechnung.

Bei dem mit CLSM-Messungen verwendeten Detektor handelt es sich i.d.R. um einen PMT (*photomultiplier tube*) oder eine APD (*avalanche photodiode*, Lawinenphotodiode). Bei Fluoreszenzmessungen muss das reflektierte Anregungslicht dabei vor der Detektion ausgefiltert werden. Mit nichtmonochromatischen Lichtquellen wird bereits das Anregungslicht mittels Filter(n) geblockt bzw. die Nutzwellenlänge bandbegrenzt extrahiert. Die Bilderzeugung erfolgt generell rasternd, d.h. das Bild wird Punkt für Punkt aus photometrischen Messungen, zeilenweise, aufgebaut. Bei manchen Mikroskopen wird dabei entweder der Beleuchtungsstrahl (in Vorschubrichtung) oder die Probe (entgegen der Vorschubrichtung) bewegt. Eine leicht abweichende Variante ist die des Linienscanners, bei der eine ganze Zeile auf einmal gerastert wird.

Ein (frühes) Prinzip des Punktrastverfahrens, das heute hauptsächlich noch in der Materialforschung Anwendung findet, ist die Rasterung mittels *Nipkov-Scheiben* (*multipinhole*) [268] [269]. Die Vorteile der CLSM/CSM liegen in der Begrenzung der dreidimensionalen Nachweis-iPSF (*intensity point spread function*). Im Bezug auf die Abbildungsvergrößerung kann man im Vergleich zur Weitfeldmikroskopie dadurch eine Steigerung der lateralen Auflösungsfähigkeit erreichen sowie zusätzlich eine echte axiale Auflösung für einen einzelnen Objektpunkt bzw. die gesamte Infokusebene angeben (*optische Schnittdicke*).

Aufgrund der guten Fokussierungseigenschaften werden für die CLSM i.d.R.  $TEM_{00}$ -Laserprofile verwendet. Es gibt dennoch Ausnahmen, wie z.B. die Technik der STED-Methode (*Stimulated Emission Depletion*). Hierbei kann die erreichte laterale Einzelpunktauflösung in Abhängigkeit der verwendeten Laserintensitäten ( $I_m, I_s$ ) gegenüber dem Rayleighlimit verbessert werden, gemäß [270] [271] [272] [273] [274] [275] [276]:

$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot n \cdot \sin \alpha \cdot \sqrt{1 + \frac{I_m}{I_s}}} \quad (3.127)$$

Es wird bei dieser Technik, durch aktive „Ausblendung“<sup>69</sup> der Wirkungsrandbereiche einer lateralen iPSF des Anregungslasers sichergestellt, daß das vom Bildpunkt stammende Fluoreszenzsignal nur aus der Halbwertsbreitenverteilung des Anregungsbereiches stammen kann. Es gilt dabei theoretisch, daß wenn das Verhältnis  $I_m/I_s \rightarrow \infty$  strebt, dann auch  $d \rightarrow 0$  geht.

Begrenzt man einen  $TEM_{00}$ -Laserstrahl im  $I_{Peak}/e^2$ -Bereich (der Strahltille) durch eine Blende (Blende 1), entspricht eine Fernfeldprojektion in etwa einem Airy-Durchmesser homogener Strahlprofile, d.h.  $2\omega \approx 1$  AU bzw.  $1.83\lambda \approx 2.44\lambda$ . Die Abkürzung AU steht dabei für *Airy unit*. Das transmittierte Profil weicht dabei hinter der Blende (Blende 1) im Abstand der Fraunhoferbeugung nur unwesentlich von einem Gaussprofil ab. Die erreichbare Peakintensität entspricht hinter der Blende dabei noch ungefähr der Peakintensität eines vergleichbaren homogenen Profils mit *Airy pattern* im ungebeugten Maximum ( $I_{Gauss} \approx 0.924 \cdot I_{Airy}$ ). Wesentlich größere Pupillendurchmesser ( $D > 1AU$ ) auf der Beleuchtungs/Anregungsseite führen zu fast vollständig transmittierten Gaussprofilen und dadurch zu einem Leistungs- bzw. Intensitätsgewinn bei einem gleichzeitigen Auflösungsverlust. Kleinere Pupillendurchmesser verringern die transmittierte Lichtintensität (Leistung) stark, nähern aber andererseits die laterale PSF weiter einem *Airy pattern* einheitlicher Strahlprofile an. Es treten dann ebensolche Nebenmaxima auf. Bei der Transmission von Gaussprofilen ist also immer ein Kompromiss bei der Wahl der Blendengröße bzw. der Objektivausleuchtung notwendig. Die Beugungsbegrenzung des Gaußstrahles wird durch die *Beugungsmaßzahl*  $M^2$  bzw. das *Strahlparameterprodukt* beschrieben. Fehljustierungen, zu starke Strahlbescheidung (Blenden) oder Teilausleuchtung des Objektivs z.B. durch unsymmetrische Obstruktionen können dagegen zu komplizierten Beugungs- und Aberrationsmustern der iPSF im Objektraum führen und damit die Leistungsfähigkeit konfokaler Aufbauten einschränken. Anders als bei der Weitfeldmikroskopie, gelangt bei der CLSM/CSM (idealerweise) mit kleiner Detektionsblende ( $D < 0,25$  AU) kein Defokuslicht zur Auswertung. Ein Streulichteintrag wird aber bereits mit Detektionsblendengrößen von  $1 AU < D < 5 AU$  weitgehend unterdrückt. Der Justierung und Positionierung aller optischen Elemente im Strahlengang eines konfokalen Mikroskopes kommt insgesamt eine höhere Bedeutung zu, als in nichtkonfokalen Aufbauten.

<sup>69</sup>Durch Überlagerung eines  $TEM_{00}$ -Anregungsprofils ( $I_s$ ) mit einem  $TEM_{0i}$  \* „Doughnut-Anregungsprofil“ ( $I_m$ ). Das Doughnutprofil entsteht durch eine lineare Superposition der Hermite-Gauss Moden 10 und 01.

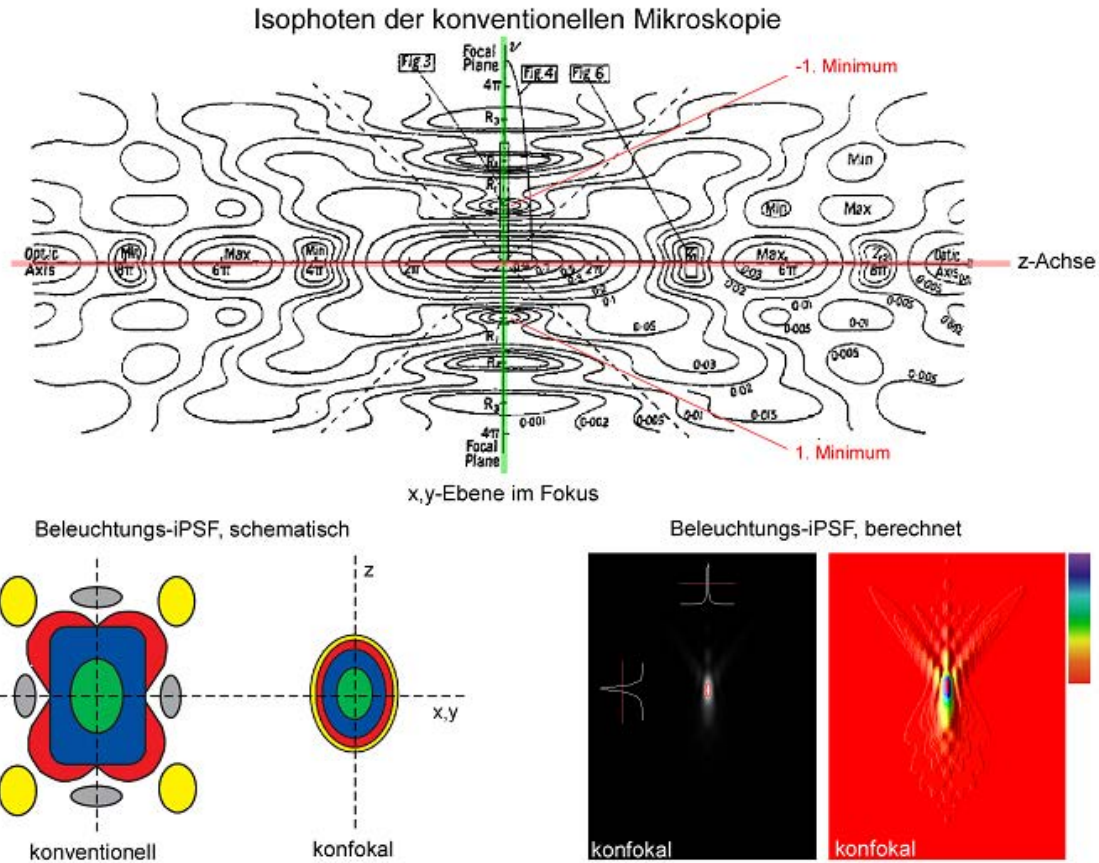


Abbildung 3.25: Verteilung der Intensität als Isophotenplot (Isophoten=Linien gleicher Intensität) in der x-z-Ebene eines fokussierten Strahles in der Weitfeldmikroskopie. (Links unten) Schematische Gegenüberstellung der Beleuchtungsverhältnisse der Weitfeldmikroskopie und der konfokalen Mikroskopie mit monochromatischen Anregungs- und Emissionswellenlängen (Fluoreszenz). Entnommen aus der Zeiss-Broschüre: „*IC<sup>2</sup>S-Objectives für biomedizinische Anwendungen*“, Carl Zeiss MicroImaging GmbH. (Unten rechts) Beispielhaft dargestellte Intensitätsverteilung einer mikroskopischen Beleuchtungs-iPSF im Objektraum bei einer realen mikroskopischen Anordnung mit Deckglas. Beispielberechnung entnommen aus dem Anhang zum Programm *PSF Lab* [277]. Schematische Lage der (zurückgerechneten) Ellipse im Falle einer konfokalen Anordnung unter Verwendung des berechneten Profils. Im rechten Bild entspricht die Ellipse in etwa der dunkelblauen Intensitätsfläche. (Oben) Transversale Intensitätsverteilung im Fokus ( $u=0$ ) gemäß  $I(v) = \left(\frac{\pi a^2}{\lambda f}\right)^2 \left(\frac{2J_1(v)}{v}\right)^2$  mit  $v \approx \frac{2\pi}{\lambda} r \sin \alpha$  und  $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ ; Longitudinale Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse ( $v=0$ ),  $I(u) = \left(\frac{\pi a^2}{\lambda f}\right)^2 \left(\frac{\sin(u/4)}{u/4}\right)^2$  und  $u = \frac{2\pi}{\lambda} a^2 \left(\frac{1}{f} - \frac{1}{z}\right) = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta z \frac{a^2}{f^2}$ ;  $a$  = Aperturradius. Abbildung entnommen und verändert aus [278].

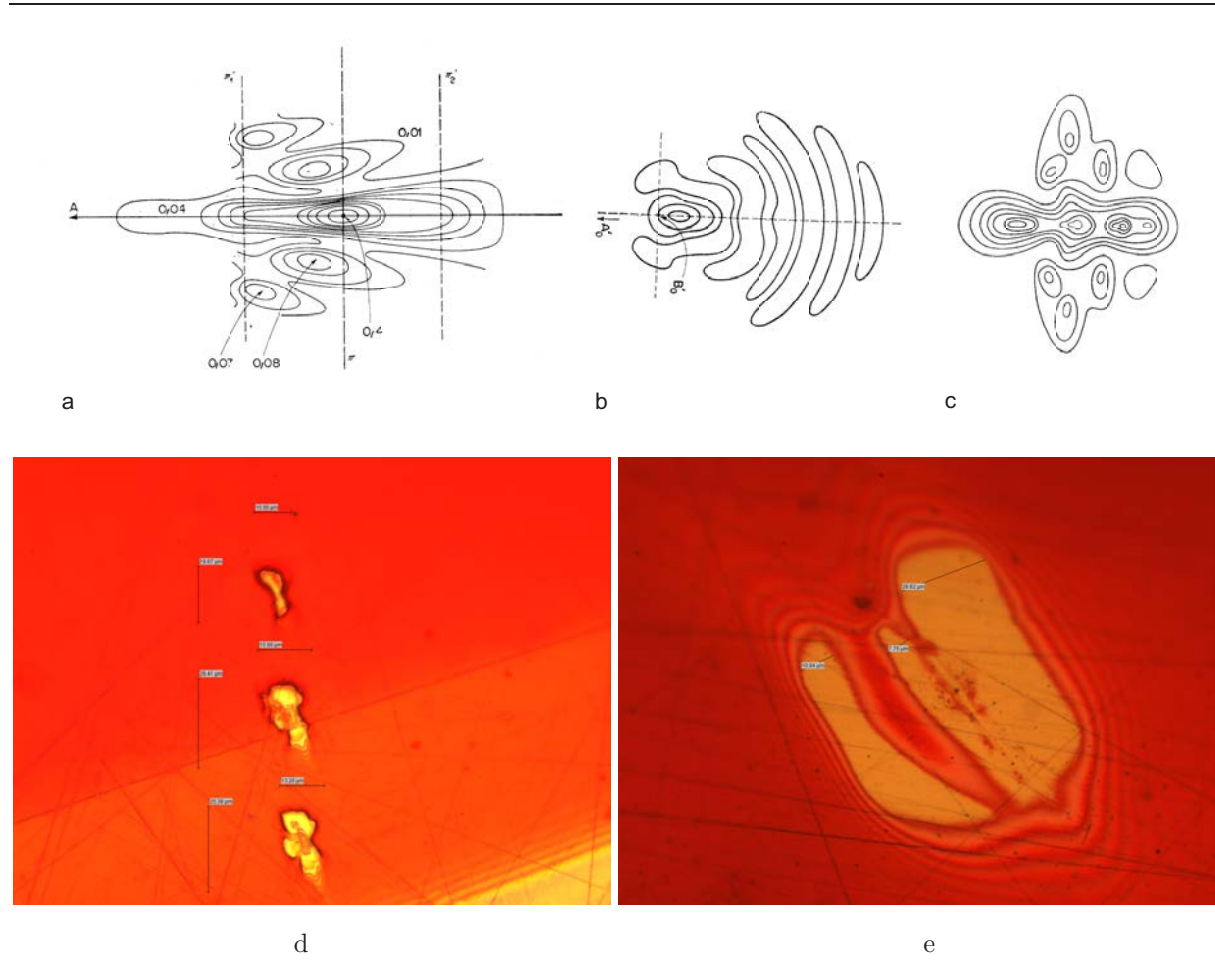


Abbildung 3.26: Aberrationen als Isophotendarstellung (Optische Achse = waagerechte Linie). (a) Isophoten bei sphärischer Aberration (Bildpunkt in  $\pi$ ). (b) Durch Koma verzerrtes Bild eines ausserhalb der optischen Achse liegenden konjugierten Objektpunktes. (c) Isophotenverlauf eines Bildpunktes bei dem Koma, sphärische Aberration und Astigmatismus vorliegen. Obere Darstellungen (a - c) entnommen aus [279]. (Unten) Ablationsprofile bei Veränderung der Justierung des Laserstrahles zum einen am LAMMA 2000 (d) und am ALADIM II (e).



### 3.4.2 TEM<sub>00</sub> – Laserstrahlprofil

Der Realwertanteil des elektrischen Feldes kann bei der Betrachtung ebener Wellen als periodische Störung, die sich in z-Richtung im Raum ausbreitet, aufgefasst werden [278] [280]:

$$\begin{aligned} E_x(z, t) &= E_{x0} \cos(kz - \omega t + \varphi_x) \\ E_y(z, t) &= E_{y0} \cos(kz - \omega t + \varphi_y) \\ E_z(z, t) &= 0 \end{aligned} \quad (3.128)$$

Linear polarisiertes Licht liegt dann vor, wenn eine Phasendifferenz  $\Delta\varphi = \varphi_y - \varphi_x = 0$  oder  $\pi$  beträgt bzw.  $E_{x0} = 0$  oder  $E_{y0} = 0$  zutreffend ist. Betrachtet man nur die Grundmode TEM<sub>00</sub> (TEM = Transversale elektromagnetische Mode), kann eine komplexe Beziehung, die den zeitlichen Verlauf der Ausbreitung im Raum darstellt angegeben werden z.B.:

$$E(x, y, z, t) = E_0 \frac{\omega_0}{\omega(z)} \cdot e^{-\frac{x^2+y^2}{\omega(z)^2}} \cdot e^{-i(kz - \arctan(z/z_R))} \cdot e^{-i\frac{k(x^2+y^2)}{2R(z)}} \cdot e^{i\omega t} \quad (3.129)$$

Die transversale Ausdehnung der Strahlung läuft in der angegebenen Form zunächst auf ihre schmalste Stelle hin (Taille), mit  $E_0$  dem maximalen Betrag der Feldamplitude,  $k$  der Kreiswellenzahl ( $2\pi/\lambda$ ) und  $\omega = 2\pi/T$ , der Kreisfrequenz. Es ergeben sich folgende (teilweise abgeleitete) Beziehungen:

$$R(z) := z \left( 1 + \frac{z_R^2}{z^2} \right) \quad (3.130)$$

$$z_R := \frac{\pi\omega_0^2 n}{\lambda} \quad (3.131)$$

$$\omega(z)^2 := \omega_0^2 \left( 1 + \frac{z^2}{z_R^2} \right) \quad (3.132)$$

$$\eta(z) := \arctan\left(\frac{z}{z_R}\right) \quad (3.133)$$

Dabei entspricht  $R(z)$  dem *Krümmungsradius* der Wellenfront mit Lage der Taille in  $z = 0$ .  $z_R$  bezeichnet die *Rayleighlänge* ( $n$  = Brechungsindex des Ausbreitungsmediums),  $\omega(z)$  gibt den *Strahlradius* in Abhängigkeit der z-Position an, und  $\eta(z)$  ist die *Gouy-Phase*. Der Parameter  $\omega_0$  zeigt die engste Stelle bzw. den Radius der Strahltaille an (*waist*). Die Gouy-Phase stellt einen Korrekturterm dar, der den Übergang von der Strahltaille zu beiden Seiten der Rayleighlänge beschreibt. Wenn gilt  $z_R < z < z'_R$  (Nahfeld) wird der Krümmungsradius  $R \propto z_R^2/z$  und geht für  $z \rightarrow 0$  ins Unendliche. Bei Werten  $z \gg z'_R$  und  $z \ll z_R$  (Fernfeld) können die Strahleinhüllenden gemäß den Vorhersagen der geometrischen Optik berechnet werden. Der Krümmungsradius der Wellenfront ist dort  $R \propto z$ . Die Wellenfronten verhalten sich bei der Ausbreitung dann gerade so, als ob ihr punktförmiger Ursprung in  $z = 0$  liegt. Der Krümmungsradius  $R$  hat am Ort  $z = z_R$  zu beiden Seiten von  $z = 0$  sein Minimum mit  $R_{min} = 2|z_R|$ .

Zur Darstellung der Intensitätsverteilung in einem TEM<sub>00</sub>-Strahl mit einem CCD-Sensor-Array wird die Intensität über die Messzeit gemittelt. Betrachtet man beispielhaft die Verteilung entlang der x-Koordinate und eine Strahlausbreitung in z-Richtung, gilt:

$$E(x, z) = E_0 \frac{\omega_0}{\omega(z)} \cdot e^{-\frac{x^2}{\omega(z)^2}} \quad (3.134)$$

und für die gemittelte Intensität als Funktion der Zeit (mit Bezug auf eine Periodendauer  $T$ ) bzw. der  $x, z$ -Koordinaten kann man angeben:

$$I(t) = \varepsilon_0 c \frac{1}{T} \int_{t-T/2}^{t+T/2} E^2(t') dt' \quad (3.135)$$

$$I(x, z) = \frac{1}{2c\varepsilon_0} |E(x, z)|^2 \equiv \frac{1}{2c\varepsilon_0} E_0^2 \left( \frac{\omega_0}{\omega(z)} \right)^2 \cdot e^{-\frac{2x^2}{\omega^2(z)}} \quad (3.136)$$

Es ist dabei auch möglich, die Eigenschaften des Gaussstrahles über einen komplexen Parameter  $q$  anzugeben. Die Schreibweise erfolgt dabei oft in der Form des reziproken  $q$ -Parameters:

$$\frac{1}{q} = \frac{n(z)}{R(z)} - i \frac{n(z) \lambda}{\pi \omega^2(z)} \quad (3.137)$$

Mit dem  $q$ -Parameter und einer ABCD-Matrix sowie den Matrizes der verwendeten optischen Elemente, kann aus der resultierenden Matrix die numerische Beschreibung von Gaußstrahlen erfolgen, mit dem berechneten  $q$ -Wert der Stelle  $z^{70}$ :

$$\begin{aligned} q(z) &= \frac{\underline{A} q(0) + \underline{B}}{\underline{C} q(0) + \underline{D}} \\ \frac{1}{q(z)} &= \frac{\underline{C} + \underline{D} / q(0)}{\underline{A} + \underline{B} / q(0)} \end{aligned} \quad (3.138)$$

Aufgrund der oftmals nicht perfekten Symmetrie von Gaußstrahlen, erfolgt die Angabe i.d.R. für jede Richtung der Ebene getrennt. Der eindimensionale Intensitätsverlauf über die  $x$ -Koordinate entspricht an einer Projektionsstelle  $z$  der eindimensionalen Dichtefunktion einer Gaussverteilung und kann adäquat durch diese beschrieben werden:

$$I(x) = I(0) \exp(-2x^2/\omega_x^2) \equiv I(0) \exp(-x^2/2\sigma_x^2) \quad (3.139)$$

mit  $\sigma_x$  der Standardabweichung. Die Enveloppen des divergierenden Strahles können für einen Abstand  $z \gg z_R$  durch die Tangensbeziehung der geometrischen Optik angenähert werden:

$$\tan \theta := \lim_{z \rightarrow \infty} \frac{\omega(z)}{|z|} = \frac{\omega_0}{z_R} = \frac{\lambda}{\pi \omega_0 n} \quad (3.140)$$

Die Peakleistung eines Gaußprofils kann über die Pulsenergie  $E_{puls}$ , die Pulsdauer  $t_{puls}$  und den Radius der Strahltaile  $\omega_0$  berechnet werden, gemäß:

$$P(0) = \sqrt{\frac{16 \ln 2}{\pi^3}} \frac{E_{puls}}{\omega_0^2 t_{puls}} \quad (3.141)$$

Die mittlere Intensität, die in einem Gaußprofil auf eine entsprechende Querschnittsfläche trifft, kann in Abhängigkeit der Standardabweichung bzw.  $\omega(z)$  angegeben werden und beträgt ca.  $0.61 I(0)$  (siehe Anhang). Ein praktisch wichtiger Parameter eines realen Gaußstrahles ist der  $M^2$ -Wert, der auch als *Beugungsmaßzahl* bezeichnet wird. Die *Beugungsmaßzahl* gibt an, wie stark der reale Strahl von dem eines idealen Gaußstrahls (der nur ein mathematisches Konstrukt ist) abweicht. Er kann aus der Messung des Intensitätsprofils erhalten werden, wenn die Projektionsebene entlang der  $z$ -Koordinate verändert wird [280]. Mit der Annahme, daß  $\theta$  der (Fernfeld) Divergenz des Strahles im Bogenmaß entspricht, kann der kleinstmögliche Strahldurchmesser eines realen Monomode Gaußstrahles auch über das sogenannte *Strahlparameterprodukt* abgeschätzt werden:

$$\omega_0 \theta = M^2 \frac{\lambda}{\pi} > \frac{\lambda}{\pi} \quad (3.142)$$

<sup>70</sup>Dies findet auch Anwendung bei der Abbildung eines Strahles auf sich selbst, wie dies im Falle stabiler Resonatoren für die Grundmode innerhalb der Laser-Cavität eintritt.

Die Beziehung der Ungleichung gilt dabei nur für den eingebetteten Gaußstrahl. Dieser ist nicht real, sondern ein ideales Konstrukt. Die Beziehung vor der Ungleichung spiegelt den Verlauf realer Strahlhüllender wider und kann auch für gemittelte Multimode-Profile verwendet werden:

$$\omega(z)^2 = \omega_0^2 \left( 1 + M^4 \frac{\lambda^2}{\omega_0^4 \pi^2} z^2 \right) \tag{3.143}$$

$$\omega_0 = M^2 \frac{\lambda f}{\pi \omega} \tag{3.144}$$

Wobei  $2\omega = D_L$  entsprechen soll. Geht man davon aus, daß an einer Linse bzw. Apertur  $D$  ein hindurchtretender Laserstrahl mit dem Durchmesser  $D_L$  in seinem Intensitätsprofil nur 1% seiner Energie in Folge der Beschneidung verliert, d.h. der Durchmesser des Laserstrahls auf der Linse beträgt  $D_L = \pi\omega_f$ , kann für die schmalste Strahltaile (nach dem  $1/e^2$ -Kriterium) die Beziehung

$$d_0 = 2\omega_0 \approx \frac{2f\lambda}{D} \tag{3.145}$$

für den Strahltaillendurchmesser aufgestellt werden. Der für die Fokussierung des Gaußstrahls entscheidende Parameter ist dann die Linsenausleuchtung  $D_L$ . Mit der Definition der  $f$ -Zahl  $f^\# \equiv \frac{f}{D}$ , kann wegen des kleinen Intensitäts- bzw. Leistungsverlustes der kleinste Strahldurchmesser approximiert werden. Er beträgt in etwa [280]:

$$d_0 \approx 2 f^\# \lambda \tag{3.146}$$

Aus einer Leistungsberechnung folgt ein vergleichbarer Wert, wenn man eine Konzentrierung der Energie in einem Querschnitt von  $A = 2(f^\#\lambda)^2$  annimmt mit  $d_0 \approx 1.6 f^\# \lambda$ .

### 3.4.3 Taille-zu-Taille Abbildung

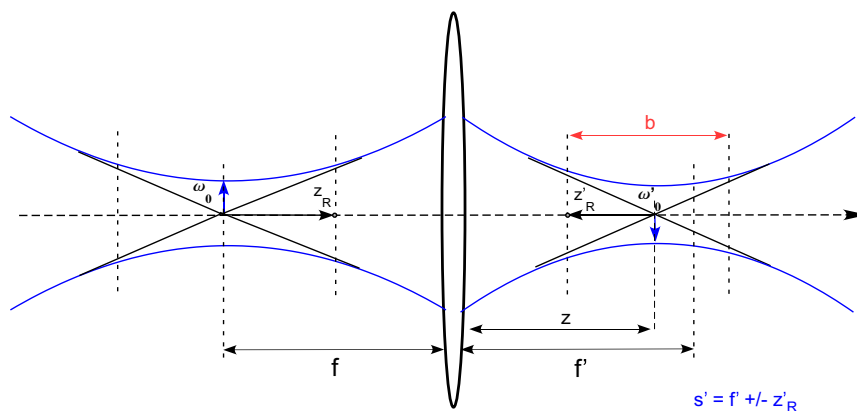


Abbildung 3.27: Abbildung einer TEM<sub>00</sub>-Strahlhüllenden, zusammen mit einer dünnen Sammellinse (+ Linse).

In der geometrischen Optik gibt per Definition die Brennweite einer dünnen Sammellinse den Krümmungsradius der einhüllenden Wellenfront bei einer Abbildung achsparalleler Strahlen in einem Punkt hinter der Linse wider. Der Ursprung des Krümmungsradius ist dabei der geometrisch optische Fokus. Im Zusammenhang mit der Theorie der Ausbreitung von Gaußstrahlen erhält man bei der Abbildung einer

Strahltaile eine zusätzliche Beziehung, die den Wellenfrontradius  $R_z$  und die Linsenbrennweite  $f$  verbindet:

$$R_{(z)} = z + \frac{z_R^2}{z} = f \quad (3.147)$$

Es ist damit i.d.R. eine Abweichung  $\Delta f$  zwischen der Lage des Fokus nach der Definition der geometrischen Optik und der Lage der Strahltaile des fokussierten Laserprofils in einer Entfernung  $z_0$  von der Linse festzustellen (Abbildung 3.27). Die Differenz zwischen der erwarteten Lage  $z_0$  und der Brennweite  $f$  entspricht:

$$\Delta f \equiv f - z_0 = \frac{z_R^2}{z_0} \approx \frac{z_R^2}{f} \quad (3.148)$$

Berücksichtigt man im folgenden, daß per Konvention die rückwertige Brennweite einer dünnen Linse mit  $f'$  bezeichnet wird, kann die Situation adäquat durch eine komplexe Relation beschrieben werden. Diese leitet sich aus dem q-Parameter,  $q(z) = z + q(0) = z + iz_R$ , in Kombination mit der ABCD-Matrix und dem Matrixelement einer dünnen Linse ab:

$$\frac{1}{-s + iz_R} + \frac{1}{s' - iz'_R} = \frac{1}{f'} \quad (3.149)$$

Diese geht für große Gegenstands- und Bildabstände in die Gleichung der geometrischen Optik über. Liegt die Strahltaile eines z.B. vorfokussierten Gaußstrahls im Gegenstandsbereich einer dünnen Sammellinse  $s$ , kann man aus dem reellen Anteil von (3.149) die Bildweite  $s'$  erhalten:

$$s' = f' \left( 1 - \frac{f'(s + f')}{(s + f')^2 + z_R^2} \right) \quad (3.150)$$

Weiterhin ergibt sich aus dem Realteil auch die Größe der Strahltaile in der rückwertigen Bildebene, gemäß [281]:

$$\omega'_0 = \frac{\omega_0 f'}{\sqrt{(s + f')^2 + z_R^2}} \quad (3.151)$$

Für den Fall, daß der Betrag der Rayleighlänge  $z_R \rightarrow 0$ , ergibt sich somit kein Unterschied zu den Schlussfolgerungen aus der geometrischen Optik. Diese Situation tritt aber i.d.R. nicht ein und man kann allgemein deutliche Abweichungen feststellen:

- Es gibt eine maximale und eine minimale Bildweite  $s'$  für TEM<sub>00</sub>-Gaußstrahltaillen.
- Die maximale Bildweite wird bestimmt durch die maximale Gegenstandsweite  $s = f + z_R$  und beträgt  $s'_{max} = f + f^2/2z_R$ .
- Es existiert ein Verhältnis  $s/f = s'/f = 1$  für alle Werte von  $z_R/f$ . Liegt die Strahltaile ( $\omega_0$ ) im Brennpunkt  $f$  vor der Linse, dann liegt die Strahltaile hinter der Linse ( $\omega'_0$ ) auch im rückwertigen Brennpunkt  $f$ . Eine Abbildung ins Unendliche bei einer Lage der Taille in  $f$  ( $s = f$ ) vor der Linse, wie in der geometrischen Optik, ist nicht möglich.
- Teleskopanordnungen nach Kepler (zwei + Linsen) aber als (gute) Näherungen erfüllt. Es stellt sich bei einer erneuten Fokussierung des teleskopisch aufgeweiteten Strahls eine Verlagerung von  $\omega'_0$  ein ( $s' = f' - z'_R$ ), wenn das Verhältnis von  $z_R/f$  vergrößert wird.

Die Vergrößerung  $m$  kann z.B. über die Strahltaillen berechnet werden:

$$m = \frac{\omega'_0}{\omega_0} = \frac{1}{\sqrt{\left(1 - \frac{s}{f}\right)^2 + \left(\frac{z_R}{f}\right)^2}} \quad (3.152)$$

Es gibt dabei keine Beschränkung der minimalen Abstände, um eine Strahltaile abzubilden. Diese kann z.B. unmittelbar auf der Krümmungsfläche einer bikonkaven Linse liegen und wird in diesem Fall auf der gegenüberliegenden Krümmungsfläche abgebildet werden. Die Rayleighlänge hinter dem fokussierenden System hängt vom Vergrößerungsfaktor im Quadrat ab:

$$z'_R = m^2 \cdot z_R \quad (3.153)$$

Die „Fokustiefe“, d.h. der Bereich in den Grenzen, bis zu denen die Strahltaile um den Faktor  $\sqrt{2}$  angewachsen ist, entspricht dem auch als *konfokalen Parameter*  $b$  bezeichneten Wert  $b = 2z_R \approx 2\pi f^{\#2} \lambda \approx \frac{\pi}{2} \left(\frac{d_a}{\lambda}\right)^2 \lambda$ . Dabei wird als Aperturdurchmesser  $D = \pi\omega_f$  angenommen. Alternativ kann z.B. aber auch ein bestimmter Prozentwert für eine Strahlaufweitung, gegenüber dem Tailenwert, als ein Kriterium herangezogen werden. Gilt z.B. die Annahme, daß nur 5% Aufweitung im Verhältnis zum Wert der Strahltaile für weitere Zwecke akzeptabel sind, entspricht dies in etwa einer axialen Tiefe von:

$$\Delta z \approx \pm \frac{0.32\pi\omega_0^2}{\lambda} \quad (3.154)$$

Der axiale Intensitätsverlauf entlang der Ausbreitungsrichtung der Strahlung, beginnend von der Strahltaile, ist also einerseits abhängig von der Aperturgröße mit dem Radius =  $a$ , der Wellenlänge der Strahlung und der (maximalen) Peakintensität,  $I(x = 0, y = 0, z = 0) = I_{peak}$ :

$$\frac{I(z)}{I_{peak}} = \left(\frac{\pi a^2}{z \lambda}\right) = \left(\frac{z}{z_R}\right)^2 \quad (3.155)$$

Außerdem muss bei den Messungen in dieser Arbeit berücksichtigt werden, daß ein erheblicher Anteil des Intensitätsprofils, aufgrund der besonderen Art der Laserstrahleinkopplung in die Hochvakuumquelle(n) effektiv verlorengeht. So zeigt das fokussierte TEM-Profil z.B. bei zentrischer Strahljustierung (keine Koma) am Spektrometer LAMMA 2000 und einer Betrachtung der fokalen Ebene im Probenraum einen Energieverlust von  $\geq 90\%$  (ohne statische und dynamische Abschwächer). Werden afokale Probenebenen betrachtet, kann die Intensitätsverteilung im Sinne einer Zentralabblendung interpretiert werden, die allerdings geometrisch nicht idealsymmetrisch ist. Dennoch existieren nicht selten intensive Peaks innerhalb der Intensitätsverteilung, die massenspektrometrische MALDI-Messungen ermöglichen. Ähnliches gilt auch für Strahljustierungen mit Koma.

Ein gaußförmiges TEM-Profil muss im Vergleich zu einem Strahlprofil mit homogener Verteilung in einer Mikroskopanordnung berücksichtigt werden (Sinusbedingung). Die Apodisationsfunktion zur Beschreibung einer Objektbeleuchtung im Auflicht erhält man nach [277]:

$$P(\theta) = \exp\left(-\beta^2 \frac{\sin^2(\theta)}{\sin^2(\alpha)}\right) \cos^{1/2}(\theta) \quad (3.156)$$

wobei  $\beta = a/\omega$ , dem Verhältnis von Blenden- bzw. Aperturradius zum Strahltaillenradius des Gaussprofils in der Aperturebene entspricht und  $\alpha$  dem halben Öffnungswinkel des Objektivs sowie  $\theta$  dem Beugungswinkel. Beide Winkel (im Bogenmaß) entsprechen sich gerade, wenn nur die jeweils möglichen Randstrahlen im Aufbau betrachtet werden. Die Gleichung spiegelt dann die Situation eines homogenen Strahlprofils wider, wenn für  $\beta = 0$  angenommen werden kann.

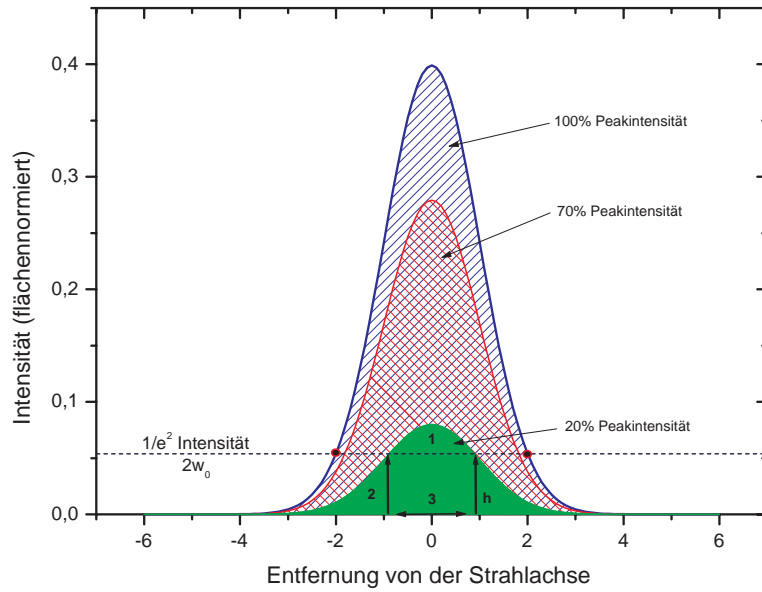
Die Abbildungen 3.28 bis 3.30 stellen einige Eigenschaften fokussierter TEM<sub>00</sub>-Strahlung dar.

### Babinets Prinzip

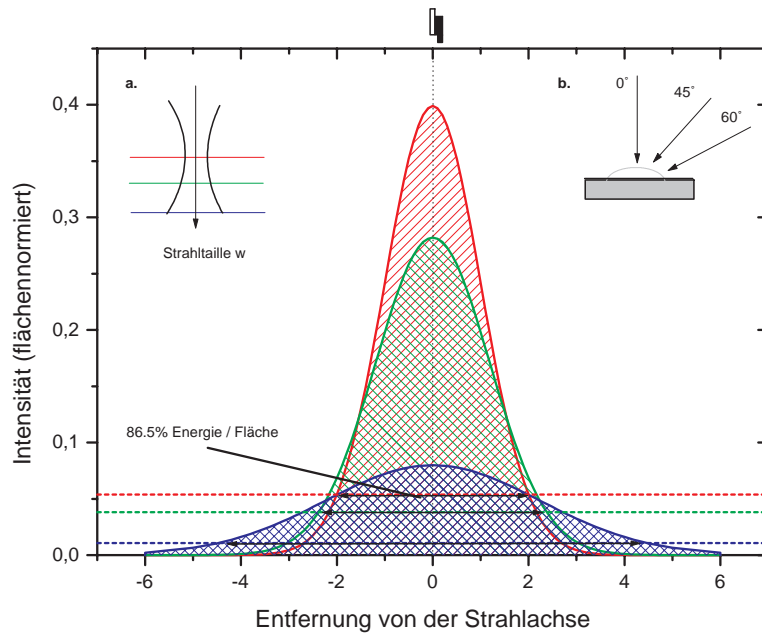
Außer den kreisrunden Aperturblenden, der kreisrunden Linsenspupille(n) und einer ovalen Spiegelaussparung innerhalb der Ionenquelle der Massenspektrometer (ALADIM II, LAMMA 2000), muss zudem

---

noch der Einfluss der Ionentransferkapillare(n) beachtet werden. Diese wirken dabei, aus Folgerungen die sich aus dem Prinzip von Babinet ergeben, in guter Näherung als Spaltaperturen mit identischem Durchmesser. Das entstehende Fraunhofer-Beugungsbild entspricht damit fast demjenigen einer vergleichbaren Schlitzblende ( $\rightarrow$  ähnliche Wirkung von komplementären Beugungsgeometrien im Nah- und Fernfeld) [278] [280].



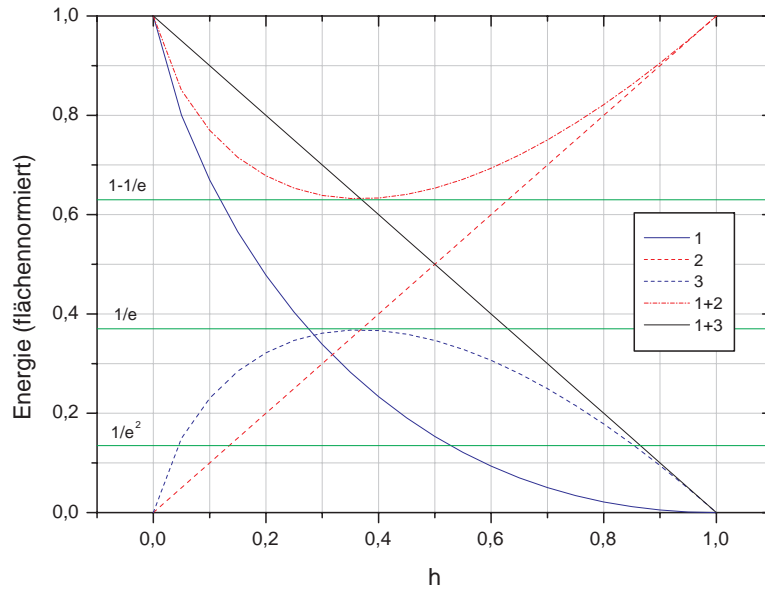
(a)



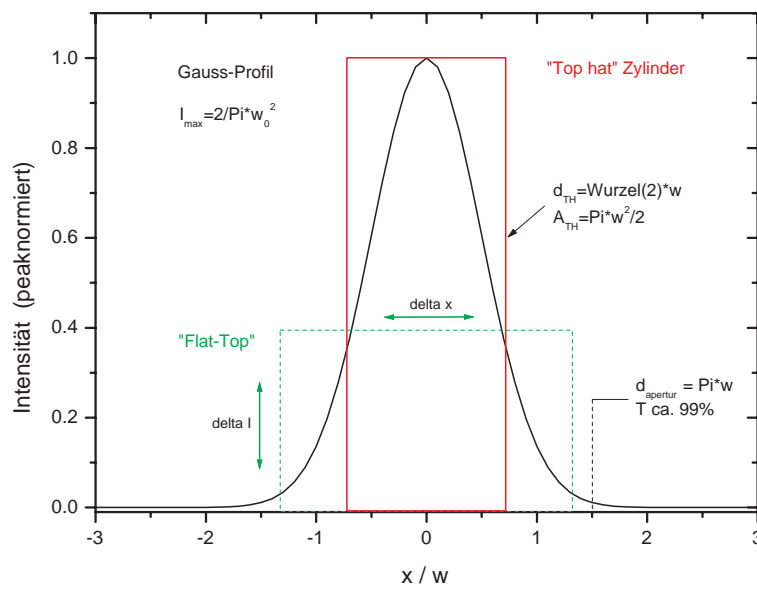
(b)

Abbildung 3.28: (a) Eindimensionales TEM<sub>00</sub>-Strahlprofil bei unterschiedlicher Abschwächung mit z.B. Kombinationen aus *Neutraldichtefiltern* (Graufilter) mit homogener Abschwächung. Nimmt man eine bestimmte Intensität  $h = \frac{I_h}{I_{max}}$  im eindimensionalen Profil an, die mit einem Radius  $r$  von der Strahlachse ausgehend betrachtet wird, ist es möglich das Profil in Bereiche einzuteilen. Einen rechteckigen Bereich 3 in der Mitte des Profils, dessen Höhe  $h$  und dessen Breite  $2r_h$  entspricht. Einen Bereich an der Spitze des Profils 1 und zwei Bereiche links und rechts neben dem Rechteckbereich 2. Trägt man die Energie als Funktion von  $h$  auf, erhält man die in Abbildung 3.29 dargestellten Verläufe. (b) Eindimensionale Intensitätsverteilung bei unterschiedlichen Ebenen im fokussierten Gaussprofil. Für den Fall einer gewinkelten Einstrahlung  $0^\circ < \theta < 90^\circ$  erhält man elliptische Querschnittsflächen auf der Ebene, die eindimensionalen Profile  $x,y$  unterscheiden sich deutlich und weisen eine *Schiefte* auf (Skewness, hier nicht dargestellt) [280].



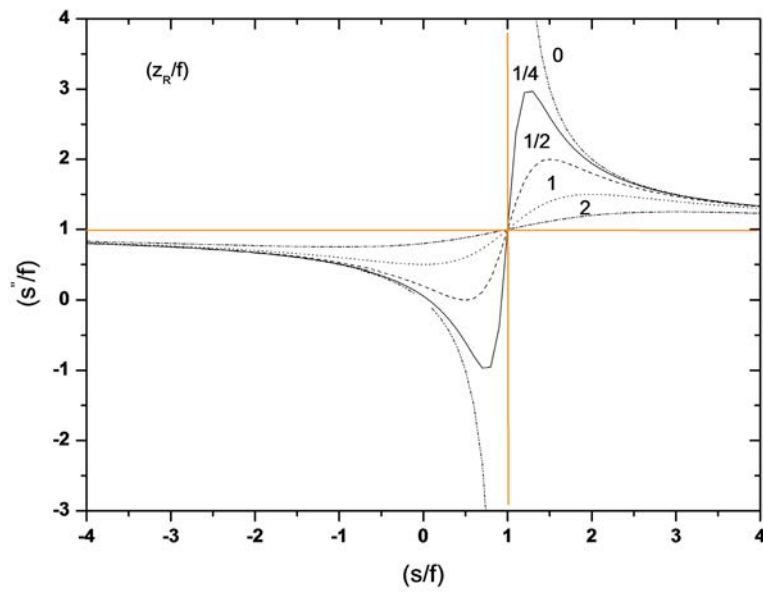


(a)

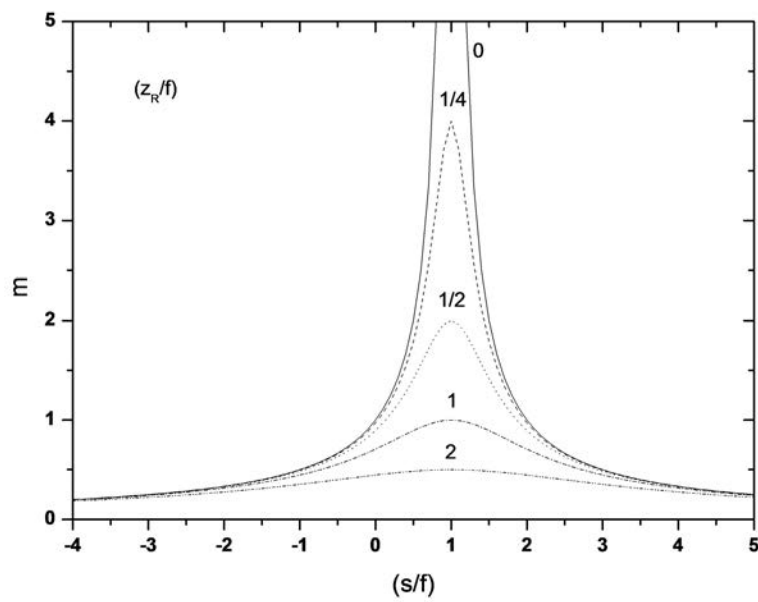


(b)

Abbildung 3.29: (a) Energie als Funktion von  $h$  entsprechend Abbildung 3.28 a [282]. (b) Auf den Strahlradius normiertes eindimensionales Gaussprofil (schwarz) und ein Top-hat-Profil. Die Lage realer „Flat-Top“-Profile im Vergleich zum ursprünglichen Gaussprofil, kann je nach technischer Ausführung variieren und ist nur angedeutet (grün) [280].



(a)



(b)

Abbildung 3.30: (a) Plot der Linsenformel nach Umstellen auf  $(s'/f) = 1 + \frac{(\frac{s}{f}-1)}{(\frac{s}{f}-1)^2 + (z_R/f)^2}$  für TEM<sub>00</sub>-Gaußstrahlen mit wechselnden Werten von  $(z_R/f)$ . Der Betrag  $(z_R/f) = 0$  stellt dabei die Situation der geometrischen Optik dar. Die Extremwerte erhält man mit  $(s'/f)_{max} = 1 + 1/2(z_R/f)$  bei  $(s/f) = 1 + (z_R/f)$  und  $(s'/f)_{min} = 1 - 1/2(z_R/f)$  bei  $(s/f) = 1 - (z_R/f)$ . (b) Plot der Vergrößerung  $m$  als Funktion der Bildweite für TEM<sub>00</sub>-Gaußstrahlen mit wechselnder Konstante  $(z_R/f)$ . Der Betrag  $(z_R/f) = 0$  stellt die Situation der geometrischen Optik dar.

# Kapitel 4

## Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Geräte

Neben den hier explizit dargestellten Geräten sind weitere Laborgeräte verwendet worden. Diese werden an entsprechender Stelle im Text bezeichnet, in ihrem Aufbau aber nicht näher beschrieben.

#### 4.1.1 Massenspektrometer ALADIM II

Es handelt sich bei dem Gerät ALADIM II um ein LDI-TOF Spektrometer mit horizontal angeordnetem Flugrohr. Das Spektrometer kann im *Linearmodus* (bis ca. 27 kV)<sup>1</sup> oder im *Reflektormodus* (bis ca. 20 kV) betrieben werden. Im Reflektormodus wird ein axialer zweistufiger Gitterreflektor (24 Ringe) in Kombination mit einer Konversionsdynode<sup>2</sup> verwendet. Es besteht im Reflektormodus auch die Möglichkeit zur PSD-Analyse mit einer stufenweisen Anpassung des Reflektorpotentials und einer selektiven Iongateschaltung (Mutterionenselektion, Übersichtsskizze Abbildung 4.1).

Die Ionenquelle ist aus einer zweistufigen Beschleunigungszone mit einer zusätzlichen elektrostatischen Fokussierungseinrichtung mit inhomogenen elektrostatischen Feldern aufgebaut. Diese Anordnung beinhaltet einen Ionentransfertunnel, an dessen Ausgang sich ein Iongate aus zwei planparallelen Gitternetzebenen befindet. Zusätzlich besteht die Möglichkeit mit verzögerter Ionenextraktion (Delayed-Extraction, DE) zu messen. Im Falle von DE wird die Blende in Abhängigkeit der Schaltspannung ( $V_0$ ), so schnell als möglich (Turn-On-Delay-time, Turn-On-Rise-time, Jitter) von dem am Target anliegenden Potentialwert auf ein niedrigeres positives Potential geschaltet (Übersichtsskizze Abbildung 4.2). Die schnelle Potentialschaltung wird dabei über zwei Push-Pull-MOS-FET-Schalter der Firma Behlke (HTS 31-GSM) realisiert. Die Delayzeit kann über einen digitalen Delay-Generator (DG 535) der Firma Stanford Research Systems Inc. variiert werden. Von der Probe im Spektrometer kann über einen Spiegel im Probenraum ein ca. 2 mm x 2 mm großer Bereich mit einer 100-fachen Vergrößerung betrachtet werden. In Abbildung 4.3 ist zum einen die transmittierte Laserenergie in Abhängigkeit von der Position der Abschwächerplättchen sowie zum anderen der Winkel der Abschwächerplättchen in Abhängigkeit von der Schrittmotorstellung aufgetragen.

Die AD-Umsetzung der i.d.R. nicht weiter vorverstärkten MCP-Signale erfolgt über ein digitales 500 MHz Speicheroszilloskop der Firma Le Croy des Typs 9350 AM (1GS/s im Einkanalverfahren, 500MS/s im Zweikanalverfahren). Das Spektrometer wird über die im Haus entwickelte Software ULISSES 8.0

---

<sup>1</sup>Gegenwärtig: MCP-Detektor I,  $d \approx 40$  mm, Chevron-Anordnung.

<sup>2</sup>gegenwärtig: Kupfer-Beryllium-Dynode, MCP-Detektor II  $d \approx 40$  mm, Chevron-Anordnung.

gesteuert [283].

Der Restgasdruck des Spektrometers liegt im Bereich zwischen ca.  $P \approx 7 \cdot 10^{-7} \text{ mbar}$  und  $P \approx 1.0 \cdot 10^{-6} \text{ mbar}$ . Er wird von zwei Turbomolekularpumpen (Pfeiffer TMU 520, TMU 250) und einer Drehschieberölpumpe (Pfeiffer Duo 16B, ca. 15 l/h) erzeugt. Zur Einschleusung der Probe wird eine separate Drehschieberölpumpe mit geringerer Leistung verwendet (ca. 10 l/h). Die Messungen zu dieser Arbeit werden mit einem Stickstofflaser der Firma Laser Science Inc., mit einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 337.1 \text{ nm}$  durchgeführt.

Sämtliche Netz-, Mess- und Steuergeräte (einschliesslich Steuerrechner) sind mit einer Masse (MS-Gehäuse) verbunden. Das MS-Gehäuse ist dann über die laborinterne Masseleitung (Kupferstrang) geerdet.

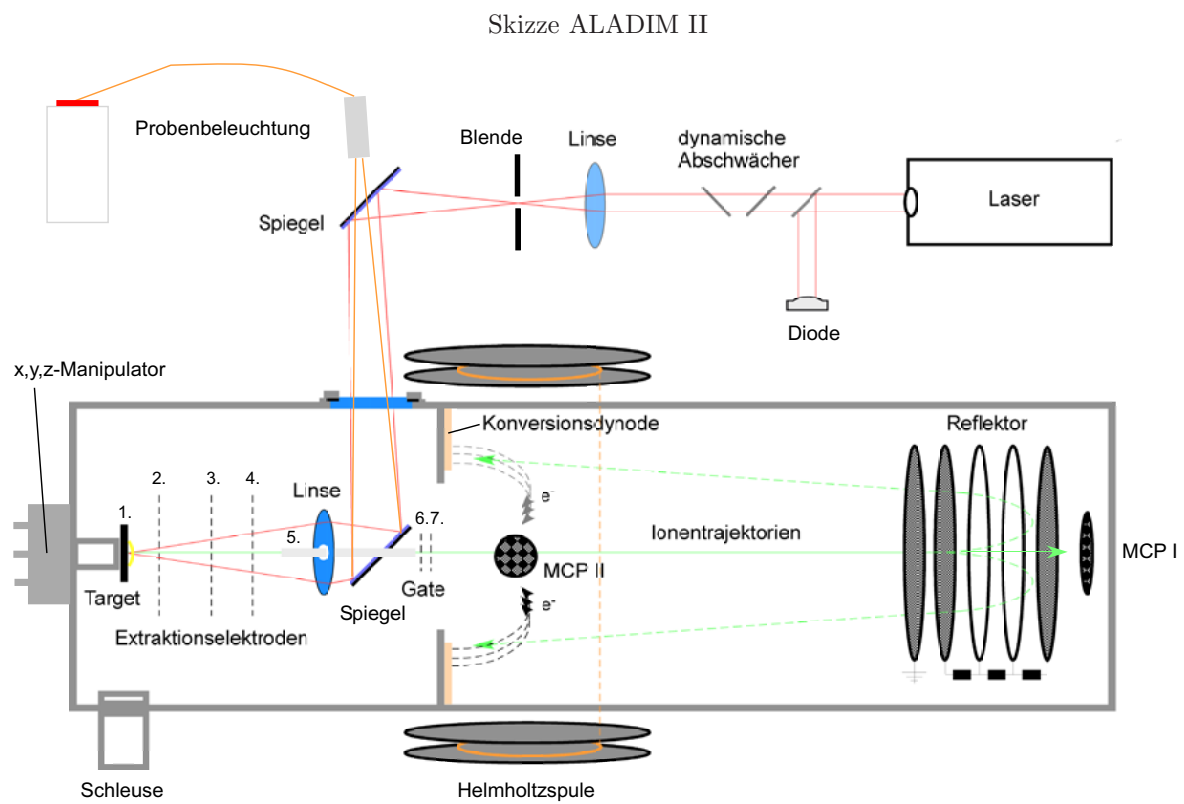


Abbildung 4.1: Aufbauskitze des Massenspektrometers ALADIM II (ohne Vakuumpumpen).

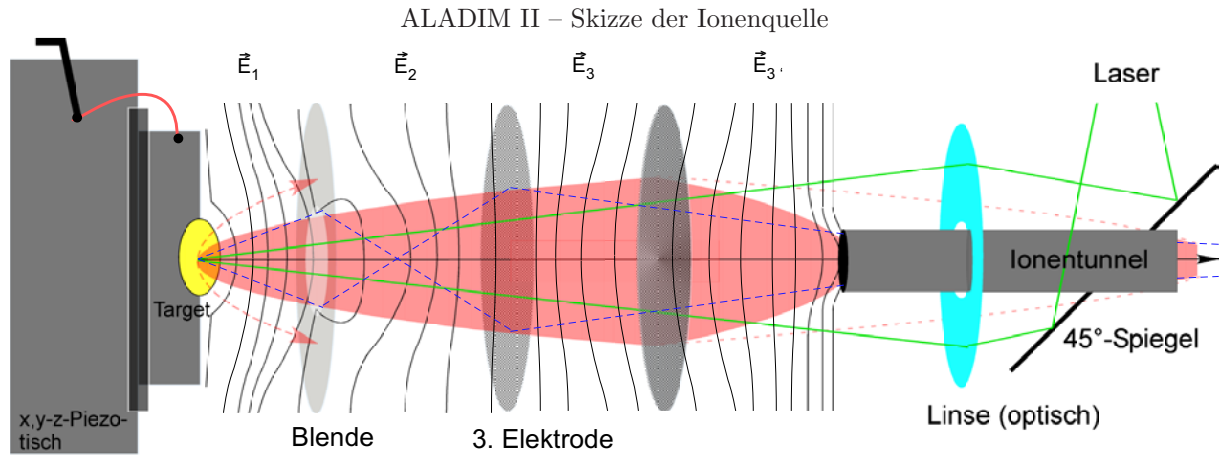


Abbildung 4.2: Schematischer Aufbau der Ionenquelle des Massenspektrometers ALADIM II und angedeuteter Verlauf der Äquipotentialflächen im seitlichen Anschnitt. Die Geometrie der in der Skizze dargestellten Elektroden entspricht nicht der tatsächlichen Geometrie, diese besitzen teilweise die Form eines Rohrstückes.

Tabelle 4.1: Dimensionen am Massenspektrometer ALADIM II. Werte gerundet, in der Einheit Millimeter.

Ionenquelle	
Target - Blende	: 3
Blende - 3. Elektrode	: 7
3. Elektrode - 4. Elektrode	: 15
4. Elektrode - Iontunnel	: 3
TOF	
Target - Lineardetektor	: 1400
Target - Konversionsdynode	: 2150
Konversionsdynode - Detektor*	: 150
* Kürzester parabolischer Trajektorienabstand.	

Tabelle 4.2: Spezifikation des  $N_2$ -Laser VSL-337 ND-S der Firma Laser Science Inc., verwendet am Massenspektrometer ALADIM II. Die maximale unfokussierte Bestrahlung beträgt in etwa  $75 \text{ mJ/m}^2$ .

\*: Im Profil fehlt ein rechteckiger Bereich von ca.  $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ .

Lasermedium	: $N_2$
Ausgabewellenlänge	: $337.1 \text{ nm}$
Spektrale Bandbreite	: $0.1 \text{ nm}$
Pulsenergie	: $\approx 300 \mu\text{J}$
Pulsdauer (FWHM)	: $< 4 \text{ ns}$
Frequenz	: $1 - 20 \text{ Hz}$
Mittlere Leistung (20 Hz)	: $6 \text{ mW}$
Peakleistung	: $75 \text{ kW}$
std. Intensität (10 Hz)	: $\pm 4\%$
Strahldivergenz	: $\approx 0.5 \text{ mrad}$
Strahlquerschnitt*	: $40 \text{ mm}^2$
Externer Trigger	: $+ 5 \text{ V}, 1 \mu\text{s}, 20 \text{ Hz}$
Maximale Betriebstemperatur	: $40^\circ\text{C}$
Trigger In to Optical Pulse Out	: $700 \text{ ns}, \leq 40 \text{ ns std. jitter}$
Optosync Output	: $\text{TTL } 50 \Omega$
Optical Pulse to Optosync Delay	: $50 \text{ ns}, < 500 \text{ ps std. jitter}$

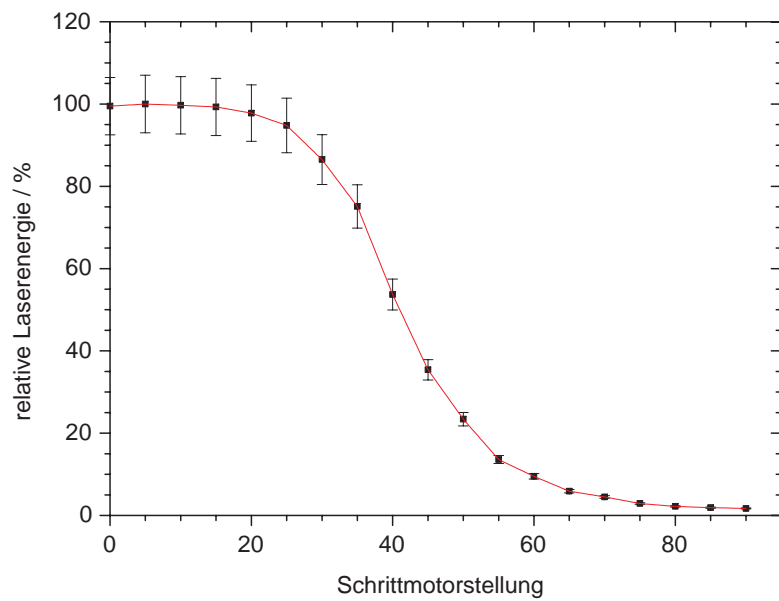
Tabelle 4.3: Spezifikation HV-Schalter Behlke HTS 31-GSM (Herstellerangaben).

Maximum Operating Voltage ( $V_o$ )	: $\pm 3000 \text{ V}$
Isolation ( $V_i$ )	: $> 10000 \text{ V}$
Maximum Peak Current ( $I_p$ )	: $30 \text{ A}$
Maximum Continuous Current ( $I_L$ ) $25^\circ\text{C}$	: $500 \text{ mA}$
Static On-Resistance ( $R_{stat}$ )	: $\text{ca. } 8 - 24 \Omega$
Maximum Off-State Current ( $I_{off}$ )	: $< 10 \mu\text{A}$
Turn-On Delay Time ( $t_{d(on)}$ )	: $80 \text{ ns}$
(bei $0.5 V_o, C_L = 20 \text{ pF}, R_s = 47 \Omega$ )	
Turn-On Rise Time ( $t_{r(on)}$ )	: $10 \text{ ns}$
(bei $0.8 V_o, C_L = 20 \text{ pF}, R_s = 51 \Omega$ )	
Typical Turn-On Jitter ( $t_{j(on)}$ )	: $300 \text{ ps}$
(bei $V_{aux} = 5.0 \text{ V}, V_{tr} = 5 \text{ V}, f = 1 \text{ kHz}$ )	
Pulse Width Range ( $t_p$ )	: $80 \text{ ns} - \infty$
Switch Natural Capacitance ( $C_n$ bei $V_o$ )	: $70 \text{ pF}$
Coupling Capacitance ( $C_c$ )	: $15 \text{ pF}$
HV side against control side	
Auxilliary Supply Voltage ( $V_{aux}$ )	: $5 \text{ V}$
Auxilliary Supply Current ( $I_{aux}$ )	: $400 \text{ mA}$
Control Voltage ( $V_{tr}$ )	: $2 - 10 \text{ V}$
Maximum Continuous Frequency ( $f_{c(max)}$ )	: $40 \text{ kHz}$
Continuous Power Dissipation ( $P_{d(max)}$ )	: $10 \text{ W}$

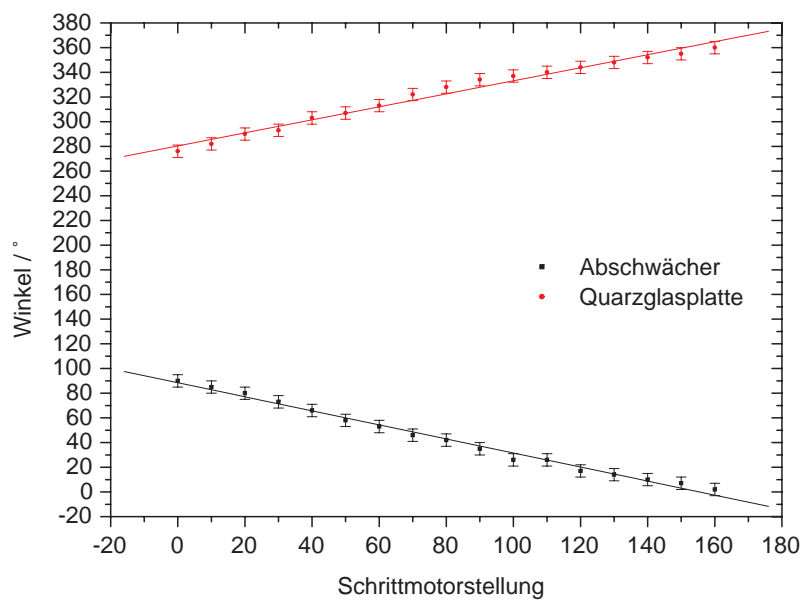
Tabelle 4.4: Linsen zur Vorfokussierung von Strahlung im UV. Herstellerangaben in der Einheit Millimeter (LINOS Photonics).

Nennbrennweite	$d_{Optik}$	$f'_{248\text{nm}}$	$f'_{355\text{nm}}$
20	12.5	19.67	21.01
25	12.5	24.77	26.44
40	22.4	38.69	41.31

Plankonvexlinsen, Quarzglas.



(a)



(b)

Abbildung 4.3: Relative Laserenergie in Abhängigkeit der Stellung der Abschwächer (oben) und Winkel der Oberfläche eines Abschwächer- und Korrekturplättchens zum Laserstrahl in Abhängigkeit der Schrittmotorstellung (unten). Das zweite Quarzglasplättchen korrigiert dabei die Parallelverschiebung  $\Delta$  des Laserstrahles,  $\Delta = d \sin(\alpha) \left( 1 - \frac{\cos(\alpha)}{\sqrt{n^2 - \sin^2(\alpha)}} \right)$ , mit  $d$  der Dicke des Plättchens,  $n$  dem Brechungsindex des Glasmaterials und  $\alpha$  dem Laserstrahlwinkel in Bezug auf das Lot der Glasoberfläche.



### 4.1.2 Massenspektrometer LAMMA 2000

Bei dem Gerät LAMMA 2000 handelt es sich um ein LDI Flugzeitspektrometer mit vertikaler Anordnung des Flugrohres. Dieses Spektrometer ermöglicht die Durchführung von Messungen im Linear- und Reflektormodus. Bei dem Reflektor handelt es sich hier um einen zweistufigen Gitterreflektor mit 14 Ringen. Im Meßaufbau wird sowohl zur Desorption/Ionisierung sowie auch zur Vermessung von CLSM-Proben im aktuellen Aufbau, ein und derselbe Nd:YLF DPSS-Laser<sup>3</sup> der Firma Spectra-Physics GmbH verwendet.

Einige Bilder von der geöffneten Ionenquelle sind in Abbildung 4.4 zu erkennen. Eine Übersichtsskizze des gesamten Aufbaus ist in Abbildung 4.5 dargestellt. In dem doppelbrechenden Nd:YLF-Kristall wird hauptsächlich senkrecht polarisiertes Licht der Wellenlängen  $\lambda = 1047 \text{ nm}$  und  $\lambda = 1053 \text{ nm}$  erzeugt. Der Nd:YLF-Kristall weist gegenüber den i.d.R. häufiger eingesetzten Nd:YAG- und Nd:VO<sub>4</sub>-Kristallen eine schwächere Ausprägung des *thermischen Linsen-Effekts* auf. Als thermische Linse wird die temperaturbedingte Änderung des Brechungsindex ( $dn/dT$ ) im Querschnitt des Mediums, in Abhängigkeit zur Längsposition im stabförmigen Kristall, bezeichnet. Weiterhin ist die Lebensdauer des wahrscheinlichsten spontanen Fluoreszenzübergangs mit der Wellenlänge  $\lambda = 1047 \text{ nm}$ , mit ca.  $485 \mu\text{s}$  ( $Nd^{3+}$ ,  ${}^4F_{3/2}$ ) im Nd:YLF-Kristall deutlich größer, als diejenige der primären Nutzwellenlänge von Nd:YAG-Kristallen ( $\approx$  Faktor 2). Hierdurch kann der Prozess des optischen Pumpens verlängert werden. Das optische Pumpen wird durch einen Diodenlasers eingeleitet. Dieser emittiert Strahlung einer Wellenlänge von  $\lambda = 806 \text{ nm}$ , die dann über eine mehradrige Glasfaserleitung (dielektrische Multimode oder Singlemode Wellenleiter<sup>4</sup>) in den Laserkopf gelangt. Hier kommt es nach dem Laserprozess zu einer Wandlung der Primärwellenlänge (1047 nm), anhand zweier *nichtlinearer* Kristalle (BBO<sup>5</sup>; SHG, SFG) in einem Überhöhungsresonatoraufbau (OPO) [284]. Die letztlich emittierte (Arbeits)Wellenlänge entspricht dann der frequenzverdreifachten Primärwellenlänge von  $\lambda = 349 \text{ nm}$  mit einer überwiegend horizontalen (linearen) Polarisation ( $P > 100:1$ ). Die effektive Konversionseffizienz, wie auch die Strahlqualität hängen dabei entscheidend von der Temperaturregulation der Wandlerkristalle ab ( $dn_e/dT$ )<sup>6</sup>. Der verwendete Laser erreicht im Aufbau mit akustooptischer Modulation (AOM, Q-Switch) eine maximale Pulswiederholfrequenz von  $f = 1 \text{ kHz}$  und kann über eine RS-232-Schnittstelle angesteuert bzw. über einen analogen 26-Pin-Anschluss extern getriggert und (optional) ausgelesen werden. Über den analogen Port ist auch eine Optosync-Kontrolle (Photodiode) der Ausgabepulse möglich. Der Optosync-Output erfolgt dabei zwischen  $0.9 \mu\text{s}$  bis  $1 \mu\text{s} \pm 2.5 \text{ ns}$  Jitter, bevor der Laserpuls emittiert wird. Der in den Laserkopf integrierte Pulsmonitor misst die Pulsenergie und übermittelt diese ca.  $38 \text{ ns} \pm 0.5 \text{ ns}$  Jitter nach Erreichen der steigenden Flanke des Laserpulses an den Steuerrechner. Zwischen der steigenden Flanke eines TTL-Pulses und der Laserpulsabgabe vergehen dann i.d.R. zwischen  $2.4 \mu\text{s}$  bis  $2.5 \mu\text{s} \pm 0.5 \mu\text{s}$  Jitter, wobei die TTL-Pulslänge dann immer  $t > 0.5 \mu\text{s}$  sein muss (min. pulse length =  $0.1 \mu\text{s}$ ). Die maximale Pulsintensität des Laser liegt in etwa bei  $E_{Puls} \approx 250 \mu\text{J}$ . Die maximale Pulsbestrahlung des unfokussierten Ausgangsstrahles beträgt in etwa  $E = 1.27 \text{ kJ/m}^2$  ( $1.27 \text{ nJ}/\mu\text{m}^2$ ). In Abbildung 4.6 ist die Wellenfrontkrümmung des Lasers bei unterschiedlichen Pulsenergien aufgetragen. Sie gibt die Verzögerung der Phase an achsfernen Punkten an.

<sup>3</sup>Triton 250, Nd:YLF =  $LiYNd_xF_x$ , tetragonale Kristallstruktur, Gitterparameter  $a = 5.16 \text{ \AA}$ ,  $c = 10.85 \text{ \AA}$ , thermischer Ausdehnungskoeffizient (Kristallachse a)  $\approx 13.3 \cdot 10^{-6}/K$  (Kristallachse c)  $\approx 8.3 \cdot 10^{-6}/K$ , Dichte  $\approx 3.99 \text{ g/cm}^3$ , doppelbrechender Kristall senkrecht zueinander polarisiert, Brechungsindizes nach Sellmeier-Gleichung  $n_o = 1.38757 + \frac{0.70757\lambda^2}{\lambda^2 - 0.00931} + \frac{0.18849\lambda^2}{\lambda^2 - 50.99741}$ ,  $n_e = 1.31021 + \frac{0.084903\lambda^2}{\lambda^2 - 0.00876} + \frac{0.53607\lambda^2}{\lambda^2 - 134.9566}$ , Suffix o = ordinary, e = extraordinary (siehe auch S.xx). Spezifikationen nach LASER COMPONENTS GmbH, 82140 Olching, Germany.

<sup>4</sup>Totalreflexion bei  $\theta = \arcsin(n_2/n_1)$ . Brechungsindizes der Faserhülle ( $n_2$ ) und des Faserkerns ( $n_1$ ).

<sup>5</sup>BBO = Beta-Bariumborat-Kristall,  $\beta - BaB_2O_4$ ; SHG = Second harmonic generation, SFG = Sum-frequency generation.

<sup>6</sup>Der wellenlängenabhängige Brechungsindex für den extraordinär polarisierten Strahl der 2. harmonischen Wellenlänge  $523.5 \text{ nm}$  muss für eine Phasenmodulation (SFG) mit der fundamentalen Wellenlänge  $1047 \text{ nm}$  im Wandlerkristall möglichst exakt auf einem Wert gehalten werden.

Das Massenspektrometer wird über eine im Haus programmierte Software (ULISSES 8.2) gesteuert [283]. ULISSES ermöglicht die automatische Bilderzeugung von derzeit bis zu vier Massenpeaks, jeweils in einem Zeitfenster von min. 105 ns (21 Bins). D.h. das intensivste Signal innerhalb der Fensterauswahl wird zur Pixelerzeugung herangezogen. Die AD-Wandlung erfolgt hier über eine ISA PC-Einsteckkarte des Modells 9825 Control mit 200 MHz (200 Megasamples/s) der Firma Precision Instruments. Im CLSM-Modus erfolgt die Steuerung des Piezo-Probentisches (Graf Mikroelektronik) und die Lasertriggerung ebenfalls über eine im Haus erstellte Software und eine I/O PCI-Karte der Firma Precision Instruments. Bei dem AD-Wandler für den CLSM-Modus handelt es sich um einen Meilhaus ME-Redlab 1208 (12 Bit, 10 Bit-Auflösung) der Firma Meilhaus Electronic GmbH. Dieser kann über USB 2.0 angesteuert und ausgelesen werden.

Das Vakuumsystem des Spektrometers besteht aus zwei Turbomolekularpumpen (2 x Leybold Turbovac 361, ca. 350 - 360 l/h) und einer Drehschieberöl-Vorpumpe (Leybold Trivac, ca. 15 l/h). Die Drehschieberöl-Vorpumpe wird auch zur Evakuierung der Probenschleuse verwendet. Hierzu wird zusätzlich ein Ausgleichkammersystem mit Regelventilen benötigt, das ein unterbrechungsfreies Arbeiten der Turbomolekularpumpen auch während des Schleusungsvorgangs gewährleistet. Der Restgasdruck im Spektrometer beträgt im Meßbetrieb zwischen  $5 \cdot 10^{-7}$  mbar bis maximal  $1 \cdot 10^{-6}$  mbar.

Eine Besonderheit bildet das aus fünf Suprasillinsen mit zentraler Bohrung bestehende Laserobjektiv. Die Abweichungen der einzelnen Linsenoberflächen zur idealen Sphäre betragen hier maximal  $\lambda/10$ . Die Durchmesser der Linsen liegen zwischen 31 mm und 42.5 mm. Die Toleranzen der einzelnen Linsendicken betragen zwischen 0.008 mm und 0.2 mm. Der erste Glas-Luft-Glasabstand des Systems ist einstellbar (Rechtsgewinde) und ermöglicht eine (moderate) Wellenlängenanpassung. Das Objektiv besitzt auf der Abbildungsseite eine numerische Apertur von  $NA = 0.62$  und ist rechnerisch beugungsbegrenzt ausgelegt ( $\lambda/8$  bei  $\lambda = 266$  nm, Airydurchmesser  $d = 0.52 \mu\text{m}$ ). Der objektseitige Brennpunkt liegt in einer Entfernung von  $f = 34.76$  mm. Die Gegenstandsweite entspricht dann einer Entfernung von  $s = 455$  mm, die Bildweite einer Entfernung von  $s' = 25$  mm. Die rechnerisch optimale Lage des Fokus beträgt bei dieser Wellenlänge 15.917 mm von der Fassungskante des Objektivs aus gemessen. Aus den Daten ergibt sich eine rechnerische Vergrößerung von  $\beta = 0.077$  für eine Punktabbildung in die Region der Ionenquelle des Spektrometers (alle Angaben bezogen auf  $\lambda = 266$  nm). Die Werte für eine Wellenlänge von  $\lambda = 349$  nm müssen experimentell ermittelt werden.

Die Beobachtung der Probe ist über eine modifizierte Beleuchtung (mit einer roten Laserdiode) und einen zum Desorptions/Ionisierungsstrahlverlauf teilparallelen Abbildungsstrahlengang möglich. Hierbei wird in einer mikroskopischen Vergrößerung (ca. 400-fach) ein Bildausschnitt von ca.  $500 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$  betrachtet. Das Spektrometer ist in dieser Arbeit ausschliesslich im Linearmodus betrieben worden. Bei dem hierzu verwendeten Detektor handelt es sich um einen MCP-Detektor in Chevron-Anordnung (zwei MCP) mit wirksamen Durchmessern von 40 mm der Firma tectra GmbH (MCP 050, Gain  $\approx 5 \cdot 10^6$  bei 2 kV). Das Signal aus dem MCP-Detektor wird dann zusätzlich verstärkt, (ca. 10-fach) und anschliessend mit vertauschtem Vorzeichen in die Transientenkarte geleitet. Abbildung 4.7 zeigt den Verlauf der Laserenergie bei der variablen (dynamischen) Abschwächung sowie bei unterschiedlichem Diodenstrom. Mit angegeben wird die wellenlängenabhängige Transmission des statischen (10 %) Neutralfilterfilters und die wellenlängenabhängige Transmission des testweise verwendeten Fluoreszenzfilters im CLSM-Aufbau. Die Abbildungen 4.8 und 4.9 zeigen Einzelheiten aus dem CLSM-Aufbau bzw. Herstellerspezifikationen

bestimmter Baugruppen.

Sämtliche Netz-, Mess- und Steuergeräte, einschliesslich der zwei Rechner, die gegenwärtig zu einer getrennten Steuerung der Ionendetektion und des Lasers erforderlich sind, werden mit einer gemeinsamen Masseleitung verbunden (MS-Gehäuse). Das MS-Gehäuse ist abschliessend über eine laborinterne Masseleitung (Kupferstrang) geerdet.

#### LAMMA 2000 – Ionenquelle

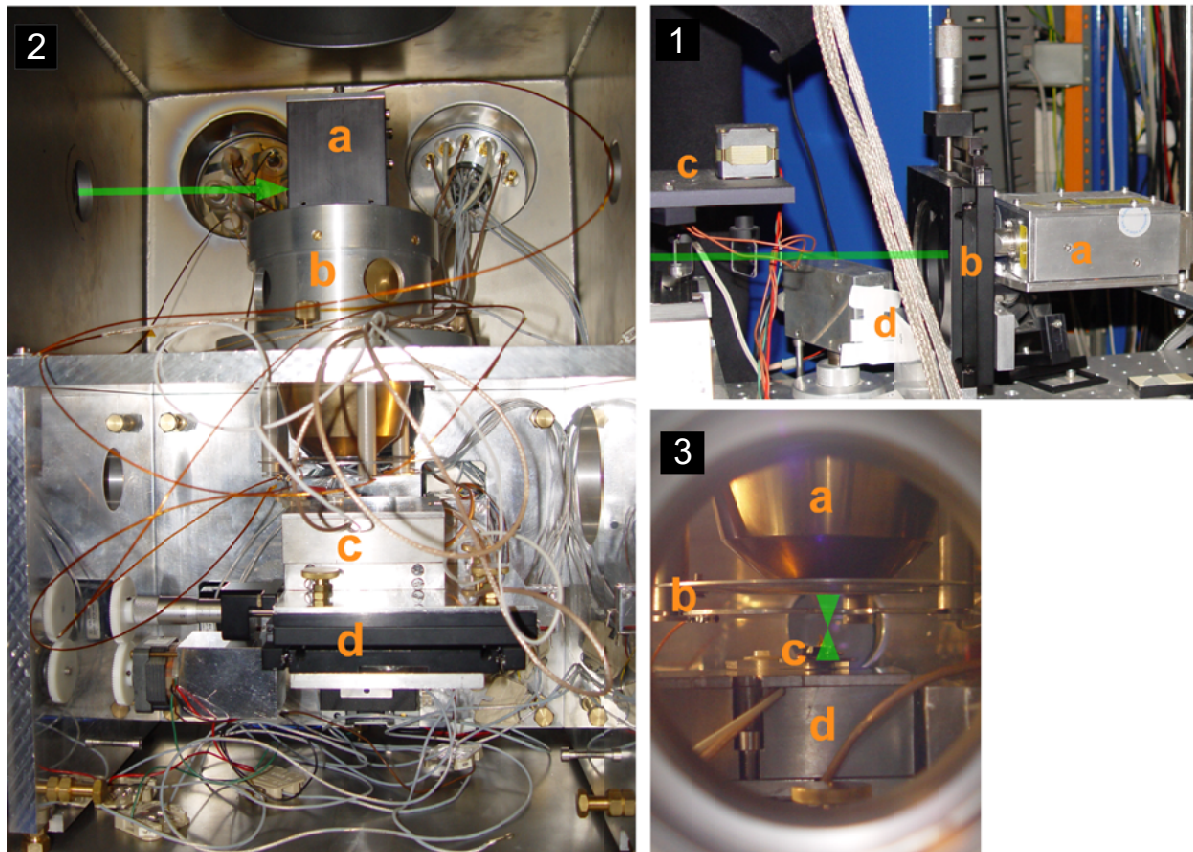


Abbildung 4.4: LAMMA-2000-Quelle. (1.a) Nd:YLF-Laserkopf mit Pulsmonitor x,y,z-Halterung (1.b), regelbarem Abschwächer (1.c) und Photodiode (1.d). Blick in die geöffnete Quellregion mit Ionendefektor (2.a), Laserobjektiv mit Halterung (2.b), x,y,z-Piezotisch (2.c) und x,y,z-Tisch (2.d). Blick durch die Probenschleuse auf die Quelle und angedeutete Laserstrahlteile. (3.a) Laserobjektiv in Messingfassung, (3.b) Extraktionselektroden, (3.c) Probenaufnahme mit Elektrodenhalterung und Anschluss, (3.d) x,y,z-Piezotisch.

LAMMA 2000 – MS- und CLSM-Übersichtsskizze

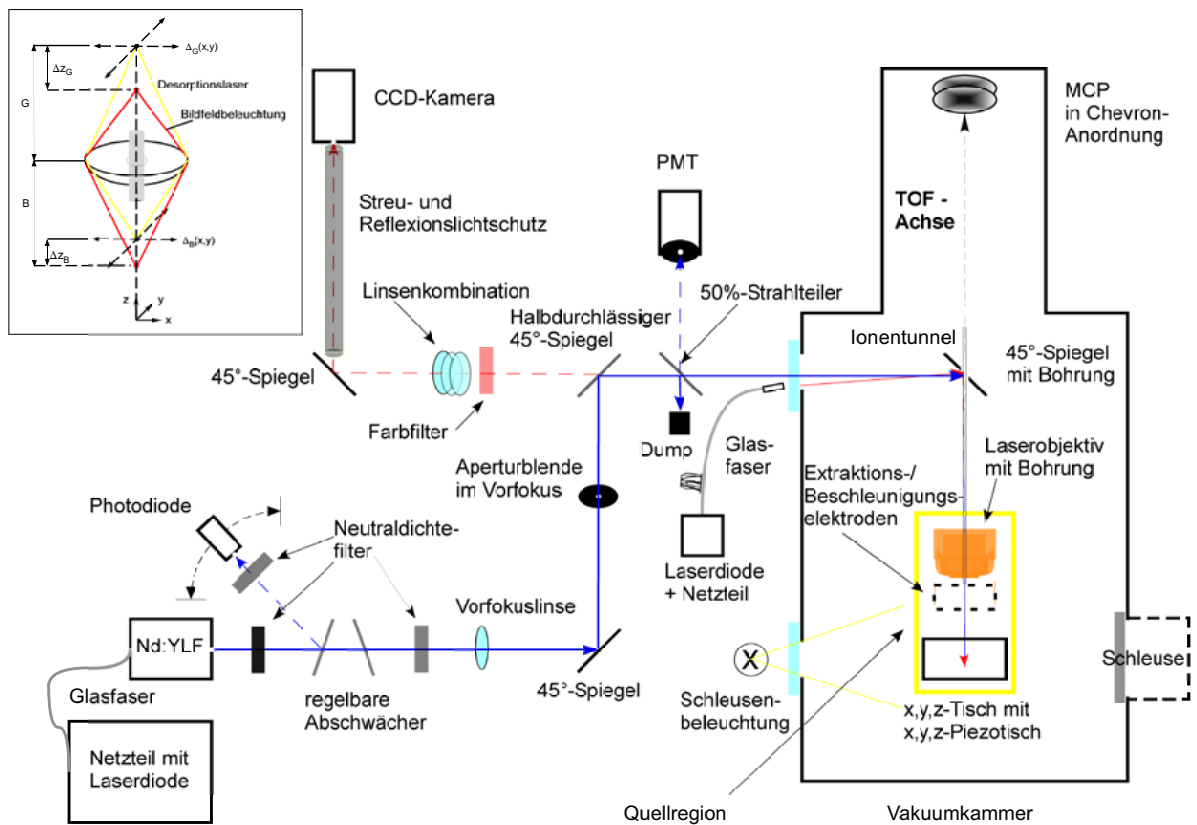


Abbildung 4.5: Übersichtsskizze des Aufbaus am Spektrometer LAMMA 2000. Der Kasten an der linken Seite stellt die unterschiedlichen Abbildungsverläufe der Beleuchtungs- und Desorptionstrahlung in der Quellregion dar.

Tabelle 4.5: Längendimensionen am Massenspektrometer LAMMA 2000. Werte gerundet in der Einheit Millimeter.

Ionenquelle	
Target - Blende	: 4
Blende - 3. Elektrode	: 8
3. Elektrode - Iontunnel	: 8
TOF-Analysator	
Driftstrecke*	: 1326
* Iontunnel - Gitter-MCP (Lineardetektor).	

Tabelle 4.6: Leistungsdaten und Strahlqualität des **Nd:YLF** basierten DPSS-Laser Triton 250 vor den optischen Elementen am LAMMA 2000.

Leistungsdaten				
Energie (int.)	Energie (ext.)	Pulsweite <sup>1</sup>	Diodenstrom	Pulsrauschen*
52 $\mu\text{J}$	$52 \pm 0.9 \mu\text{J}$	$16.8 \pm 0.4 \text{ ns}$	7.0 A	1.7 %
152 $\mu\text{J}$	$152 \pm 2.7 \mu\text{J}$	$10.8 \pm 0.3 \text{ ns}$	9.0 A	1.8 %
250 $\mu\text{J}$	$250 \pm 3.5 \mu\text{J}$	$9.0 \pm 0.2 \text{ ns}$	12.0 A	1.4 %
Strahlqualität				
Energie (intern)	$M^2$ (x)	$M^2$ (y)	Astigmatismus	Asymmetrie
52 $\mu\text{J}$	1.09	1.05	0.20	1.04
152 $\mu\text{J}$	1.12	1.07	0.13	1.01
250 $\mu\text{J}$	1.31	1.25	0.40	1.19
$M^2$ Messung				
Energie (intern)	$\omega'_0$	$s'$	$z'_R$	Divergenz
52 $\mu\text{J}$	x = 0.407 mm	162.14 mm	341.98 mm	1.19 mrad
	y = 0.425 mm	87.40 mm	385.43 mm	1.10 mrad
152 $\mu\text{J}$	x = 0.418 mm	160.83 mm	351.73 mm	1.19 mrad
	y = 0.416 mm	115.48 mm	364.72 mm	1.14 mrad
250 $\mu\text{J}$	x = 0.424 mm	283.40 mm	308.64 mm	1.38 mrad
	y = 0.503 mm	128.71 mm	454.68 mm	1.11 mrad
Parameter				
Pulsenergie	Optimum für 250 $\mu\text{J}$	Optimum für 50 $\mu\text{J}$		
Diodentemperatur	23.5°C	23.5°C		
SHG-Temperatur	2090 cts <sup>#</sup>	2770 cts		
THG-Temperatur	2315 cts	2215 cts		
Diodenstrom (max.)	13 A	10 A		

<sup>#</sup> : cts = counts, interne Zählrate.

<sup>1</sup> : Pulsweite nach FWHM-Definition.

\* : Signalrauschen in Prozent der Pulsenergie aus Leistungsmessungen.

Quelle : Spectra Physics GmbH NL Stahnsdorf, Testprotokoll. Linsenfokussierung zur Waist-Charakterisierung  
 $f = 489 \text{ mm}$  bei  $\lambda = 349 \text{ nm}$ . Diodenwellenlänge  $\lambda = 805.5 \text{ nm}$ . Pulswiederholungsrate = 1kHz.

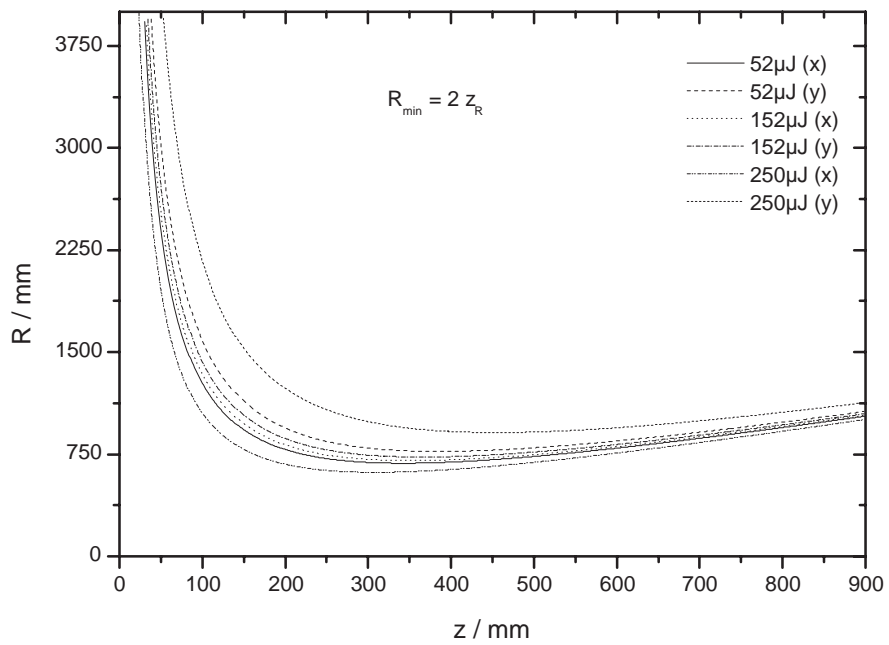
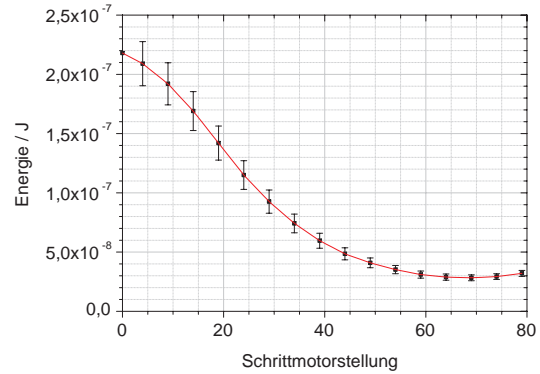
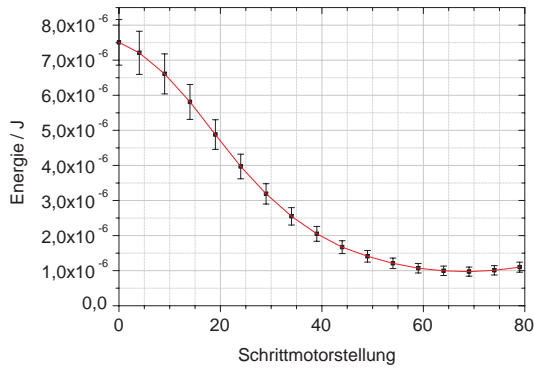


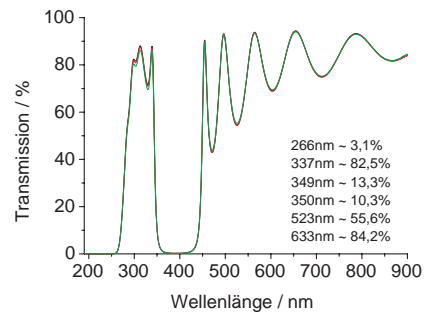
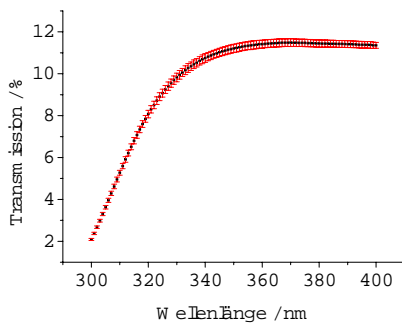
Abbildung 4.6: Wellenfrontkrümmung des Triton 250 Nd:YLF DPSS-Laser. Daten siehe Tabelle 4.6.



Dynamische Laserenergieregulierung



Statischer Abschwächer und CLSM-Fluoreszenzfilter



DPSS-Energie in Abhängigkeit vom Diodenstromes

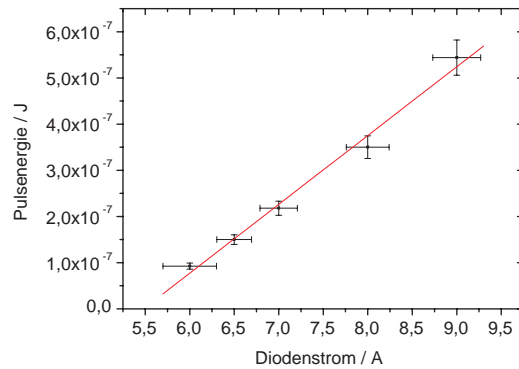
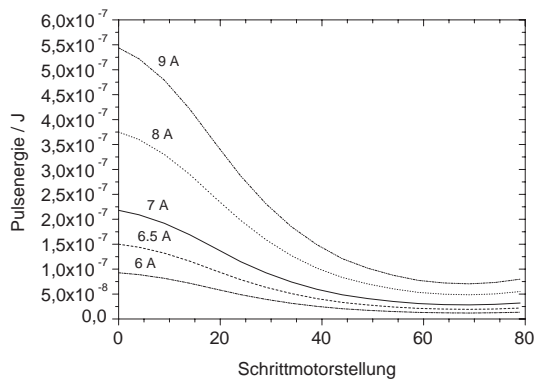
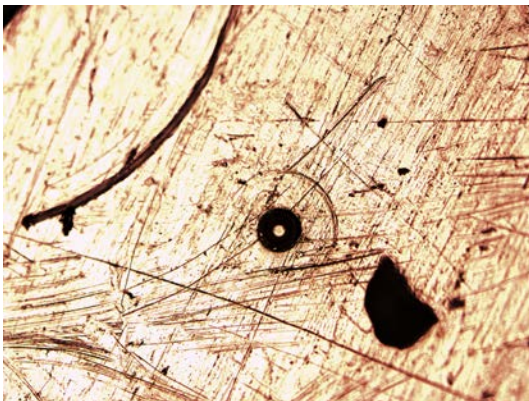
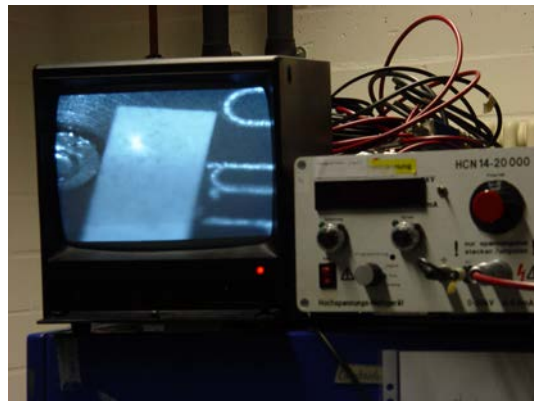


Abbildung 4.7: Laserenergiemessung unmittelbar hinter den Abschwächern (oben, links). Laserenergiemessung im Probenraum (oben, rechts). (Mitte) Spektrale Transmission einer verwendeten Neutraldichtefilterkombination und CLSM-Fluoreszenzfilter. Laserenergiemessung unmittelbar hinter den Abschwächern bei unterschiedlichen Diodenströmen (unten). Energiemeter FieldMaxII TOP, Messkopf J10MB-LE, Firma Coherent GmbH.

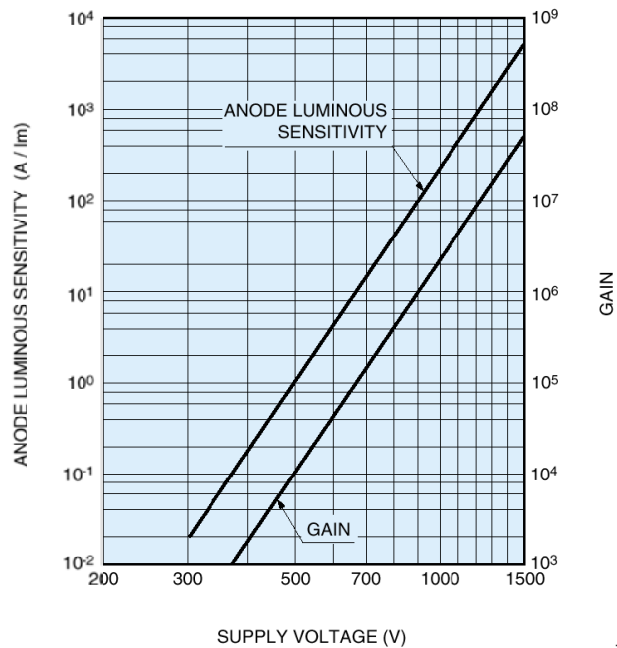
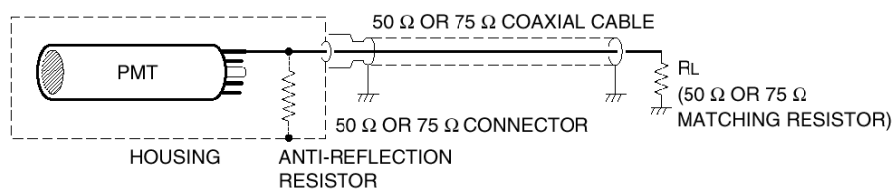




CLSM-Apertur (Bildmitte)



PMT-Justage unter optischer Kontrolle



TI

Abbildung 4.8: Oben, links: PMT-Blende (2) als Platineinsatz, erkennbar in der Bildmitte. Aperturdurchmesser  $\approx 19.5 \mu\text{m} \pm 1.5 \mu\text{m}$ . **Bildmaße: 178  $\mu\text{m}$  x 133  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 500x)**. Rechts: Optische Justierunterstützung einer 10  $\mu\text{m}$ -Blende. Erkennbar ist ein Papierstreifen mit abstrahlender Fluoreszenz nach Laserbeschuss. Unten: Side-On PMT der Firma HAMAMATSU Corp. mit *Reflection-mode* Photokathode und einer *circular-cage*-Geometrie der Dynodenanordnung. Transmission des Quarzglasfenster bei einer Wellenlänge  $\lambda = 349 \text{ nm} \approx 90\%$ . Spezifikation der Signalverstärkung (Gain) und der Luminiszenz-Sensitivität (A/lm) der Anode als Funktion des Klemmenpotentials. Da die Einheit Lumen (lm) sich nur auf sichtbares Licht bezieht, ist diese im UV und IR Bereich durch W zu ersetzen. Die Verstärkung berechnet sich nach:  $G = \delta^n = K V^{\alpha n}$ , mit  $V$  = Potential zwischen Kathode und Anode,  $K$  = Konstante,  $\alpha$  = Material und Geometriekonstante,  $n$  = Anzahl der Dynoden,  $\delta$  = Sekundärelektrodenemissionsrate. Als spektrale Referenzlichtquelle wird eine Glühlampe (Glühwendel = Wolfram, tungsten) mit einer (Farb)Temperatur von 2856 K angegeben. Die Anodensensitivität ist abhängig vom Einstrahlungswinkel und von der Temperatur des (gesamten) Sensors. Abbildungen (unten) entnommen aus Dokumenten der Firma HAMAMATSU PHOTONICS Deutschland GmbH. Link: <http://sales.hamamatsu.com>.

PMT-Charakteristik

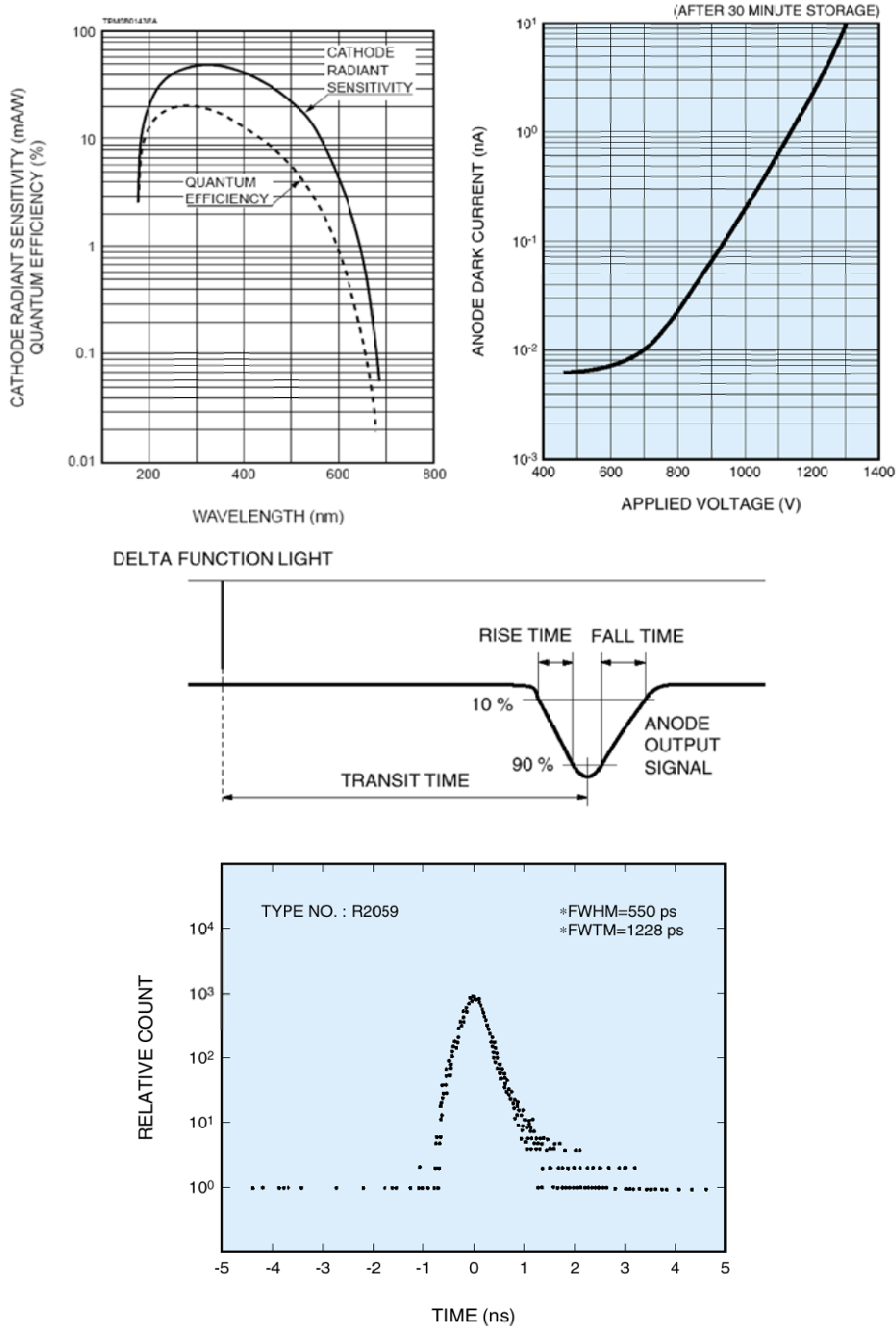


Abbildung 4.9: Oben links: Spektrale Charakteristik einer Bialkali Photokathode (typisch: Sb-Cs). Die Quanteneffizienz (in Prozent) einer Photokathode berechnet sich zu  $QE = \frac{S \cdot 1240}{\lambda} \cdot 100$ , mit  $S$  = der winkelabhängigen Sensitivität in  $[A/W]$  und der Wellenlänge in  $[nm]$ . Sie stellt das Verhältnis von emittierten Photoelektronen zu der Anzahl initialer Photonen dar. Oben rechts: Dunkelstrom als Funktion des Potentials. Das sogenannte ENI (*Equivalent noise input*) stellt den Betrag der Strahlungsleistung dar, der notwendig ist, um ein  $SNR = 1$  am Signaloutput zu erzeugen:  $ENI = \frac{\sqrt{2q \cdot ldb \cdot g \cdot \Delta f}}{S}$ , mit  $q$  = Elementarladung,  $ldb$  = Anodendunkelstrom nach Definition (Diagramm),  $g$  = Gain,  $\Delta f$  = Frequenzbandbreite, typisch 1 Hz,  $S$  = winkelabhängige Sensitivität bei einer Wellenlänge. Typische Werte:  $ENI \approx 5 \cdot 10^{-16} W \pm 4 \cdot 10^{-16} W$ . Mitte: Dargestellt ist der theoretische Verlauf eines Transportprozesses (*Transit-time*) mit typischer Verzögerung des Peakaufbaus (*Pulse-rise-time*, 10%-90%) einer PMT-Anode und der Zeitabweichung im Elektronentransport (*Transit-time*) diskreter Photonenpulse pro Bildpunkt (*Delta-Function-Light, Electron-transit-time-spread*). Unten: Die dargestellten Werte stammen aus Messungen mit einem Head-On PMT Typ R2059 mit 51 mm Fenster, 12-stage, linear-focused Geometrie. Angenommen werden Delta-Funktions-Lichtpulse mit einer Breite von  $< 50$  ps. Die Abbildungen sind entnommen aus Dokumenten der Firma HAMAMATSU PHOTONICS.

Tabelle 4.7: Hamamatsu 1P28 Side-On-PMT. Maximales Potential (Kathode - Anode) = 1250 V DC. Maximales Potential zwischen letzter Dynode und Anode = 250 V DC. Durchschnittlicher Anodenstrom = 0.1 mA. Kathodenmaterial: Sb-Cs. Minimal nutzbare Kathodenfläche = 8 mm x 24 mm. 9 Stufen. Spektraler Bereich: 185 nm bis 650 nm, maximale Empfindlichkeit bei 340 nm. Betriebstemperaturbereich = -80°C bis 50°C. Alle Spezifikationen nach Datenblatt TPMS1062E01 FEB1999, HAMAMATSU PHOTONICS K.K., 314-5, Shimokanzo, Toyooka-village, Iwata-gun, Shizuoka-ken, 438-0193, Japan.

Parameter	Minimal	Typisch	Maximal	Einheit
Sensitivität der Anode				
Glühlampe (2856 K)	20	400	–	A/lm
$\lambda = 400 \text{ nm}$	–	$4.8 \cdot 10^5$	–	A/W
Sensitivität der Kathode				
Glühlampe (2856 K)	25	40	–	$\mu\text{A/lm}$
$\lambda = 400 \text{ nm}$	–	48	–	mA/W
Quanteneffizienz				
$\lambda = 340 \text{ nm}$	–	21	–	%
Gain	–	$1.0 \cdot 10^7$	–	–
Dunkelstrom der Anode				
nach 30 min.	–	5	50	nA
Ansprechzeit				
Anoden-Puls-Rise-Time	–	2.2	–	ns
Elektronentransportzeit	–	22	–	ns
Spezifikationen bei $T = 25^\circ\text{C}$ und 1000 VDC Betriebsspannung.				

### 4.1.3 Labormikroskop Olympus BX 41

In dieser Arbeit wird das UV-VIS-Labormikroskop BX 41 von Olympus verwendet (Abbildung 4.10). Mit diesem Mikroskop können Probenaufnahmen im Auf- und Durchlichtverfahren hergestellt werden. Neben Fluoreszenz- und Hellfeldaufnahmen (B) sind darüberhinaus auch Dunkelfeldaufnahmen (D) und Messungen mit differentiellem Interferenzkontrast (DIC) möglich. Das Mikroskop ist zudem mit einer CCD-Kamera ausgestattet (CC-12, 12 Bit<sup>7</sup>). Sie wird über die analySIS-Software 5.0 der Firma SIS (Soft Imaging Systems GmbH) gesteuert bzw. über eine Frame-Grabber-Karte mit FireWire-Anschluss (IEEE 1394) ausgelesen (20 MHz ADC, Sample-and-Hold Verstärkung). Die verwendete Routine zeichnet sich durch einen Bildaufbau mit 1376 x 1032 Pixel (Pixelkantenlänge = 6.45  $\mu\text{m}$ , 4:3, quadratische Pixel), bei einer effektiven Sensorfläche von 8.6 mm x 6.9 mm (Projektionsfläche, 6.7  $\mu\text{m}$  x 6.7  $\mu\text{m}$  single cell size) aus. Die Aufnahmezeit beträgt im Video-Modus mind. 16 fps bis 18 fps (*frames-per-second*). Wird hierzu ein Binning (zeilenweise Pixelzusammenfassung) angewandt, können Aufnahmezeiten von über 22 fps erreicht werden. Die Belichtungszeit kann von 100  $\mu\text{s}$  bis maximal 160 s manuell oder automatisch über die Software geregelt werden. Zur Unterdrückung des thermischen Rauschens ist die Kamera mit einem (passiven) Peltierelement ausgestattet. Dieses kühlt die Sensorfläche bei 25°C Umgebungstemperatur auf eine Solltemperatur von 10°C. Eine zusätzliche Vibrationsdämpfung für den Kamera-Chip und das Mikroskop besteht im gegenwärtigen Aufbau nicht. Die Beleuchtung erfolgt im Falle der Auflichtmikroskopie über eine Halogenlampe (12 V, 100 W) bzw. bei Fluoreszenzmessungen über eine Quecksilberdampfdrucklampe (10 V, 100 W) und im Durchlichtverfahren über eine im Fuß des Mikroskopes eingelassene Halogenlampe (12 V, 100 W). Das BX-41 ist mit einem Probenstisch (*x,y,z-stage*) ausgerüstet, der eine Mikrometermanipulation zur Probenfokussierung im Fein- (0.1 mm / 360°) und im Grobtrieb (17.8 mm / 360°) ermöglicht (U-VSRB-4, Dreiecks-Keramiklagerung). Dabei kann mit der Feintriebteilung ein kleinstmöglicher axialer Ebenenwechsel von einem Mikrometer (0.1 mm/100) eingestellt werden. Die laterale Beweglichkeit der Probe beträgt in x-Richtung (horizontal) 76 mm und in y-Richtung (vertikal) 52 mm. Im Durchlichtverfahren können wechselnde Kondensoren zur Ausleuchtung der Probe verwendet werden (Abbe, NA=1.1, 4x - 100x ; Achromatic Aplanat NA=1.4, 10x - 100x). Die für Fluoreszenzaufnahmen zur Verfügung stehenden Filterkombinationen sind in Abbildung 4.11 dargestellt.

---

<sup>7</sup>3 x 12 Bit RGB. Diese wird innerhalb der analySIS-Software in 3 x 8 bit RGB Bilder konvertiert (ADDA-Modul).

Labormikroskop mit Digitalkamera



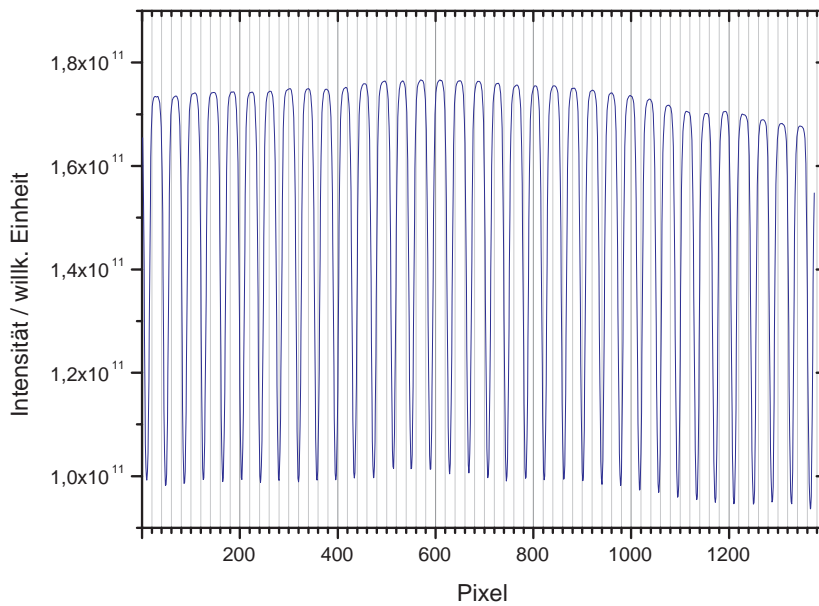
Abbildung 4.10: Aufrechtes UV-VIS Labormikroskop Olympus BX 41 mit computergestützter Bildauswertung.

Tabelle 4.8: Daten der Universal M Plan Fluorit Objektive für Hellfeld- und Dunkelfeldbeobachtungen in Kombination mit den Binokularen WH10X (FN22) am aufrechten Labormikroskop BX 41 von Olympus. Alle Objektive erreichen eine Sehfeldzahl von  $FN = 26.5 \text{ mm}$  (*Field number*). Daraus ergibt sich die Größe des betrachteten Bildfeldes zu,  $FOV = \frac{FN}{m_{obj} \cdot m_{ok}}$ . Außer dem Plan Apo Objektiv (Apochromat), handelt es sich dabei um Halbapochromate. Nicht gekennzeichnete Werte wurden berechnet. Laterale Auflösung = Rayleigh-Kriterium, Fokustiefe = Näherung der Berekschen Formel. Annahme einer Fokussierung auf die mittlere Wellenlänge,  $\lambda = 550 \text{ nm}$  und einer Brechzahl von Luft in Bodennähe,  $n \approx 1$ .

Bezeichnung	Vergrößerung*	Fokustiefe	NA*	Arbeitsabstand*	Auflösung
UM Plan F1 BD	5x	ca. $57.6 \mu\text{m}^*$	0.15	12 mm	ca. $2.2 \mu\text{m}$
UM Plan F1 BD	10x	ca. $22.4 \mu\text{m}^*$	0.30	6.5 mm	ca. $1.1 \mu\text{m}$
UM Plan F1 BD	20x	ca. $7 \mu\text{m}^*$	0.46	3.1 mm	ca. $0.7 \mu\text{m}$
UM Plan F1 BD	50x	ca. $1.28 \mu\text{m}$	0.80	0.2 mm	ca. $0.4 \mu\text{m}$
UM Plan F1 BD	100x	ca. $0.66 \mu\text{m}^*$	0.90	0.31 mm	ca. $0.3 \mu\text{m}^*$
Plan Apo N BD	2x	ca. $398 \mu\text{m}^*$	0.08	6.2 mm	ca. $4.2 \mu\text{m}$

\* Spezifikation nach Olympus Deutschland GmbH. BD = Brightfield, Darkfield.

Messkalibrierung und Filterkombinationen



Mikrometermaßstab

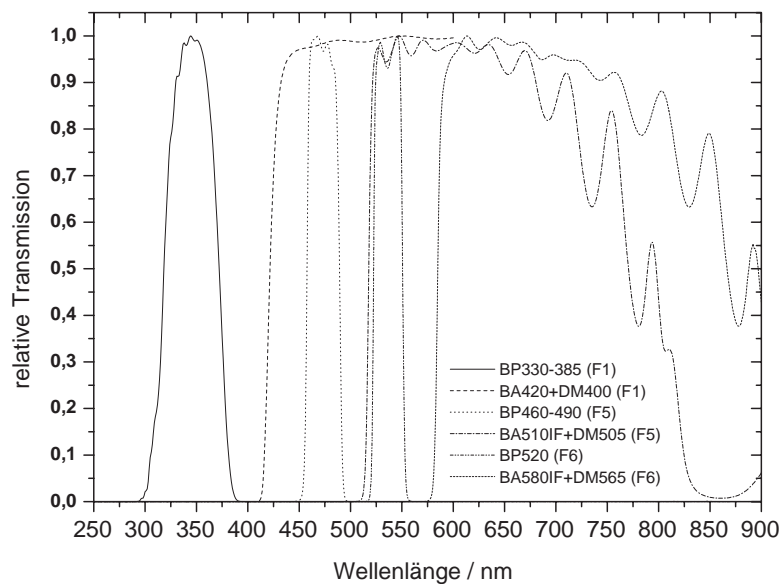


Abbildung 4.11: (Oben) Kalibrierung der Größenskala der analysIS-Software (Version 5.0) durch Vermessung eines horizontalen Mikrometermaßstabs im Durchlichtverfahren. Bildgröße des Maßstabsausschnitts: 1376 (horizontal) x 1032 (vertikal) Pixel. Gemessen wird die Transmission im gesamten horizontalen Bereich über die volle (vertikale) Länge der kleinen Teilstriche. Anhand des mittleren Abstands der Teilungen kann bei der Betrachtung unterschiedlicher Vergrößerungen eine Abweichung z.B. aufgrund einer groben Dejustierung der Kameraposition ermittelt werden. Im Beispiel entspricht der Abstand einer Teilung ca.  $50 \pm 0,5 \mu\text{m}$  (50-fache Vergrößerung, Objektiv 5x, Okular 10x). (Unten) Spektrale Charakteristik der Bandpassfilter (BP), Dichromatischer Spiegel (DM) und Anregungsfilter (BA) am Olympusmikroskop BX-41.

## 4.2 Material

### 4.2.1 Chemikalien zur Analyse und Präparation

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders bezeichnet, in der jeweils höchsten verfügbaren Reinheitsstufe verwendet, d.h. mindestens HPLC-grade-Qualität mit einer Reinheit  $\geq 98\%$ . Bei den Peptiden/Proteinen/Enzymen handelt es sich, soweit nicht näher bezeichnet, um salzfreie Lyophilisate. Die Abbildung 4.12 zeigt die verwendeten (UV)MALDI Matrizes. Abbildung 4.13 stellt die Eigenfluoreszenz der MALDI Matrix 2,5-DHB dar. In Abbildung 4.14 sind Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Matrix 2,5-DHB dargestellt.

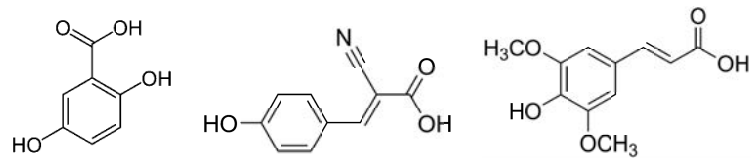


Abbildung 4.12: Von links nach rechts: Gentisinsäure (2,5-Dihydroxybenzoesäure),  $\alpha$ -cyano-p-Hydroxyzimtsäure ((E)-2-cyano-3-(4-hydroxyphenyl)-2-propensäure), Sinapinsäure ((E)-3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2-propensäure). Gentisinsäure kommt natürlich u.a. in Enzian- (Gentiana L.), Kümmel- und Lavendelarten vor. Zimtsäurederivate u.a. in Trauben.



Tabelle 4.9: Verwendete Chemikalien, außer Lösungsmittel. GRAVY (*Grand average of hydropathicity*) für Peptide bzw. Proteine nach HI in Tabelle 3.3.

Bezeichnung	Molmasse [g/mol]	GRAVY	Summenformel
Gentisinsäure	154.12		$C_7H_6O_4$
Sinapinsäure	224.21		$C_{11}H_{12}O_5$
$\alpha$ -Cyano-p-hydroxymizinsäure	189.17		$C_{10}H_7NO_3$
Bernsteinsäure	118.09		$C_4H_6O_4$
Glycerol	92.09		$C_3H_8NO_3$
Trifluoressigsäure	114.02		$C_2HF_3O_2$
Ameisensäure	46.03		$CH_2O_2$
Iodacetamid	184.96		$C_2H_4INO$
Kalziumchlorid	75.53		$CaCl_2$
Salzsäure	36.46		$HCl$
SDS	288.4		$C_{12}H_{25}NaO_4S$
Ammoniumhydrogencarbonat	79.06		$NH_4HCO_3$
Ammoniumphosphat	115.03		$NH_4H_2PO_4$
Octanyl-N-Methylglucamid	321.41		$C_{15}H_{31}NO_6$
2-Mercaptoethanol	78.13		$C_2H_6SO$
Cholesterol	386.67		$C_{27}H_{46}O$
Phosphatidylcholin PC(32:0)	734.04		$C_{40}H_{80}NO_8P$
Phosphatidylcholin PC(34:1)	760.76		$C_{42}H_{82}NO_8P$
Kirsch2-Peptid <sup>1</sup>	1260.1	0.740	$C_{62}H_{97}N_{15}O_{11}S$
Substanz P	1347.63	- 0.700	$C_{63}H_{98}N_{18}O_{13}S$
Melittin	2846.46	0.273	$C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$
Val-5-Angiotensin I	1282.45	- 0.230	$C_{61}H_{87}N_{17}O_{14}$
Dynorphin A	2147.48	- 0.500	$C_{99}H_{155}N_{31}O_{23}$
Bombesin	1619.85	- 0.564	$C_{71}H_{112}N_{24}O_{19}S$
Rinderinsulin	5733.49	0.193	$C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$
Gramicidin S	1140.71	*	$C_{60}H_{92}N_{12}O_{10}$
Valinomycin	1111.32	*	$C_{54}H_{90}N_6O_{18}$
Cytochrom C	11748.7	- 0.706	$C_{526}H_{845}N_{143}O_{149}S_6$
Cytochrom C (Pferd)	12360.1		
Myoglobin	17082.6	- 0.381	$C_{774}H_{1221}N_{211}O_{219}S_3$
Myoglobin (Pferd)	16951.5		
Trypsinogen	23980.9		
anionisches Trypsinogen	26294.6	- 0.061	$C_{1163}H_{1783}N_{305}O_{363}S_{14}$
<b>Enzyme</b>			
<b>Trypsin sequencing grade</b> , Cat. No. 11 418 475 001, 4x 25 $\mu$ g (From bovine pancreas), Roche.			
<b>Chymotrypsin sequencing grade</b> , Cat. No. 11 418 467 001, 4x 25 $\mu$ g (From bovine pancreas, salt free lyophilisate, EC 3.4.21.1), Roche.			
<b>N-Glycosidase F, recombinant</b> , PNGase F, Peptide-N <sup>4</sup> -(acetyl- $\beta$ -glucosaminyl) asparagine amidase cloned from <i>Flavobacterium meningosepticum</i> and expressed in <i>E.coli</i> , EC 3.2.218; 3.5.1.52, Cat. No. 11 365 185 001, 100 units, Roche.			
<b>O-Glycosidase</b> , from <i>Diplococcus pneumoniae</i> (O-Glycan-peptide hydrolase), O-Glycopeptide endo-D-galactosyl-N-acetyl- $\alpha$ -galactosamino hydrolase, EC 3.2.1.97, Cat. No. 11 347 101 001, 25 mU (50 $\mu$ l), Roche.			
Chemikalien von SIGMA-Aldrich, Roche, Fluka und Merck.			
* wasserunlösliche cyclische Peptide.			
<sup>1</sup> PANATECs GmbH Tübingen.			

## Epifluoreszenzaufnahmen (2,5-DHB)

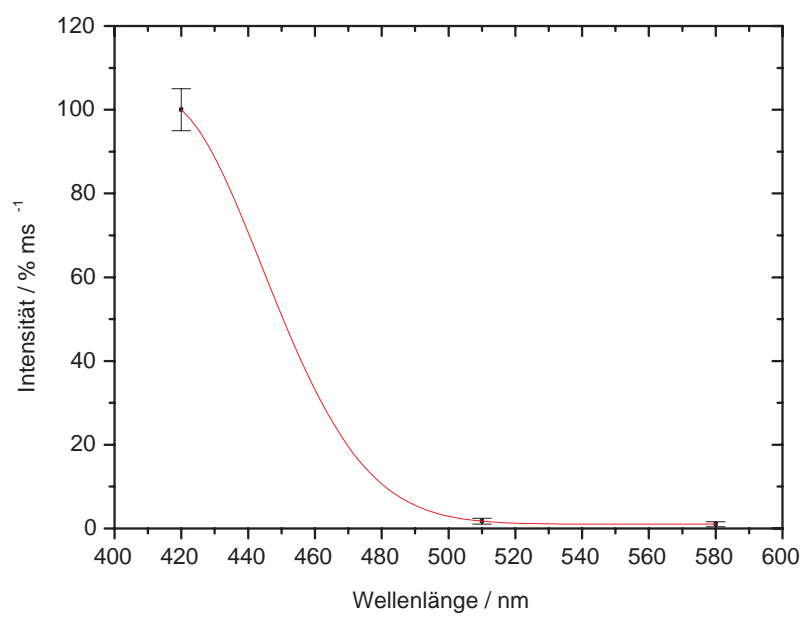
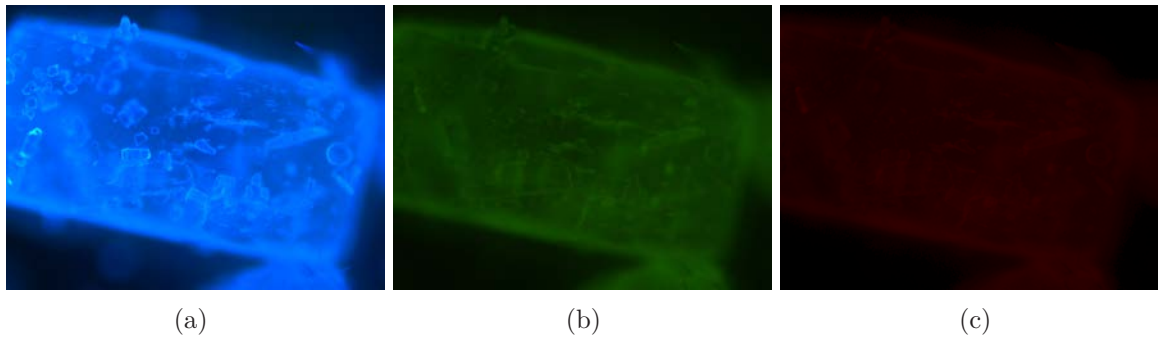
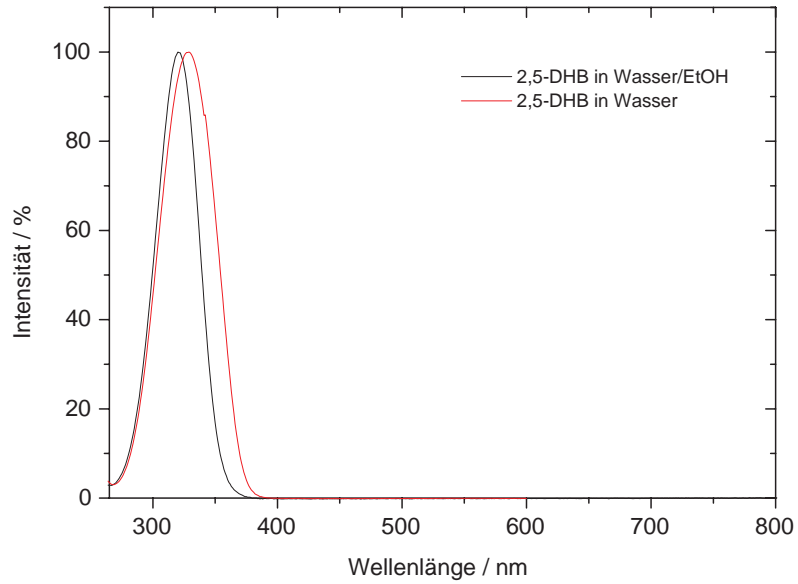
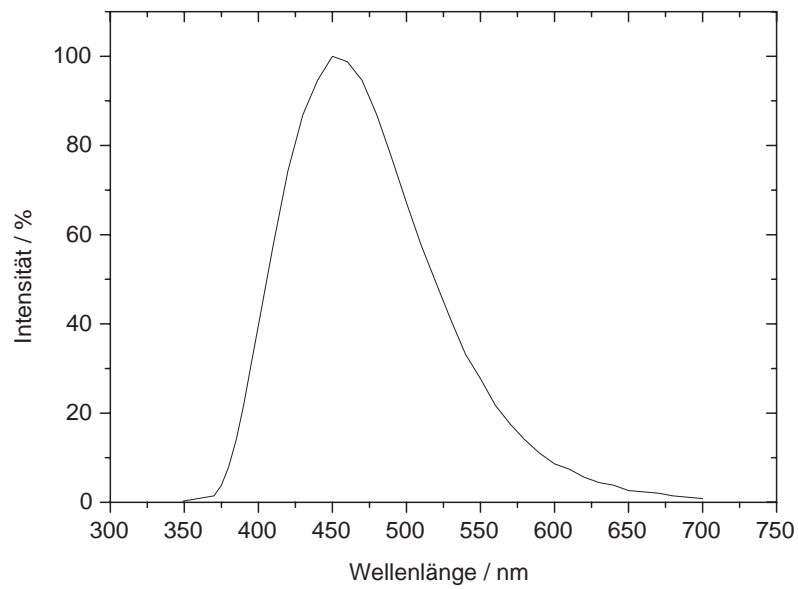


Abbildung 4.13: (a - c) Fluoreszenzaufnahmen (100 W Quecksilberdampfdrucklampe), Belichtungszeiten (a) = 20 ms (Filter 1: U-MWU2), (b) = 500 ms (Filter 5: U-MWIB2) und (c) = 210ms (Filter 6: U-MWIG2). **Bildmaße 177  $\mu\text{m}$  x 133  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 500x).** (Unten) Relative UV-Intensität der 2,5-DHB Kristalle. Integrale Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen die Wellenlänge (Kantenfilter siehe Abb. 4.11).



(a)



(b)

Abbildung 4.14: (a) Absorptionsspektren und (b) Fluoreszenzspektrum von 2,5-DHB bei Anregung mit Licht des Wellenlängebandes  $\lambda = 349 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$  (100 W Quecksilberdampfdrucklampe). Absorptionsspektren: Jasco V-550, Zweistrahlphotometer. Fluoreszenzaufnahme: Spektralphotometer PMQ II Carl Zeiss.

### Filzstiftfarbstoffe und PEG 1500

Im Zusammenhang mit den Ablationsuntersuchungen und mit vergleichenden LDI-Messungen an unterschiedlichen Targetmaterialien werden Filzstifte der Marke EDDING Typ 3000 verwendet. Die ermittelten Massen der Farbstoffe bzw. Gemische werden in den Übersichtsspektren mit den nominalen Massen dargestellt.

Bei dem „schwarzen Farbstoff“ handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein Gemisch - „Polyethylenfarbe“- gelegentlich auch als Polyethylenglycol 200 Decyl-Ether-Phosphat bezeichnet ( $C_{12}H_{29}O_6P$ ,  $M_r = 300.33$  g/mol, CAS-Nr. 52019-36-0) mit Ruß bzw. nicht näher spezifizierten Bestandteilen. Der Anteil an Phosphorsäurediester im schwarzen Farbstoffgemisch beträgt  $< 5$  % w/w. Die Dichte des schwarzen Gemisches liegt zwischen  $\rho = 0.9$  bis  $1.4$  g/cm<sup>3</sup> (EG-Sicherheitsdatenblatt 2007).

Die rote und die blaue Farbstofflösung beinhaltet photochemisch aktive (Farbstoff)Moleküle. Bei dem roten Farbstoff handelt es sich um Rhodamin 6 G ( $C_{28}H_{31}O_3N_2Cl$ ,  $M_r = 479.02$  g/mol) und bei dem blauen Farbstoff um „Basic Blue 7“ ( $C_{33}H_{40}ClN_3$ ,  $M_r = 514.14$  g/mol). Rhodamin 6 G hat eine Dichte von  $\rho = 1.26$  g/cm<sup>3</sup>, Basic Blue 7 von  $\rho \approx 0.94$  g/cm<sup>3</sup> bis  $0.98$  g/cm<sup>3</sup>. In den verwendeten Filzstiftprodukten beträgt der Anteil an rotem und blauem Farbstoff insgesamt  $\leq 5$  % (w/w). Weitere enthaltene Lösungsmittel und Zusätze sind 1-Methoxy-2-propanol  $\leq 80$  %, Phosphorsäurediester  $\leq 5$  % und Ethanol  $\leq 10$  % alle w/w (EG-Sicherheitsdatenblatt 2003: Permanent Marker e-3000). Abbildung 4.15 zeigt Übersichtsspektren der verwendeten Farbstoffe.

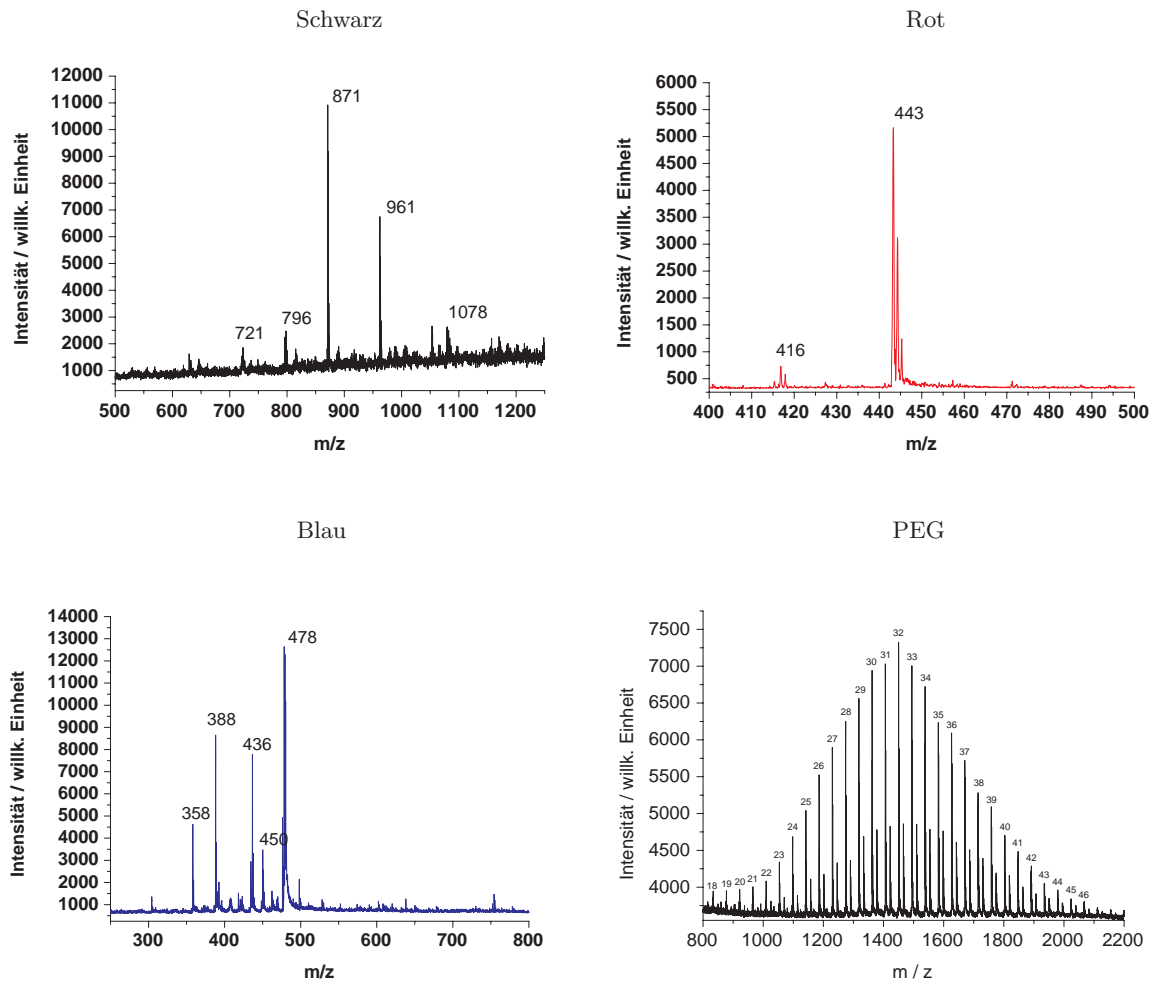


Abbildung 4.15: Übersichtsspektren der verwendeten Farbstofflösungen bzw. der PEG-Verteilung. Die Farbstoffe werden im Rahmen der Ablations-/Desorptionsuntersuchungen bei LDI und MALDI-Bedingungen eingesetzt. Die PEG-Massen dienen einer gezielten Nachkalibrierung von DE-Massenspektren im Reflektormodus am Spektrometer ALADIM II.

Die Farbstoffe Rhodamin 6 G und Basic Blue 7 zeigen in den Spektren die Basispeaks  $[M - Cl + H]^+ = 443.23$  u und  $[M - Cl + H]^+ = 478.32$  u. Das Gemisch des „schwarzen Farbstoffs“ zeigt in den Spektren, in Abhängigkeit der Bestrahlung, die Basispeaks  $m/z$  961 u bzw.  $m/z$  871 u. Hierbei könnte es sich auch einfach um Massen des Bestandteiles 2-(Decoxy)ethanol und Phosphorsäure als  $[C_{36}H_{86}O_{18}P_3K + Na]^+ = 961.46$  u bzw.  $[(C_{12}H_{26}O_2)_4K + Na]^+ = 870.73$  u handeln, was bei Vakuumbedingungen aber eher unwahrscheinlich ist. Das eigentlich für den Farbeindruck - schwarz - verantwortliche Gemisch ist, nach der Qualität der Spektren zu urteilen, aus überwiegend die Laserwellenlänge nicht oder nur sehr gering absorbierenden Bestandteilen zusammengesetzt. Eine nähere Charakterisierung wurde nicht durchgeführt.

In Abbildung 4.15 ist ein Übersichtsspektrum der verwendeten PEG 1500 Mischung dargestellt. Das PEG wurde von Sigma Aldrich bezogen (81210 Fluka, CAS 25322-68-3). Die Peakverteilung der PEG-Massen ist ebenso in Tabelle 4.10 dargestellt. Der Basispeak im PEG-Spektrum entspricht dabei  $[C_{66}H_{134}O_{34} + Na]^+ = 1493.86$  u.

Tabelle 4.10: Theoretische PEG-Massen  $[C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1} + X - e^-]^+$  zur Nachkalibrierung von MALDI-TOF-Spektren im Massenbereich von ca.  $m/z$  800 bis in etwa  $m/z$  2500. Monoisotopische Quasimolekülionen mit  $X = \text{Natrium (sodium)}$  oder  $\text{Kalium (potassium)}$ .

Nr.	$n$	$M$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$
1	18	810.48243	833.47165	849.44559
2	19	854.50864	877.49787	893.47180
3	20	898.53486	921.52408	937.49802
4	21	942.56107	965.55030	981.52423
5	22	986.58729	1009.57651	1025.55045
6	23	1030.61350	1053.60272	1069.57666
7	24	1074.63972	1097.62894	1113.60288
8	25	1118.66593	1141.65515	1157.62909
9	26	1162.69215	1185.68137	1201.65531
10	27	1206.71836	1229.70758	1245.68152
11	28	1250.74458	1273.73380	1289.70774
12	29	1294.77079	1317.76001	1333.73395
13	30	1338.79701	1361.78623	1377.76017
14	31	1382.82322	1405.81244	1421.78638
15	32	1426.84944	1449.83866	1465.81259
16	33	1470.87565	1493.86487	1509.83881
17	34	1514.90187	1537.89109	1553.86502
18	35	1558.92808	1581.91730	1597.89124
19	36	1602.95430	1625.94352	1641.91745
20	37	1646.98051	1669.96973	1685.94367
21	38	1691.00673	1713.99595	1729.96988
22	39	1735.03294	1758.02216	1773.99610
23	40	1779.05915	1802.04838	1818.02231
24	41	1823.08537	1846.07459	1862.04853
25	42	1867.11158	1890.10080	1906.07474
26	43	1911.13780	1934.12702	1950.10096
27	44	1955.16401	1978.15323	1994.12717
28	45	1999.19023	2022.17945	2038.15339
29	46	2043.21644	2066.20566	2082.17960
30	47	2087.24266	2110.23188	2126.20582
31	48	2131.26887	2154.25809	2170.23203
32	49	2175.29509	2198.28431	2214.25825
33	50	2219.32130	2242.31052	2258.28446
34	51	2263.34752	2286.33674	2302.31067
35	52	2307.37373	2330.36295	2346.33689
36	53	2351.39995	2374.38917	2390.36310
37	54	2395.42616	2418.41538	2434.38932
38	55	2439.45238	2462.44160	2478.41553
39	56	2483.47859	2506.46781	2522.44175
40	57	2527.50481	2550.49403	2566.46796



### Industriediamanten

Herstellerproben einer Diamantschleifpaste mit synthetischen Diamanten einer mittleren Größe von ca.  $6\ \mu\text{m}$ , (nichtkommerzielle Musterprobe „POLIMANT“). Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei der Probe um Diamanten des Typs IIa, da keine (gelbe) Farbigkeit festgestellt werden kann. Die farblosen Diamanten des Typs IIa haben keine Verunreinigungen. Sie sind von ca. 250 nm bis in den sichtbaren Bereich hin transparent. Auch wenn die Experimente an den Industriediamanten im Ergebnisteil explizit nicht dargestellt werden, sollen diese hier zumindest erwähnt werden. Die Industriediamanten sind bei MALDI-Absorptionsexperimenten von Peptiden und CLSM-Messungen (als kristalliner Reflexionsstandard) verwendet worden.

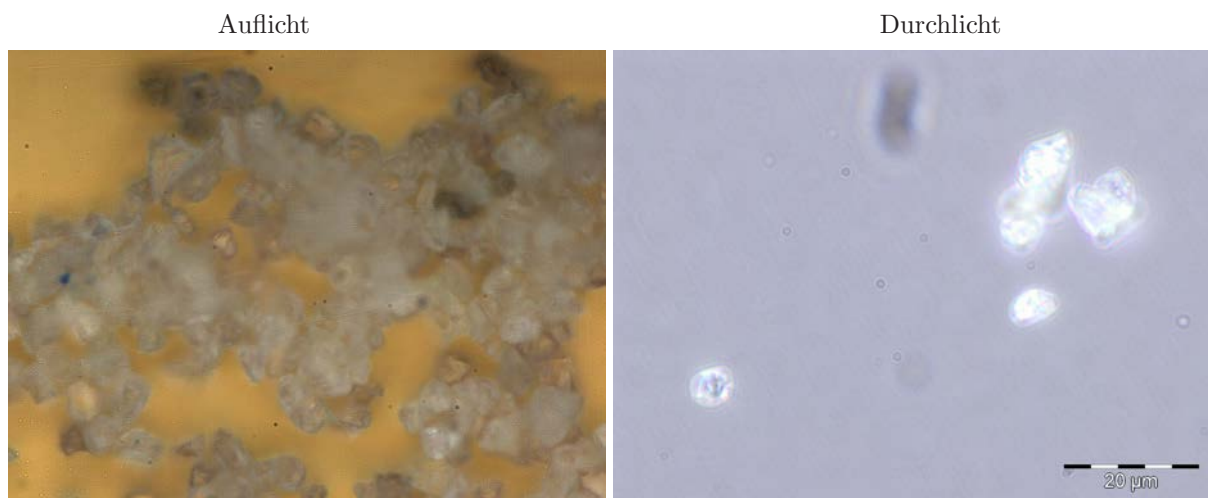


Abbildung 4.16:  $6\ \mu\text{m}$  Industriediamanten (Schleifpaste) nach Reinigung. (Links) Diamanten auf Goldoberfläche. (Rechts) Diamanten auf Glasoberfläche (1000-fache Vergrößerung).

## Lösungsmittel

Als Lösungsmittel wurden für die unterschiedlichen Versuche Ethanol, Methanol, Isopropanol, Aceton und Acetonitril der Firma Merck, durchweg in der Qualität LiChrosolv, verwendet. Weiterhin verwendet wurde zweifach entionisiertes Wasser und HPLC-reine Ameisensäure (FA) sowie HPLC-reine Trifluoressigsäure (TFA), alles von der Firma Fluka bzw. Sigma Aldrich.

## 4.2.2 Proben­träger und Zubehör für die Massenspektrometrie

### Standard-MALDI-Proben­träger

Die Standardproben­träger der LDI/MALDI-Massenspektrometer ähneln Proben­trägern die auch für die REM-Analytik verwendet werden (Abbildung 4.17). Sie bestehen aus einem kreisrunden Teller mit einem Durchmesser von ca. 2 cm und planer Oberfläche (gedrehtes Rundprofil). Der Teller weist an der Unterseite einen Fuß von ca. 5 mm Durchmesser und 8 mm Länge auf. Mit diesem kann der Teller in eine Halterungsvorrichtung (Target) gestellt und mittels einer Madenschraube arretiert werden. Das Tellermaterial ist i.d.R. Aluminium. Die Tellerdicke des unbeschichteten Aluminiumtellers beträgt zum einen ca. 0.6 mm (LAMMA 2000) bzw. ca. 5 mm (ALADIM II). Die Aluminiumteller werden, soweit sie direkt mit festen oder gelösten biologischen Proben in Kontakt kommen, mit einer ca. 8  $\mu\text{m}$  dicken Goldschicht versehen. Neben Aluminium sind bei den Versuchen auch Proben­träger aus Stahl und Messing verwendet worden.

Gedrehte Metallproben­träger

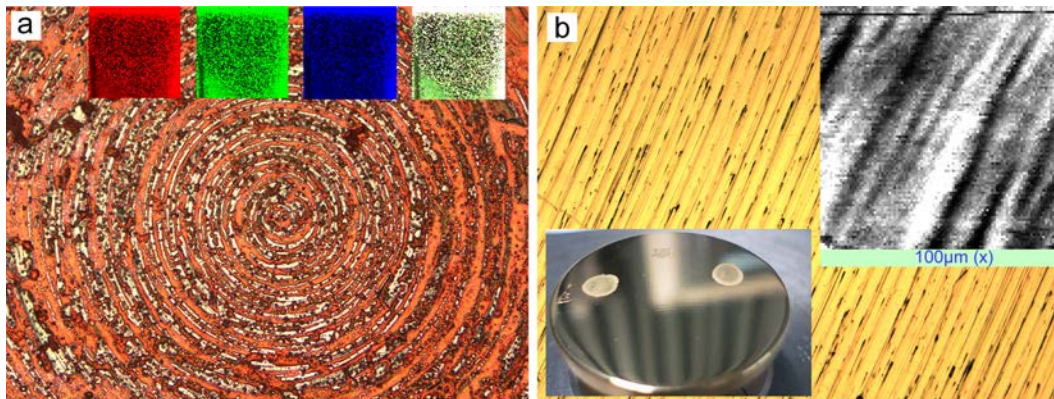


Abbildung 4.17: Aluminiumproben­target mit Goldbeschichtung. (a) Vergrößerung der Tellermitte. Belegung der Oberfläche mit rotem Filzstiftfarbstoff. LDI-Messung eines  $100\ \mu\text{m} \cdot 100\ \mu\text{m}$  großen Ausschnittes und Ionenintensitätsverteilungsbilder von Farbstoffionen (rot), Farbstofffragmentationen (blau) und Natriumionen (grün) sowie ein Überlagerungsbild aller drei Massen. (b) Oberflächendurchmesser des Proben­tellers,  $d \approx 20\ \text{mm}$ . Erkennbar sind zwei Dried-droplet Präparationen mit der Matrix 2,5-DHB. Präparationsvolumen je Spot ca.  $2\ \mu\text{l}$ . Hellfeldauflichtvergrößerung im Hintergrund und 2D-Projektion der CLSM-Vergrößerung eines Ausschnittes des Proben­tellers (3D-CLSM-Bild in Abbildung 6.31).

### Edelstahlblech, poliert

Im Rahmen eines *Round-Robin*-Experimentes sind Proben auf einem polierten Edelmetalltarget vermessen worden. Das Target musste zur Matrixpräparation (Sprüh) und der MS-Vermessung in den Hochvakuum- und Atmosphärendruck-MALDI-Quellen dabei, zunächst auf eine rechteckige Form einer Kantenlänge von ca. 2 cm, zugeschnitten werden.

### Strukturierte Silizium-Wafer

Zur gezielten Präparation einzelner nativer und artifizierlicher biologischer Proben und Untersuchungen mittels CLSM sind strukturierte Silizium-Wafer verwendet worden (nSi). Diese sind an der Oberfläche und am geätzten Boden lichtmikroskopisch vermessen worden (Abbildung 4.18 und 4.19). Ein verwendeter Silizium-Wafer besteht dabei i.d.R. aus mehreren Schichten. Ein häufiges Herstellungsverfahren der Strukturen ist die sogenannte Grabenisolation (*STI, shallow trench isolation/box isolation technique*). Auf ein mono- oder polykristallines Silizium-Substrat wird zunächst durch thermische Oxidation eine ca. 40 nm dicke Schicht von (porösem)  $SiO_2$  erzeugt (pSi). Dieser Schicht schliesst sich eine weitere, ca. 100 nm dicke Schicht von  $Si_3N_4$  an. Zuletzt schliesst eine Schicht aus Photolack die Oberfläche ab. Diese wird durch photolithografische Verfahren, entweder eine Positiv- oder Negativmaske der Strukturen darstellen. An den Bereichen mit dem strukturiert (i.d.R.) abgetragenen Lack, werden dann in weiteren Schritten die tieferliegenden Schichten und i.d.R. auch ein Teil des Siliziumsubstrates chemisch entfernt (anisotropes Ätzen). Die beiden Schichten werden unter mechanischem Polieren nasschemisch entfernt, die Nitridschicht mittels  $H_3PO_4$  (Phosphorsäure) und die  $SiO_2$ -Schicht mit  $HF$  (Flusssäure) [285]. Die behandelte Waferoberfläche zeigt sich im lichtmikroskopischen Bild hellgrau. Der geätzte Boden der Hohlraumstrukturen ist überwiegend noch heller bzw. zeigt teilweise Dispersion des polychromatischen Spektrums. Letzteres deutet auf eine Verunreinigung mit unterschiedlicher Schichtdicke der Strukturen hin. Alle Hohlraumstrukturen besitzen eine Tiefe von  $h > 10 \mu m$ , weshalb angenommen werden kann, daß sie in den Bereich des monokristallinen Siliziumsubstrates des Wafers reichen. Die Waferoberfläche erscheint glatt und sehr eben, was auf eine Kombination aus chemischem Ätzen und mechanischer Bearbeitung hindeutet. Es ist deshalb sehr unwahrscheinlich, daß die Oberfläche noch Schichten von porösem  $SiO_2$  oder  $Si_3N_4$  enthält. Es wird deshalb angenommen, daß es sich bei der Oberfläche ebenfalls, wie bei dem Boden der geätzten Strukturen, um kristallines Siliziumsubstrat handelt. Kristallines Silizium besitzt bei der Wellenlänge  $\lambda = 337 \text{ nm}$  einen Absorptionskoeffizienten von  $\alpha \approx 10^6 \text{ cm}^{-1}$ . In einem Temperaturintervall von 300 K bis 972 K ist der Absorptionskoeffizient temperaturunabhängig. Der Absorptionskoeffizient von pSi liegt bei der Wellenlänge  $\lambda = 337 \text{ nm}$  in etwa bei  $\alpha \approx 10^5 \text{ cm}^{-1}$  [285] [286]. Bei den zur Verfügung gestellten Wafern handelt es sich um Ausschussware. Sie sind vom Hersteller nicht näher spezifiziert.

Strukturierte Si-Wafer Oberflächen

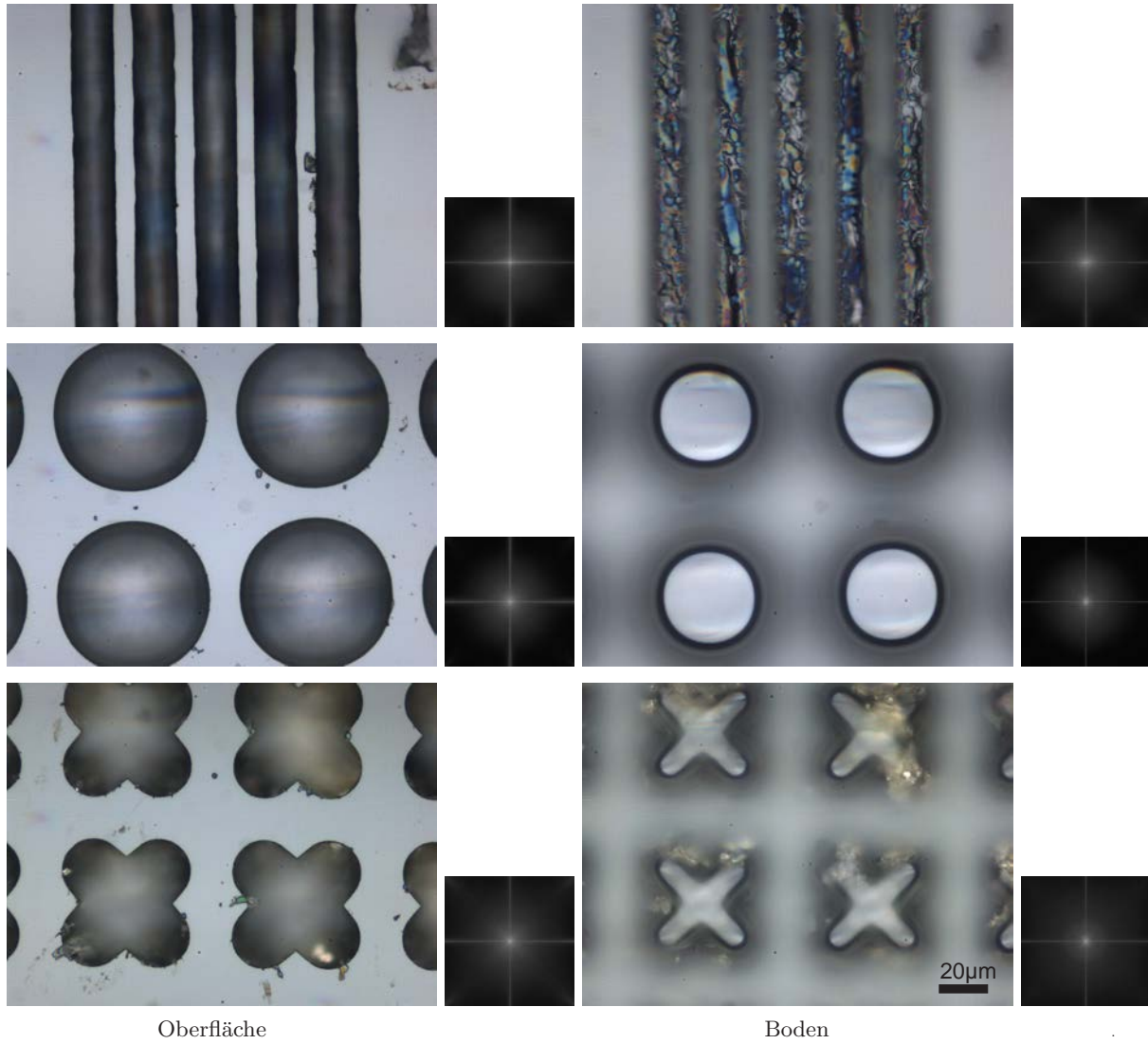


Abbildung 4.18: Obere Reihe: Linienstruktur an Waferoberfläche ( $d \approx 20 \mu m \pm 1 \mu m$ ). Rechts daneben: geätzter Linienboden ( $d \approx 22 \mu m \pm 1 \mu m$ ). Stegbreite ca.  $8 \mu m \pm 1 \mu m$ . Höhendifferenz ca.  $12.0 \mu m \pm 1.5 \mu m$ . Mittlere Reihe: Geätzte Kreisstruktur unmittelbar an der Waferoberfläche ( $d \approx 63 \mu m \pm 1 \mu m$ ) und rechts daneben, Boden der Struktur ( $d \approx 37 \mu m \pm 1 \mu m$ ). Höhendifferenz ca.  $18 \mu m \pm 1.5 \mu m$ . Untere Reihe: Geätzte Kreuzstruktur an der Waferoberfläche und am Boden. Höhendifferenz ca.  $15.0 \mu m \pm 1.5 \mu m$ . **Bildmaße (einheitlich):  $178 \mu m \times 133 \mu m$  (Vergrößerung: 500x).**

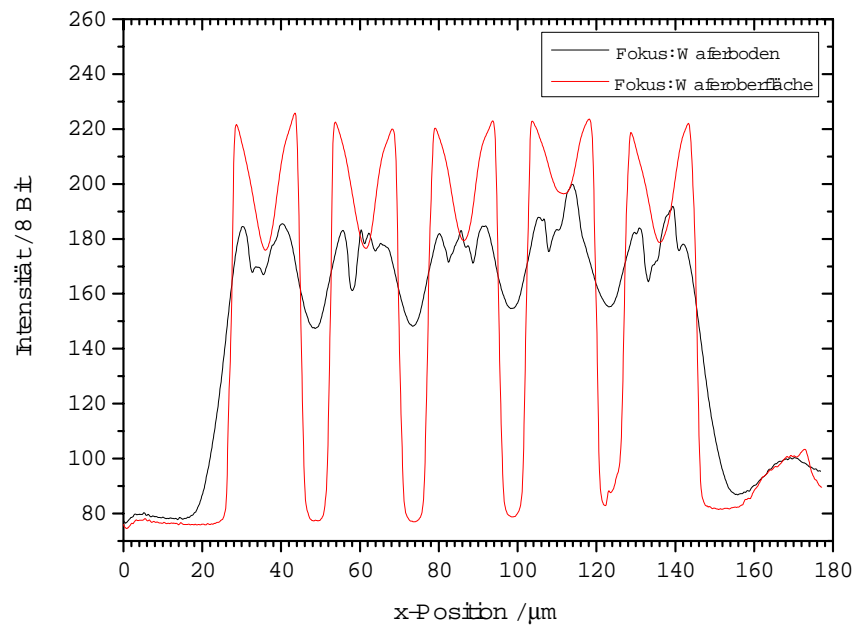


Abbildung 4.19: Dargestellt sind die invertierten Graustufenintensitäten (8 Bit) der Linienstrukturen aus Abbildung 4.18. Es handelt sich zum einen, um die fokussierten Böden der Hohlraumstrukturen (schwarz) und zum anderen um die fokussierte Waferoberfläche (Stege, rot).

## Standardglasobjektträger für die Durchlichtmikroskopie

Verwendet wurden BK07 Glasobjektträger der Abmessung 76 mm x 26 mm von unterschiedlichen Herstellern.

### Glasobjektträger

Zur Präparation einiger nativer biologischer Proben können wahlweise Standardglasobjektträger (BK07) zur Durchlichtmikroskopie oder auch mit Indiumzinnoxid (*indium tin oxide*) beschichtete Glasobjektträger (BK07) verwendet werden. Diese sind in der gängigen Größe, Abmessung: 76 mm x 26 mm erhältlich. Die einseitige (leitfähige) Beschichtung besteht aus ca. 90 %  $In_2O_3$  (Indium(III)oxid) und ca. 10 %  $SnO_2$  (Zinn(IV)oxid) und kann unterschiedlich dick sein (ca. 60 nm bis 120 nm). Die Schichten weisen in etwa einen ohmschen Widerstand von  $R \approx 7\Omega \pm 2\Omega$  auf. Verwendet wurden in dieser Arbeit Produkte unterschiedlicher Hersteller.

### Leitfähigkeitspads

Proben die z.B. auf leitfähigen Glasobjektträgern aufliegen, werden mittels Leitfähigkeitspads G3347 der Firma Plano GmbH Wetzlar auf die metallischen Targets fixiert. Die Pads sind beidseitig klebend und bestehen aus einer Trägerfolie von ca. 0.2 mm dickem Polycarbonat. Die Folie wird durch feines Graphitpulver leitfähig. Die Dicke der leitfähigen Klebeschicht beträgt ca. 30  $\mu m$  (Herstellerangaben).

### Leitsilber

Die Oberfläche leitfähig beschichteter Glasobjektträger kann mittels Leitsilber direkt oder über eine Verbindung zu den Klebepads mit dem metallischen Target verbunden werden. Das verwendete Leitsilber entspricht der Spezifikation G302 der Firma Plano GmbH Wetzlar (Silberflocken  $\approx 7\mu m$  in Methylisobutylketon und thermoplastischem Harz). Die Trockenzeit beträgt laut Hersteller ca. 20 min. (bei Raumtemperatur).

### Mikrokanalplatte

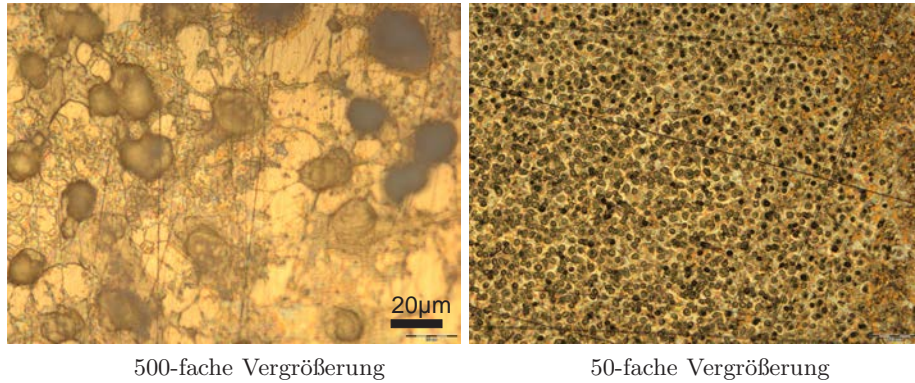
Teilstücke einer einzelnen Mikrokanalplatte ( $\varnothing = 45$  mm) sind als Targetoberfläche für LDI-Messungen verwendet worden, um den Einfluss freigesetzter Elektronen bei der Neutralisation desorbierter Kationen zu untersuchen. Die Ergebnisse sind explizit nicht im Ergebnisteil dargestellt. Während dieser Versuche ist die Unterseite der MCP-Bruchstücke mit einem Leitfähigkeitspad an einem metallischen Probenträger aufgebracht. An der MCP-Unterseite liegt somit das Potential der Probenelektrode an. Die mit der Probe beladene (leitfähige) Oberseite der Mikrokanalplatte liegt etwa in 1.5 mm Abstand zur Probenträgerfläche und weist dann ein entsprechend niedrigeres Potential auf.

## 4.2.3 Native biologische Proben

### A498-Zellen

Humane Nierenkarzinomzellen (*human kidney carcinoma*, Abbildung 4.20). Präparatherkunft: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ GmbH 38124 Braunschweig. Diese Proben wurden zu Vergleichsmessungen herangezogen.





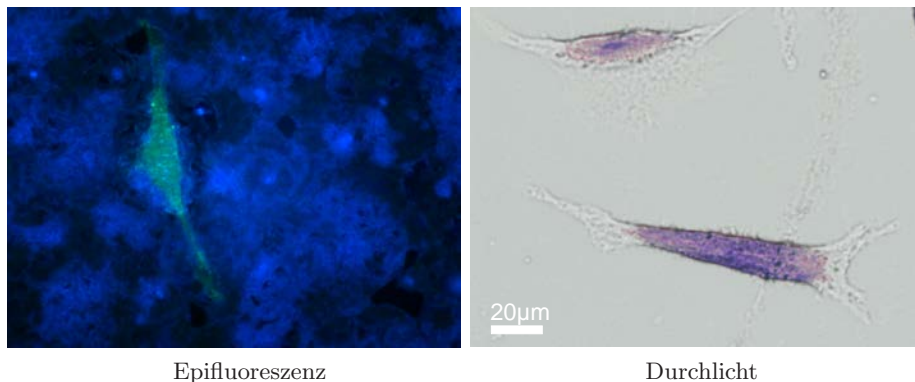
500-fache Vergrößerung

50-fache Vergrößerung

Abbildung 4.20: Mit Aceton fixierte A498-Zellen auf einer mit Gold beschichteten Targetoberfläche, **Bildmaße Bild 1: 178  $\mu\text{m}$  x 133  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 500x). Bildmaße Bild 2: 1775  $\mu\text{m}$  x 1331  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 50x).**

### HELA-Zellen

Humane Gebärmutterhalskrebszellen (*cervix carcinoma*, Abbildung 4.21). Präparatherkunft: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ GmbH 38124 Braunschweig. Diese Proben wurden zu mikroskopischen Versuchen und Präparationszwecken (MALDI-Testpräparat) verwendet.



Epifluoreszenz

Durchlicht

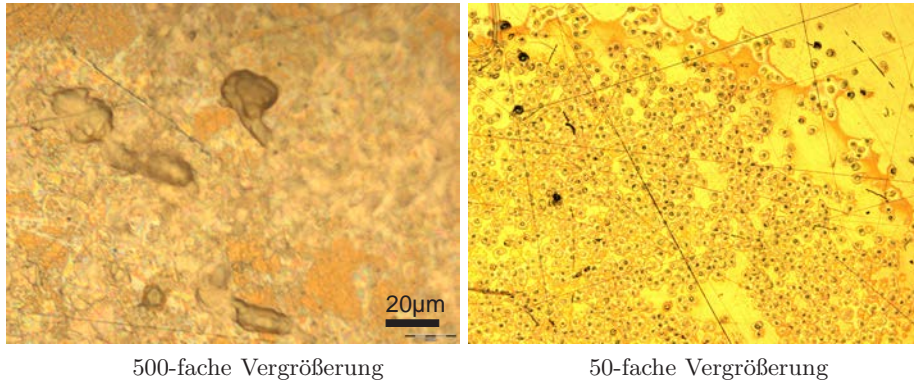
Abbildung 4.21: Bild 1: Fluoreszenzaufnahme (F1) HELa-Zellen nach Matrixpräparation (einfache Spraypräparation mit 2,5-DHB), **Bildmaße (einheitlich): 178  $\mu\text{m}$  x 133  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 500x).** Grüne Eigenfluoreszenz der Zelle, blaue Matrixfluoreszenz. Bild 2: Färbepreparation, Farbstoff Coomassie blue.

### T2-Zellen

Humane T2 Zellen (*human-human somatic cell hybrid*, Abbildung 4.22). Präparatherkunft: Universität/Klinikum Heidelberg. Diese Proben wurden zu Vergleichsmessungen verwendet.

### Bäckerhefe

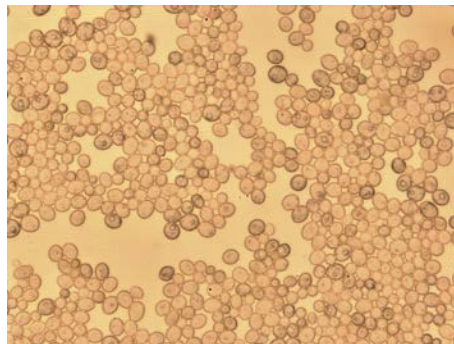
*Saccharomyces cerevisiae*, Nahrungsmittel in 42 g-Packung (Feuchtgewicht). Präparatherkunft: Verschiedene Anbieter aus dem Einzelhandel. Diese Proben wurden zu Vergleichsmessungen und MSI-Messungen verwendet (Abbildung 4.23).



500-fache Vergrößerung

50-fache Vergrößerung

Abbildung 4.22: Bild 1 Hellfeldaufnahme einzelner T2-Zellen. **Bildmaße: 178  $\mu\text{m}$  x 133  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 500x).**  
 Bild 2 T2 Zellen nach Fixierung mit Aceton. **Bildmaße: 1775  $\mu\text{m}$  x 1331  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 50x).**



500-fache Vergrößerung

Abbildung 4.23: Durchlichtaufnahme: Hefezellen in Puffersuspension. **Bildmaße: 178  $\mu\text{m}$  x 133  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 500x).**

### Nierengewebeproben der Maus

Zur Anwendung kamen Schnittpräparate einer Mäuseniere (Medianschnitte, *Mus musculus*, Abbildung 4.24). Präparatherkunft: Universität/Klinikum Heidelberg. Diese Proben sind zu Präparationstestzwecken und MSI-Messungen verwendet worden.

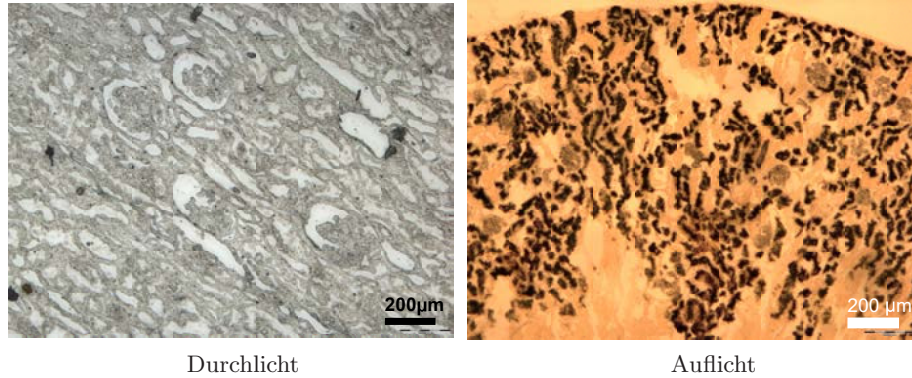
### Drüsengewebe

Schnittpräparat des *Proboscis-like-organ* aus dem Kopffüßler (Cephalopod) *Nautilus pompilius* L. (Abbildung 4.25). Präparatherkunft: AG Prof. emerit. Dr. R. Schipp, PD Dr. B. Westermann, Universität Giessen. Diese Proben sind zu einer komplementären MS-Analytik, bestehend aus ESI-HPLC, Nano-ESI-HPLC und MSI (Mass Spectrometry Imaging) Messungen verwendet worden.

### Quergestreifte Muskulatur

Schnittpräparate der Zungen- und der Oberschenkelmuskulatur einer Maus (*Mus musculus*). Zuvor wurde die Maus mit dem Parasit *Trichinella spiralis* (ein Fadenwurm) infiziert (Abbildung 4.26). Präparatherkunft: AG Prof. Dr. H. Zahner (Veterinärmedizin, Universität Giessen). Diese Proben sind zu Vergleichszwecken verwendet worden.

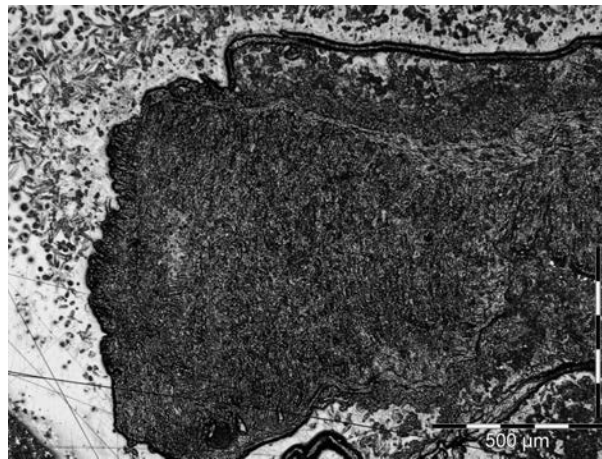




Durchlicht

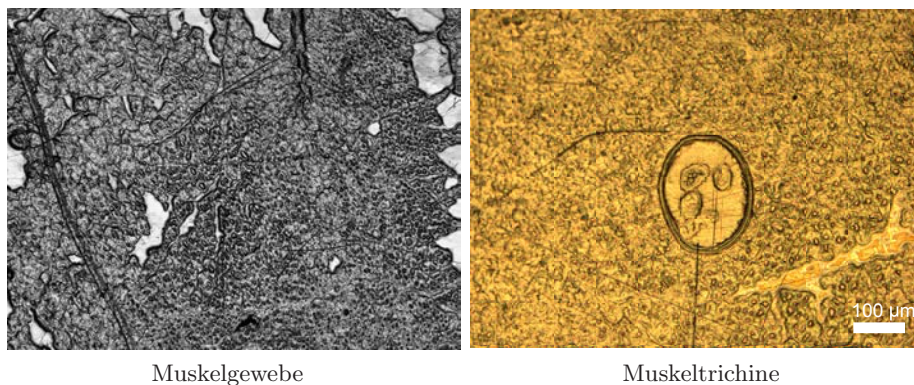
Auflicht

Abbildung 4.24: Bild 1: Nierengewebeschnitt einer Maus im Durchlicht. **Bildmaße: 888  $\mu\text{m}$  x 666  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 100x)**. Bild 2: Nierengewebeschnitt auf vergoldeter Targetoberfläche im Auflicht. Deutlich zu erkennen sind die Malpighischen Körperchen (rechts: schwarz). **Bildmaße: 1775  $\mu\text{m}$  x 1331  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 50x)**.



Auflicht

Abbildung 4.25: Präparation des *Proboscis-like-organ* mittels Rasierklinge (Innenseite des Organs).



Muskelgewebe

Muskeltrichine

Abbildung 4.26: *Trichinella spiralis* Kapseln in quergestreifter Mausmuskulatur (Zungengrund). Links: Muskelgewebe. Rechts: Muskelgewebe mit *Trichinella*-Kapsel. Linkes Bild **Bildmaße: 1775  $\mu\text{m}$  x 1331  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 50x)**. Rechtes Bild **Bildmaße: 888  $\mu\text{m}$  x 666  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 100x)**.

### 4.3 Messmethoden

Die massenspektrometrischen Messungen zu dieser Arbeit folgen einem allgemeinen Ablaufschema. Dieses geht aus Abbildung 4.29 hervor. Ab Punkt 5 im dargestellten chronologischen Ablauf findet hier eine Unterscheidung zwischen „konventionellen“ (Punkt 6) und bildgebenden Messungen (Punkt 8) statt. Bildgebende Messungen beinhalten mindestens die Speicherung der einzelnen Massenpeaks (*centroid bin, value*) oder ganzer Spektren, zusammen mit den lateralen Ortskoordinaten jeder Messposition (Intensität, x-Koordinate, y-Koordinate). Aus der Intensität eines Peakzentroides an einer Position im Messraster wird dann zunächst ein Graustufenpixel erzeugt. Es erfolgt dabei eine Normierung auf das intensivste Signal einer Rasterung. In Abbildung 4.27 werden die unterschiedlichen Möglichkeiten der Lagekombinationen von Laserprofilquerschnitten und Schwerpunktsverteilungen von Analyten in Bezug auf das sich aufbauende Messraster gezeigt. Eine vereinfachende Zusammenfassung der Laserprofilenergiebereiche in „Zonen“ äquivalenter Intensitätsbereiche, ermöglicht eine einfachere Bewertung von ggf. ausgebildeten „Überlappungsfiguren“.

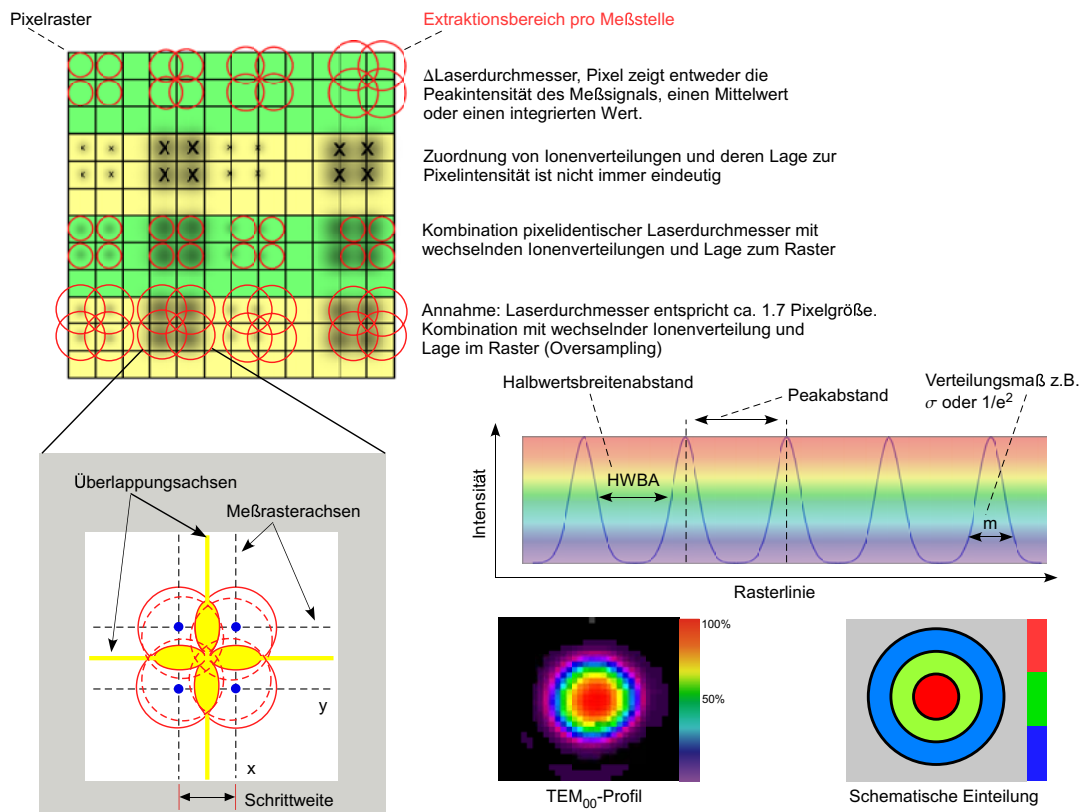


Abbildung 4.27: Rasternde bildgebende Lasermassenspektrometrie. Pixelraster, Laserspotgröße, zweidimensionale Laserintensitätsverteilung auf der Probenoberfläche, Messraster und mögliche Überlappungsachsen. Die Überlappungsachsen zeichnen sich durch einen Beitrag an Signalintensität in benachbarten Pixel aus. Rechts unten: Einteilung des realen  $TEM_{00}$ -Profils (LAMMA 2000, Nd:YLF-Laser) in zusammengefasste Intensitätsbereiche.

### 4.3.1 Probenorientierung und optische Kontrolle

Die beiden in dieser Arbeit hauptsächlich eingesetzten Spektrometer verfügen über eine Vergrößerungsoptik, die eine Beobachtung der Probe auch während einer Messung ermöglicht, und die vorab zur Einstellung einer bestimmten Probenposition auch benötigt wird. Hierzu wird ein Abbildungsstrahlengang aufgebaut, der teilweise parallel zum Strahlengang des Desorptions-/Ionisierungslasers verläuft und dabei überwiegend dieselbe Optik verwendet. Am Spektrometer LAMMA 2000 entspricht die Gegenstandsebene der Beobachtungsoptik nicht der Fokusebene des Desorptionslasers (bei den Wellenlängen 337 nm und 349 nm). Am Spektrometer ALADIM II kann dagegen direkt die Fokusebene des Desorptions-/Ionisierungslasers (337 nm) abgebildet werden. Es ist damit möglich, vor dem Beginn der eigentlichen Messung, die Probenposition vollständig zu bestimmen und diese während einer Messung kontrolliert zu verändern. Eine bestimmte Position kann dabei beliebig oft und aus unterschiedlichen Richtungen im Raum angefahren werden. Die Positionierung weist am Spektrometer ALADIM II eine Mikrometer- und am Spektrometer LAMMA 2000 eine Submikrometergenauigkeit auf. Es handelt sich bei beiden Beleuchtungseinrichtungen um eine Hellfeldauflicht-Anordnung. Außerhalb der Ionenquellen wird zur Beobachtung einer Probe dann das aufrechte Labormikroskop BX-41 von Olympus eingesetzt. Die Betrachtungen vor, während und nach einer MS-Messung ermöglichen somit eine nahezu lückenlose optische Kontrolle jeder Probe im Verlauf eines MS-Experimentes. Optional können die Aufnahmen am Olympusmikroskop und auch am Spektrometer LAMMA 2000 digitalisiert und gespeichert werden.

### 4.3.2 Ablationsbestimmung

Die Ablationsmasse, die an einer einzelnen Probenstelle abgetragen wird, musste indirekt mit einer Labormikrowaage (Mettler Toledo AX) ermittelt werden. Aufgrund der erreichbaren Richtigkeit (*accuracy of the mean*) während der Messungen, sind nur Schätzungen über die mit einem Laserpuls abgetragene Masse an einer Probenposition möglich. Zunächst wird dabei der gesamte Präparationsauftrag eines Targets ermittelt, wobei darauf geachtet werden muss, daß die Einwaage der Probe insgesamt mindestens dem doppelten Betrag der geringsten noch wägbaren Massedifferenz der Feinwaage entspricht. Die kleinste reproduzierbar wägbare Masse beträgt demnach in etwa  $6 \mu\text{g} \pm 2 \mu\text{g}$ . Der Messbereich erstreckt sich damit von  $6 \mu\text{g}$  bis max. 22 g, wobei die Extremwerte möglichst zu vermeiden sind. Im Messbereich der Waage wird nach einer Kalibrierung eine Linearität von  $\pm 6 \mu\text{g}$  angegeben. Jede Messung der insgesamt an einer Präparation erfolgten Ablation wird (mindestens) drei mal wiederholt bzw. solange, bis eine relative Standardabweichung  $\leq 5 \%$  erreicht werden kann. Die Ablationsmessungen laufen dabei nach folgendem Schema ab:

1. Die zu vermessende Probe wird auf einem Aluminiumtarget mit planer Ebene präpariert.
2. Die Homogenität der Präparation wird durch eine dreidimensionale lichtmikroskopische Vermessung bei einer 500-fachen Vergrößerung an mindestens 10 Stellen über dem Messraster bestimmt.
3. Die aufgebrachte Matrixmasse wird aus Differenzwägungen ermittelt.
4. Die MS-Vermessung erfolgt im rasternden Verfahren. Es werden dabei so viele Messungen durchgeführt, wie zu einer absoluten Ablation über dem zweifachen Wert der niedrigsten detektierbaren Masse an der Feinwaage erforderlich sind. Ist die relative Standardabweichung dreier Wägungen dabei größer als 5 %, wird erneut Gerastert.
5. Die Masse einer Einzelpulsablation oder einer Ablation nach mehreren Laserpulsen wird nachträglich aus der Anzahl der insgesamt abgegebenen Laserpulse und der Gesamtmassedifferenz errechnet.

6. Zur Kontrolle wird das ermittelte Ergebnis an mehreren Einzelpulsablationen unter der Annahme einer durchschnittlichen Materialdichte mit Hilfe der optischen Vermessung des Ablationsvolumens (*burn pattern*) genähert. Dieses Ergebnis wird mit der Ablationsmessung und Skalierung verglichen.

Diese Art der Massenbestimmung kann die während einer Desorption mögliche Debrisablagerung nicht berücksichtigen. Der Ablationsbetrag wird deshalb wahrscheinlich systematisch etwas zu klein ermittelt. In Abbildung 4.28 wird übersichtsartig die mikroskopische Brennfleckanalyse dargestellt.

Biologisches Weichgewebe der meisten Organe (Wirbeltiere) hat eine mittlere Dichte von  $\rho \leq 1.1 \text{ g/cm}^3$  [71]. Das Volumen der verwendeten Gewebepreparate beträgt  $\leq 0.004 \text{ cm}^3$ . Für alle Präparate gilt dabei dann die Annahme einer Masse  $\leq 4.4 \text{ mg}$ .

#### Mikroskopische Brennfleckanalyse

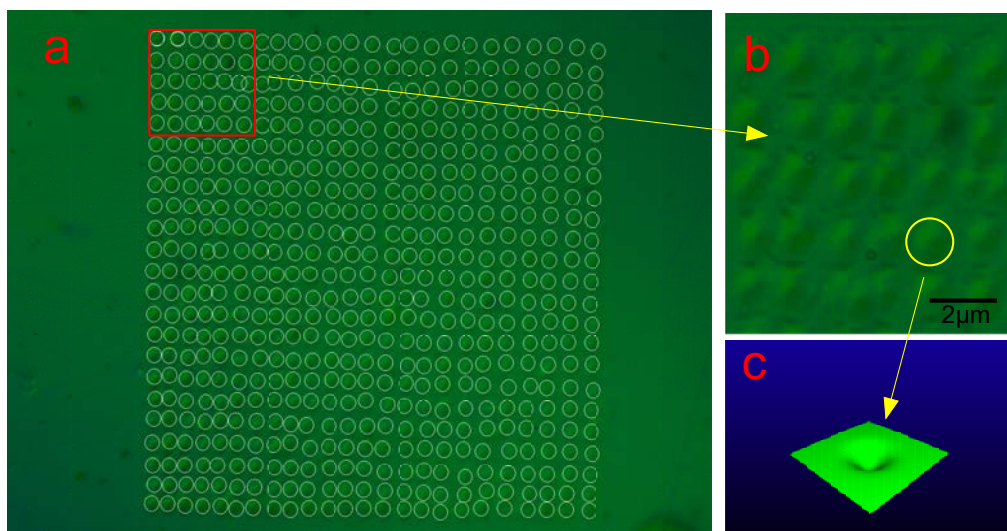


Abbildung 4.28: Analyse der Brennflecke (*burn pattern*) an Ablationsreihen in dünnen Farbstoffschichten. Jeder Ablationskrater kann separat ausgewählt (a) und danach in seinem Umfang vermessen werden. Im Anschluss wird eine Kratertiefe bestimmt, mit der dann, basierend auf der Annahme eines gaussförmigen Tiefenprofils, ein Ablationsvolumen ermittelt werden kann (b,c).

### 4.3.3 Desorptionsbestimmung

Die desorbierte Ionenmenge korreliert nach bisherigen Erkenntnissen positiv (mit Einschränkungen) mit der verwendeten Bestrahlung und sehr wahrscheinlich auch mit dem Ablationsvolumen [1] [8] [71]. Als direktes Maß wird hier, wie zuvor beschrieben, die Signalintensität als Integral über die erhaltenen Peakflächen eines Isotopenmultiplets herangezogen. Die Gesamtdesorption wird über den Totalionenstrom (TIC) im betrachteten Massenintervall ermittelt. Hierbei handelt es sich um die Summe aller Peakintegrale unter Berücksichtigung der Basislinie des chemischen Rauschens.

### 4.3.4 Laseroptische Infokusmessungen

Während Infokusmessungen befindet sich die Probenebene im Bereich des konfokalen Parameters  $b$  der fokussierten Laserstrahlung. Auf diesen Bereich bezieht sich die ermittelte Schwellbestrahlung zur Darstellung einer ausreichenden Ionenanzahl entsprechender Analyte und Matrizes an den Spektrometern



LAMMA 2000 und ALADIM II. Der Laserstrahl kann entweder parallel zur optischen Achse der elektrostatischen Aperturlinse justiert werden („zentrisch“, Zenith-Winkel =  $0^\circ$ ) oder aber einen Zenith-Winkel  $20^\circ > \Theta > 0^\circ$  aufweisen. Bei einigen Experimenten werden auch Schrittweiten eingestellt, die kleiner als die Halbwertsbreite oder der doppelte *Peak-to-Valley*-Abstand sind (Oversampling).

### 4.3.5 Laseroptische Defokussmessungen

Defokussmessungen beziehen sich auf eine Lage der Probenebene ausserhalb des konfokalen Parameters  $b$ . Die Probe kann dabei entweder vor der schmalsten Stelle der Strahltaile (*waist*) im Bereich  $a$  oder dahinter im Bereich  $c$  liegen (siehe Abbildung 4.30). Die Gesamtintensität und ihre lokale Verteilung im Strahlprofil kann, in Abhängigkeit des Zenith-Winkels der Strahlung, in den Bereichen  $a$  und  $b$  dabei deutlich voneinander abweichen. Dies ermöglicht z.B. eine „Differenzmessung“ an einer Probe. Die Differenz ergibt sich einerseits aus dem räumlich veränderten Intensitätsprofil und andererseits aus der unterschiedlichen Länge der ersten Beschleunigungsstrecke. Die Probe wird dazu jeweils einmal in jedem Bereich ( $a$ ,  $c$ ) vermessen. Gegenüber den laseroptischen Infokussmessungen ( $b$ ) verändert sich bei den Defokussmessungen ( $a$ ,  $c$ ) dabei auch die elektrische Feldstärke im primären Extraktionsbereich der Quelle, was Einfluss auf die Plumedynamik haben kann.

### 4.3.6 Beschreibung der MS-Methoden

Wie in den vorhergehenden Abschnitten bereits erwähnt, handelt es sich im Besonderen bei nativen biologischen Proben, um ein Gemisch chemisch unterschiedlicher Substanzklassen. Des weiteren kommt ein bedeutender Anteil an anorganischen Salzen vor. Die Ermittlung von Eckdaten, die zu einer qualitativ guten MALDI-Messung notwendig sind, ist deshalb aufwendiger als bei konventionellen Proben. Die an konventionellen Proben für aufgereinigte und i.d.R. ausreichend konzentrierte Analyte ermittelten Schwellbestrahlungen, können deshalb oft nur als Ansatzpunkt einer notwendigen Optimierung dienen.

In dieser Arbeit ist ein Vorgehen für das Vermessen von *Peptid-* und *Phospholipidanalyten* im positiven Ionenmodus an Flugzeitspektrometern erarbeitet worden, das im Wesentlichen einen Vergleich der Messergebnisse von zwei Methoden anwendet. Die Optimierungsstrategie basiert dabei auf der Berücksichtigung der tatsächlichen Verteilung des/der Analyte in einer Probe und den messbaren Einfluss der chemischen Umgebung auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Entscheidend ist hierbei, daß die chemische Umgebung unter möglichst genau den Bedingungen berücksichtigt wird, die auch der Messung(en) an nativen biologischen Proben entspricht. Der Ablauf wird nachstehend kurz beschrieben.

Vorausgesetzt wird dabei immer, daß bekannt ist ob Analyte in einer Probe vorhanden sind oder nicht.

#### Methoden 1

Die Probe wird zunächst, anhand von laseroptischen Infokussmessungen, mit Einzelpulsen an wechselnden Probenorten untersucht. Es wird dabei mit der Matrix 2,5-DHB eine Laserenergie gewählt, die zusammen mit der optischen Querschnittsfläche des Laserstrahles auf der Probe der Schwellbestrahlung des zu vermessenden Analyten entspricht. Es ist dabei darauf zu achten, daß nicht mit einer wesentlich höheren Bestrahlung, als der 1.5-fachen Schwellbestrahlung des Analyten gemessen wird (Pulsschwankungen mit einbezogen). Liegt über die Schwellbestrahlung einer Substanz keine Erkenntnis vor, und kann diese auch nicht in entsprechenden Vorexperimenten ermittelt werden, sollte mit einer Bestrahlungsstärke gemessen

werden, die nicht größer als die doppelte Schwellbestrahlung der Matrix 2,5-DHB ist. Die Einzelpulsspektren werden, in homogenen Präparationen, von mindestens fünf verschiedenen Positionen erzeugt. Kann auf diese Art ein Signal des Analyten in den Einzelpulsspektren erhalten werden, das in etwa einem  $\text{SNR} \approx 2$  entspricht, erfolgt im Anschluss der Einzelpulsmessungen an wechselnden Positionen eine Mehrpulsmessung in einem Bereich von dem solche Signale erhalten werden konnten. Soweit es möglich ist, wird dabei bis zum vollständigen Abtrag der Probe an dieser Stelle ein Summenspektrum aufgenommen. Die Anzahl der Pulse hängt dabei von der verwendeten Matrix (Konzentration und Menge), der Probenbeschaffenheit und auch von der Präparationsart ab. Es wird im weiteren, anhand der Kumulation von Einzelpulssignalen aus den unabhängigen Einzelpulsmessungen, ein Vergleich zwischen den kumulierten Signalintensitäten und der erzeugten Summenintensität aus den Mehrfachmessungen durchgeführt. Handelt es sich bei der Probe um eine sehr heterogene Präparation, wie sie z.B. bei einer Dried droplet-Probe mit der Matrix 2,5-DHB vorliegt, müssen mindestens 10 Einzelpuls- und Mehrpulsmessungen von morphologisch oder spektral deutlich unterscheidbaren Probenbereichen erstellt werden. Bei Proben, bei denen ca. 200 – 300 Pulse an einer (gleichbleibenden) Messposition zu keinem vollständigen Abtrag des Probenmaterials führen kann die Summenmessung dann abgebrochen werden, wenn wiederholt kein Analytsignal (im Einzelspektrum) mehr erhalten werden kann. Bei morphologisch einheitlichen Präparationen müssen räumlich deutlich voneinander getrennte Bereiche vermessen werden.

Führt obiges Vorgehen zu keinen erkennbaren Analytsignalen in den Spektren, dann sollte ein Vorgehen nach Methode 2 durchgeführt werden.

### **Methode 2**

Abweichend zu Methode 1 wird bei Methode 2 die Probenebene in eine z-axiale Position gestellt, die im Bereich  $a$  oder  $c$ , also vor bzw. hinter der Strahltaile des Lasers liegt. Aufgrund der sich einstellenden rechnerischen Vergrößerung des Strahlprofildurchmessers - um mindestens den Faktor 2 - vergrößert sich die Desorptionsfläche dabei - um mindestens den Faktor 4. Die Energiedichteverteilung wird bei Gausprofilen zudem deutlich flacher, weshalb zum Erreichen der Schwellbestrahlungsstärke die Pulsenergie des Lasers entsprechend nachgeregelt werden muss.

Das Vorgehen aus Methode 1 wird wiederholt, um zunächst aus Einzelpulsen an unterschiedlichen Stellen der Probe Analytsignale zu erhalten. Gelingt dies mit einem  $\text{SNR} \approx 2$ , sind auch hier Mehrpulsmessungen an Stellen mit vorhandener Einzelpulsintensität bis zum vollständigen Abtrag des Probenmaterials an dieser Stelle durchzuführen. Bei Proben die sich mit ca. 200 – 300 Pulsen nicht vollständig abtragen lassen wird wie zuvor verfahren. Die Signalintensitäten der kumulierten Einzelpulsmessungen und die der Summenmessungen sind dann im Anschluss miteinander zu vergleichen.

### **Vergleich der Ergebnisse aus beiden Methoden**

- a. Wenn Methode 2 erfolgreich angewandt werden kann ist, anhand des Vergleiches der kumulierten Einzelpulsmessungen mit den Mehrpulsmessungen, eine Optimierung folgender Messungen möglich.
- b. Führt auch das Vorgehen nach Methode 2 nicht zu detektierbaren Intensitäten der Analyte mit einem  $\text{SNR} \approx 2$ , muss zur weiteren Analyse zunächst ein Vergleich der erhaltenen (vollständigen) Spektren aus *beiden* Methoden angestellt werden.

Alle Vergleiche beinhalten dabei die Bestimmung

1. der Basislinie(n),
2. der Rangfolge(n) der Intensitäten (aller Datenpunkte)
3. sowie die Berechnung der Totalionenströme.

Zu dem Vergleich in **b** werden, abweichend zu den vorhergehenden Vergleichen, die *arithmetisch gemittelten* Summenspektren (der Mehrpulsmessungen) und die Einzelpulsspektren herangezogen. Der Vergleich **b** liefert dann eine Abschätzung darüber, ob und mit welcher Methode (einschliesslich der zu wählenden Bestrahlung und der Pulszahl pro Messstelle) eine Analytdetektion an den Spektrometern prinzipiell möglich ist oder nicht.

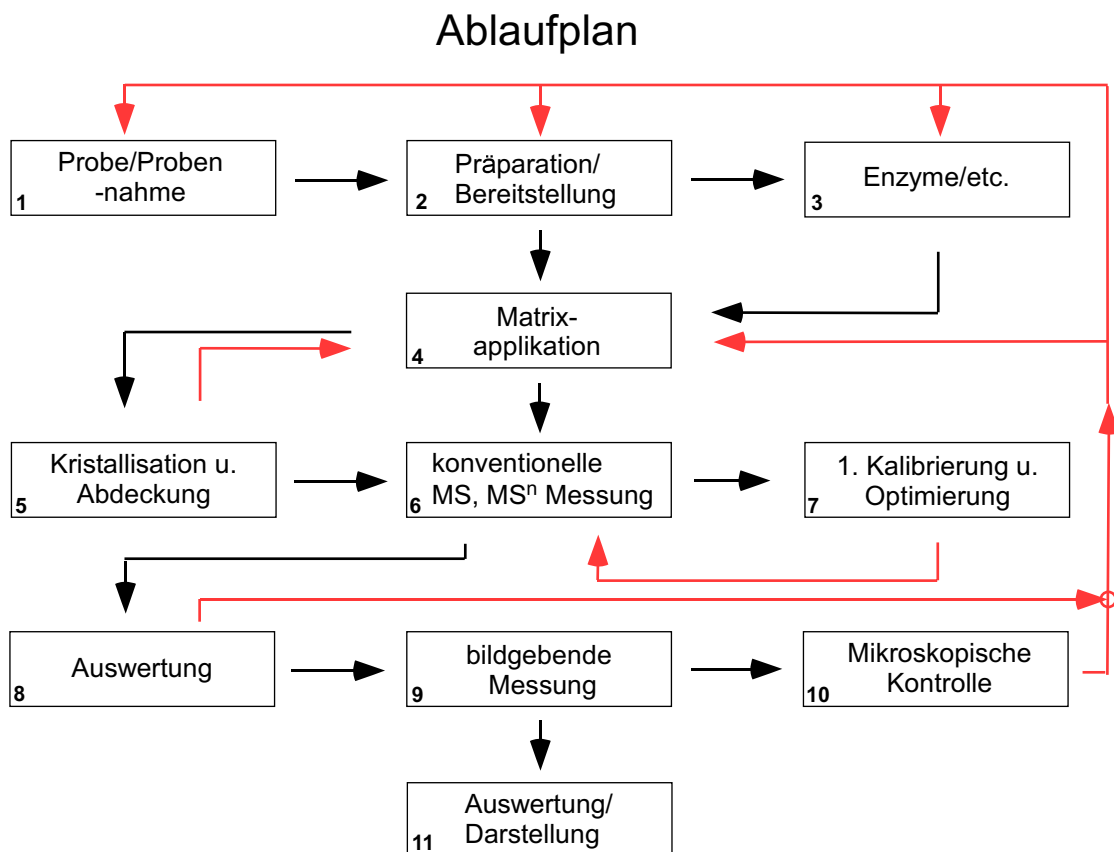


Abbildung 4.29: Allgemeiner Ablaufplan der MS-Messungen mit insgesamt 11 Stationen. Die helleren Pfeile stellen Äste von Rückkopplungsschleifen dar. Die Punkte 8 und 11 bieten die Möglichkeit zu einer zweiten Kalibrierung (Nachkalibrierung), unter der Hinzunahme von Stützstellen (bekannte Massensignale im Spektrum) und Polynomen. Die mikroskopische Kontrolle (5, 10) ist ein wesentlicher Bestandteil der Dokumentation und Qualitätskontrolle der bildgebenden MS-Messungen.

### Bildgebende Messungen

Bei bildgebenden MALDI-Imaging-Messungen handelt es sich um rasternde Messungen, d.h. um wiederholte Messungen mit möglichst unveränderten apparativen Bedingungen an benachbarten Probenorten. Hierbei ist es sinnvoll, wenn mit mehreren Pulsen an einer Messstelle gerastert wird, den Einfluss möglicher Überlagerungen an den Desorptions-/Ablationsorten zu berücksichtigen. Eine Mehrfachmessung an einzelnen Probenpositionen kann (sofern noch desorbierbares Material vorhanden ist) eine Zuordnung von



teilweise identischer Pulsinformation (Ortskoordinaten) auf benachbarte Pixel bedeuten und damit eine gewisse Ortsunschärfe in den erstellten Abbildungen hervorrufen. Andererseits erhöht eine vollständige (d.h. lückenlose) Rasterung einer Probe(noberfläche) die Wahrscheinlichkeit, die relativen Intensitäten der Bestandteile über alle Messungen realistisch abbilden zu können (relative Quantifizierung). Der letztgenannte Effekt wird üblicherweise in Profiling-Messungen, gegenüber einer höheren räumlichen Auflösung, bevorzugt. Geeignete mathematische Verfahren sind in der Lage, die verwaschene Ortsinformation etwas zu korrigieren, soweit es sich um rein zufällige Verteilungsmuster (ohne Bias-Einfluss) handelt [290]. Ein weiteres Extrem wird erreicht, wenn die Lücken zwischen einzelnen Messstellen zu groß werden (Undersampling). Ab wann Undersampling die Bildqualität maßgeblich negativ beeinflusst, hängt von der Größe der strukturbildenden Probenbestandteile ab und wird formal durch das Nyquist-Kriterium beschrieben. Oversampling kann auch durch eine Lage der Probenebene ausserhalb der Strahltaile hervorgerufen werden (Defokuslage). Undersampling ist auch dann möglich, wenn Fehler in der zeitlichen Abstimmung zwischen Laserpuls (Trigger), Messstellenwechsel und Spektrenaufnahme eintreten. In Abbildung 4.30 werden schematisch die Bereiche bei eintretendem Oversampling und eine mögliche Ordnung der betroffenen Pixel angegeben. Je nach Laserintensitätsverteilung und Analytverteilung kann sich dabei eine unterschiedliche Lage von zentralen Pixel (CP) und Randpixel (OP, bezogen auf den tatsächlichen Analytgehalt) innerhalb eines Messraster ergeben. Oversampling kann zur „Verwaschung“ bzw. zur Artefaktbildung in Pixelbildern beitragen aber andererseits auch zur Probencharakterisierung verwendet werden.

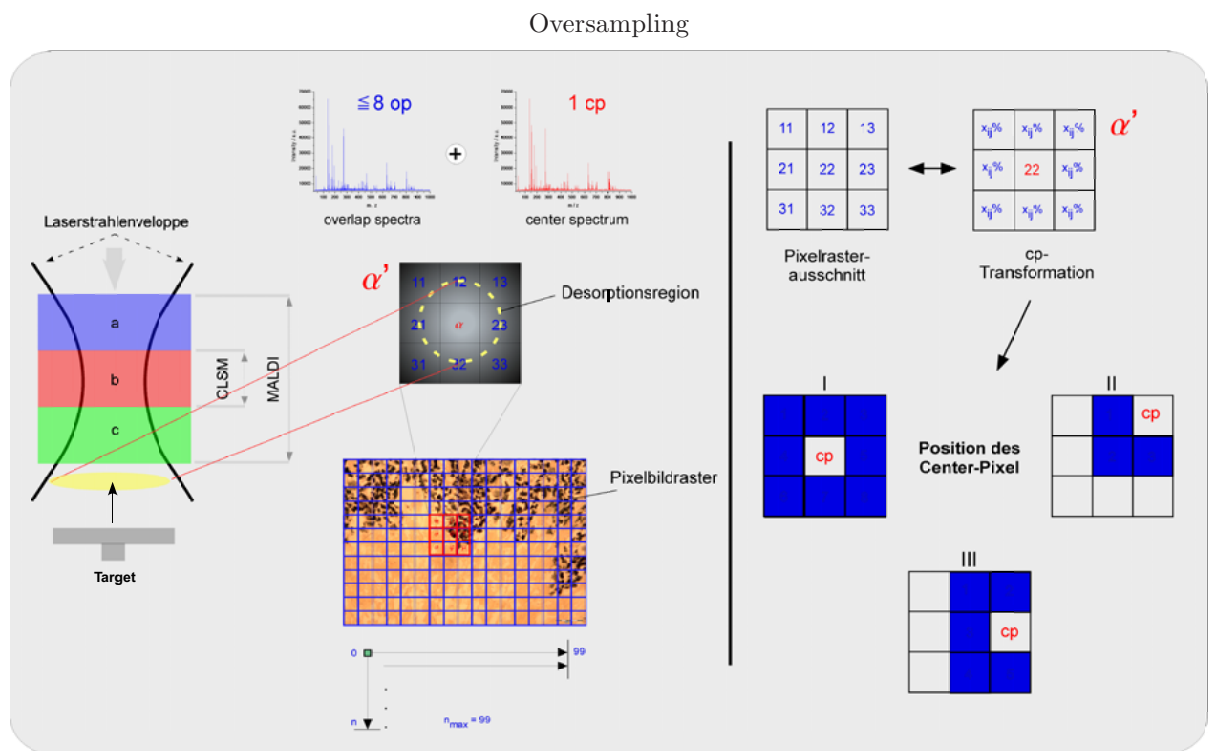


Abbildung 4.30: Darstellung des Abbildungsprinzips unter Berücksichtigung von Oversampling. MALDI-Messungen können aus einem größeren Bereich ( $a - c$ ), als aus dem konfokalen Bereich  $b$  erfolgen. CLSM-Messungen sind dagegen nur aus dem konfokalen Bereich  $b$  erfolgreich (links). Die Orientierung und Lage der Probe sowie die Lage des Messrasters bestimmt die Abbildbarkeit von Strukturen an der Auflösungsgrenze mit. Die laterale Auflösungsgrenze für Punktintensitäten mit „Rayleighcharakteristik“ (Ursache: UV-VIS-Optik = Beugung, MS = Molekülverteilung und Desorption/Ionisierung) gibt eine Mindestanzahl von  $4 \times 4$  Pixel vor (symmetrische Verteilung, siehe Anhang). Die Größe des optischen Laserdurchmessers auf der Probenoberfläche kann die gewählte Pixelkantenlänge genau erreichen, sie aber ebenso unter- wie überschreiten. Hierbei ergeben sich die Bedingungen für ein *undersampling* und ein *oversampling* der Probe. Liegt ein *oversampling* vor, werden benachbarte Probenbereiche mehrfach vermessen. Die erhaltenen Spektren bilden dann teilweise Signale in einem Massenbereich aus einem überlappenden Ortsbereich in benachbarten Pixel ab. Es kann zwischen Fällen unterschieden werden, bei denen der Desorptionsdurchmesser  $\leq 2 \times$  Pixelkantenlänge bleibt, die dann maximal 8 Überlappungspixel mit einem zentralen Pixel zeigen. I.d.R. ist es aber sinnvoller, das Kriterium des Zentrumspixels anhand der größten Intensität des betrachteten Bildsignales im Microprobe Modus zu wählen. Es wird deutlich, daß hierbei je nach Startpunkt der Rasterung das intensivste Signal einer betrachteten Ionenspezies innerhalb einer zusammenhängenden Überlappungsfläche, bestehend aus  $3 \times 3$  Pixel (Hyperpixel), zentral oder an Randbereichen liegen kann.

### 4.3.7 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Neben den massenspektrometrischen Messungen erfolgen teilweise parallel auch CLSM-Messungen an einigen Proben. Zur Einrichtung der Messanordnung werden nach den Justierarbeiten am Desorptions-/Ionisierungslaser die Justierung des Strahlteilers und des CLSM-Pinholes (Blende 2, Abbildung 4.31) inklusive des Photomultipliertubes (PMT) durchgeführt. Beide Bauteile befinden sich an der senkrecht stehenden Lochplatte des Spektrometers. Die Achse des PMT-Pinholes ist dort parallel zum Flugrohr des Massenspektrometers angeordnet. Zu den Justierungsarbeiten wird zunächst ein Spiegel in die objektseitige Strahltaile des Lasers gestellt. Bei schwacher Leistung kann der Strahl, nach Einbringen eines Strahlteilers in den Strahlengang, jeweils anhand der Fluoreszenz eines weißen Papierstückchens<sup>8</sup> verfolgt werden. Alternativ wird eine rote Laserdiode ( $\lambda = 630 \text{ nm}$ ) als Pilotlaser verwendet. Die Laserenergie im Messaufbau wird mit einem Energiemeter ermittelt, wobei zunächst die (messbaren) Extremwerte vermessen werden. Das Pinhole (2) wird dazu grob in die Position der Strahltaile gesetzt und erst später, während der Messung von Testproben und anhand der Mikrometerschraubenfixierungen endgültig feinjustiert. Diese Routine muss nach jeder Veränderung des Laserstrahlenganges wiederholt werden.

Anhand einer Serie von Aufnahmen an einer reflektierenden Gold- oder Aluminiumoberfläche, erfolgt die Abstimmung der Laserenergie und die Bestimmung der fokalen Ebene im Probenraum.

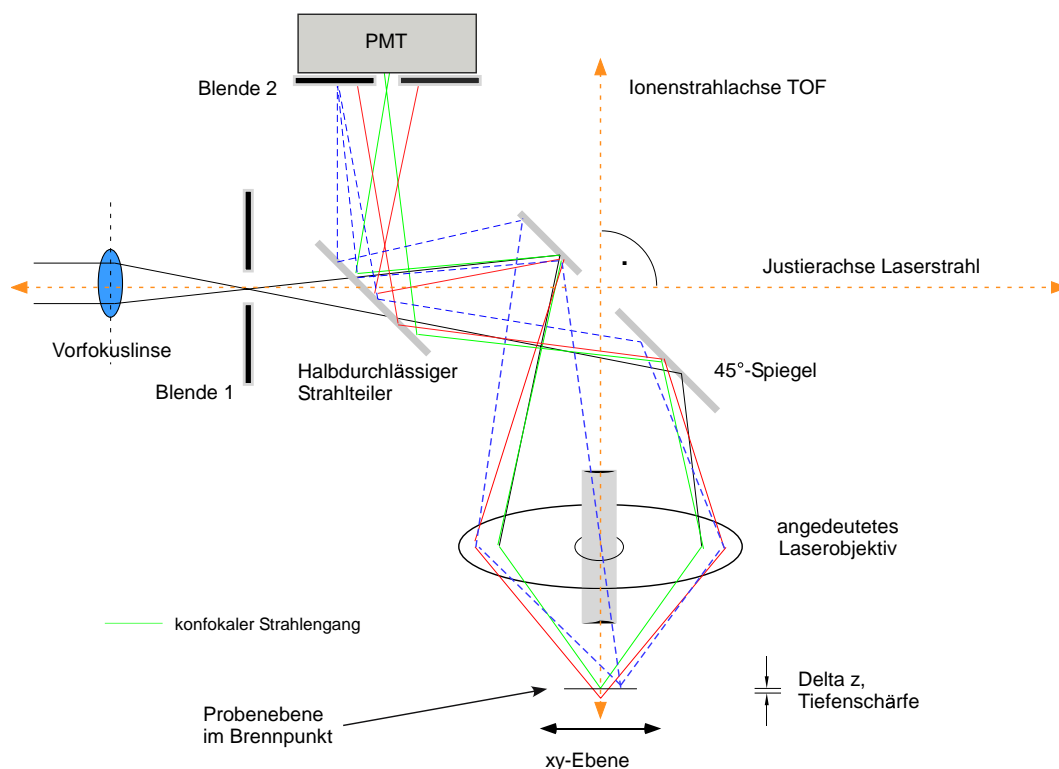


Abbildung 4.31: Strahlengang an der CLSM-Anordnung am Massenspektrometer LAMMA 2000.

<sup>8</sup>In der Regel Fluoreszenzsignale von  $TiO_2$ .

## 4.4 Messaufbauten zur Systemcharakterisierung

### 4.4.1 Vermessung der Laserstrahltaillen

Die an den Spektrometern verwendeten Laser sind im Zeitraum dieser Arbeit mehrfach von unterschiedlichen Personen mit teilweise abweichenden Methoden vermessen worden. Dies war notwendig, da sich die laseroptischen Aufbauten veränderten und die Strahljustierung(en) im Rahmen der Versuche zu dieser Arbeit variiert werden mussten. Der prinzipielle Messaufbau zur Ermittlung des Strahltaillenverlaufes ist in Abbildung 4.32 dargestellt und entspricht dem Konzept aus teilweise veröffentlichten Arbeiten [53]. Die Bestimmung der Laserpulsenergie wurde mit einem Energiemeter Field Max II TOP der Firma Coherent in Verbindung mit einem pyroelektrischen Messkopf J 10 MB-LE (Maximale Pulslänge = 17  $\mu$ s, maximale Energiedichte bei  $\lambda = 355$  nm = 0.14 J/cm<sup>2</sup>, maximale Folgefrequenz = 1000 Hz, Detektordurchmesser = 10 mm, Energie Linearität =  $\pm 3$  %, Kalibrierfehler =  $\pm 2$  %, Wellenlängenbereich:  $\lambda = 190$  nm - 1200 nm, spezifizierter Messbereich: E = 100 nJ - 200  $\mu$ J) durchgeführt.

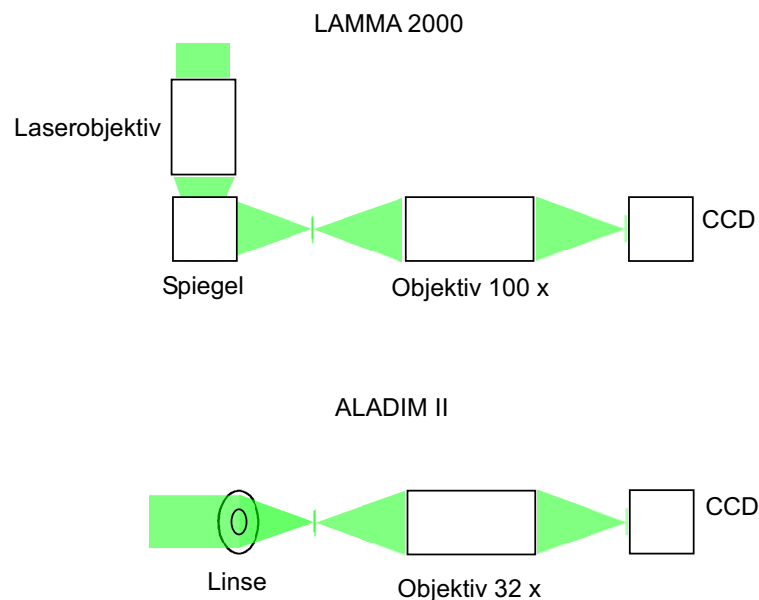


Abbildung 4.32: Aufbauski­z­ze der Messanordnungen zur Strahltaillenbestimmung und Fokusvermessung. In der Skizze ist ein paralleler Eingangsstrahl dargestellt, in den realen Messaufbauten wird dagegen ein vorfokussierter Strahl verwendet. Die Objektive (Ultrafluor 100 x NA 0.85, Ultrafluor 32 x NA 0.46, beide von Carl Zeiss) bilden den Strahl aus einer Gegenstandsweite von ca. 0.8 mm (100 X) oder 0.42 mm (32 X) in einer festen Bildweite von 150 mm auf einen CCD-Chip ab (Bezug = Objektivfassungskanten). Die Objektive sind dabei jeweils fest mit einer CCD-Kamera verbunden (Typ 4812, Cohu Inc.), um einen einheitlichen Bildabstand zu gewährleisten. Objektiv und CCD-Kamera befinden sich auf einer optischen Schiene und sind mittels Mikrometerschrauben, entlang der Laserstrahlachse, verschiebbar. Der stark abgeschwächte Laserstrahl kann auf diese Weise direkt in den Quellregionen der Massenspektrometer vermessen werden. Die erhaltenen Daten werden über eine Messkarte digitalisiert (14 Bit) und können dann mit der Software LBA-7XXPC der Firma Spiricon Inc. am PC ausgewertet werden.

### 4.4.2 Bestimmung des elektronischen Rauschverhaltens der Spektrometer

Das elektronische Rauschverhalten und die Schalt­puls­charakteristik an Elektroden im DE-Betrieb ist an den Spektrometern LAMMA 2000 und ALADIM II, nach dem in Abbildung 4.33 dargestellten Prinzip, ermittelt worden. Am Spektrometer ALADIM II wird ein digitales Speicheroszilloskop verwendet, am Spektrometer LAMMA 2000 dagegen eine ISA-PC-Messkarte. Beide Transientenrekorder verfügen über zwei Eingangskanäle (Differentialverstärkereingang). Das elektronische Rauschverhalten des CLSM-

Aufbaus mit dem USB-ADC der Firma Meilhaus (zur Aufnahme der CLSM Messungen) ist auf zwei Arten bestimmt worden. Zum einen über eine direkte Ausgabe der analogen Werte des Photomultiplier Tubes auf einen Kanal eines digitalen Speicheroszilloskopes und zum anderen über den ADC und einen PC.

#### Elektronische Rauschcharakterisierung

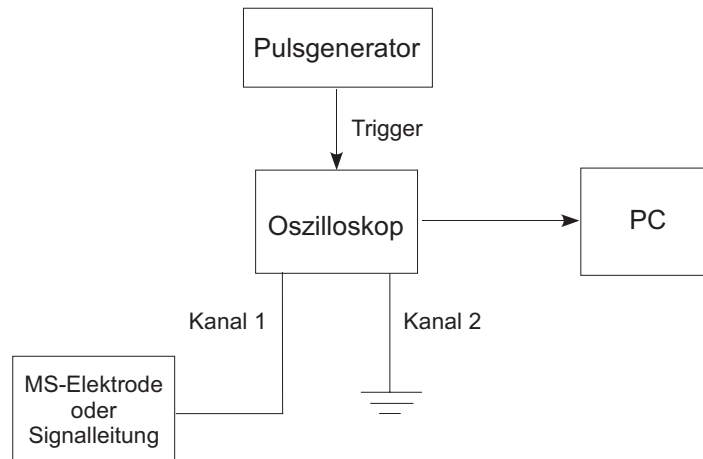


Abbildung 4.33: Prinzipieller Aufbau zur Rauschwertmessung im Messaufbau der Massenspektrometer ALADIM II und LAMMA 2000 sowie Eigenrauschmessungen am digitalen Speicheroszilloskop Le Croy 9350 und der ISA-Steckkarte Precision Instruments 9845 bzw. 9825. Bei der Ermittlung des Systemeigenrauschverhaltens muss das Rauschverhalten des Transientenrecorders berücksichtigt werden. Hierzu werden beide Kanäle über einen Abschlusswiderstand am Differentialverstärkereingang kurzgeschlossen ( $50 \Omega$  oder  $1 M\Omega$ ) und miteinander verglichen. Es erfolgt eine Spannungsmessung von  $k$  Iterationen nach einem Triggersignal. Die Messungen können im Oszilloskop gemittelt werden. Die Leistungsdichte wird dann im Rahmen einer FFT, ebenso mit dem Oszilloskop berechnet. Die frequenzabhängige Rauschleistungsdichte (PSD, *power spectral density*) kann aus der Differenz der mittleren Rauschleistungsdichte des Gesamtsystems, vermindert um die mittlere Rauschleistungsdichte des Oszilloskops erhalten werden. Ohne Mittelung, der über  $n$  Iterationen durchgeführten Messungen, wird ein stärkerer Rauschanteil ermittelt. Diese Differenz ergibt sich aus der statistischen Natur weissen Rauschens. Das Verhältnis der Rauschleistungsdichten mit und ohne Mittelung wird als Noise Floor Drop (NFD) bezeichnet und entspricht in etwa  $NFD = -3 \lg_2 n$  [dB]. I.d.R. reicht es aus, nur den Frequenzbereich abzudecken, der auch in späteren Messungen relevant sein kann. Am Spektrometer LAMMA 2000 muss die FFT über ein PC-Programm durchgeführt werden. Ein direkter Vergleich mit einem digitalen Speicheroszilloskop, anstelle der ISA-Messkarte, zeigt dabei eine Differenz im Eigenrauschverhalten der Transientenrecorder. Die Ursache hierfür kann durch den Unterschied in den verwendeten Algorithmen, in der unterschiedlichen Bitzahl sowie der abweichenden Darstellung der Zahlen in den Prozessoren (Oszilloskop, PC) liegen, wurde aber nicht näher untersucht. Die theoretische Rauschleistungsdichte entspricht  $P_{th}/B = 10 \cdot \lg((4kTR)/(X\Omega 0.001W))$  [dBm/Hz] mit  $X = (50, 10^6)$ .

### 4.4.3 Ermittlung der Fluidtransportraten bei der Sprühpräparationsmethode

Zu einer gezielten Optimierung des Volumen- bzw. Massestromes sind zunächst die jeweiligen Istwerte im Versuchsaufbau bestimmt worden.

#### Matrixlösung

Die sich während einer Matrixapplikation im vollständig manuellen Betrieb der gasdichten Hamilton-spritze ( $25 \mu\text{l}$ ) einstellenden Flussraten sind unter allen verwendeten Präparationsbedingungen ermittelt worden. Als Referenzmessungen zur Bestimmung der relativen Standardabweichungen des Messaufbaus sind unterschiedliche Sollflussraten im Betrieb mit einer Spritzenpumpe herangezogen worden. Der maximale Volumenstrom der Spritzenpumpe mit reinem Wasser beträgt ca.  $10 \mu\text{l}/\text{min}$ . Zu den Messungen wird ein Durchflusssensor der Firma Sensirion AG des Typs LG 16-0480 verwendet. Der Sensor hat einen linearen Messbereich von  $1.0 \mu\text{l}/\text{min}$  bis  $50 \mu\text{l}/\text{min}$  (Kalibrierung mit Wasser,  $20^\circ\text{C}$ , 1 bar). Er kann über einen USB-Adapter und eine vom Hersteller bereitgestellte Software ausgelesen werden (I<sup>2</sup>C, USB). Die Software ermöglicht eine Speicherung der Daten. Die theoretische Tastfrequenz der Messungen beträgt 13 kHz ( $t = 74 \text{ ms}$ ). Die reale Tastfrequenz schwankt in Abhängigkeit vom verwendeten Betriebssystem bzw. mit dem verwendeten Messrechner (ca. 70 ms – 100 ms). Die Messungen erreichen maximal eine digitale 16 Bit-Auflösung. Das mittlere Rauschen beträgt bei der niedrigsten kalibrierten Flussrate (4.5 LSB) laut Herstellerangaben ca.  $0.025 \mu\text{l}/\text{min}$  und bei der maximal erreichbaren Flussrate ca.  $0.3 \mu\text{l}/\text{min}$ . Eine Überprüfung dieser Angaben im Messaufbau mit Wasser, ergab keine signifikanten Abweichungen. Der verwendete Messaufbau ist schematisch in Abbildung 4.34 dargestellt. Der Innendurchmesser der Glaskapillare des Sensors beträgt ca.  $480 \mu\text{m}$ .

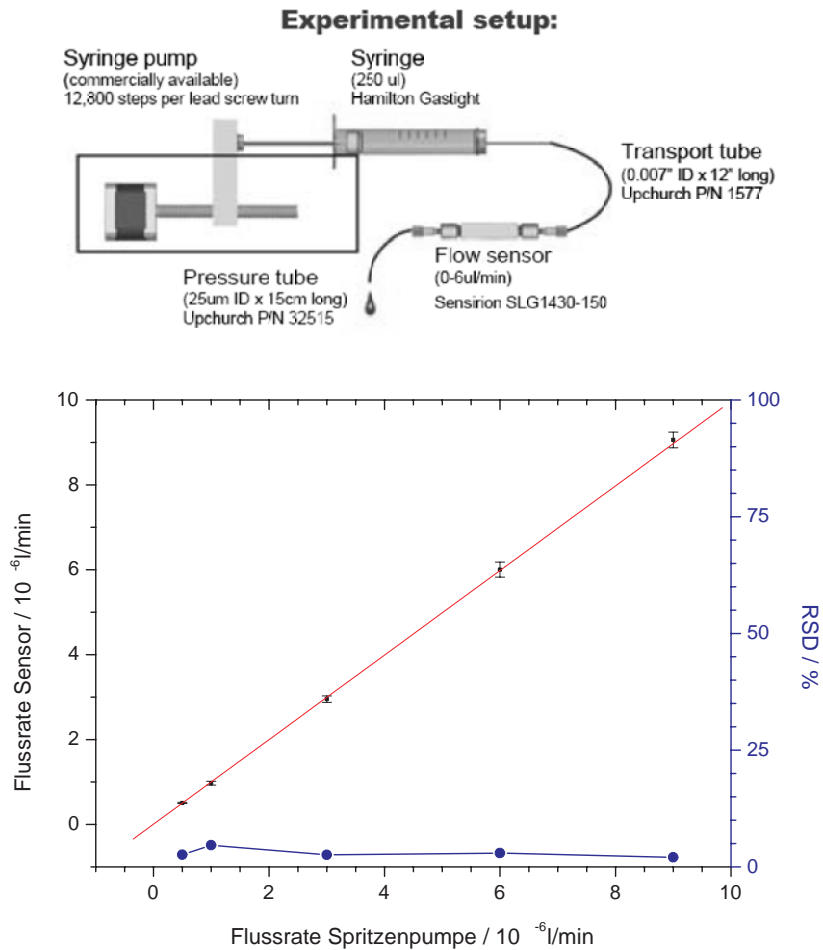


Abbildung 4.34: (Oben) Messaufbau zum Vergleich der Soll- und Istflussraten und Bestimmung der Schwankungen im automatischen Spritzenpumpenbetrieb. Abbildung übernommen aus folgender Quelle: Ausschnitt einer Posterpräsentation von Darren Lewis et al., Integrated Solutions, IDEX Health & Science Group, Oak Harbor, WA, Hopedale, MA USA (<http://www.idex-hs.com>). In Abhängigkeit der Innendurchmesser der verwendeten Kapillaren (Transport tube, Pressure tube) und der Kapillarlänge, variiert der tatsächliche Druck beim Transport einer Lösung im Leitungssystem. Die Genauigkeit der Istflussrate ist dabei letztlich mindestens durch die realen Abweichungen im Rahmen der Fertigungstoleranzen der Steigungen an der Gewindespindel (und Hülse) sowie der Schrittmotorcharakteristik begrenzt. Zur Detektion der Istflussraten und ggf. zu einer ausgleichenden Regulation durch eine aktive Rückkopplung, wird ein Flussratensensor in den Aufbau integriert. (Unten) Korrelation der eingestellten Flussrate (Spritzenpumpe: Harvard Pump 11) mit der ermittelten Flussrate des Sensors (Sensirion LG16-0480D) ohne Auslasskapillare. Die RSD bleibt, im getesteten linearen Messbereich von 0.5  $\mu$ l/min bis 10  $\mu$ l/min, unter 5%.



### Sprüh- und Reservoirgas

Der Volumenstrom an Stickstoffgas ist bei einem Vordruck von  $p_{vor} = 1$  bar und Raumtemperatur ( $20^\circ\text{C}$ ) bestimmt worden (Swagelok VAF-G4-09M, 50 l/h – 500 l/h). Bei 2,5-DHB-Präparationen mit der beschriebenen Kammer beträgt er ca. 315 l/h  $\pm$  4 l/h, mit Stickstoff der Qualität 2.8 (Air Liquide, 99.8 Vol-%, weitere Bestandteile  $\text{O}_2$  und Feuchtigkeit,  $\rho = 1.17$  kg/m<sup>3</sup> bei  $15^\circ\text{C}$  und 1 bar, relative Dichte bezogen auf trockene Luft  $15^\circ\text{C}$ , 1 bar = 0.967). Die Angaben ermöglichen, unter definierten Bedingungen, die Berechnung des Gasmassenstromes in der Apparatur.

#### 4.4.4 Bestimmung der effektiven Signalverstärkung bei den MS-Messungen

Zur Abschätzung der relativen Verstärkung transmittierter Ionenströme am Spektrometer LAMMA 2000 wurde eine Standard-MALDI-Probe mit den drei Peptidanalyten Substanz P, Melittin und Insulin bei zentrisch justiertem Laserstrahl vermessen. Es handelt sich bei der Probe um eine Sprühpräparation (10 x 20  $\mu\text{l}$ , 10 mg/ml 2,5-DHB, 1:3:5 x  $10^{-6}$  M Substanz P, Melittin, Insulin in 0.1%-TFA/EtOH (1:1) v/v). Durchgeführt wurden Infokusmessungen mit einer mittleren Pulszahl von 100  $\pm$  15 Pulsen je Messpunkt und einer durchschnittlichen Laserpulsenergie von 56  $\mu\text{J}$   $\pm$  8  $\mu\text{J}$  bei einer dynamischen Abschwächerstellung von 40 (Abbildung 4.7). Aus dem Ablationsvolumen, der Transmission und der Matrix- bzw. Analytkonzentration kann die Nettoverstärkung ermittelt werden. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 4.35 dargestellt. Ab einem MCP-Potential von ca. - 2.5 kV können am Oszilloskop deutliche Dunkelpulssignale ermittelt werden<sup>9</sup>.

Die effektive Signalverstärkung wurde äquivalent auch am Spektrometer ALADIM II, sowohl im Linear-, als auch im Reflektormodus ermittelt. Die Verstärkung im Linearmodus ist um durchschnittlich 5 % niedriger als am Spektrometer LAMMA 2000. Die Verstärkung im Reflektormodus ist dagegen um zwischen 10 % bis 15 % höher, als im Linearmodus am Spektrometer LAMMA 2000 (Daten nicht explizit dargestellt).

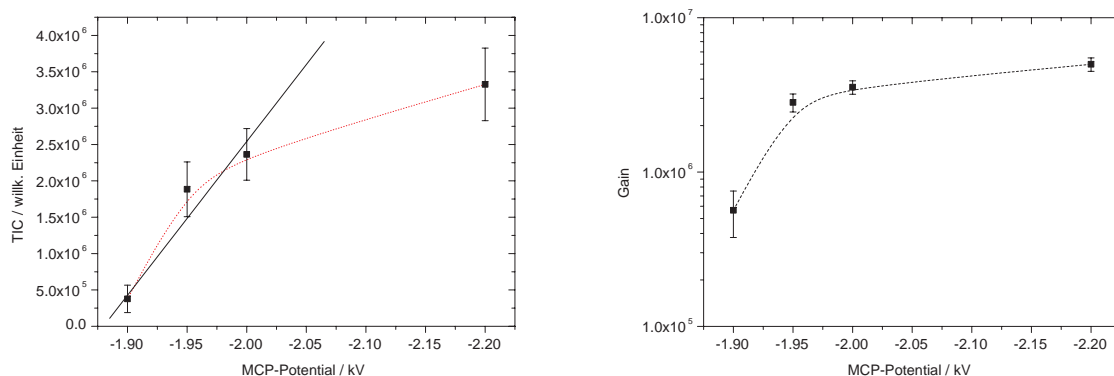


Abbildung 4.35: Relative MCP- und Vorverstärkung in der Form des erhaltenen TIC (m/z 0 bis m/z 10000) und bestimmte Netto-Verstärkung am Chevron-MCP des Spektrometers LAMMA 2000.

<sup>9</sup> Amplitude  $\approx$  34 mV bei 50  $\Omega$  und 40 mV Vollausschlag. 0.2 - 1 Impuls/s cm<sup>2</sup>, 40 mm effektive Fläche.

## 4.5 Protokolle der Präparationstechniken

Bei den eingesetzten Verfahren zur Matrixpräparation (mit Ausnahme von dried droplet) handelt es sich um Techniken, bei denen die Charakteristik der Fluide von dem Verhalten makroskopischer Fluide abweichen kann. Das entsprechende Forschungsgebiet wird oft auch als „Mikrofluidik“ bezeichnet [287]. In der Mikrofluidik kann sich z.B. der Einfluss der Gravitation gegenüber anderen Kräften, wie der Reibung oder den Kapillarkräften, so stark verringern, daß diese Größe vernachlässigt werden kann. In der Regel erfordert dies eine Anpassung der Berechnungsmodelle.

### 4.5.1 Vorversuche und Bewertung

Anhand einer Reihe von Vorversuchen ist zunächst, in Abhängigkeit von den jeweiligen Präparationsprotokollen, die für eine vollständige Lösungsmittelverdampfung benötigte Zeit ermittelt worden. Betrachtet wurde dabei auch das Lösungs- und Diffusionsverhalten von Peptidanalyten (Abbildung 4.36 und Abbildung 4.37 und 4.38). Hierzu wurde ein für das Verfahren dried droplet typisches Präparationsvolumen im Bereich von  $V \approx 0.5 \mu\text{l}$  bis  $2 \mu\text{l}$  angenommen. Das Referenzlösungsmittel für die Matrix 2,5-DHB ist Ethanol/0,1% TFA in einem Verhältnis 3:7 (v/v). Die Testbedingungen werden nachfolgend kurz beschrieben, um eine Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

Der zu ermittelnde (mittlere) Zeitbedarf einer aus Lösung einsetzenden Matrixkristallisation bzw. die Zeit, die eine vollständige Lösung von Kristallen in einer Präparation, nach Zuführung von Lösungsmittel benötigt, ist in erster Linie abhängig von der Löslichkeit der entsprechenden Substanz(en). Weiterhin besitzt die Kristallform und -größe einen Einfluss auf die Dauer des Lösungsprozesses. Die Lösungsmittelzusammensetzungen der hier untersuchten MALDI-Matrizes stellen i.d.R. ein (positiv) azeotropes Gemisch dar.

### Adsorption und Benetzung

Neben der geometrischen Strukturierung (Rauigkeit) sind besonders die chemische Beschaffenheit (Polarität) der Phasenbestandteile (Fluid/Feststoff) und die wirksamen elektrostatischen Kräfte für die Art und Ausprägung einer Adsorption und Benetzung von Oberflächen mit Flüssigkeiten oder Gasen verantwortlich [288] [289]. Das Verhältnis von wirksamen Adhäsionskräften zwischen dem Adsorbens und dem Adsorptiv zu den Kohäsionskräften innerhalb des Adsorptivs, bestimmt dabei wesentlich die Charakteristik des erfolgenden Sorptionsprozesses. Energieabhängig wird dabei i.d.R. zwischen Physisorption und Chemisorption unterschieden [289].

Betrachtet werden im folgenden (nur) die Vorversuche zu den Präparationsmethoden „dried droplet“ und „Zweikomponentensprüh“. Die Vorversuche zu den Druckpräparationen werden nicht explizit dargestellt. Zu den Versuchen sind hauptsächlich die newtonschen Fluide<sup>10</sup> Wasser, Ethanol und  $N_2$  verwendet worden. Wasser ist bei allen zu dieser Arbeit eingesetzten Präparationstechniken ein wesentlicher Bestandteil der Lösungsmittelmischungen ( $c \geq 50$  vol.-%). Stickstoff wird in der Sprühapparatur als Reservoir- bzw. Trägergas verwendet. Bei den Präparationstechniken, die eine gelöste Matrix unmittelbar auf der Präparatoberfläche entlassen, wie z.B. die Methode des dried droplet oder die mit dieser artverwandten Layer-Techniken und die dann i.d.R. mittels Kolbenhubpipetten aufgetragen werden, sind neben den Kräften die zur Tropfenbildung führen, beim Auftreffen auf die zu benetzende Oberfläche, keine weiteren

<sup>10</sup>Fluide deren Scherspannung  $\tau$  proportional zur Schergeschwindigkeit  $\frac{du}{dx}$  ist:  $\tau = \eta \frac{du}{dx}$  mit  $\eta$  = dynamische Viskosität,  $u$  = Strömungsgeschwindigkeit parallel zur Oberfläche und  $x$  = orthogonale Ortskoordinate. Das Verhältnis von  $\eta/\rho$  wird als kinematische Viskosität bezeichnet.  $\rho$  = Dichte des Fluides. Nicht-newtonsche Fluide sind i.d.R. Suspensionen.

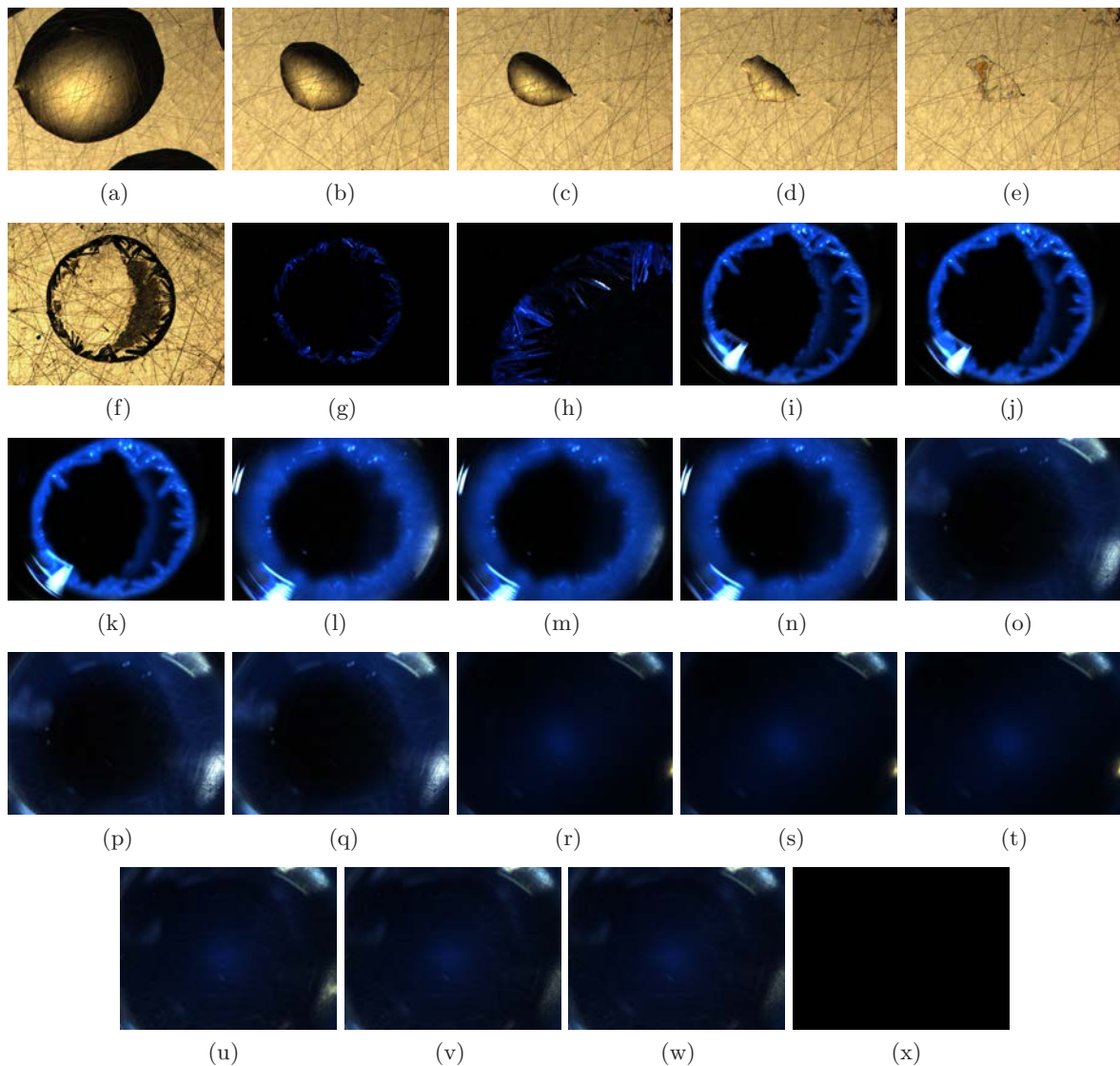


Abbildung 4.36: Evaporation, Lösung und Diffusion. 1. Reihe: Test der Evaporationszeit an einem Tropfen aus  $1 \mu\text{l}$  Wasser. Trocknung im warmen Luftstrom (ca.  $50^\circ\text{C}$ ). Bildaufnahmeabstand (a) - (b) = 10 s, dann jeweils 5 s. Ab 2. Reihe: Dried droplet-Präparation:  $0.1 \mu\text{l}$  2,5-DHB aus EtOH/0,1% TFA 3:7 (vol/vol) und Eigenfluoreszenzaufnahmen (2,5-DHB). Lösung der Matrix und Diffusion in  $1 \mu\text{l}$  98 % Glycerol. Bild (f) Hellfeldübersichtsaufnahme der getrockneten Präparation. Bild (g) Fluoreszenzübersicht von Bild (f). Bild (h) Ausschnittsvergrößerung der linken oberen Ecke von Bild (g). Bild (i) ca. 20 s nach Glycerolzugabe. Bild (j) nach ca. 50 s. Bild (k) (3. Reihe erste Position) nach ca. 1 min 50 s. Bild (l) nach ca. 20 min. (Bild m, n jeweils + 1 min.). Bild (o) nach ca. 40 min (Bild p, q jeweils + 1 min.). Bild (r) nach ca. 2 h (Bild s, t jeweils + 1 min.). Bild (u) (5. Reihe erste Position) nach 3 h (Bild v, w jeweils + 1 min.). Bild (x) nach 7 h (Lösung ist nicht eingetrocknet). Zwischen den Aufnahmen wurde die UV-Beleuchtung der Probe unterbrochen. Ununterbrochene UV-Beleuchtung nur während der unmittelbaren Belichtungszeit einer Aufnahme. Einheitliche Fluoreszenzbelichtungszeit pro Bild = 5 s. **Bildmaße (einheitlich außer 3. Bild , 2. Reihe):  $1775 \mu\text{m} \times 1331 \mu\text{m}$  (Vergrößerung: 50x).** 3. Bild , 2. Reihe, **Bildmaße:  $888 \mu\text{m} \times 666 \mu\text{m}$  (Vergrößerung: 100x).**

Größen zu berücksichtigen. Bei den Präparationstechniken die einen Transportweg von der Stelle der primären Tropfenbildung am Präparationswerkzeug zur Stelle der Präparat- oder Targetoberfläche beinhalten, ist dies dagegen anders. Die äußeren Bedingungen nehmen hier einerseits Einfluss auf die primäre Tropfengröße/Form (Verdampfung, Reibung) sowie andererseits auch auf die kinetische Energie der einzelnen Tropfen (Fallbeschleunigung, relative Strömungsgeschwindigkeit). Betrachtet man hierbei einzelne Tropfen bzw. nahezu homogene Populationen mit einer besonders flachen Größenverteilung und sehr geringen relativen Fließgeschwindigkeiten, bei denen jeder Tropfen in eine ruhende (statische) Gasatmo-

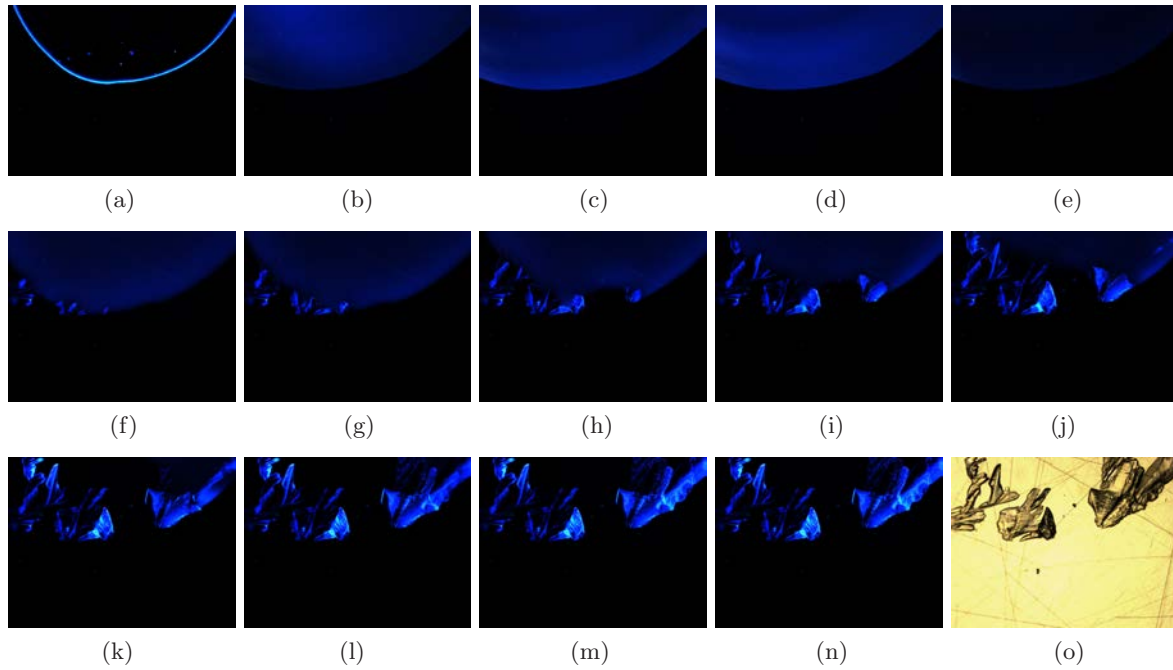


Abbildung 4.37: Lösung einer 1  $\mu\text{l}$  Dried droplet-Präparation eines mit AMCA (7-amino-4-methylcoumarin-3-acetat,  $\lambda_{ex} \approx 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} \approx 450 \text{ nm}$ ) markierten 10 AS-Peptides (AMCA-NH<sub>2</sub>-RKFWLLMPAV-CONH<sub>2</sub>, Amid,  $M_r = 1260.1 \text{ g/mol}$ ) in einer Ethanol/Wasser 3:7 (v/v) Mischung. Aufgebracht und getrocknet bei Raumtemperatur ( $c \approx 10^{-5} \text{ M}$ ). Lösung und Diffusion nach Auftragung von 1  $\mu\text{l}$  10 mg/ml 2,5-DHB in EtOH/0.1 % TFA 3:7 (vol./vol.). Reihe 1 Bild (b), (c) Aufnahme nach 1 min., Belichtungszeit jeweils 10s. Reihe 1 ab Bild (d) Aufnahme nach 2 min., Belichtungszeit 5 s. Alle weiteren Aufnahmen erfolgten unmittelbar nacheinander  $\Delta t$  ca. 10 s. Ab Bild (f) in Reihe 2 ist die beginnende Kristallisation von 2,5-DHB mit dem fluorophormarkierten Peptid zu erkennen. **Bildmaße (einheitlich): 1775  $\mu\text{m}$  x 1331  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 50x).**

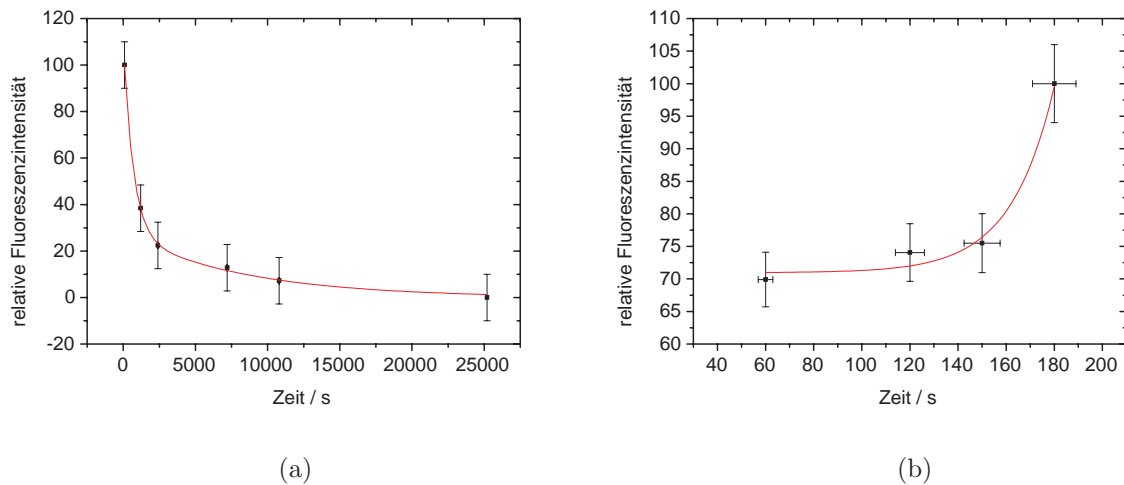


Abbildung 4.38: (a) Auf eine Sekunde Belichtungszeit normierte relative Fluoreszenzintensität: Lösung und Diffusion von AMCA-NH<sub>2</sub>-RKFWLLMPAV-CONH<sub>2</sub> (Abb. 4.37). (b) Lösung und Rekristallisation von AMCA-NH<sub>2</sub>-RKFWLLMPAV-CONH<sub>2</sub> in einer Dried droplet-Präparation mit 2,5-DHB.

sphäre geringer Dichte abgegeben wird, können einzelne Tropfen - soweit keine Mikrofluidcharakteristik einsetzt - in erster Näherung als „ballistische“ Objekte mit berechenbarer Trajektorie behandelt werden. Im Falle der Bildung eines heterogenen Sprühs mit einer deutlichen Größenverteilung sind die Verhältnisse

dagegen, von Beginn an, komplizierter. Um polydisperse Sprühs mit monodispersen Sprühs hinsichtlich physikalischer Prozessgrößen vergleichbar zu machen, werden i.d.R. bestimmte Tropfengrößen definiert. Hierzu zählen z.B. der  $d(43)$  oder der  $d(32)$  Durchmesser [106].

Auch die Jet-Druckverfahren erzeugen im Präparationsprozess Tropfen. Aus einem thermischen Verdampfungsprozess eines Teiles der Drucklösung, das sich in einem Kanalsystem befindet, wird ein kleines Volumen der Lösung mit hohen Geschwindigkeiten aus den Düsenöffnungen ausgetrieben. Die Düsen haben eine bestimmte geometrische Anordnung und kommen in den verwendeten Kartuschen in zwei unterschiedlichen Größen vor (siehe Abb. 4.45).

Tabelle 4.11: Dynamische Viskosität  $\eta$  einiger Fluide in  $\text{N s/m}^2$ .

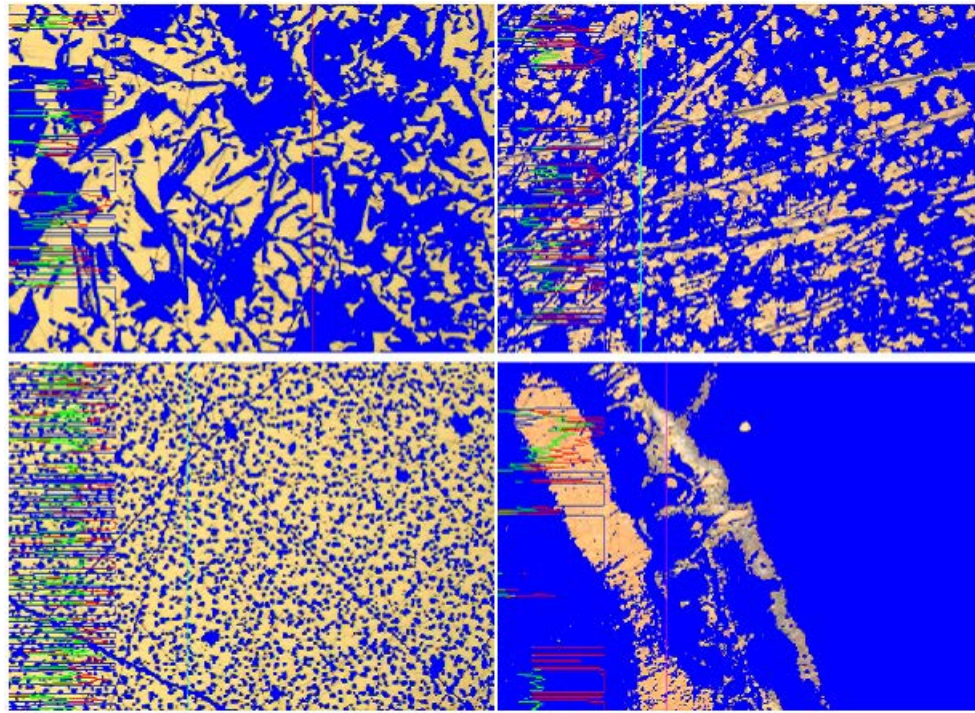
Fluid	Viskosität
Wasser <sup>1</sup>	$1.0 \cdot 10^{-3}$
Ethanol <sup>1</sup>	$1.2 \cdot 10^{-3}$
Aceton <sup>1</sup>	$3.6 \cdot 10^{-4}$
Acetonitril <sup>1</sup>	$3.7 \cdot 10^{-4}$
Methanol <sup>1</sup>	$5.8 \cdot 10^{-4}$
Glycerol <sup>1*</sup>	$1.5 \cdot 10^0$
Luft <sup>2</sup>	$1.7 \cdot 10^{-7}$
Stickstoff <sup>2</sup>	$1.7 \cdot 10^{-7}$

<sup>1</sup>: 20°C.  
<sup>2</sup>: 0°C.  
\*: In Mischungen mit  $H_2O$   $\eta \ll 1.5$ .

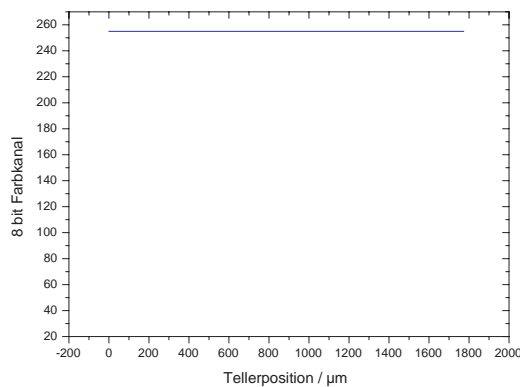
## 4.5.2 Zweikomponenten-Sprühtechnik

Die Zweikomponentensprühtechnik basiert auf der entwickelten mehrteiligen Sprühapparatur. Diese besteht, im einfachsten Aufbau, aus einer Kombination eines Sprühkopfes mit einer Kammer und einem Targethalter. Der ursprüngliche Sprühkopf setzt sich dabei aus einem Glasbehälter (ähnlich einer ICP-MS-Probenzerstäuber-Düse) mit waagerechtem Gasanschluss und einer gasdichten, manuell zu bedienenden und vertikal stehenden Hamiltonspritze zusammen. Die Präparationskammer (PTEG) steht in direkter Verbindung mit dem Sprühkopf und dem vertikal orientierten Elektromotor. Der Probenträgerhalter wird während der Präparation, durch den Gleichstromelektromotor, in Rotation versetzt. Die Drehzahl der Motorwelle ist dabei über ein Digitalvoltmeter kontrollierbar und kann mit einem Labornetzgerät (220V DC) über einen weiten Bereich stufenlos reguliert werden. Methodisch handelt es sich bei dem Sprühkopf um eine *Zweistoff-Düse innerer Mischung*. Die Öffnung des Sprühkopfes und das eingesetzte Target befinden sich während der Präparation in der fast vollständig geschlossenen Kammer. Der Präparationsraum ist damit im Verlauf des Sprühvorganges nur durch die Motorbelüftungsschlitze mit der umliegenden Atmosphäre direkt verbunden und wird vor dem Einsetzen des eigentlichen Sprühvorganges mit dem Reservoirgas, wobei es sich in der Regel um Stickstoff handelt, befüllt. Die Kammer hat im aufgebauten Sprühapparat außerdem die Funktion eines akustischen Resonanzkörpers. In Abbildung 4.39 sind exemplarische Matrixbedeckungen optisch markiert und im Vorlauf einer quantitativen Auswertung dargestellt. Abbildung 4.40 zeigt unterschiedliche Stadien bei der Entwicklung des Sprühkopfes im Auf-

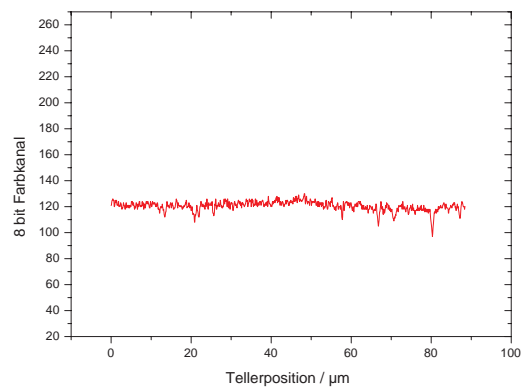




Matrixabdeckung mit unterschiedlichen Präparationsmethoden



Marker B-Wert



Hintergrund B-Wert

Abbildung 4.39: Optischer Vergleich der Matrixabdeckung durch vertikal gemittelte horizontale Linienscans in mikroskopischen Hellfeldauflichtbildern. Im jeweiligen Bildausschnitt wird das (real detektierte) RGB-Tupel der Matrix durch das (Marker-) RGB-Tupel(001) ersetzt. Im Anschluss wird dann der in eine Richtung über eine festzulegende Pixelanzahl gemittelte 8 Bit B-Kanal des Tupels gegen die Ortskoordinate der Linescanrichtung abgetragen (Tellerposition = Relative Position auf der Telleroberfläche). Es ist hierbei sinnvoll die Anzahl der gemittelten Linien in Abhängigkeit des Laserfokussdurchmessers zu wählen. Eine weitere Betrachtung z.B. die Ermittlung aller matrixtragender Pixel kann dann besonders einfach z.B. über eine binäre Zuordnung erfolgen (Matrix=1, keine Matrix=0). (Oben links) Dried droplet Präparation mit SA, (oben rechts) Spraypräparation mit 2,5-DHB, (unten links) Dried droplet-Präparation mit CHCA, (unten rechts) flächige Druckpräparation mit der Matrix 2,5-DHB [292].

bau der Apparatur. Abbildung 4.41 stellt die Auswertung der vergleichenden MALDI-Messungen dar, die in Abhängigkeit von den Parametern Gasvordruck und Matrixkonzentration untersucht wurden. Die Abbildungen 4.42 bis 4.44 stellen Ergebnisse der Auswertungen zu Parametervergleichen der Flussrate und Matrixkonzentration dar.

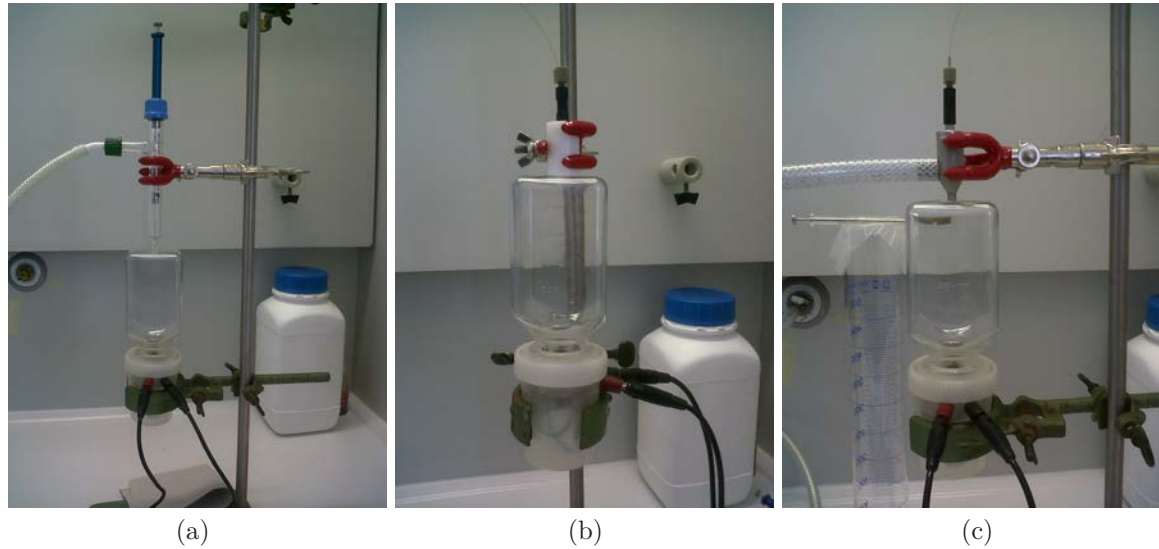


Abbildung 4.40: Zweikomponentenssprühapparatur mit verschiedenen Sprühköpfen und derselben Sprühkammer. (a) Aufbau mit gasdichter Hamiltonspritze (25  $\mu\text{l}$ ) und Glaskörper. (b) Testsprühkopf aus PP zur Untersuchung des zusammenhängenden Flüssigkeitsstrahlkerns. (c) Testsprühkopf aus PEEK.

Das in einem Zweikomponentenssprüh ausgebildete Aerosol zeigt i.d.R. eine heterogene Tropfengrößenverteilung (polydispenser Sprüh). Diese Verteilung ist theoretisch vorab nur schwer zu berechnen, praktisch dagegen aber relativ genau bestimmbar<sup>11</sup>. Als grobe Orientierung diene hier die, für den Sauterdurchmesser<sup>12</sup> ( $d_{32}$ ) an einer Zweistoff-Düse mit innerer Mischung, aufgestellte Gleichung nach [106]. Sie ist aber nur für die ursprünglich angenommene Düsen-Dimensionierung und Fluide vergleichbarer rheologischer Eigenschaften hinreichend aussagekräftig:

$$d_{32} = 585 \frac{\sqrt{\sigma}}{u \sqrt{\rho}} + 597 \left( \frac{\eta}{\sqrt{\sigma\rho}} \right)^{0.45} \left( \frac{1000 \dot{V}}{\dot{V}_{Gas}} \right)^{1.5} [\mu\text{m}] \quad (4.1)$$

Zusätzlich wird im Aufbau, in Abhängigkeit der Geometrie der Präparationskammer, im Präparationsraum eine bestimmte Strömung erzeugt. Die Strömung wird u.a. unterhalb des eingesetzten Proben-tellers turbulent, was unmittelbar über dem Target eine für die Tropfengrößenverteilung besonders günstige Gasbewegung entstehen lässt. Diese unterstützt einerseits die Trocknung einzelner Tropfen sowie andererseits auch die Koaleszenz unterschiedlich großer Tropfen, wobei die Tropfengröße dann über der Präparatfläche nur noch eine sehr flache Verteilung aufweist. Außerdem wird eine akustische Resonanz erzeugt, die einen Rückstau ausbildet. Dieser vermindert den Impuls der Gasströmung an der Kapillaröffnung der Düse. Der am Spraykopf einströmende Gasfluss kann mechanisch über ein Drosselventil (Nadelventil) mit Manometer in Druckabstufungen von ca.  $\Delta p = 0.2$  bar eingestellt werden. Bei einem (Vor)Druck von 1 bar beträgt der Volumenstrom des Trägergases ( $\text{N}_2$ ,  $T = 20^\circ\text{C}$ ) in etwa  $\dot{V}_G = 315 \text{ l h}^{-1} \pm 5 \text{ l h}^{-1}$ . Der Gasdruck wird im Rahmen von Vorversuchen und in Abhängigkeit des Präparationskammervolumens, der Kammerform und der Lösungszusammensetzung bestimmt. Hierbei muss die Oberflächenbeschaffenheit der zu bedeckenden Probe berücksichtigt werden, auf die alle Parameter abschliessend dann feinabgestimmt werden müssen.

Bei dieser Art der Präparation können positive Auswirkungen auf die Größe und die Form der erhaltenen

<sup>11</sup>Zum Beispiel mittels Laserbeugungsspektrometrie und Fourieranalyse.

<sup>12</sup>Der Sauterdurchmesser bezieht sich auf den Durchmesser eines monodispersen Sprühs mit gleicher volumenbezogener Oberfläche, als diejenige, die der erhaltenen polydispersen Verteilung entspricht.



Kristalle beobachtet werden. Es wird unter vollständig manueller Bedienung der Spritze und bei wiederholten Sprühvorgängen (Sprühzyklen), eine besondere Qualität einer Matrixschichtung erreicht. Diese zeichnet sich durch eine sehr homogene und feinkristalline Verteilung der Matrix aus.

Bei den Ausgangsparametern der Sprühtechnik handelt es sich um:

- die Matrix selbst und ihre Konzentration (Massestrom  $\dot{m}$ ),
- das Trägergas und den Volumenstrom  $\dot{V}_G$  bei einem bestimmten Vordruck (Massestrom  $\dot{m}$ ),
- die Kammergeometrie (Strömungsprofil und akustische Resonanz),
- die Flussrate der Lösung (Volumenstrom  $\dot{V}$ ),
- die chemische Zusammensetzung der Lösung<sup>13</sup>,
- die Bewegungsart des Targethalters und in deutlich geringerem Ausmaß, die Geschwindigkeit der Targetbewegung.

Weiterhin können die bedeutsamen physikalischen Ausgangsparameter des Sprühkopfes bzw. der Düse benannt werden. Diese sind im Wesentlichen:

- der Innendurchmesser und das Material der Sprühkapillare sowie die Geometrie der Öffnung,
- der Durchmesser des gasführenden Kanals (Vorkammer) sowie dessen Geometrie und Oberflächenbeschaffenheit,
- der Trägergasdruck sowie der Durchmesser des Gasreservoirs und die Geometrie des Übergangsbereiches.

Der am Durchmesser  $d$  der konvergenten Düse austretende Gasmassenstrom beträgt in etwa:

$$\dot{m}_G = \frac{\pi d^2}{4} p_{G_0} \sqrt{\frac{2}{R T_0}} \Psi \quad [kg/s] \quad (4.2)$$

wobei die dimensionslose Ausflussfunktion  $\Psi$  die Massenstromdichte ( $\rho_G u$ ) beschreibt:

$$\Psi = \frac{\rho_G u}{\sqrt{2 p_{G_0} \rho_{G_0}}} \quad (4.3)$$

Der Index 0 bezeichnet dabei den Zustand an der Stelle der größten Ausdehnung des Gaskanals im Sprühkopf. Das Druckverhältnis erlangt den kritischen Wert, wenn an der Mündung die Schallgeschwindigkeit erreicht wird. Für Luft ergibt sich dabei ein Betrag von in etwa  $\Psi \approx 0.484$  [106]. Die Position der Sprühkapillare im gasführenden Kanal (Vorkammer) beeinflusst, neben der Oberflächenspannung der versprühten Lösung und der Gaszusammensetzung, die Tropfenbildung bzw. den Tropfenabriss und damit die Länge des zusammenhängenden Strahlkerns. Sie ist vor allem im Zusammenhang mit der Gaskanalgeometrie im einsetzenden Zerstäubungsprozess entscheidend [291].

Um eine Zweikomponentenzerstäubung ausreichend charakterisieren zu können, müssen zumindest ansatzweise die sich ausbildenden Strömungsform(en) bekannt sein. Hierbei sind das dimensionslose Massestromverhältnis des Gases zum Gesamtmassenstrom,

$$\dot{x} = \frac{\dot{m}_G}{\dot{m}_G + \dot{m}}, \quad (4.4)$$

---

<sup>13</sup>Polarität, Viskosität, Dampfdruck.

das auf Normdruck von Luft und Wasser bezogene dimensionslose Dichteverhältnis,

$$\rho' = \sqrt{\frac{\rho_G}{\rho_{Luft}} \frac{\rho}{\rho_{Wasser}}} \quad (4.5)$$

und der Einfluss der Oberflächenspannung ( $\sigma$ ) sowie der dynamischen Viskosität ( $\eta$ ),

$$\nu = \frac{\sigma_{Wasser}}{\sigma} \left( \frac{\eta}{\eta_{Wasser}} \left( \frac{\rho}{\rho_{Wasser}} \right)^2 \right)^{1/3}, \quad (4.6)$$

der Fluide zu bestimmen bzw. zu berücksichtigen. Das Massestromverhältnis wirkt sich auf die Schallgeschwindigkeit an der Düsenmündung aus. Diese kann ggf. deutlich unter der Schallgeschwindigkeit in den reinen Bezugsfluiden liegen,  $c_{Wasser} \approx 1500 \text{ m/s}$ ,  $c_{Luft} \approx 330 \text{ m/s}$  [291]. Im Rahmen der Testphase der entwickelten Zweikomponentensprühapparatur sind hierzu Experimente mit einem, unmittelbar an der Düsenmündung angebrachten, Kondensatormikrophon durchgeführt worden. Diese belegen einen erkennbaren Drift im Frequenzspektrum, sobald das Massenstromverhältnis  $\mu = \frac{\dot{m}_G}{\dot{m}}$  sprunghaft verändert wird (Die Daten hierzu sind nicht dargestellt). Es wird angenommen, daß die Präparationskammer auch als akustischer Resonator dient. Hierzu sind Tests mit unterschiedlichen Kammergeometrien durchgeführt worden. Aus der Kombination einer Zweistoff-Düse mit einem akustischen Resonator können die sehr kleinen Tropfendurchmesser, die i.d.R. kleiner ausfallen als über Gleichungen der Düsencharakterisierung berechnet wird, erklärt werden.

### Sekundärer Tropfenzerfall

Die in einem Sprüh erzeugten primären Tropfen können durch die Gasströmung weiter zerteilt werden. Dieser Prozess ist besonders geeignet, um eine flachere Größenverteilung zu erhalten. Betrachtet wird, der Einfachheit halber, zunächst ein ruhender (ideal) kugelförmiger Tropfen, auf den ein Gasstrom einwirkt. Der Tropfen setzt dem Gasstrom eine sogenannte aerodynamische Widerstandskraft entgegen [291]:

$$F_W = \frac{\rho_G}{2} v_G^2 \frac{\pi d_{Tropfen}^2}{4} c_W [N] \quad (4.7)$$

Mit  $c_W$  dem dimensionslosen Widerstandsbeiwert. Die Oberflächenspannungskraft des Tropfens wirkt dabei seiner Zerteilung entgegen:

$$F_\sigma = \pi d_{Tropfen} \sigma [N] \quad (4.8)$$

Aus beiden Gleichungen ergibt sich dann das Stabilitätskriterium eines angeströmten statischen Tropfens:

$$\frac{\rho_G}{2} v_G^2 \frac{\pi d_{Tropfen}^2}{4} c_W = \pi d_{Tropfen} \sigma \quad (4.9)$$

Wie bei der Beschreibung der primären Tropfenbildung in einem Sprüh werden, bezogen auf die sekundäre Tropfenbildung, Verhältniszahlen definiert. Diese sind bei einer näheren Charakterisierung hilfreich. Zum einen ist dies die sogenannte Gas-Weberzahl:

$$We_G \equiv \frac{\rho_G v_G^2 d_{Tropfen}}{\sigma} = \frac{8}{c_W} \quad (4.10)$$

Sinnvoller Weise wird die Stabilitätsbetrachtung in realen Sprühs auf die kritische Relativgeschwindigkeit (d.h. auch der Tropfen bewegt sich) und einen kritischen Tropfendurchmesser bezogen:

$$v_{kritisch} = \sqrt{\frac{8 \sigma}{c_W \rho_G d_{Tropfen}}} [m/s] \quad (4.11)$$

$$d_{kritisch} = \frac{8 \sigma}{c_W \rho_G v_{relativ}^2} [m] \quad (4.12)$$

Um die Flüssigkeitsviskosität und Schwingungseinflüsse zu berücksichtigen wird weiterhin noch die, auf den sekundären Tropfenzerfall bezogene, Ohnesorgezahl verwendet:

$$Oh_T = \frac{\eta}{\sqrt{\sigma \rho d_{Tropfen}}} \quad (4.13)$$

Empirisch wird dann eine kritische Gas-Weberzahl gefunden, bei deren Überschreiten ein sekundärer Tropfenzerfall erwartet werden kann:

$$We_G > \frac{8}{c_W} + 14 Oh_T \quad (4.14)$$

Berücksichtigt werden muss, das die angenommenen Ausgangsbedingungen über die Tropfengröße und die Relativgeschwindigkeit im Verlauf der Sprühbildung nicht konstant sind.

Ebenso kann die Zeit, die für einen Tropfenzerfall benötigt wird, abgeschätzt werden [291]:

$$t_{Zerfall} \approx 2.8 \frac{d_{Tropfen}}{v_{relativ}} \sqrt{\frac{\rho}{\rho_G}} [s] \quad (4.15)$$

### Overspray

Zweikomponentensprüher mit innerer Mischung neigen bekanntermaßen zur Ausbildung eines sogenannten *Oversprays* [291]. Aufgrund der teilweise sehr klein werdenden Tropfen sinkt die Masse der Tropfen und die Relativgeschwindigkeit geht gegen Null. Es handelt sich hierbei um ein Phänomen der *Mikrofluidik*. Die Tropfen folgen dann der ausgebildeten Gasströmung und werden dabei nicht nur auf die zu beschichtende Oberfläche transportiert. Im vorliegenden Sprühaufbau verbleibt, im optimierten Betrieb, deshalb der überwiegende Teil des Sprays an den Wänden der Präparationskammer. Der Anteil des Oversprays geht dann einerseits für die Präparation verloren, ist aber andererseits ein deutliches Qualitätsmerkmal kleiner Tropfen mit einer engen Größenverteilung im Sprüh. Diese erzeugt ihrerseits dann eine flache Mengenverteilung der Matrix, bezogen auf die Fläche der zu beschichtenden Probe (siehe auch Abb. 5.6).

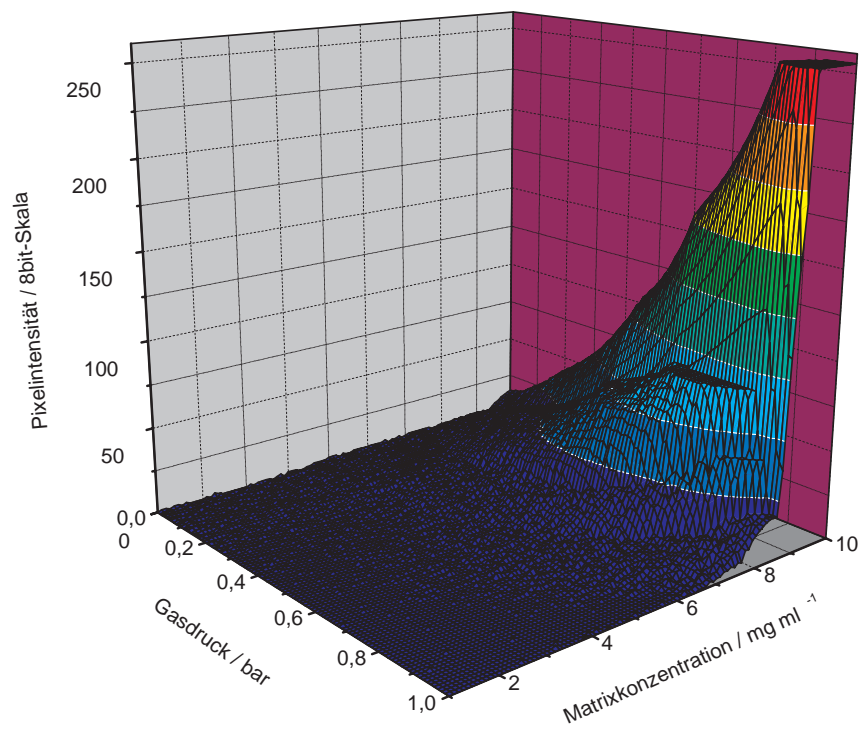


Abbildung 4.41: Dargestellt ist die Entwicklung der mittleren 2,5-DHB-Signalintensität ( $m/z$  137) in Linienrasterspektren (ein Puls pro Pixel). Abhängigkeit von der Matrixkonzentration und dem Gasvordruck. Verwendet wird eine manuelle gasdichte Hamiltonspritze mit einer mittleren Flussrate zwischen  $5 \mu\text{l}/\text{min} > f > 1 \mu\text{l}/\text{min}$ . Versprüht wurde jeweils der mittlere Bereich eines Spritzenvolumens, d.h. ca.  $20 \mu\text{l}$  (Spritzenfassungsvermögen  $25 \mu\text{l}$ ). Die Linienscans gehen über die gesamte Oberfläche eines goldbeschichteten Aluminiumtargets. Durchmesser ca.  $20000 \mu\text{m}$  (2 cm). Lösungsmittel: EtOH/0.1% TFA 1:1 (v/v). Messung am Spektrometer LAMMA 2000, Targetebene im fokalen Bereich b, Bestrahlung: ca. 1.5-fache Schwellbestrahlung von 2,5-DHB.

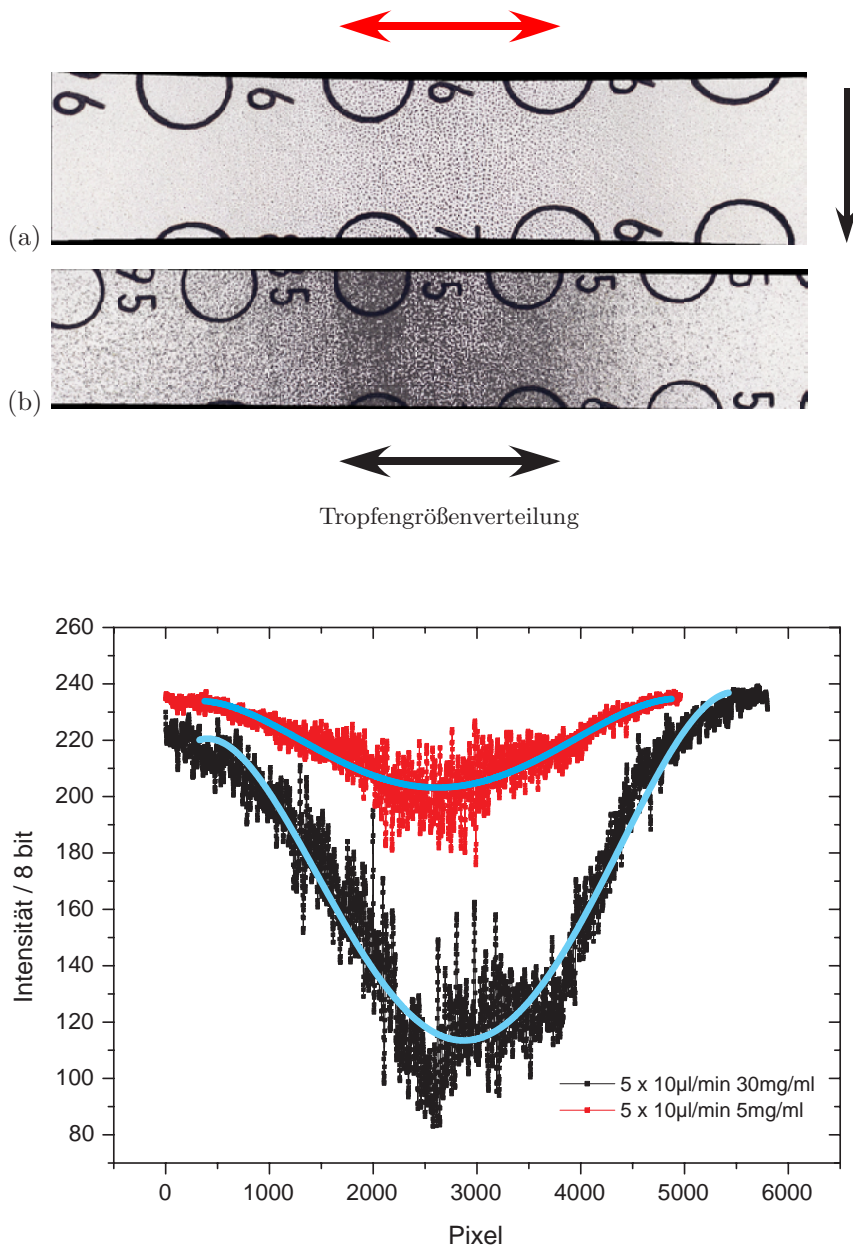


Abbildung 4.42: (a, b) Gezeigt sind Ausschnitte vertikal besprühter AB Sciex Targets. Die Translationsrichtung (Spraylinienrichtung) liegt im Bild senkrecht  $\downarrow$ . Im mittleren Bereich von (a, b) ist die waagerechte Sprayverteilung zu erkennen. (a)  $5 \times c = 5 \text{ mg/ml}$  2,5-DHB. (b)  $5 \times c = 30 \text{ mg/ml}$  2,5-DHB. Diagramm: Dichteverteilung der aufgetragenen Matrix. Ermittlung anhand von UV-VIS-Reflexionsmessungen in der Form vertikal gemittelter horizontaler optischer Linienscans. Pixelgröße von (a) ca.  $1.3 \mu\text{m}$ , Pixelgröße von (b) ca.  $3.2 \mu\text{m}$ . Deutlich erkennbar ist die erhaltene eingipflige Dichteverteilung. Sollflussrate ca.  $10 \mu\text{l/min}$ , Translationsgeschwindigkeit des Sprühkopfes in x-Richtung ca.  $95 \text{ mm/min}$ . Abstand der Sprühkapillare zum internen Referenzpunkt ca.  $10 \text{ mm}$ . Lösungsmittelzusammensetzung beider Matrixkonzentrationen EtOH/H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v).

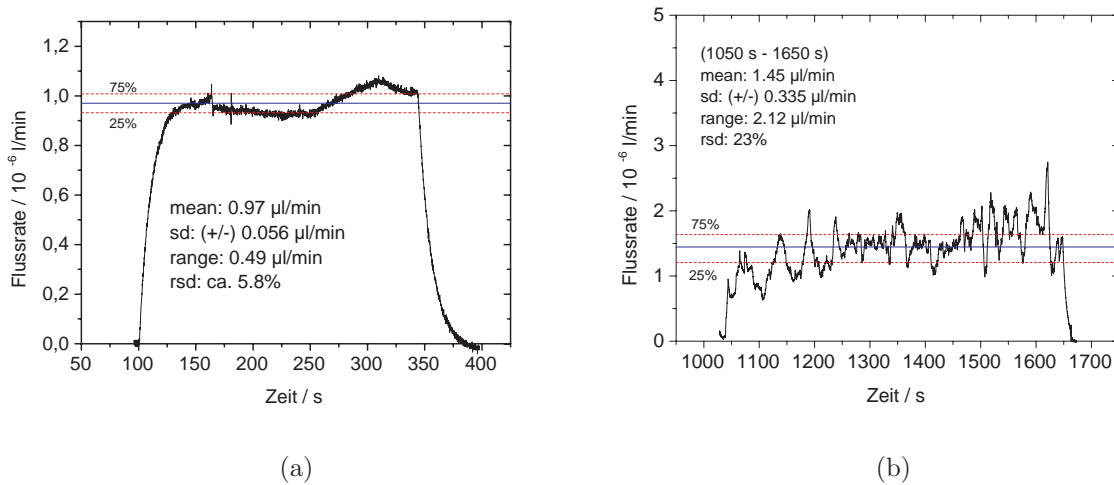


Abbildung 4.43: Flussratenvergleich unter Präparationsbedingungen. (a) Spritzenpumpe (Harvard Pump 11), Sollflussrate 1 µl/min, 250 µl Hamiltonspritze. (b) 25 µl gasdichte Hamiltonspritze, manuelle Bedienung. Nach Integration (über 644 s) ergibt sich ein Sprühvolumen von 14.7 µl. Eine manuelle Präparation von 20 µl benötigt somit in etwa 15 min (14.6 min).

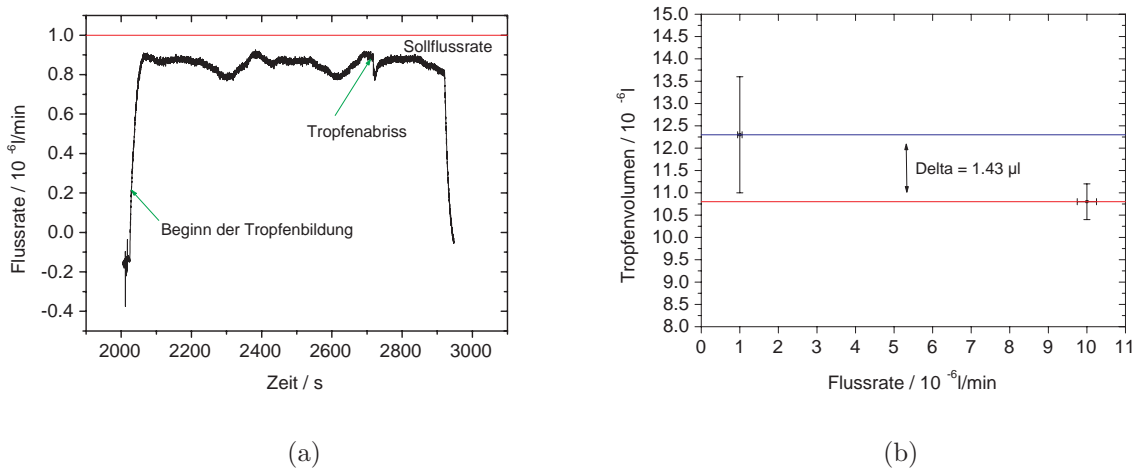


Abbildung 4.44: (a) Im Versuchsaufbau mit der Spritzenpumpe kann die Sollflussrate dauerhaft nicht erreicht werden. Ein dauerhaftes übertreffen der Sollflussrate konnte in den Versuchen dagegen nicht festgestellt werden. Bei der Tropfenbildung am Kapillarende und dem Abtropfen in eine statische Gasatmosphäre zeigen sich, unmittelbar zum Zeitpunkt des Abscherens eines Tropfens, Schwankungen im Wärmefluss des Sensors, bei denen nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie mit dem Abtropfen in direktem Zusammenhang stehen. In der Abbildung ist dem Ereignis eine periodische Schwankung überlagert. Dargestellt ist die Flussrate während kontrollierter Tropfenbildung und Tropfenabriss an einer PEEK-Kapillare mit planem Kapillarende (AD = 1/16 °, ID = 500 µm, Länge = 32 mm). (b) Unmittelbar vor der Abtropfung bei lotrechter und ortsfester Positionierung der Kapillare, aus der Integration der Flussrate, ermitteltes Tropfenvolumen (PEEK-Kapillare: AD = 1/16 °, ID = 500 µm, Länge = 32 mm). Es zeigt sich eine „Tendenz“ zu kleineren Tropfenvolumen bei höheren Flussraten. Aufgrund der hohen Standardabweichung bei kleiner Flussrate ist aber keine definitive Aussage, anhand dieser Ergebnisse möglich.

### 4.5.3 Drucktechnik

Als Druckapparatur wird in dieser Arbeit ein modifizierter kommerzieller Deskjet-Drucker des Herstellers HP vom Typ 550 D verwendet (Abbildung 4.45) [51] [292]. Zur Aufnahme der Lösungen werden geöffnete HP-Patronen eingesetzt, die eine Tropfenerzeugung durch einen thermisch erzeugten Jet, nach dem sogenannten Droplet-On-Demand-Prinzip (DOD) ermöglichen. Vor dem Umbau der Farbstoffpatronen wird zunächst deren Funktionsfähigkeit und die Durchlässigkeit aller Düsen mit dem originalen Farbstoffgemisch (schwarz) des Herstellers getestet. Danach erfolgt eine grobe Justierung des Targets, die nach Testdrucken dann mit einer Mikrometerschraube feinjustiert wird. Die Mikrometerachse befindet sich während eines Druckvorgangs unterhalb der axialen Position der Druckkartusche. Nach dem Funktionstest der schwarzen Originalfarbstoffpatronen muss ein Reinigungsprotokoll mit Lösungsmitteln (Aceton, Wasser, Ethanol) zur vollständigen Säuberung von Farbstoffresten und Ablagerungen durchgeführt werden. Das Reinigungsprotokoll sieht dabei einen kontinuierlichen Fluss in Druckrichtung vor. Dieser kann z.B. durch Kontakt mit einem großflächig ausgebreiteten Zellulosetuch hergestellt werden. Je nach Probenträgermaterial müssen unterschiedliche Abstände zu den Druckdüsen eingestellt werden, um mit identischen Lösungen vergleichbare Druckergebnisse zu erhalten.

Die Ansteuerung des Druckers erfolgt aus der ULISSES-Umgebung oder mit einem beliebigen Textverarbeitungsprogramm. Aus ULISSES können geometrische Punktmuster mit unterschiedlichem Rasterabstand sowie Präparationen mit flächigem Auftrag hergestellt werden.

Ein reproduzierbares mehrfaches Drucken auf diskrete Positionen ist mit diesem einfachen Verfahren nicht möglich. Mehrmaliges Bedrucken einer größeren Fläche (ca.  $3 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$ ) ist dagegen gut handhabbar.

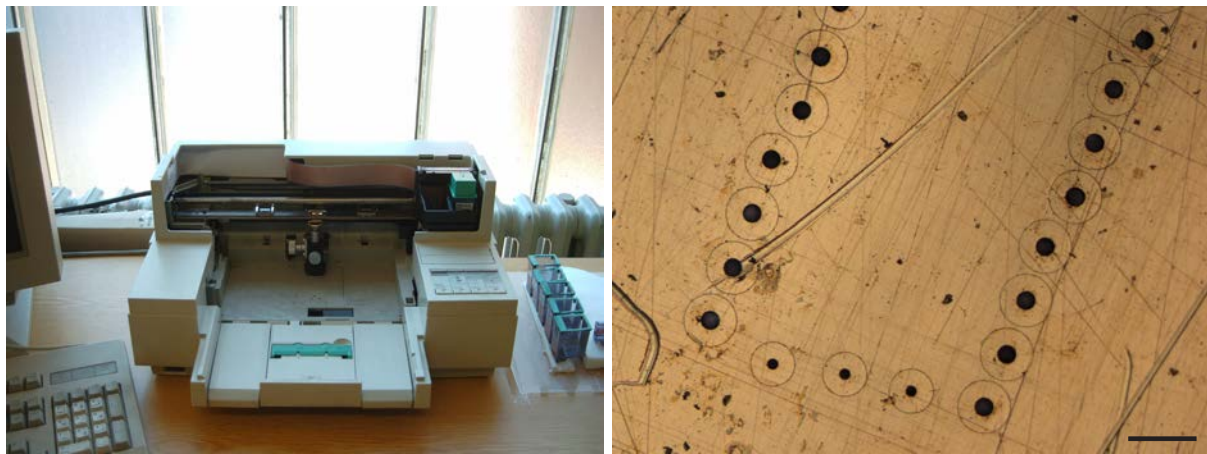


Abbildung 4.45: Modifizierter Deskjet-Drucker von HP mit speziell präparierten Druckkartuschen, zu erkennen am rechten Bildrand. (Rechts) Anordnung der unterschiedlich großen Druckdüsen am Boden der Druckkartusche. Messbalkenlänge, rechte Bildunterseite:  $100 \mu\text{m}$ .



## **Teil II**

# **Ergebnisse und Diskussion**



## Kapitel 5

# Ergebnisse der Experimente zur Präparation und MS-Charakteristik

### 5.1 Probenpräparation

#### 5.1.1 Beobachtungen zum Lösungsmiteleinschluss und Salzkontamination

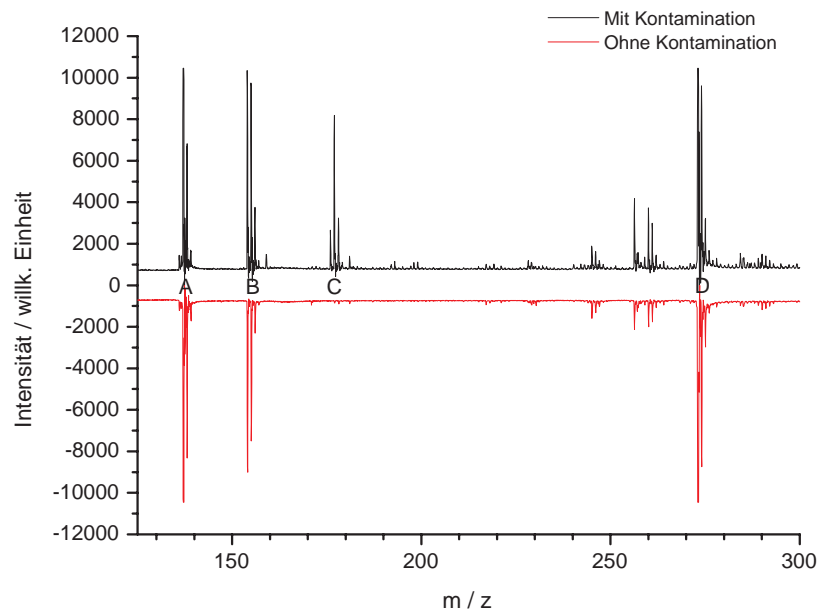
An mittels dried droplet hergestellten Präparationen mit der Matrix 2,5-DHB kann bei einem hohen Wasseranteil in der Präparationslösung und langsamer Trocknung unter mikroskopischer Beobachtung ein deutlicher „Lösungsmiteleinschluss“ bzw. eine Hohlräumbildung im Präparat beobachtet werden. Inwieweit dabei Lösungsmittel in oder wahrscheinlicher zwischen einzelne wachsende Kristalle eingelagert wird, kann auf diese Weise aber nicht differenziert ermittelt werden. Aufgrund der, gegenüber dried droplet-Präparationen, deutlich verringerten Volumina (i.d.R. einige Nanoliter) und dem Prozess der Tropfenbildung, bleibt der beobachtete Effekt an Druckpräparationen und Sprühpräparationen, bei denen eher kleine Kristalle und/oder amorphe Matrixbereiche erzeugt werden, dagegen aus. Ein typisches Massenspektrum der Matrix 2,5-DHB ( $\lambda = 337$  nm) im Massenintervall von  $m/z$  100 bis  $m/z$  300 enthält die Signalgruppen A bis D (siehe Abb. 5.1 a). Hierbei handelt es sich um die Multiplets der Spezies:

- $[M - H_2O + H]^+ = 137.02$  u (**A**)
- $[M]^{\bullet+} = 154.03$  u (**B**)
- $[M + Na]^+ = 177.02$  u (**C**)
- $[2M - (H_2O)_2 + H]^+ = 273.04$  u (**D**)

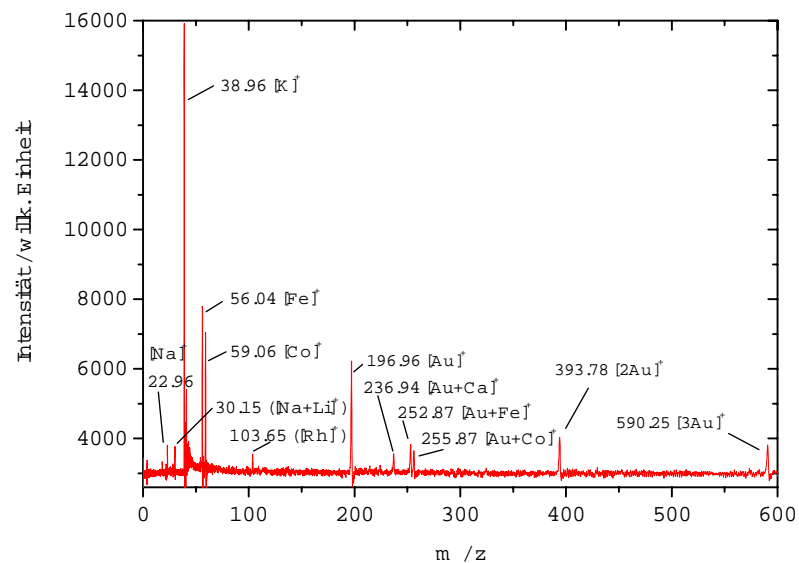
Neben diesen Ionenspezies treten noch die Ionen  $[M + H]^+ = 155.03$  u und  $[M + K]^+ = 192.99$  u auf. Es zeigt sich bei den in Abbildung 5.1 dargestellten Messungen, daß eine geringfügige Salzkontamination (hauptsächlich NaCl) in einer Präparation das Verhältnis der Signalgruppen A/B gegenüber der Situation ohne Kontamination verschieben kann. Hierbei scheint die Bildung der Spezies  $[M - H_2O + Na]^+$  bei einer Kontamination das Verhältnis von A/B nicht in gleichem Umfang zu beeinflussen, wie die Bildung der Spezies  $[M + Na]^+$ . Weiterhin bleibt das Verhältnis von A/D bei einer Kontamination nahezu konstant. Die Bildung der Spezies  $[M + Na]^+$  überwiegt gegenüber der Bildung der Spezies  $[M - H_2O + Na]^+$ . Die dargestellten Beispielspektren sind mit einer identischen Bestrahlung, (z-) axialen Probenposition und vergleichbarer Pulszahl (22 bzw. 23 Messungen) an einer Probenstelle der jeweiligen Präparation, aufgenommen. Der Totalionenstrom im betrachteten Massenintervall steigt bei einer geringfügigen Kontamination mit NaCl um rund 6 % an, was hauptsächlich durch die zusätzlich erzeugten Quasimoleküli-Ionenspezies mit Natrium und in geringerem Umfang mit Kalium erklärt werden kann. Ein signifikanter

qualitativer Unterschied bei der Vermessung von 2,5-DHB-Matrix mit den Wellenlängen  $\lambda = 337$  nm und  $\lambda = 349$  nm konnte nicht festgestellt werden, d.h. mit beiden Wellenlängen werden die identischen Ionenspezies erzeugt. Ein quantitativer Unterschied in der relativen Intensitätsverteilung ist dagegen feststellbar (Abb. 5.71).

Bei zentrischer Laserstrahljustierung und Bestrahlungen, die deutlich über der Schwellbestrahlung von 2,5-DHB liegen, kann mit beiden Wellenlängen und Strahlprofilen eine Desorption von Goldionen aus der Oberflächenbeschichtung des Aluminiumprobenträgers festgestellt werden (siehe Abb. 5.1 b). Neben dem, wie im Übersichtsspektrum in Abbildung 5.1 b erkennbaren, Zusatz von Co und Fe können in den unterschiedlichen Goldbeschichtungen auch (nachweisbare) Anteile an Ag, Mn, Cr und Cu enthalten sein (nicht dargestellt). Ein Einfluss dieser Elemente auf die Bildung von Quasimolekülen biologischer Spezies konnte in den Messungen nicht festgestellt werden.



(a)



(b)

Abbildung 5.1: (a) Gegenüberstellung der Signalcharakteristik von 2,5-DHB Präparationen mit und ohne Salzkontamination. Bei den Kontaminationen handelt es sich um den Eintrag von Natrium- und Kaliumsalzen. Wie in der Übersicht erkennbar wird, haben die Salzkontaminationen (Hauptpeaks, C) i.d.R. keinen signifikanten Einfluss auf die relative Intensitätsverteilung der übrigen 2,5-DHB-Massensignale im niedrigen Massenintervall. Dargestellt ist jeweils ein Summenspektrum über mehrere Messungen an einer Probenstelle. Ohne Kontamination:  $A/B \approx 1.3$ ,  $A/D \approx 1$ . Mit Kontamination:  $A/B \approx 1$ ,  $A/D \approx 1$ . Der TIC ohne Salzkontamination im Massenintervall beträgt ca.  $4.7 \cdot 10^6$  (willk. Einheit). Der TIC mit Salzkontamination liegt etwas höher, bei ca.  $5 \cdot 10^6$  (willk. Einheit). Aufnahme am Spektrometer ALADIM II. (b) Ablation der Oberflächenbeschichtung eines Targets bei höherer Bestrahlung. Erkennbar sind die Signale von Gold und weiteren chemischen Elementen. Aufnahme am Spektrometer LAMMA 2000 (siehe Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Massesignale aus der Targetbeschichtung bei höherer Bestrahlung. Rundung auf die zweite Nachkommastelle. Die Massen 30.15 u, 103.65 u sind, aufgrund der hohen Massenabweichung zur angenommenen Zusammensetzung, nicht sicher bestimmt. Die Bimetallspezies  $\text{NaLi}^+$  ist eher aus der LMIS-MS (*liquid metal ion source-ms*) bekannt [293]. Das Element Fe konnte dagegen sicher bestimmt werden, da im Spektrum auch das Isotop  $^{54}\text{Fe}$  auftritt. Bei Co (Kobalt) handelt es sich um ein Reinelement, wie auch bei Au (Gold) und Rh (Rhodium). Das Spektrometer wurde vor der Messung mit einer linearen Regression und drei Stützmassen kalibriert.

Peakzentroid	Theoretische Masse	$\delta$ m
22.96 u	22.99 u	- 1305 ppm
30.15 u	30.01 u	4665 ppm
38.96 u	38.96 u	0 ppm
56.04 u	55.93 u	1967 ppm
59.06 u	58.93 u	1867 ppm
103.65 u	102.91 u	7191 ppm
196.96 u	196.97 u	- 51 ppm
236.94 u	236.93 u	42 ppm
252.87 u	252.90 u	- 12 ppm
255.87 u	255.90 u	- 12 ppm
393.78 u	393.93 u	- 38 ppm
590.25 u	590.90 u	- 110 ppm

Tabelle 5.2: Parameterkombinationen der goldbeschichteten Aluminiumtellermessung am Spektrometer LAMMA 2000.

Geräteparameter	
Targetpotential	: 10 kV
Blendenpotential	: 7.5 kV
Gitterpotential	: 0 kV
MCP-Potential	: - 2.0 kV
z-Achsenposition	: in b*, fix
Laserpulsenergie	: ca. 51 $\mu\text{J}$
Abschwächung	: 15
ND-Filter	: kein Filter
Restgasdruck	: ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Raumtemperatur	: ca. 19°C
* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.	
Präparationsparameter	
Target	: Aluminiumteller, vergoldet

### 5.1.2 Beobachtungen zur Kristallisation der MALDI-Matrix 2,5-DHB

Im Zusammenhang mit dem Drucken der Matrix 2,5-DHB kann bei Verwendung von organischen Lösungsmitteln wie Aceton (Propanon, aprotisch-polar) oder THF (Tetrahydrofuran, aprotisch-unpolar) an den erhaltenen Präparationen ein signifikant höherer Anteil mit Bereichen einer zu größeren Wellenlängen verschobenen Fluoreszenz festgestellt werden (grün, *bathmochromic shift*). An Dried droplet-Präparationen und Sprühpräparationen mit einem hohen Anteil an organischen Lösungsmitteln (Anteil  $\geq 50\%$  v/v) tritt dieses Phänomen auch auf. Es deutet aber einiges darauf hin, daß bei dem Druckvorgang, zumindest in den amorph erscheinenden Bereichen, aufgrund der an den Heizelementen erreichten hohen Temperaturen ( $T \approx 300^\circ\text{C}$ ) eine glasartige Struktur der Matrix gebildet werden kann. Diese Matrixablagerungen in so fluoreszierenden Bereichen zeigen dann auch keine Löslichkeit mehr, in den zuvor verwendeten Lösungsmitteln. Es finden sich auch in Dried droplet- und Sprühpräparationen Kristalle, die ebenfalls einen Shift in der Fluoreszenz zeigen, ihre Löslichkeit in den verwendeten Lösungsmitteln aber dennoch beibehalten (Abbildung 5.3). Massenspektren von diesen Kristallen zeigen keine signifikanten Unterschiede in den relativen Häufigkeiten der Peakmuster, gegenüber Spektren die von ausschliesslich im blauen Wellenlängenbereich fluoreszierenden Kristallen erhalten wurden. In den Spektren, die von den amorphen und grün fluoreszierenden Bereichen aufgenommen werden, zeigen die 2,5-DHB Peaks niedrige Signalintensitäten. Nähere Untersuchungen zur Charakterisierung der amorphen Bereiche oder der Kristalle, mit dazu geeigneten Analysemethoden (z.B. Kristallstrukturbestimmung), sind im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt worden. In Abbildung 5.2 sind Ergebnisse von Dried droplet-Präparationen bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen dargestellt. Es wird nach den CLSM-Messungen an größeren 2,5-DHB-Kristallen vermutet, daß Störungen im Kristallisationsprozess, aufgrund von plötzlichen Veränderungen in den Umgebungsbedingungen zu einer verstärkten Bildung von „Hohlräumen“ (unter Atmosphärendruck) führt. Diese zunächst mit Flüssigkeit gefüllten Bereiche können in den CLSM-Messungen (unter Vakuumbedingungen) als Hohlräume identifiziert werden. Zum Vergleich sind Regionen des Probenargets mit mehreren Riefen abgebildet, die im CLSM-Bild als schwarze Bereiche erkennbar sind.



Tabelle 5.3: Parameterkombinationen der 2,5-DHB-Vermessungen am Spektrometer ALADIM II.

Geräteparameter	
Targetpotential	: 18.9 kV
Blendenpotential	: 14.7 kV
DE-Zeit	: 190 ns
Gitterpotential	: - 5.1 kV
Konversionsdynode	: - 9.1 kV
Reflektor 1	: 12.2 kV
Reflektor 2	: 23.3 kV
MCP-Potential	: - 2.2 kV
z-Achsenposition	: in b*, fix
Laserpulsenergie	: ca. 200 $\mu J$
Abschwächung	: 67
ND-Filter	: kein Filter
Restgasdruck	: ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Raumtemperatur	: ca. 19°C
* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.	
Präparationsparameter	
Matrix	: 2,5-DHB
Molmasse	: 154.7 Da
Summenformel	: $C_7H_6O_4$
Konzentration	: 10 mg/ml
Lösungsmittel	: EtOH/0.1% TFA, 3:7 (v/v)
Präp.-Technik	: Dried droplet
Raumtemperatur	: ca. 18°C
Umgebungsgas	: Luft
Präparationszeit	: ca. 1 min.
Target	: Aluminiumteller, vergoldet

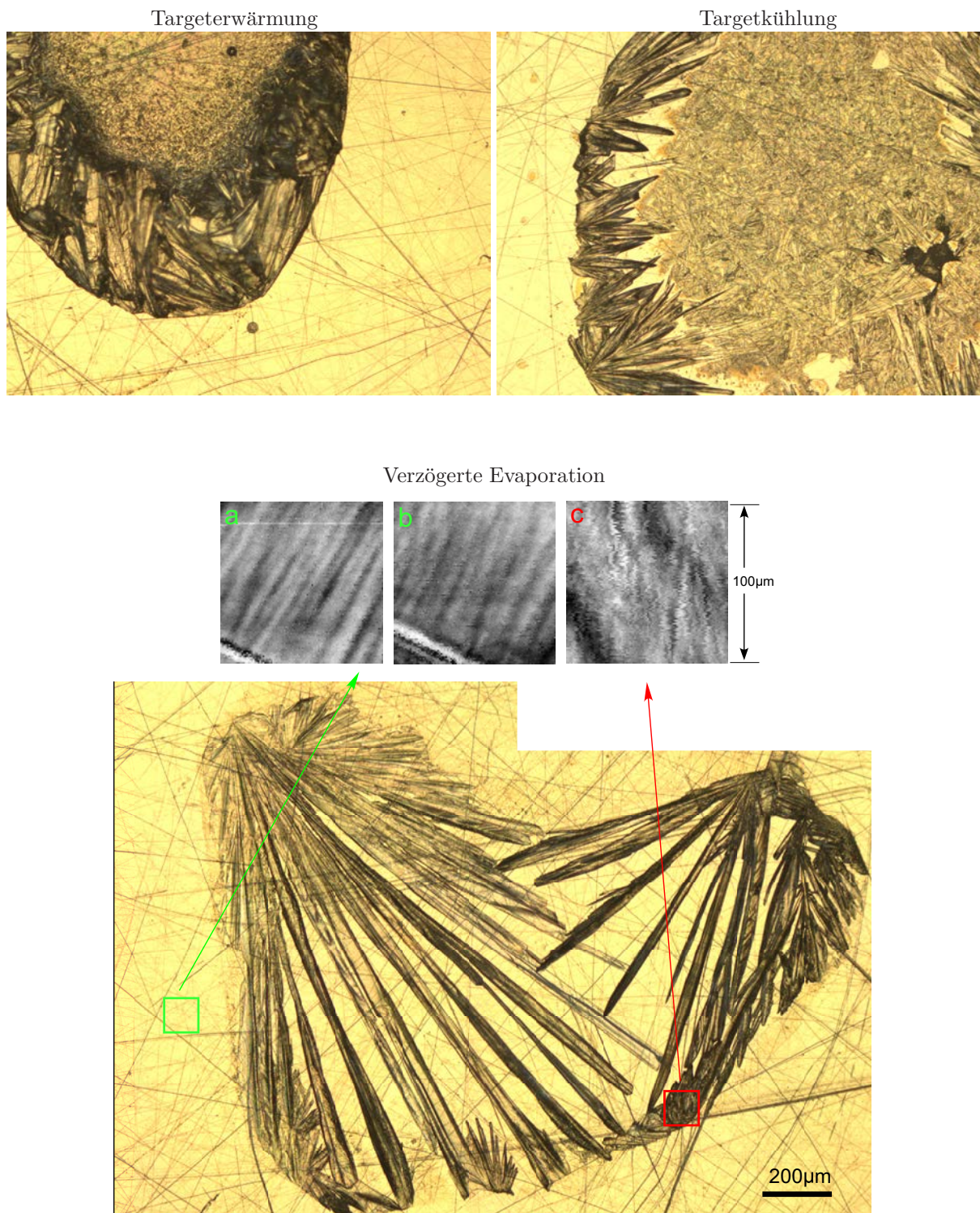


Abbildung 5.2: (Oben links) Dried droplet-Präparation mit 2,5-DHB und schnelle Trocknung durch einen erwärmten Luftstrom (ca.  $60^{\circ}\text{C}$ - $70^{\circ}\text{C}$ ). (Oben rechts) Dried droplet-Präparation und Kühlung vor dem vollständigen Verdampfen der Lösungsmittel auf ca.  $7^{\circ}\text{C}$ . (Unten) Dried Droplet Präparation mit verzögerter Evaporation. CLSM-Abbildungen aus den markierten Bereichen, (a, b) blankes Target, (c) Randbereich der Kristallisation. Das Target ist zu den CLSM-Messungen auf den Matrixkristallen so positioniert, daß die höchsten Stellen im Laserfokus liegen. Im CLSM-Bild (c) sind sehr wahrscheinlich Kristallhohlräume, aufgrund von Wassereinlagerungen zu erkennen (schwarze Bereiche). Der Größenmaßstab unten rechts ist für alle Weitfeldaufnahmen zutreffend.

## Fluoreszenz an Matrixkristallen

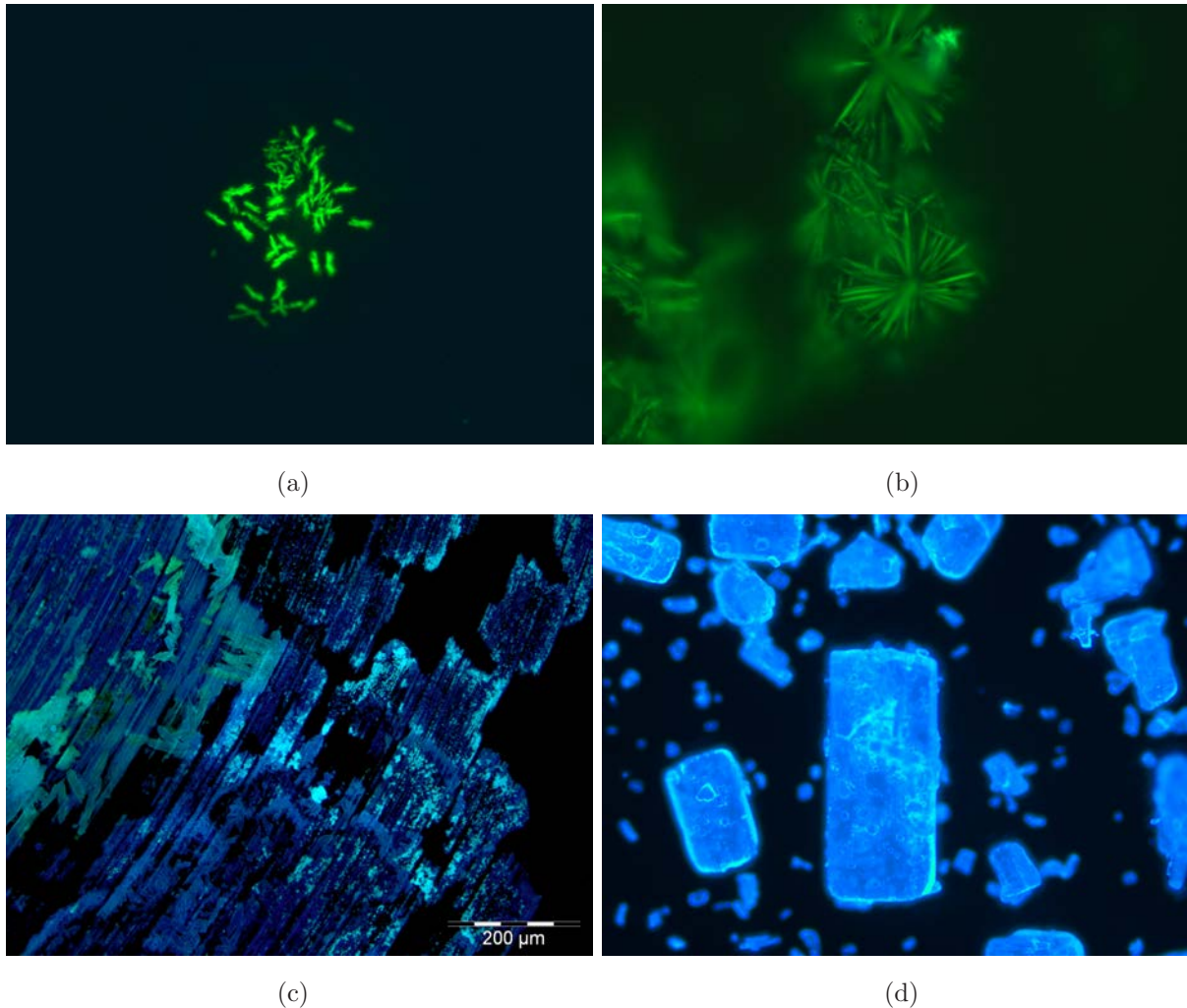


Abbildung 5.3: Änderung der Fluoreszenzemission der Matrix 2,5-DHB nach unterschiedlicher Behandlung und Betrachtung mit der Fluoreszenzkombination F1 (U-MWU2). Erhitzt man 2,5-DHB Matrixkristalle für kurze Zeit auf die Schmelztemperatur ( $T: 199^{\circ}\text{C} - 200^{\circ}\text{C}$ )  $T \leq 215^{\circ}\text{C}$ , lässt sich nach dem Erkalten im mikroskopischen Bild eine deutlich veränderte Morphologie erkennen. (a) Epifluoreszenzaufnahmen nach Erhitzen und Erstarren. (b) vergrößerter Ausschnitt aus (a), **Bildmaße** (b):  $178 \mu\text{m} \times 133 \mu\text{m}$ . (c) Druckpräparation und (d) Epifluoreszenzbild der Matrixkristalle (Kristallisation des Herstellers), **Bildmaße** (d):  $178 \mu\text{m} \times 133 \mu\text{m}$ .



## 5.2 Zweikomponentensprüh- und Drucktechnik

Geeignete Parameterkombinationen ermöglichen mit der angepassten Sprühtechnik die Ausbildung unterschiedlicher Kristallgrößen und eine wechselnde Verteilungsdichte in den erzeugten Matrixschichten. Eine Kristallschicht wird in diesem Zusammenhang als der kontinuierliche Auftrag einer Spritzenfüllung (mechanische Hamiltonspritze  $25 \mu\text{l}$ ) bezeichnet. Die erreichte Matrixverteilung wird dabei ab einer insgesamt versprühten Menge an Matrix, in Abhängigkeit der Oberflächenbeschaffenheit des Präparates, sehr dicht. Ab ca. 10 Schichten von je  $20 \mu\text{l}$  Volumen können mit der Matrix 2,5-DHB ab einer Konzentration von ca. 10 mg/ml und einem organischen Lösungsmittelanteil, der mind. 50 % (vol/vol) beträgt, Abdeckungen erreicht werden die nur noch sehr vereinzelt Lücken aufweisen. Die Flächenabdeckung einer metallischen Oberfläche von ca.  $3 \text{ cm}^2$  beträgt mit der Matrix 2,5-DHB zwischen 95 % und 100 %. Hierdurch wird es möglich wechselnde ortsfeste Analytverteilungen innerhalb einer zu untersuchenden Probe ortsaufgelöst abbilden zu können. Bei Verfahren wie einem manuellen oder automatischen dried droplet-Auftrag mittels Kolbenhubpipetten oder dem Drucken diskreter Tropfen ist dies, bedingt durch die Art der Kristallisation bzw. der erhaltenen Kristallmorphologie sowie der eintretenden lokalen Konzentrierung (der Matrix), i.d.R. nicht möglich. Die Experimente zeigen eine deutlich homogenere Matrixabdeckung größerer Flächen, im Gegensatz zu den eher diskret benetzenden Verfahren, bei denen die Position der Düse bzw. der Kapillaröffnung während der Präparation verändert wird. Es besteht prinzipiell die Möglichkeit einen gelösten Analyten zusammen mit der Matrixlösung oder dieser voran- bzw. nachgestellt zu versprühen. Mit auf dieser Art hergestellten Präparationen findet man im Vergleich zu dried droplet-Präparationen Analytsignale über der gesamten präparierten Probe (Besonders bei der Matrix 2,5-DHB kann an dried droplet-Präparationen ein ausgeprägtes „Sweet spot“-Phänomen auftreten). Dieser, im Zusammenhang mit Peptiden im Prinzip bekannte Verteilungseffekt einer Sprühpräparation [294], der auch mit Nukleinsäureanalyten festgestellt werden kann [100], wird durch den Einsatz von Sprühkammern in Kombination mit einer rotierenden Targetbewegung erheblich verbessert. Eine qualitativ hochwertige Reproduktion einzelner Präparationen mit größerer Oberfläche<sup>1</sup> ist damit sehr gut möglich. Eine einfache Vergrößerung des Düsenabstandes ohne Einsatz von Kammern ist dagegen nicht hinreichend, um vergleichbar homogen präparierte Oberflächen zu erhalten. Die Rotation des Proben targets um die zentrale Achse, die diese mit der Sprühdüse bildet, ermöglicht eine gewisse Toleranz gegenüber einer schiefen Ausrichtung des Sprühkopfes. Ein vollautomatischer Betrieb der Apparatur mit kontrolliertem Massefluss (Gas und Lösung) und Strömungsverlauf, ermöglicht eine weitere Steigerung der Kristallhomogenität und eine sehr hohe Reproduzierbarkeit qualitativ guter Präparationen.

Die Skizzen in Abbildung 5.4, 5.5 und 5.7 stellen schematisch die Anordnungen der verwendeten Sprühapparatur und die des modifizierten Druckaufbaus dar. Wie in den vorhergehenden Abschnitten bereits erläutert, ergeben sich besonders an der Zweikomponentensprühapparatur eine Reihe an Parametern, deren Werte entsprechend der Fragestellung aufeinander abgestimmt werden müssen. Im Verlauf der Testreihen an artifiziellen und nativen biologischen Proben hat sich dabei mit der MALDI-Matrix 2,5-DHB besonders die Kombination einer Sprühkapillare mit einem Gaskanal und einer Kammer, wie sie im aktuellen Aufbau verwendet wird, als sehr gut handhabbar erwiesen. Es handelt sich hierbei im einzelnen um eine kommerzielle Spritzennadel der Firma Hamilton Bonaduz (aus Edelstahl) mit einem Innendurchmesser von  $d = 130 \mu\text{m}$ , einem Glaszylinder mit Gasanschluss und einer gasdichten Hamiltonspritze. Der Zylinder besitzt einen engen Kanal, der zur Mischung der Fluide dient. Der Präparationsraum wird von der Kammer mit zentrischen Bohrungen gebildet. Es handelt sich bei der Kammer um eine auf dem Kopf

<sup>1</sup>Untersucht wurden Oberflächen von bis ca.  $4 \text{ cm}^2$ .

stehend angebrachte rechteckige Kunststoffflasche (PETG, Polyethylenterephthalat). Im Rahmen dieser Dissertation wurden sechs weitere Kammergeometrien getestet, die sich hauptsächlich im Volumen und der Wandflächengeometrie unterscheiden.

Zu den wesentlichen Ergebnissen der Entwicklungsarbeit zählt damit die Zusammensetzung des Sprühapparates aus den einzelnen Komponenten sowie das abgestimmte Testprotokoll zur systematischen Untersuchung der Matrixlösungen. Das Testprotokoll eignet sich dabei auch zum Einsatz am modifizierten Drucker.

### 5.2.1 Testprotokoll für die Matrixpräparation

Das Testprotokoll ist zunächst zur Anwendung auf beschichteten oder unbeschichteten Probenträgern aus gedrehtem und poliertem Aluminium ausgelegt, kann in den meisten Fällen aber auch zum Einsatz an nativen biologischen Proben herangezogen werden. Es beinhaltet folgende Punkte:

1. Erstellen einer Konzentrationsreihe der einzusetzenden Matrizes, am Beispiel 2,5-DHB: ca. 1 mg/ml bis ca. 40 mg/ml in Stufen von ca. (+) 5 mg/ml.
2. Erstellen von Lösungsmittelkombinationen aus organischen Lösungsmitteln mit Wasser in 5%-Schritten (v/v).
3. Aliquotierung der Lösungsmittelkombinationen und erstellen einer Reihe von ca. 0.1% bis ca. 20% (w/w) einer Beimischung von, einerseits Glycerol und andererseits Natriumdodecylsulfat (SDS).

Mit der Sprühapparatur und einer Kammer von ca. 250 ml Volumen werden die angesetzten Matrixlösungen nacheinander und in jeweils aufsteigender Matrixkonzentration bei zunehmendem organischen Lösungsmittelanteil, unter möglichst konstanter Flussrate und konstanter (rotierender) Targetbewegung aber mit wechselndem Gasdruck versprüht. Der  $N_2$ -Massestrom in der Apparatur entspricht bei einem Vordruck von 1 bar  $\pm$  0.2 bar ca. 315 l/h  $\pm$  5 l/h.

Mit dem modifizierten Ink-Jet-Drucksystem werden die angesetzten Lösungen durch eine ULISSES-Routine verdruckt. Das Füllvolumen beträgt jeweils 100  $\mu$ l und es werden nur die Kartuschen des schwarzen Druckfarbstoffes verwendet. Die ULISSES-Routinen ermöglichen das Drucken von Punktmustern (kurze Heizzeit) und einen Flächenauftrag (längere Heizzeit). Der Abstand des Probenträgers zu den Druckdüsen ist ein variabler Versuchsparameter, der mit dem Probenmaterial, der Matrix und den verwendeten Lösungsmitteln variiert werden muss.

Es zeigt sich hierbei an den erhaltenen (Sprüh und Druck) Testpräparationen eine wechselnde Verteilung der, zudem in Größe und Form sehr unterschiedlichen, Matrixkristalle. Weiterhin entstehen auch amorphe Bereiche die teilweise eine veränderte Fluoreszenz aufweisen (siehe Abb. 5.3). Anhand der lichtmikroskopischen Vermessung der erkennbaren Tropfenumrisse, Kristalle und amorphen Bereiche in einer Präparation, werden dann die für eine Fragestellung bzw. Probe am geeignetsten erscheinenden Parameterkombinationen ermittelt. Diese werden im Anschluss bei der zu vermessenden Probe dann angewandt. Im folgenden werden die charakteristischen Ergebnisse der Parameterkombinationen dargestellt.

### 5.3 Aufbau der Sprühapparatur und der Druckeinrichtung

Die Abbildungen 5.4, 5.5 und 5.7 zeigen eine schematische Übersicht der Sprüh- und Druckapparatur bzw. eine Darstellung von den wesentlichen Elementen, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt bzw. gezielt eingesetzt wurden. Abbildung 5.6 hebt schematisch den Unterschied hinsichtlich einer homogenen Matrixverteilung bei Sprühergebnissen am Beispiel eines blanken goldbeschichteten Probenträgers, ohne und mit einer Sprühkammer heraus. Alle gezeigten Zeichnungen entsprechen dabei Prinzipskizzen, sie sind deshalb nicht maßstabstreu sowie ebenfalls nicht normgerecht bemaßt. Der in Abbildung 5.5 dargestellte Sprühkopf aus Polyetheretherketon (PEEK) ist dem ursprünglich aus Glas gefertigten Sprühkopf nachempfunden, kann sich aber besonders in den Parametern  $d$ ,  $d'$  und  $d''$  (in den Abbildungen 5.4 bzw. 5.5 dargestellt) sowie in der Gesamtlänge von diesem unterscheiden. Maßgebend ist hierbei die aufeinander abgestimmte (proportionale) Skalierung aller Größen im Hinblick auf die u.a. gasdynamischen Parameter, auf die in Abschnitt 4.5.2 eingegangen wurde. Die Apparatur ist optimiert auf das Beschichten von relativ kleinen biologischen Oberflächen mit Ausmaßen von bis zu ca.  $4 \text{ cm}^2$ . Eine Einschränkung in der Verwendbarkeit der Apparatur besteht deshalb vor allem in der Größe der beschichtbaren Oberfläche. Die senkrechte Stellung des einzelnen Sprühkopfes ist (nach dem dargestellten Prinzip) mit einer für diesen Aufbau günstigen Kammergeometrie und für das Beschichten wesentlich größerer Oberflächen ( $\gg 5 \text{ cm}^2$ ) nicht geeignet. Wenn dies erreicht werden soll, ist hierzu eine Anordnung mit mehreren Sprühköpfen sowie eine veränderte Kammergeometrie notwendig. Ein im Prinzip wesentlich einfacheres Vorgehen, bei dem durch Verändern der  $xy$ -Position eines einzelnen i.d.R. senkrecht zur Probenebene stehenden Sprühkopfes sukzessiv eine größere Fläche abgefahren werden kann, erreicht bislang keine Beschichtung in einer Qualität, wie sie mit dem beschriebenen Verfahren erreicht werden kann. Auf eine eingehende Beschreibung der Mehrkopfanordnung wird hier verzichtet, da ausreichende experimentelle Daten zur Belegung der Leistungsfähigkeit noch fehlen.

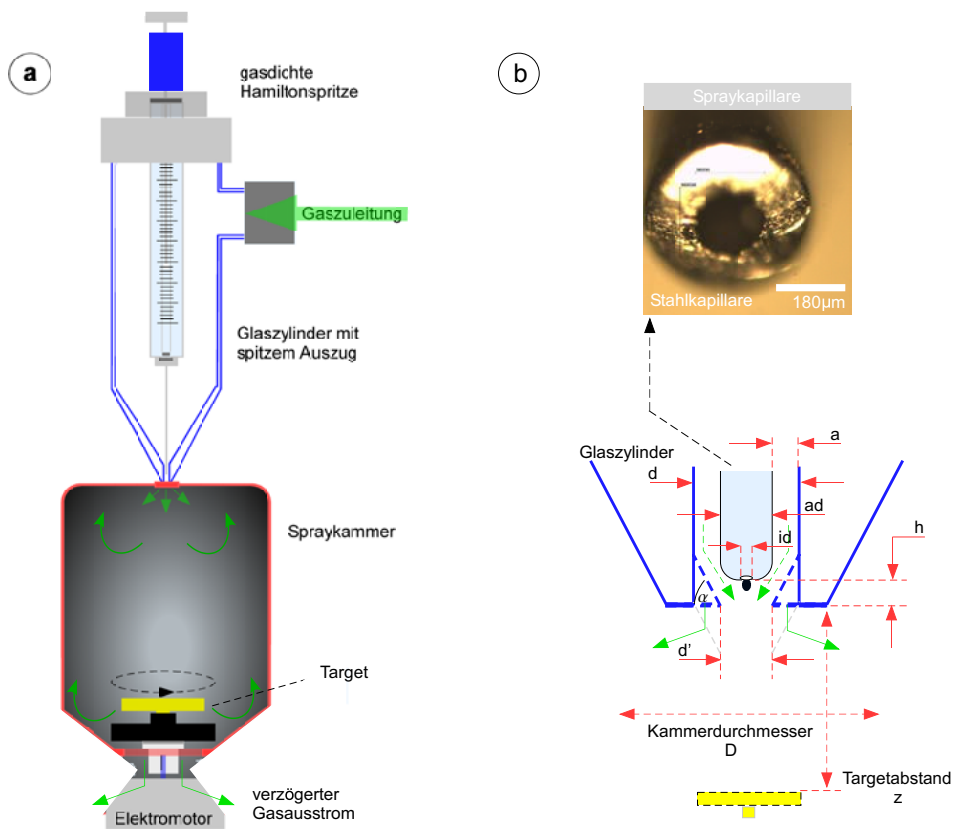


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der (a) Sprühapparatur mit gasdichter Hamiltonspritze und (b) Detaildarstellung der Glasausführung am Mündungsbereich der Düse. Die Abbildung zeigt die prinzipielle Anordnung der einzelnen Elemente an der Sprühapparatur. Die Sprühkapillare ist am Ausgang auf ca. 180 μm aufgeböhrt und an den Aussenseiten abgerundet.



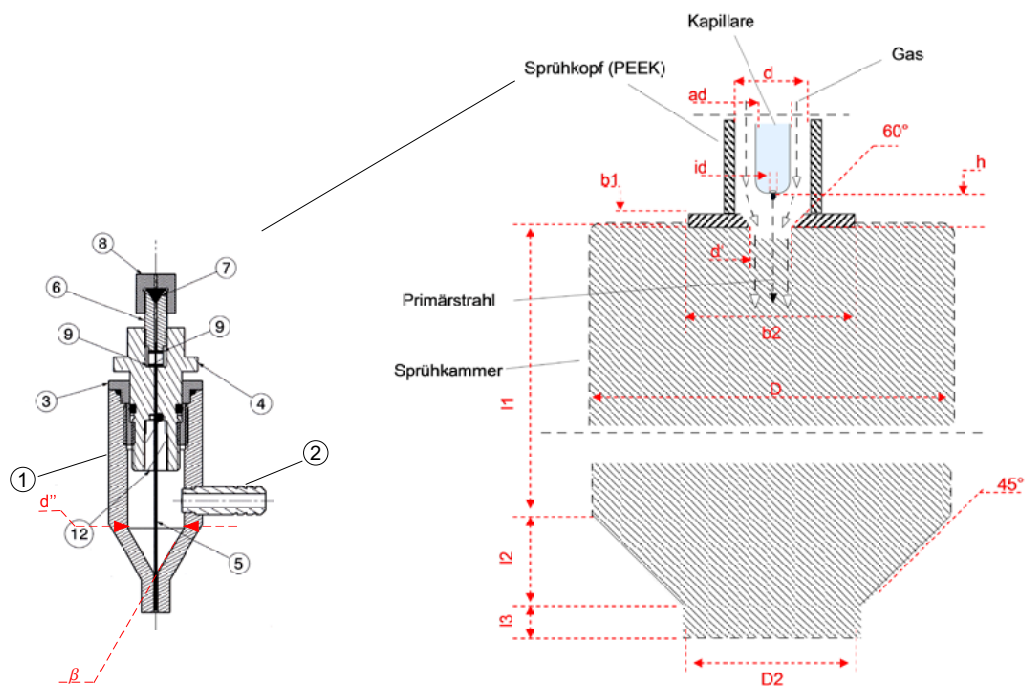


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung der Sprühapparatur mit angedeutetem Sprühkopf aus PEEK und Dimensionsübersicht (nicht maßstabgetreu) der Sprühkammer aus PET. Detailbezeichnungen: (2) Gaszuleitungsanschluss, (3) Kapillarhalterfassung, (4) Kapillarhalter, (5) Kapillare, (6) Kopplungsadapter, (7) Dichtung, (8) Kopplungsadapterkopf, (9) Dichtung, (12) Zentriereinsatz. Im Querschnitt (nicht bezeichnete) schwarze Flächen sind Dichtungen.

Matrixbeschichtung

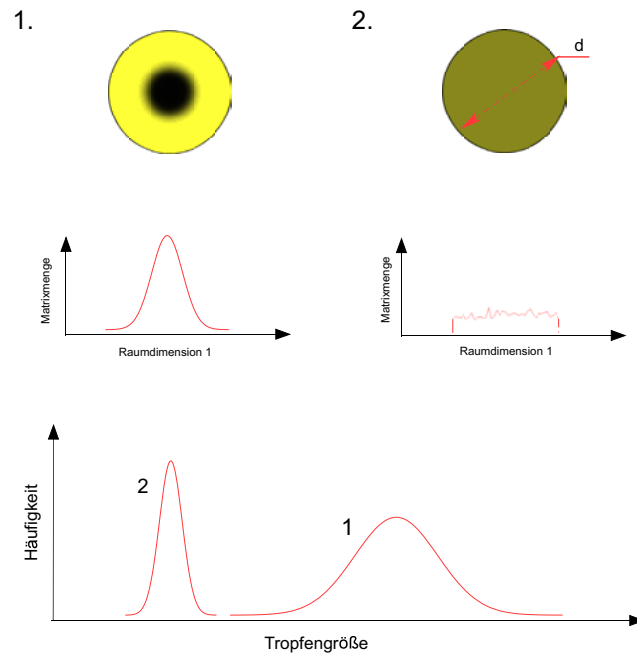


Abbildung 5.6: (Oben, Mitte) Qualitativer Vergleich hinsichtlich der erreichbaren Homogenität und der zusammenhängenden Präparatfläche nach einer Sprühpräparation mit (2) und ohne (1) Einsatz einer Sprühkammer. (Unten) Unterschiede in der entstehenden Tropfengrößenverteilung.

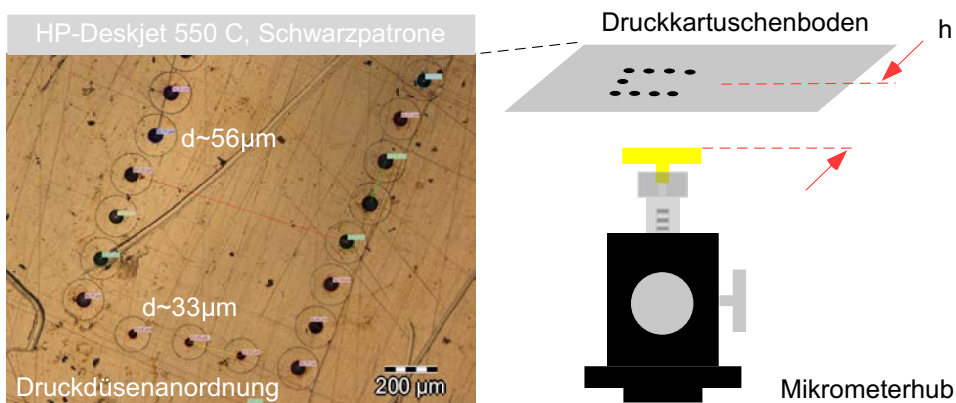


Abbildung 5.7: (Links) Blick auf die Unterseite einer Druckerpatrone mit den erkennbaren Düsenrößen. (Rechts) Die Positionierung des Probenhalters erfolgt in der Druckapparatur mithilfe einer linearen Mikrometerachse. Der Abstand zu den Düsen ist in Abhängigkeit vom Target- bzw. Probenmaterial und der verdruckten Lösung und Matrixkonzentration einzustellen.

### 5.3.1 Sprühpräparationen nach Testprotokoll

Die Anwendung des Testprotokolls bei Sprühpräparationen führt zu einer Serie von Ergebnissen, die sich für jede der untersuchten Matrices in der Regel deutlich unterscheidet. Die Matrix 2,5-DHB bildet bei den Untersuchungen einen Schwerpunkt, da sie aufgrund ihrer nahezu universellen Einsatzfähigkeit an biologischen Proben und ihrer guten Kristallisationseigenschaften in den Tests deutlich vielseitiger ist, als die vor allem in der Peptidanalytik eingesetzten Matrices CHCA oder SA. Bei Peptid-, Lipid- und Kohlenhydratanalyten, wie auch bei einer Reihe von kleinen organischen Stoffwechselprodukten und Polymeren (z.B. PEG) zeigen Präparationen mit der Matrix 2,5-DHB qualitativ gute bis sehr gute Massenspektren, hinsichtlich des SNR und auch der Reproduzierbarkeit. Die in Abbildung 5.8 dargestellten Sprühergebnisse zeigen auf metallischen Oberflächen einen Überblick, über die bei einer Präparation möglichen Kristallmorphologien bzw. Verteilungen. Sie stellen keine systematische Dokumentation des Testprotokolls dar. Die Bildausschnitte geben einheitlich einen identisch großen Targetbereich wieder.

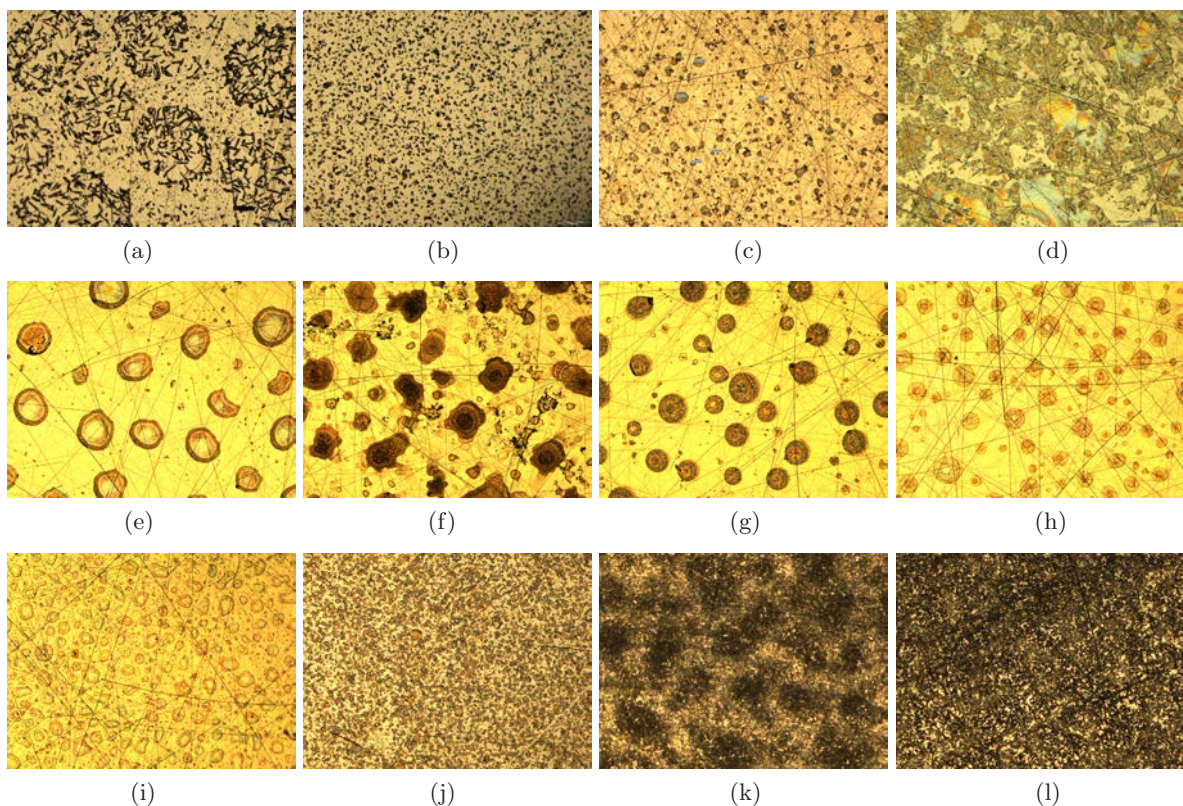


Abbildung 5.8: Ergebnisse einiger Sprühpräparationen mit unterschiedlichen Parametereinstellungen und Matrices. Verwendet wurde eine statische Sprühdüse im Aufbau der Sprühapparatur. (a) Spraypräparation mit 2,5-DHB bei hoher Flussrate. (b) Spraypräparation mit CHCA bei niedriger Flussrate und hohem organischen Lösungsmittelanteil (70% Acetonitril). (c - e) 2,5-DHB Sprühpräparationen mit unterschiedlichen Kammergeometrien bei identischen Konzentrationen und Lösungsmitteln. (f - g) Präparation mit Sinapinsäure unterschiedlicher Konzentration. (h - l) 2,5-DHB Präparationen mit unterschiedlichen Konzentrationen und Flussraten sowie unterschiedlichem Gasvordruck. **Bildmaße: 1775  $\mu\text{m}$  x 1331  $\mu\text{m}$**  (Vergrößerung: 50-fach).

Allgemein kann gesagt werden, daß bei Sprühpräparationen die Matrices eine absteigende Reihenfolge bei der Kristallgröße bilden: 2,5-DHB > SA > CHCA. Die kleinsten Kristalle der Matrix 2,5-DHB werden in Präparationen mit einem hohen Volumenanteil an Aceton (min. 50 vol-%) i.d.R. in Kombination mit Wasser erreicht. 2,5-DHB zeigt in Ethanol die größte Löslichkeit ( $L > 120 \text{ mg/ml}$  bei RT), wobei mit der mechanischen Sprühapparatur bei einer Konzentration von ca. 30 mg/ml die besten Ergebnisse, bezogen

auf eine einheitliche Schichtdicke sowie Kristallgröße und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, erreicht werden konnten. In Abbildung 5.9 ist zu erkennen, daß bei den in Abbildung 5.8 gezeigten Beispielen eine unterschiedliche Abdeckung eines hier eingesetzten Standardpräparationsträgers ( $d = 2\text{cm}$ ) mit einem Sprühvolumen von  $20\ \mu\text{l}$  erreicht wird. Da die Parameterwahl teilweise zu einem verminderten sekundären Tropfenzerfall (e - h) führt sind in einigen Bildern noch deutliche Artefakte, die von auftreffenden Tropfen stammen, zu erkennen.

In Abbildung 5.10 ist zu sehen, daß auch die auf die Matrix 2,5-DHB hin optimierte Sprühmethode vereinzelt Tropfen erzeugt, die als solche auch noch auf die Targetoberfläche auftreffen. Die markierten Beispielumrisse, die eindeutig als „matrixbeinhaltend“ identifiziert werden konnten, zeigen in der optischen Vermessung in Abbildung 5.11 eine laterale FWHM-Ausdehnung zwischen  $d = 0.45\ \mu\text{m}$  und  $d = 6.45\ \mu\text{m}$  (optisches UV-Reflexionslinienraster). In den beispielhaft massenspektrometrisch vermessenen Bereichen in Abbildung 5.10 (unten) wird deutlich, daß es sich bei den einzelnen Matrixdarstellungen teilweise um Kristallgrößen handeln muss, die lateral unter  $1\ \mu\text{m}$  betragen. Neben den Matrixsignalen werden auch Signale von Natrium und Kalium erhalten, die vermutlich in der Form von Salzkristallen auftreten und teilweise lateral noch kleinere Ausmaße zeigen. Die Pixelgröße von  $1\ \mu\text{m}$  Kantenlänge löst hierbei die kleinsten Strukturen nicht deutlich auf, was vor allem an isoliert auftretenden Pixeln unterschiedlicher Intensität erkennbar wird. Im RGB-Überlagerungsbild zeigt sich, daß das aufgenommene Matrixsignal örtlich hauptsächlich zusammen mit Natriumsignalen auftritt.

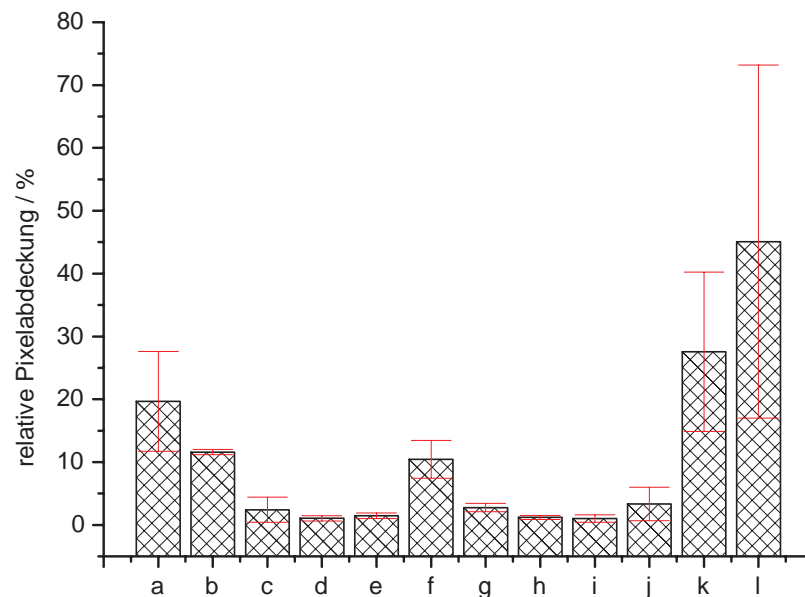


Abbildung 5.9: Relative Matrixabdeckung einzelner Sprühvorgänge mit einem geringen Sprühvolumen von ca.  $20\ \mu\text{l}$  (siehe Abb. 5.8). Es zeigt sich dabei deutlich, daß mit den beispielhaft dargestellten Lösungsmittelkombinationen und Matrixkonzentrationen unter der Verwendung einer statischen Sprühdüse mit Präparationskammer und einem Sprühvolumen von ca.  $20\ \mu\text{l}$  i.d.R. Flächenabdeckungen von im Mittel ca. 50 % erreichen lassen (l). Die untersuchte Fläche ist hierbei auf die Fläche des kreisrunden Targets ( $\varnothing = 2\text{cm}$ ) normiert.



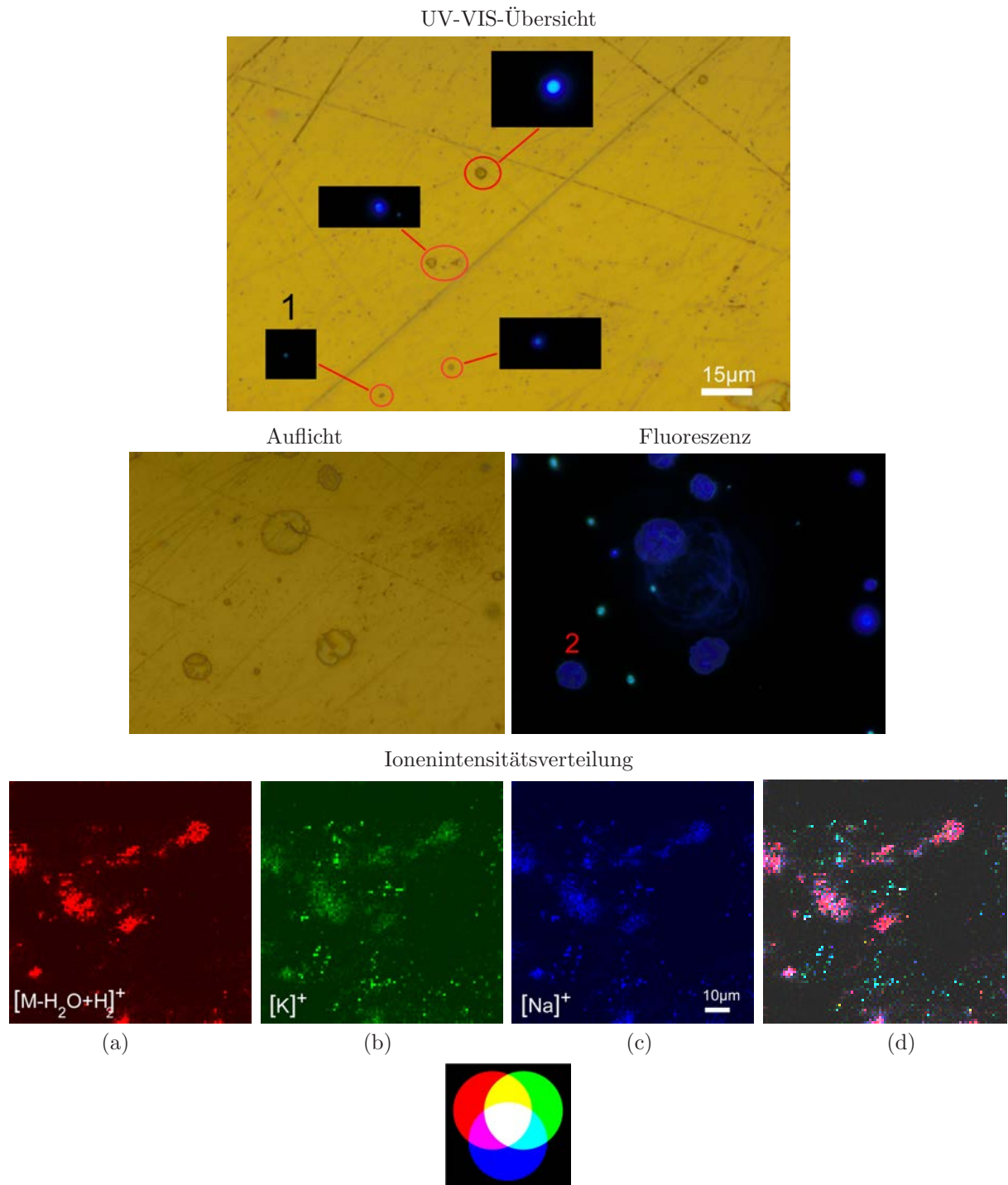
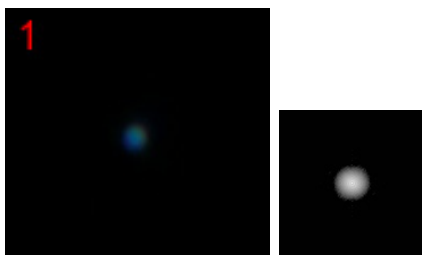
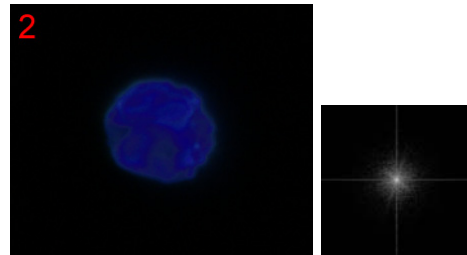
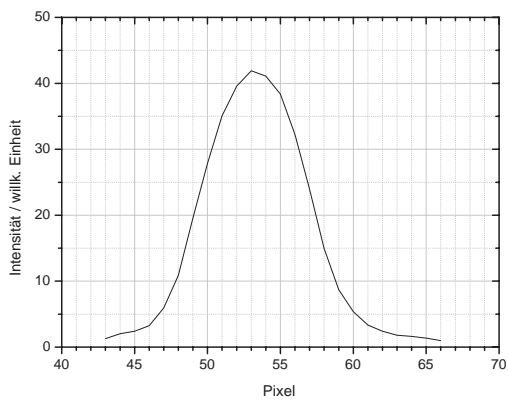


Abbildung 5.10: Sprüh von ca.  $2 \mu\text{l}$ ,  $c = 30 \text{ mg/ml}$  2,5-DHB gelöst in EtOH/0.1 % TFA 1:1 (v/v). Goldbeschichtete Targetoberfläche. Zu erkennen sind Auftropfumrisse mit teilweise auskristallisierter und/oder amorpher Matrix unterschiedlicher Durchmesser (Hellfeldauflicht- und Fluoreszenzaufnahmen). (1, 2) Ausgewählte Bereiche zur Größenbestimmung. (a - c) Ionenintensitätsverteilungsbilder der Spezies  $[M - H_2O + H]^+$ ,  $[Na]^+$ ,  $[K]^+$  eines Targetausschnitts, (d) RGB-Überlagerungsbild (a - c).



Horizontal



Horizontal

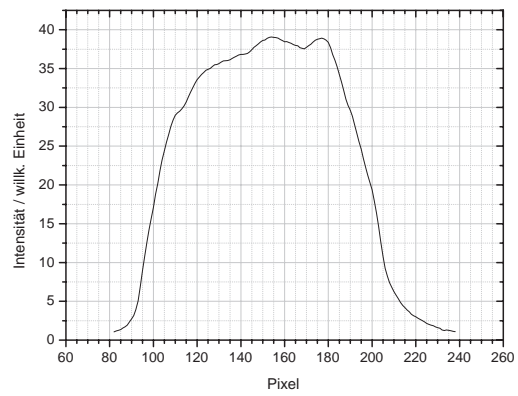


Abbildung 5.11: (Obere Reihe) Ausgewählte Bereiche der Spraypräparation (Abb. 5.10) und (klein) PSF der Abbildung. (Untere Reihe) Über die vertikale Achse gemittelte horizontale Fluoreszenzintensitätsverteilung. (1) Kleinster anhand von Fluoreszenzmessungen detektierter 2,5-DHB-FWHM-Durchmesser ca. 7.5 Pixel  $\equiv$  0.45  $\mu\text{m}$ . (2) Durchschnittliche Spotgröße der erhaltenen Verteilung. FWHM-Durchmesser ca. 100 Pixel  $\equiv$  6.45  $\mu\text{m}$ .

### 5.3.2 Sprühpräparationen an nativen biologischen Proben

Nach einer Optimierung der Parameter kann entweder eine (lokal) gezielte oder aber eine (flächig) homogene Abdeckung einer nativen biologischen Oberfläche erreicht werden. Die entstehenden Kristalle der Matrix 2,5-DHB bilden dabei überwiegend feine Kristallformen aus, die eine Länge in einer Raumrichtung von unter  $1\ \mu\text{m}$  bis ca.  $10\ \mu\text{m}$  aufweisen können. Die erhaltenen Kristalle werden bei einer mehrmaligen Sprühpräparation überproportional häufig symmetrisch, d.h. ein ausgeprägtes Wachstum in eine Vorzugsrichtung (des Raumes) ist selten. In Abbildung 5.12 ist hierzu ein Ausschnitt einer Sprühpräparation mit der Matrix 2,5-DHB zu erkennen, der eine Matrixbeschichtung einer vergoldeten Aluminium-Probenhalteroberfläche zeigt. Es handelt sich dabei um die Präparation aus einem Volumen von ca.  $20\ \mu\text{l}$ . Man erkennt, daß bereits mit dieser Matrixmenge im dargestellten Bereich eine fast lückenlose Abdeckung der Oberfläche erreicht werden kann. Lediglich drei Stellen in der dargestellten Abbildung, von denen nur eine im Fokus liegt, zeigen eine blanke Goldoberfläche. Die Abmessung der im Fokus liegenden unbedeckten Stelle beträgt ca.  $2.5\ \mu\text{m} \times 2.5\ \mu\text{m}$ .

2,5-DHB-Sprühpräparation zur hochauflösenden MALDI-Imaging-MS

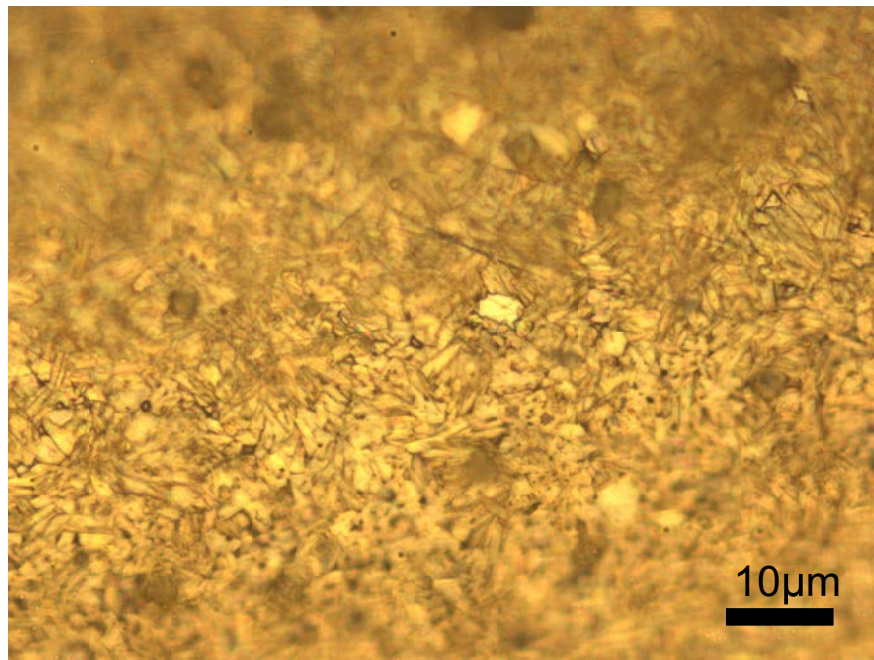
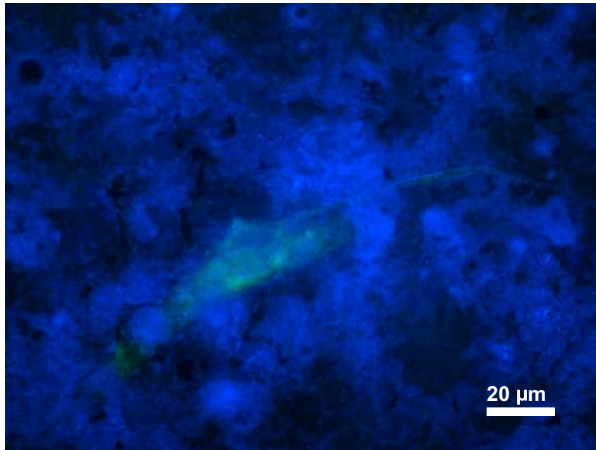


Abbildung 5.12: Sprühpräparation von  $1 \times$  ca.  $20\ \mu\text{l}$ ,  $c = 25.5\ \text{mg/ml}$  2,5-DHB gelöst in EtOH/0.1% TFA (1:1, v/v) auf einer Goldoberfläche (**Vergrößerung: 1000x**). Die erkennbaren Kristallgrößen in der Ebene betragen zwischen ca.  $2\ \mu\text{m}$  und ca.  $10\ \mu\text{m}$  in einer Raumrichtung. Anhand der Fokusslage kann der Unterschied in der axialen Richtung ( $z$ -Achse), zwischen den fokussierten Kristall(ober)flächen und den in der Abbildung unscharfen Bereichen, auf Werte zwischen  $0.66\ \mu\text{m} < \Delta z < 1.28\ \mu\text{m}$  geschätzt werden (siehe Tabelle 4.8).

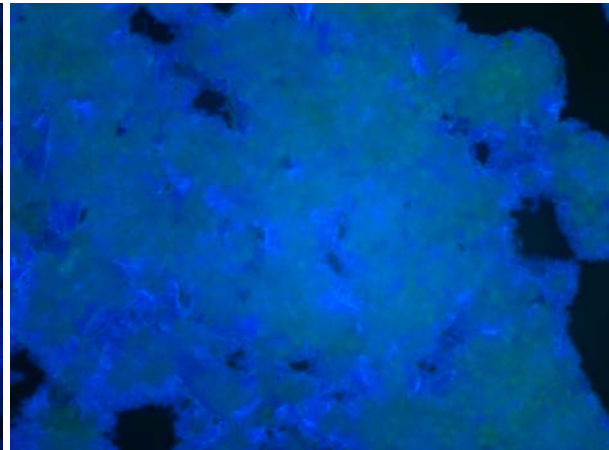


In den Abbildungen 5.13 und 5.14 sind Beispiele für eine Matrixbeschichtung von nativen biologischen Proben gezeigt. Es handelt sich hier um Präparationen die mit der Matrix 2,5-DHB angefertigt worden sind. Besonders deutlich wird der Präparationsunterschied, der mit Sprühpräparationen gegenüber Methoden nach dem dried droplet-Prinzip oder auch den artverwandten „Thin-Layer“-Techniken erreicht werden kann, an Hefezellen (*S. cerevisiae*). Die in der Abbildung 5.13 dargestellten Ergebnisse vergleichender Präparationen zeigen einerseits eine Dried-droplet-Präparation, bei der die in eine laterale Vorzugsrichtung wachsenden Matrixkristalle die grün fluoreszierenden Hefezellen nur teilweise bedecken (können). Andererseits ist eine Sprühpräparation zu sehen, die im Gegensatz hierzu eine vollständige Bedeckung der Hefezellen herstellen kann. Weiterhin ist in dieser Abbildung eine Sprühpräparation an HELA-Zellen auf einem Glasobjektträger zu erkennen. Der im Bild anhand der grünen Fluoreszenz schwach erscheinende einzelne HELA-Zellkörper wird dabei ebenfalls deutlich von der blau fluoreszierenden Matrix bedeckt. Die weiteren Epifluoreszenzbilder dokumentieren die bereits erfolgte breite Anwendung an biologischem Weichgewebe mit unterschiedlicher physikalischer und chemischer Oberflächenbeschaffenheit.

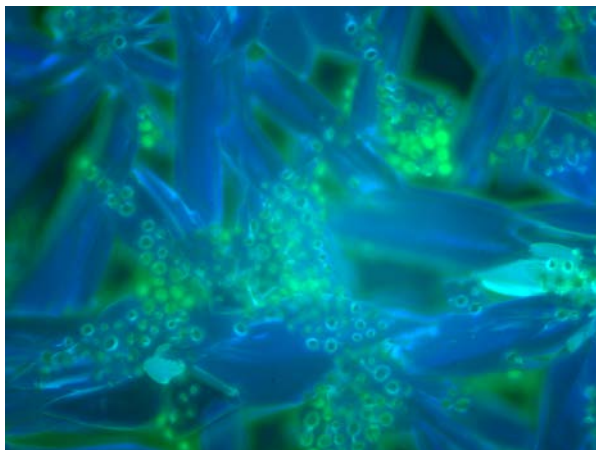
2,5-DHB-Sprühpräparation an HELA-Zellen



2,5-DHB-Sprühpräparation an Hefezellen



Dried droplet-Präparation an Hefezellen

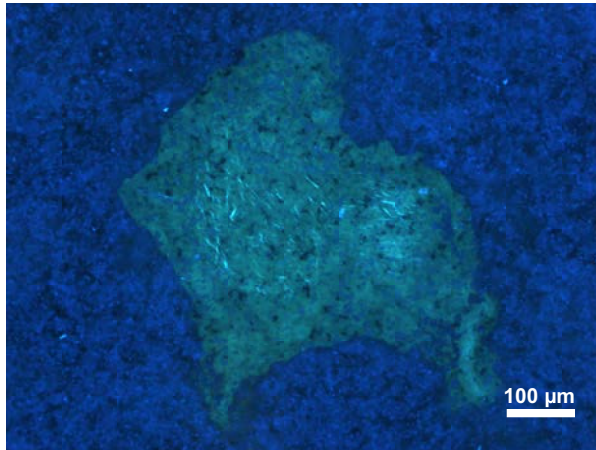


2,5-DHB-Sprühpräparation an Nierengewebe

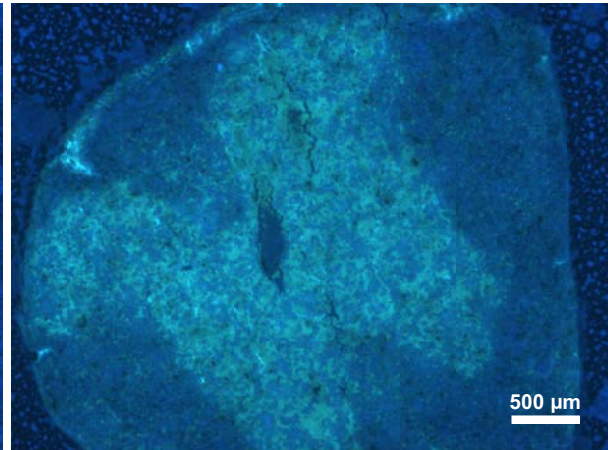


Abbildung 5.13: (Links oben) Spraypräparation mit der Matrix 2,5-DHB: Epifluoreszenzaufnahme einer HELA-Zelle (grüne Eigenfluoreszenz) auf Glas (**Vergrößerung: 500x, 178  $\mu\text{m}$  x 133  $\mu\text{m}$ .**), 1x ca. 20  $\mu\text{l}$ , c = 25 mg/ml 2,5-DHB gelöst in Aceton/0.1% TFA (1:1, v/v). (Rechts oben) Spraypräparation mit der Matrix 2,5-DHB: Epifluoreszenzaufnahme von Hefezellen (grüne Eigenfluoreszenz) auf einer Goldoberfläche (**Vergrößerung: 500x, 178  $\mu\text{m}$  x 133  $\mu\text{m}$ .**), 1x ca. 20  $\mu\text{l}$ , c = 25 mg/ml 2,5-DHB gelöst in EtOH/0.1% TFA (1:1, v/v). (Unten links) Dried droplet-Präparation mit der Matrix 2,5-DHB: Epifluoreszenzaufnahme von Hefezellen (grüne Eigenfluoreszenz) auf einer Goldoberfläche (**Vergrößerung: 500x, 178  $\mu\text{m}$  x 133  $\mu\text{m}$ .**), 1  $\mu\text{l}$ , c = 10 mg/ml 2,5-DHB gelöst in EtOH/0.1% TFA (1:1, v/v). (Unten rechts) Sprühpräparation mit der Matrix 2,5-DHB: Nierengewebeschnitt einer Maus (**Vergrößerung: 100x**), 10x ca. 20  $\mu\text{l}$ , c = 10mg/ml 2,5-DHB gelöst in EtOH/0.1% TFA (1:1, v/v). Länge des Messbalkens = 200  $\mu\text{m}$ . Die Matrixabdeckung erreicht über 95 % der abgebildeten Gesamtfläche.

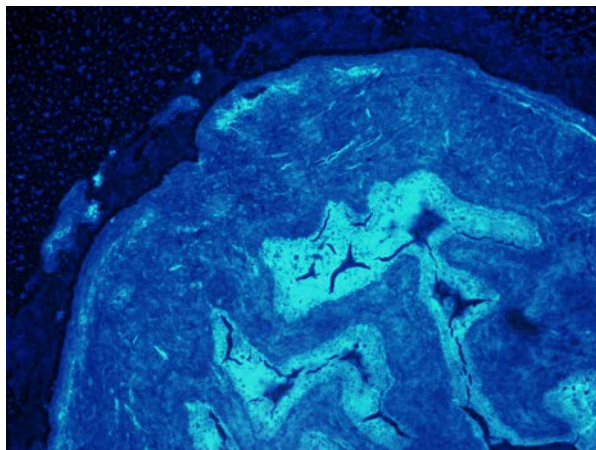
2,5-DHB-Sprühpräparation am Mausherz



2,5-DHB-Sprühpräparation am RM der Maus



2,5-DHB-Sprühpräparation an Harnblase



2,5-DHB-Sprühpräparation an Froschepidermis

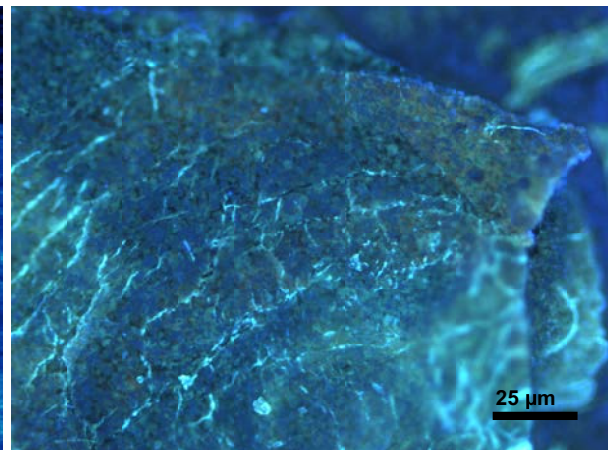


Abbildung 5.14: (Links oben) Sprühpräparation mit der Matrix 2,5-DHB: Epifluoreszenzaufnahme einer Herzvorhofpräparation auf einem Glasobjektträger (**Vergrößerung: 100x, 888  $\mu\text{m}$  x 666  $\mu\text{m}$ .**), 3x ca. 20  $\mu\text{l}$ , c = 30 mg/ml 2,5-DHB gelöst in Aceton/0.1% TFA (1:1, v/v). (Rechts oben) Sprühpräparation mit der Matrix 2,5-DHB: Epifluoreszenzaufnahme einer Rückenmarkpräparation der Maus auf einem Glasobjektträger (**Vergrößerung: 20x, 4438  $\mu\text{m}$  x 3328  $\mu\text{m}$ .**), 3x ca. 20  $\mu\text{l}$ , c = 30 mg/ml 2,5-DHB gelöst in EtOH/0.1% TFA (1:1, v/v). (Unten links) 2,5DHB-Sprühpräparation einer Harnblase der Maus auf einem Glasobjektträger: Epifluoreszenzaufnahme (**Vergrößerung: 20x, 4438  $\mu\text{m}$  x 3328  $\mu\text{m}$ .**), 3x ca. 20  $\mu\text{l}$ , c = 30 mg/ml 2,5-DHB gelöst in EtOH/0.1% TFA (1:1, v/v). (Unten rechts) Sprühpräparation von 2x ca. 20  $\mu\text{l}$ , c = 30 mg/ml 2,5-DHB gelöst in EtOH/0.1% TFA (1:1, v/v). Zu erkennen ist ein Ausschnitt der Epidermis von *Hyla savignyi* (Mittelöstlicher Laubfrosch) im Fluoreszenzmodus (**Vergrößerung: 500x, 178  $\mu\text{m}$  x 133  $\mu\text{m}$ .**). Die massenspektrometrische Vermessung dieser Proben erfolgte im Rahmen anderer Dissertationsarbeiten.

### 5.3.3 Quantitativer Matrixauftrag bei Overspray-Bedingungen

Der an der eingesetzten Vorrichtung erzeugte Sprüh weist eine besondere Charakteristik auf. Ab einer Konzentration der Matrix 2,5-DHB von ca. 10 mg/ml kann bei einer Präparation, unter den als Standard etablierten Präparationsbedingungen, ein nahezu konstanter relativer Masseintrag auf die kreisrunden Probenträgeroberflächen ( $\varnothing = 2$  cm) beobachtet werden. Dieser entspricht, im Rahmen der erreichbaren Wägegenauigkeit, in etwa 1/3 der insgesamt versprühten Matrixmasse. Damit verbleiben in etwa 2/3 der Matrixmasse im sogenannten Overspray. Eine exaktere Bestimmung in Abhängigkeit von der Matrixkonzentration (10 mg/ml – 120 mg/ml) steht jedoch noch aus, da hierzu eine leistungsfähigere Waage (z.B. eine Quarzmikrowaage) benötigt wird.

Tabelle 5.4: Effektiver Matrixauftrag bei Sprühpräparationen mit 2,5-DHB unter Verwendung von Standardparametern. Mittelwerte aus 10 x 10 Präparationen (d.h. 10 Schichten pro Target, auf 10 Targets). Die Messungen berücksichtigen kein Kristallwasser im Präparat.

<b>Targetmasse (leer)</b>	<b>Targetmasse (Ladegewicht)</b>
1440713 $\mu\text{g} \pm 10 \mu\text{g}$	1441030 $\mu\text{g} \pm 10 \mu\text{g}$
<b>Matrixkonzentration</b>	
25.5 mg/ml $\pm 0.5$ mg/ml	
<b>Matrixmasse (theoretisch)</b>	(zwei Sprayzyklen, ca. 44 $\mu\text{l}$ )
1122 $\mu\text{g} \pm 15 \mu\text{g}$	
<b>Matrixmasse pro Target</b>	
317 $\mu\text{g} \pm 15 \mu\text{g}$	
<b>Relative Masse</b>	<b>Masse pro Targetfläche</b>
ca. 28 %	ca. 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

### 5.3.4 Sprühpräparation an artifiziellen Proben

Die Sprühtechnik eignet sich, neben der Präparation nativer biologischer Proben, auch sehr gut zu einer Kombinationspräparation mit anderen Techniken oder zu einer Präparation artifizieller Proben. Dies soll hier anhand einiger Beispiele, die die homogene Abdeckbarkeit entsprechender Oberflächen dokumentiert, dargestellt werden. Abbildung 5.15 zeigt die Präparation einer Myoglobinlösung die zur Bestimmung der erreichbaren Massengenauigkeit am Spektrometer ALADIM II verwendet wird. Es wird hierbei einerseits deutlich, daß sich die Methode der Sprühpräparation zu einem Auftrag von Peptidanalyten auf die goldbeschichteten Probenträger eignet und eine erhaltene Verteilung nachträglich mit einer Sprühpräparation der Matrix 2,5-DHB vollständig abgedeckt werden kann. Das nach der Matrixpräparation aufgenommene Epifluoreszenzbild des Präparationsausschnitts zeigt dabei eine durchaus mit der Analytverteilung korrespondierende Textur und deutet somit auf eine nur geringe Beeinflussung der lateralen Analytposition während der Matrixpräparation hin.

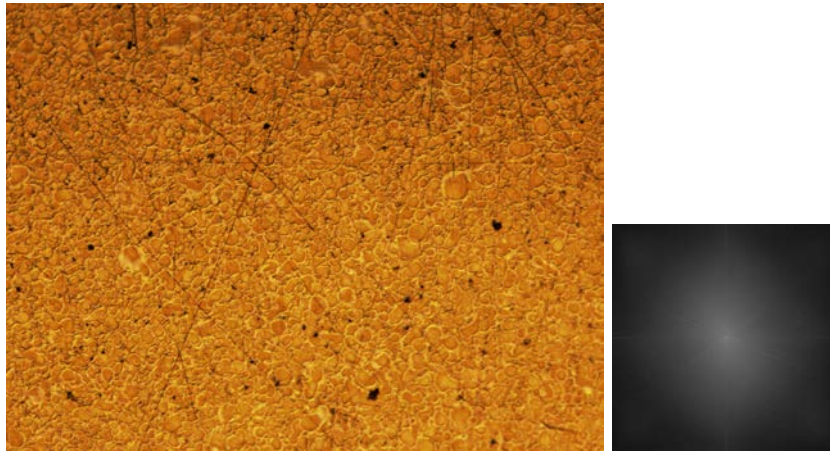
Tabelle 5.5: Standardparameter der aufgebauten Sprühapparatur. Parameter mit Bezug auf die Skizzen in Abbildung 5.4 und Abbildung 5.5:  $z$  (Targetabstand),  $id$  (Innendurchmesser der Sprühkapillare),  $ad$  (Außendurchmesser der Sprühkapillare),  $d$  (Durchmesser des Gaskanals),  $a$  (Abstand der Kapillare zur Gaskanalwand),  $h$  (Position der Kapillare im Gaskanal),  $\alpha$  (Winkel der Gaskanalwände an der Düsenöffnung,  $\alpha^1$ : Glasaufbau,  $\alpha^2$ : PEEK-Aufbau),  $d'$  (Düsenöffnung). Neben den tabellierten Parametern ist die Kammergröße (Volumen) und die Geometrie der Sprühkammer zu definieren. Bei Standardbedingungen beträgt das Kammervolumen ca.  $250 \text{ cm}^3$ . Die Kammer hat eine annähernd rechteckige obere Grundfläche mit einer Kantenlänge von ca.  $5.8 \text{ cm}$  und einer zentralen Bohrung zur Aufnahme der Düse. Die Kammer verjüngt sich im letzten  $1/5$  ihrer Länge. Die Wandflächen nehmen dabei einen Winkel von ca.  $40^\circ - 45^\circ$  an. Die Kammeröffnung an der Bodenseite ist kreisrund und besitzt einen Durchmesser von ca.  $2.8 \text{ cm}$ . Die Targetoberflächenebene liegt während der Präparation unmittelbar am oberen Bereich der Verjüngung. Std. = Standardabweichung der Messungen.

Parameter	Sollwert	Std.			
$z$	85	mm	$\pm$	5	mm
$id$	130	$\mu\text{m}$	$\pm$	10	$\mu\text{m}$
$ad$	480	$\mu\text{m}$	$\pm$	10	$\mu\text{m}$
$\alpha^{1,2}$	90	$^\circ$	$\pm$	0.2	$^\circ$
$\alpha^2$	60	$^\circ$	$\pm$	0.2	$^\circ$
$d$	800	$\mu\text{m}$	$\pm$	10	$\mu\text{m}$
$h$	$\geq 2.5$	mm	$\pm$	0.25	mm
$D$	6.0	cm	$\pm$	0.5	cm

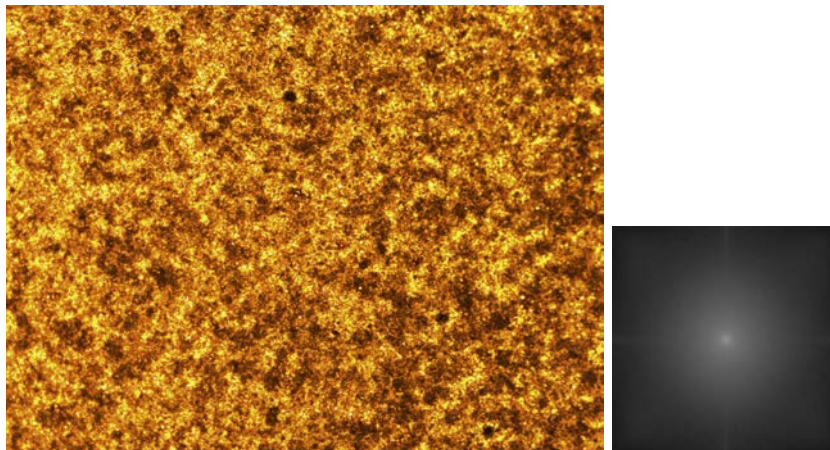
$a \leq (d - ad)/2$  ;  $id \leq d' < d$



Sprühpräparation des gelösten Analyten



Sprühpräparation der gelösten Matrix



Epifluoreszenzaufnahme der Präparation

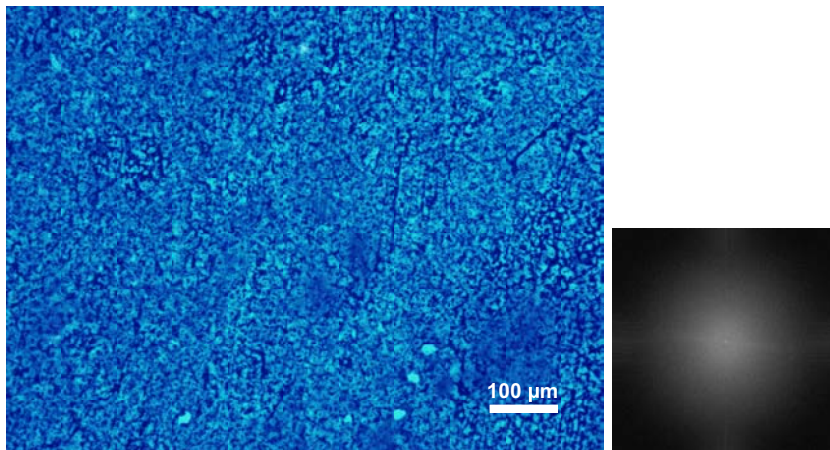


Abbildung 5.15: (Oben) Sprühpräparation von Myoglobin auf einer goldbeschichteten Targetoberfläche. (Mitte) 2,5-DHB Sprühpräparation der Matrix auf die Myoglobinpräparation. (Unten) Fluoreszenzaufnahme nach der Matrix-Sprühpräparation. **Vergrößerung: 100 x, Bildmaße (einheitlich): 888  $\mu\text{m}$  x 666  $\mu\text{m}$ .** (Rechts) PSF der Abbildungen.

In Abbildung 5.16 sind drei Druckpräparationen von Lipid- und Peptidanalyten auf einer polierten Edelstahloberfläche zu erkennen, die nachträglich durch eine Sprühpräparation mit der Matrix 2,5-DHB beschichtet wurden. Alle drei Präparationen lassen in den Aufsichtsbildern (rechte Spalte) eine homogene Matrixabdeckung erkennen. Diese gewährleistet eine Vermessung von Analyten im Druckpunkt, wie auch ggf. außerhalb der Druckpunkte.

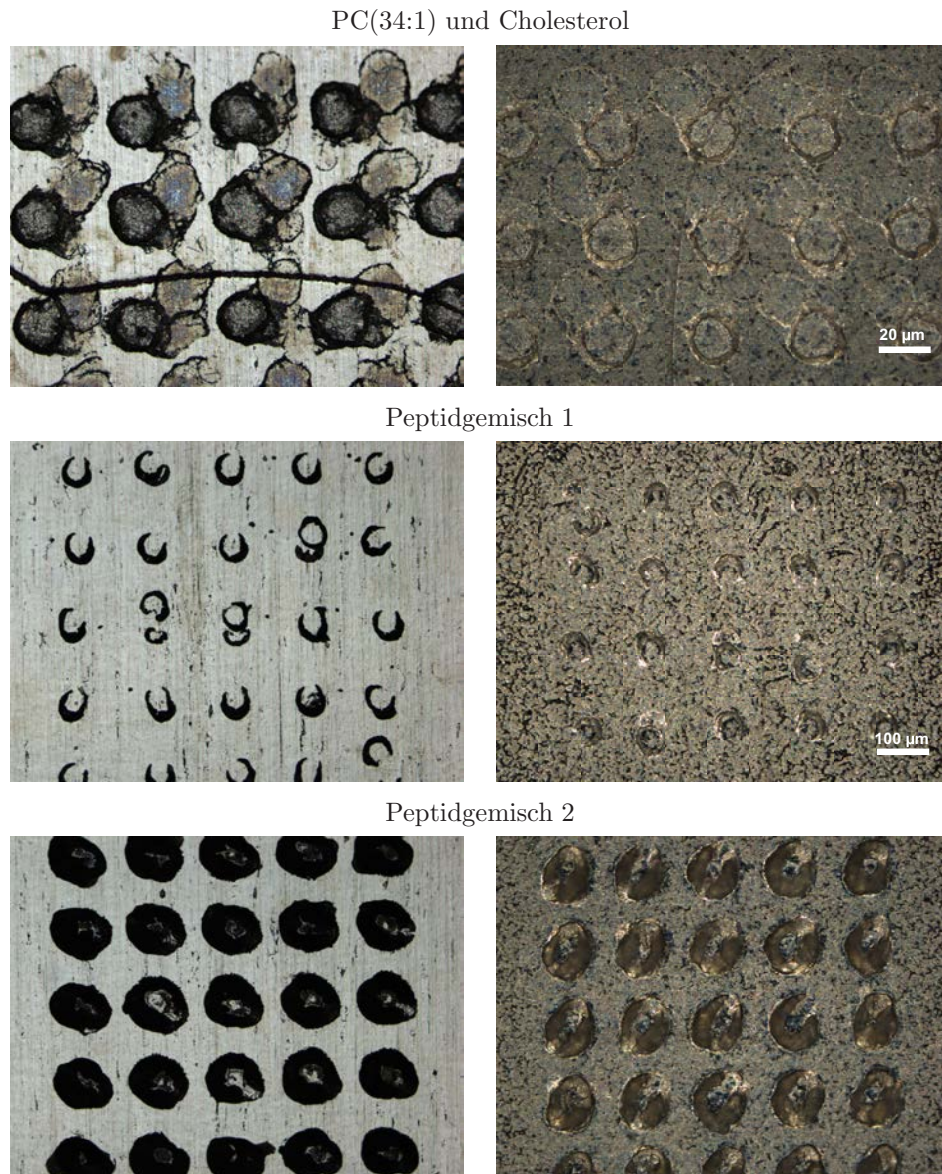


Abbildung 5.16: Round-Robin-Experiment, Druckpräparation durchgeführt am AMOLF, AG Prof. R. Heeren. (Oben) Druckpräparationen des Analyten Phosphatidylcholin PC(34:1) und Cholesterol sowie anschließende Sprühpräparation mit der Matrix 2,5-DHB, einmal  $20 \mu\text{l}$ ,  $c = 30 \text{ mg/ml}$  in EtOH/0,1% TFA (1:1) v/v. (Mitte) Druckpräparationen einer Peptidmischung und anschließende Sprühpräparation mit der Matrix 2,5-DHB (wie oben). Die Lipid- und die Peptidpräparation 1 wurden im Rahmen einer anderen Dissertationsarbeit massenspektrometrisch vermessen. (Unten) Druckpräparationen einer Peptidmischung ohne Matrix und anschließende Matrix-Sprühpräparation (wie oben). Die Peptidpräparation 2 wurde im Rahmen dieser Dissertation vermessen. **Vergrößerung (mitte und unten) 100x, Bildmaße:  $888 \mu\text{m} \times 666 \mu\text{m}$ .** (Oben) 500 x, **Bildmaße:  $178 \mu\text{m} \times 133 \mu\text{m}$ .** (Linke Spalte) Hellfeldaufnahmen. (Rechte Spalte) Dunkelfeldaufnahme der um  $90^\circ$  im Uhrzeigersinn gedrehten Hellfeldausschnitte.



Das Sprühverfahren eignet sich auch sehr gut zur Präparation der geätzten Hohlraumstrukturen der Silizium-Wafer, was anhand der Abbildung 5.17 erkennbar wird. Hier ist im linken Bild der Versuch zu sehen, die Linienhohlräume durch eine Dried-droplet-Präparation mit der Matrix 2,5-DHB zu füllen. Es ist dabei deutlich zu erkennen, daß in dem dargestellten Bereich der Verlauf der Kristallisation der Matrix 2,5-DHB eine vollständige und einheitliche Füllung der Linien nicht gewährleisten kann. Das Epifluoreszenzbild auf der rechten Seite zeigt dagegen einen gleichgroßen Ausschnitt, der mittels einer Sprühpräparation beschichtet wurde. Es zeigt sich hierbei eine deutlich homogenere Verteilung der Matrix, die zudem eine vollständige Füllung der Hohlraumstrukturen ermöglicht (zur Größenorientierung der Strukturen siehe auch S. 169 Abb. 4.18, obere Reihe).

Matrixpräparationen an geätzten Linienhohlräumen

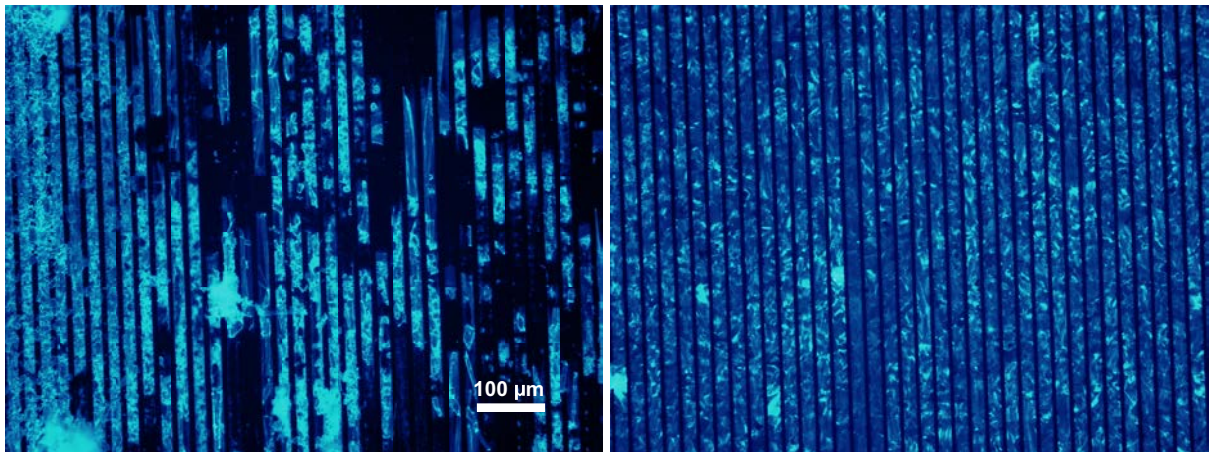


Abbildung 5.17: (Links) Dried droplet-Präparation der Matrix 2,5-DHB. (Rechts) 2,5-DHB Sprühpräparation am identischen Silizium-Wafer mit geätzten Linienstrukturen **Vergrößerung: 100 x**, **Bildmaße (einheitlich): 888 µm x 666 µm**. Man erkennt die deutlich homogenere Matrixabdeckung der Linienstrukturen bei Anwendung des Sprühverfahrens.

### 5.3.5 Druckpräparation nach Testprotokoll

Das Testprotokoll ermöglicht es für artifizielle und native biologische Proben die geeigneten Parameterkombinationen während einer Serie von Testpräparationen herauszufinden. Das gilt auch für die Druckpräparationen. Druckpräparationen mit der Matrix 2,5-DHB, die mit einem hohen Anteil eines organischen Lösungsmittels (ca. 60 % v/v) angesetzt werden, erzeugen einzelne Druckpunkte mit einem Durchmesser von unter 60  $\mu\text{m}$ . Druckpunkte von ca. 65  $\mu\text{m}$  im Durchmesser sind für diskrete Drucke des schwarzen Farbstoffgemisches aus den Originalkartuschen mit dem für die MALDI-Targets (goldbeschichtete Aluminiumprobenträger) ermittelten Abstand zu den Druckdüsen typisch. Hierbei treten sehr häufig kleinere Satellitenpunkte auf, die bei Verringerung des Abstandes zu den Druckdüsen aber vermieden werden können. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei um einen Effekt des Tropfenzerfalls handelt und nicht etwa um direkt abgetrennte Tropfen. Eine Verringerung des Abstandes (Probenteller zu Düsenebene) führt i.d.R. zu einer Vergrößerung der Druckpunkte. Ein einzelner Matrixdruckpunkt besitzt in Abhängigkeit von der Lösungsmittelzusammensetzung in etwa ein Volumen, das zwischen 10 nl und 20 nl beträgt. Im Vergleich hierzu zeigen Versuche mit Matrixlösung an feststehenden Kapillaren (ID: 50  $\mu\text{m}$ ) mit mechanisch angetriebenem Volumenstrom und einem Abtropfen in eine ruhende Gasatmosphäre, deutlich größere Tropfen. Eine flächige Druckpräparation vergrößert das Präparationsvolumen um einen Faktor von ungefähr 10, auf dann in etwa 150 nl  $\pm$  50 nl. Der flächige Druck zeigt hier für kleinere Präparationsareale, hinsichtlich der Abdeckungsdichte, durchaus mit Sprühpräparationen vergleichbare Ergebnisse. Die Kristallisation weist dagegen deutliche Unterschiede zu dem Ergebnis einer Sprühpräparation auf, vor allem was die Homogenität betrifft und weist auf einen ungleichmäßigen Kristallisationsprozess hin (siehe Abbildung 5.3.c). Es entstehen dabei Kristalle in einem lateralen Größenspektrum von  $d \leq 5 \mu\text{m}$ , die sehr häufig örtlich getrennt und zusammen mit amorph erscheinenden Bereichen auftreten. Ein geringer Zusatz von SDS in die Drucklösung führt überwiegend zu einer Angleichung der Kristallform und in höheren Konzentrationen zu einer weitgehend amorphen Präparation, fast ohne erkennbare Kristalle (siehe Abbildung 5.16). Die höheren SDS-Zugaben sind dann allerdings unvereinbar mit einer Peptid-/Proteinanalytik. Es empfiehlt sich in diesem Fall die Verwendung eines anderen, ebenfalls chaotrop wirkenden Detergenz, das weniger negative Einflüsse auf das An-/Einlagerungsverhalten der Analyte zeigt.

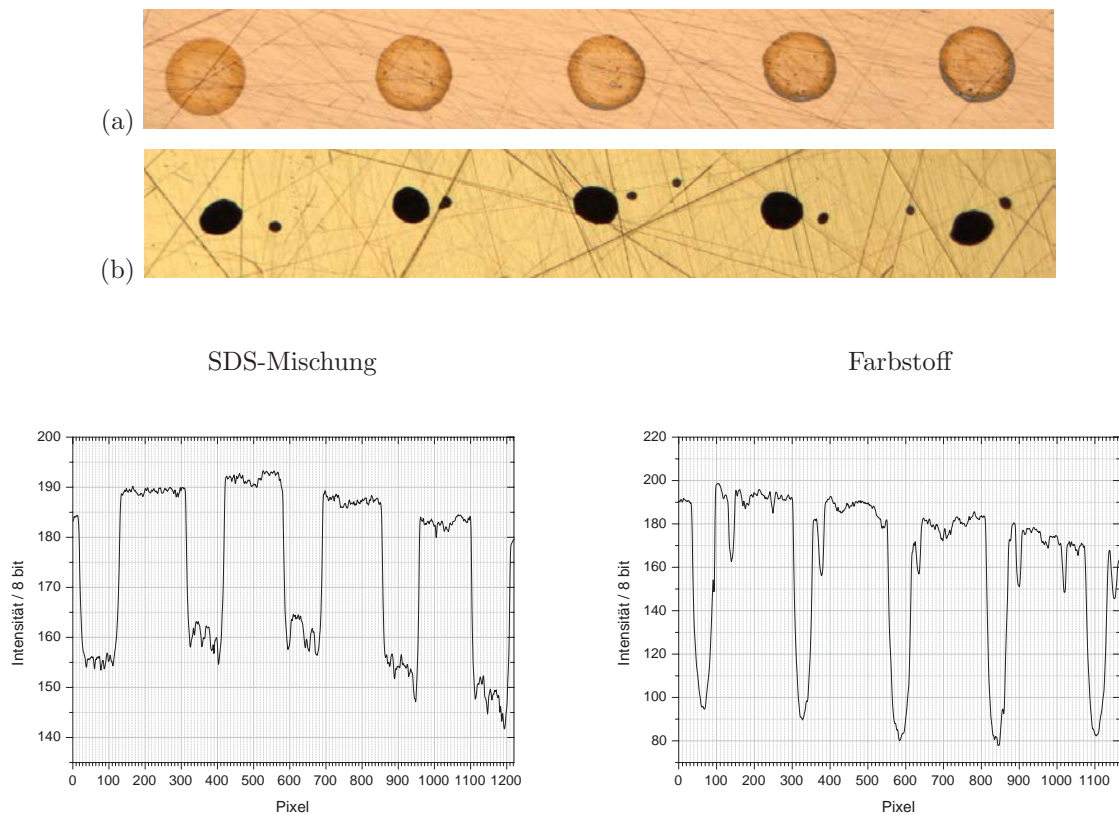
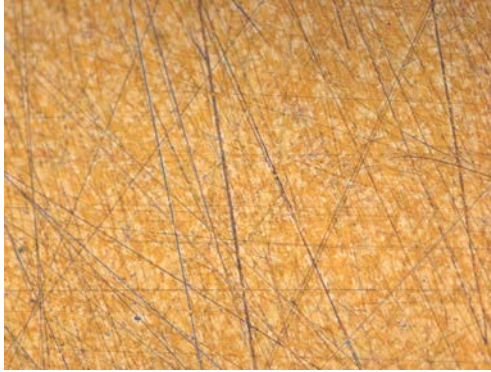
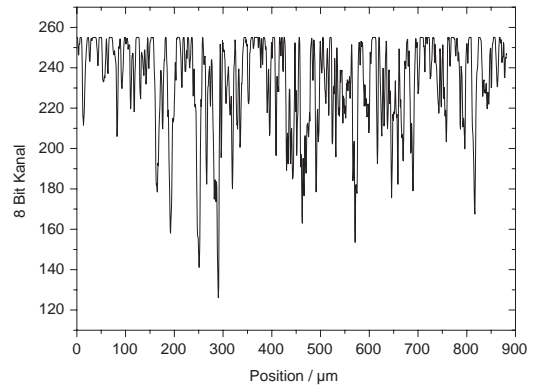
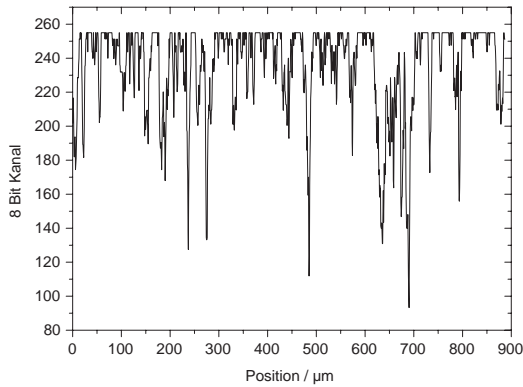


Abbildung 5.18: (a) 2,5-DHB-Druck diskreter Punkte mit ca. 5% SDS-Anteil in der Präparationslösung. (b) Druckpräparation mit der schwarzen „Farbstoffmischung“. (Unten) Horizontale Punktabmessungen. Deutlich zu erkennen sind kleine Satellitenpunkte bei den Farbstoffpunkten mit einem mittleren horizontalen Durchmesser von ca. 15 Pixel  $\equiv 19\mu m \pm 4\mu m$ . SDS-Matrix-Spots ca. 100 Pixel  $\equiv 129\mu m \pm 4\mu m$ . Der Durchmesser der schwarzen Farbstoffspots beträgt ca. 50 Pixel  $\equiv 65\mu m \pm 4\mu m$ .

2,5-DHB-Flächendruck



SDS-Matrix-Flächendruck ( $c_{SDS} \approx 5\%$ )



SDS-Matrix-Flächendruck ( $c_{SDS} > 10\%$ )

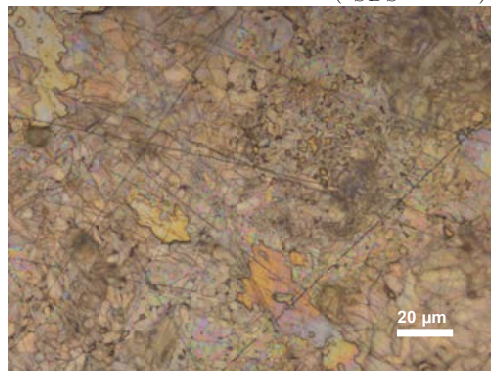


Abbildung 5.19: (Oben) Präparierte Matrixflächen auf vergoldeter Aluminiumoberfläche. Der Einsatz von SDS in Konzentrationen bis ca. 10 % ermöglicht das Verdrucken konzentrierter 2,5-DHB-Lösungen ( $> 25 \text{ mg/ml}$ ). Höhere SDS-Konzentrationen führen zu einer verminderten Kristallisation und weitgehend amorphen Präparationen (unten). (Mitte) Gemittelte horizontale optische Linienscans über eine vertikale Strecke von ca.  $20 \mu\text{m}$ . Die Flächenabdeckung mit Matrix erreicht bei hohen SDS-Konzentrationen nahezu 100 %. **Vergrößerung (oben) 100x, Bildmaße:  $888 \mu\text{m} \times 666 \mu\text{m}$ . Vergrößerung (unten) 500x, Bildmaße:  $178 \mu\text{m} \times 133 \mu\text{m}$ .**



### 5.3.6 Fazit

Die während dieser Doktorarbeit entwickelte und optimierte Sprühtechnik ermöglicht eine flächendeckende und homogene Matrixbeschichtung physikalisch und chemisch sehr unterschiedlicher Oberflächen. Das Prinzip basiert dabei auf einer statischen Zweistoff-Düse innerer Mischung mit Präparationskammer<sup>2</sup> und einem während der Präparation rotierenden Probenträger. Die Kombination dieser Elemente in der hier verwendeten Art und Weise ist als Anwendung zur MALDI-Probenpräparation biologischer Proben neuartig und mittlerweile innerhalb der Arbeitsgruppe Spengler etabliert. Getestet wurden im Rahmen dieser Arbeit die Beschichtung von nativen und artifiziellen biologischen „Oberflächen“, metallischen Oberflächen, Glasoberflächen (BK07) und Silizium-Wafer-Oberflächen. Mit einiger Übung ist es im halbautomatischen<sup>3</sup> Verfahren dabei möglich, mit der sehr häufig in der MALDI-Analytik eingesetzten Substanz 2,5-DHB als Matrix, Kristallgrößen von im Mittel drei bis fünf Mikrometer über einer Fläche von ca. 3 cm<sup>2</sup> auf einer metallischen Oberfläche aufzubringen. Die Kristalle können auf Glasoberflächen eine Größe zwischen drei Mikrometer und ca. 15 Mikrometer annehmen, wobei eine Optimierung fast ausschliesslich Kristallgrößen < 10 Mikrometer ermöglicht. Nach der Optimierung der relevanten Prozessparameter und einer Regulierung der Flussraten (Volumen- und Massestrom der Fluide) ist die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse mit einer statistischen ein-Sigma Wahrscheinlichkeit bzw. einer RSD von 5 % gegeben und wird damit nahezu unabhängig vom Experimentator. Bei eingehender und intensiver Auseinandersetzung mit der Sprühcharakteristik gelingt es geübten Operatoren mit manueller Einstellung des Volumenstromes der Matrixlösung, bei etwa jeder dritten Präparation, eine mittlere Kristallgröße von ca. 3  $\mu\text{m}$  zu erreichen. Testergebnisse, die mit der Möglichkeit einer aktiven Rückkopplung über die tatsächlichen Flussraten erzielt werden konnten legen nahe, daß bei automatischer Steuerung der Flussraten der Fluide, die mittlere Kristallgröße der Substanz 2,5-DHB auch unter 3  $\mu\text{m}$  gesenkt werden kann. Hierbei ist es von zentraler Bedeutung für die folgende MALDI-MS-Analytik, daß obwohl diese relativ kleinen Kristalle erzeugt werden, alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten nativen biologischen Oberflächen, eine für Phospholipide und Peptide ausreichende Kontakteffizienz mit der Matrix ausbilden konnten. Die laterale Migration von Analyten erwies sich im Präparationsmaßstab (0,25  $\mu\text{m}$  bis 2  $\mu\text{m}$ ) als weitgehend unbedeutend, d.h. Positionierungsartefakte sind hier eher auf Effekte wie Oversampling oder Störungen bzw. Schwankungen der Bewegungsabläufe innerhalb der Rastermechanik beim Probenstellenwechsel zurückzuführen. Als Beispiel werden in Abbildung 6.8 (S. 359) drei hintereinander durchgeführte Messungen an mit 2,5-DHB präparierten Hohlraumkreuzstrukturen dargestellt.

Die mittels der Testapparatur erstellten Druckpräparationen verändern die Kristallisation der Matrix 2,5-DHB deutlich gegenüber anderen Techniken, wie z.B. Dried droplet- oder Sprühpräparationen. Die effektiv nutzbare Fläche einer Präparation ist bei Druckpräparationen größer, als bei Dried droplet-Präparationen. Bei Dried droplet-Präparationen mit z.B. Peptidanalyten ermöglichen oftmals nur die „Hot spots“ am großkristallinen Rand der Probe eine Analytdetektion. Bei flächigen Druckpräparationen konnten Messungen mit Peptidanalyten aus im Mittel 95 % der präparierten Fläche erhalten werden. Das Verdrucken von vorgemischten Matrix/Analyt-Lösungen ist möglich und ergibt rein qualitativ vergleichbare Ergebnisse zu Dried droplet-Präparationen. Die absoluten Signalintensitäten von Peptidanalyten sind i.d.R. niedriger, als bei Dried droplet-Präparaten und Sprühpräparationen. Das SNR-Verhältnis von Peptidanalyten in artifiziellen Präparationen ist i.d.R. vergleichbar mit dem Ergebnis von Dried droplet-Präparationen und damit deutlich schlechter, als bei Sprühpräparationen. Druckpräparationen sind damit eingeschränkt zu empfehlen. Zum Einsatz in bildgebenden Verfahren eignet sich diese Technik, in der hier

---

<sup>2</sup>Zweistoff-Düse innerer Mischung mit akustischem Resonator.

<sup>3</sup>Manuelle Flussratenregulierung.

---

verwendeten Art und Weise, nur bedingt und soweit keine größeren Flächen gerastert werden. Als abschliessendes Urteil ist diese Technik eher im Zusammenhang mit Online-HPLC-MS Messungen anzuwenden, wie dies auch bereits mit kommerziellen Geräten getan wird, die in dieser Arbeit in der Einleitung erwähnt werden (2.3.3).

## 5.4 Signalcharakteristik in MALDI-TOF-Massenspektren

### 5.4.1 Signalintensität als Funktion des Desorptionsortes und der Pulszahl

Im folgenden sind die Ionenpulsintensitäten als Funktion der Desorptionsorte in einer MALDI-Präparation gezeigt. Diese weisen generell, wie in der Literatur beschrieben, im Falle der MALDI-Methodik immer eine relativ große Varianz auf. Diese Streuung kann, wie bereits zuvor erläutert, durch mehrere systematische und statistische Größen beeinflusst werden. Hierzu zählen:

1. Die Analytmenge im Desorptionsbereich und ihre Verteilung,
2. Die Matrixmenge im Desorptionsbereich und ihre Verteilung,
3. Die Effizienz des MALDI-Prozesses (einschliesslich der Rauschentwicklung),
4. im weiteren Sinne apparative Schwankungen (Laserpulsenergie, Ionen transfer, Ionendetektion bzw. Konversion, elektronische Verstärkung und Digitalisierung).

Aus statistischen Überlegungen geht hervor, daß es dabei nicht unerheblich ist, ob die einzelnen Messungen sich gegenseitig beeinflussen können oder nicht. Die erhaltenen Signalintensitäten kumulierender Messungen können einerseits eine Normalverteilung zeigen oder aber, wie von Mittelwertverteilungen bekannt, eine t-Verteilungscharakteristik aufweisen.

Im weiteren Verlauf wird eine Messserie von drei Datensätzen vorgestellt, die mit jeder Präparationstechnik einheitlich konzentrierte Analyte verwendet. Aufgrund der wechselnden Präparationstechniken kann dabei das eingesetzte Präparationsvolumen nicht konstant gehalten werden und auch das Verhältnis der Lösungsmittel variiert, da die unterschiedlichen Techniken zusammen mit einer Matrix i.d.R. ein begrenztes Mischungsoptimum aufweisen. Die apparativen Parameter bleiben dagegen in einer Messserie unverändert, d.h. die HV-Potentiale, die Laserpulsenergie, die axiale Position der Probenebene, die DE-Zeit, etc. ... sind im Rahmen ihrer Genauigkeit konstant gehalten.

In den folgenden Abbildungen werden die Signalintensitäten einzelner Massesignale der angegebenen Peptidanalyte und der Matrix 2,5-DHB dargestellt. Die Peptide Substanz P, Melittin und Insulin sind jeweils in einem Einwaageverhältnis von  $1 : 3 : 5 \cdot 10^{-6}$  M zusammen mit 10 mg/ml 2,5-DHB präpariert.

#### Voneinander unabhängige Messungen (Datensatz 2)

Der Datensatz 2 beinhaltet die Werte der monoisotopischen Massenpeaks von Substanz P und Melittin. Bei beiden Analyten handelt es sich um kleine Peptide. Die Messungen werden am Spektrometer ALADIM II im Reflektormodus durchgeführt (Abbildung 5.20). In Abbildung 5.21 (a) sind die Signalintensitäten aus Linienrastermessungen an unterschiedlichen Präparationen zu erkennen. In Abbildung 5.21 (b) sind die dazugehörigen Box-Plots aufgetragen. Diese geben einen Überblick hinsichtlich der Verteilung dieser Daten (Datengrenze: kurze waagerechte Linien ohne senkrechte Verbindung) innerhalb bestimmter Perzentile (Box: 25 % und 75 %, Whisker: 95 % und 5 %) und z.B. der Lage von wahrscheinlichen Ausreißern (außerhalb Kreuz: 99 %, 1 %), gegenüber Kenngrößen wie dem arithmetischen Mittelwert (Rechteck) und dem Meridian (durchgezogene waagerechte lange Linie).



Tabelle 5.6: Parameterkombinationen der Messungen zu Datensatz 2 am Spektrometer ALADIM II.

Geräteparameter	
Targetpotential	: 18.9 kV
Blendenpotential	: 14.7 kV
DE-Zeit	: 190 ns
Gitterpotential	: - 5.1 kV
Konversionsdynode	: - 9.1 kV
Reflektor 1	: 12.2 kV
Reflektor 2	: 23.3 kV
MCP-Potential	: - 2.2 kV
z-Achsenposition	: in b*, fix
Laserpulsenergie	: ca. 250 $\mu J$
Abschwächung	: 67
ND-Filter	: kein Filter
Restgasdruck	: ca. $9.9 \cdot 10^{-7}$ mbar
Raumtemperatur	: ca. 20°C
* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.	
Präparationsparameter	
Matrix	: 2,5-DHB
Molmasse	: 154.7 Da
Summenformel	: $C_7H_6O_4$
Target	: Aluminiumteller, vergoldet

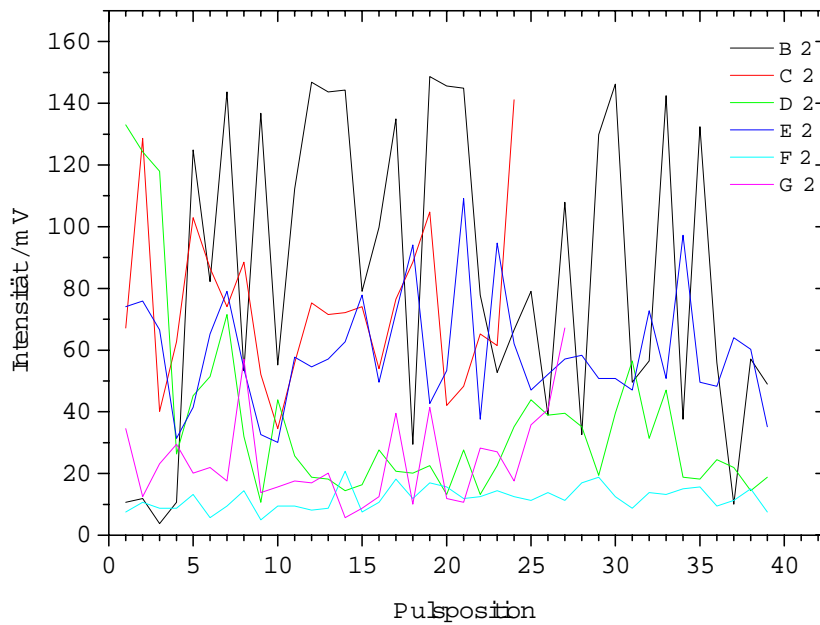
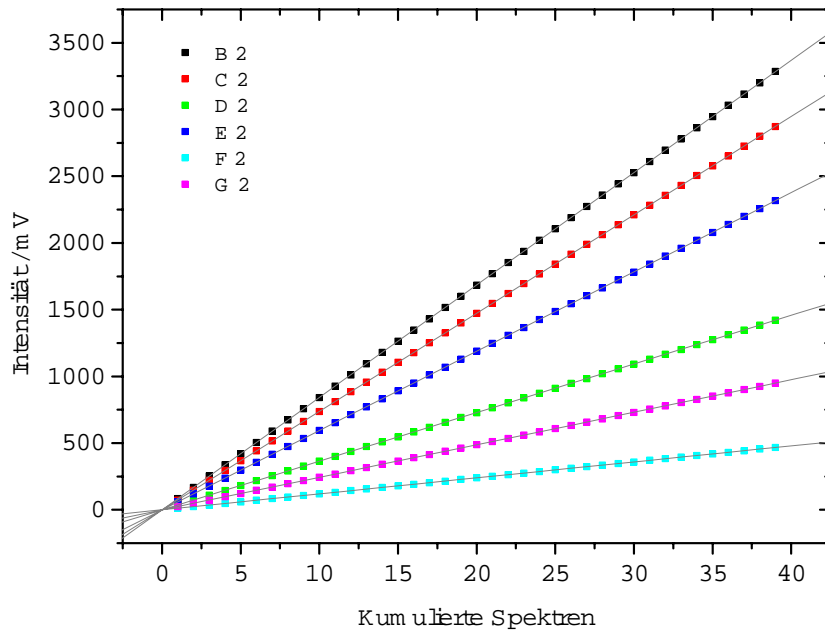
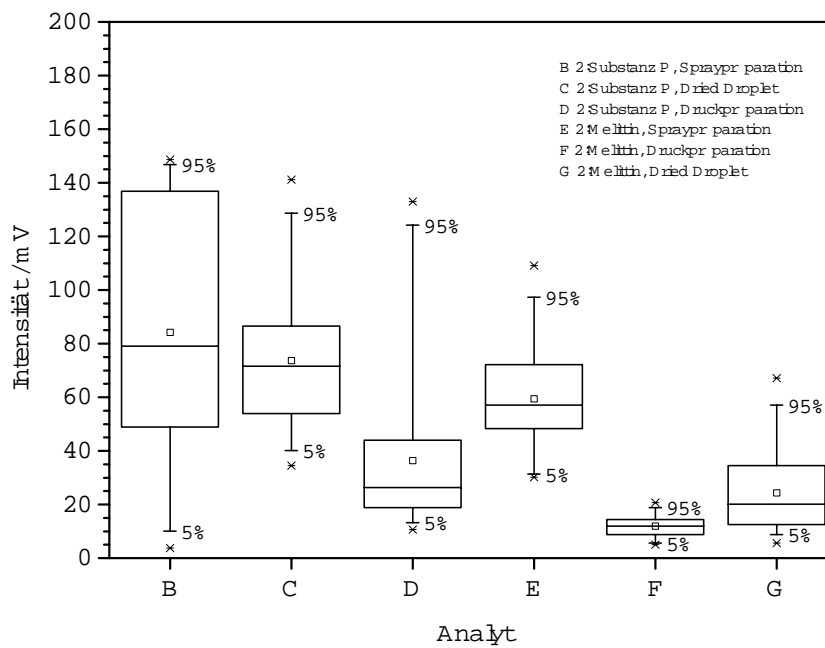


Abbildung 5.20: Ionensignalintensitäten benachbarter Desorptionsorte von ausgewählten monoisotopischen Massenpeaks. Messungen am Spektrometer ALADIM II.



(a)



(b)

Abbildung 5.21: (a) Darstellung repräsentativer Signalwachstumskurven von Messungen an unterschiedlichen Probenstellen. Zur Herstellung der Proben wurden unterschiedliche Präparationstechniken eingesetzt. (b) Boxplot der Verteilungen aus (a).

Tabelle 5.7: Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung von Datensätzen mit geringer Messwertanzahl. Der Test wird in Abwandlung auch in der Software SPSS verwendet. Festgelegtes Signifikanzniveau  $\alpha = 0.05$  (5%). Die Nullhypothese (**Normalverteilt**) wird angenommen, wenn  $p > 0.05$  bzw.  $W$  bei einem Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$  über einem kritischen Wert  $W_{krit}$  liegt. Die kritischen Werte  $W_{krit}$  sind für Stichprobenumfänge  $n < 50$  tabelliert und in den meisten Statistikbüchern im Anhang enthalten.

Datensatz	Messwertanzahl	W	p
B 2	39	0.88491	0.00058
C 2	24	0.93532	0.13157
D 2	39	0.70498	0.00000
E 2	39	0.94525	0.07884
F 2	39	0.97775	0.72225
G 2	27	0.88432	0.00561

Tabelle 5.8: Durch lineare Regression ermittelte Steigung der Ausgleichsgeraden der Kumulationen aus Abbildung 5.21 [mV/Kumulation].

Datensatz	Messwertanzahl	Steigung
B 2	39	84.2
C 2	24	73.7
D 2	39	36.4
E 2	39	59.4
F 2	39	12.0
G 2	27	24.4

### Voneinander abhängige Messungen (Datensatz 1 und 3)

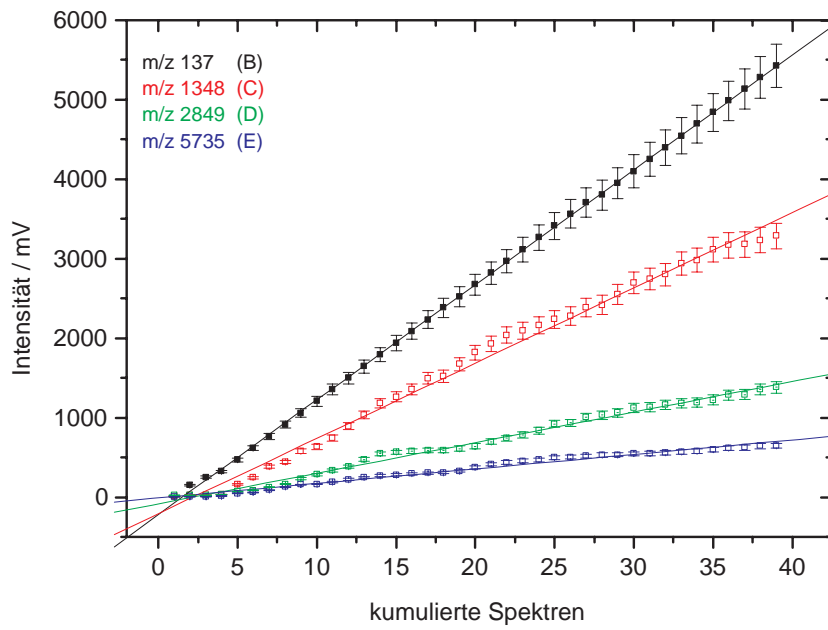
Datensatz 1 beinhaltet Werte des monoisotopischen Massenpeaks von 2,5-DHB ( $[M - H_2O + H]^+$ ) und die Massenzentroidwerte der unaufgelösten Multiplets der Quasimolekülonen ( $[M + H]^+$ ) der Peptide Substanz P, Melittin und Insulin. Die Messungen erfolgen am Spektrometer LAMMA 2000. Datensatz 3 beinhaltet die Werte der monoisotopischen Peaks von 2,5-DHB, Substanz P, Melittin und Insulin. Die Messungen erfolgen am Spektrometer ALADIM II. Zu berücksichtigen ist dabei, daß bei Substanz P der monoisotopische Peak der Basispeak der Verteilung ist, bei Melittin aber der zweite Peak der Verteilung. Bei Insulin ist im teil aufgelösten Multiplet der vierte Peak der Basispeak der Verteilung. In Abbildung 5.22 (a) sind die kumulierten Signalintensitäten aus Datensatz 1 dargestellt. Abbildung 5.22 (b) zeigt den Box-Plot der einzelnen Signalintensitäten (siehe auch Datensatz 2). Abbildung 5.23 stellt die kumulierten Signalintensitäten aus Datensatz 3 in einer halblogarithmischen Auftragung dar. Der Box-Plot liefert keine neuen Erkenntnisse und ist deshalb nicht dargestellt.

Tabelle 5.9: Parameterkombinationen der Messungen zu Datensatz 1 und 3 am Spektrometer LAMMA 2000 (Werte in Klammern) und am Spektrometer ALADIM II.

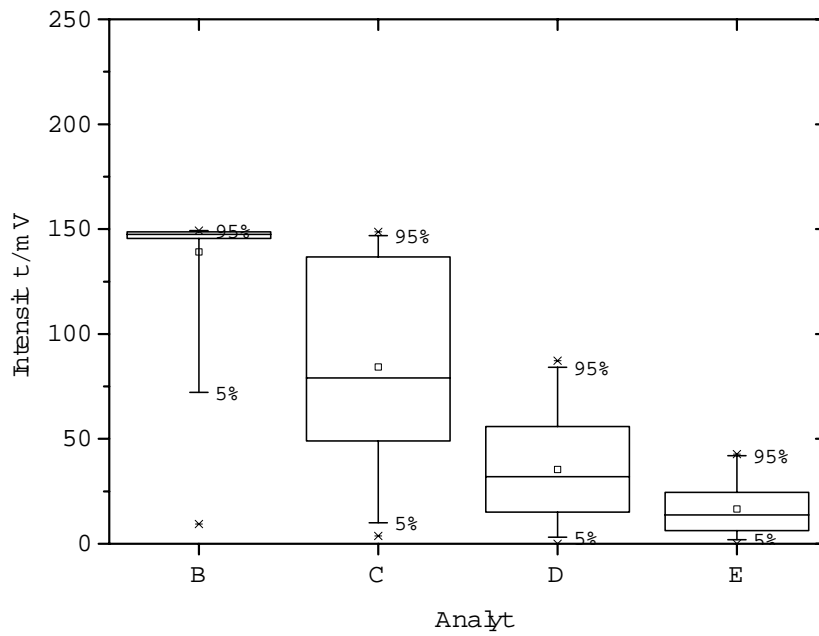
Geräteparameter	
Targetpotential	: 18.9 kV, (10 kV)
Blendenpotential	: 14.7 kV, (7.5 kV)
DE-Zeit	: 190 ns, (-)
Gitterpotential	: - 5.1 kV, ( $\pm 0$ kV)
Konversionsdynode	: - 9.1 kV, (-)
Reflektor 1	: 12.2 kV, (-)
Reflektor 2	: 23.3 kV, (-)
MCP-Potential	: - 2.2 kV, (-2.2 kV)
z-Achsenposition	: in b*, fix
Laserpulsenergie	: ca. 120 $\mu J$ , (80 $\mu J$ )
Abschwächung	: 60, (50)
ND-Filter	: kein Filter
Restgasdruck	: ca. $9.9 \cdot 10^{-7}$ mbar, ( $7.5 \cdot 10^{-7}$ mbar)
Raumtemperatur	: ca. 20°C
* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.	
Präparationsparameter	
Matrix	: 2,5-DHB
Molmasse	: 154.7 Da
Summenformel	: $C_7H_6O_4$
Target	: Aluminiumteller, vergoldet

Tabelle 5.10: Durch lineare Regression ermittelte Steigung der Ausgleichsgeraden der Kumulationen aus Abbildung 5.22 [mV/Kumulation].

Datensatz	Messwertanzahl	Steigung
B 1	39	144.4
C 1	39	94.7
D 1	39	38.4
E 1	39	18.2



(a)



(b)

Abbildung 5.22: (a) Darstellung der Signalintensitätsentwicklung bei kumulierten Messungen an einer Probenstelle. (b) Boxplot-Darstellung der Intensitätsverteilungen aus (a).

Tabelle 5.11: Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung. Festgelegtes Signifikanzniveau  $\alpha = 0.05$  (5%). Die Nullhypothese (**Normalverteilt**) wird angenommen, wenn  $p > 0.05$  bzw.  $W$  bei einem Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$  über einem kritischen Wert  $W_{krit}$  liegt. Die kritischen Werte  $W_{krit}$  sind für Stichprobenumfänge  $n < 50$  tabelliert und in den meisten Statistikbüchern im Anhang enthalten.

Datensatz	Messwertanzahl	W	p
B 1	39	0.94269	<b>0.06411</b>
C 1	39	0.91868	0.00894
D 1	39	0.92264	0.01238
E 1	39	0.91066	0.00463

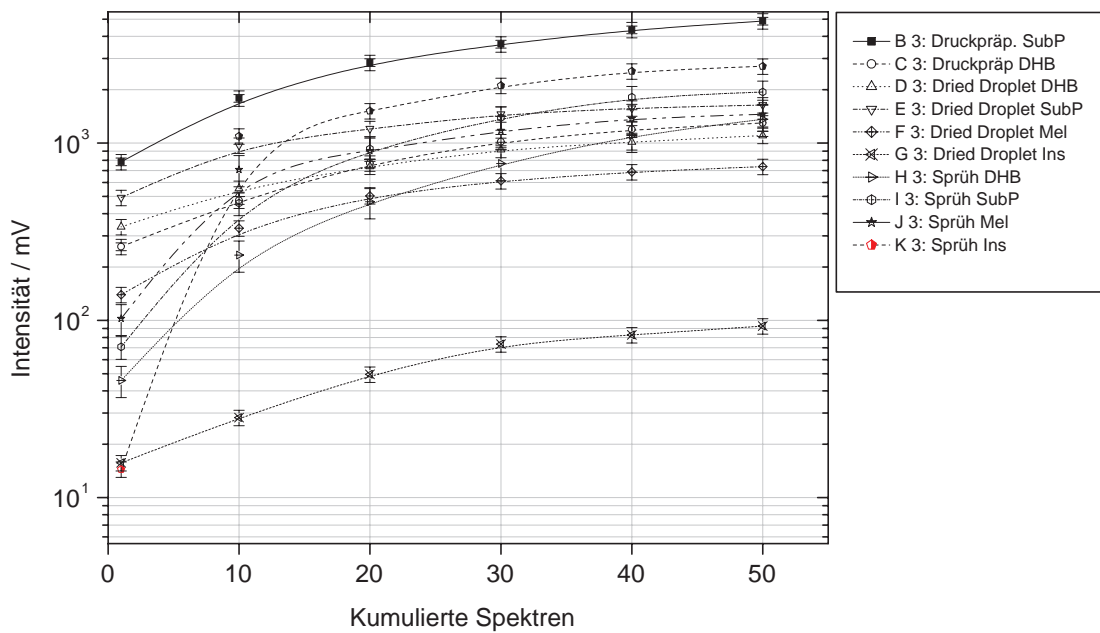


Abbildung 5.23: Ionensignalintensitäten ausgewählter monoisotopischer Massenpeaks als Funktion der Laserimpulse pro Messstelle, bei unterschiedlichen Präparationstechniken.

Alle untersuchten Proben zeigen bei Kumulation von bis zu 50 Pulsen eine stetige Steigerung der Summenintensität. Es gibt dabei überwiegend deutliche Unterschiede zwischen Mehrpulsmessungen an einer Probenstelle und Mehrpulsmessungen an wechselnden Probenstellen. Diese resultieren einerseits aus der dreidimensionalen Verteilung der Analyte innerhalb der Probe und andererseits aus den unterscheidbaren (teilweise statistischen) Wachstumsraten der Rauschwerte. Das SNR-Verhältnis bei Mehrpulsmessungen an einer Probenstelle verläuft dabei i.d.R. mit größerer Steigung als bei Kumulationen aus Einzelpulsmessungen an unterschiedlichen Probenstellen. Letzteres wird an den in 5.4.3 gezeigten Ergebnissen (Abbildung 5.27) deutlich. Die Intensitätsverteilungen bei den voneinander unabhängigen Messungen lassen sich präparationsunabhängig häufiger mit einer Normalverteilung in Einklang bringen, als die Ergebnisse der voneinander abhängigen Messungen. Die gezeigten Beispieldatensätze 1, 2, 3 stellen jeweils repräsentative Ergebnisse einer Messserie dar.

### Signalwachstumscharakteristik unterschiedlicher Matrices

In Abbildung 5.24 ist in willkürlicher Gruppierung die kumulierte Signalintensität untersuchter MALDI-Matrices und einiger Peptidanalyte aufgetragen. Es handelt sich dabei um voneinander abhängige Mehrpulsmessungen an einer identischen Probenstelle. Die Proben wurden mittels der Dried-droplet-Methode und einem einheitlichen Volumen von  $1 \mu\text{l}$  hergestellt. Mit der Matrix 2,5-DHB (ca. 10 mg/ml) werden die Lösungsmittel Ethanol und 0.1%-TFA (3:7) v/v, mit der Matrix CHCA (ca. 5 mg/ml) Methanol und 0.1%-TFA und mit der Matrix SA (ca. 5 mg/ml) Acetonitril und 0.1%-TFA verwendet. Die vermessenen Peptidanalyte Substanz P, Melittin und Insulin stehen nach der Einwaage in einem molaren Verhältnis von  $1:3:5 \cdot 10^{-6}$  M. Alle Messungen erfolgen mit einer Laserpulsenergie von ca.  $200 \mu\text{J}$  und einer dynamischen Abschwächung von 67 (siehe Abb. 4.3). Die Proben werden zunächst auf Stellen mit einem günstigen SNR hin untersucht (*hot spot*) um sicherzustellen, daß an der entsprechenden Messstelle ausreichend intensive Signale erzeugt werden können. Die kumulierenden Messungen erfolgen dann im Anschluss. Hierbei wird deutlich, daß alle untersuchten Matrices und Analyte im Untersuchungsumfang ein stetiges Wachstum aufweisen. Die vorherrschende Charakteristik ist dabei ein linearer Verlauf der Kurven, teilweise fällt der Zuwachs im Verlauf ab. Die Matrix CHCA zeigt das in der Literatur bereits beschriebene Phänomen, daß Peptidionen in artifizialen Präparationen erst nach etwa dem dritten bis fünften Puls mit Intensitäten auftreten, die deutlich über denen der unspezifischen Rauschwerte liegen.



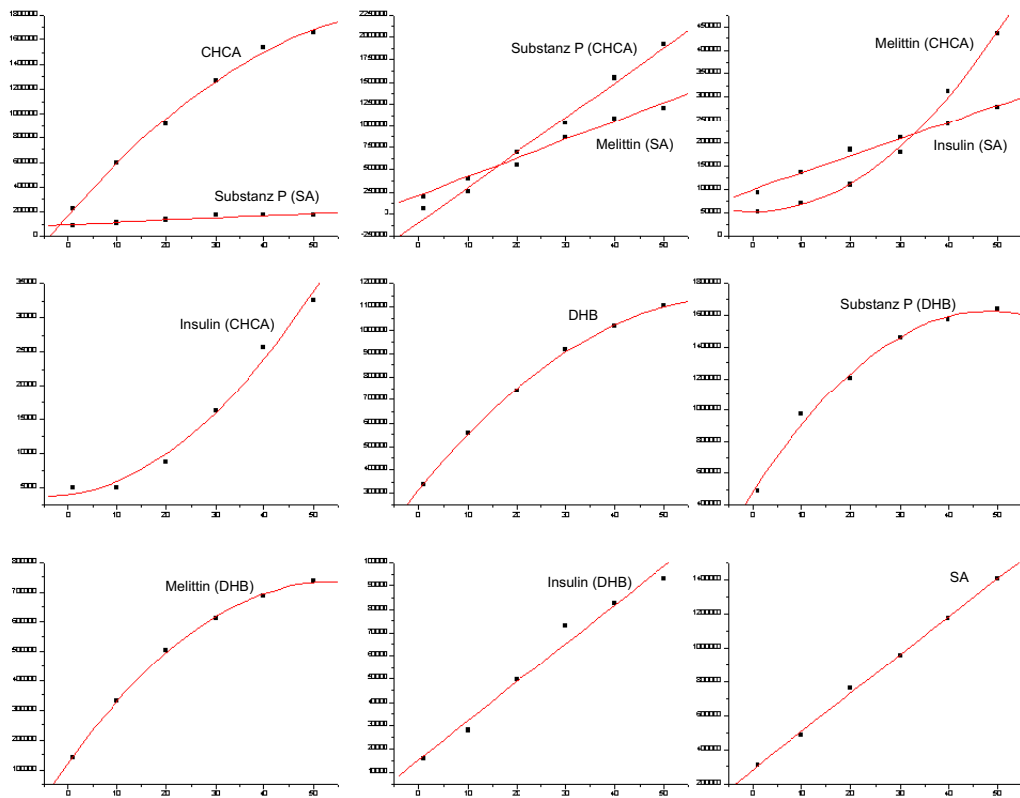


Abbildung 5.24: Signalwachstum der Basispeaks der UV-MALDI-Matrizes (DHB, SA, CHCA) und der monoisotopischen Peaks einiger Peptidanalyte in Kombination mit unterschiedlichen Matrizes. Es handelt sich um Summensignale aus Mehrfachmessungen ( $n = 1, 10, \dots, 50$ ) an jeweils einer Messstelle.

### 5.4.2 Signalintensität in Abhängigkeit von der Matrix- und Analytverteilung

Exemplarisch dargestellt ist in Abbildung 5.25 eine Vergleichsmessung einer Standardpeptidlösungspräparation mit Substanz P, Mellitin und Insulin in einem Verhältnis  $1:3:5 \times 10^{-6}$  M mit der Matrix 2,5-DHB in einer Konzentration von 10 mg/ml (EtOH/0.1 % TFA, 1:1, v/v). Die (Infokus)Vermessung erfolgte am Spektrometer LAMMA 2000 mit zentrisch justiertem Laserstrahl bei einer Pulsenergie von  $53 \mu\text{J}$  und einer dynamischen Abschwächerstellung von 40 sowie zusätzlicher Verwendung eines 11 % ND-Filters (Neutralsdichtefilter, siehe Abb. 4.7).

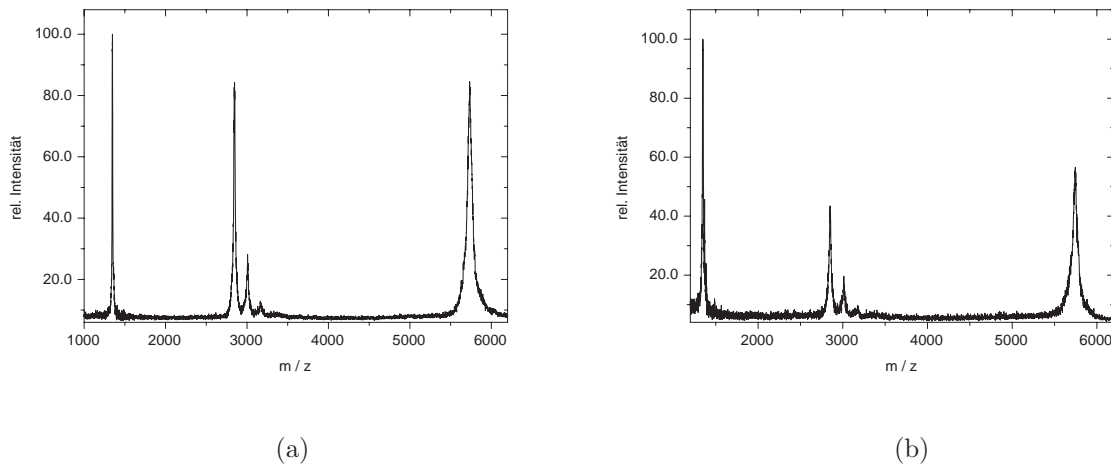


Abbildung 5.25: (a) Signalintensität eines Summenspektrums aus 25 Messungen an je 20 Probenpositionen innerhalb einer Sprühpräparation. (b) Signalintensität eines Summenspektrums aus 25 Messungen an je 20 Probenpositionen am Rand einer Dried-droplet-Präparation.

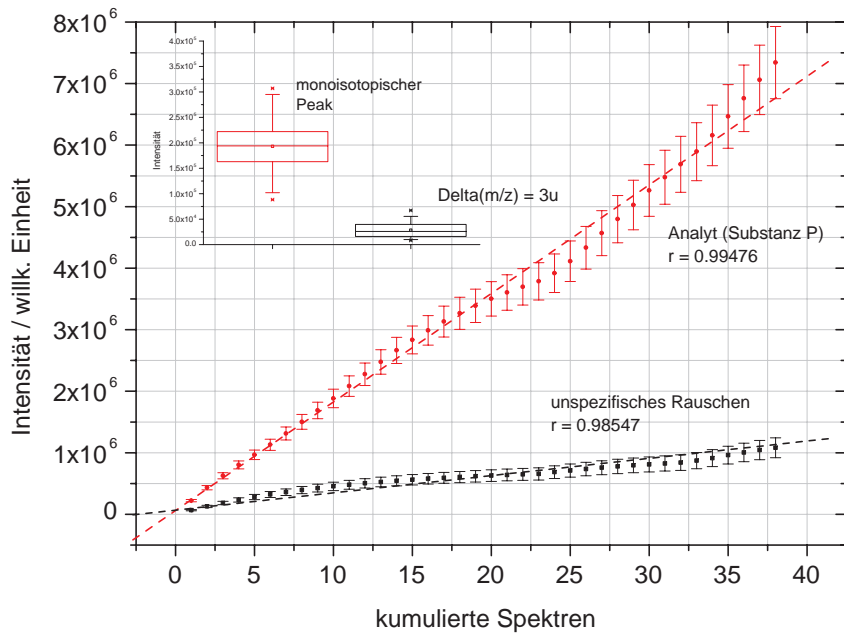
In Abbildung 5.25 ist zu erkennen, daß im Summenspektrum der Sprühpräparation die maximalen Signalintensitäten der drei Peptide deutlich geringere Abweichungen zeigen, als im Summenspektrum der Dried-droplet-Präparation, obwohl in jedem Fall mit der identischen Stammlösung präpariert wurde. Im Falle der Dried-droplet-Präparation ist gezielt nach Stellen am Randbereich der Präparation gesucht worden. Die Sprühpräparation ist dagegen über die gesamte Schicht ohne lokale Häufung der einzelnen Stellen vermessen worden. Eine Berechnung der Peakintegrale in Spektrum (a) ergibt für die Signalmultiplets gerundet ein Intensitätsverhältnis von  $1 : 4 : 6$  ( $1/3.7/6.0$ ) und in Spektrum (b) ein Verhältnis von  $1 : 2 : 3$  ( $1/1.9/2.7$ ). Beide Messungen geben hierbei nicht exakt das Verhältnis der Einwaage ( $1 : 3 : 5$ ) wieder. In der mittels dried droplet präparierten Probe werden die Peptide mit höherer Molekularmasse geringer gewichtet, als es der Einwaage entspricht. In der mittels Sprühpräparation erstellten Probe kommt es zu einer Übergewichtung der Peptide mit höherer Molekularmasse. Bei dem Vergleich der Messungen fällt dennoch auf, daß unter identischen Gerätebedingungen und bei einheitlicher Messmethodik, im Mittel besonders die Sprühpräparationen vergleichbar intensive Basispeaks in jeder Multipletverteilung der drei Peptide zeigen. Die Abweichungen der Intensitätsverhältnisse vom Einwaageverhältnis wird mit der unterschiedlichen Kristallisation und der abweichenden Verteilung von Matrix(kristallen) sowie einer abweichenden An- bzw. Einlagerung von Analyten im Verlauf der jeweiligen Präparation in Zusammenhang gebracht. Die Präparationsvolumina wurden alle aus dem identischen Stammlösungsgefäß ohne veränderte Durchmischung und unmittelbar nacheinander entnommen sowie zur entsprechenden Präparation verwendet. Da sowohl die Bestrahlungsfläche als auch die Laserpulsenergie nur geringe Standardabweichungen zeigen und vor allem bei den mittels dried droplet erzeugten Proben gezielt die (stark

peptideinlagernden) Randbereiche einer Probe vermessen wurden, muss es sich bei den beobachteten Unterschieden in den Spektren um ursächliche Verteilungsphänomene der Präparationstechniken handeln.

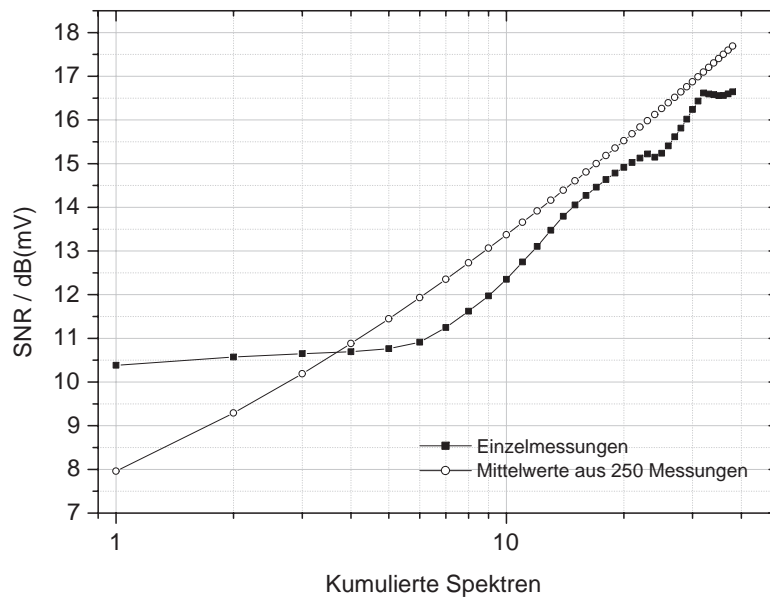
### 5.4.3 Signal-zu-Rausch Entwicklungen

#### Artifizielle Peptidproben

Die Ermittlung des unspezifischen Rauschwertes kann für jeden einzelnen Datenpunkt vorgenommen werden. Durchweg angewandt führt dies zur Erstellung einer Basislinie. Im gezeigten Beispiel von Abbildung 5.26 wird die Rauschwertintensität über einen Bereich im Spektrum ermittelt, der das Datenpunktintervall des aufgelösten monoisotopischen Peaks des Peptidanalyten Substanz P umfasst. Der Referenzbereich des unspezifischen (reinen) Rauschens liegt dabei in einem unmittelbar benachbarten Zeitintervall. Es werden insgesamt zwei Messreihen aufgenommen. Zum einen eine Messreihe, die einmal  $n$  Messungen an einer Probenstelle enthält sowie einmal eine Messreihe, die 250 mal  $n$  Messungen an einer Probenstelle enthält (d.h. 250, 500, ..., 9500). Für diese Messungen werden die Basislinien des unspezifischen Rauschens in den Spektren bestimmt und die zugrundeliegenden Rauschwerte an den entsprechenden Peakintervallen mit den Signalintensitäten der Peakzentroide korreliert. Bei der Messreihe mit den Einzelmessungen werden die Einzelwerte korreliert. Bei der Messreihe mit den 250 x  $n$  Messungen die arithmetischen Mittelwerte. Die weiteren Abbildungen in diesem Abschnitt zeigen die SNR-Entwicklungen der unter 5.4.1 dargestellten Messungen.

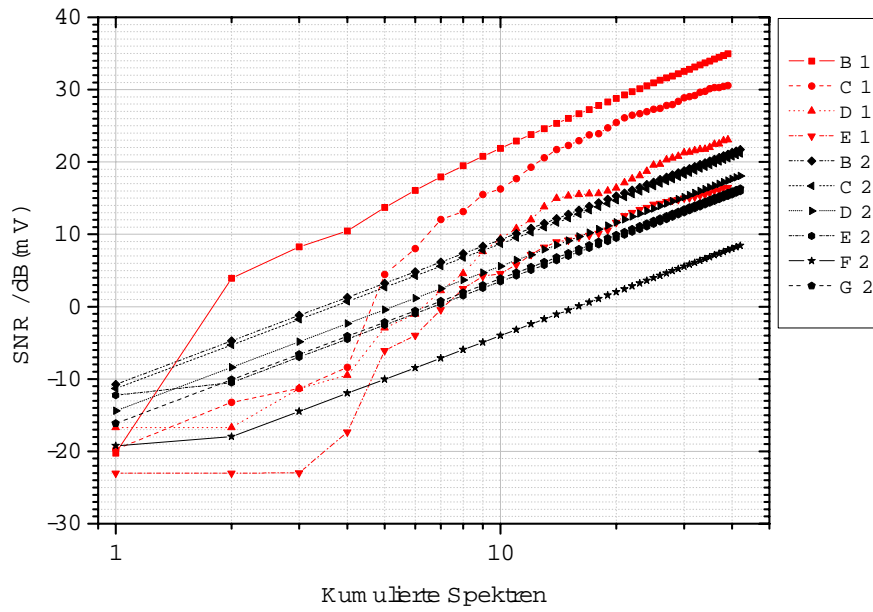


(a)

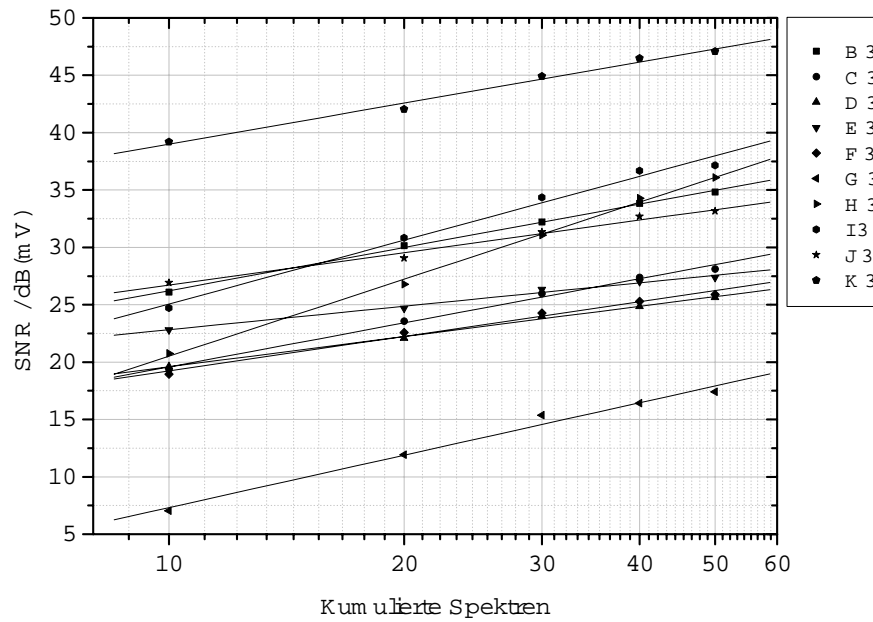


(b)

Abbildung 5.26: (a) Signalintensität kumulierter Einzelpulsspektren von Substanz P an einer Messstelle im Vergleich zum unspezifischen Rauschen. (b) Vergleich des SNR anhand der Intensitätsmittelwerte aus  $250 \times n$  Kumulationen und  $n$  Kumulationen für jeden Datenpunkt im Plot.



(a)



(b)

Abbildung 5.27: (a) Dargestellt ist die SNR-Entwicklung der Messungen aus Datensatz 1 (B 1 - E 1) entsprechend Abbildung 5.22. und Datensatz 2 (B 2 - G 2) entsprechend Abbildung 5.21. (b) SNR-Entwicklung der Messungen von Datensatz 3 aus Abbildung 5.23.

### Korrelation der Signalintensitäten von Lipid- und Peptidanalyten in einer artifiziellen Probe

Neben den massenspektrometrisch (bezogen auf MALDI) potenziell interessanten Lipiden wie Vertreter der PC, PI, PE, etc., ist im Rahmen dieser Arbeit auch der Einfluss des sehr häufig in tierischen Membranen vorkommenden Cholesterol, auf die Signalintensität des Beispielpeptides Substanz P, untersucht worden. Als Präparationstechnik wird hierzu die Dried droplet-Methode gewählt, um eine mögliche Durchmischung und ggf. eine ungleichmäßige Verteilung der Analyte zu ermöglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.28, in der Form der Intensitäts- und SNR-Entwicklungen zusammengefasst.

Diese zeigen, daß Cholesterol einen messbar negativen Einfluss auf die erhaltenen Signalintensitäten von Substanz P besitzt. Die Signalintensitäten der Multiplets bleiben, wie auch das SNR, deutlich unterhalb der zuvor bei reinen Proben ermittelten Werte. So stehen hier rechnerische Werte für eine Steigung bei kumulierten Messungen von 0.033 mV/Spektrum bzw. 0.116 mV/Spektrum z.B. den Werten aus Abbildung 5.23 von in etwa 36 mV/Spektrum für eine mittels dried droplet präparierte Probe von Substanz P in einer Konzentration von ca.  $1 \cdot 10^{-6}$  M gegenüber. Die niedrigste Steigung für Substanz P ( $10^{-6}$  M), die aus mittels dried droplet präparierten reinen Proben mit der Matrix 2,5-DHB (10 mg/ml) in Peptidgemischen erhalten wurde beträgt 4 mV/Spektrum (Messung nicht dargestellt).

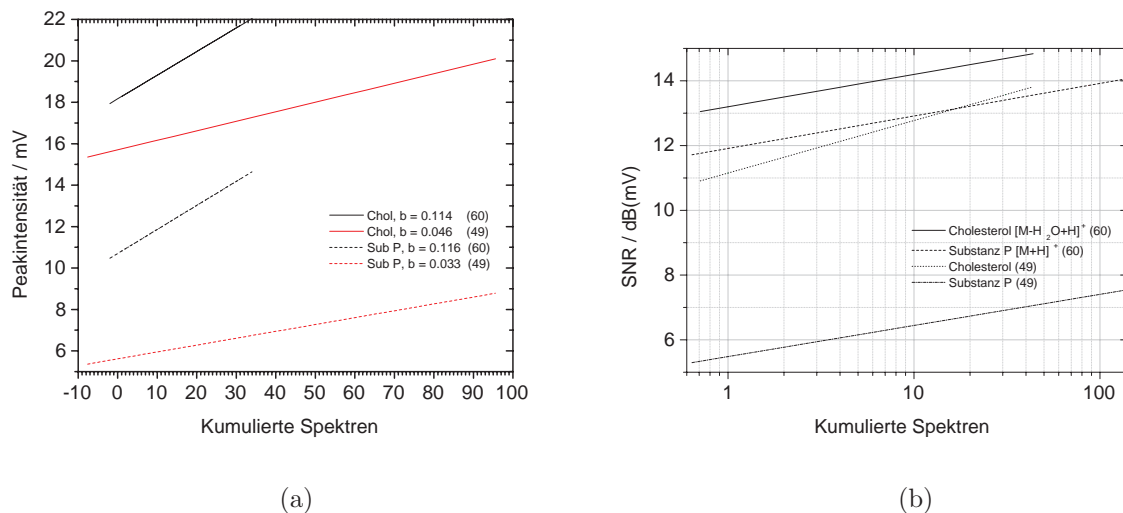


Abbildung 5.28: (a) Signalintensitätsentwicklung an einer Dried Droplet-Präparation von Cholesterol,  $C_{27}H_{46}O$  (Stammlösung,  $c \approx 2 \cdot 10^{-3} M$ , in Aceton), mit Substanz P (Stammlösung,  $c \approx 5 \cdot 10^{-4} M$ , in EtOH/0.1% TFA 3:7 (v/v)) und der Matrix 2,5-DHB (Stammlösung,  $c \approx 10^{-4} M$ , in EtOH/0.1%-TFA, 3:7 (v/v)). Mischungsverhältnis der Dried Droplet-Präparation:  $1 \mu l$  Substanz P (1/100) +  $1 \mu l$  Cholesterol (1/100) +  $1 \mu l$  2,5-DHB. Die Auftragung von Cholesterol erfolgt nach dem Auftrag von Substanz P und 2,5-DHB auf einen goldbeschichteten Aluminiumprobenträger. Hierbei kommt es zu einer Umkristallisation. Die Kristalle werden durch die Umkristallisation deutlich kleiner. (b) Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Messungen zu (a). Infokusmessungen mit zwei unterschiedlichen Abschwächungen (60, 49; siehe S.149) und einer Ausgangspulsenergie von ca.  $150 \mu J$  am Spektrometer ALADIM II. Cholesterol kann z.B. im Säugetiergehirn bis zu 25 % des Lipidmasseanteiles (im weiteren Sinne) einnehmen.

## SNR-Entwicklung von Lipiden bei Messungen an nativen biologischen Proben

Die SNR-Entwicklung von Phospholipiden ist in dieser Arbeit an Einzelzellen und auch an Gewebeproben untersucht worden. Beispielhaft werden hier die Ergebnisse eines Vergleiches der Signalintensitäten von PC (34:1) als  $[M+H]^+ = 760$  u,  $[M+Na]^+ = 782$  u und  $[M+K]^+ = 798$  u sowie der PC-Kopfgruppe  $m/z = 184$  u dargestellt (Abbildung 5.29). Diese stammen aus Messungen an Gewebeproben der Maus und einzelnen Hefezellen. Die genannten Ionenspezies konnten im Rahmen der Analyse mit hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden, indem Vergleichsspektren der Reinsubstanz als Referenz mit der identischen Kalibrierung vermessen wurden (nicht explizit dargestellt).

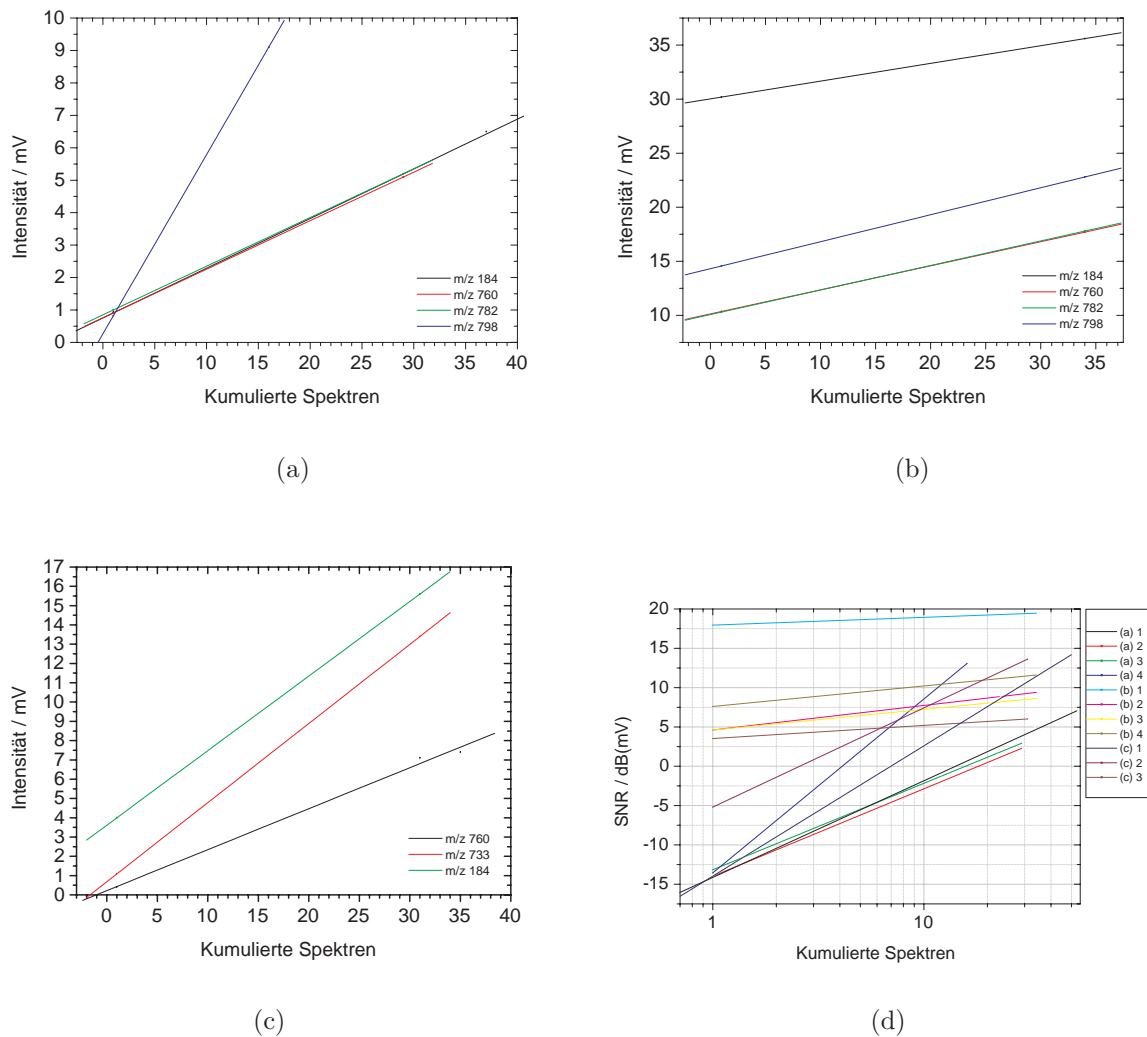


Abbildung 5.29: (a) Signalintensitätsentwicklung von ausgewählten Lipidsignalen an einer Sprühpräparation von quergestreifter Mausmuskulatur. (b) Identische Probe zu (a), Messung mit höherer Bestrahlung. (c) Signalintensitätsentwicklung von ausgewählten Lipidsignalen an einer Hefezellpräparation mit der Matrix 2,5-DHB (Stammllösung,  $c \approx 5 \cdot 10^{-4} M$ , in EtOH/0.1%-TFA, 1:1 (v/v)). Infokmessungen mit einer Abschwächung von ca. 60 (siehe S. 149) und einer Ausgangspulsenergie von ca.  $150 \mu J$  am Spektrometer ALADIM II. (d) SNR der Messungen. (a) Infokmessungen mit einer Abschwächung von ca. 60 (siehe S. 149) und einer Ausgangspulsenergie von ca.  $170 \mu J$  am Spektrometer ALADIM II. (b) Infokmessungen mit einer Abschwächung von ca. 50 (siehe S. 149) und einer Ausgangspulsenergie von ca.  $170 \mu J$  am Spektrometer ALADIM II.



Wie in Abbildung 5.29 zu erkennen, bleiben die Signalintensitäten der untersuchten Lipide in nativen Proben unterhalb der Signalintensitäten von Peptiden in artifiziellen Proben bei einer vergleichbaren Präparation und Messmethode. Die dargestellten Ergebnisse sind dagegen in etwa mit der Qualität von artifiziellen reinen Lipidproben vergleichbar, die vorab zur Spektreninterpretation erstellt wurden (nicht explizit dargestellt).

### SNR-Vergleich zwischen Linear- und Reflektormodus am Spektrometer ALADIM II

In Abbildung 5.30 ist erkennbar, daß die SNR-Entwicklung, bezogen auf das Peaksignal  $m/z$  137 der Matrix 2,5-DHB und unspezifisches Rauschen in diesem Massenbereich, im Reflektormodus am Spektrometer ALADIM II in etwa um ca. 3 dB höher ausfällt als bei den entsprechenden Linearmessungen. Zu berücksichtigen ist dabei der unterschiedliche Detektionsaufbau. Im Linearmodus wird ein MCP-Detektor (Chevron,  $\varnothing = 40$  mm) und im Reflektormodus ein MCP-Detektor (Chevron,  $\varnothing = 40$  mm) in Kombination mit einer Konversionsdynode verwendet. Das MCP-Potential im Linearmodus ist mit ca. - 2.19 kV geringfügig niedriger als im Reflektormodus ( $U = - 2.22$  kV). Die Konversionsdynode liegt auf einem Potential von ca. - 9.70 kV. Die parabolischen Elektronentrajektorien zwischen der Konversionsdynode und der ersten MC-Platte betragen im Mittel ca. 30 mm.

Das insgesamt im Reflektormodus erreichte höhere SNR ist überwiegend auf die verminderte Menge an unspezifischen Rauschionen und die vollständige Abwesenheit von Neutralteilchen im untersuchten Massenbereich zurückzuführen. Da die Desorptions-/Ionisierungsbedingungen wie auch die Probe in beiden Modi identisch sind, kommen als weitere mögliche Ursachen für die gefundenen Unterschiede nur die Ion-zu-Elektron Konversion und eine Differenz in der statistischen Rauschlast der Detektorelektronik in Betracht.

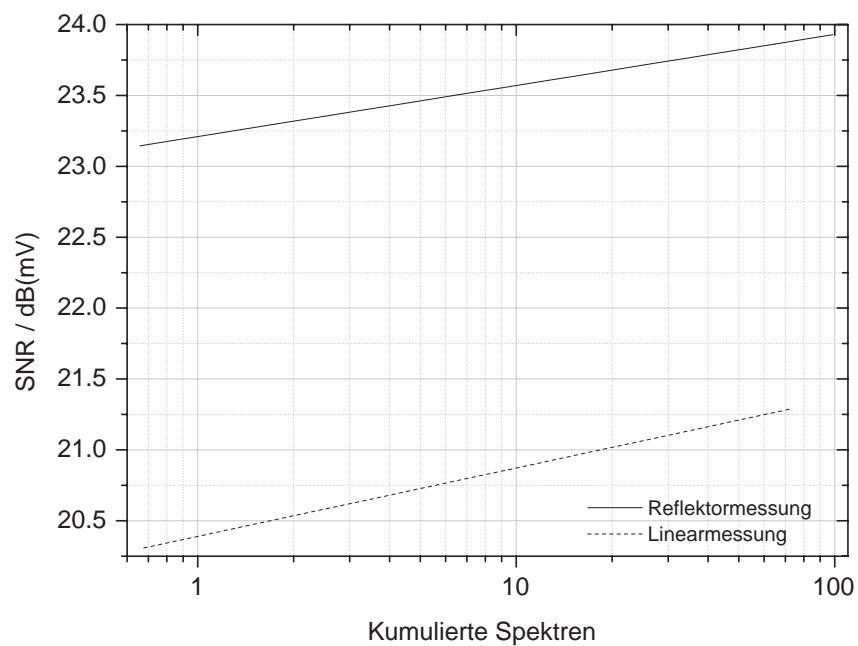


Abbildung 5.30: Dargestellt ist das SNR bei kumulierten Spektren wechselnder Messstellen an einer Dried droplet-Präparation der Matrix 2,5-DHB. Matrixkonzentration  $c \approx 10$  mg/ml in EtOH/0,1%-TFA 3:7 (v/v), Präparationsvolumen ca. 1  $\mu$ l. Laserenergieabschwächung 60, bei einer Ausgangspulsenergie von ca. 300  $\mu$ J (siehe S. 149). Die Bestrahlung ist i.d.R. für Dried droplet-Anwendungen mit Peptidanalyten in konventionellen artifiziellen Proben zu hoch, gewährleistet aber, daß der zu vergleichende Basispeak in den Spektren der bekannten Fragmentmasse von 2,5-DHB bei  $m/z$  137 zukommt.

### SNR-Entwicklung in Abhängigkeit von den Sprühschichten an artifiziellen Proben

Eine Untersuchung der Signalintensitätsentwicklung an Sprühpräparationen mit der Matrix 2,5-DHB ergibt, bei einer Konzentration von ca. 10 mg/ml mit den Testanalyten Substanz P und Polyethylenglykol 3000 in einer Konzentration von jeweils ca.  $10^{-6}$ M, ein Optimum bei ca. 7 Sprühschichten (7 x ca. 20  $\mu$ l Sprühvolumen). Die SNR-Entwicklung wird darüberhinaus bei bis zu 10 Sprühschichten weiter gesteigert. Mit der geringer konzentrierten Matrix CHCA (ca. 5 mg/ml), die zudem eine andere Kristallisation als 2,5-DHB in den Präparaten aufweist, kann bei identischer Analytkonzentration kein eindeutiges Optimum im Bezug auf eine maximale Signalintensität ermittelt werden. Die kleineren und deutlich homogener im Präparat verteilten Kristalle verändern das Signalwachstum. Auch bei 10 Sprühschichten zeigt die Intensitätskurve noch den Verlauf eines linearen Wachstums an. Die Signalintensitäten bleiben bei einer identischen Bestrahlung aber deutlich hinter denen mit der Matrix 2,5-DHB zurück, obwohl CHCA die Wellenlänge  $\lambda = 337$  nm deutlich stärker absorbiert als 2,5-DHB (Faktor  $\approx 10$ ). Das SNR mit der Matrix CHCA ist niedriger als bei 2,5-DHB, zeigt aber einen stärkeren Zuwachs mit der Anzahl der Sprühschichten. Ein Optimum ist hier bei 10 Sprühschichten noch nicht erreicht (Abbildung 5.31).

Die mit der Matrix CHCA gegenüber der Matrix 2,5-DHB abweichenden Ergebnisse belegen die Notwendigkeit einer matrixspezifischen Optimierung der Sprühmethode, ggf. sind apparative Veränderungen am Aufbau der Sprühapparatur notwendig. Die für die Matrix 2,5-DHB gefundenen Kombinationen können nicht einfach und ohne Anpassung auf eine andere Matrix übertragen werden. Die Optimierung der Methode für z.B. die Matrix CHCA beinhaltet eine höhere Lösungsflussrate und eine kleinere (äußere) Kammer während der Sprühpräparation. Die Ergebnisse der Optimierung einer Sprühpräparation auf die Matrizes CHCA und SA werden im weiteren nicht explizit dargestellt.

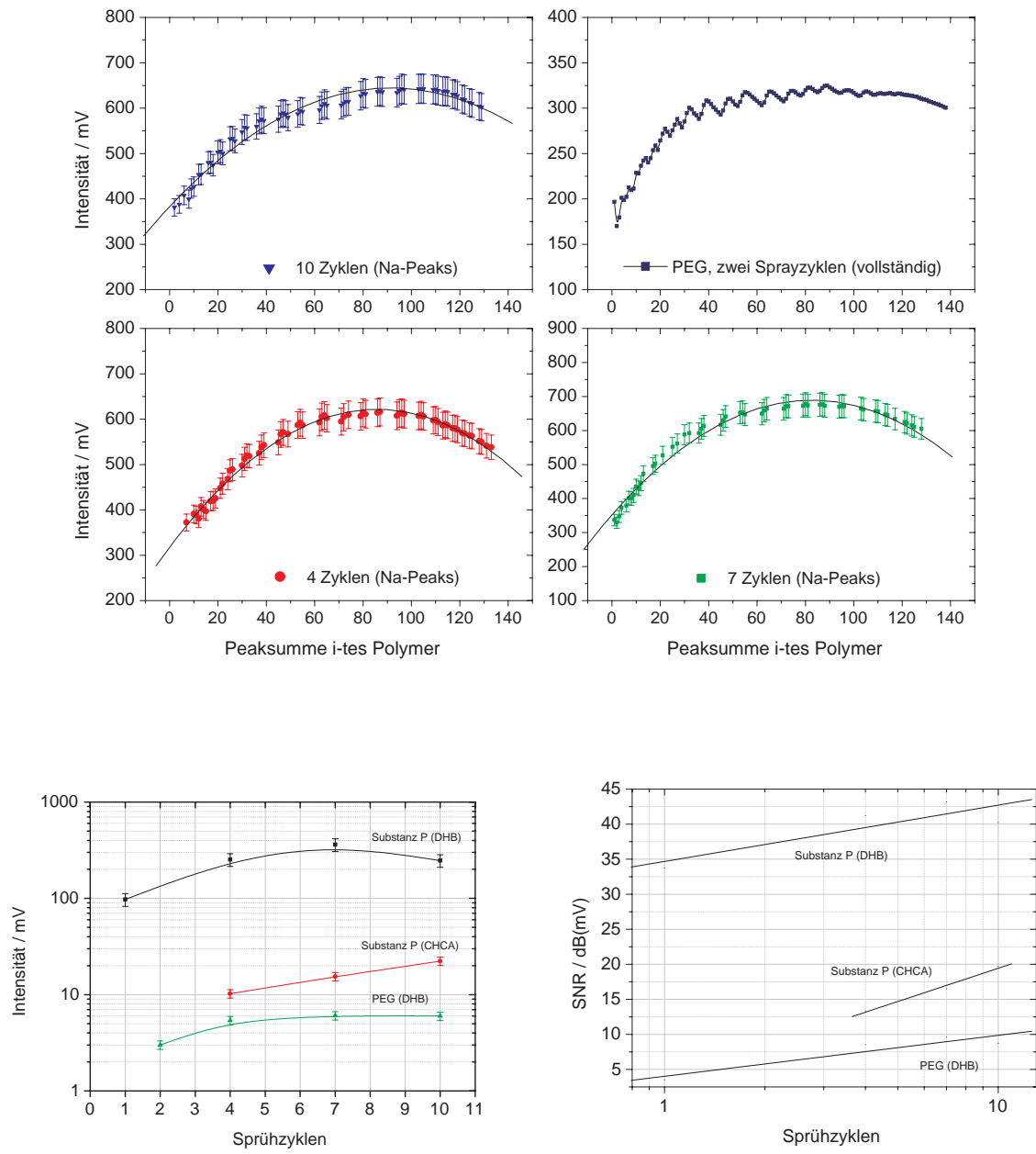


Abbildung 5.31: Entwicklung der Signalintensitäten gesprühter PEG-Präparationen, mit jeweils n Sprühzyklen. Zu erkennen ist eine nur geringe Varianz bei den Intensitäten der einzelnen i-ten Polymerpeaks in einer Verteilung. Bei n = 2 wurden sämtliche PEG-Peaks im Plot berücksichtigt, bei den übrigen Darstellungen nur die monoisotopischen Massen der  $[M+Na]^+$ -Spezies. (Unten) Ionensignalintensität der Isotopenverteilungen als Funktion der Sprayzyklenanzahl.

### SNR-Entwicklung in Abhängigkeit von der Matrixkonzentration an nativen Proben

Es ist weiterhin ermittelt worden, daß an nativen biologischen Proben die homogene Abdeckung der Probenoberfläche bei Sprühpräparationen ab Konzentrationen von ca. 30 mg/ml (2,5-DHB) deutlich gesteigert werden kann. Eine damit einhergehende Steigerung der Ionensignalintensität von Analyten ist allerdings nicht zwangsläufig. Es zeigt sich aber eine positive Auswirkung auf das SNR in solchen Messungen. Andererseits kann bei Infokusmessungen mit deutlich über der Schwellbestrahlung der Matrix liegender Bestrahlung und Konzentrationen ab ca. 25 mg/ml (2,5-DHB), gehäuft eine Serie von Matrixclustern auftreten. Die Clustersignale sind bei Messungen am LAMMA 2000 mit kleinem Fokus (ca. 1  $\mu\text{m}$  wirksamer Desorptionsdurchmesser) deutlich schwächer, als bei Messungen am Spektrometer ALADIM II mit größerem Fokus (ca. 20  $\mu\text{m}$  wirksamer Desorptionsdurchmesser).

### 5.4.4 Sensitivitätsvergleich der Spektrometer ALADIM II und LAMMA 2000

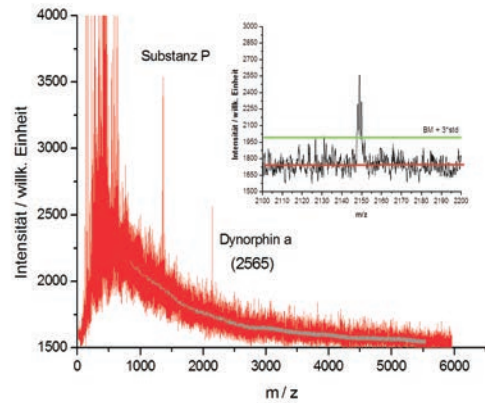
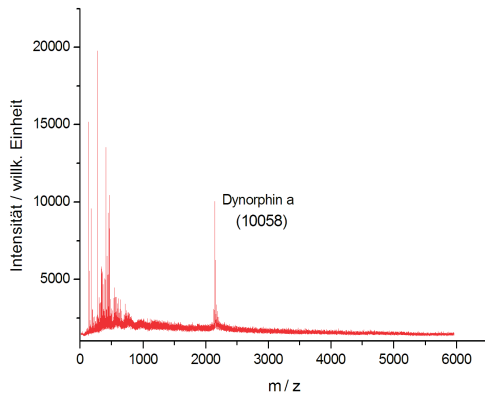
#### Nachweisgrenze von Dynorphin A in Dried droplet-Proben

Zur experimentellen Bestimmung der Nachweisgrenze eines kleinen Peptides in artifiziellen MALDI-Präparaten an den Spektrometern ALADIM II und LAMMA 2000 ist das Peptid Dynorphin A herangezogen worden. Von dem Analyten sind dabei zwei Probensteller mit jeweils drei mal drei Dried droplet-Präparationen einer Konzentrationsabstufung von  $c = 10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M und  $c = 10^{-8}$  M erstellt worden. Die Präparation erfolgte dabei nacheinander, d.h. zunächst wurde ein Volumen von einem Mikroliter Peptidlösung auf den Probensteller aufgebracht und diese dann nach einer kurzen Trockenzeit mit der Matrixlösung (1  $\mu\text{l}$ ) überschichtet. Die noch nicht vollständig eingetrocknete Peptidlösung ist dabei mit einem Teil des ausgestossenen Matrixvolumens mehrmals in die Spitze der Kolbenhubpipette aufgezogen und wieder ausgestossen worden. Jede der drei Präparationen einer Konzentration auf einem Probensteller ist nacheinander mit jedem Spektrometer vermessen worden. Hierzu ist abwechselnd ein Probensteller, zuerst mit dem einen Spektrometer, und der andere Probensteller zuerst mit dem anderen Spektrometer vermessen worden. Es wurde ebenso darauf geachtet, nicht bis zum vollständigen Abtrag einer Präparation an der jeweiligen Messposition Spektren aufzunehmen. Weiterhin wurden unter optischer Kontrolle zunächst die Probenrandbereiche einer Präparation gesucht, von der die stärksten Signalintensitäten ermittelt werden konnten. Die Messungen erfolgten am Spektrometer ALADIM II im Reflektormodus und am Spektrometer LAMMA 2000 im Linearmodus und die Ergebnisse sind in Abbildung 5.32 dargestellt.

#### Signalentwicklung von Substanz P

Anhand der in Abbildung 5.33 dargestellten Messungen wird erkennbar, daß bei einer Konzentration der Analytlösung (Substanz P) von ca.  $10^{-4}$  M eine Verringerung der Intensitätszunahme eintritt. Zwischen den Konzentrationen  $10^{-5}$  M und  $10^{-6}$  M liegt noch ein linearer Verlauf nahe. Ob das Abflachen der Intensitätszunahme bei  $10^{-4}$  M bereits auf einen Sättigungseffekt des Detektionssystems zurückzuführen ist, wurde nicht systematisch untersucht. Der Messverlauf in den Abbildungen 5.32 und 5.33 zusammengekommen, zeigt den dynamischen Messbereich kleiner Peptide am Spektrometer LAMMA 2000, wobei die Konzentration von  $10^{-4}$  M dann sehr wahrscheinlich bereits zu einer Signalsättigung am Detektionssystem führt, wie diese für massenspektrometrische Nachweise erwartet wird [223].

ALADIM II



LAMMA 2000

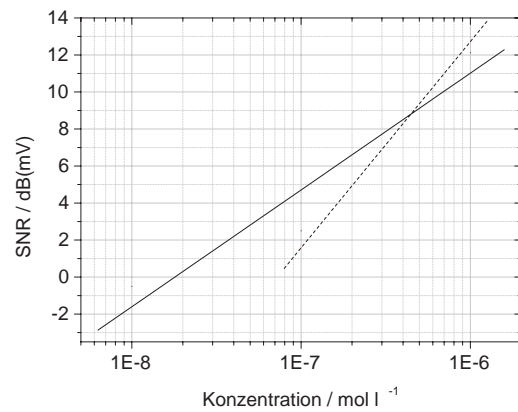
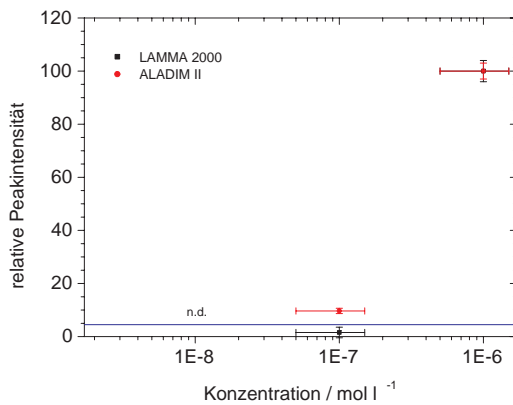
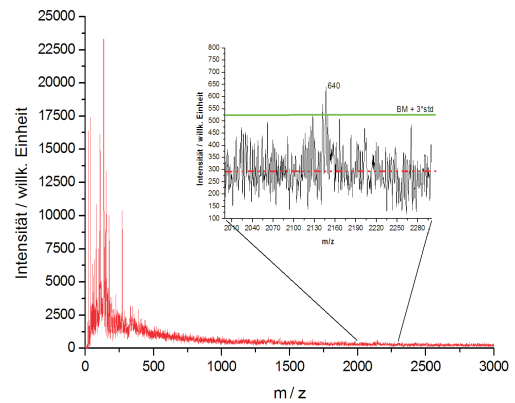
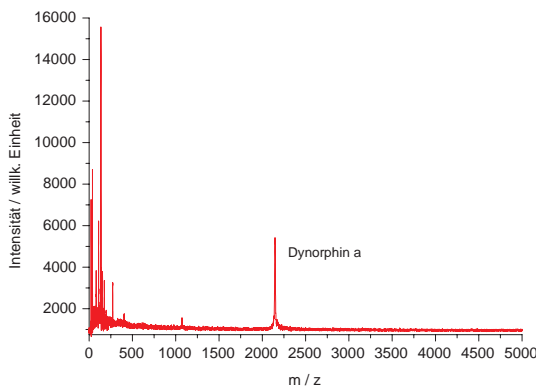


Abbildung 5.32: Vergleich der Spektrometer ALADIM II und LAMMA 2000, anhand vergleichender Messungen an identischen Dried droplet-Proben. (Obere Reihe) ALADIM II Summenspektren (125 und 131 Einzelpulse) aus Infokusmessungen der Analytkonzentrationen 10<sup>-6</sup>M und 10<sup>-7</sup>M. Beide Laser sind für die gezeigten Messungen zentrisch justiert. (Mittlere Reihe) LAMMA 2000-Messungen mit einer Laserenergie entsprechend einem Diodenstrom von 7 A mit einer Abschwächerstellung von 70 (ohne 11 %-ND-Filter). Summenspektren aus 82 und 155 Einzelpulsen. (Unten) Relativer Intensitätsvergleich und Darstellung des SNR. Durchgezogene Linie = ALADIM II, gestrichelte Linie = LAMMA 2000.

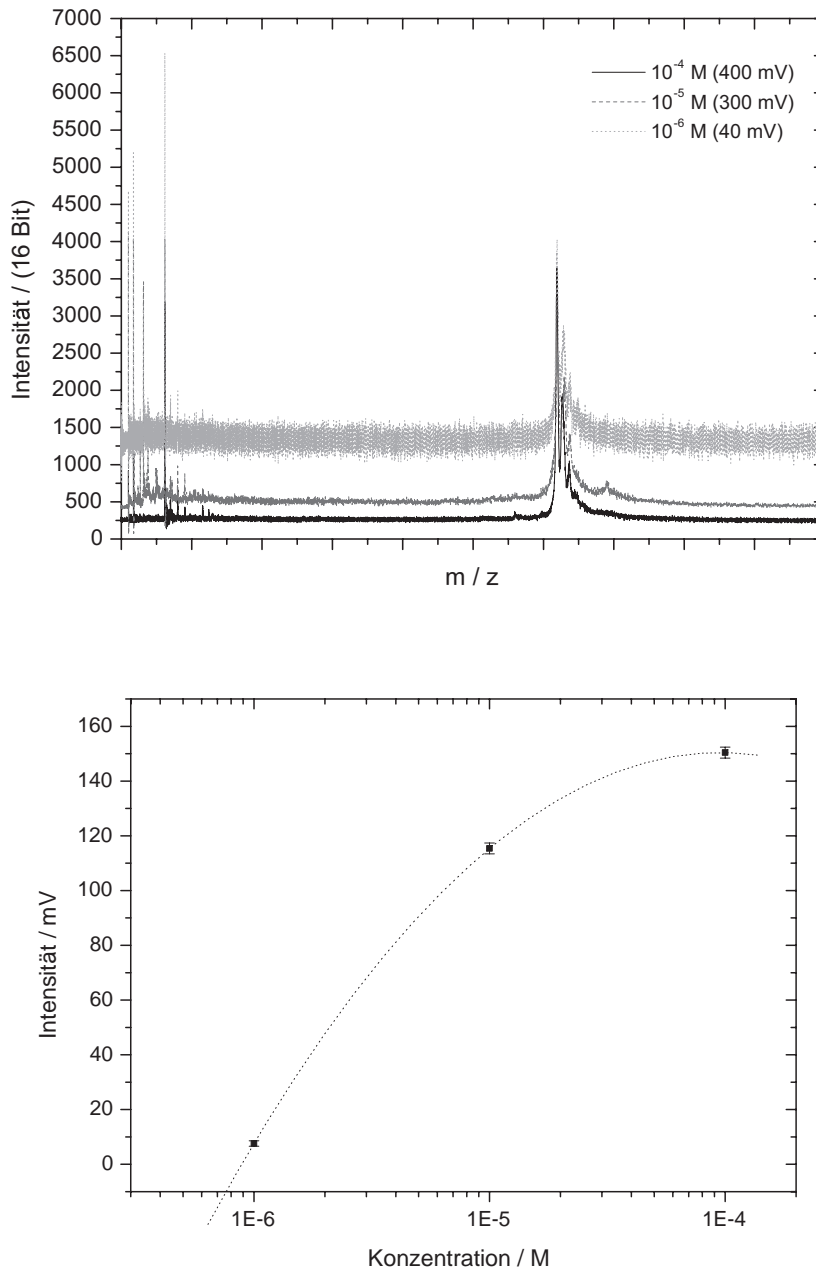
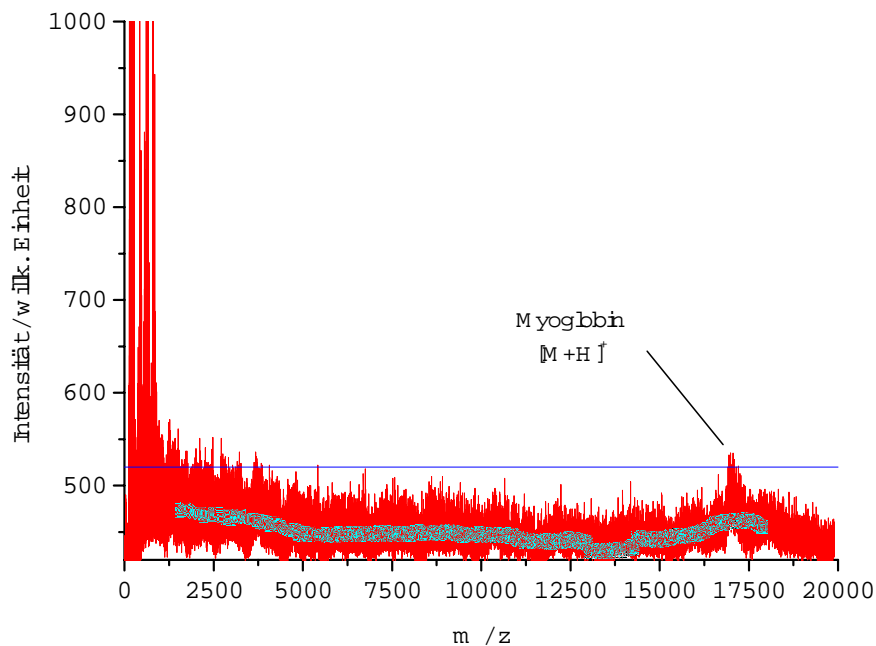


Abbildung 5.33: Dargestellt werden Messungen die den Intensitätsverlauf des Peptidanalyten Substanz P in einer Konzentrationsreihe von ca.  $3 \times 10^{-4}$  M bis  $3 \times 10^{-6}$  M zeigen. Es handelt sich um Dried droplet-Präparationen mit der Matrix 2,5-DHB ( $c=10\text{mg/ml}$ ). Summenspektren ohne Basislinienkorrektur (17 bis 83 Einzelspektren). Zentrische Laserjustierung, Infokussmessungen. Laserenergie ca.  $51 \mu\text{J}$ , Abschwächung: 25, kein statischer Abschwächer.

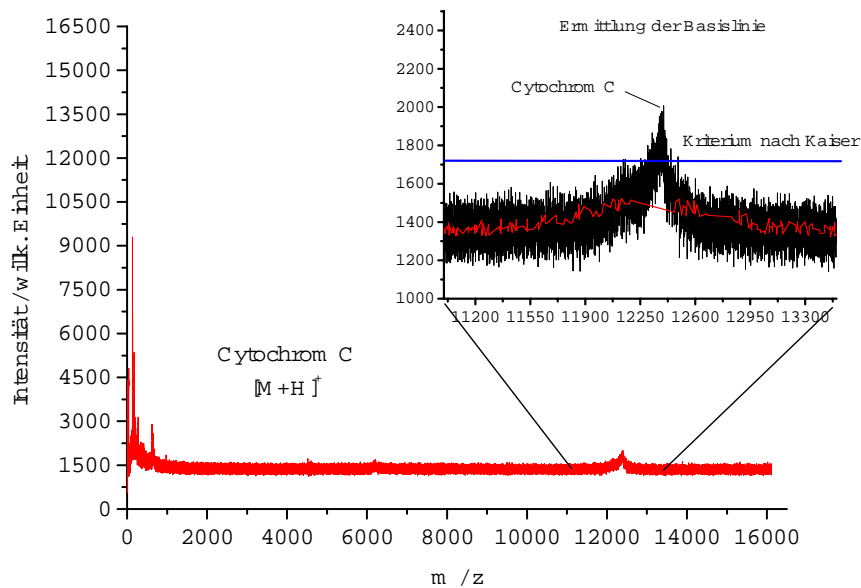


### Nachweisgrenze von Cytochrom C und Myoglobin

Die experimentelle Nachweisgrenze von Peptiden im Massenbereich ab ca. 10 kDa bis ca. 20 kDa ist an Sprühpräparationen von Cytochrom C und Myoglobin ermittelt worden. Hierbei sind zunächst die Analyte in Konzentrationen von ca.  $10^{-4}$ M mit einem Sprühvolumen von jeweils ca. 25  $\mu$ l auf goldbeschichtete Aluminiumtargets versprüht worden. In einem zweiten Schritt ist dann die Matrix 2,5-DHB in einer Konzentration von ca. 30 mg/ml mit einem absoluten Sprühvolumen von ca. 50  $\mu$ l auf die zuvor mit dem Analyten beschichtete Oberfläche aufgebracht worden. Als Beispiel für eine solche Präparation kann Abbildung 5.15 auf Seite 229 betrachtet werden. Diese zeigt einen Ausschnitt der Myoglobin-Präparation. Die identische Präparation wird auch bei den Verdau- und Kalibrierexperimenten verwendet. Die Myoglobin-Präparation ist am Spektrometer ALADIM II und die Cytochrom C-Präparation am Spektrometer LAMMA 2000 vermessen worden. Die erhaltenen Messergebnisse zeigen, daß ein für eine quantitative Bestimmung notwendiges SNR von ca. 6 dB mit einer Summation von 100 bzw. 400 Pulsen nicht erreicht wird. Eine qualitative Darstellung ist dagegen möglich. In den Messungen unter Abb. 5.38 a zeigt sich bei dem Analyten Myoglobin in einer Kombination aus Druck- und Sprühpräparation und einer Vermessung im linearen Mode am Spektrometer ALADIM II ein  $\text{SNR} \geq 6$  dB bei einer Summation zwischen 10 und 20 Pulsen. Die Analyte liegen dort in niedrigerer Ausgangskonzentration vor, werden aber durch die punktförmige Druckpräparation deutlich anders verteilt. Die nachfolgende Sprühpräparation stellt dann eine homogene Beschichtung mit Matrix her. In den Präparationen unter Abb. 5.34 werden dagegen sowohl die Analyte als auch die Matrix gleichmäßig in der Präparation verteilt, was in diesem Fall als Nachteil zu bewerten ist.

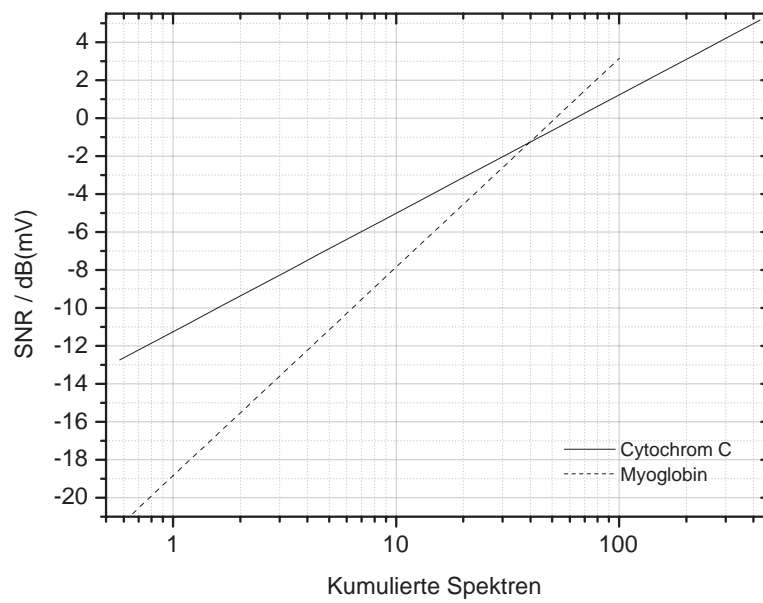


(a)



(b)

Abbildung 5.34: (a) Dargestellt ist ein Summenspektrum (66 Einzelspektren) des Peptidanalyten Myoglobin nach Auftragung mittels Sprüh und anschließender Matrixsprühpräparation. Konzentration von Myoglobin ca.  $10^{-4}$  M in EtOH/0,1%-TFA 3:7 (v/v), Sprühvolumen ca.  $25 \mu\text{l}$ . Matrixkonzentration,  $c \approx 30$  mg/ml, Sprühvolumen ca.  $50 \mu\text{l}$ . Vermessung am Spektrometer ALADIM II im Reflektormodus. Die Basislinie ist teilweise aufgetragen. Die durchgezogene blaue Linie entspricht dem Kriterium von Kaiser, bezogen auf die ermittelte Basislinie im unmittelbaren Messbereich von Myoglobin und der entsprechenden Standardabweichung. (b) Summenspektrum (247 Einzelspektren) aus einer Sprühpräparation des Analyten Cytochrom C ( $c \approx 10^{-4}$  M, EtOH/0,1%-TFA 3:7, v/v), Sprühvolumen ca.  $25 \mu\text{l}$  und anschließender Matrixsprühpräparation (ca.  $50 \mu\text{l}$ ) mit einer Matrixkonzentration  $c \approx 30$  mg/ml, EtOH/0,1%-TFA 1:1 (v/v). Vermessung am Spektrometer LAMMA 2000.



---

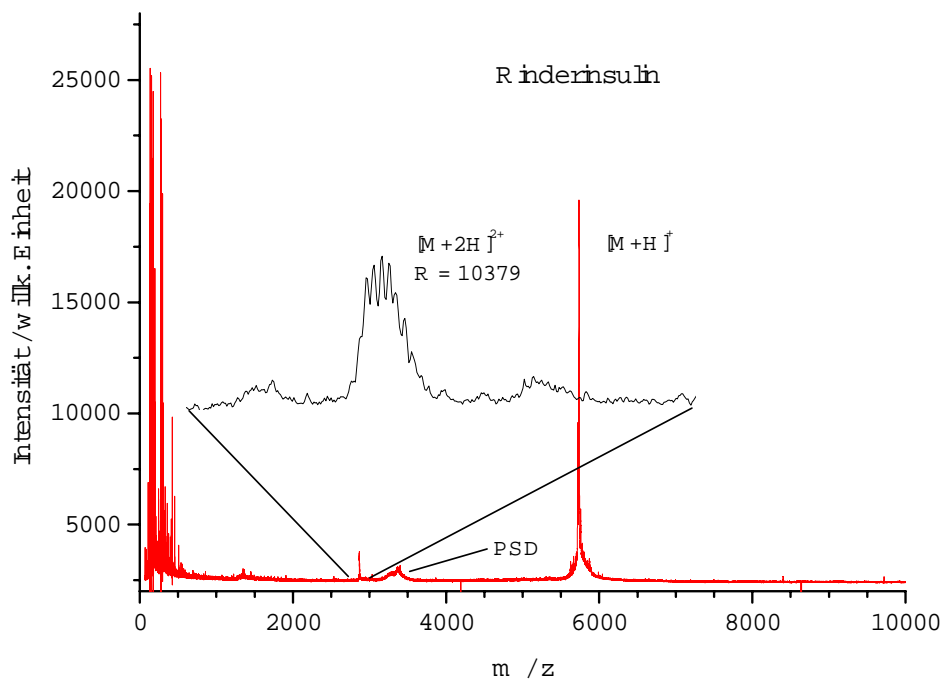
Abbildung 5.35: SNR der Spektren von Cytochrom C und Myoglobin aus Abbildung 5.34.

### 5.4.5 Fragmentierungsversuche an Peptidanalyten

Es ist im Rahmen dieser Arbeit an Peptiden untersucht worden, ob eine Analytfragmentierung bei den Mikrosondenmessungen mit relativ kleinen Laserfoki, innerhalb der angewandten MALDI- und LDI-Analytik, eine zu berücksichtigende Größe im Analyseprozess darstellt. Die Peptidmessungen an den Spektrometern ALADIM II und LAMMA 2000 zeigen bei allen durchgeführten Versuchen dabei ein insgesamt geringes Aufkommen an Analyt-Fragmenten. Bei Verwendung relativ hoher Analytkonzentrationen (ab ca.  $10^{-5}$  M) konnte in Summenspektren von Proben des Peptidanalyten Insulin am Spektrometer ALADIM II das Multiplet der zweifachgeladenen (protonierten) Quasimolekülionspezies erhalten werden. Bei diesen Versuchsbedingungen traten dann auch in geringem Umfang PSD-Ionen auf (Abbildung 5.36). Das SNR-Verhältnis der zweifachgeladenen Insulinionen zeigt im Summenspektrum (101 Einzelspektren) einen Wert von  $\text{SNR} = 3.62 \text{ dB(mV)}$ . Das SNR-Verhältnis der einfachgeladenen Ionen beträgt  $\text{SNR} = 16.72 \text{ dB(mV)}$ .

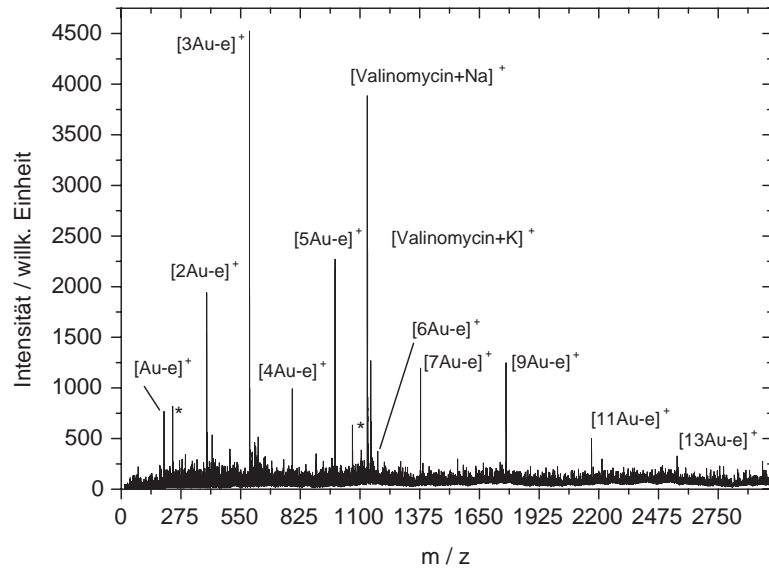
Tabelle 5.12: Parameterkombinationen der Insulin-Vermessungen am Spektrometer ALADIM II.

Geräteparameter	
Targetpotential	: 18.9 kV
Blendenpotential	: 14.7 kV
DE-Zeit	: 190 ns
Gitterpotential	: - 5.1 kV
Konversionsdynode	: - 9.1 kV
Reflektor 1	: 12.2 kV
Reflektor 2	: 23.3 kV
MCP-Potential	: - 2.2 kV
z-Achsenposition	: in b*, fix
Laserpulsenergie	: ca. 120 $\mu\text{J}$
Abschwächung	: 55
ND-Filter	: kein Filter
Restgasdruck	: ca. $9.9 \cdot 10^{-7}$ mbar
Raumtemperatur	: ca. 20°C
* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.	
Präparationsparameter	
Matrix	: 2,5-DHB
Molmasse	: 154.7 Da
Summenformel	: $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$
Konzentration	: 10 mg/ml
Lösungsmittel	: EtOH/0.1% TFA, 3:7 (v/v)
Präp.-Technik	: Dried droplet
Raumtemperatur	: ca. 20°C
Umgebungsdruck	: Atmosphärendruck
Umgebungsgas	: Luft
Präparationszeit	: ca. 1 min.
Target	: Aluminiumteller, vergoldet

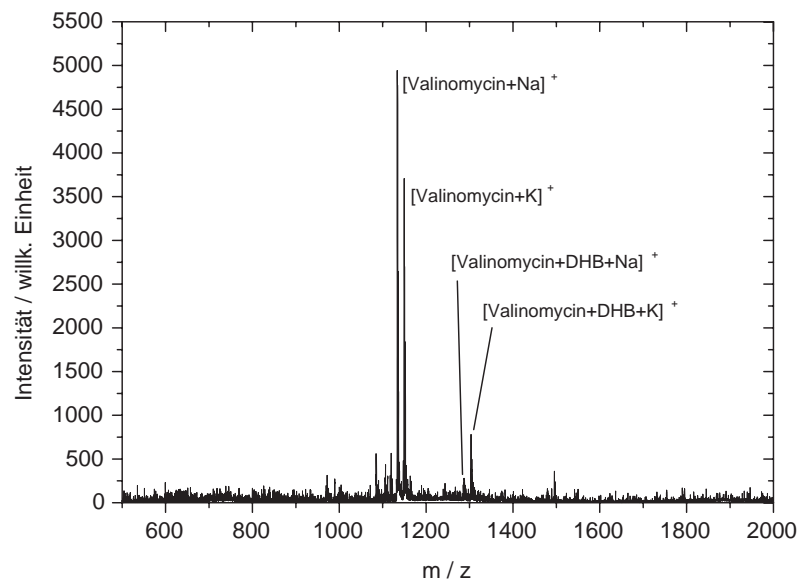


---

Abbildung 5.36: MALDI-Flugzeitspektrum von Insulin (Rind) mit der Matrix 2,5-DHB (Summe aus 101 Spektren). Zu erkennen ist deutlich die Signalverteilung des zweifachprotonierten Molekülions ( $[M + 2H]^{2+}$ ) und die Verteilung der PSD-Ionensignale. Dried droplet-Präparation: 6  $\mu$ l Analytlösung + 5  $\mu$ l Matrixlösung. Analytlösung: ca.  $10^{-5}$ M in EtOH/0.1%-TFA 3:7 (v/v). Matrixlösung: ca. 10 mg/ml 2,5-DHB in EtOH/0.1%-TFA 3:7 (v/v).



(a)



(b)

Abbildung 5.37: (a) In-Source-Decay Versuche an Valinomycin-LDI-Probe. (b) Fragmentierungsversuche an Valinomycin-MALDI-Probe.

Mehrfachladungen konnten außerdem auch an Druckpräparationen eines Analytgemisches der drei Peptide Cytochrom C, Myoglobin und Trypsinogen erhalten werden. Die Druckpräparation erfolgte im Rahmen eines Round-Robin-Experimentes, zunächst ohne Matrixzugabe, mit dem automatischen Drucksystem CHIP (Shimadzu Corp.) und wurde am FOM-AMOLF in den Niederlanden (AG Prof. R. Heeren)<sup>4</sup> durchgeführt. Hierbei wurden folgende Analytkonzentrationen verwendet: Cytochrom C = 1 pmol/ $\mu$ l, Myoglobin = 2 pmol/ $\mu$ l, Trypsinogen = 5 pmol/ $\mu$ l. Je Spot sind ca. 20 nl Lösung aufgedruckt, was in etwa  $2.4 \cdot 10^{-4} \mu$ g Cytochrom C,  $6.8 \cdot 10^{-4} \mu$ g Myoglobin und  $2.4 \cdot 10^{-3} \mu$ g Trypsinogen entspricht (1 : 3 : 10). Die Probe wurde am Spektrometer ALADIM II im Linearmodus und im Reflektormodus vermessen. Das Spektrum der Linearmessung zeigt ein Intensitätsverhältnis von in etwa 1 : 1.5 : 2 (Multipletintegrale) und gibt damit nicht das erwartete Präparationsverhältnis in der Druckprobe wieder (Abbildung 5.38, 5.39). In diesem Fall muss aber wahrscheinlich bereits die, aufgrund der Molekularmasse eintretende, sinkende Signalstärke bei langsamen Ionen berücksichtigt werden (siehe S. 9, Abb. 2.1). Weiterhin ist die Präparation nicht bis zum vollständigen Abtrag des 20 nl-Spots vermessen worden.

Am Spektrometer LAMMA 2000 konnten bislang (zweifelsfrei) keine mehrfachgeladenen Peptidionen detektiert werden. Bei beiden Spektrometern zeigte sich an Peptidmischungen (Substanz P, Melittin, Insulin; 1:3:5  $10^{-6}$  M) die routinemäßig zur Kalibrierung im niedrigen und mittleren Massenbereich verwendet werden, bei einer erhöhten Bestrahlung aber in sehr geringem Umfang, die Tendenz zur Bildung von Peptidanlagerungen bzw. Clusterbildung, z.B.  $[2 \times \text{Insulin} + \text{H}]^+$  (Abbildung 5.38, b).

Als zweites Beispielpeptid in artifiziellen Proben wurde Valinomycin verwendet (Abbildung 5.37). Typische In-Source-Decay-Fragmente sind bei den durchgeführten Messungen am Spektrometer LAMMA 2000 dabei nicht nachweisbar<sup>5</sup>, am Spektrometer ALADIM II dagegen schon. Signale im niedrigen Massenbereich ( $< m/z$  500), die im Zweifel als Fragmente in Frage kommen, sind in separaten Messungen als Ionensignale identifiziert worden, die bereits in der reinen Matrixlösung auftreten. Es handelt sich hierbei sehr wahrscheinlich also um Matrixfragmente und nichtidentifizierte Lösungsmittelbestandteile oder um organische Verunreinigungen des Probenträgers.

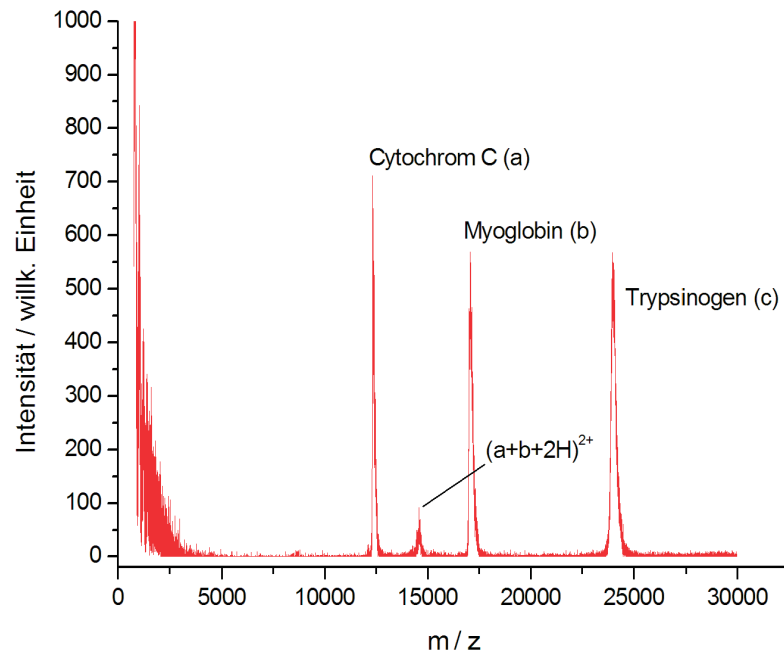
Die eingangs gestellte Frage nach der Bedeutung von Analytfragmentierungen im MALDI-Analyseprozess mit sehr kleinen Foki kann damit als nicht signifikant beantwortet werden.

---

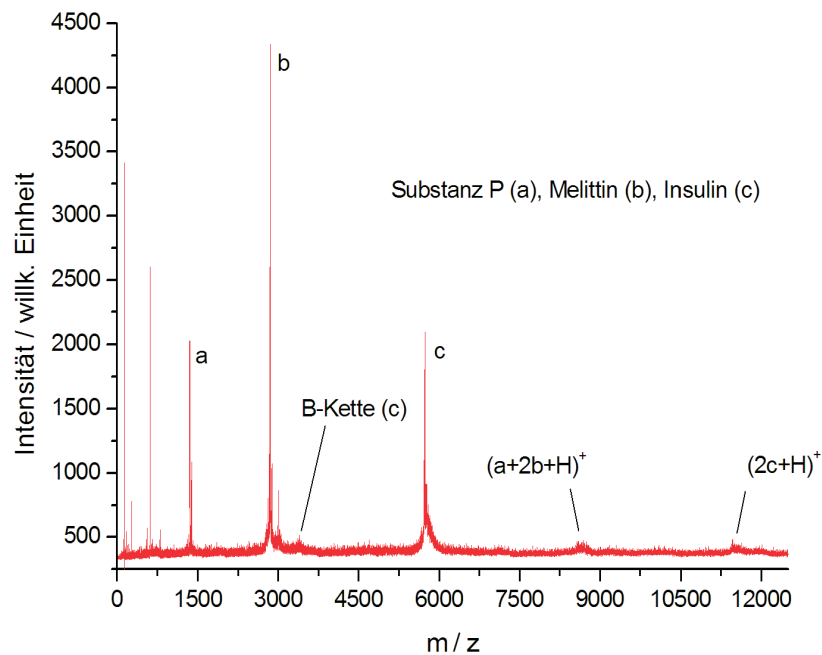
<sup>4</sup>Als Kontrollpräparate wurden auch mit Matrix präparierte Druckproben verwendet (CHCA). Diese wurden dabei nachträglich mit einer Sprühpräparation versehen.

<sup>5</sup>In Low-Energie CAD-Experimenten (ESI-MS mit einfach- und zweifachgeladenen Spezies) mit dem cyclischen Peptid Valinomycin werden hauptsächlich b- und y-Ionen erwartet, neben  $[VM - CO + H]^+$ -Ionen [301].



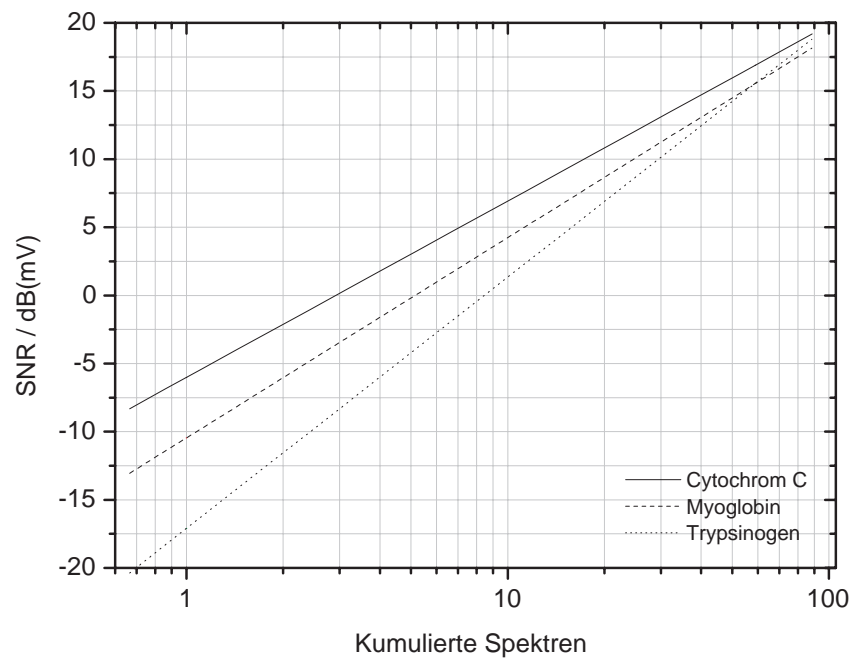


(a)



(b)

Abbildung 5.38: (a) Round-Robin-Messung gedruckter Protein-/Peptidanalyten (Druckpräparation hergestellt am FOM-AMOLF) und nachträglicher Matrixpräparation mit 2,5-DHB. Sprühpräparation mit 1 x ca. 20  $\mu$ l einer 30 mg/ml 2,5-DHB-Lösung in EtOH/0.1% TFA 1:1 (v/v), Summenspektrum aus 50 Einzelspektren (Linearmessung, ALADIM II). (b) Messung einer Dried droplet-Präparation mit der Matrix 2,5-DHB und den Peptiden Substanz P, Melittin und Insulin bei nicht zentrisch justiertem Laser. Summenspektrum aus 40 Einzelspektren (Linearmessung, LAMMA 2000).



---

Abbildung 5.39: Entwicklung des SNR der Spektren aus Abbildung 5.38 (a).

### 5.4.6 Durchschnitts-SNR über alle MS-Messungen

Aus allen (erfolgreich) durchgeführten massenspektrometrischen Messungen erhält man, getrennt nach Substanzklassen und Molekularmassen, eine Reihenfolge der SNR-Verhältnisse für die vermessenen Ionen(spezies). Die ermittelten Daten sind in Tabelle 5.13 dargestellt und beziehen sich immer auf eine Kumulation von 20 Einzelpulsmessungen.

Tabelle 5.13: Mittleres SNR bei Kumulation von 20 Pulsspektren in dB(mV). Std = Standardabweichung, Var = Varianz, CV = Variationskoeffizient.

Peptide	$\overline{SNR}$	Std	Var	CV
M < 10 kDa	18.5 ±	10.1	103	0.55
M ≥ 10 kDa	4.2 ±	6.2	39	1.50
Lipide	9.1 ±	5.9	35	0.65

### 5.4.7 SNR- und SAR-Entwicklung

In Abbildung 5.40 sind repräsentative Ergebnisse der Messungen mit Substanz P aufgetragen, wobei in Abhängigkeit der Pulseistung das SNR voneinander unabhängiger Messereignisse ermittelt wurde. Bei einer Bestrahlung ab der Schwellbestrahlung des Analyten Substanz P wird ein kontinuierlich sinkendes SNR ermittelt. Die Schwellbestrahlung entspricht einem SNR ≈ 6 dB bzw. einem Intensitätsverhältnis von 2:1 (S/N). Im Bereich der 2.5-fachen bis in etwa der 10-fachen Schwellbestrahlung (bezogen auf die Pulseistung) erhält man, wie dargestellt, ein nahezu konstantes SNR-Verhältnis.

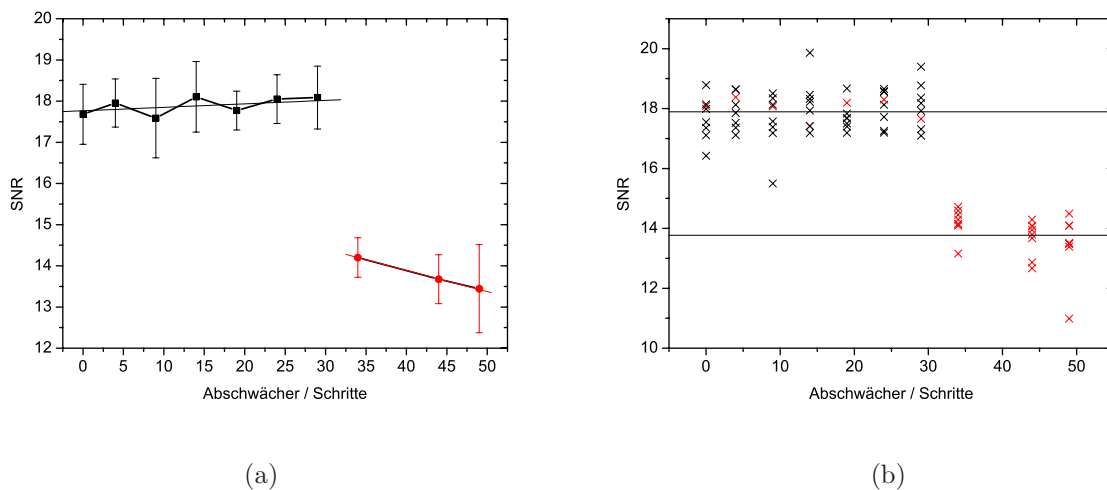


Abbildung 5.40: (a) Darstellung des mittleren SNR bei unterschiedlichen Bestrahlungen mit den einfachen Standardabweichungen. (b) Darstellung der einzelnen SNR mit den über alle Werte gebildeten Mittelwerten (durchgezogene Linien).

Ein unmittelbarer Vergleich von SNR und SAR (auf einen Einzelpuls normiertes SNR/normiertes SAR), hier im weiteren als relatives Signal-zu-Ablationsverhältnis bezeichnet, zeigt am Beispiel der Peptidmessungen (Substanz P) das in Abbildung 5.41 erkennbare Ergebnis. Während bei den voneinander

abhängigen Messungen bei einer Pulszahl zwischen 1 und 8 ein deutlicher Anstieg des SNR im Einzelpuls zu verzeichnen ist, bleibt das SNR bei den voneinander unabhängigen Messungen nahezu konstant. Dies führt gegenüber den voneinander unabhängigen Messungen zu einem schwächeren Abfall des relativen SAR bei den voneinander abhängigen Messungen. Der Abfall kann allgemein am besten mit einem exponentiellen Zusammenhang erster Ordnung beschrieben werden (gepunktete Fitkurven). Wie aus Abbildung 5.40 hervorgeht, verändert sich dies bei den voneinander unabhängigen Messungen auch bei veränderter Bestrahlung nur unwesentlich, solange nicht im Bereich der Schwellbestrahlung gemessen wird. Der Verlauf des relativen SAR bei den voneinander abhängigen Messungen an einer identischen Probenposition kann dann als höhere Effizienz der Messungen interpretiert werden, wenn man eine ähnliche Dichte der Analyt-/Matrixteilchen im Desorptions-/Ionisierungsvolumen der Probe annimmt.

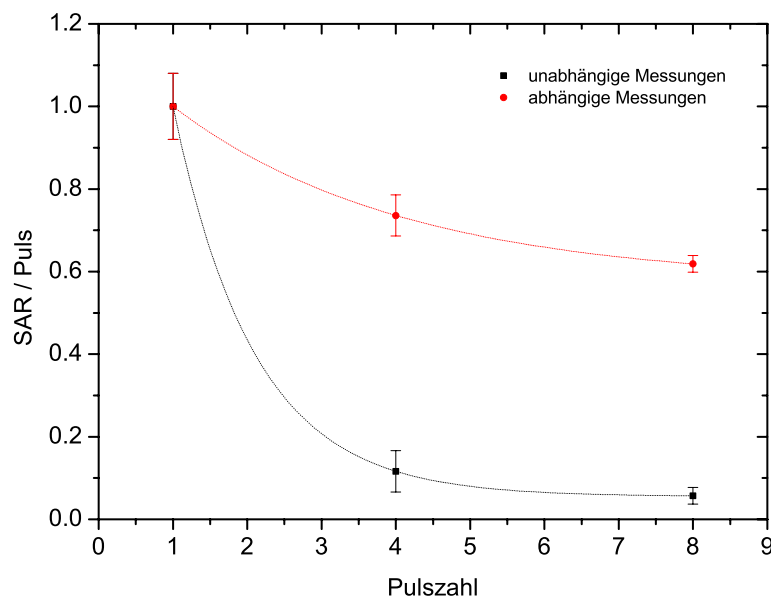


Abbildung 5.41: Relatives Signal-zu-Ablationsverhältnis von (rot) Messungen an einer identischen Probenstelle und (schwarz) Messungen von unterschiedlichen Probenstellen. Dargestellt sind die Berechnungen aus Mittelwerten von jeweils 50 Messungen je Datenpunkt.

Auffällig wird bei einem Vergleich aller Messungen, daß das mittlere SNR-Verhältnis von Peptiden mit einer Molekularmasse von  $M_r < 10$  kDa im Vergleich zum SNR-Verhältnis von Lipiden mit einer Molekularmasse von  $M_r < 1$  kDa bei der Summierung von 20 Einzelpulsspektren größer ist. Dennoch ist es schwierig an nativen biologischen Proben, bei gleichzeitiger Anwesenheit von Lipiden und einem Laserfokus von ca.  $1 \mu\text{m}$ , Peptide zu vermessen. In der Regel (Anteil  $> 95\%$ ) wird hier nach 20 Pulsen bei Lipiden ein positives SNR-Verhältnis erreicht, bei Peptiden dagegen i.d.R. nicht. Bei höherer Bestrahlung treten die signalstärksten Lipide dann zusätzlich als  $[2M + X]^+$ -Spezies auf ( $X = \text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$ ). An artifiziellen MALDI-Sprühpräparationen konnte gezeigt werden, daß eine homogene Matrixbeschichtung an einer zuvor mit Peptiden einer Molekularmasse von  $M_r > 10$  kDa beladenen metallischen Proben-trägerfläche, eine qualitative Darstellung ermöglicht. Ein Vergleich der SNR-Verhältnisse aller Peptid- und Lipidmessungen in den artifiziellen und den nativen Proben ergibt für die Summation von 20 Einzelpulsspektren dann eine Abstufung der Variationskoeffizienten gemäß: Peptide ( $M_r < 10$  kDa)  $<$  Lipide  $<$

Peptide  $M_r > 10$  kDa. Als Fazit kann festgehalten werden: Wenn es an nativen Proben möglich ist Peptide mit einer Molekularmasse von  $M_r < 10$  kDa zu detektieren, dann sind Peptidsignale i.d.R. stetiger, als die Signale von (Phospho)Lipiden. Eine Strategie zur Vermessung von Peptiden bei der gleichzeitigen Anwesenheit von Lipiden sollte also nach Möglichkeit auf die vermehrte Fragmentierung von Lipiden setzen, wenn diese vor der Messung nicht in ausreichendem Maße entfernt werden können.

#### 5.4.8 Fazit

Anhand der Messungen von nativen und artifiziellen biologischen Proben konnte im Rahmen dieser Arbeit die SNR-Entwicklung von Peptid- und Phospholipidanalyten in MALDI-TOF Massenspektren ermittelt werden. Die hierzu eingesetzten Spektrometer unterscheiden sich von den überwiegend kommerziellen MALDI-TOF Spektrometern, die in der Bioanalytik eingesetzt werden, bezüglich der Laserstrahleinkopplung und der Laserfokusgröße. Die Messungen erlauben insgesamt die Feststellung, daß an den tierischen und humanen Gewebeproben, die keine peptidsezernierenden Zellen im engeren Sinne enthalten (z.B. Drüsenzellen), zunächst Phospholipide die dominierende Substanzklasse in den Spektren darstellen. Ähnliches trifft auch bei den untersuchten Pilzproben (Hefe) zu. Dies entspricht, bezogen auf die prozentualen Anteile dieser Analyte in den untersuchten Proben, zunächst nicht den Erwartungen. Die Vermutung ist naheliegend, daß hierfür mechanistische Gründe bei der Desorption/Ionisierung sowie der Plumedynamik ausschlaggebend sind. Da im Falle von peptidsezernierenden Zellen (z.B. Drüsenzellen) die Analytmenge überproportional gegenüber den i.d.R. ortsfesten Zellbestandteilen zunimmt, kann angenommen werden, daß dieser Einfluss proportional zur absoluten Analytanzahl im Desorptionsvolumen ist. Versuche mit Substanz P und Cholesterol, einem Lipid das in MALDI-Spektren nur in geringen Intensitäten auftritt aber in den meisten biologischen Membranen (tierischen Ursprungs) häufig ist, zeigen deutlich eine negative Korrelation hinsichtlich der Signalintensitäten in artifiziellen Präparationen. Die Aussage muss auf positive Ionen beschränkt werden, da in dieser Arbeit ausschliesslich im positiven Ionenmodus gemessen wurde.

Aus den Untersuchungen zum Ablations-/Desorptionsverhalten geht hervor, daß neben dem SNR-Verhältnis auch das Signal-zu-Ablationsverhältnis (SAR) betrachtet werden muss, um die Effizienz einer Messung (richtig) beurteilen zu können. Im linearen Messbereich der Spektrometer korreliert der TIC (Totalionenstrom), der bei Messungen nativer biologischer Proben erhalten wird, mit der Pulsablation an einer Messstelle. Eine Desorption von Rauschionen kann dabei im gesamten Ablationsvolumen stattfinden. Die Erzeugung (analyt)spezifischer Rauschionen korreliert dagegen stärker mit dem Bestrahlungsprofil bzw. der Energiedichte im potentiellen Desorptionsvolumen des jeweiligen Analyten. Die unspezifische Rauschentwicklung folgt bei Mehrpulsmessungen klar einem exponentiellen Zusammenhang, wobei innerhalb des linearen Messbereiches zudem eine lineare Korrelation mit der Laserpulsintensität auftreten kann. Das spezifische Rauschen korreliert mit der Laserpulsintensität, der Pulsanzahl und dem Pulsprofil. Es muss hier aber deutlich zwischen voneinander abhängigen und voneinander unabhängigen Messungen unterschieden werden. Die Berechnung eines Einzelpulsdesorptionsvolumens für eine bestimmte Substanz, anhand der lateralen Laserprofilausdehnung innerhalb der Schwellbestrahlungsgrenzen, ist, zusammen mit der angenommenen Lasereindringtiefe aber nur ein theoretischer Wert. Das Pulsablationsvolumen ist dagegen, ab einer gewissen Bestrahlung, direkt aus einer z.B. licht- oder elektronenmikroskopischen Vermessung der Pulskrater oder indirekt über eine Bestimmung der mittleren Pulsablationsmasse, unter theoretisch identischen Bedingungen, zugänglich.

Das auf einen Einzelpuls bezogene SAR zeigt bei Mehrpulsmessungen (Kumulationen) in den Unter-

suchungen einen stetigen Abfall. Dies wird an allen artifiziellen biologischen Proben ermittelt (Peptid- und Lipidsignale). Unterschiede zeigen sich dabei zwischen den Messungen an einer identischen Probenstelle und den Messungen an wechselnden Probenstellen. Bei Messungen im Einzelpulsverfahren bleibt in einem relativen Pulsleistungsintervall von  $P = 95 \% \times P_{max}$  bis  $P = 35 \% \times P_{max}$  das ermittelte SNR im Mittel nahezu unverändert. Erst ab  $P < 35 \% \times P_{max}$  wird eine deutliche Abschwächung detektiert. Bei einer Normierung auf die (entsprechende) Schwellbestrahlung wird ein  $SNR \approx 6$  dB mit einer relativen Pulsleistung von ungefähr  $P = 1.5 \% \times P_{max}$  erreicht (Peptidanalyte,  $M_r < 10$  kDa).  $P_{max}$  bezieht sich dabei auf die maximale Pulsleistung bei einem Diodenstrom von 7 A und einem statischen Abschwächer mit ca. 11 %-Transmission bei der Wellenlänge 349 nm. Das relative SAR, das (hier) als SNR/SAR-Verhältnis angegeben wird, zeigt sehr deutliche Unterschiede zwischen den voneinander abhängigen und den voneinander unabhängigen Messungen. Die Untersuchungen sind aber, aufgrund der messtechnischen Einschränkung bei der Bestimmung der mittleren Ablationsmasse, nur bis zu einer maximalen Pulszahl von 8 durchgeführt worden. Bei höheren Pulszahlen und Mehrpulsmessungen an einer Probenstelle konnte der Zuwachs an Ablation nicht mehr eindeutig am lateralen Umfang des Brennkaters bestimmt werden.

In den Spektren nativer biologischer Proben zeigt sich eine hohe Fragmentierung der vermessenen Lipide. Am deutlichsten ist dies in allen untersuchten Proben, anhand des auftretenden Fragmentes der PC-Kopfgruppe ( $m/z$  184) zu erkennen. Eine ähnlich ausgeprägte Fragmentierung wird bei AP-SMALDI Messungen mit einem Fokusdurchmesser von  $5 \mu m$  nicht beobachtet. Bei der Fragmentierung identischer Analyte konnte an den verwendeten Spektrometern Unterschiede festgestellt werden. Das untersuchte Beispielpeptid Insulin zeigt in den artifiziellen Proben am Spektrometer ALADIM II bei höheren Bestrahlungen hauptsächlich PSD-Ionen und bei zusätzlich hohen Konzentrationen dann auch in geringem Umfang Spezies mit Doppelladungen,  $[M + 2H]^{2+}$  aber keine eindeutig zuordbaren In-Source-Decay-Fragmente.

Weiterhin wird deutlich, daß die als Matrix- und Analyt-Unterdrückungseffekte (*matrix/analyte suppression effects*) bezeichneten Phänomene nicht nur von der Konzentration der beteiligten Substanzen in der Ausgangslösung von z.B. mittels dried droplet präparierter Proben abhängen, sondern auch die Verteilung der Bestandteile in der Präparation einen messbaren Einfluss hat. Sprühpräparationen artifizieller Proben<sup>6</sup> zeigen dabei das Phänomen der Unterdrückungseffekte in den durchgeführten Versuchen nicht, wenn identische Stammlösungen verwendet werden. Bei mittels dried droplet präparierten Kontrollproben waren die Unterdrückungseffekte an „Hot spots“, wie in der Literatur beschrieben, dagegen nachweisbar [139]. Eine Erklärung für diese Unterschiede könnte am einfachsten im unterschiedlichen Verteilungsmuster der Analyte zu finden sein, d.h. in einem wesentlich stärkeren Ladungsaustausch zwischen Matrix und Analyt in einem aus Hot Spots generierten Plume, aufgrund einer höheren Dichte von Analytspezies. Die Gleichverteilung der Analyte in Sprühproben könnte einen sprunghaften Anstieg von Analytspezies im Plume, vergleichbar zu den aus Hot Spots und mittels dried droplet präparierten Proben, verhindern und dadurch keinen Unterdrückungseffekt entstehen lassen.

Die an 2,5-DHB Dried-droplet Präparationen (Volumen =  $1 \mu l$ ) ermittelte Grenzkonzentration ( $SNR \approx 6$  dB) eines Peptidanalyten einer Masse von ca. 2 kDa (Dynorphin A) beträgt am Spektrometer ALADIM II in Summenspektren (Reflektormodus) in etwa  $1.6 \times 10^{-7}$  M und ca.  $2.6 \times 10^{-7}$  M am Spektrometer LAMMA 2000 (Linearmodus). Dies entspricht einer absoluten Peptidmenge von maximal ca.  $1.6 \times 10^{-13}$  mol (160 Femtomol) bzw. einer Masse von ca.  $3.4 \times 10^{-10}$  g (340 pg) am Spektrometer ALADIM II und ca.

---

<sup>6</sup>Matrix: 2,5-DHB; Analyte Substanz P, Valinomycin.

$2.6 \times 10^{-13}$  mol (260 Femtomol) bzw.  $5.6 \times 10^{-10}$  g (560 pg) am Spektrometer LAMMA 2000. Das Mas-  
severhältnis an der (quantitativen) Detektionsgrenze von Dynorphin A beträgt demnach ca.  $m(\text{ALADIM II/LAMMA 2000}) \approx 0.6$ , d.h. am Spektrometer LAMMA 2000 wird gegenüber Messungen am Spektro-  
meter ALADIM II (im Reflektormode) zur äquivalenten Darstellung in etwa die 1.7-fache Analytmasse  
benötigt. Am Spektrometer LAMMA 2000 entspricht dies, bei einer als konstant angenommenen Puls-  
ablation (155 Pulse), in etwa einer mittleren Pulsmasse von ca.  $3.6 \times 10^{-12}$  g ( $1.7 \times 10^{-15}$  mol) bzw.  
einer Anzahl von ca.  $1 \times 10^9$  Teilchen gegenüber ca.  $7.24 \times 10^8$  Teilchen am Spektrometer ALADIM II  
(133 Pulse). Diese Werte sind aber vollkommen unrealistisch, bezogen auf ein Detektionsereignis über der  
Rauschschwelle ( $\text{SNR} \geq 2$ ) in Einzelpulsmessungen mit einer vergleichbaren Elektronik (siehe S. 445 ff.).  
Für ein Detektionsereignis über der Rauschschwelle werden i.d.R., in Abhängigkeit der Verstärkungselek-  
tronik, im ADC-Modus zwischen 1000 bis 100000 Ionen/Puls mit typischen MCP-Detektoren benötigt  
(Gain  $\approx 10^6 - 10^7$ ). Es wird deshalb angenommen, daß der tatsächliche Ionenpulswert mindestens um den  
Faktor  $10^{-4}$  niedriger liegt, als der maximal mögliche errechnete Pulsablationswert an Teilchen. Dem-  
nach werden maximal ca. 100000 Ionen/Puls (Spektrometer LAMMA 2000) und ca. 72000 Ionen/Puls  
(Spektrometer ALADIM II) detektiert. Das bedeutet, daß die effektive Ionisierungsrate in Einzelpulsen  
höchstens ca. 0.001 % (0.01 Promille) beträgt, was wiederum mit den in der Literatur gefundenen Wer-  
ten übereinstimmt [8]. Da am Spektrometer LAMMA 2000 bei zentrischer Laserstrahljustierung und pro  
Puls ein geringeres Ablationsvolumen erreicht wird (mittlere Pulsablationstiefe ca.  $0.3 \mu\text{m}$ , Fläche ca.  
 $0.95 \mu\text{m}^2$ , Gaussprofil), als am Spektrometer ALADIM II (mittlere Pulsablationstiefe ca.  $0.2 \mu\text{m}$ , Fläche  
ca.  $491 \mu\text{m}^2$ , Gaussprofil), sinkt damit die Sensitivität. Andererseits kann angenommen werden, daß  
die relative Ionenmenge/Desorptionsvolumen am Spektrometer LAMMA 2000 mit dem kleineren Laser-  
fokus höher ist, als am Spektrometer ALADIM II. Ähnliches konnte bei Vergleichen unterschiedlicher  
Desorptions-/Ablationsprofile in der Literatur bereits festgestellt werden [148]. Die anhand der integrierten  
Signalintensität des monoisotopischen Peaks ermittelte Schwellbestrahlung für das Peptid Substanz  
P aus 2,5-DHB-Sprühpräparationen bleibt dagegen deutlich unterhalb der Werte, die nach einem ther-  
mischen Modell der Analyt- und Matrixdesorption zu erwarten sind, wie ein Vergleich mit der Literatur  
zeigt [53].

Bei den Untersuchungen von Valinomycin mit LDI und MALDI am Spektrometer LAMMA 2000  
kann prinzipbedingt im Linearmodus keine Untersuchung von ISD- und PSD-Ionen stattfinden. Es fällt  
zunächst aber auf, daß dieses Peptid (nahezu unabhängig von der Bestrahlung) nicht messbar zu frag-  
mentieren scheint, da die Spektrenqualität keinerlei prominente Änderung in der erhaltenen Peakvertei-  
lung (Häufigkeit) zeigt sowie insgesamt nur eine geringe Peakverbreiterung zu beobachten ist. Mögliche  
Fragmente tragen deshalb entweder keine Ladung oder entstehen erst gar nicht, wobei letzteres eher  
unwahrscheinlich ist. In den LDI-Spektren treten bei hoher Bestrahlung aber Gold-Cluster (Probenteller-  
oberfläche), neben nur sehr schwachen Signalen im Massenbereich potentieller Fragmente, auf. In den  
MALDI-Messungen sinken mit verringerter Bestrahlung die Intensitäten der Gold-Cluster aber auch mit  
relativ hoher Bestrahlung sind dann keine Hinweise auf Fragmente von Valinomycin zu erkennen. Der  
einzige Hinweis auf eine zu hohe Bestrahlung, zeigt sich in der Bildung von Matrix-Peptid-Clustern  
( $[\text{DHB} + \text{Peptid} + X]^+$ ,  $X=\text{Na,K}$ ). Hieraus folgt, daß wenn Fragmentationen am Spektrometer LAM-  
MA 2000 erzeugt werden, ihre Intensität innerhalb des statistischen Rauschens verbleibt und/oder diese  
überwiegend als neutrale Moleküle auftreten. Den größten Anteil am spezifischen Rauschen tragen hier  
die Matrix/Analyt-Cluster und bei höheren Bestrahlungen auch die Gold-Cluster des Targetmaterials.  
Valinomycin als Quasimolekülion mit Gold wird dabei nicht gefunden. Auch Fragmentmassen von Va-  
linomycin mit Gold sind nicht erkennbar. Bis zu einer Konzentration von  $c = 10^{-4}$  M konnten von  
Valinomycin am Spektrometer ALADIM II keine PSD-Ionen erhalten werden. Im Vergleich hierzu lassen



sich PSD-Ionen von Insulin, bei höherer Bestrahlung und Analytkonzentrationen ab  $c = 10^{-6}$  M, erzeugen. Am Spektrometer ALADIM II werden auch von Valinomycin deutliche In-Source-Decay-Fragmente sowie PSD-Ionen erhalten, wenn dieses mittels MALDI vermessen wird. Eine überzeugende Erklärung für das (scheinbar) unterschiedliche Fragmentierungsverhalten der untersuchten Substanzen in den beiden Spektrometern konnte bislang noch nicht gefunden werden. Ein Vergleich mit Ergebnissen aus der Literatur ist schwierig, da MALDI-MS-Messungen mit einem Laserfokus von ca.  $1 \mu\text{m}$  überaus selten sind. Am Spektrometer ALADIM II wird, aufgrund des größeren Laserfokus, mit einer in der Größenordnung rund eine Potenz (Faktor 10) niedrigeren Bestrahlung gemessen, als am Spektrometer LAMMA 2000. Der Restgasdruck im Spektrometer LAMMA 2000 ( $p \approx 9 \times 10^{-7}$  mbar) war durchweg etwas niedriger, als am Spektrometer ALADIM II ( $p \approx 1.6 \times 10^{-6}$  mbar). Eine mögliche Erklärung könnte also in der unterschiedlichen „Verweildauer“ der erhaltenen Ionen in den beiden Ionenquellen zu finden sein.

An Sprühpräparationen<sup>7</sup> mit einer Konzentration der Matrixlösung (2,5-DHB) von mindestens 10 mg/ml konnten mit dem Analyten Substanz P und Einzelpulsmessungen SNR-Verhältnisse  $\approx 42.6$  dB (8-Bit) über nahezu der gesamten Präparationsfläche ( $A \approx 3 \text{ cm}^2$ ) detektiert werden. Lediglich an einer Stelle in der Präparation sank das SNR dabei auf ca. 41.2 dB. An Dried droplet-Präparationen mit identischen Analyt- und Matrixkonzentrationen konnten hingegen maximal SNR-Verhältnisse  $\approx 30$  dB (8-Bit) ermittelt werden. D.h. obwohl an Dried droplet-Präparationen mit der Matrix 2,5-DHB für Peptidanalyte, bei Vermessung eines „Hot-spots“, höhere absolute Signalintensitäten gefunden werden konnten, war bei Sprühpräparationen das SNR-Verhältnis bei Einzelpulsmessungen immer höher. Die Ursache hierfür wird in der homogenen Verteilung kleinerer Matrixkristalle in der Präparation vermutet. Einerseits ermöglicht hierbei das günstigere Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis der kleineren Kristalle eine effektivere Strahlungswirkung bei Mehrpulsmessungen, andererseits steigt hierdurch die Wahrscheinlichkeit gegenüber Präparationen mit größeren Kristallen, an einer Messstelle, unterschiedliche Kristallflächen zu fokussieren (statistische Verteilung). Die auf das Volumen bezogene größere Oberfläche der kleinen Kristalle wirkt sich zudem günstig auf die Wahrscheinlichkeit einer Analytanlagerung aus. Ein gesteigerter Einfluss von Salzanlagerungen konnte hingegen nicht festgestellt werden.

---

<sup>7</sup>10 Sprühzyklen, ca.  $200 \mu\text{l}$  Gesamtvolumen.

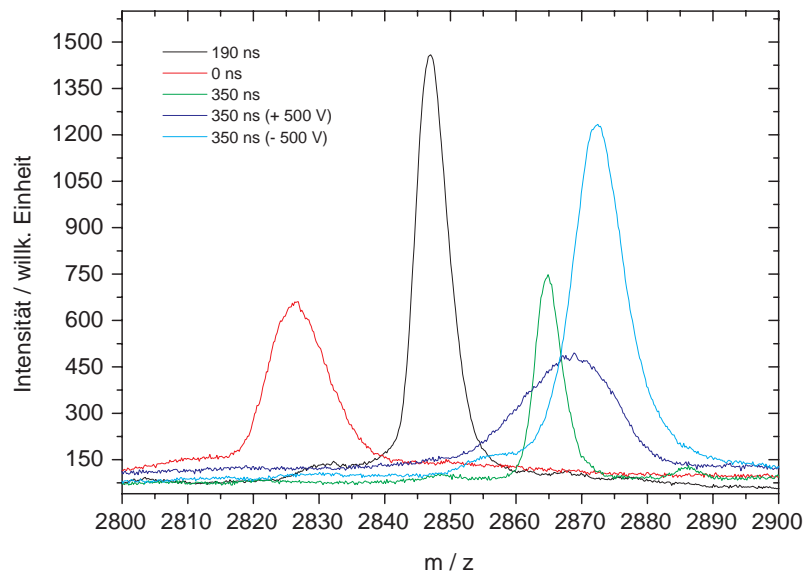
### 5.4.9 Massenrichtigkeit, Massengenauigkeit und Kalibrierung

#### Einfluss der DE-Zeit und der Samplingrate

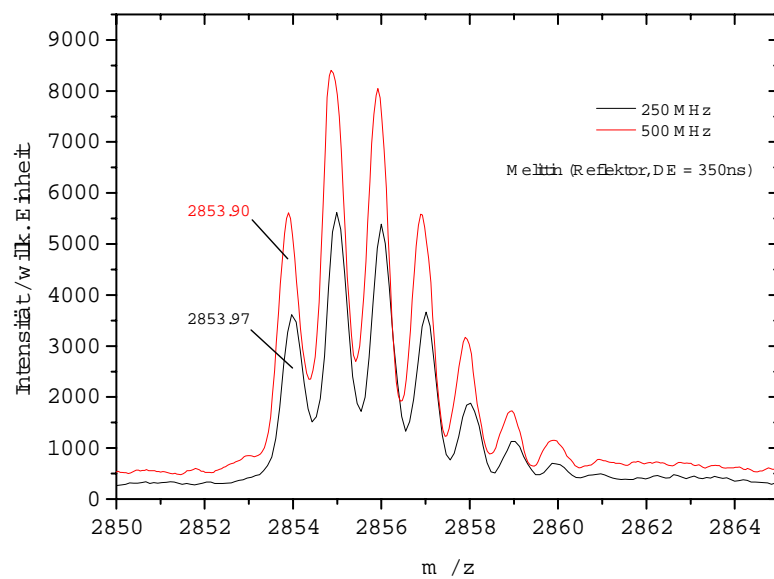
In Abbildung 5.42 sind Messungen der Quasimolekülonenverteilung  $[M + H]^+$  des Peptides Melittin bei unterschiedlicher DE-Zeit und Samplingrate (des Transientenrekorders) gezeigt. Die Messungen beziehen sich auf eine Kalibrierung mit einer DE-Zeit von  $t_{delay} = 190$  ns und einer Samplingrate bzw. Frequenz von  $f = 250$  MHz. Hierbei wird der Einfluss auf die mittlere Ionengeschwindigkeit, die Signalintensität und ggf. die Genauigkeit der Messungen bei einer gegenüber der Kalibrierung veränderten Sampling-Rate erkennbar. Es ist weiterhin untersucht worden, welchen Einfluss die mit einer Delayzeitmessung verbundene systematische Veränderung des elektrostatischen Feldes (vor allem) in der ersten Beschleunigungsstrecke am Aufbau des Spektrometers ALADIM II auf die Massengenauigkeit der Messungen in einem Massenbereich von ca.  $m/z$  140 bis  $m/z$  6000 haben kann. Hierzu sind in der Abbildung 5.43 zunächst die Messungen der Flugzeiten betrachteter Ionen gegen die eingestellte Delayzeit abgetragen. Diese zeigen die bekannte positiv lineare Beziehung zwischen der Ionenflugzeit und der Delayzeit. Andererseits wird auch erkennbar, dass bei den Messungen zu jedem betrachteten  $m/z$  ein früher Bereich (für relativ kleine Delayzeiten) und ein später Bereich (für relativ große Delayzeiten) ausgebildet wird, der innerhalb der ermittelten Fehler am besten durch einen eigenen Fit genähert werden kann. Die beiden Fitkurven besitzen dabei Schnittpunkte, die mit steigender Ionenmasse zu höheren Flug- und Delayzeiten verlagert sind. Im Rahmen der Delayzeitmessungen ist eine Bestimmung der maximalen, aufgrund der verursachten Feldverzerrung eintretenden, Flugzeitfehler kalibrierter Ionenmassen durchgeführt worden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.44 dargestellt. Wie im vorhergehenden Text dargelegt und in Abbildung 5.44 anhand eigener Messungen und den schematischen Schaltbildern des verwendeten Push-Puls-HV-Schalters verdeutlicht, erlangt das elektrostatische Feld vor allem bei Anwesenheit der Ionen in der ersten Beschleunigungsstrecke eine Verzerrung, aufgrund der Spannungs-Oszillation während der Rise-time der Elektrodenschaltung. Wie in Tabelle 5.14 aufgetragen, kann dieser systematische Fehler am Spektrometer ALADIM II maximal zu einer Massenabweichung von ca. 80 ppm im Massenbereich von ca.  $m/z$  1500 bis ca.  $m/z$  3000 führen. Im unteren Massenbereich ist der Fehler dabei erheblich größer. Diese Messungen beruhen aber auf einer gezielt hervorgerufenen Kapazitätserhöhung im Schaltungsaufbau und werden deshalb in Messungen mit abgestimmt ausgewähltem Widerstand  $R_S$  am Spektrometer ALADIM II nicht in dieser Form beobachtet. In Abbildung 5.45 ist das Leistungsspektrum im konstruierten DE-Aufbau dargestellt.

Tabelle 5.14: Maximaler systematischer DE-Restfehler im vermessenen DE-Zeitintervall für die Massen von 2,5-DHB  $[M - H_2O + H]^+$ , Substanz P  $[M + H]^+$ , Melittin  $[M + H]^+$  und Insulin  $[M + H]^+$  am Spektrometer ALADIM II.

Substanz	$\Delta t$	$\delta t$	$\delta m$
2,5-DHB	2.6 ns	0.009 %	200 ppm
Substanz P	4.1 ns	0.009 %	82 ppm
Melittin	5.6 ns	0.008 %	84 ppm
Insulin	6.5 ns	0.007 %	66 ppm

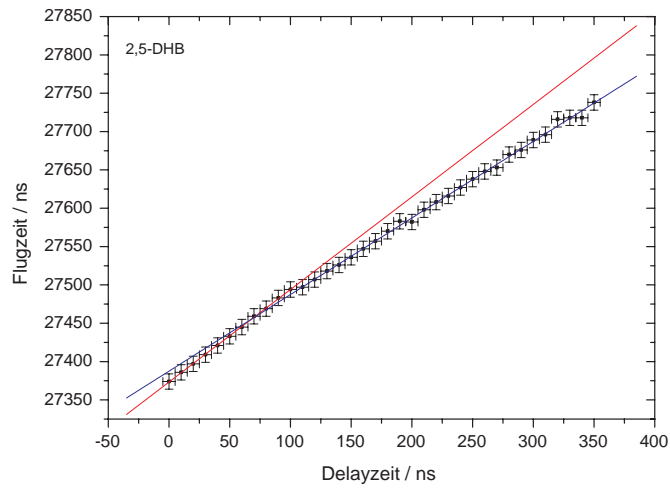


(a)

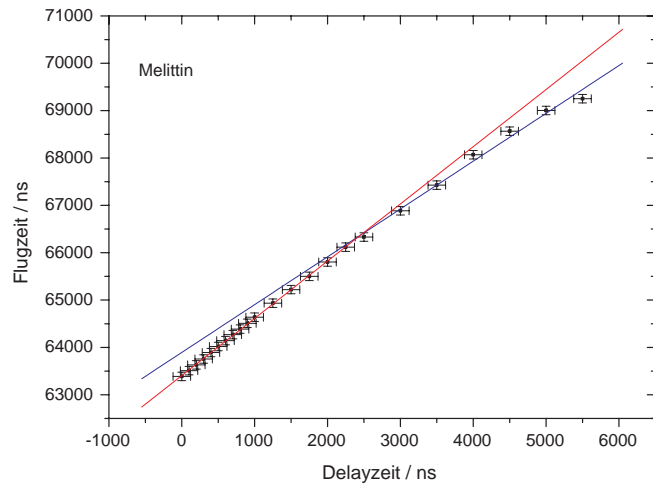


(b)

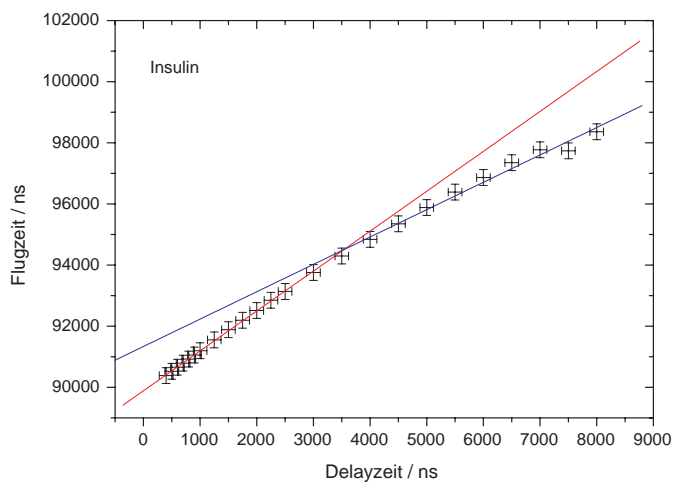
Abbildung 5.42: (a) Unaufgelöster Multipletpeak von Melittin ( $[M + H]^+$ ) bei unterschiedlichen DE-Zeiten im linearen Messmodus (250 MHz). Kalibrierung bei der DE-Zeit = 190 ns,  $m/z$  2847.35 (av, gemessen),  $m/z$  2847.47 (av, theoretisch),  $\delta_m = -42.14$  ppm. (b) Peaks von Melittin bei der DE-Zeit = 350 ns im Reflektormodus. Messung relativ zur Kalibrierung am Peak (av) im linearen Messmodus und der DE-Zeit = 190 ns. Aufnahme von Spektren mit 250 MHz und 500 MHz Sampling-Frequenz. In den Spektren ist die absolute Peakintensität angegeben. Deutlich wird die relative Massenabweichung von ca. 24.5 ppm zwischen den unterschiedlichen Samplingfrequenzen. Diese spiegelt den Einfluss einer systematischen Verschiebung (hier DE-Zeit relativ zur Kalibrierung) in Spektren bei einem zusätzlichen Wechsel der Fensterfunktionsbreite wider.



(a)

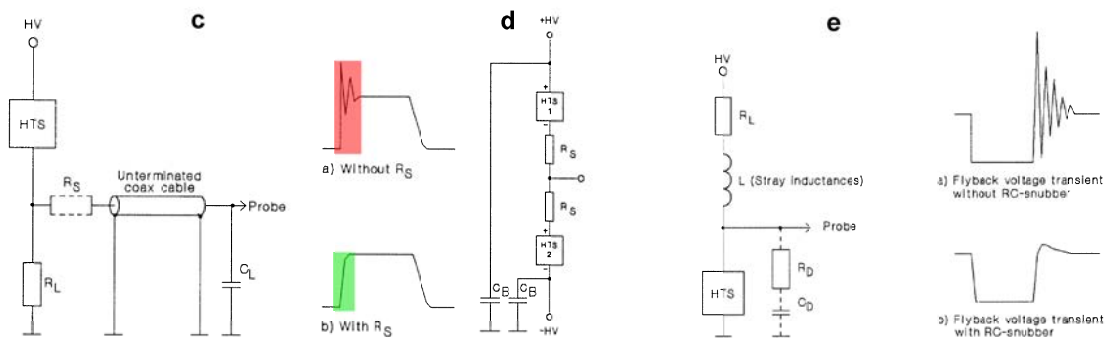
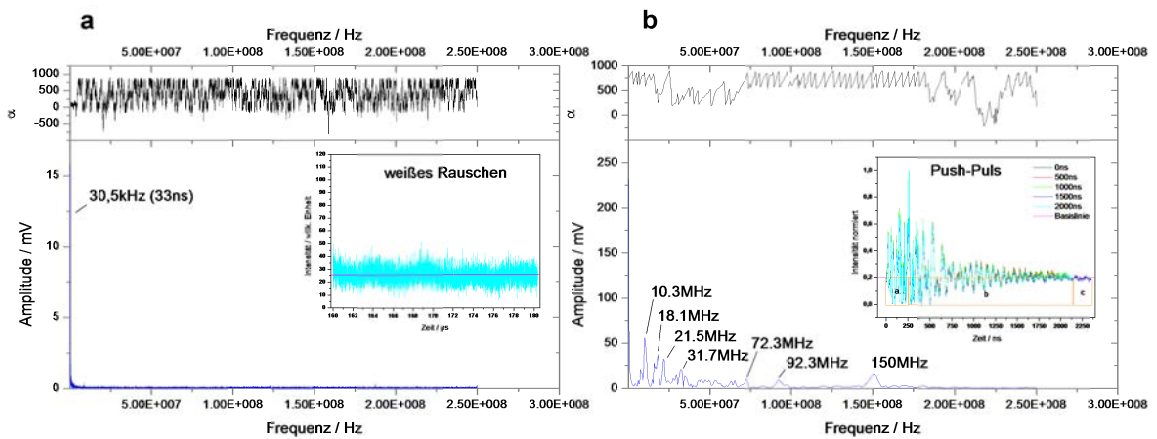


(b)



(c)

Abbildung 5.43: Abtrag der Ionenflugzeit gegen die Delayzeit für (relativ) große Delayzeiten in Abhängigkeit zum  $m/z$ -Verhältnis. Dargestellt sind die Ergebnisse für eine Dried droplet-Präparation ( $1\mu\text{l}$ ). Jeder Messpunkt entspricht dem arithmetischen Mittel aus 50 Einzelmessungen.



f Maximaler absoluter Restfehler der Kalibrierpeptide

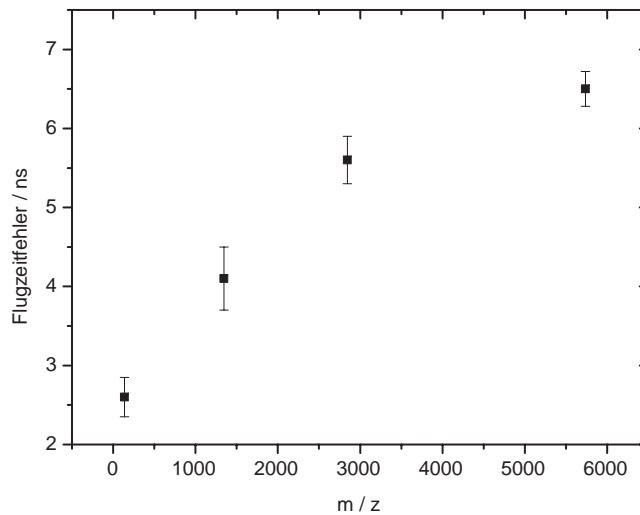


Abbildung 5.44: Fourieranalyse der DE-Schaltpulsscharakteristik der steigenden Flanke des Push-Pulses (a - d). (e) Fallende Flanke des Schaltpulses. (f) Absoluter maximaler, systematischer Restfehler kalibrierter DE-Messungen im angegebenen Massenbereich am Spektrometer ALADIM II. Abbildungen (c - e) entnommen aus der Referenz der Firma Behlke. (a) Charakteristisches Rauschverhalten des Gesamtsystems (Oszilloskop + MCP + Signalleitungen) bei einer Laserpulsfrequenz von 1 Hz und einer Abtastfrequenz von 500 MHz. (b) Analyse des Einflusses der steigenden Schaltpulsscharakteristik auf die erhaltenen Massenspektren.

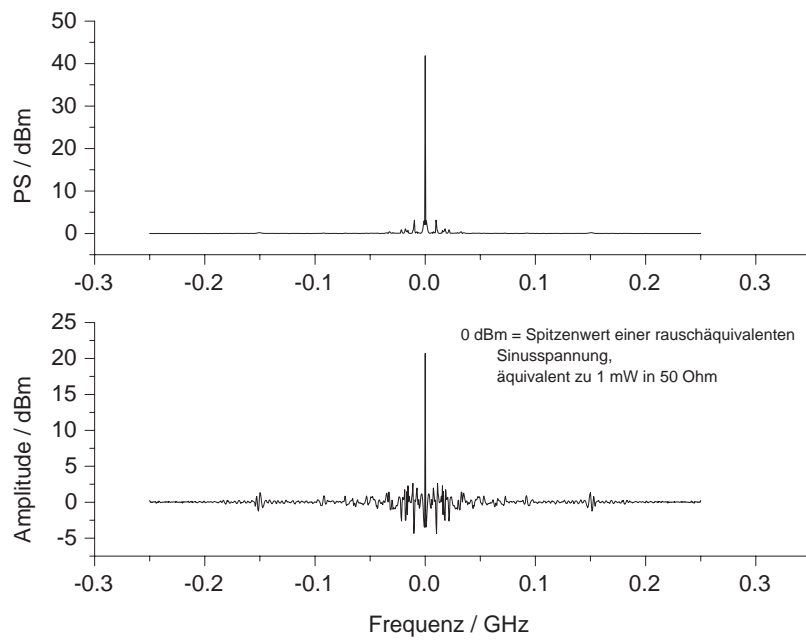


Abbildung 5.45: Leistungsspektrum der Schaltpulsscharakteristik im konstruierten DE-Aufbau. Erkennbar ist die, durch die Schaltung, verstärkte Intensität der Basislinie (von ca. 20 dBm auf ca. 40 dBm). Neben dem Signal des thermischen Grundrauschens (Basislinie) sind weitere Signale der Schaltpulsscharakteristik zuordbar.

### Einfluss der Nachkalibrierung am Beispiel einer PEG-Probe - Vergleich mit einer tryptischen Verdauprobe

In Abbildung 5.46 sind die mit einer Delayzeit von ca. 190 ns, bei einer zuvor mittels Dreipunktkalibrierung justierten Position der Probenebene, zu erwartenden absoluten Fehler an einer Verdauprobe von Myoglobin dargestellt. Es handelt sich hierbei um eine Sprühpräparation des Myoglobinanalyten und einem nachträglichen On-Target Dried droplet-Verdau mit dem Enzym Trypsin (Trypsin sequencing grade). Die größte gefundene Massenabweichung ist ca. + 56 ppm ( $m/z$  1086), die geringste Abweichung beträgt ca. + 4 ppm ( $m/z$  1360). Bei den drei zu dieser Messung verwendeten Kalibrierpeptiden handelt es sich um Substanz P ( $m/z$  1347), Melittin ( $m/z$  2845) und Insulin ( $m/z$  5735). Anhand des gezeigten Spektrenausschnitts wird deutlich, daß in der Nähe einzelner Kalibriermassen liegende Analytionen, am Spektrometer ALADIM II mit einer Massengenauigkeit (in Summenspektren) vermessen werden können, die die Grenze einer Restabweichung von 5 ppm unterschreitet. Die arithmetisch mittlere Massenabweichung über alle Peakzentroide ergibt aber  $24.3 \text{ ppm} \pm 16.8 \text{ ppm}$ . Im Mittel wird die 5 ppm-Grenze damit deutlich übertroffen.

Das angezeigte Massenintervall besteht aus 22363 Datenpunkten und deckt den Massenbereich von  $m/z$  800 bis  $m/z$  2200 ab (250 MHz-Messung). Betrachtet man die ermittelten theoretischen Peakmassen einer PEG 1500-Verteilung in Tabelle 5.18, so befinden sich in diesem Massenintervall 32 Peakmassen, wenn nur die Natriumspezies betrachtet werden und sogar 63 Peakmassen, wenn zusätzlich auch die Kaliumspezies berücksichtigt werden können. Alle Peakmassen sind als Stützmassen in einer Nachkalibrierungsprozedur einsetzbar. Die Nachkalibrierung wird im folgenden aber auf die ersten 30 Peaks der Natriumspezies begrenzt, da diese deutlich intensiver sind. Die Besonderheit der Massenverteilung liegt in diesem Fall, bei der äquidistanten Anordnung der einfachgeladenen Stützmassen mit einem  $\Delta m \approx 44.026 \text{ u}$ .

#### Sequenzabdeckung



```

      10      20      30      40      50
MGLSDGEWQQ  VLNVWGKVEA  DIAGHGQEV L  IRLFTGHPET  LEKFDKFKHL
      60      70      80      90      100
KTEAEMKASE  DLKKHGT VVL  TALGGILK K K  GHHEAELKPL  A QSHATKHKI
      110     120     130     140     150
PIKYLEFISD  AIIHVLHSKH  PGDFGADAQG  AMTKALELFR  NDIAAKYKEL
      154
GFQG

```

Die MALDI-Messung der tryptischen Verdauprobe zeigt eine Sequenzabdeckung von 77.3 % und ist damit im Rahmen einer MASCOT-Suche in SwissProt/NCBI Datenbanken ausreichend, um hierüber Myoglobin eindeutig identifizieren zu können.



## Tryptische Spaltpeptide von Myoglobin nach On-Target Verdau

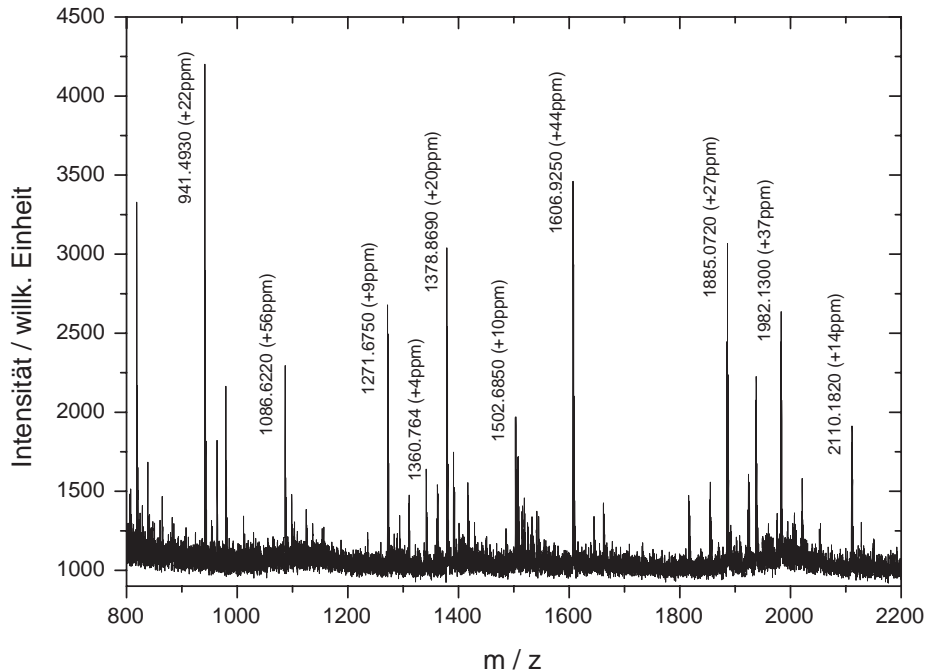


Abbildung 5.46: Summenspektrum (81 Einzelspektren) einer tryptischen Verdauprobe des Proteins Myoglobin mit der Matrix 2,5-DHB ohne Nachkalibrierung (Pferdemyoglobin, *Equus caballus*,  $M_r = 17072$  Da, **P68082**). Sprühpräparation aus Abbildung 6.12. Einige Peaks sind mit ihren gemessenen Massen und den relativen Fehlern angegeben (Mascot-Datenbanksuche), Tabelle 5.15.

Tabelle 5.15: Im Summenspektrum identifizierte tryptische Verdaupeptide des Proteins Myoglobin (P68082) UniProtKB/Swiss-Prot. MC = Missed cleavages, 0=blau, 1=grün, 2=rot. Primärstruktur im Einbuchstabencode.

Position	Sequenz	MC	Messwert	Theoriewert	$\delta$ m
147 – 154	YKELGFQG	1	941.4930	941.4727	22 ppm
49 – 57	HLKTEAEMK	1	1086.6220	1086.5612	56 ppm
33 – 43	LFTGHPETLEK	0	1271.6750	1271.6630	9 ppm
135 – 146	ALELFRNDIAAK	1	1360.7640	1360.7583	4 ppm
65 – 78	HGTVVLTALGGILK	0	1378.8690	1378.8416	20 ppm
120 – 134	HPGDFGADAQGAMTK	0	1502.6850	1502.6692	10 ppm
17 – 32	VEADIAGHGQEVLR	0	1606.9250	1606.8547	44 ppm
104 – 119	YLEFISDAIHVLHSK	0	1885.0720	1885.0218	27 ppm
80 – 97	KGHHEAELKPLAQSHATK	1	1982.1300	1982.0566	37 ppm
79 – 97	KKGHHEAELKPLAQSHATK	2	2110.1820	2110.1515	14 ppm

In Abbildung 5.47 (a) sind die Ergebnisse der ermittelten Massenabweichungen identifizierter Peaks aus zwei unabhängigen MALDI-Messungen, einerseits der Messung einer Verdauprobe (Myoglobin) und andererseits der Messung einer PEG-1500-Verteilung, zu erkennen. Auch die PEG-Probe ist zunächst mit den Einstellungen der Standardreferenz (drei Peptidmassen) kalibriert. Die größte Massenabweichung der PEG-Messung ohne Nachkalibrierung beträgt in etwa 44 ppm. Die arithmetisch mittlere Massenabweichung liegt bei  $19.9 \text{ ppm} \pm 8.9 \text{ ppm}$ . Es ist anhand beider Messungen deutlich zu erkennen, daß eine Massenabweichung von kleiner oder gleich 5 ppm am Spektrometer ALADIM II im angegebenen Massenintervall, weder für die Peptidmessungen noch für die PEG-Messungen über den gesamten betrachteten Massenbereich erreicht werden kann. In den dargestellten Messungen betragen die geringsten erhaltenen Abweichungen einzelner Peaks dennoch 4 ppm (Myoglobin-Messung) bzw. -4.5 ppm (PEG-Messung) und liegen damit unter 5 ppm. Im Zusammenhang mit TOF-Messungen wird die 5 ppm-Marke gelegentlich in der Literatur auch als „magische“ Grenze bezeichnet [22] [23].

Eine Nachkalibrierung der aufgenommenen Massenspektren kann durch eine Interpolation mit Polynomen  $n$ -ter Ordnung aber auch mit einer Geradengleichung in Verbindung mehrerer Stützmassen erfolgen. Die Polynome haben dabei prinzipiell die in Abschnitt 3.3 dargestellte Form:

$$(i) \quad t = C_0 + C_1 \cdot (m/z)^{1/2} + C_2 \cdot (m/z) + C_3 \cdot (m/z)^{3/2} + \dots$$

Die Kalibrierung, die als Standardverfahren in der Steuer- und Aufnahmesoftware ULISSES verwendet wird und dort maximal vier Stützpunkte berücksichtigen kann, basiert auf der Geradengleichung der TOF-Formel (ii):

$$(ii) \quad t = C_0 + C_1 \cdot (m/z)^{1/2}$$

Tabelle 5.16: Kalibrierkonstanten der polynomischen und linearen Fitfunktionen zur Nachbildung der Dreipunktkalibrierungen. (i.M, ii.M) = Myoglobin-Messung, (i.P, ii.P) = PEG-Messung.

Nr.	$C_0$	$C_1$	$C_2$	$C_3$	$C_4$	$C_5$
i.M	187.32363	2334.34505	-3.18871E-6	9.28995E-8	-1.34166E-9	7.68118E-12
i.M	187.32419	2334.34498	8.92017E-7	-1.64417E-8	1.12554E-10	–
i.M	187.32397	2334.345	-6.73736E-8	6.05706E-10	–	–
i.M	187.324	2334.345	1.42829E-9	–	–	–
ii.M	187.324	2334.345	–	–	–	–
i.P	0.395	2328.54633	-1.84796E-5	5.09542E-7	-6.97122E-9	3.78592E-11
i.P	0.39774	2328.54596	1.63424E-6	-2.93874E-8	1.96348E-10	–
i.P	0.39736	2328.546	-3.93392E-8	3.5092E-10	–	–
i.P	0.39738	2328.546	5.23073E-10	–	–	–
ii.P	0.39738	2328.546	–	–	–	–

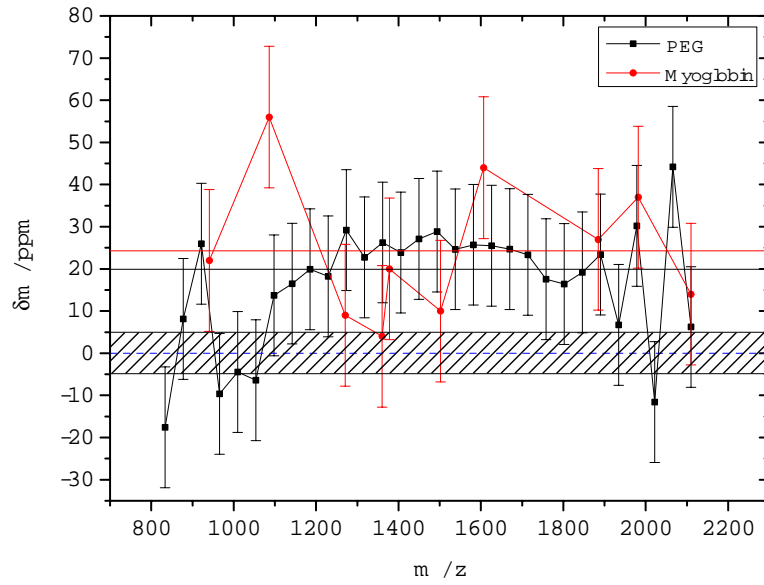
Tabelle 5.17: Kalibrierkonstanten der polynomialen und linearen Fitfunktionen zur Nachkalibrierung der aufgenommenen Spektren.

Nr.	$C_0$	$C_1$	$C_2$	$C_3$	$C_4$	$C_5$
i.P	-1048.04782	2537.75658	-12.04234	0.34407	-0.00487	2.7347E-5
i.P	845.95257	2278.4673	2.06505	-0.03727	2.48814E-4	-
i.P	378.26524	2329.61569	-0.01527	2.93327E-5	-	-
i.P	379.76308	2329.49318	-0.01197	-	-	-
ii.P	396.39179	2328.59274	-	-	-	-

Tabelle 5.18: Theoretische PEG-Massen  $[C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1} + Na - e^-]^+$ . Peakmassen nach Dreipunkt-kalibrierung im Programm ULISSES und relative Massenabweichung zu den theoretischen Peakmassen. Geringste Abweichung (blau), höchste Abweichung (rot).

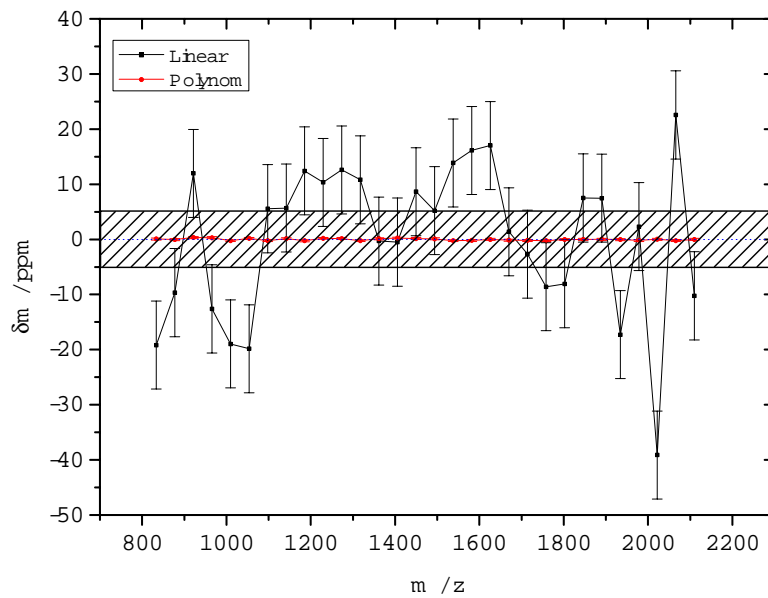
Nr.	$n$	Messwert	Theoriewert	$\delta$ m
1	18	833.457	833.47165	- 17.6 ppm
2	19	877.505	877.49787	8.1 ppm
3	20	921.548	921.52408	26 ppm
4	21	965.541	965.55030	- 9.6 ppm
5	22	1009.572	1009.57651	- 4.5 ppm
6	23	1053.596	1053.60272	- 6.4 ppm
7	24	1097.644	1097.62894	13.7 ppm
8	25	1141.674	1141.65515	16.5 ppm
9	26	1185.705	1185.68137	20 ppm
10	27	1229.730	1229.70758	18.2 ppm
11	28	1273.771	1273.73380	29.2 ppm
12	29	1317.790	1317.76001	22.8 ppm
13	30	1361.822	1361.78623	26.3 ppm
14	31	1405.846	1405.81244	23.9 ppm
15	32	1449.878	1449.83866	27.1 ppm
16	33	1493.908	1493.86487	28.9 ppm
17	34	1537.929	1537.89109	24.7 ppm
18	35	1581.958	1581.91730	25.7 ppm
19	36	1625.985	1625.94352	25.5 ppm
20	37	1670.011	1669.96973	24.7 ppm
21	38	1714.036	1713.99595	23.4 ppm
22	39	1758.053	1758.02216	17.5 ppm
23	40	1802.078	1802.04838	16.4 ppm
24	41	1846.110	1846.07459	19.2 ppm
25	42	1890.145	1890.10080	23.4 ppm
26	43	1934.140	1934.12702	6.7 ppm
27	44	1978.213	1978.15323	30.2 ppm
28	45	2022.156	2022.17945	- 11.6 ppm
29	46	2066.297	2066.20566	44.2 ppm
30	47	2110.245	2110.23188	6.2 ppm

Myoglobin- und PEG-Messungen ohne Nachkalibrierung



(a)

PEG-Messungen mit Nachkalibrierung



(b)

Abbildung 5.47: (a) Dargestellt sind die relativen Massenabweichungen der Myoglobin- und PEG-Messungen vor einer Nachkalibrierung. (b) Massenabweichungen der PEG-Messung nach einer Nachkalibrierung mit einer Linearen Regression und einem Polynomfit.

Tabelle 5.19: Theoretische PEG-Massen  $[C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1} + Na - e^-]^+$ . Nachkalibrierung anhand einer linearen Regression und einer Polynomfunktion. Geringste Abweichung (blau), höchste Abweichung (rot).

Nr.	$n$	Linear	Polynom	Theoriewert	$\delta m$ (Linear)	$\delta m$ (Polynom)
1	18	833.4556615	833.4717034	833.47165	-19.18 ppm	0.064 ppm
2	19	877.4893959	877.4978383	877.49787	-9.66 ppm	-0.036 ppm
3	20	921.5351083	921.5243778	921.52408	11.97 ppm	<b>0.322 ppm</b>
4	21	965.5381236	965.5505944	965.55030	-12.61 ppm	0.305 ppm
5	22	1009.557367	1009.576273	1009.57651	-18.96 ppm	-0.235 ppm
6	23	1053.581820	1053.602911	1053.60272	-19.84 ppm	0.181 ppm
7	24	1097.635035	1097.628705	1097.62894	5.55 ppm	-0.214 ppm
8	25	1141.661634	1141.655299	1141.65515	5.68 ppm	0.130 ppm
9	26	1185.696091	1185.681073	1185.68137	12.42 ppm	-0.250 ppm
10	27	1229.720297	1229.707814	1229.70758	10.34 ppm	0.191 ppm
11	28	1273.749856	1273.733986	1273.73380	12.61 ppm	0.146 ppm
12	29	1317.774260	1317.759697	1317.76001	10.81 ppm	-0.238 ppm
13	30	1361.785811	1361.786388	1361.78623	<b>-0.31 ppm</b>	0.116 ppm
14	31	1405.811736	1405.812784	1405.81244	-0.50 ppm	0.245 ppm
15	32	1449.851192	1449.838891	1449.83866	8.64 ppm	0.159 ppm
16	33	1493.872646	1493.865015	1493.86487	5.21 ppm	0.097 ppm
17	34	1537.912418	1537.890734	1537.89109	13.87 ppm	-0.231 ppm
18	35	1581.942818	1581.916984	1581.91730	16.13 ppm	-0.200 ppm
19	36	1625.971192	1625.943523	1625.94352	17.02 ppm	<b>0.002 ppm</b>
20	37	1669.972043	1669.969475	1669.96973	1.38 ppm	-0.153 ppm
21	38	1713.991352	1713.995604	1713.99595	-2.68 ppm	-0.202 ppm
22	39	1758.007059	1758.021754	1758.02216	-8.59 ppm	-0.231 ppm
23	40	1802.033847	1802.048346	1802.04838	-8.06 ppm	-0.019 ppm
24	41	1846.088453	1846.074578	1846.07459	7.51 ppm	-0.006 ppm
25	42	1890.114931	1890.100841	1890.10080	7.48 ppm	0.021 ppm
26	43	1934.093595	1934.126933	1934.12702	-17.28 ppm	-0.045 ppm
27	44	1978.157808	1978.152826	1978.15323	2.31 ppm	-0.204 ppm
28	45	2022.100334	2022.179483	2022.17945	<b>-39.12 ppm</b>	0.016 ppm
29	46	2066.252280	2066.205208	2066.20566	22.56 ppm	-0.219 ppm
30	47	2110.210271	2110.231856	2110.23188	-10.24 ppm	-0.011 ppm

Tabelle 5.20: Vergleich der relativen Abweichungen im Bezug auf die Referenzmessung. Die Referenz ist die PEG-Messung, im Anschluss einer Dreipunktkalibrierung mit den Peptiden Substanz P, Melittin und Insulin. Bedingung der ersten beiden Spalten: Wenn (Abweichung der Nachkalibrierung) < (Abweichung der Referenz) dann 1, sonst 0. Bedingung der letzten beiden Spalten: Wenn |Abweichung der Nachkalibrierung| < |Abweichung der Referenz| dann 1, sonst 0.

Peak-Nr.	Polynom	Linear	Polynom(Betrag)	Linear(Betrag)
1	0	1	1	0
2	1	1	1	0
3	1	1	1	1
4	0	1	1	0
5	0	1	1	0
6	0	1	1	0
7	1	1	1	1
8	1	1	1	1
9	1	1	1	1
10	1	1	1	1
11	1	1	1	1
12	1	1	1	1
13	1	1	1	1
14	1	1	1	1
15	1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	1	1	1	1
18	1	1	1	1
19	1	1	1	1
20	1	1	1	1
21	1	1	1	1
22	1	1	1	1
23	1	1	1	1
24	1	1	1	1
25	1	1	1	1
26	1	1	1	0
27	1	1	1	1
28	0	1	1	0
29	1	1	1	1
30	1	1	1	0

Die Ergebnisse der Nachkalibrierungsprozedur für die PEG-Messungen mit einem Polynom 5. Ordnung zeigen eine arithmetisch mittlere Massenabweichung von  $149.7 \text{ ppb} \pm 96.5 \text{ ppb}$ . Die Kalibriermassen der linearen Nachkalibrierung befinden sich alle im Intervall von  $m/z$  800 bis  $m/z$  2200 (Peak 1, Peak 14 und Peak 28 der PEG-Verteilung). Die Nachkalibrierung anhand einer linearen Regression am identischen Datensatz ergibt eine arithmetisch mittlere Massenabweichung von  $11.3 \text{ ppm} \pm 8.0 \text{ ppm}$ . Beide Nachkalibrierungsverfahren steigern damit die Massengenauigkeit der Testmessungen. Die Nachkalibrierung mittels Polynom zeigt dabei, neben der Reduktion des statistischen Fehlers, auch eine deutliche Reduktion des systematischen Fehlers, der aufgrund der DE-Pulsschaltung auftritt bzw. auftreten kann. Ihr Einfluss wird im Vergleich zur statistischen Streuung bedeutungslos. Dieser Effekt kann bei einer Nachkalibrierung durch eine lineare Regression mit drei Stützmassen, die innerhalb des Intervalls  $m/z$  800 bis  $m/z$  2200 liegen, nicht festgestellt werden. Nicht alle Abweichungen (nach) einer linearen Nachkalibrierung zeigen im Betrag niedrigere Werte, als die Peakabweichungen in der Referenz. Es zeigt sich andererseits, daß alle Abweichungen der Peakwerte nach der linearen Nachkalibrierung niedrigere Werte aufweisen, wenn man ihr Vorzeichen berücksichtigt, was auf eine Reduktion des systematischen Fehlers schliessen lässt. Der statistische Fehler wird naturgemäß nie vollständig beseitigt. In der Korrektur mit dem polynomischen Fit erfolgt insgesamt eine deutliche Reduktion des systematischen und des statistischen Fehlers (siehe Tabelle 5.20).

#### 5.4.10 Fazit

An einer exemplarisch durchgeführten artifiziellen Sprühpräparation mit Myoglobin ( $25 \mu\text{l}$ ,  $10^{-4} \text{ M}$ ) konnte gezeigt werden, daß ein On-Target-Verdau mit ca.  $2 \mu\text{l}$  Trypsinlösung (ca. 50 ng), verteilt auf einem Areal von ca.  $7 \text{ mm}^2$  ausreichend gute Ergebnisse bereitstellt, um im Rahmen einer MASCOT-Datenbanksuche eine Identifizierung des verdauten Analyten zu erhalten. Der Analyt wird bei der Sprühpräparation auf einer metallischen Targetfläche von ca.  $3 \text{ cm}^2$  homogen verteilt, wobei ca.  $1/3$  der versprühten Masse auf dem Target verbleibt. Von den  $7 \text{ mm}^2$  der Dried droplet-Präparation wird dann gerade eine Fläche von ca.  $490 \mu\text{m}^2$  laserspektrometrisch vermessen und im Anschluss die erhaltenen Signale im Massenbereich  $m/z$  800 bis  $m/z$  2200 zu einer MASCOT-Suche in den Datenbanken SwissProt und NCBI herangezogen.

Nachkalibrierungsexperimente an einer  $20 \mu\text{l}$  PEG-Sprühpräparation zeigen, daß bei einer Anzahl von 30 äquidistanten Stützmassen in einem DE-Reflektor-TOF-Massenspektrum, anhand einer Nachkalibrierung mittels einer Polynomfunktion 5. Ordnung (vereinfachtes Newtonsches Verfahren), der verbleibende Restfehler der Massengenauigkeit in einem großen Massenbereich ( $m/z$  800 –  $m/z$  2200) auf i.d.R. deutlich unter 5 ppm gesenkt werden kann. Zum Vergleich wird eine lineare Nachkalibrierung mit drei Stützmassen herangezogen. Letztere wäre, aufgrund der geringeren Rechenzeit und einer relativ einfachen Implementierung, auch als eine Art Echtzeitkalibrierung (on the fly) während Messungen möglich, liefert aber deutlich schlechtere Ergebnisse als die Nachkalibrierung mit der Polynomfunktion. Eine Betrachtung der Fehlerreduktion deutet ebenso darauf hin, daß hierdurch der systematische Restfehler der Messung nur unzureichend korrigiert werden kann.

Diese Messungen belegen insgesamt, daß theoretisch auch an komplexen Massenspektren biologischer Proben, die mit TOF-Spektrometern und Reflektor sowie der DE-Technik aufgenommen werden, eindeutige Substanzidentifizierungen möglich sind, wenn entsprechende Nachkalibrierungsmethoden angewandt werden. In realen (unbekannten) Proben ist es aber vergleichsweise schwierig eine ähnlich große Anzahl



von bekannten Stützmassen einzufügen, ohne die Messung negativ zu beeinflussen. Eine zufriedenstellende Lösung für die routinemäßige Laborpraxis muss deshalb noch gefunden werden.

### 5.4.11 Laserablationsbestimmung

Zur Ablationsbestimmung können einerseits die ermittelten Querschnitte der vermessenen Laserstrahlprofile an der jeweiligen ( $z$ -) axialen Position herangezogen werden und andererseits die erhaltenen Ablationskrater im entsprechenden Probenmaterial. Die Justierung (des Lasers) kann dabei z.B. an Ablationsprofilen in rotem (absorbierenden) Filzstiftfarbstoff im gesamten axialen Strahlverlauf ermittelt werden, um diese dann mit den Werten aus der optischen Strahlvermessung zu vergleichen. Auf diese Weise ist es z.B. möglich, Desorptions- und Ablationsgrenzen im optischen Laserquerschnittsprofil zu ermitteln und daraus Schwellbestrahlungen einer bestimmten Substanz am eingesetzten Spektrometer zu errechnen. In Abbildung 5.48 erkennt man am Beispiel des Spektrometers LAMMA 2000 einige Ablationsmuster in rotem und schwarzem Filzstiftfarbstoff. Diese können weitestgehend mit der Lager des Strahlverlaufes relativ zum  $45^\circ$ -Spiegel im hinteren Bereich der MALDI-Ionenquelle erklärt werden. Der rote Farbstoff ist photochemisch anregbar. Die Mischung des schwarzen Farbstoffs wird aber sehr wahrscheinlich hauptsächlich thermisch angeregt. Zusammen mit dem Iontentransferröhrchen bildet der axial durchbohrte Spiegel ein Hindernis aus, wodurch das einfallende Laserlicht teilweise ausgeblendet und beugt wird. In Abhängigkeit des Strahlwinkels und der Auftreffposition des Laserquerschnitts auf dem Spiegel, entstehen so unterschiedliche Intensitätsquerschnitte in der Probenregion des Spektrometers. Diese erzeugen im Messbetrieb Ablationskrater, deren Querschnitte bei Infokuslage von ideal kreisrunden Profilen über ovale bis halbmond-, sichel- oder keulenförmige Strukturen reichen. In Abbildung 5.49 ist eine Übersicht des Einkoppelprinzips am Spektrometer LAMMA 2000 gezeigt.

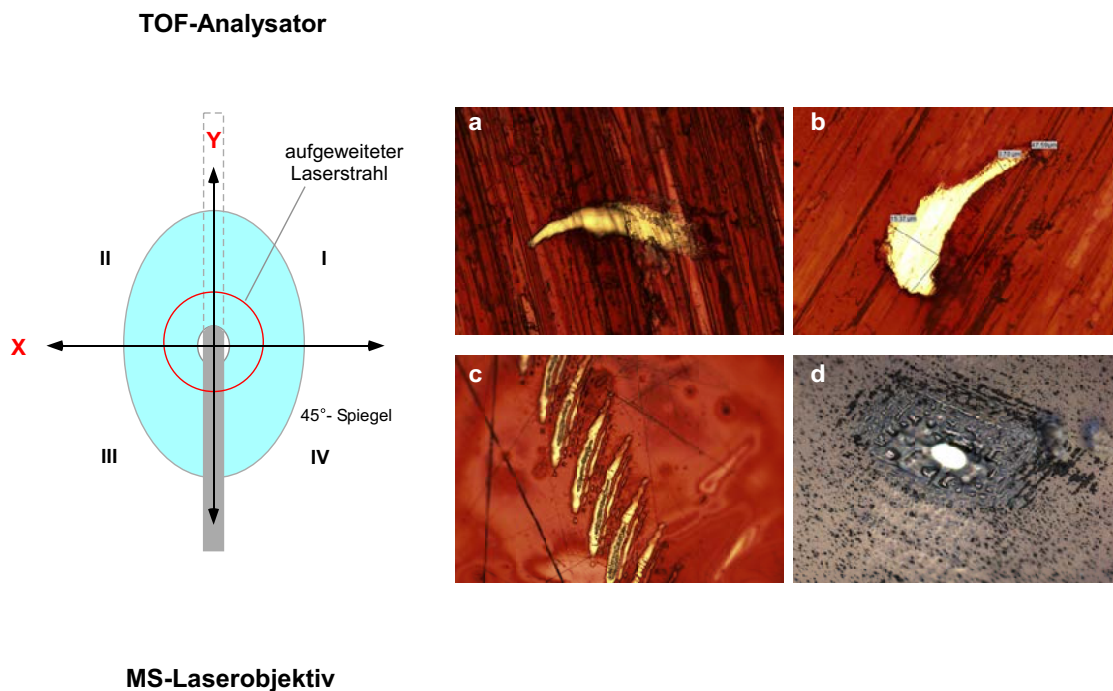


Abbildung 5.48: Darstellung einiger Ablationsprofile bei Infokusmessungen und wechselnder Strahljustierung. (a - c) Verlagerung des Strahlprofilquerschnitts in der  $x$ -Achse, relativ zum Achsenkreuz auf dem  $45^\circ$ -Spiegel. (d) Verlagerung des Strahlprofils hauptsächlich entlang der  $y$ -Achse.

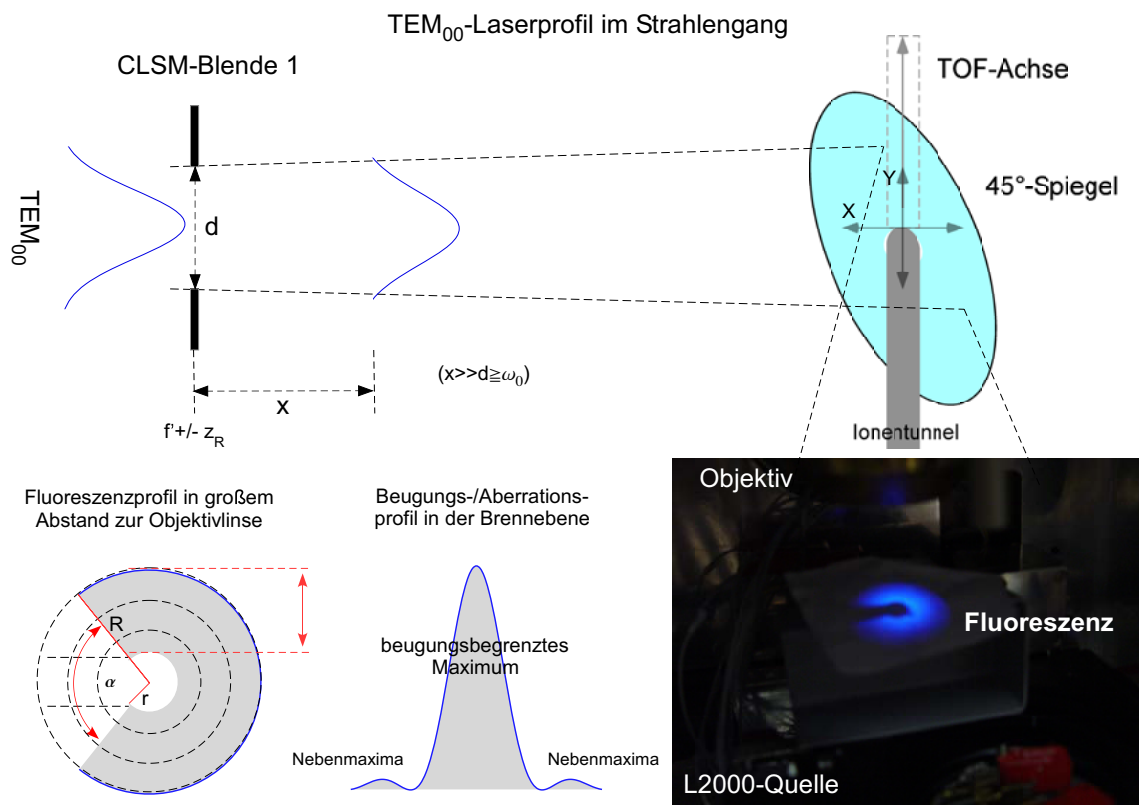
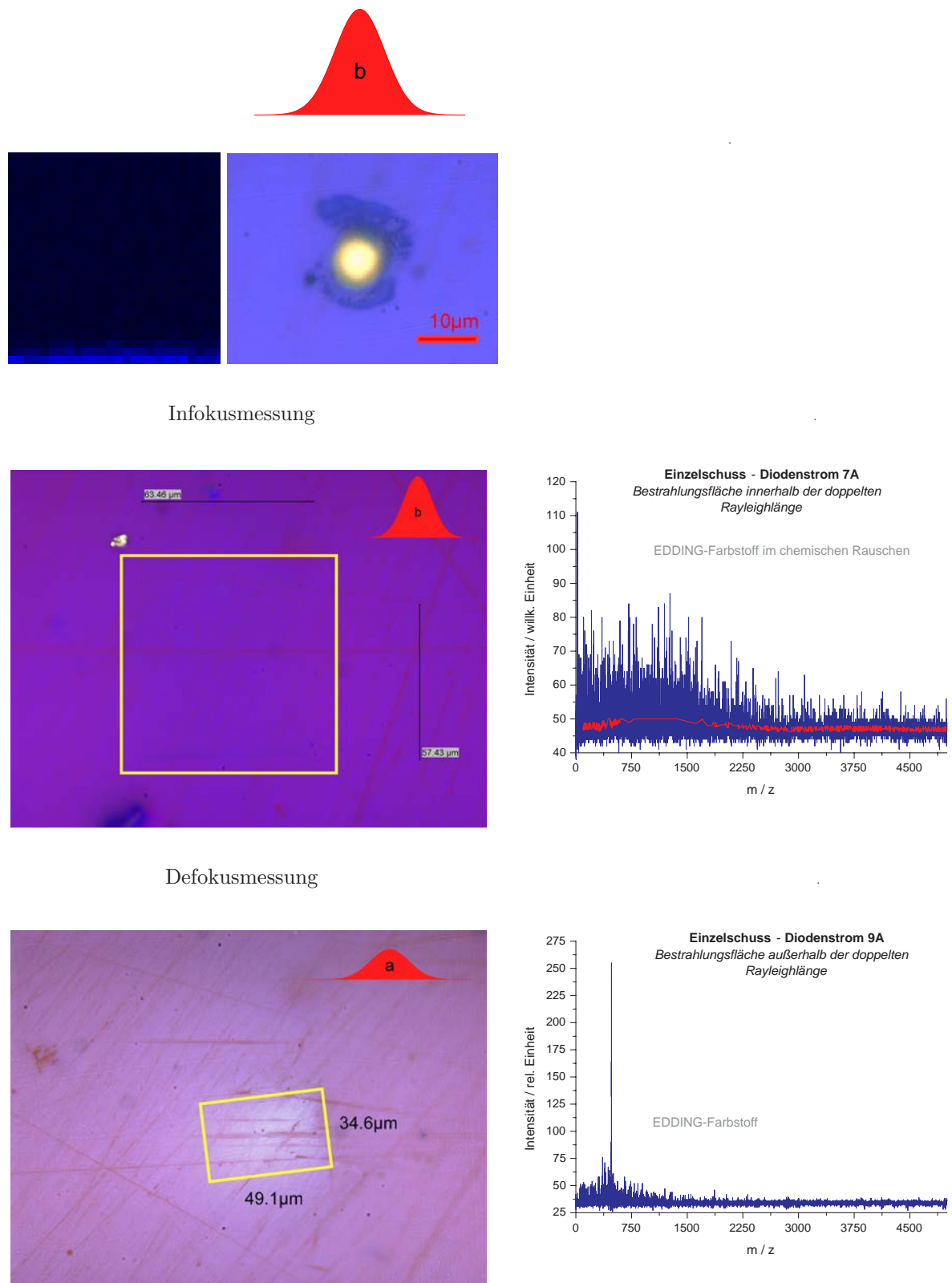


Abbildung 5.49: Schlüssellochprofil im afakalen Bereich. Der blau unterlegte Flächeninhalt des Ringteiles im projizierten Laserprofil errechnet sich aus  $A_\alpha = \frac{\alpha \pi}{360^\circ} (R^2 - r^2) = \frac{\alpha \pi}{1440} (D^2 - d^2)$ , mit  $D = 2R$ ,  $d = 2r$ .

Neben den wechselnden Ablationsquerschnitten bei axialer Infokus- und Defokuslage der Probenebene, kann bei Infokus- und Defokussmessungen auch ein unterschiedlich ausgeprägtes Ablations-Tiefenprofil auftreten. Insgesamt kann es hierdurch qualitativ zu einem veränderten Signal/Rausch-Muster in den korrespondierenden Massenspektren kommen, vor allem dann, wenn native biologische Proben vermessen werden.

Als vereinfachte Beispiele werden im folgenden Ablations- bzw. Desorptionsumrisse in dünn aufgetragenem blauen Filzstiftfarbstoff dargestellt.

In Abbildung 5.50 ist zu erkennen, daß am Beispiel der LDI-Messungen an blauem Filzstiftfarbstoff, zum einen bei den Infokussmessungen mit relativ niedriger Laserpulsenergie (an der Grenze zur Schwellbestrahlung), hauptsächlich Spektren mit niedrigem SNR erhalten werden. Im unteren Bildbereich des Ionenintensitätsverteilungsbildes (oben links) sind, wie in Abb. 5.68 beschrieben, Mehrpulsartefakte als deutlich blaugefärbte Pixel zu erkennen. Der Rest der Abbildung zeigt dagegen nur Pixel mit sehr geringer Intensität. Diese werden durch das exemplarische Einzelpulsspektrum in der Abbildungsmitte (rechts) repräsentiert. Bei der rasternden Defokussmessung (darunter) ist zum einen in der lichtoptischen Aufnahme ein deutlich ungleichmäßiger Farbstoffabtrag zu erkennen, der zudem ein unsymmetrisches Profil hinterlässt. Während bei den Infokussmessungen noch ein weitgehend symmetrisches Raster erzeugt wird, stellt sich bei den Defokussmessungen eine deutliche Unsymmetrie ein. Das in der Abbildung nicht dargestellte Ionenintensitätsverteilungsbild dieser Messung zeigt eine gleichmäßig helle (intensive), vollständig ausgefüllte Rasterfläche. Ein repräsentatives Einzelpulsspektrum ist rechts, neben dem lichtoptischen Bild, dargestellt.



Infokusmessung

Defokusmessung

Abbildung 5.50: (Oben links) Ionenintensitätsverteilungsbild des gelb umrandeten Bereiches aus (Basispeaks des blauen Farbstoffs, Infokusmessung) der (Mitte links) Lichtoptischen Aufnahme der Rasterfläche. (Oben rechts) Lichtoptische Aufnahme einer Infokuseinzelpulsmessung mit einem Diodenstrom von 9 A. (Mitte links) Summenpulsablation bei Lage des Targets innerhalb des Strahlbereiches b (Diodenstrom 7 A, Infokusmessung, siehe S. 156). (Mitte rechts) Charakteristisches Einzelpulsspektrum. (Unten links) Lichtoptische Aufnahme einer Defokus-Einzelpulsmessung mit einem Diodenstrom von 9 A (siehe S. 156).

**Infokusmessungen mit zentrischer Strahljustierung**

Die Analyse der Desorptions-/Ablationsbereiche an einer Einzelpulsmessstelle wird dann i.d.R. auch auf rasternde Messungen erweitert. Das Vorgehen bei der Auswertung beinhaltet hierbei die (teilweise automatische) lichtoptische und zeilenweise Vermessung der Einzel- oder Mehrpulsablationen an den Messstellen. Das Vorgehen ist für Vier- und Achtpulsmessungen an einer Probenstelle exemplarisch in Abbildung 5.51 verdeutlicht. Nach der zeilenweisen Vermessung wird i.d.R. eine spaltenweise Vermessung angeschlossen (nicht dargestellt). Auf diese Weise kann zunächst die laterale Ablationsfläche abgeschätzt werden. Bei Proben die ein geringes Höhenprofil aufweisen, wie z.B. die beispielhaft dargestellten LDI-Farbstoffproben, beschränkt sich die Ermittlung der Tiefentopologie an einer Messstelle darauf, ob an der entsprechenden Stelle noch Farbstoff vorhanden ist oder ob bereits der Targetuntergrund sichtbar wird. Dies ist i.d.R. im Aufsichtverfahren anhand deutlicher Änderungen der reflektierten Lichtmenge erkennbar. Weiterhin ist bei solchen Proben oft ein lateraler Bereich an thermisch verändertem Material und/oder einer Debrisablagerung erkennbar.

Ablationsraster in Filzstiftfarbstoff

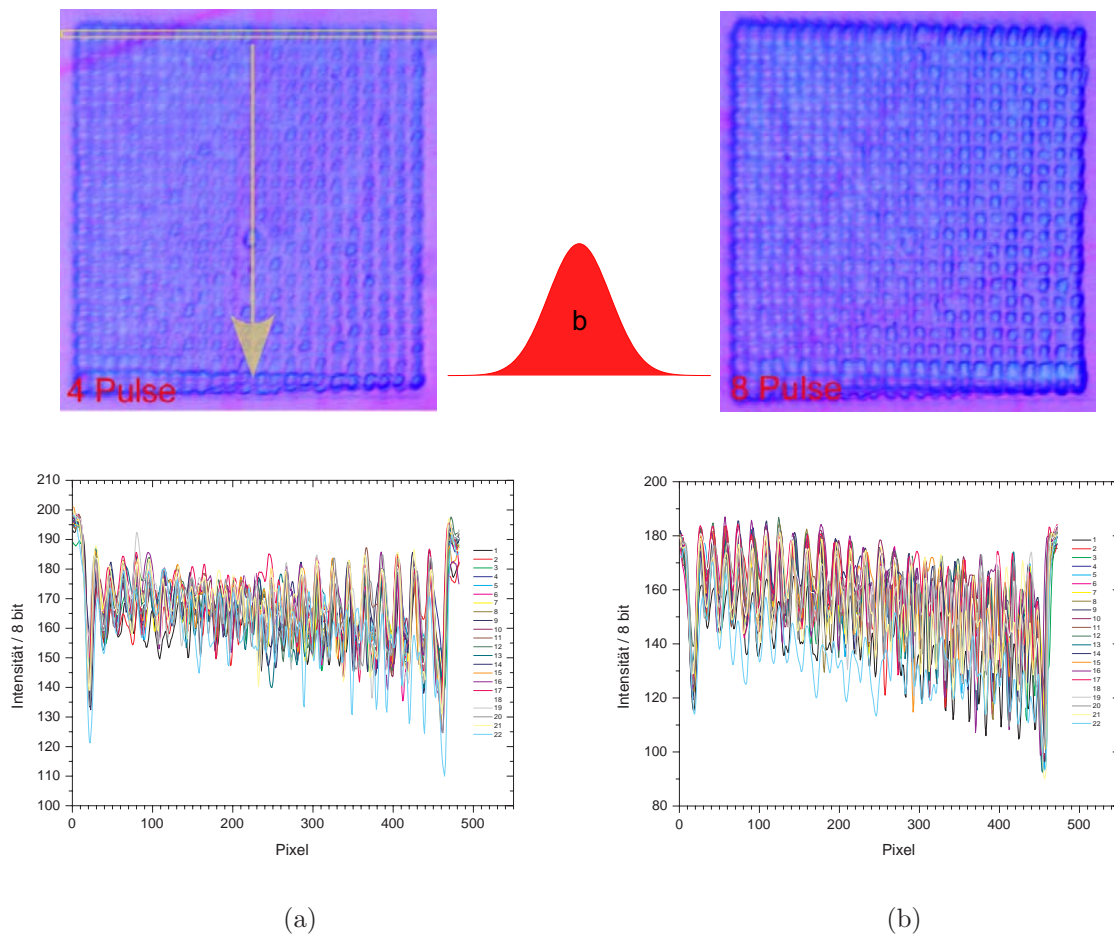
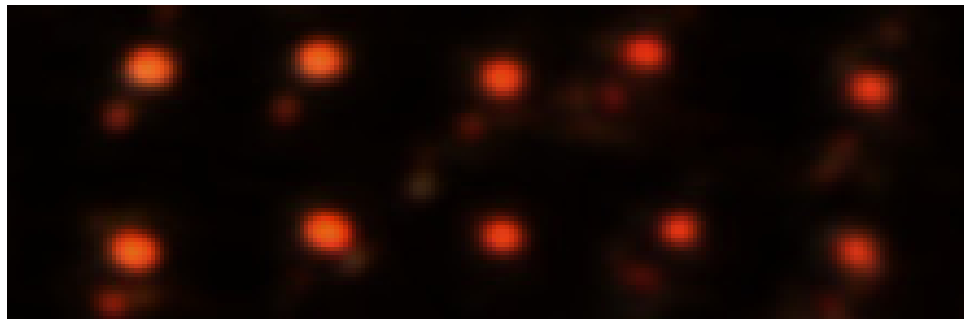


Abbildung 5.51: Ablationsprofile in blauem Farbstoff bei (links) 4 Laserpulsen pro Meßstelle und (rechts) 8 Laserpulsen pro Meßstelle (Vergrößerung 100 x, Bildausschnitt links: 482 x 514 Pixel, rechts: 472 x 503 Pixel, Pixelgröße = 0.645  $\mu\text{m}$ ). Einheitliche Schrittweite von 4  $\mu\text{m}$ . Laserpulsenergie ca. 55  $\mu\text{J}$  (7 A), dynamische Abschwächerstellung: 40, statische Abschwächung: 11% ND-Filter. Die ersten drei Reihen, ausgehend von der unteren Bildseite, sind teilweise überlagert.

Die Dicke einer dünn aufgetragenen absorbierenden Farbstoffschicht (roter, blauer Farbstoff) beträgt in etwa zwischen  $0.2 \mu\text{m} < d \leq 0.7 \mu\text{m}$ . Die Dicke einer einfachen Sprühpräparation mit  $20 \mu\text{l}$  Präparationsvolumen ( $30 \text{ mg/ml}$  2,5-DHB) beträgt im Mittel ca.  $0.3 \mu\text{m} - 0.5 \mu\text{m}$ .

Besonders im Zusammenhang mit MALDI-Imaging Experimenten ist die kleinste laterale Ausdehnung einer Ablations- und Desorptionsfläche in einem realen Messaufbau zu ermitteln, bei dem in den erhaltenen Massenspektren das jeweilige Analyt ionensignal noch ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweist. In den Abbildungen 5.52, 5.53 und 5.54 werden Messungen dargestellt, die jeweils den geringsten lateralen Abtrag an Probenmaterial zeigen, der für ein hinreichendes Ionensignal (roter Farbstoff und 2,5-DHB-MALDI-Matrix) bei Infokusmessungen mit zentrisch justiertem Laserstrahl am Spektrometer LAMMA 2000 notwendig ist.

Ablationskrater in Farbstoff (Burn pattern)



Horizontal

Vertikal

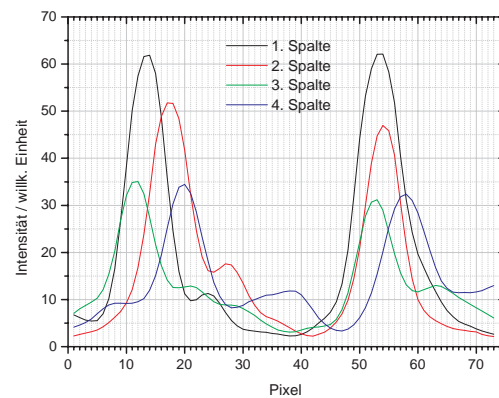
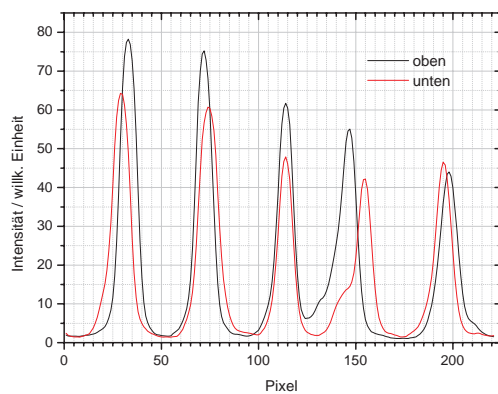


Abbildung 5.52: Dunkelfeldaufnahme der Einzelpulsablationskrater (Burn-pattern) in rotem Farbstoff. Bildausschnitt:  $14.25 \mu\text{m} \times 4.71 \mu\text{m}$ , Pixelkantenlänge =  $0.0645 \mu\text{m}$ . FWHM  $\approx 10$  Pixel  $\equiv 0.65 \mu\text{m}$ . Die Methode der gemittelten Linienscans berücksichtigt auch schwache Randintensitäten von Oberflächenartefakten und stellt die Halbwertsbreiten deshalb eher zu groß dar. Zentrisch justierter Laserstrahl und Infokuslage des Proben targets während der Messungen. Laserenergie  $\approx 55 \mu\text{J}$ . Statische Abschwächung durch einen 11 % Neutraldichtefilter und dynamische Abschwächung bei einer Schrittmotorstellung von 40.

Der kleinste Ablationsdurchmesser in absorbierendem Filzstiftfarbstoff beträgt in etwa  $0.6 \mu\text{m}$  bis  $0.7 \mu\text{m}$ . Der kleinste erkennbare Ablationsdurchmesser an einer 2,5-DHB-Matrixsprühpräparation beträgt in etwa  $1.2 \mu\text{m}$ . Die FWHM-Durchmesser dieser Ablationsprofile liegen, aufgrund der gaussförmigen Pulscharakteristik, dementsprechend niedriger. Unmittelbar an der SNR-Grenze, die der Schwellbestrah-



## Ablationskrater in Matrix

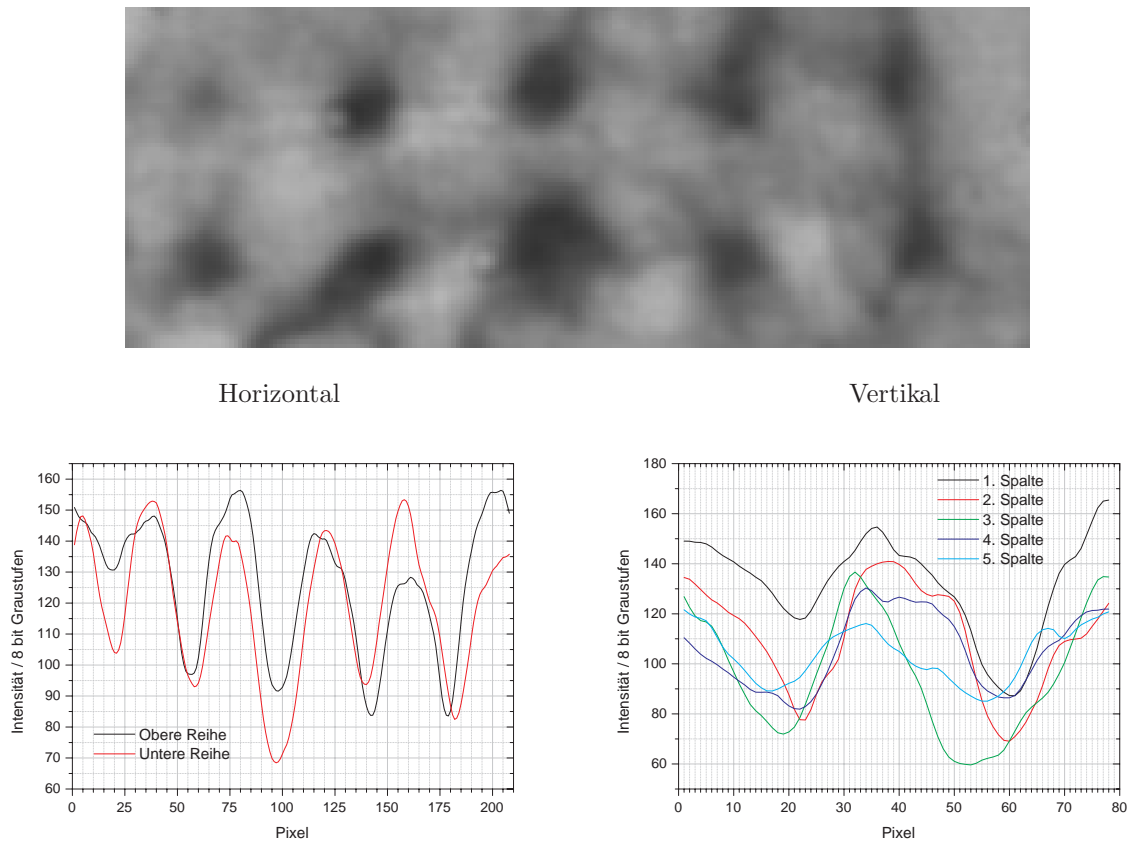


Abbildung 5.53: Bildausschnitt:  $13.42 \mu\text{m} \times 5.03 \mu\text{m}$ , Pixelkantenlänge =  $0.0645 \mu\text{m}$ . FWHM  $\approx 18$  Pixel  $\equiv 1.2 \mu\text{m}$ . Die Methode der gemittelten Linienscans berücksichtigt auch schwache Randintensitäten von Oberflächenartefakten und stellt deshalb die Halbwertsbreiten eher zu groß dar. Hellfeldauflichtbild (in Graustufen) der Einzelpulsablationskrater (Burn-pattern) in 2,5-DHB-Matrix. Matrixauftrag durch Spraypräparation ( $2 \times 20 \mu\text{l}$  ca.  $25 \text{ mg/ml}$  2,5-DHB in EtOH/H<sub>2</sub>O, 1:1, v/v). Zentrisch justierter Laserstrahl, Infokulage des Proben targets. Laserpulsenergie  $\approx 55 \mu\text{J}$  (vor Abschwächung), statische Abschwächung durch 11 % Neutralfilter, dynamische Abschwächung bei Schrittmotorstellung 40.

lung der Matrix 2,5-DHB entspricht ( $\text{SNR} \approx 2$ ), können lichtmikroskopisch keine Ablationsprofile mehr an den Sprühpräparationen festgestellt werden. Da keine elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Proben vorliegen, kann nur abgeschätzt werden, daß der Desorptionsdurchmesser bei Pulsen an der Schwellbestrahlung, deutlich unter den hier ermittelten Ablations-Werten liegt. Die Ablations-/Desorptionstiefe sollte dann deutlich unter  $0.3 \mu\text{m}$  betragen.

Die Schwellbestrahlung des Peptidanalyten Substanz P ( $c \approx 10^{-4} \text{M}$ ) in der Matrix 2,5-DHB beträgt mit zentrisch justiertem Laser und Infokulmessungen in etwa  $2062 \text{ J/m}^2$  [53]. Die Schwellbestrahlung des roten Filzstiftfarbstoffes liegt etwas niedriger, sie übertrifft aber noch die Schwellbestrahlung der Matrix 2,5-DHB. Die in den Abbildungen 5.52 - 5.54 vorgenommenen Ablationsmessungen an Matrix- und Farbstoffpräparationen sind mit identischer Pulsbestrahlung durchgeführt worden. Die Annahme, daß der tatsächliche Desorptionsdurchmesser an der Schwellbestrahlungsgrenze (der Peptid-Analyte in der Matrix 2,5-DHB) sich dem Durchmesser der deutlichen Farbstoffablation in Abbildung 5.52 nähert, ist insgesamt sehr wahrscheinlich. Die bei den Versuchsbedingungen ermittelte durchschnittliche Ablationstiefe bei Einzelpulsmessungen an 2,5-DHB-Sprühpräparationen beträgt in etwa zwischen  $0.2 \mu\text{m}$  und  $0.3 \mu\text{m}$ .

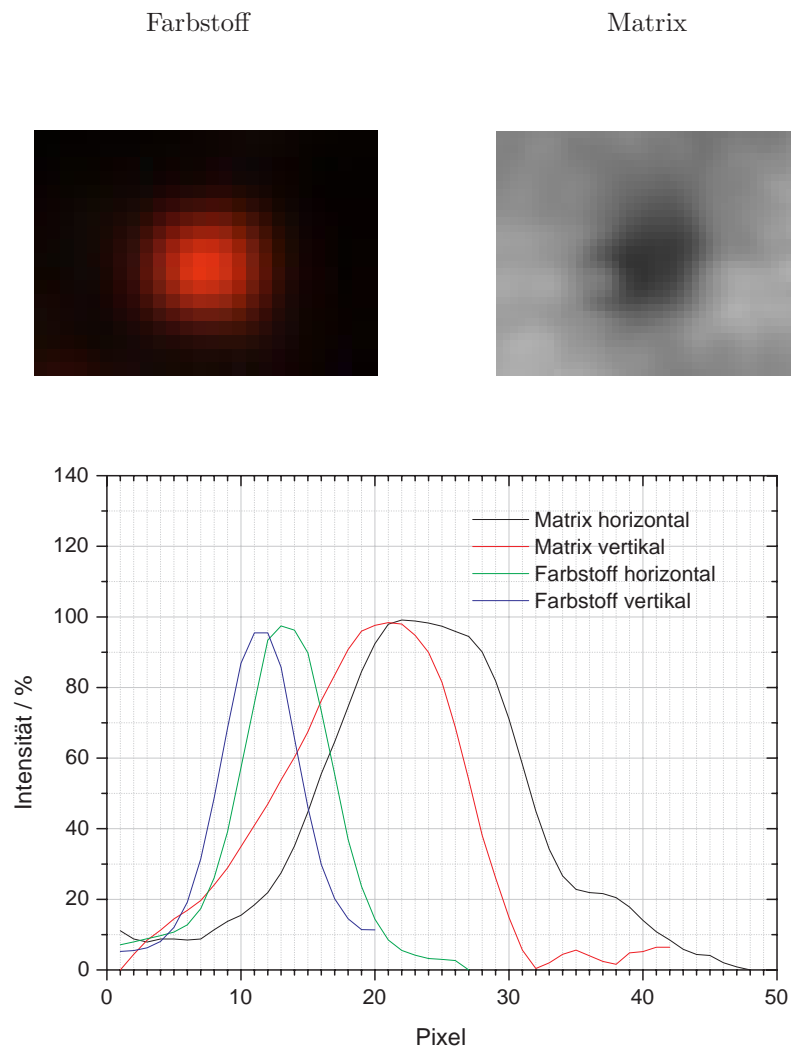
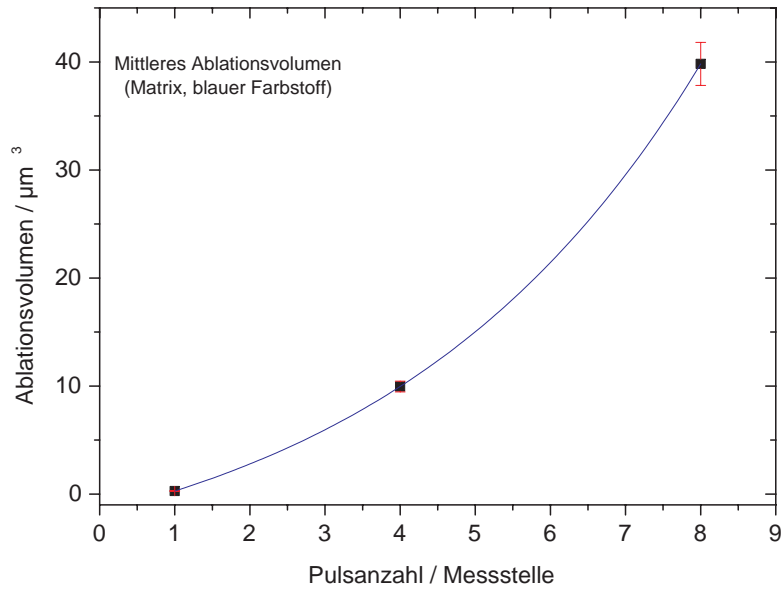
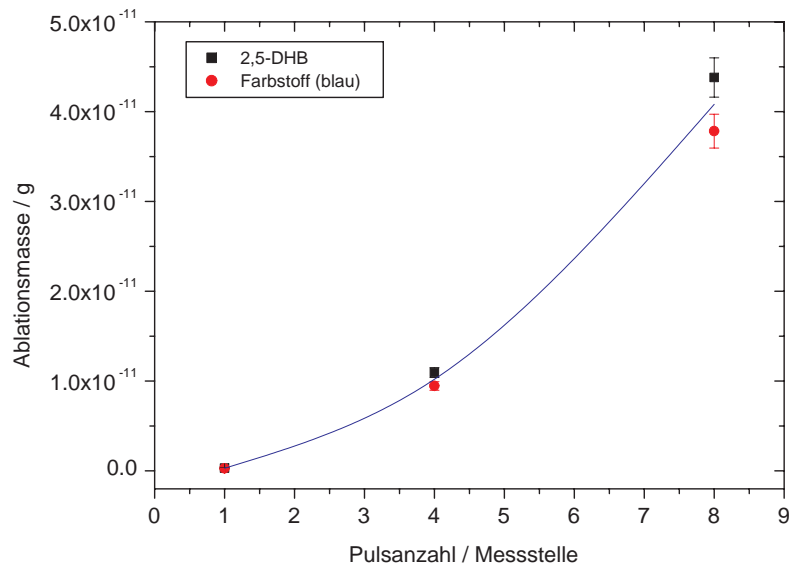


Abbildung 5.54: Pixelkantenlänge =  $0.0645 \mu\text{m}$ . Burn-Pattern roter Farbstoff,  $\text{FWHM} \approx 7 \text{ Pixel} \equiv 0.45 \mu\text{m}$ . Burn-Pattern 2,5-DHB Matrix,  $\text{FWHM} \approx 16 \text{ Pixel} \equiv 1 \mu\text{m}$ . Zentrisch justierter Laser, Infokuslage des Proben targets. Laserenergie  $\approx 55 \mu\text{J}$ , Abschwächung durch 11 % Neutralfilter und dynamischen Abschwächer bei Schrittmotorstellung 40.

Bei Mehrpulsmessungen und Messungen mit höherer Bestrahlung wird ein näherungsweise gaussförmiger Ablationskrater ausgebildet. Die Ablationstiefe an absorbierenden Farbstoffschichten (Rhodamin 6 G, Basic Blue 7) ist in etwa identisch. An dünnen Farbstoffpräparationen werden nach Einzelpulsdesorption mit niedriger Bestrahlung gelegentlich Beugungs- bzw. spektrale Brechungsmuster beobachtet, die auf eine verbleibende Schichtdicke schließen lassen. Da mit zunehmender Schichtdicke mehrere Reflexionsmaxima auftreten, verschiebt sich das reflektierte (Licht)Spektrum zum Rand der Desorptionsfläche bei dickeren Präparationen i.d.R. in den längerwelligen Bereich, wenn die Brechung überwiegt.



(a)



(b)

Abbildung 5.55: (a) Infokusablationsvolumen bei Messungen mit dem Spektrometer LAMMA 2000. (b) Infokusablationsmasse an Matrix (2,5-DHB) und absorbierenden Farbstoffproben (blauer Filzstiftfarbstoff).

### Infokusmessungen mit exzentrischer Strahljustierung

In Abbildung 5.56 sind Ablationsprofile in Filzstiftfarbstoff zu erkennen, die dann erhalten werden, wenn der Laserstrahl den durchbohrten 45°-Spiegel am hinteren Ende der Ionenquelle des Spektrometers LAM-MA 2000 hauptsächlich in den Quadranten I und IV oder II und III trifft (rechte Spalte). Wird der Laser dagegen so justiert, daß der Strahlquerschnitt den Spiegel hauptsächlich in den Quadranten I oder II bzw. III oder IV trifft, ergeben sich Ablationsprofile mit einem Umriss, die denen der linken Abbildungsspalte entspricht. Die Ablationsprofile in den dargestellten Beispielen ergeben, bezogen auf die kleinste erhaltene Infokusablationsfläche mit exzentrischer Justierung (links oben) für den Rayleighbereich Schwankungen mit Faktoren zwischen 3.5 bis 4.3. Das dargestellte Ablationsprofil außerhalb des Rayleighbereiches ist, bezogen auf die kleinste erhaltene Ablationsfläche im Rayleighbereich, um einen Faktor von ca. 17.5 größer. Neben den dargestellten Infokusablatinsprofilen werden auch Profile mit deutlich erkennbaren Aberrationsmustern sichtbar, wie z.B. Koma und sphärische Aberration (an dieser Stelle nicht explizit gezeigt, siehe S. 131).

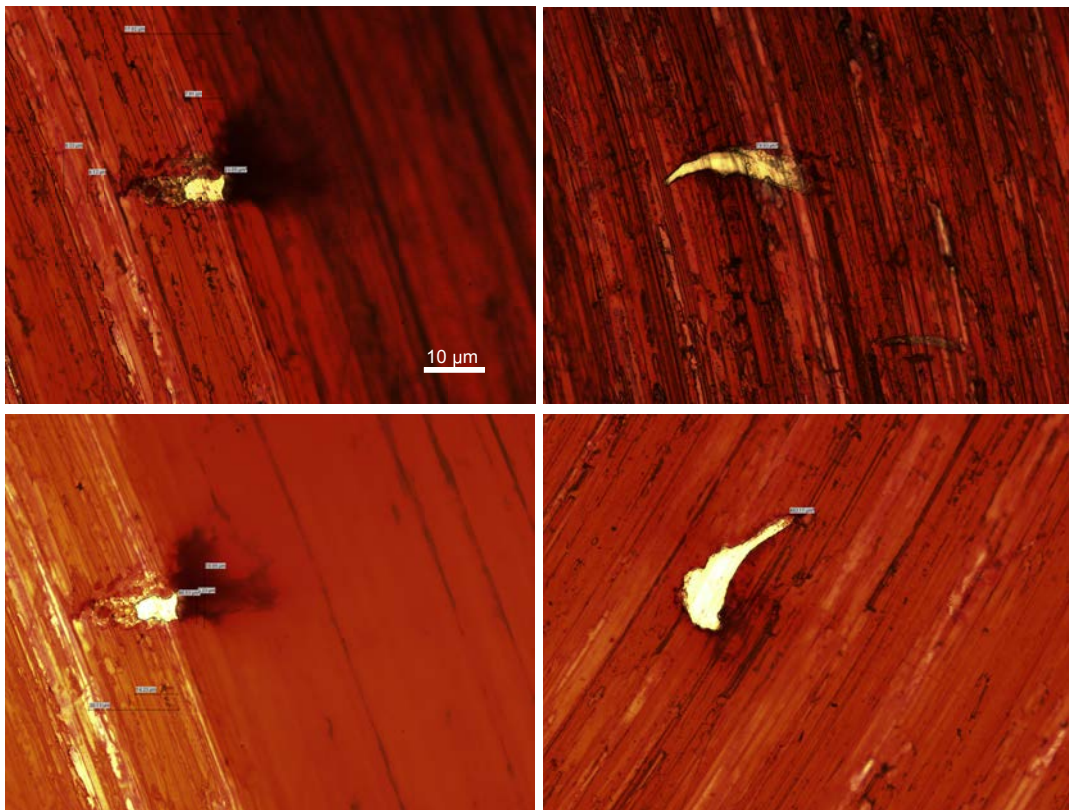


Abbildung 5.56: Ablationsprofile in rotem Filzstiftfarbstoff mit (wechselnder) exzentrischer Laserstrahljustierung. Die Querschnittsflächen variieren innerhalb des Rayleighbereiches von ca.  $23 \mu\text{m}^2$  (oben links), ca.  $80 \mu\text{m}^2$  (oben rechts) bis ca.  $99 \mu\text{m}^2$  (unten links). Wenige Mikrometer außerhalb des Rayleighbereiches (ca. 10 - 15  $\mu\text{m}$  Defokus) beträgt die Ablationsfläche bei exzentrischer Strahljustierung im Beispiel bereits ca.  $403 \mu\text{m}^2$ .

### 5.4.12 3D-Intensitätsverlauf der Laserprofile

Im folgenden werden die messtechnisch ermittelten, fokussierten Intensitätsprofile dargestellt. Diesen werden unter bestimmten Annahmen<sup>8</sup> erstellte theoretische Profile gegenübergestellt. Die Angaben über die verwendeten Linsenkombinationen findet man auf den Seiten, S. 141 ff.. Die erkennbaren Unterschiede werden eingeordnet und ihre Bedeutung wird hinsichtlich der gemachten Annahmen und der verwendeten Optiken dann diskutiert bzw. bewertet. In Abbildung 5.59 sind die Laserintensitäten beider Spektrometer in Abhängigkeit von der Stellung der Abschwächerplättchen aufgetragen, um den charakteristischen Einfluss auf den Verlauf in der jeweils vorhandenen Optik zu erkennen. Als Referenzmessung wird hier eine Messung am Spektrometer ALADIM II mit dem unfokussierten Ausgangsprofil herangezogen (markiert als „Abschwächer“).

#### LAMMA 2000

Das vermessene laterale Pulsprofil im Fokus der Ionenquelle am Spektrometer LAMMA 2000 in Abbildung 5.60 und Abbildung 5.61 zeigt vom 0. Maximum zum  $\pm 1$ . Minimum (*Peak-to-Valley*-Abstand) in vertikaler Richtung einen Abstand von im Mittel ca.  $0.55 \mu\text{m}$  und in horizontaler Richtung von im Mittel ca.  $0.75 \mu\text{m}$ . Das axiale Pulsprofil, das im Messverlauf als Gaussfunktion in Abbildung 5.62 genähert wird, besitzt mit zentrisch justiertem Laser eine FWHM-Distanz von  $\leq 15 \mu\text{m}$ . Mit exzentrisch justiertem Laser werden axiale FWHM-Distanzen  $\leq 30 \mu\text{m}$  erreicht. Bei der Vorfokussierung wird im Mittel ein Durchmesser von ca.  $10 \mu\text{m} \pm 2 \mu\text{m}$  gefunden. Hieraus ergibt sich eine maximale Pulsbestrahlung von in etwa  $E \approx 3.18 \times 10^6 \text{ J/m}^2$  ( $3.18 \mu\text{J}/\mu\text{m}^2$ ) im Vorfokus. Die errechnete Vergrößerung, bezogen auf den Fokus in der Ionenquelle, beträgt in etwa  $\beta = 0.11$ . Die rechnerisch maximale Pulsbestrahlung, ohne Berücksichtigung der Verluste an den Glas-Luft-Grenzflächen, beträgt im Fokus der Ionenquelle in etwa  $E \approx 2.58 \times 10^8 \text{ J/m}^2$  ( $258 \mu\text{J}/\mu\text{m}^2$ , Beugungsbegrenzung, Intensität im 0. Maximum). In Abbildung 5.58 (a) ist das laterale Ausgangsprofil des Lasers unmittelbar hinter dem Laserkopfausgang in ca. 30 cm Entfernung zu erkennen. Mit dem unfokussierten Ausgangsstrahl sind dann darüberhinaus Brennfleckaufnahmen auf Fotopapier aufgenommen worden. Diese sind mit unterschiedlichen Repetitionsraten erstellt.

#### ALADIM II

Das laterale Pulsprofil in der Ionenquelle am Spektrometer ALADIM II in Abbildung 5.66 (unten) lässt keine prominenten Nebenmaxima erkennen und befindet sich demnach (noch) nicht in der beugungsbegrenzt maximalen Fokussierung. Der ermittelte FWHM-Durchmesser liegt im Bereich von  $40 \mu\text{m} > d > 25 \mu\text{m}$ . Hieraus ergibt sich eine (theoretisch) maximale Bestrahlung von  $E \approx 2.39 \times 10^7 \text{ J/m}^2$  bis  $E \approx 6.11 \times 10^7 \text{ J/m}^2$ , ohne Berücksichtigung der Glas-Luft-Grenzflächenverluste. Eine nichtzentrische Justierung (Quadrant I, IV) des Strahles ermöglicht für die waagerechte Richtung (x) eine Verringerung auf unter  $10 \mu\text{m}$  ( $1/e^2$ -Durchmesser) bei gleichzeitiger Vergrößerung auf  $> 40 \mu\text{m}$  in senkrechter Richtung (Abbildung 5.67 a). Bei zentrischer Justierung wird im Idealfall ein nahezu symmetrischer lateraler  $1/e^2$ -Durchmesser von ca.  $25 \mu\text{m}$  erreicht, ohne dabei Nebenmaxima auszubilden (Abbildung 5.63 b). Eine exzentrische Justierung (Quadrant II) ist in den Abbildungen 5.67 und 5.68 gezeigt. Zusammen mit dem im Mittel erreichten Vorfokussdurchmesser von  $d \approx 118.8 \mu\text{m}$ , errechnet man eine Vergrößerung im Bereich von  $\beta = 0.34$  bzw.  $\beta = 0.21$ . Die Pulsbestrahlung im Vorfokus beträgt in etwa  $E \approx 6.8 \text{ kJ/m}^2$  ( $6.8 \text{ nJ}/\mu\text{m}^2$ ).

<sup>8</sup>Die freigemachten Daten des jeweils verwendeten Objektivs bzw. des kombinierten Linsensystems wird hierzu mittels der Software PSF Lab [277] zur Berechnung der theoretischen Profile verwendet.

Strahlprofil und Brennflecke in Photopapier

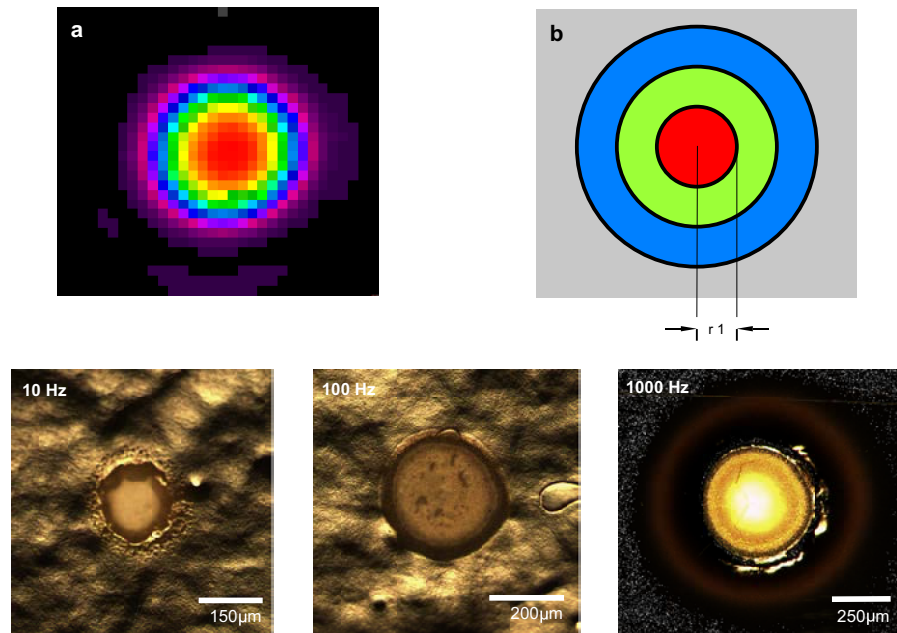


Abbildung 5.57: (a) 2D-Laserintensitätsprofil des Nd:YLF-Laser vor der Optik des Spektrometers LAMMA 2000. (b) Nach Intensitätsbereichen in Klassen aufgeteiltes Profil. (Unten) Brennflecke (*Burn pattern*) auf Photopapier, AGFA-GEVAERT Brovira. Verwendung unterschiedlicher Laserrepetitionsfrequenzen (10 Hz, 100 Hz, 1000 Hz) und konstanter Betriebszeit von ca. 5 s.

Tabelle 5.21: Laserstrahl Daten in der ALADIM II-Quelle. Vermessung der Strahlteile entlang der Laserstrahlachse.  $1/e^2$ -Durchmesserkriterium,  $I_{max.} = 16257$  (14 bit,  $2^{14}$  - Noise-level). Bei der Profilaufnahme 7 und 8 in Abbildung 5.64 markiert die Peakfindung der LBA-Programmroutine in der x-Richtung relativ intensive Randbereiche. Auffallend ist die Intensitätsspitze neben 4, auch in 6. Dies zeigt, daß je nach Justierung des Lasers entlang der z-Achse mehrere Positionen erreicht werden können, die einen Bereich mit maximaler Energiedichte enthalten (bei identischer Pulsleistung).

Nr	$\varnothing_x$	$\sigma_x$	$\varnothing_y$	$\sigma_y$	$I_{Peak}$
0.	55.19	$\pm 5.08 \mu m$	27.70	$\pm 3.26 \mu m$	8403
1.	54.18	$\pm 5.45 \mu m$	46.38	$\pm 4.37 \mu m$	11350
2.	40.52	$\pm 2.23 \mu m$	51.16	$\pm 1.70 \mu m$	15610
3.	51.35	$\pm 2.32 \mu m$	40.83	$\pm 4.69 \mu m$	16060
4.	42.17	$\pm 2.12 \mu m$	49.36	$\pm 2.44 \mu m$	16130
5.	30.78	$\pm 1.26 \mu m$	55.19	$\pm 6.59 \mu m$	15830
6.	16.53	$\pm 2.93 \mu m$	60.38	$\pm 3.41 \mu m$	16130
7.	3.02	$\pm 1.63 \mu m$	45.75	$\pm 3.03 \mu m$	16000
8.	4.16	$\pm 2.20 \mu m$	40.71	$\pm 3.72 \mu m$	13660
9.	11.99	$\pm 1.84 \mu m$	41.43	$\pm 5.63 \mu m$	8814

Digitale Daten aus der LBA-Messung.

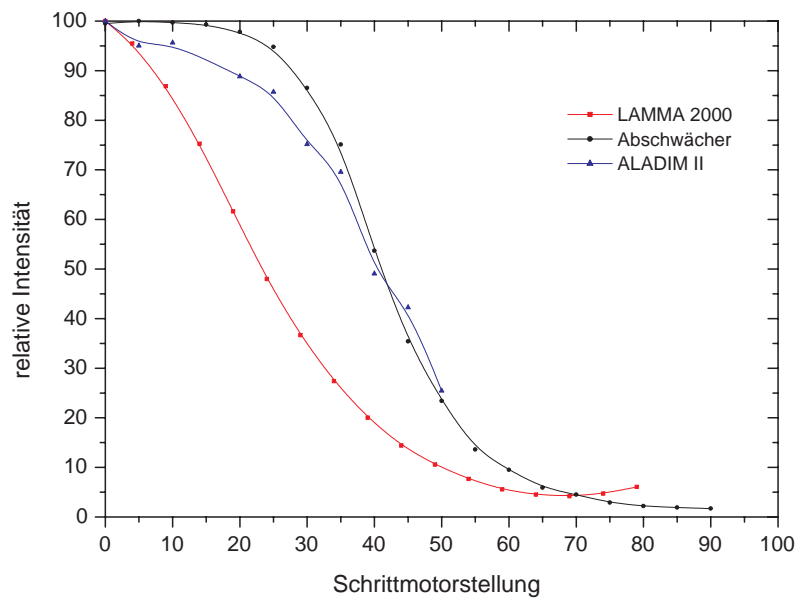


Abbildung 5.58: Laserintensität nach Abschwächung im Probenraum der Spektrometer. Abschwächung am unfokussierten Ausgangsprofil des N<sub>2</sub>-Laser am Spektrometer ALADIM II als Referenzmessung („Abschwächer“). Im Strahlengang des Spektrometers LAMMA 2000 sind neben dem dynamischen Abschwächer auch statische Abschwächer (Neutralsdichte-Filter) im Aufbau enthalten.



Strahltaile, Intensitätsmaximum und Energiedichteverteilung im Fokus

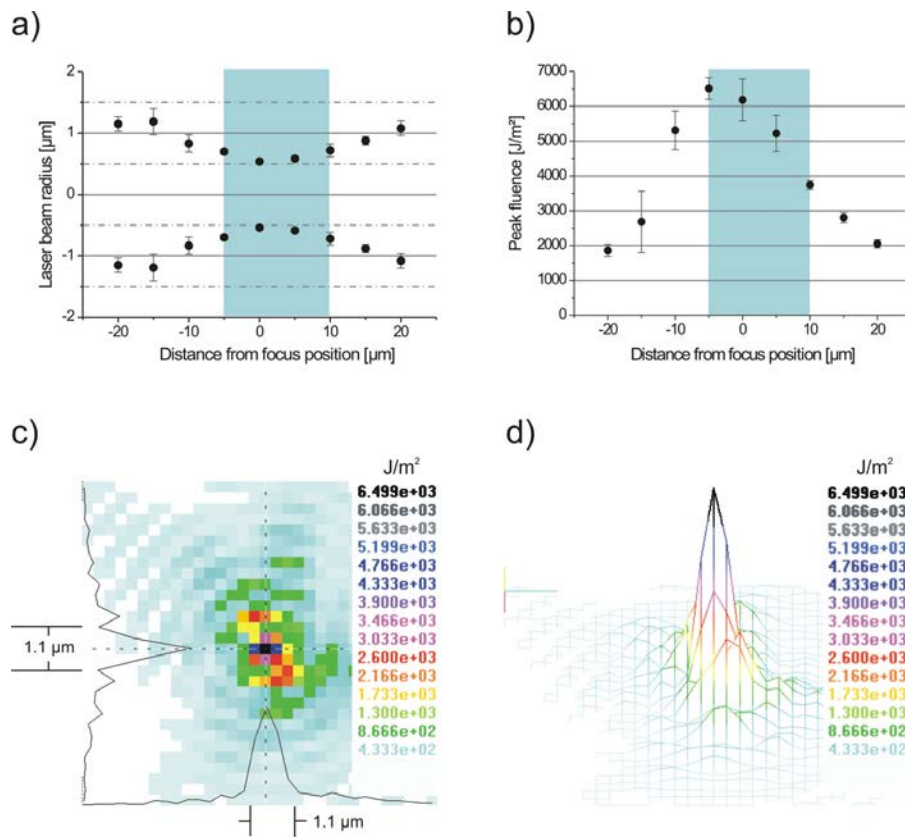
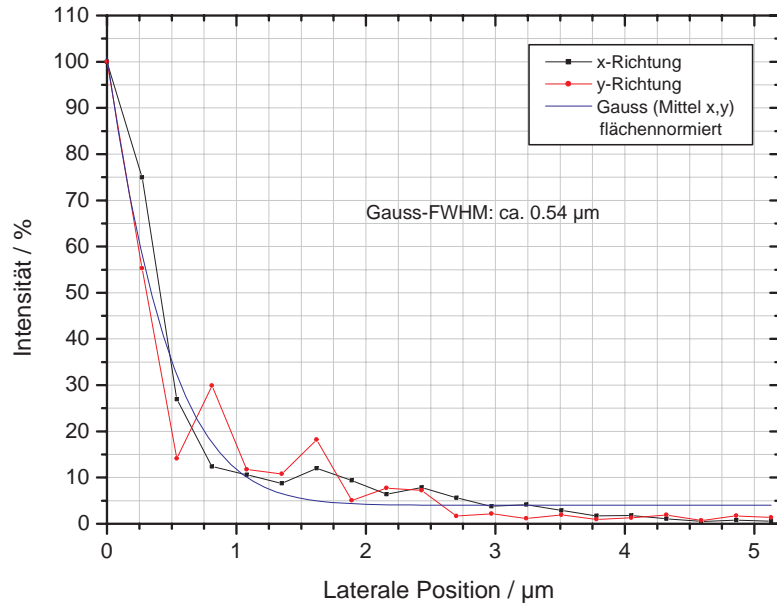
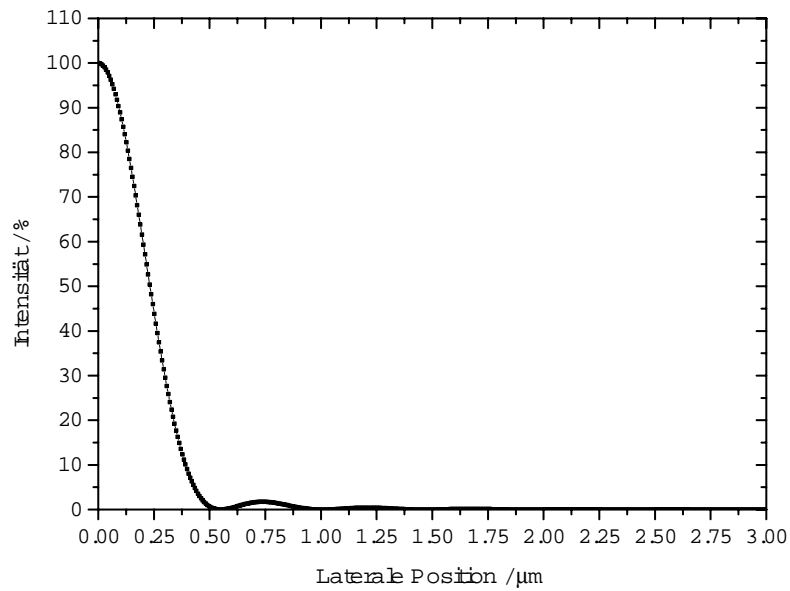


Abbildung 5.59: (a) Strahltaillenverlauf des Nd:YLF-Laser am Spektrometer LAMMA 2000. (b) Intensitätsmaximum im Strahltaillenverlauf. (c) 2D-Intensitätsverteilung im ermittelten Fokus und Linescan. (d) Energiedichteverteilung als 3D-Plot. Vergrößerung des ursprünglichen Laserfokus mit einem Ultrafluar 100x 1.25 Glyc 160/0.35 Qu Mikroskopobjektiv (Zeiss). Pixelgröße der erzeugten Abbildung ca.  $3.5 \cdot 10^{-1} \mu\text{m}$ . Abbildung entnommen aus [53].

Halbseitiges laterales Pulsprofil



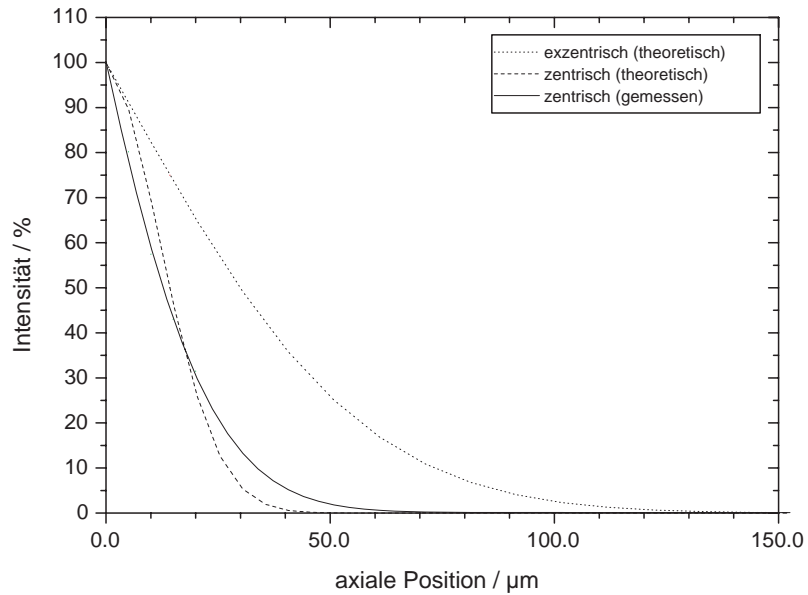
(a)



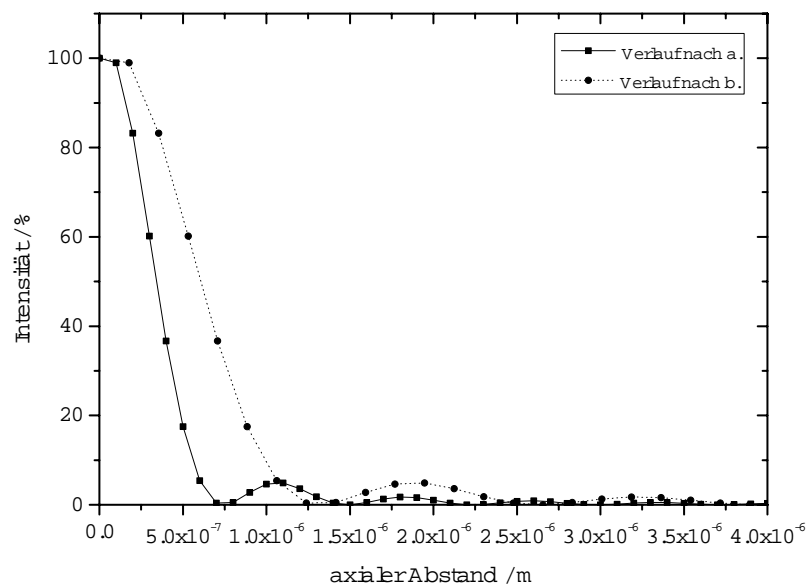
(b)

Abbildung 5.60: (a) Intensitätsprofil im Laserfokus am Spektrometer LAMMA 2000 und (b) Airy-Profil ohne Aberrationen bei Beugungsbegrenzung, bezogen auf die LAMMA 2000-y-Werte.

Halbseitiges axiales Pulsprofil



(a)



(b)

Abbildung 5.61: (a) Axialer Intensitätsverlauf des Laserprofils am Spektrometer LAMMA 2000 bei zentrischer Justierung (durchgezogene Linie,  $FWHM < 15 \mu m$ ,  $0.8 I_{max} \leq 5 \mu m$ ) und bei exzentrischer Justierung (gestrichelte Linie,  $FWHM < 30 \mu m$ ,  $0.8 I_{max} \leq 13 \mu m$ ). Näherung als Gaussfunktionen. (b) Idealer axialer Intensitätsverlauf als Isophotenschnitt ( $x,y=0$ , Linsen ohne Zentralabschattung; a., b.: Gleichungen siehe Anhang. Die berechnete ideale DOF für die Wellenlänge 349 nm ergibt rund 908 nm. Der rechnerische Abstand 0.Maximum zu 1.Minimum beträgt  $\approx 1.6 \mu m$ .

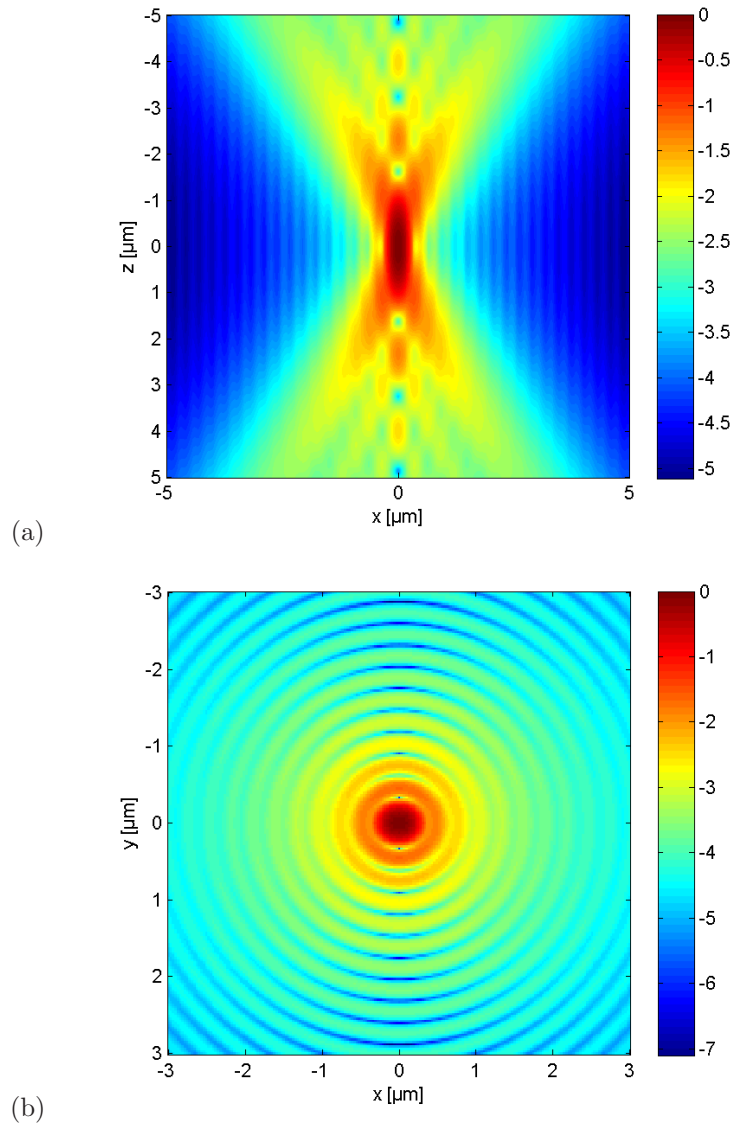
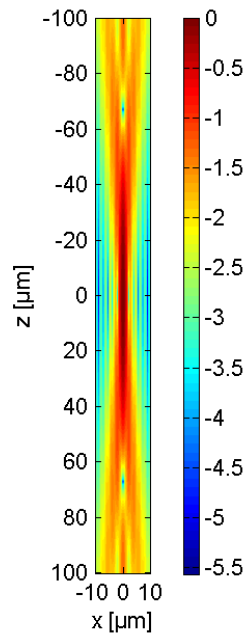
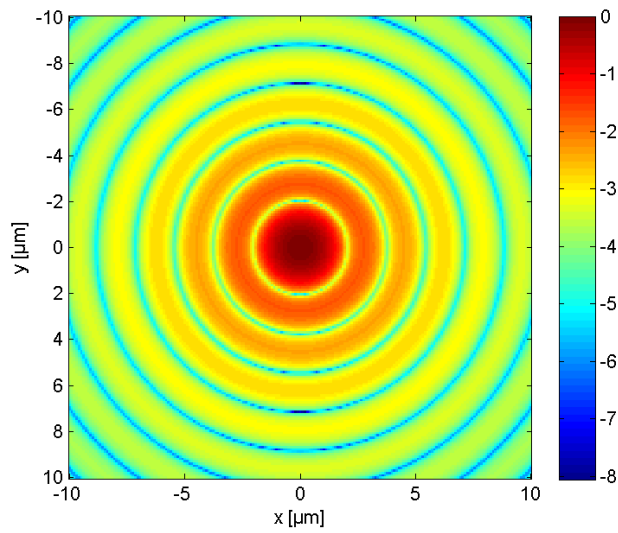


Abbildung 5.62: (a) zx-Projektion der theoretischen 3D-iPSF ( $y=0$ ) des Nd:YLF-Laser am Spektrometer LAMMA 2000. (b) xy-Projektion der theoretischen 3D-iPSF ( $x=0$ ). Berechnet mit dem Programm PSF Lab [277]. Zur Verdeutlichung der Feinstruktur ist eine logarithmische Intensitätsskalierung gewählt.



(a)



(b)

Abbildung 5.63: (a) zx-Projektion der theoretischen 3D-iPSF ( $y=0$ ) des N<sub>2</sub>-Lasers am Spektrometer ALADIM II. (b) xy-Projektion der theoretischen 3D-iPSF ( $x=0$ ). Berechnet mit dem Programm PSF Lab [277]. Zur Verdeutlichung der Feinstruktur ist eine logarithmische Intensitätsskalierung gewählt.

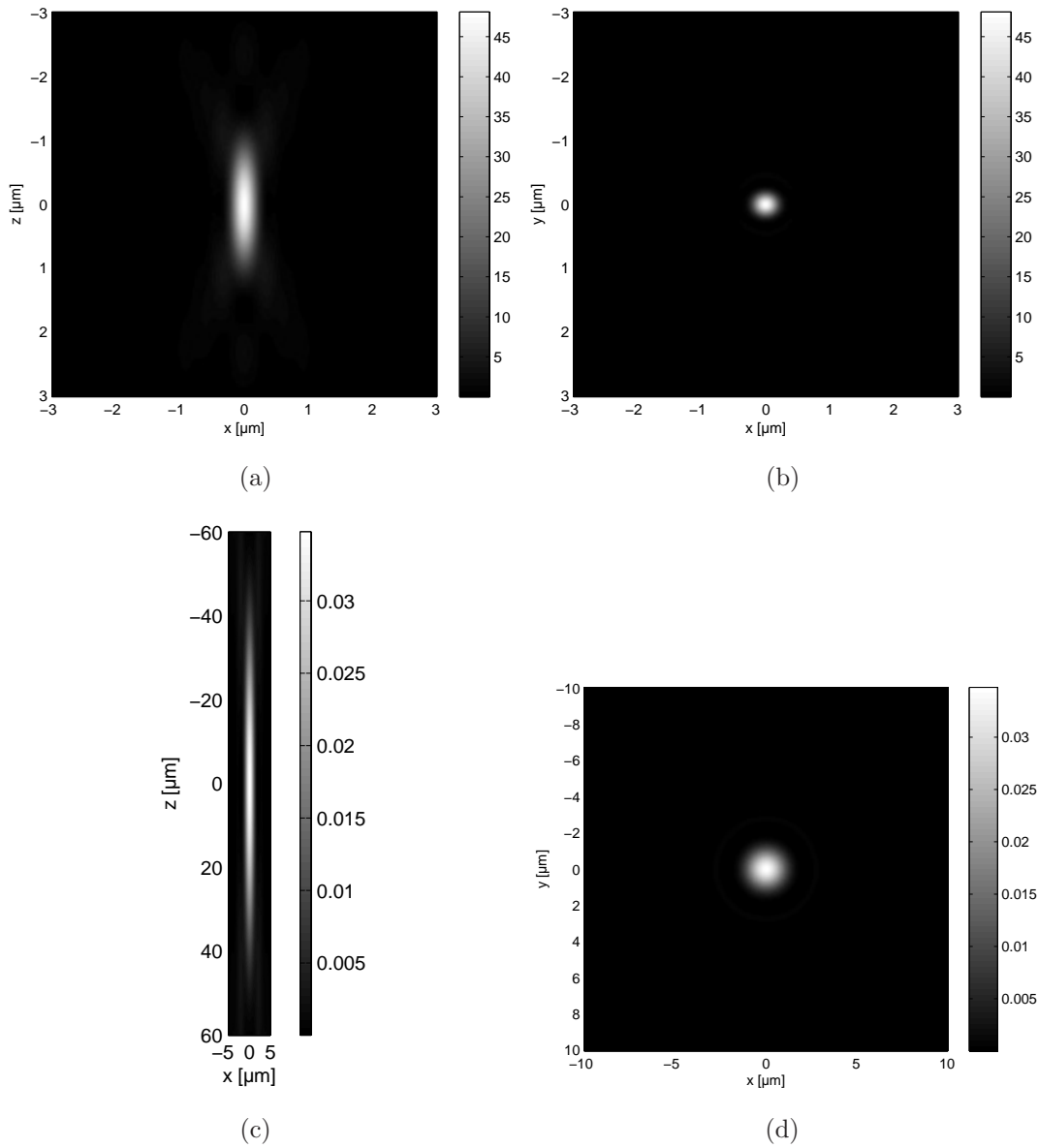
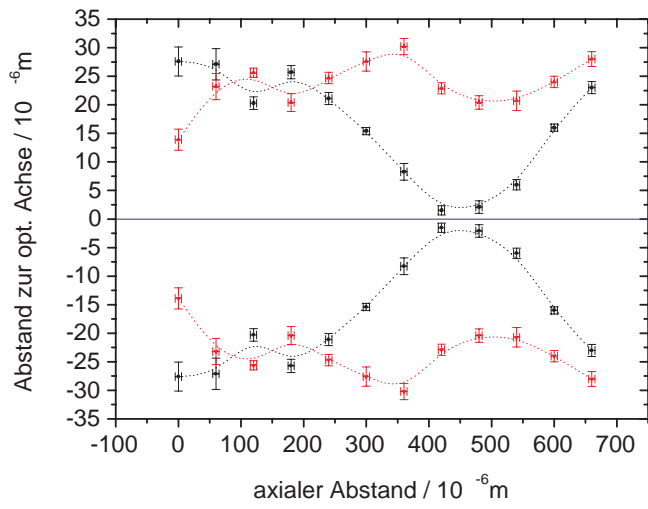
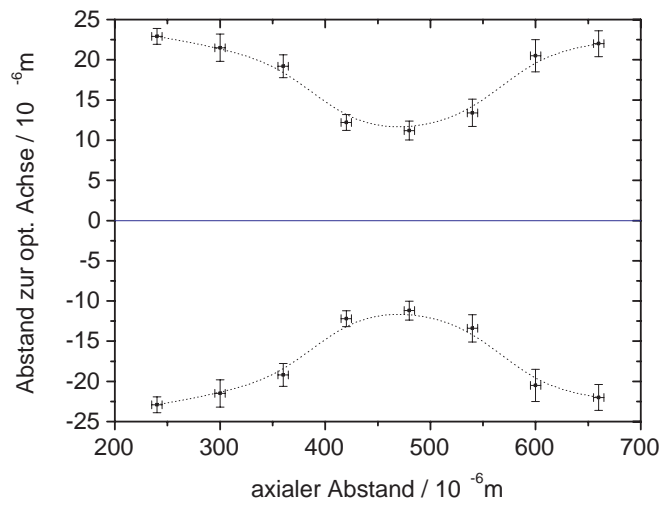


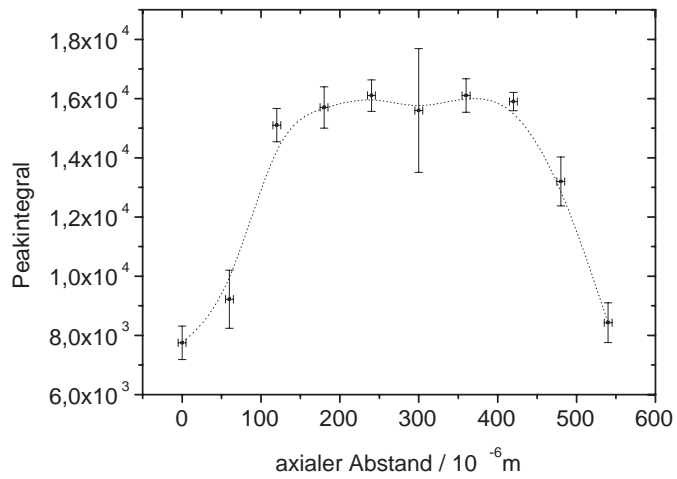
Abbildung 5.64: (a) Ausschnitt der  $zx$ -Projektion aus Abbildung 5.60. (b) Ausschnitt der  $xy$ -Projektion aus Abbildung 5.60. (c) Ausschnitt der  $zx$ -Projektion aus Abbildung 5.61. (d) Ausschnitt der  $xy$ -Projektion aus Abbildung 5.61. Berechnet mit dem Programm PSF Lab [277]. Lineare Intensitätsskalierung.



(a)



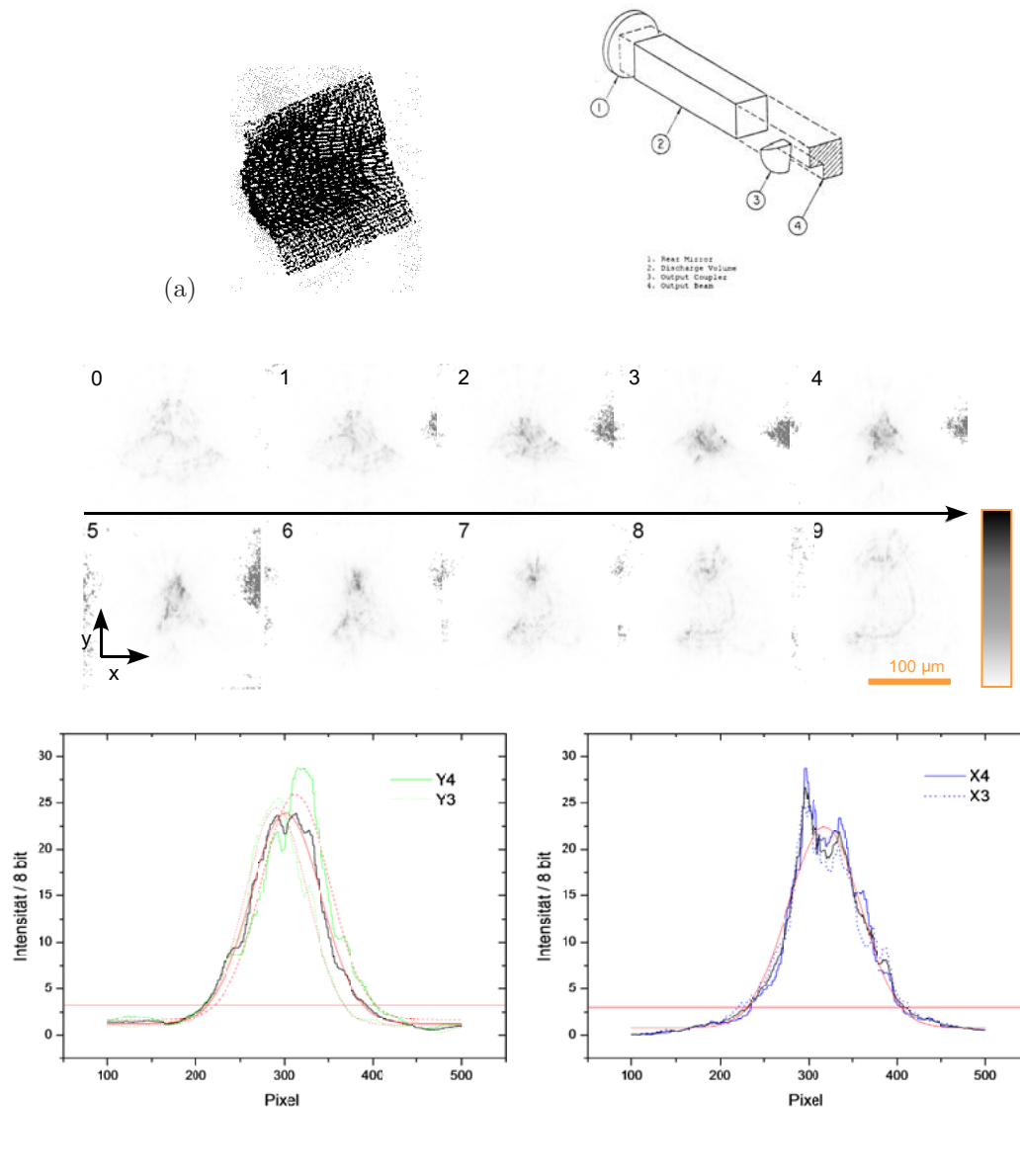
(b)



(c)

Abbildung 5.65: (a) Verlauf der Strahlteile des N<sub>2</sub>-Laser am ALADIM II. Justierung mit extremer Differenz der x,y-Werte. (b) Zentrische Strahljustierung. (c) Peakintensität bei zentrischer Justierung, aufgetragen gegen den z-axialen Abstand.





(b)

Abbildung 5.66: (Oben links) Ausgangsprofil nach Herstellerangaben, (rechts) Schema der Strahluskopplung (Herstellerangaben). (Mitte) Plot der TEM-Laserprofilintensitäten entlang der Strahlusbreitung in der ALADIM II Quelle, nach Vorfokussierung und Fokussierung des Lasers. Die Abbildungen 0 bis 9 entsprechen 32-fachen Vergrößerungen des realen Laserprofils (0 = Position nahe der Blende). Gemittelte Daten aus je 50 Einzelmessungen. Bildfeldabmessungen:  $218.4 \mu\text{m}$  ( $x$ )  $\times$   $204.7 \mu\text{m}$  ( $y$ ). Der axiale Abstand ( $\Delta z$ ) zwischen zwei Abbildungen entspricht  $60 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$ . (Unten) Die Strahltaille befindet sich zwischen den Abbildungen 3 und 4. Die Schrittweite der mechanischen  $z$ -Achsen-Verstellung des Probenmanipulators entspricht ca.  $50 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$ . Die durchgezogenen roten Linien markieren die  $1/e^2$ -Intensität des angepassten Gaussprofils aus den gemittelten Werten für jede Raumrichtung, aus den beiden Abbildungen 3 und 4. Die Abbildungsdarstellung entspricht einer 8 Bit-Darstellung bzw. 1 Byte/Pixel. Die ursprüngliche Digitalisierung der analogen Daten des CCD-Kamera Chips mittels Frame-Grabber-Karte beträgt 14 Bit bzw. 1.75 Byte/Pixel. FWHM-Durchmesser ( $x$ ) ca.  $40 \mu\text{m}$ , ( $y$ ) ca.  $35 \mu\text{m}$ .

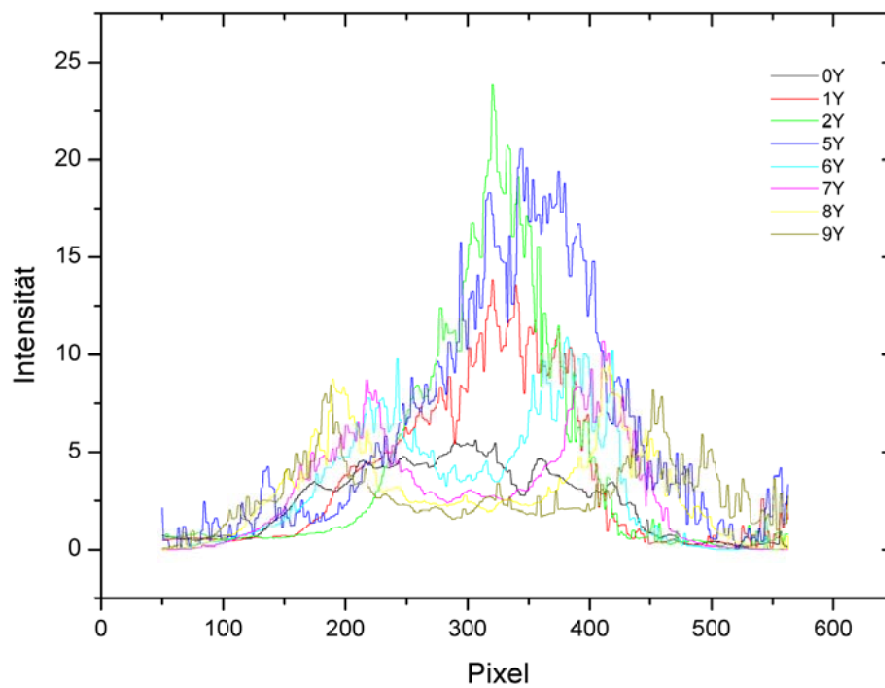
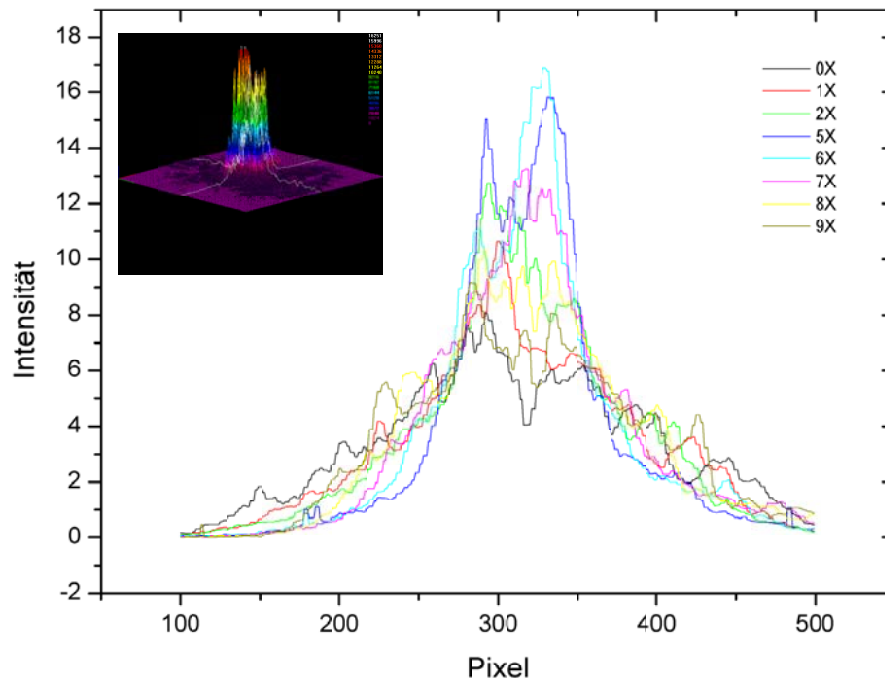


Abbildung 5.67: Plots der gemittelten TEM-Laserprofilintensitäten für jede Richtung der Ebene. Nummerierung 0 bis 2 und 5 bis 9, für jede Richtung getrennt. Justierung mit extremer Abweichung der Strahlausdehnung. Pixelgröße ca.  $3.5 \cdot 10^{-1} \mu\text{m}$ .

### 5.4.13 Angewandte Messmethodiken

In den prinzipiell feststehenden Ablauf einer Messung müssen probenspezifisch angepasste Parameterkombinationen eingebunden werden.

In Abbildung 5.68 wird zunächst schematisch die Aufnahme­routine einer bildgebenden MS-Messung, unter Berücksichtigung gegebener Mess- und Probenraster, dargestellt. Hierbei wird davon ausgegangen, daß die Analytverteilung in der Probe ein Objektgitter ausbildet, dessen Knotenpunkte durch die lateralen Häufungsschwerpunkte der Analyte gekennzeichnet werden. Die Verbindungslinien, d.h. die jeweils kürzesten Abstände zwischen benachbarten Knoten in einem rechtwinkligen Netz, können für jeden Analyten unterschiedlich ausfallen. Das Intensitätsprofil des Laserquerschnitts an einer Desorptionsstelle bildet während einer rasternden Messung die Knotenpunkte des Messgitters. Diese können als Schwerpunkte der Laserenergie­dichte interpretiert werden. In Analogie zu lichtoptischen Betrachtungen werden dann Kombinationen aus überlagerten Objekt- und Messnetzen auftreten, die letztlich ein Ionenintensitätsverteilungsbild entstehen lassen, das im Idealfall sehr nah an das tatsächliche Verteilungsprofil eines oder mehrerer Analyte in einer Probe heranreicht. Bei einer ungünstigen Überlagerung ist mit einer Verzerrung der ursprünglichen Verteilung zu rechnen, so, wie dies auch von licht- oder elektronenoptisch rasternden Methoden bekannt ist. Da an den verwendeten Spektrometern der laterale Abstand zwischen benachbarten Messstellen (Schrittweite und Linienabstand) verändert werden kann und zudem nicht nur Infokusmessungen möglich sind, ergeben sich ggf. Überlappungen. Aufgrund der Kombination von Federelementen und Piezokristallen im mechanischen Aufbau des Piezotisches am Spektrometer LAMMA 2000 können zusätzlich<sup>9</sup> Unregelmäßigkeiten bei der Positionierung der Probe auftreten. Diese führen i.d.R. an Randbereichen zu einer Überlagerung einzelner Messstellen. Diese sind schematisch in Abbildung 5.68 dargestellt.

Die Messmethodiken, auf die bereits eingegangen wurde (siehe S. 179), lassen sich übergeordnet einteilen in einerseits *Infokus-* und andererseits *Defokusmessungen*. In- wie Defokusmessungen können dabei mit wechselnder Laserintensität, wechselnden Schrittweiten bzw. Linienabständen und elektrostatischen Parametern kombiniert werden. Da das maximale absolute Messraster des Piezotisches immer auf  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$  begrenzt ist, verringert sich die Pixelanzahl, wenn eine größere Schrittweite gewählt wird. Eine Schrittweite von einem viertel Mikrometer führt zu Abbildungen von 400 Zeilen mit jeweils 400 Pixel (insgesamt 160000 Pixel) und eine Schrittweite von vier Mikrometern zu 25 Zeilen mit jeweils 25 Pixel (insgesamt 625 Pixel). Infokus- und Defokuspositionen werden durch Veränderung der axialen (*z*-) Position der Probenebene erreicht ohne das dabei die Justierung des Laserstrahles bzw. der Strahlengang beeinflusst wird.

---

<sup>9</sup>Bei Verwendung besonders starrer Elektroden zur Kontaktierung der Probe.

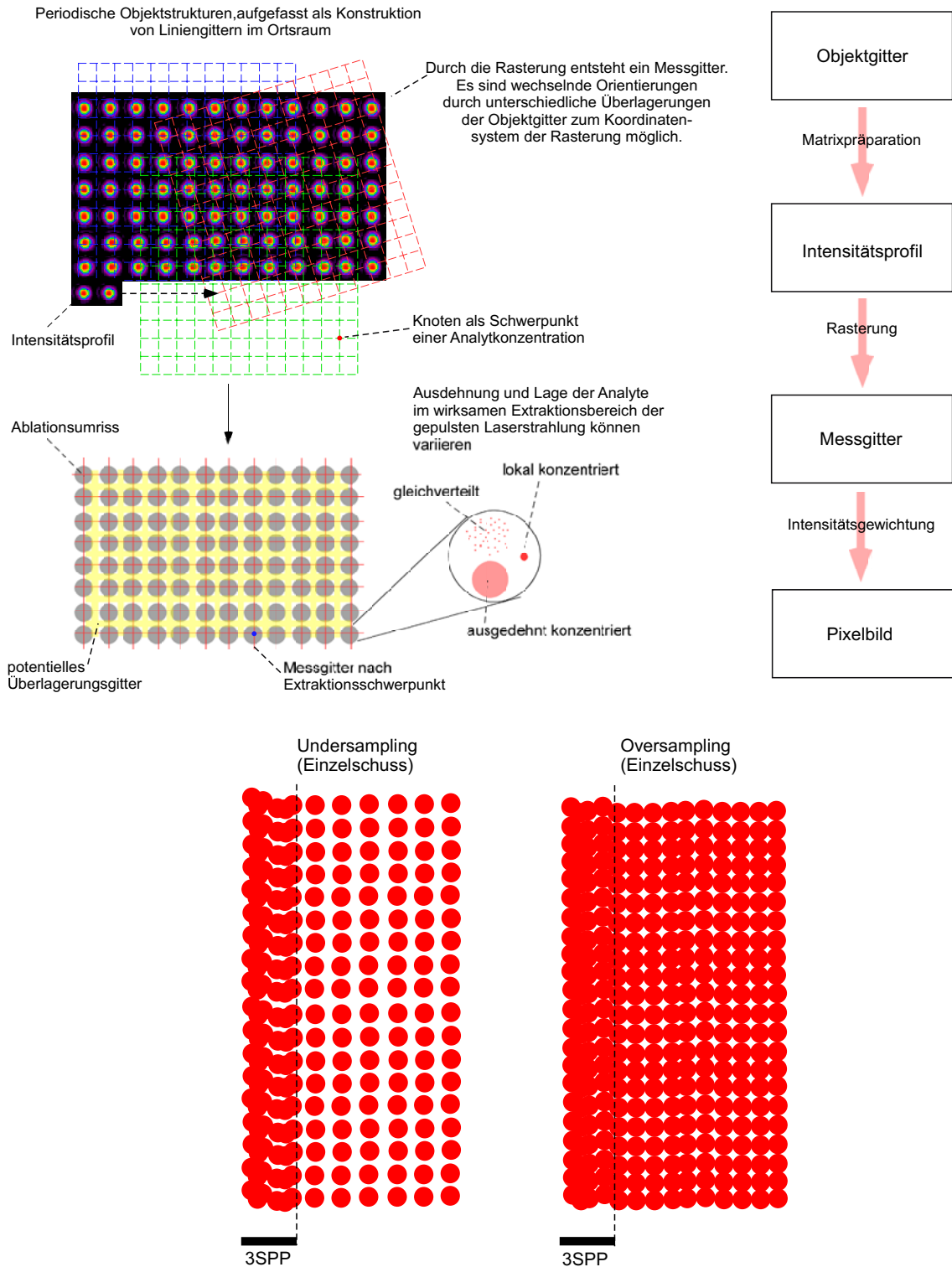


Abbildung 5.68: (Oben) Schematische Darstellung der Aufnahmeroutine, bezogen auf das Spektrometer LAMMA 2000. Die in den RGB-Farben gezeigten Gitter stellen die Schwerpunktlage entsprechender Analytverteilungen über der Rasterfläche dar (Objektgitter). Eine homogene Matrixpräparation ermöglicht eine vollständige Abdeckung der Analytstrukturen. Das Intensitätsprofil des Laserspots auf der Probenoberfläche und die Rasterschrittweite erzeugen ein Messgitter. Das Messgitter kann zu den Objektgittern verschoben sein. Innerhalb der Desorptions/Ionisierungsgrenze eines Laserprofils kann anhand der erhaltenen Signalintensitäten i.d.R. nicht zwischen Verteilungen eines Analyten unterschieden werden. Bei ungünstiger Lage des Messgitters über einem Objektgitter kann es in Abhängigkeit der tatsächlichen Verteilung des Analyten in der Ablationsfläche zu Abbildungsfehlern im Verlauf der Rasterung kommen. (Unten) Andeutung von moderaten Under- und Oversampling-Bedingungen am Spektrometer LAMMA 2000. Im linken Bereich des Messrasters kann es aufgrund der Piezotischkonstruktion (Federelemente) zu Pulsüberlagerungen und damit zu deutlichen Oversamplingbedingungen kommen (i.d.R. drei bis fünf Pulse pro Messstelle).

## Infokusmessungen

In den Abbildungen 5.69 und 5.70 sind Infokusmessungen an 2,5-DHB-Sprühpräparationen mit unterschiedlicher Laserpulsintensität zu erkennen. In Abbildung 5.69 werden zunächst Messungen betrachtet, bei denen die Pulsintensitäten zu Desorptions-/Ablationsbereichen an einer Messstelle führen, die Überlagerungen in einer rasternden Messung hervorrufen. Überlagerungen führen zu einem *Oversampling* der Probe. Zu erkennen sind die Ionensignalintensitätsverteilungen der Matrixsignale  $[M - H_2O + H]^+$  und  $[M + H]^+$  und die Verteilung des Natriumions in der Sprühpräparation bei Einzelpuls- und bei Doppelpulsmessungen. In den dargestellten Messungen treten zusätzlich im linken vertikalen Bildbereich der Ionenintensitätsverteilungsbilder Überlagerungen von Laserpulsen, aufgrund der zuvor erwähnten Positionierungsartefakte auf. Diese sind in ihrer Ausprägung deutlich an der in vertikaler Richtung erkennbaren, einbrechenden Ionensignalintensität zu erkennen. Maximal umfasst dieser Artefakt 15 Pixel, in der Regel aber nur drei bis fünf Pixel. In den lichtoptischen Aufsichtkontrollbildern der Messbereiche, die nach einer rasternden Messung erstellt wurden, erkennt man bei den Einzelpulsmessungen deutlich verbleibende Matrixreste innerhalb des Messrasters. Diese werden von scharf begrenzten Bereichen vollständiger Matrixablation an den Rändern eingefasst. An diese grenzt ebenfalls als scharfe Linie die vollständig intakte Matrixpräparation. Die im Messraster verbleibende Matrix weist eine veränderte Morphologie gegenüber einer regulären Sprühpräparation auf. Es handelt sich bei den erhaltenen Matrixresten überwiegend um sehr symmetrische „Kristallbruchstücke“ mit einem Durchmesser der deutlich unter einem Mikrometer liegt.

Trägt man das vertikal über alle Pixel im Einzelpulsmessraster gemittelte horizontale Pixelprofil in Form einer Linienintensität auf, wird deutlich, daß die Ionenintensitätsverteilung bei diesen Einstellungen, bis auf die genannten Artefakte, einen überwiegend homogenen Verlauf aufweist (Abbildung 5.69). Das gilt sowohl für die Intensität des protonierten Quasimoleküliens der Matrix 2,5-DHB, wie auch für die Intensität des protonierten Fragmentions und die Intensität des Natriumions. Betrachtet man im Vergleich die Doppelpulsmessungen, so zeigt sich hier ein anderes Bild. Die vertikal über alle Pixel gemittelten horizontalen Linienintensitäten weisen eine eher eingipflige Verteilung auf. Diese ist im Falle des Natriumions am stärksten ausgeprägt, lässt sich aber auch bei den protonierten Matrixionen noch deutlich erkennen. Das lichtoptische Kontrollbild der Messung zeigt eine nahezu vollständige Ablation im Messraster mit scharf ausgebildeten Kanten zur intakten Matrixpräparation hin. Die vereinzelt im Messraster erkennbaren Matrixreste sind im Mittel deutlich kleiner, als im Bild der Einzelpulsablation und erkennbar weniger dicht. Bildmaße Einzelpulsablation:  $68 \mu m \times 58 \mu m$ . Bildmaße Doppelpulsablation:  $71 \mu m \times 60 \mu m$ . Zwischen den Raster Routinen *regular* und *nonregular* besteht, aufgrund der Unsymmetrie der Laserstrahleinkopplung, eine Differenz in der Netto-Rasterfläche. Diese entspricht dem Verhältnis  $regular/nonregular \approx 0.982$ .

In Abbildung 5.70 sind rasternde Messungen an der identischen Matrixsprühpräparation wie in Abbildung 5.69 dargestellt, die überwiegend zu einem *Undersampling* der Probe führen. Im ersten Aufsichtkontrollbild (links oben) ist ein vergrößerter Ausschnitt der Abbildung rechts daneben zu erkennen. Es handelt sich dabei um ein Einzelpulsablationsraster mit einer Schrittweite von vier Mikrometern zwischen zwei Messstellen in beiden lateralen Richtungen. Die untere Bildreihe zeigt Einzelpulsablationsraster unter identischen Bedingungen aber einer veränderten Schrittweite von (a)  $1 \mu m$ , (b)  $2 \mu m$  und (c)  $3 \mu m$  zwischen zwei Messstellen in jeder lateralen Richtung. Die Bilder (d - g) zeigen Ionenintensitätsverteilungsbilder des 2,5-DHB-Ions  $[M - H_2O + H]^+$ . (d) Einzelpulsablation bei einer Schrittweite von  $1 \mu m$ , (e) Schrittweite  $2 \mu m$ , (f) Schrittweite  $3 \mu m$  und (g) Schrittweite  $4 \mu m$ . Im Gegensatz zu der

Tabelle 5.22: Parameterkombinationen der Messungen zur Einzelpuls- und Doppelpulsablation bei Oversamplingbedingungen.

Geräteparameter	
Targetpotential	: 10 kV
Blendenpotential	: 7.5 kV
Gitterpotential	: $\pm 0$ kV
MCP-Potential	: - 2.2 kV
z-Achsenposition	: in b*, fix
Laserpulsenergie	: ca. 80 $\mu J$ , 7.5 A
Abschwächung	: 0
ND-Filter	: 11 %-Filter
Restgasdruck	: ca. $8.4 \cdot 10^{-7}$ mbar
Raumtemperatur	: ca. 18°C
* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.	
Präparationsparameter	
Matrix	: 2,5-DHB
Molmasse	: 154.7 Da
Summenformel	: $C_7H_6O_4$
Matrixauftrag	: ca. 300 $\mu g \pm 17 \mu g$
Target	: Aluminiumteller, vergoldet

Einzelpulsablation aus Abbildung 5.69, die mit einer höheren Bestrahlung aufgenommen wurde ist im Aufsichtkontrollbild (a) zu erkennen, daß einzelne Bereiche des Messrasters nach der Messung noch mit nichtablatierter Matrix bedeckt sind. Andere Bereiche, vor allem an den Rändern, sind dagegen teilweise oder vollständig abgetragen. Ähnlich fein zerkleinerte Matrixkristalltrümmer wie in Abbildung 5.69 finden sich dagegen nur ganz vereinzelt. Neben den beschriebenen Artefakten, die auch hier auftreten, zeigt sich bei der Betrachtung von gemittelten Linienscans der Pixelintensitäten ein ähnliches Bild, wie bei den Einzelpulsmessungen mit höherer Bestrahlung unter Oversampling-Bedingungen. Betrachtet man die Aufsichtkontrollbilder, bei denen deutlich mehr der ursprünglich präparierten Matrixverteilung erhalten geblieben ist, wird erkennbar, daß einzelne Bereiche wie z.B. Lücken in der Matrixabdeckung in (b) im entsprechenden Ionensignalintensitätsverteilungsbild (e) in ihrer Position und in ihrer lateralen Ausdehnung relativ ortstreu und im realen Größenverhältnis wiedergegeben werden. Die hier beispielhaft dargestellten Messungen sind mit gleichverteilten Analyten wie z.B. Peptiden reproduzierbar (Abbildungen nicht dargestellt). Es zeigt sich, daß durch Oversampling am Spektrometer LAMMA 2000 mit einem Überlappungsbereich, der bis zu 30 % der Ablationsgrundfläche einer Einzelpulsmessstelle an einer Matrixsprühpräparation (Matrix 2,5-DHB) einnimmt, keine deutlichen (zusätzlichen) Artefaktbildungen hervorgerufen werden. Bei Mehrpulsmessungen können, wenn eine vollständige Ablation bereits nach der Hälfte der Pulse auftritt, dagegen deutliche zusätzliche Artefakte entstehen.

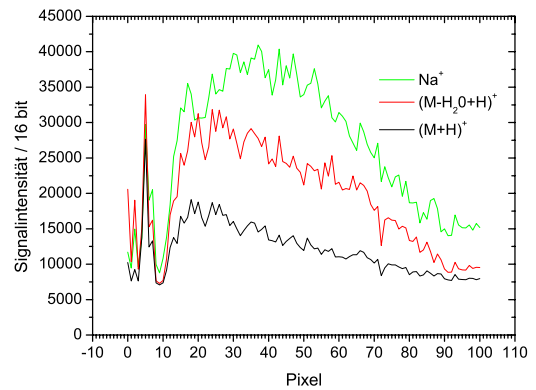
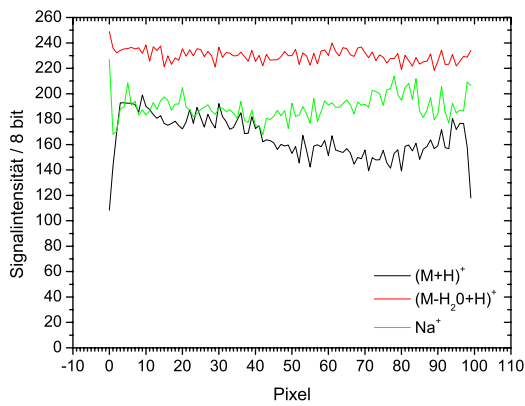
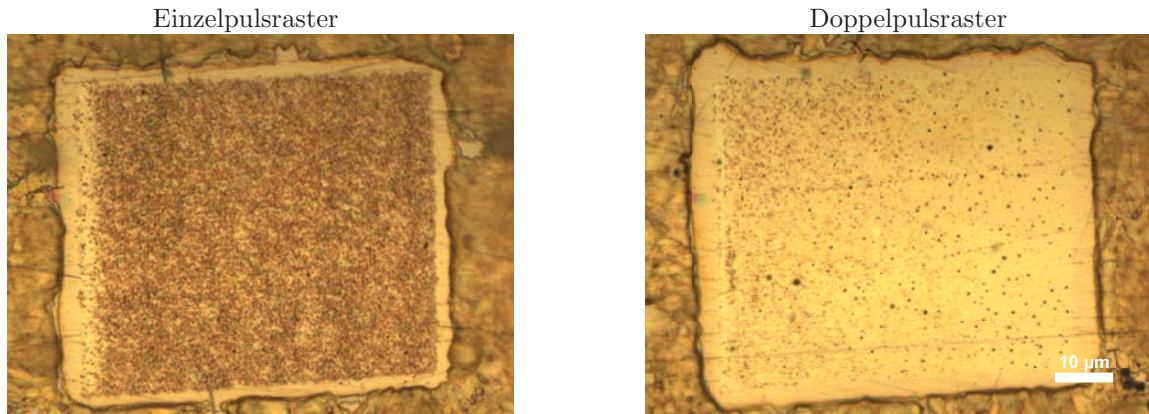
Tabelle 5.23: Parameterkombinationen der Messungen zur Einzelpulsablation bei Undersampling.

Geräteparameter	
Targetpotential	: 10 kV
Blendenpotential	: 7.5 kV
Gitterpotential	: $\pm 0$ kV
MCP-Potential	: - 2.2 kV
z-Achsenposition	: in b*, fix
Laserpulsenergie	: ca. 55 $\mu$ J, 7 A
Abschwächung	: 40
ND-Filter	: 11 %-Filter
Restgasdruck	: ca. $8.9 \cdot 10^{-7}$ mbar
Raumtemperatur	: ca. 19°C
* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.	
Präparationsparameter	
Matrix	: 2,5-DHB
Molmasse	: 154.7 Da
Summenformel	: $C_7H_6O_4$
Matrixauftrag	: ca. 300 $\mu$ g $\pm$ 17 $\mu$ g
Target	: Aluminiumteller, vergoldet

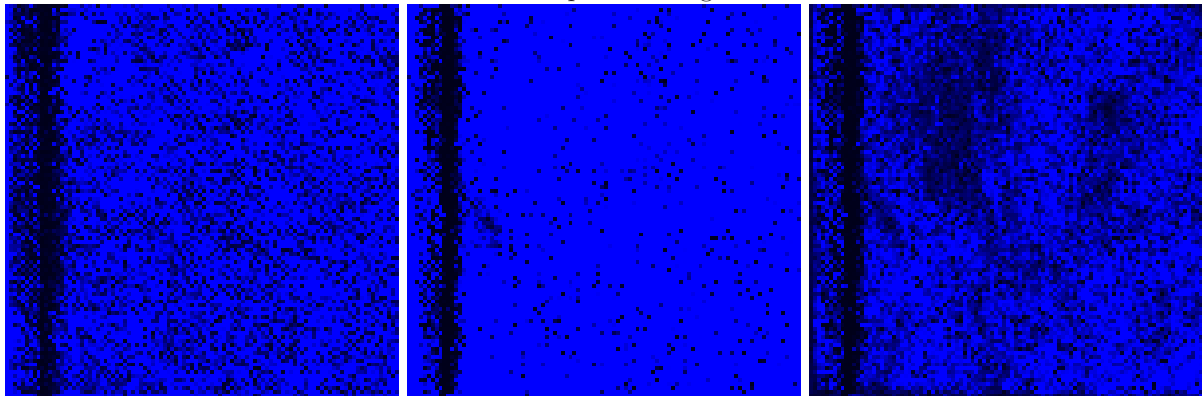
Tabelle 5.24: Peaks des Beispielspektrums der 2,5-DHB-Matrix bei Vermessung mit der Laserwellenlänge  $\lambda = 349$  nm aus Abbildung 5.71. \* der Matrix nicht eindeutig zuordbare Peaks.

Peak-Nr.	nominelle Masse	Zusammensetzung
1	137 u	$[M - H_2O + H]^+$
2	154 u	$[M]^{\bullet+}$
3	155 u	$[M + H]^+$
4	156 u	$[M + 2H]^+$
5	159 u	$[M - H_2O + Na]^+$
6	176 u	$[M - H + Na]^+$
7	177 u	$[M + Na]^+$
8	178 u	$[M + Na + H]^+$
9	192 u	$[M + K]^+$
10	198 u	*
11	199 u	*
12	273 u	$[2M - (H_2O)_2 + H]^+$





Einzelpulsmessung

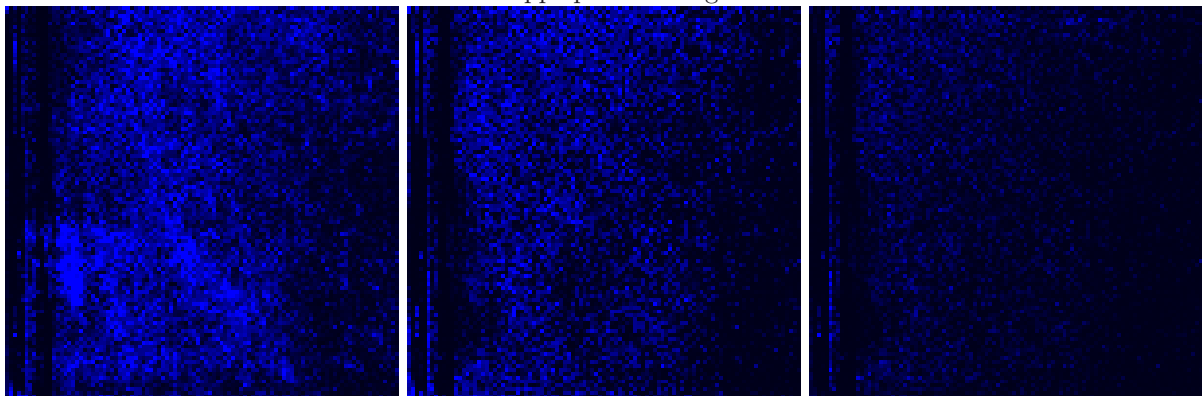


$Na^+$

$[M - H_2O + H]^+$

$[M + H]^+$

Doppelpulsmessung



$Na^+$

$[M - H_2O + H]^+$

$[M + H]^+$

Abbildung 5.69: Oversampling bei überwiegend gleichverteilter Matrix. Rasterrichtung: *regular* = von links nach rechts und von oben nach unten. Näheres siehe Haupttext.

Einzelpulsmessungen

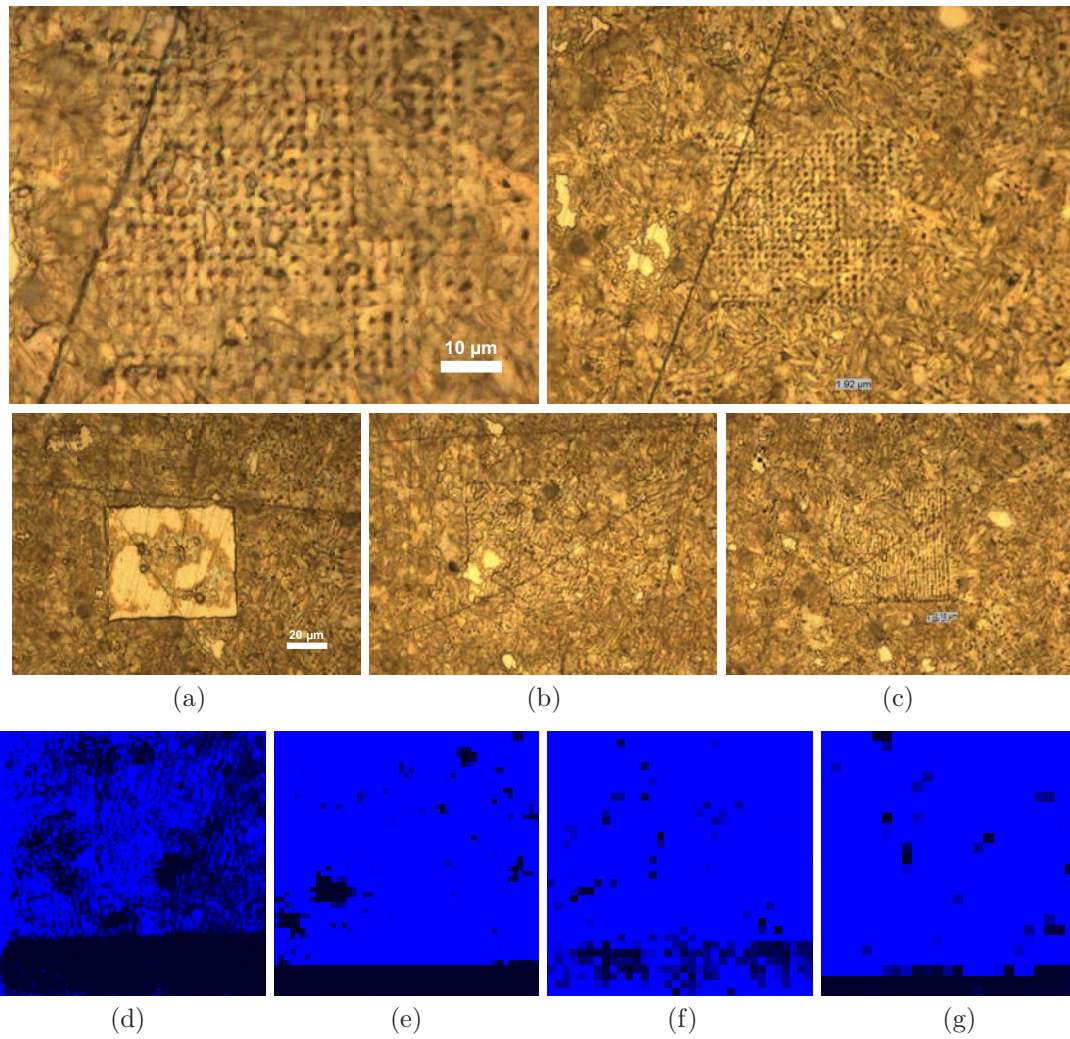


Abbildung 5.70: Undersampling bei überwiegend gleichverteiltem Analyten. (Oben links) Vergrößerung des rechten Bildes. Scanrichtung: *non-regular* = von unten nach oben und von links nach rechts. Außer in (a) sind in allen Abbildungen die Ablationskrater erkennbar. Näheres siehe Haupttext.

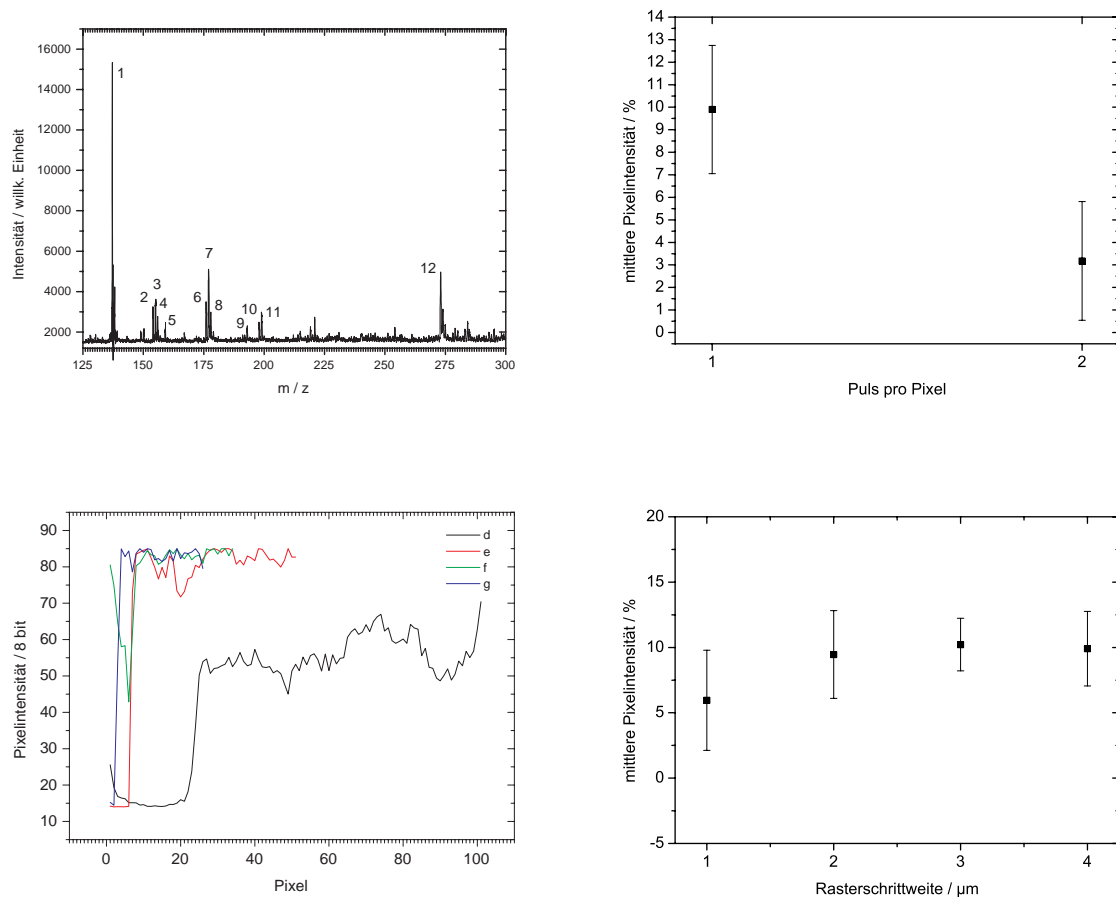


Abbildung 5.71: (Oben links) Summenspektrum der Matrix 2,5-DHB im niedrigen Massenintervall. Laserfokusbereich ca.  $1.2 \mu\text{m}$ , Wellenlänge  $\lambda = 349 \text{ nm}$ . Gegenüber durchschnittlichen Dried droplet-Präparationen und Vermessung mit größeren optischen Foki ( $\varnothing \approx 20 - 40 \mu\text{m}$ ,  $\lambda = 337 \text{ nm}$ ), zeigt sich bei nahezu identischer Bestrahlung, ein quantitativer Unterschied in der relativen Signalintensitätsverteilung im niedrigen Massenintervall. Relatives Verhältnis  $1/(2,3) = 4.4$ ,  $1/12 = 2.8$ . (Oben rechts) Mittlere Pixelintensität des Matrixfragmentes m/z 273 u bei geringem Oversampling und Einzel- bzw. Doppelpulsen. (Unten links) Linienscans der Pixelintensität (8 bit). Scanrichtung: von unten nach oben, über alle horizontalen Pixel gemittelt. (Unten rechts) Mittlere Signalintensität pro Pixel mit einfacher Standardabweichung.

### In- und Defokussmessungen bei unterschiedlichen elektrostatischen Bedingungen

Bei einer Veränderung der z-Position der Probenebene in den Ionenquellen der Spektrometer ALADIM II und LAMMA 2000 verändert sich die auf die Probe treffende Querschnittsfläche der Laserstrahlung und die Länge der ersten Beschleunigungsstrecke der Ionen. Beide Spektrometer verfügen in ihrem elektrostatischen Aufbau über eine Gitterelektrode, die in Abhängigkeit vom anliegenden Potential als zeitfokussierendes Element wirkt. Im positiven Ionenmodus besteht die Möglichkeit, diese Gitterelektrode entweder mit dem Massepotential des Spektrometergehäuses ( $\pm 0$  kV) oder mit einem negativen Potential ( $- 5$  kV) zu belegen. In Anlehnung an die Funktionalität einer Einzellinse im Quellaufbau eines Flugzeitspektrometers (siehe hierzu Abb. 4.2 S. 143), wird das Anlegen eines negativen Potentials hier als *Geschwindigkeitsmodus* und das Anlegen des Massepotentials als *Teleskopmodus* bezeichnet [263]. Im folgenden werden MALDI-Messungen mit der Matrix 2,5-DHB und den Peptiden Substanz P, Melittin, Insulin, Cytochrom C und Myoglobin dargestellt.

In Abbildung 5.73 sind die Ergebnisse der TIC-Auswertungen aus einer Position entlang der Strahlachse, als absolute Entfernung zur Infokusposition des zentrisch justierten Lasers, am Spektrometer ALADIM II aufgetragen. Man erkennt in der Darstellung, daß die maximal erreichten Totalionenströme mit den unterschiedlichen Elektrodenpotentialen (des Geschwindigkeits- und des Teleskopmodus) nicht auf eine gemeinsame (z-) axiale Position fallen, sondern um ca.  $50 \mu\text{m}$  versetzt sind. Der maximale TIC wird mit den Teleskop-Einstellungen aber auch noch im Rayleighbereich des Lasers erreicht. Er beträgt in etwa 50 % des TIC, der mit den Geschwindigkeits-Einstellungen erhalten werden konnte.

Mit exzentrisch justiertem Laserstrahl und einem molaren Einwaageverhältnis von  $1:3:5:9:11 \times 10^{-4}$  M der Peptide Substanz P, Melittin, Insulin, Cytochrom C, Myoglobin können am Spektrometer LAMMA 2000 auch Signale der größeren Peptide Cytochrom C und Myoglobin erhalten werden. Die Ergebnisse sind relativ robust, d.h. bis auf Myoglobin können von allen untersuchten Peptiden Signalintensitäten bei Infokussmessungen in einem Bestrahlungsintervall erhalten werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.74 (b) dargestellt. Der Totalionenstrom der Messungen mit exzentrischer Laserstrahljustierung übertrifft den TIC mit zentrisch justiertem Strahl im Mittel um einen Faktor von ca. 9 (Abbildung 5.73). Es handelt sich bei den untersuchten Proben dabei um solche Proben, die den Analyten bekanntermaßen nicht gleichverteilen sondern i.d.R. „Hot spots“ ausbilden, d.h. die Analytverteilung lokal stark begrenzen bzw. konzentrieren (Dried droplet-Präparation mit 2,5-DHB Matrix). Geht man davon aus, daß der Analyt innerhalb der Präparation in einer hinreichenden Konzentration gleichverteilt vorliegt, sollte mit homogenen Bestrahlungsprofilen vor allem der Faktor der Flächenvergrößerung eine entscheidende Rolle bei einer Signalintensitätssteigerung einnehmen. Bezogen auf die bei zentrischer Strahljustierung erhaltenen Ablationsflächen bei Infokussmessungen und die bei exzentrischer Strahljustierung innerhalb des Rayleighbereiches ermittelten Ablationsprofile, ergibt sich daraus ein Zuwachsfaktor von in etwa 7 bis 8. Eine Messung mit exzentrischer Justierung ist nicht unmittelbar mit einer defokussierten Messung bei zentrischer Justierung vergleichbar, da hier der intensivste Bereich des Laserprofils ausgeblendet wird. Im Vergleich wird bei exzentrischer Justierung aber die Wahrscheinlichkeit groß, den intensivsten Bereich des Profils bei Infokussmessungen abzubilden.

Die bei einem symmetrischen Strahlprofil und Mehrpulsmessungen mit einem Ablationsdurchmesser von  $2 \mu\text{m}$  erhaltene Ablationsfläche von ca.  $3 \mu\text{m}^2$  bis maximal ca.  $13 \mu\text{m}^2$  ( $\varnothing = 4 \mu\text{m}$ ) sollte bei diesem einfachen Verhältnis demnach eine Ablationsfläche von ca.  $29 \mu\text{m}^2$  bis maximal ca.  $116 \mu\text{m}^2$  bei exzentrischer Justierung gegenüberstehen, um einen Faktor von ca. 9 im TIC zu erreichen. Die Tendenz bei

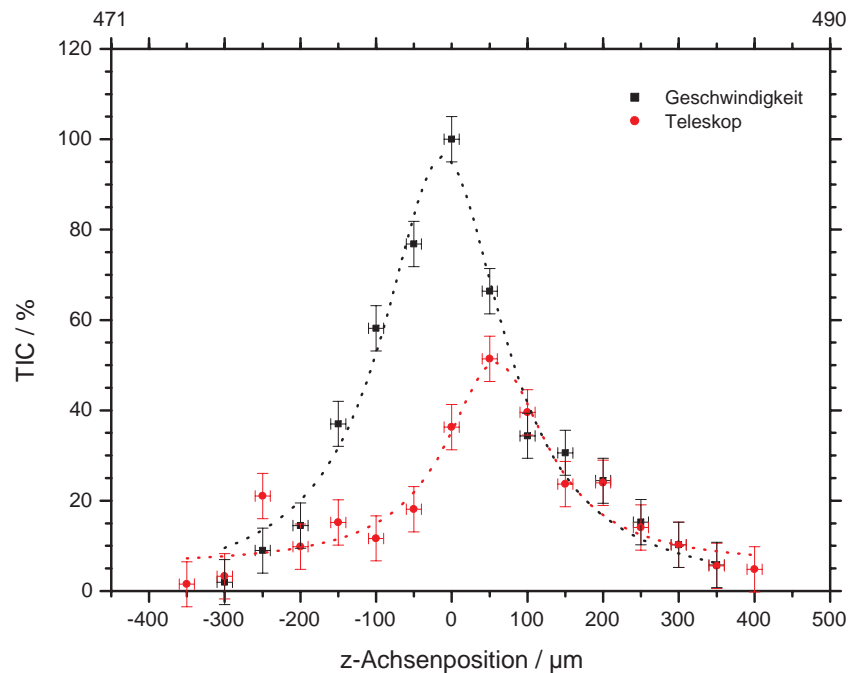


Abbildung 5.72: Lage des Fokus anhand der TIC-Intensität. Der anhand der Ionensignalintensität ermittelte „Fokus“ liegt im Zusammenhang mit der Dimensionierung der elektrostatischen Elemente im longitudinalen Verlauf des Laserstrahls an unterschiedlichen Orten. Näheres siehe Haupttext.

exzentrischer Strahljustierung an Dried droplet-Präparationen mit der Matrix 2,5-DHB geht zu höheren TICs bei Abschwächungen die zwischen 1.3 % bis 1.5 % einer Pulsenergie von ca.  $75 \mu\text{J}$  transmittieren (Abbildung 5.74 (c)). Dies würde, bezogen auf eine Fläche zwischen  $29 \mu\text{m}^2$  bis maximal ca.  $116 \mu\text{m}^2$ , einer (wirksamen) Bestrahlung von ca.  $8438 \text{ J/m}^2$  (ca.  $4.1 \times$  Schwellbestrahlung von Substanz P in 2,5-DHB) bis ca.  $38927 \text{ J/m}^2$  (ca.  $19 \times$  Schwellbestrahlung von Substanz P in 2,5-DHB) entsprechen. Die Schwellbestrahlung von Substanz P in 2,5-DHB konnte bei zentrischer Laserjustierung mit ca.  $2062 \text{ J/m}^2$  bestimmt werden (Spektrometer LAMMA 2000). Am Spektrometer ALADIM II konnte bei zentrisch justiertem Laser eine Schwellbestrahlungsstärke für Infokusmessungen des Peptidanalyten Substanz P von ca.  $500 \text{ J/m}^2$  ermittelt werden. Eine Ermittlung von Schwellbestrahlungsstärken an Defokusmessungen ist schwierig, da die Besonderheiten des Ablations- bzw. Desorptionsprofils in einer Messreihe jeweils separat vermessen werden müssen. Konsistente Ergebnisse konnten hierzu nicht erhalten werden.

Bei der Vermessung kleinerer Matrixkristalle (im Vergleich zu Dried droplet-Präparationen mit der Matrix 2,5-DHB), die typischerweise bei Matrixsprühpräparationen auftreten, konnte eine um bis zu 15 % niedrigere Schwellbestrahlung des Analyten Substanz P festgestellt werden. Demgegenüber steht ein niedrigerer Signalzuwachs bei höheren Bestrahlungen im Gegensatz zu Messungen mit größeren Kristallen in Dried droplet-Präparationen. Ein möglicher Erklärungsversuch liegt im Oberfläche-zu-Volumenverhältnis der Kristalle. Bei sehr trockenen Sprühpräparationen ist der Anteil an bereits im Aerosol gebildeten Kristallen überproportional hoch. Diese Kristalle sind i.d.R. deutlich kleiner als  $5 \mu\text{m}$ . Das A/V-Verhältnis

angenommener Würfel bei dieser Kantenlänge beträgt bereits  $1.2 \text{ m}^{-1}$ . Es wird angenommen, daß bei Kristallen dieser Größe während der Kristallisation eine Analytanlagerung an die äußeren Kristallflächen verstärkt stattfinden kann. Bei größeren Kristallen nimmt, im Zusammenhang mit der Tropfengröße des Sprühs, eher die Wahrscheinlichkeit zu, daß die Kristallisation erst auf der Probenoberfläche abgeschlossen werden kann. Die größeren Kristalle werden demnach überproportional mehr Analyt einlagern, als die kleinen Kristalle. Die kleinen Kristalle werden bei sehr trockenen Sprühs gebildet und es wird angenommen, daß bei diesem Vorgang insgesamt eine, auf eine größere Fläche bezogene, sehr homogene Verteilung erfolgt. Gleichmäßig verteilte Analyte werden dann bevorzugt an die Matrixkristallflächen der kleinen Kristalle angelagert. Demgegenüber werden bei ausreichender Mischung proportional häufiger Analyte in größeren Kristallen eingelagert.

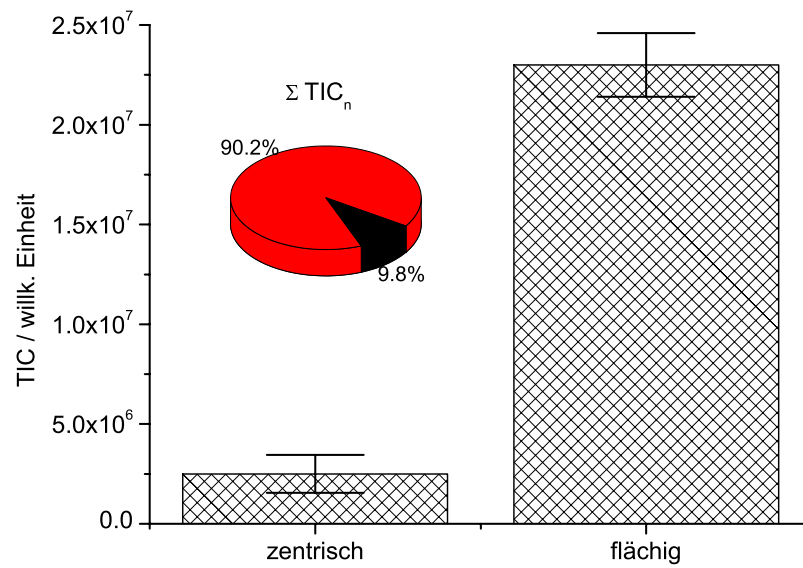
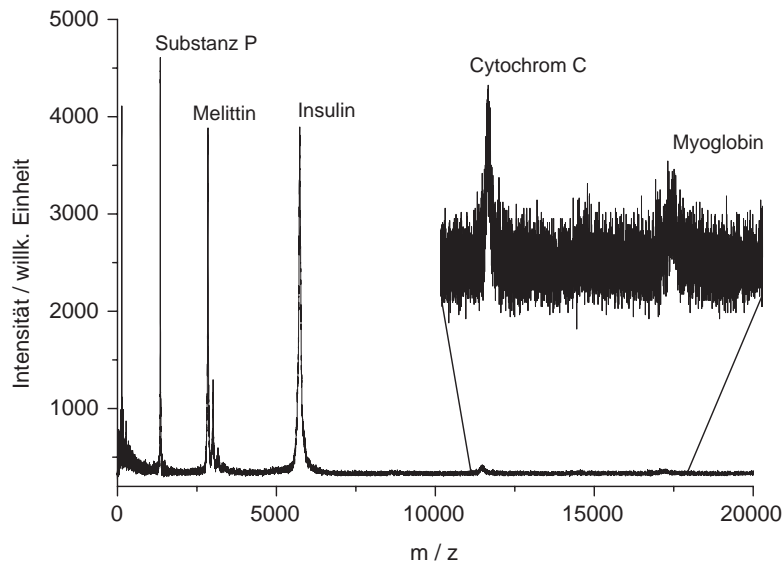
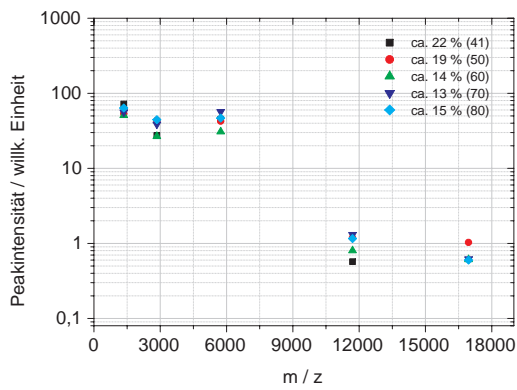


Abbildung 5.73: TIC bei zentrischer Laserjustierung und einer Energie von  $E \approx 80 \mu J$  sowie bei exzentrischer Strahljustierung (flächig) und einer Laserenergie von  $E \approx 75 \mu J$ . Beide Ergebnisse bei vergleichbarer dynamischer Strahlabschwächung, ca. 14 % Transmission und zusätzlichem statischen Abschwächer (11 % Transmission), insgesamt also ca.  $0.0154 \times 75 \mu J = 1.155 \mu J$  bzw.  $1.232 \mu J$ . Die geringere Pulsenergie bei exzentrischer Justierung trägt der Tatsache Rechnung, daß hier die Peakintensität des Profils transmittiert wird. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus 200 Messungen dar.

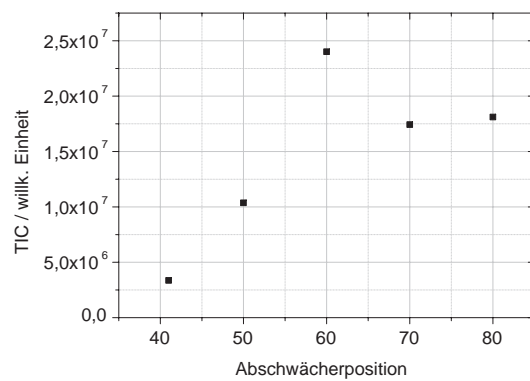




(a)



(b)



(c)

Abbildung 5.74: (a) Summenspektrum (30 Einzelspektren) der Analyte: Substanz P, Melittin, Insulin, Cytochrom C und Myoglobin. Dried droplet-Präparation im Molverhältnis 1:3:5:9:11  $\times 10^{-4}$  M, gelöst in EtOH/0.1% TFA 3:7 (v/v). Dried droplet-Präparationsvolumen = 2  $\mu$ l. Langsame Kristallisation bei Raumtemperatur (ca. 23°C). (b) Signalintensitäten bei exzentrischer Laserstrahljustierung in Abhängigkeit von der Bestrahlung. (c) Durchschnittlicher Totalionenstrom (TIC) in Abhängigkeit von der Bestrahlung bei exzentrischer Laserstrahljustierung. Messungen am Spektrometer LAMMA 2000.

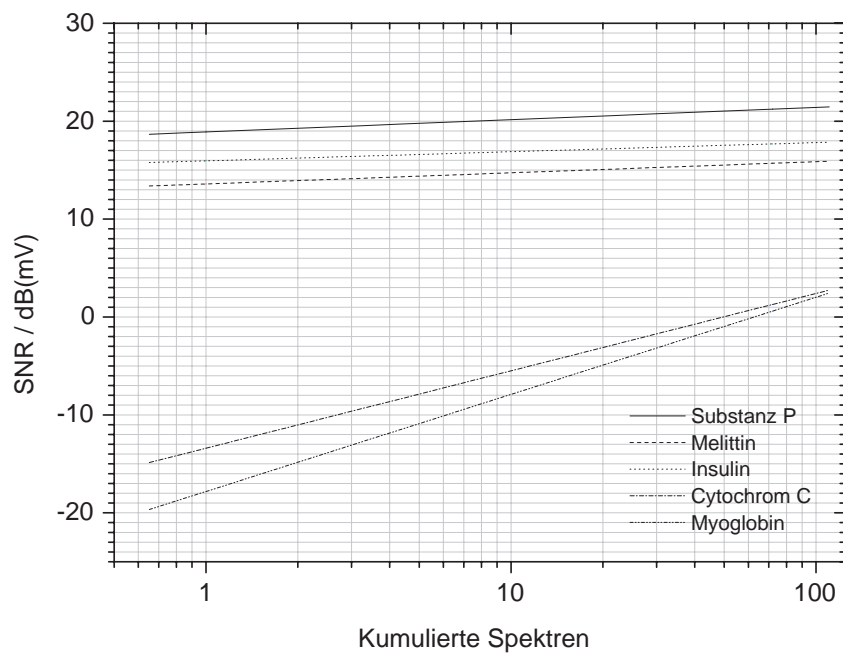


Abbildung 5.75: SNR der Messungen aus Abbildung 5.74 (a).

#### 5.4.14 Fazit

Am Spektrometer LAMMA 2000 ist es (noch) möglich, Ionensignale der Peptidanalyte Cytochrom C (ca. 12 kDa) und Myoglobin (ca. 17 kDa) zu detektieren. Die Qualität der Ergebnisse ist dabei stark abhängig von der Justierung des Lasers bzw. der Desorptionsfläche und der Energiedichte der Strahlung. Sehr wahrscheinlich hat auch das Laserpulsprofil bei den unterschiedlichen Einkopplungen dann einen Anteil am Zustandekommen der unterschiedlichen Ergebnisse. An einer Sprühpräparation von Cytochrom C ( $c = 10^{-4}$  M) war es bei zentrischer Laserjustierung (Hauptintensität wird ausgeblendet) möglich, ein SNR-Verhältnis von ca. 3 dB (bei 247 Pulsen) zu erhalten. Eine Steigerung über ein SNR von ca. 4.5 dB aus etwa 400 Pulsen war dabei nicht mehr möglich. Eine vergleichbare Sprühpräparation des Analyten Myoglobin ( $c = 10^{-4}$  M) kann am Spektrometer ALADIM II mit einem SNR = 3 dB aus etwa 100 kumulierten Pulsen erhalten werden. Am Spektrometer LAMMA 2000 war nur mit exzentrischer Laserstrahljustierung (Hauptintensität wird abgebildet) eine Detektion von Myoglobin möglich. An einer Dried-droplet-Präparation, die gegenüber einer großflächigen Sprühpräparation die Analyte stärker lokal konzentriert, konnte bei einer Konzentration von ca.  $9 \times 10^{-4}$  M für Cytochrom C und ca.  $1.1 \times 10^{-5}$  M für Myoglobin aus 100 summierten Pulsspektren ein in etwa identisches SNR  $\approx 3$  dB ermittelt werden. Bei 30 Einzelpulsspektren lag das SNR-Verhältnis dabei noch deutlich unter 0 dB. Eine qualitative Bestimmung der Peptide aus 100 summierten Pulsspektren ist möglich. Auffällig ist, daß die SNR-Verhältnisse der Peptide Substanz P, Melittin und Insulin in derselben Präparation über ca. 100 Pulssummationen dann nur um etwa 2.5 dB zunehmen (mittleres SNR  $\approx 20$  dB). Die Signale befinden sich dabei sehr wahrscheinlich nicht in der (analogen) elektronischen Sättigung. In der Literatur wurden bislang für UV-MALDI mit Laserfoki von ca.  $10 \mu\text{m}$  und Peptiden mit einer Masse  $\geq 10$  kDa negative Aussagen hinsichtlich der Darstellbarkeit getroffen, d.h. die Signale sind unmittelbar an der Grenze zum Rauschen. Für noch kleinere Laserfoki ist die Einschätzung eher noch negativer [1] [8]. Hier konnte gezeigt werden, daß für einen Laserstrahldurchmesser von ca.  $1 \mu\text{m}$  an linearen TOF-Spektrometern mit einer gängigen MCP-Detektion noch qualitative Messungen von Cytochrom C und Myoglobin möglich sind. Eine Einschränkung muss hinsichtlich der abbildenden Messungen gemacht werden. Das Rose-Kriterium (SNR  $\geq 6$  dB) wird hier bei den vorliegenden Messungen nicht erreicht.

## 5.5 Vergleich unterschiedlicher biologischer Spezies

Im Rahmen dieser Arbeit ist an allen tierischen Zell- und Gewebeproben ein enzymatischer Verdau mit Peptidasen durchgeführt worden. Die Verdauexperimente erfolgen dabei in der Form von On-Target-Ansätzen. Hierzu wird eine zuvor berechnete und aktivierte Enzymmenge in einem Volumen von i.d.R. zwei Mikrolitern, mittels Kolbenhubpipetten, auf das Gewebe oder einzelne Zellen aufgebracht. Die Proben (Gewebeschnitte, Zellpräparationen) sind in der Regel so beschaffen, daß in einem lokalen (Verdau)Bereich nicht mit mehr als ca. 100  $\mu\text{g}$  bis 300  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein zu rechnen ist (Gesamtmasse < 320  $\mu\text{g}$ ). Unmittelbar nach der Enzymapplikation wird die so präparierte Probe/Probenstelle mit einem Eppendorf-Cup-Deckel gegen die Atmosphäre abgeschirmt, um eine vorzeitige Evaporation der Lösungsmittel und damit ein Eintrocknen zu verhindern. Bei Raumtemperatur erfolgt dann ein Verdau, der i.d.R. bis zur Inaktivierung des Enzyms durch Eigenverdau oder bis zum Eintrocknen andauert (ca. 2 - 3 h). Im Falle von Trypsin hat sich die vorherige Mischung mit der Matrix 2,5-DHB als möglich und nicht störend erwiesen, wie bereits an artifiziellen Proben in vorhergehenden Arbeiten gezeigt werden konnte [67]. Auch das Enzym Chymotrypsin verträgt eine solche Mischung im aktivierten Ansatz mit etwas geringerer Spaltungsaktivität, gegenüber In-Lösungsverdau-Versuchen. Getestet wurden die MALDI-Matrizes 2,5-DHB und CHCA. Die zuckerspaltenden Enzyme (O-Glycosidase, N-Glycosidase) waren in Tests dagegen deutlich empfindlicher. Die Versuche lassen hier eine Mischung mit Matrix im Verdauansatz als nicht ratsam erscheinen. Eine systematische Analyse mit diesen Enzymen ist deshalb an den festen Präparaten nicht durchgeführt worden.

Aufgrund der sehr komplexen Massenspektren, die im Rahmen der Verdauexperimente erhalten werden, ist eine datenbankgestützte Identifizierung mit einer theoretisch erreichbaren Massengenauigkeit in einem Bereich von 5 ppm <  $\delta m$   $\leq$  60 ppm ohne Zuhilfenahme von zusätzlicher Information, z.B. aus LC-MS-Daten bzw. einer Vorabtrennung der Substanzen, sehr unwahrscheinlich ( $p \ll 50\%$ ). Eine sinnvolle CBS-Analyse der Peptide erfordert ebenso eine weitaus höhere Massengenauigkeit. Die Ergebnisse der Verdauexperimente an nativen biologischen Proben werden deshalb im weiteren Kontext nicht dargestellt, da sie außer der prinzipiellen Durchführbarkeit mit den getesteten Präparationstechniken keine zusätzlichen Erkenntnisse liefern.

Zu einem ersten Vergleich der MS-Messungen ohne vorhergehende Peakidentifizierung wird eine Rangbildung der Intensitäten durchgeführt. Diese Rangbildung ermöglicht einen Abgleich von auftretenden Mustern in den Massenspektren. Die wissenschaftliche Fragestellung ist, ob anhand der Ordnung von MS-Rohdaten (Datenpunkte, Datenpunktintensität) eine Aussage über die Regression molekularer Merkmale einer nativen (biologischen) Probe möglich ist. Für eine Analyse dieser Art ist dabei eine sehr genaue Übereinstimmung der Datenpunkte aus den zu vergleichenden Massenintervallen der verschiedenen Spektren notwendig. In den mitdargestellten Listen, die hier in Tabellenform angegeben sind, wird deshalb neben dem Datenpunkt der die Maximalintensität eines erhaltenen Peaks trägt, auch die von der Software (ULISSES) errechnete Markierung in der Form des „Label-dp“, also des physikalisch nicht existierenden (virtuellen) Markierungsdatenpunktes aufgetragen. Die erhaltenen Ranglisten können dann numerisch (hierarchisch) geordnet und entweder mittels Datenbank (Listenformat) oder graphisch, hier in der Form von Rangdifferenzdiagrammen betrachtet und verglichen werden.

In den Peaklisten sind die potentiellen Lipidsignale rot markiert. Die Messungen zeigen, im Rahmen der erreichbaren Massengenauigkeit, eine Übereinstimmung mit Massen theoretischer Lipidspezies (siehe Anhang). Nicht alle der theoretisch möglichen Lipide sind dabei auch als natürlich vorkommend nach-

gewiesen. Bei den als nicht natürlich vorkommend gekennzeichneten Strukturvorschlägen handelt es sich entweder um Verunreinigungen, Reaktionsprodukte natürlicher Lipide oder zu einer hohen Wahrscheinlichkeit um falsch zugeordnete Signale (ggf. Vertreter der nicht berücksichtigten natürlichen Lipidspezies: PI, TAG, PS, etc.). Verifizierte Strukturen werden deshalb explizit genannt bzw. gekennzeichnet. Bei den berücksichtigten Lipidspezies wurde zudem eine Auswahl getroffen, die sich nach der erwarteten Häufigkeit in den Spektren richtet. Berücksichtigt wurden deshalb PC, PE und SM mit bis zu 4 möglichen Doppelbindungen. Exemplarisch ist dies für jeden markierten Peak in Tabelle 6.26 aufgeführt. Eine sichere Identifizierung der Struktur konnte bei den Massen  $m/z$  184,  $m/z$  734 und  $m/z$  760 erreicht werden. Es handelt sich hierbei eindeutig um die PC-Kopfgruppe sowie PC(32:0) und PC(34:1). Mit dieser Identifizierung sind ebenso, soweit in den Spektren gleichzeitig vorhanden, die Quasimoleküle dieser Spezies sehr wahrscheinlich, d.h.  $m/z$  756,  $m/z$  772 und  $m/z$  751 sowie  $m/z$  782,  $m/z$  798 und  $m/z$  777 (siehe Massentabellen im Anhang). Da von diesen Massen keine gesonderten MSMS-Messungen (der jeweiligen Probe) vorliegen, werden sie aber nicht als verifiziert angesehen. Weiterhin können Matrixcluster in Verbindung mit einzelnen Lipiden auftreten, sehr wahrscheinlich ist dabei ein Zusammenschluss von  $[M + 136 + H]^+$ ,  $[M + 154 + H]^+$  sowie  $[M + 136 + Na]^+$  und  $[M + 154 + Na]^+$ . Deutlich weniger wahrscheinlich sind Cluster der Art  $[M + 272 + H]^+$ . Neben Clustern der MALDI-Matrix mit Analyten können auch reine Matrixcluster ggf. auch mit mehreren Na und/oder K im Austausch gegen H aber dennoch als einfachgeladene Spezies auftreten. Auf reine Matrixcluster deutet i.d.R. aber nicht ausschliesslich ein Massendefekt mit Nachkommastellen von ungefähr .10 bis .15 hin. Der Massendefekt (des Kerns eines Isotopes) ist definiert als die Differenz aus der Summe der Einzelmassen aller Protonen und Neutronen (Nukleonen) in einem Atomkern zu dessen tatsächlich gemessener (Ruhe)Masse<sup>10</sup>. In der (chemischen) Massenspektrometrie wird der Massendefekt nach IUPAC-Definition als Differenz der nominalen Masse zur exakten Masse verwendet und ist damit auf das <sup>12</sup>C-Isotop normiert.

### 5.5.1 Vergleichsanalyse anhand erstellter Ranglisten

Die Darstellungen zeigen zunächst die zu vergleichenden Spektrenausschnitte mit den dazugehörigen Rängen der Datenpunktintensitäten (rote Punkte auf grauer Fläche). In den weiteren Abbildungen sind die nach Datenpunkten geordneten Gegenüberstellungen der Rangdifferenzen dargestellt. Hierbei wird jedem Datenpunkt eine Rangdifferenz zugeordnet. Datenpunktlisten mit ähnlicher Rangordnung bilden geringe positive oder negative Rangdifferenzen aus, identische Spektren bilden keine Differenzen aus. Die aus der Intensitätsverteilung hervorgehenden Muster können sich in den Rangdifferenzen wiederfinden oder durch die Differenzbildung moduliert werden. Eine weitere (automatische) Analyse der Rangdifferenzen wird hier nicht durchgeführt.

---

<sup>10</sup>Die Differenz aus der Summe der Nukleonen und Elektronen eines Isotopes zur tatsächlich gemessenen (Ruhe)Masse ist in der Regel vernachlässigbar.

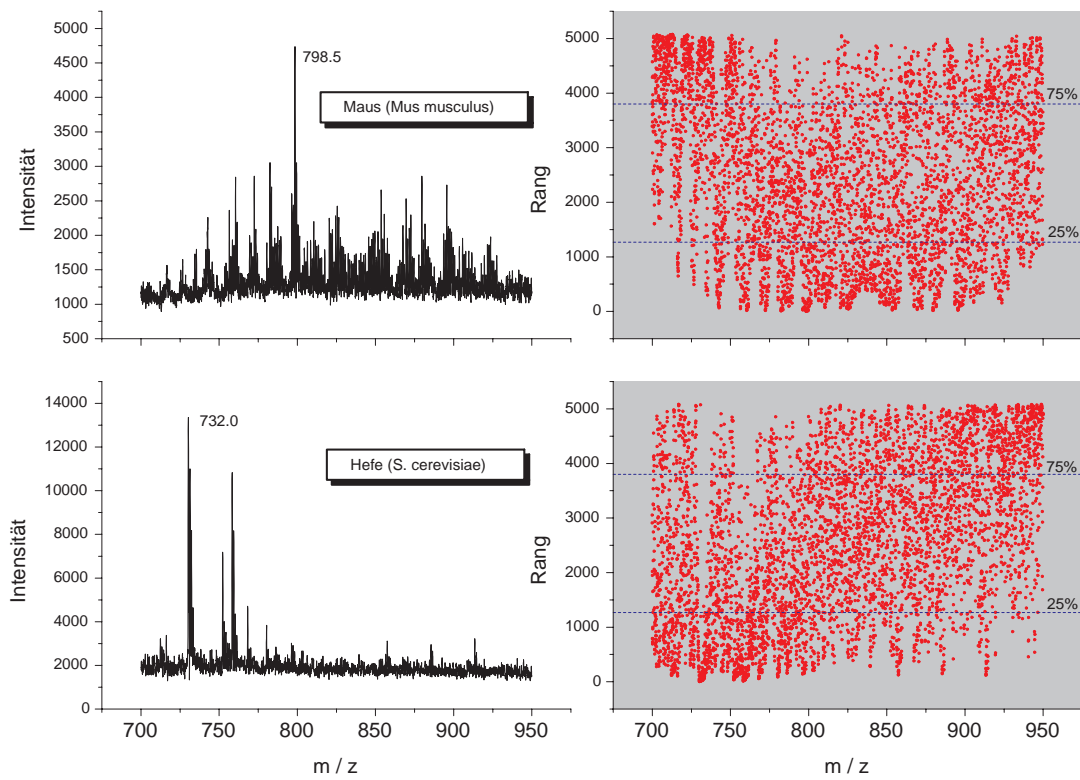


Abbildung 5.76: Beispielhafter Vergleich von Mausgewebe (quergestreifter Muskel) und Hefezellen im ausgesuchten Massenbereich zwischen  $m/z$  700 und  $m/z$  950.

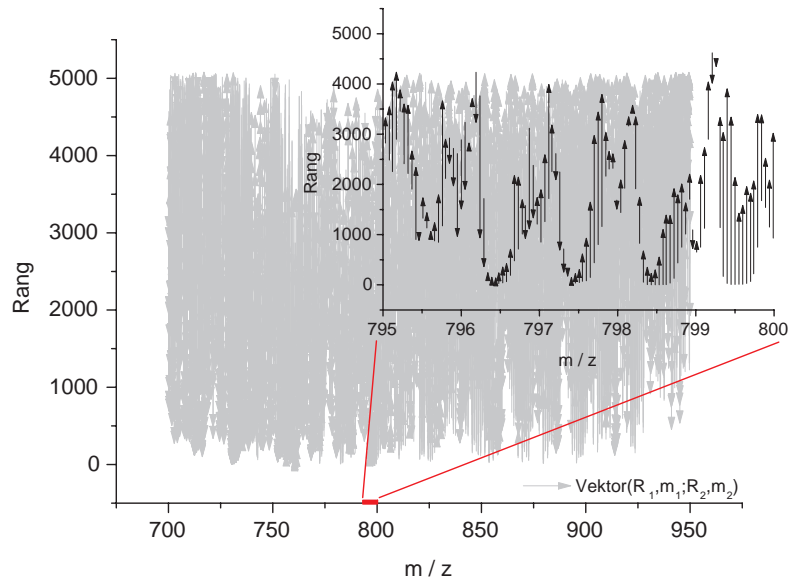


Abbildung 5.77: Vergleich der MS-Oberflächenanalyse zwischen Mausgewebe (quergestreifte Muskulatur) und Hefezellen. Untersucher Massenbereich:  $m/z$  700 -  $m/z$  950. Die Darstellung von Rangdifferenzen einzelner Datenpunkte besteht z.B. in der Form von Vektoren.

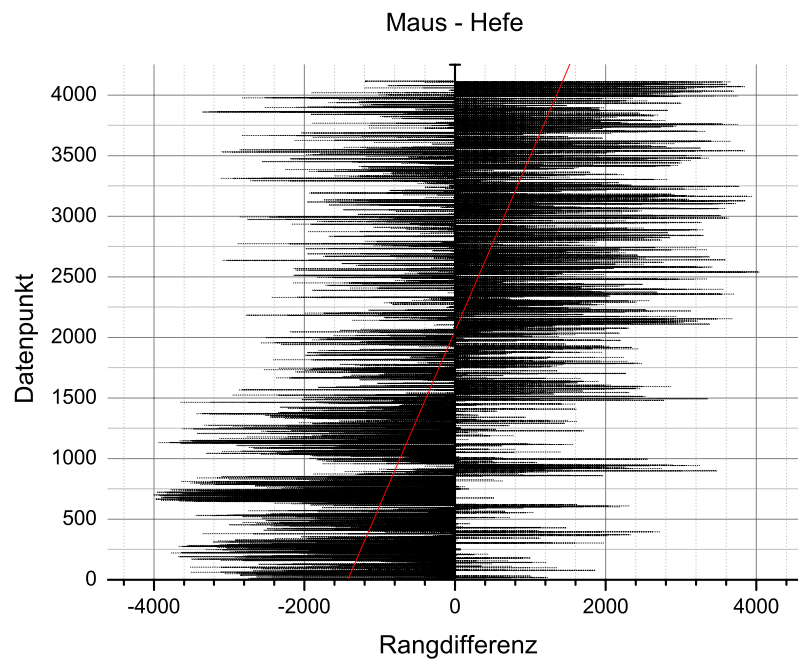
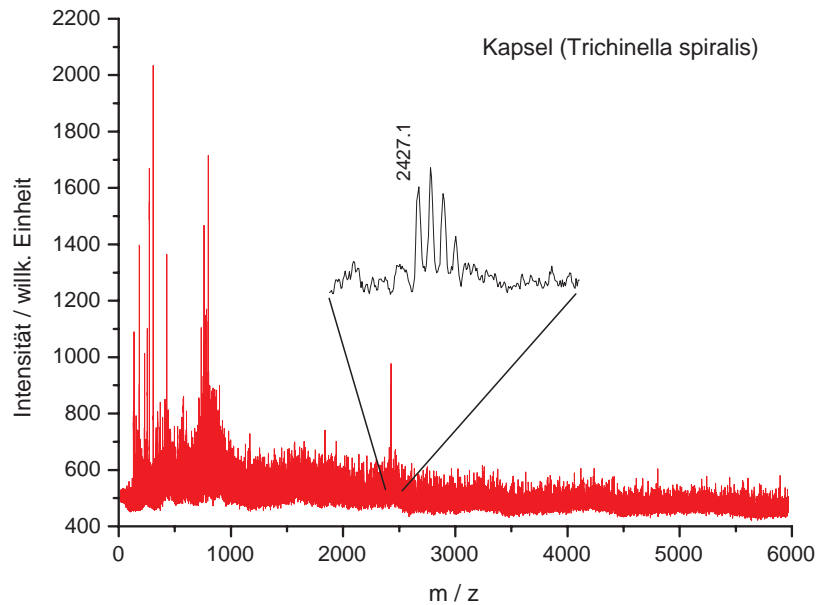


Abbildung 5.78: Vergleich der MS-Oberflächenanalyse zwischen Mausgewebe (quergestreifte Muskulatur) und Hefezellen. Untersucher Massenbereich:  $m/z$  700 -  $m/z$  900 als Rangdifferenzdarstellung der Datenpunkte.

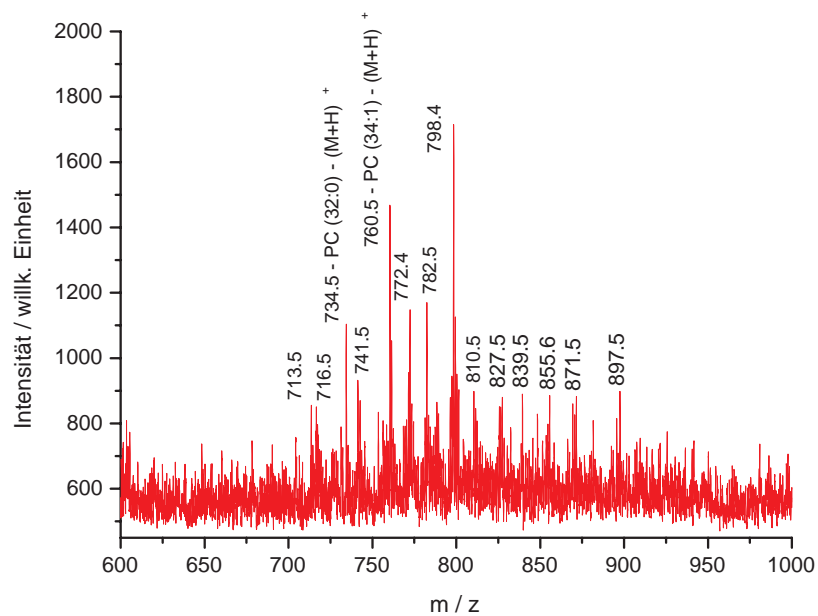


## 5.5.2 Mikrosondenmessungen an Endoparasit in quergestreifter Mausmuskulatur

*Trichinella spiralis* in Muskelgewebe der Maus



(a)



(b)

Abbildung 5.79: MALDI-TOF Messung von *Trichinella spiralis* Kapseln in infiziertem Mausmuskelgewebe. (a) Auffällig ist ein Signal bei  $m/z$  2427. (b) Im Massenintervall von  $m/z$  600 bis  $m/z$  1000 zeigen sich Phospholipidmassen, von denen zwei sicher identifiziert werden konnten:  $m/z$  734.5 PC(32:0) und  $m/z$  760.5 PC(34:1). Beide Massen als  $[M + H]^+$ . Spraypräparation mit der Matrix 2,5-DHB.

Ein Vergleich der erhaltenen Peakliste mit theoretischen Massen bekannter Substanzklassenvertreter (siehe Anhang) zeigt eine sehr wahrscheinliche Übereinstimmung mit einigen Phospholipiden. Das Signal bei  $m/z$  2427 konnte im Rahmen der Analyse strukturell nicht eindeutig zugeordnet werden, stammt lokal aber zweifelsfrei von einem Bereich innerhalb der Kapselstruktur. Diese wird durch die Infektion mit *T. spiralis* im Muskelgewebe der Maus gebildet (siehe S. 174). Es ist noch nicht in allen Einzelheiten erforscht, wie die Larve von *T. spiralis* die Kapselbildung im Muskelgewebe beeinflusst.

Tabelle 5.25: Peakliste der MALDI-Messung von mit *T. spiralis* infiziertem Mausgewebe (quergestreifte Muskulatur). Peak Nr.1 = PC-Kopfgruppe. Peak Nr.16 = PE(25:3) als  $[M + NH_4]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.17 = SM(14:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.18 = PC(28:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.19 = PC(32:0). Peak Nr.20 = SM(16:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.21 = PC(34:1). Peak Nr.22 = PC(32:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.23 = PC(34:1) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr.24 = PC(34:1) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.25 = PC(36:1) als  $[M + Na]^+$  oder PC(35:2) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.26 = SM(22:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.27 = SM(23:0) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.28 = PC(39:3) als  $[M + Na]^+$ , nicht natürlich vorkommend oder PE(42:3) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr.29 = SM(27:1), nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.30 = SM(28:1) oder PE(44:4) als  $[M + NH_4]^+$ . Peak Nr.31 = PC(39:0) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.32 = PC(41:3) als  $[M + NH_4]^+$ , nicht natürlich vorkommend oder PE(44:3) als  $[M + NH_4]^+$ . Peak Nr.33 = PC(41:1) als  $[M + Na]^+$ , nicht natürlich vorkommend oder PC(40:2) als  $[M + K]^+$  oder PC(43:4) oder PE(43:2) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.34 = SM(26:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.35 = SM(27:0) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.36 = SM(30:1). **Verifizierte Massen:** Peak Nr.1,  $\delta m = 74.3$  ppm. Peak Nr.19,  $\delta m = -120.4$  ppm. Peak Nr.21,  $\delta m = -90.8$  ppm.

Nr.	Label dp	[u]	Max. in dp	[u]
1	10915.844	184.087	10915	184.068
2	12738.934	229.151	12738	229.126
3	12811.484	231.046	12810	231.007
4	13193.063	241.143	13191	241.088
5	13676.099	254.234	13675	254.204
6	14353.287	273.169	14352	273.133
7	15548.669	308.254	15547	308.204
8	18767.014	413.246	18766	413.210
9	19219.000	429.221	19218	429.185
10	22696.785	562.275	22696	562.243
11	22736.441	563.896	22736	563.878
12	23015.885	575.382	23017	575.428
13	23068.182	577.544	23067	577.495
14	23637.521	601.348	23640	601.453
15	23686.832	603.432	23688	603.482
16	23735.381	605.488	23734	605.429
17	26182.506	713.630	26181	713.561
18	26244.600	716.490	26246	716.554
19	26632.451	734.481	26631	734.413
20	26782.209	741.487	26779	741.336
21	27185.426	760.516	27184	760.449
22	27434.684	772.401	27434	772.368
23	27644.725	782.487	27644	782.452
24	27974.496	798.454	27974	798.430
25	28221.436	810.516	28220	810.445
26	28527.963	825.615	28528	825.616
27	28807.945	839.527	28806	839.430
28	28985.367	848.404	28984	848.335
29	29128.957	855.622	29129	855.624
30	29402.912	869.478	29401	869.381
31	29424.352	870.567	29424	870.550
32	29443.322	871.532	29443	871.515
33	29621.066	880.592	29621	880.589
34	29641.373	881.630	29641	881.611
35	29913.709	895.611	29913	895.574
36	29950.943	897.531	29950	897.482
37	34879.906	1169.852	34879	1169.799
38	44941.207	1837.562	44942	1837.621
39	52372.109	2427.087	52372	2427.078

## Dried droplet-Präparation an Muskelgewebe der Maus

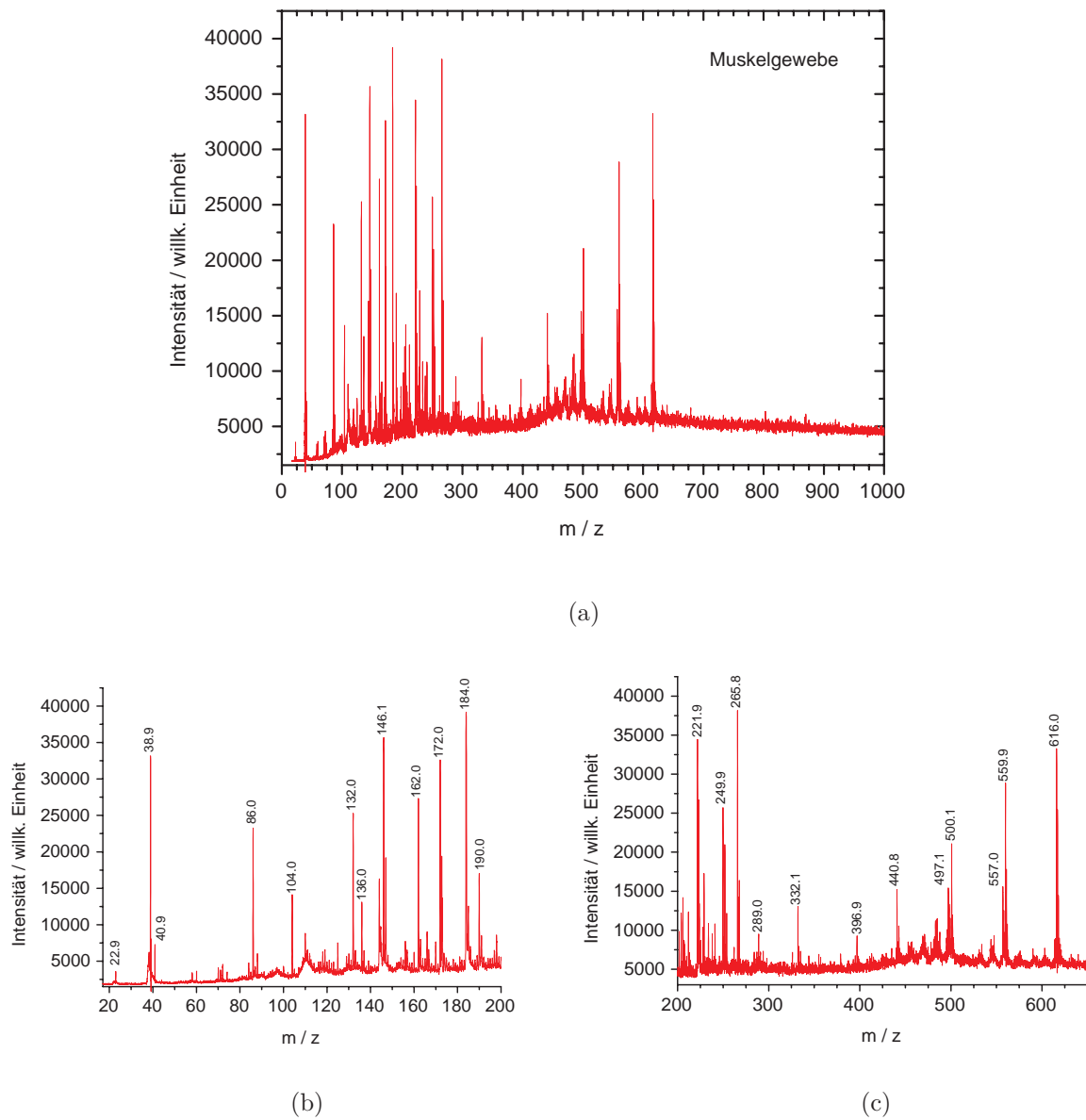


Abbildung 5.80: Quergestreiftes Muskelgewebe der Maus (*Mus musculus*). Dried droplet-Präparation mit der Matrix CHCA. Summenspektrum aus 205 Einzelspektren von teilweise überlagerten Messstellen. (a) Übersicht, (b) Massenbereich  $m/z$  20 -  $m/z$  200, (c) Massenbereich  $m/z$  200 -  $m/z$  650.

Es zeigte sich im Rahmen der Analyse, daß der Einfluss der Präparationstechnik bei MALDI auf das erhaltene Signalmuster in ähnlichen Präparaten sehr deutlich ausfällt. Ein Vergleich unterschiedlicher Proben, die mit abweichenden Präparationstechniken präpariert wurden erscheint deshalb generell nicht ratsam. Die relative Intensität einiger ubiquitär vorkommender und i.d.R. strukturbildender Moleküle, kann eindeutig durch die Art der Präparation verändert werden.

Tabelle 5.26: Peakliste der MALDI-Messung einer Dried droplet-Präparation an Muskelgewebe der Maus. Peak Nr.37 = PC-Kopfgruppe. **Verifizierte Masse:** Peak Nr.37,  $\delta m = -534.1$  ppm.

Nr.	Label dp	[u]	Max. in dp	[u]
1	2457.586	38.910	2457	38.904
2	2641.875	40.916	2641	40.906
3	3828.474	55.035	3829	55.042
4	3908.217	56.059	3906	56.030
5	3983.252	57.031	3983	57.028
6	4061.311	58.051	4060	58.034
7	4136.210	59.038	4132	58.982
8	4213.172	60.061	4213	60.059
9	4931.007	70.027	4933	70.055
10	5002.430	71.060	5003	71.068
11	5069.956	72.044	5072	72.074
12	5206.785	74.059	5209	74.091
13	5857.824	84.024	5858	84.027
14	5984.243	86.032	5983	86.012
15	6109.620	88.047	6107	88.005
16	6828.125	100.044	6826	100.007
17	7056.742	104.022	7056	104.009
18	7393.077	110.015	7392	109.996
19	7613.580	114.035	7612	114.006
20	7726.614	116.124	7724	116.075
21	7777.160	117.064	7775	117.024
22	7831.587	118.081	7829	118.032
23	7883.279	119.050	7883	119.045
24	7934.531	120.016	7932	119.968
25	7987.440	121.016	7987	121.008
26	8042.024	122.053	8042	122.052
27	8094.115	123.046	8094	123.044
28	8194.321	124.968	8193	124.943
29	8401.547	128.991	8402	129.000
30	8455.557	130.050	8456	130.058
31	8555.845	132.027	8556	132.030
32	8755.448	136.008	8755	135.999
33	9149.444	144.038	9149	144.029
34	9247.181	146.066	9246	146.041
35	9993.667	162.020	9993	162.006
36	10443.141	172.026	10443	172.023
37	10963.140	183.975	10962	183.948
38	11217.616	189.969	11217	189.954
39	12509.158	221.871	12508	221.841
40	12742.594	227.901	12741	227.860
41	12785.474	229.018	12784	228.979
42	12972.098	233.909	12970	233.853
43	13128.576	238.049	13127	238.008
44	13239.864	241.016	13238	240.967
45	13568.147	249.876	13567	249.844
46	13641.777	251.885	13641	251.863
47	13715.166	253.895	13714	253.863
48	14144.566	265.818	14143	265.774
49	14214.969	267.799	14214	267.772
50	14952.604	288.997	14952	288.979
51	16374.203	332.127	16373	332.089
52	18347.051	396.949	18347	396.947
53	19592.023	440.827	19590	440.754
54	19648.625	442.877	19646	442.782
55	21102.410	497.147	21101	497.093
56	21198.580	500.848	21198	500.825
57	20733.945	483.096	20733	483.060
58	20759.082	484.048	20759	484.045
59	20785.211	485.039	20784	484.993
60	20858.703	487.831	20857	487.766
61	20359.947	469.039	20362	469.116
62	20386.518	470.031	20386	470.011
63	20415.660	471.120	20415	471.095
64	19927.773	453.054	19927	453.026
65	20009.793	456.067	20011	456.111
66	22042.830	533.924	22041	533.851
67	21967.752	530.940	21967	530.910
68	22271.027	543.046	22271	543.045
69	22294.516	543.989	22293	543.928
70	22343.254	545.949	22342	545.898
71	22378.270	547.359	22378	547.348
72	22617.504	557.043	22616	556.982
73	22688.533	559.935	22687	559.872
74	24030.779	615.984	24029	615.908

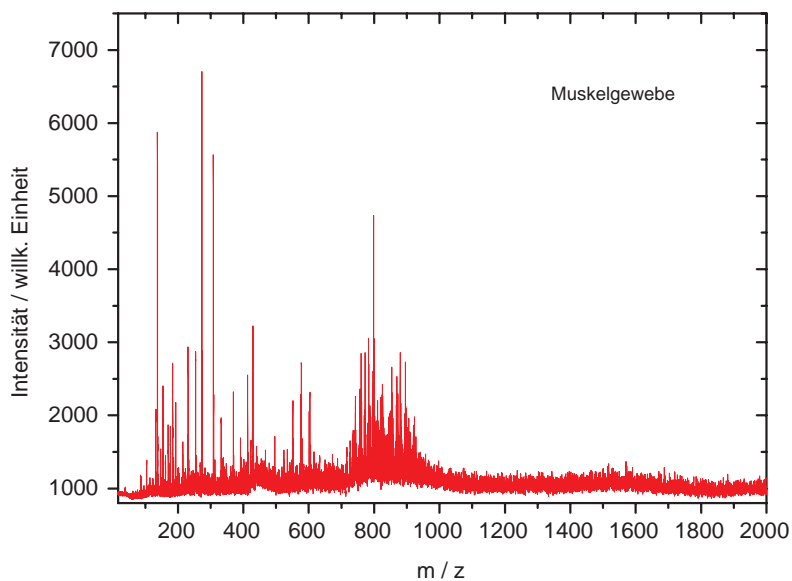
Tabelle 5.27: Peakliste der MALDI-Messung einer Sprühpräparation an Muskelgewebe der Maus. Mehrfachzuordnungen sind aufgrund der unzureichenden Massengenauigkeit möglich. Die Auswahl zeigt mögliche Strukturvorschläge. Peak Nr.13 = PC-Kopfgruppe. Peak Nr.37 PE(25:0) als  $[M + Na]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.38 = PC(24:3) als  $[M + NH_4]^+$ . Peak Nr.39 = PC(28:2). Peak Nr.40 = PE(34:2). Peak Nr.41 = SM(16:0) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr.42 = PE(32:2) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.43 = PC(32:0). **Verifizierte Massen:** Peak Nr.13,  $\delta m = 155.8$  ppm. Peak Nr.43,  $\delta m = -129.9$  ppm.

Nr.	Label dp	[u]	Max. in dp	[u]
1	5929.490	86.010	5928	85.987
2	6517.376	95.656	6517	95.650
3	7015.174	104.225	7017	104.257
4	7572.985	114.263	7571	114.226
5	8044.085	123.100	8040	123.022
6	8509.588	132.155	8512	132.203
7	8760.465	137.169	8763	137.220
8	9243.310	147.081	9242	147.053
9	9575.846	154.108	9576	154.111
10	9947.702	162.160	9945	162.101
11	10303.711	170.062	10300	169.979
12	10612.091	177.058	10608	176.965
13	10916.476	184.102	10913	184.021
14	11251.465	192.013	11249	191.954
15	11292.433	192.992	11290	192.934
16	11202.190	190.839	11202	190.835
17	12149.043	214.030	12147	213.979
18	12188.340	215.022	12185	214.937
19	12769.799	229.956	12768	229.909
20	12808.681	230.973	12806	230.903
21	13674.857	254.200	13673	254.149
22	14350.275	273.084	14350	273.076
23	15547.914	308.231	15547	308.204
24	16328.892	332.297	16330	332.331
25	17475.375	369.264	17474	369.218
26	18127.318	391.154	18126	391.109
27	18766.383	413.224	18764	413.140
28	19217.168	429.156	19216	429.114
29	21030.105	496.273	21029	496.230
30	21750.219	524.284	21749	524.236
31	22000.189	534.188	22000	534.180
32	22429.498	551.413	22429	551.393
33	23016.559	575.409	23016	575.386
34	23065.492	577.433	23064	577.371
35	23640.514	601.474	23639	601.410
36	23687.549	603.463	23687	603.439
37	23988.117	616.245	23987	616.198
38	24386.188	633.381	24385	633.330
39	25273.365	672.417	25271	672.311
40	26243.756	716.451	26247	716.600
41	26438.762	725.468	26438	725.433
42	26464.250	726.651	26464	726.639
43	26632.305	734.474	26631	734.413

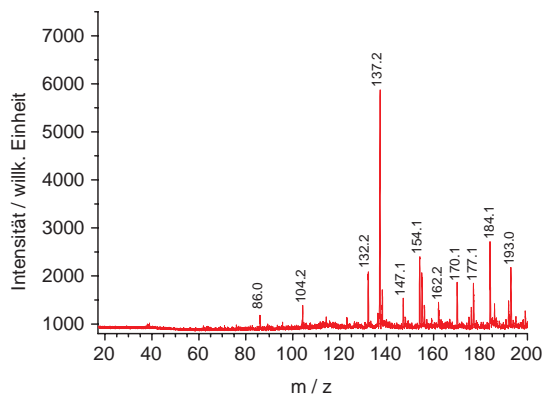
Tabelle 5.28: Peakliste der MALDI-Messung einer Sprühpräparation an Muskelgewebe der Maus. Mehrfachzuordnungen sind möglich, werden explizit aber nicht angegeben. Peak Nr. **44** = SM(16:3) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **45** = PE(36:4). Peak Nr. **46** = SM(16:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **47** = PC(31:0) als  $[M + Na]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **48** = PC(32:0) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr. **49** = PC(31:0) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **50** = PC(34:1). Peak Nr. **51** = SM(18:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **52** = PC(32:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **53** = PC(34:2) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr. **54** = PC(34:1) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr. **55** = SM(22:1). Peak Nr. **56** = PC(35:3) als  $[M + NH_4]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **57** = PC(36:1). Peak Nr. **58** = PC(35:2) als  $[M + NH_4]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **59** = PC(34:2) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **61** = PC(34:1) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **62** = SM(23:1), nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **63** = PC(34:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **64** = SM(23:0), nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **65** = PC(35:4) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **66** = PC(35:3) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **67** = PC(36:1) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr. **68** = PC(37:3) als  $[M + Na]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **69** = PC(36:2) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **70** = PC(37:0) als  $[M + NH_4]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **71** = PE(40:2) als  $[M + Na]^+$  oder mit geringerer Wahrscheinlichkeit  $[GalCer22h : 0 + Na]^+$ . Peak Nr. **72** = SM(22:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **73** = PC(37:0) als  $[M + Na]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **74** = SM(24:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **75** = SM(27:1), nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **76** = SM(25:0) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **77** = SM(28:1). Peak Nr. **79** = SM(26:1) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **80** = SM(26:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **81** = SM(27:1) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **82** = SM(27:0) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **83** = SM(30:1). Peak Nr. **84** = SM(29:1) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **85** = PC(44:1) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr. **86** = SM(29:0) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend (weiteres siehe Anhang). **Verifizierte Masse:** Peak Nr. **50**,  $\delta m = -114.5$  ppm.

Nr.	Label dp	[u]	Max. in dp	[u]
44	26653.697	735.473	26653	735.440
45	26763.043	740.588	26759	740.399
46	26782.369	741.494	26781	741.430
47	26805.900	742.598	26808	742.697
48	27100.418	756.484	27100	756.465
49	27142.584	758.483	27141	758.408
50	27185.041	760.498	27184	760.449
51	27374.182	769.508	27373	769.451
52	27436.197	772.473	27435	772.416
53	27603.271	780.491	27602	780.430
54	27644.881	782.494	27644	782.452
55	27708.168	785.546	27707	785.490
56	27748.326	787.485	27747	787.421
57	27769.818	788.524	27770	788.533
58	27790.215	789.511	27789	789.452
59	27933.467	796.458	27932	796.387
60	27954.566	797.484	27953	797.408
61	27974.957	798.476	27974	798.430
62	27996.076	799.504	27995	799.452
63	28016.021	800.476	28015	800.426
64	28037.016	801.499	28036	801.450
65	28139.385	806.498	28137	806.381
66	28180.811	808.525	28179	808.437
67	28221.428	810.516	28221	810.495
68	28424.004	820.478	28422	820.379
69	28505.195	824.488	28504	824.429
70	28444.225	821.476	28443	821.416
71	28465.025	822.503	28463	822.403
72	28526.975	825.566	28526	825.517
73	28545.943	826.505	28545	826.458
74	29089.301	853.626	29089	853.610
75	29129.037	855.626	29128	855.574
76	29364.893	867.549	29364	867.503
77	29405.109	869.590	29405	869.584
78	29464.043	872.586	29463	872.532
79	29602.617	879.649	29602	879.618
80	29642.650	881.695	29642	881.662
81	29874.746	893.604	29874	893.566
82	29912.871	895.568	29912	895.523
83	29952.625	897.618	29952	897.586
84	30414.738	921.620	30413	921.529
85	30432.963	922.573	30433	922.575
86	30452.930	923.618	30452	923.569

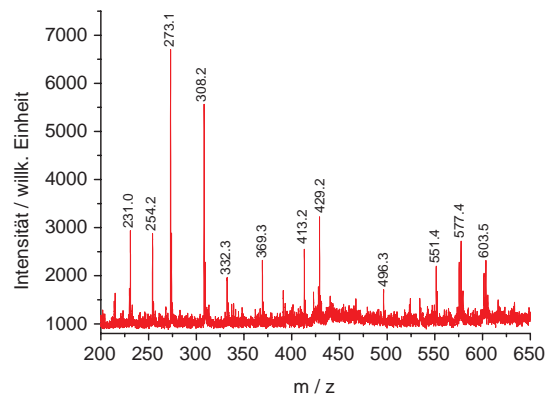
Sprühpräparation an Muskelgewebe der Maus



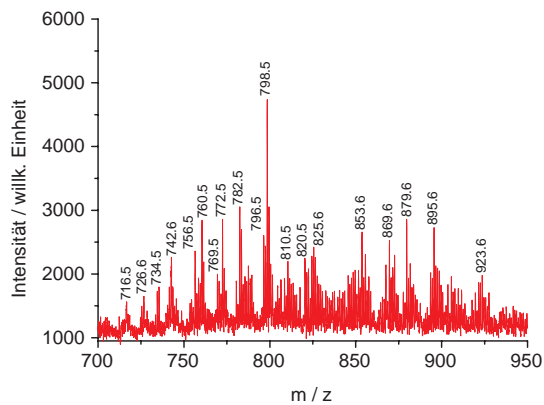
(a)



(b)



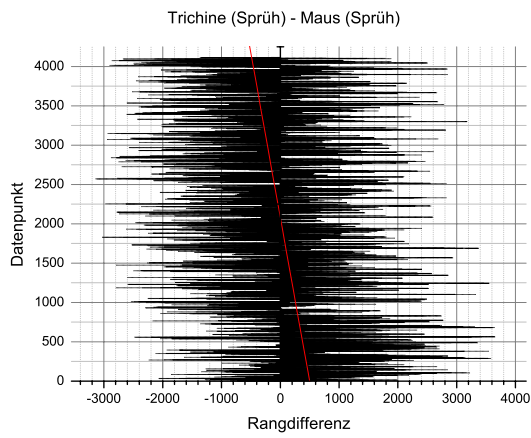
(c)



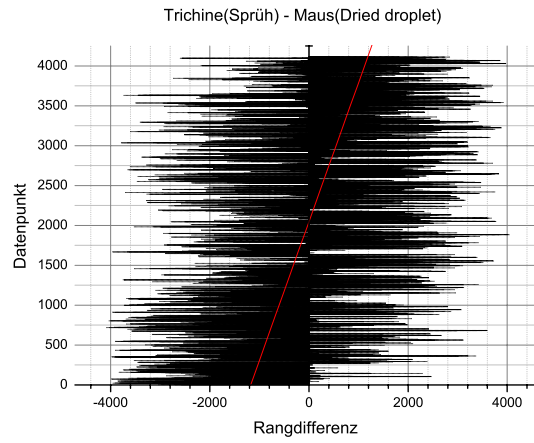
(d)

Abbildung 5.81: Quergestreiftes Muskelgewebe der Maus. Spraypräparation mit 2,5-DHB-Matrix. Summenspektrum aus 89 Einzelspektren von verschiedenen Messstellen. (a) Übersicht, (b - d) Ausschnitte von (a).

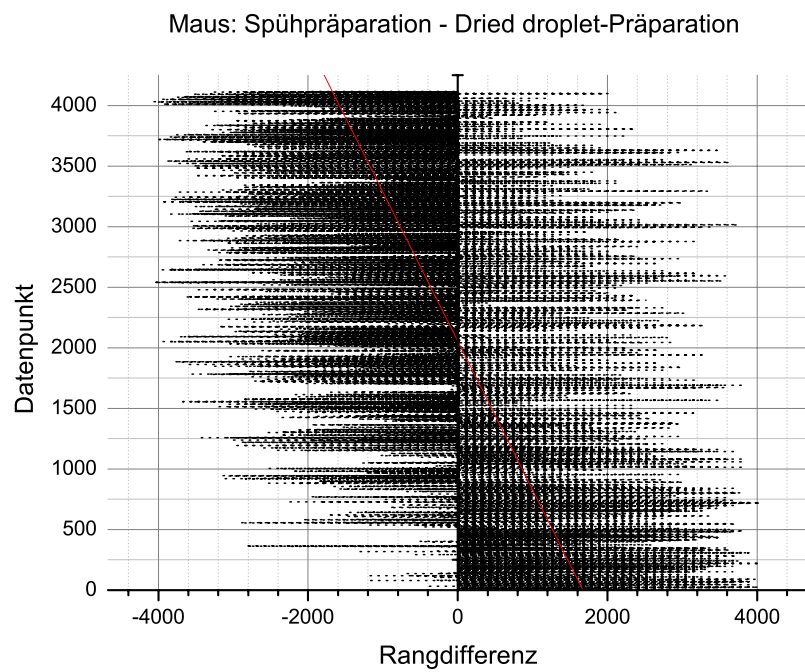




(a)



(b)

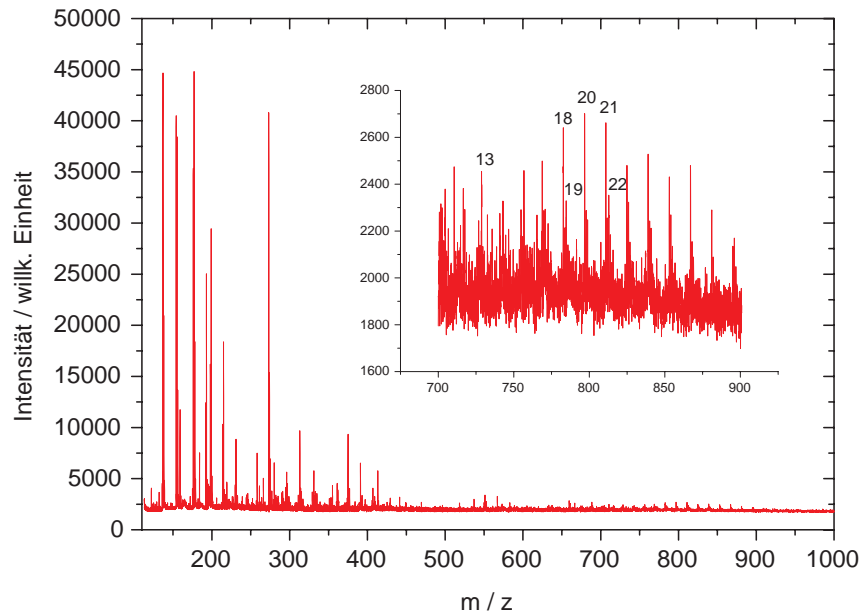


(c)

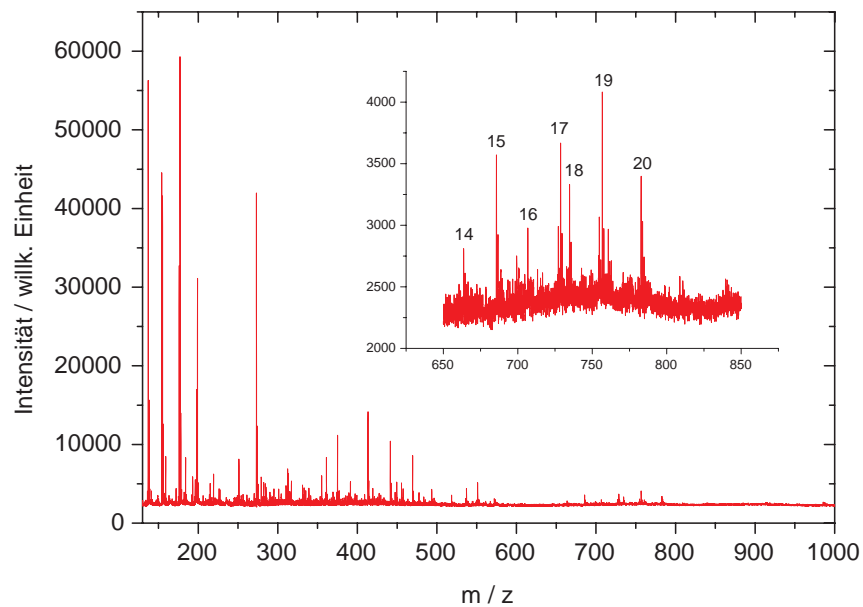
Abbildung 5.82: (a) Rangvergleich Trichine gegen Mausgewebe (Sprühpräparation). (b) Trichine gegen Mausgewebe (Dried droplet-Präparation). (c) Mausgewebe (Sprühpräparation) gegen Mausgewebe (Dried droplet-Präparation). (d) Rangdifferenz nach Datenpunkten.

## 5.5.3 Mikrosondenmessungen an humanen Einzelzellen

Sprühpräparation an Eukaryotenzellen



(a)



(b)

Abbildung 5.83: MALDI-MS an einzelnen Eukaryotenzellen nach Präparation aus Zellkulturen. Spraypräparation mit 2,5-DHB-Matrix. (a) A498-Zellen, (b) T2-Zellen. In den Spektren sind, wegen der besseren Übersichtlichkeit, nicht alle Peaks markiert.

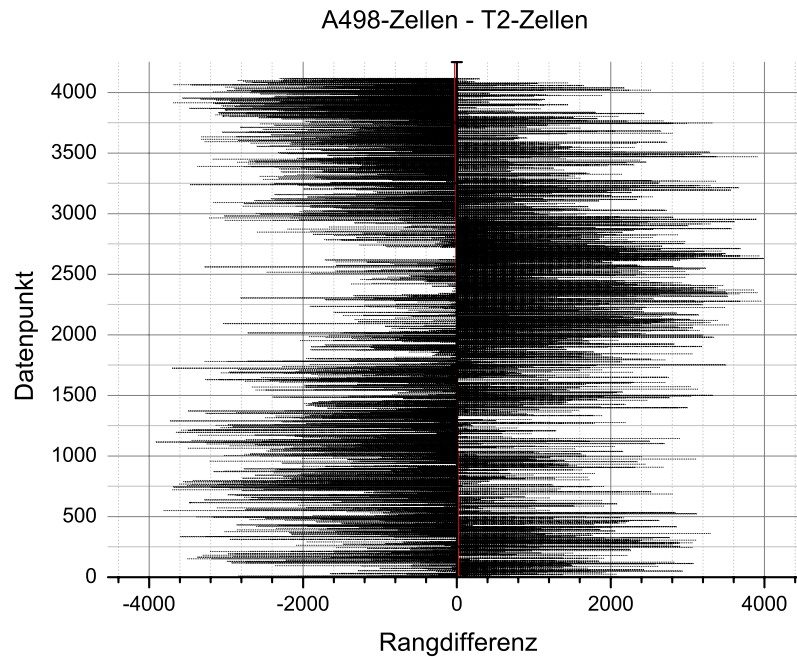


Abbildung 5.84: Rangdifferenz-Plot der Zellkulturmessungen im Massenintervall  $m/z$  700 -  $m/z$  900. (b) Rangdifferenz.

Die vergleichenden Messungen an den beiden humanen Zellpräparationen zeigt eine deutliche Verteilung von strukturbildenden Phospholipiden (siehe auch Massentabellen im Anhang). Hierbei sind Unterschiede zwischen den Zelllinien feststellbar, die aber nicht eindeutig auf z.B. einen spezifischen Membranaufbau zurückzuführen sind, obwohl dies aufgrund der sehr verschiedenen Aufgaben der untersuchten Zellen im Organismus (A498 = Nierenzellen, T2 = Hybridomazellen, Blut) nicht unwahrscheinlich erscheint. Die Bildung der Rangdifferenzen zeigt hier, abweichend zu den anderen Plots in diesem Abschnitt, keine eindeutige Tendenz zu positiven oder negativen Differenzen in niedrigen bzw. hohen Datenpunkten (rote durchgezogene Trendlinie).

Tabelle 5.29: Peakliste der MALDI-Messung an A498-Zellen. Mehrfachzuordnungen sind möglich, werden explizit aber hier nicht angegeben. Peak Nr.7 = PC(26:3) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.8 = PC(26:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.9 = PC(30:1). Peak Nr.10 = PC(28:3) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.11 = PC(31:2), nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.12 = PC(29:1) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.13 = PC(32:1). Peak Nr.14 = PC(30:1) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.15 = PC(32:1) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr.16 = PC(31:1) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.17 = PC(32:2) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.18 = PC(33:2) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.19 = PC(33:1) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.20 = PC(34:2) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.21 = PC(35:2) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.22 = PC(36:2) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.23 = PC(38:1) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr.24 = PC(38:2) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.25 = PC(39:2) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.26 = PC(41:1) als  $[M + Na]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.27 = SM(27:0) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr.28 = SM(28:0) als  $[M + K]^+$ .

Nr.	Label dp	$[u]$	Max. in dp	$[u]$
1	14089.960	518.429	14089	518.392
2	14561.918	537.103	14561	537.066
3	14910.268	551.098	14909	551.047
4	15302.733	567.081	15302	567.051
5	15689.970	583.075	15689	583.035
6	17469.066	659.415	17468	659.368
7	17629.674	666.538	17629	666.508
8	18120.518	688.543	18119	688.475
9	18473.133	704.572	18472	704.520
10	18603.113	710.527	18603	710.522
11	18734.486	716.571	18734	716.549
12	18995.393	728.651	18994	728.586
13	19079.256	732.555	19078	732.497
14	19295.670	742.679	19298	742.788
15	19552.066	754.762	19552	754.759
16	19593.672	756.732	19592	756.653
17	19848.281	768.844	19848	768.830
18	20138.258	782.755	20139	782.791
19	20180.250	784.780	20178	784.671
20	20430.746	796.913	20429	796.828
21	20716.643	810.874	20717	810.892
22	21001.598	824.910	21001	824.881
23	21283.264	838.903	21283	838.890
24	21563.230	852.928	21563	852.916
25	21841.273	866.971	21840	866.906
26	22116.707	880.996	22117	881.011
27	22390.926	895.070	22389	894.971
28	22660.820	909.032	22661	909.041
29	53129.332	3179.747	53128	3179.618
30	54779.629	3342.050	54778	3341.887

Tabelle 5.30: Peakliste der MALDI-Messung an T2-Zellen. Peak Nr.1 = PC-Kopfgruppe. Peak Nr.13 = PE(24:4). Peak Nr.15 = SM(12:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr.16 = PC(30:0). Peak Nr.17 = PC(30:0) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr.18 = PC(32:0). Peak Nr.19 = PC(32:0) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr.20 = PC(34:1) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr.21 = PC(36:2) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr.22 = PC(36:1) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr.23 = SM(23:0) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend. **Verifizierte Massen:** Peak Nr.1,  $\delta m = 394.8$  ppm. Peak Nr.18,  $\delta m = 243.1$  ppm.

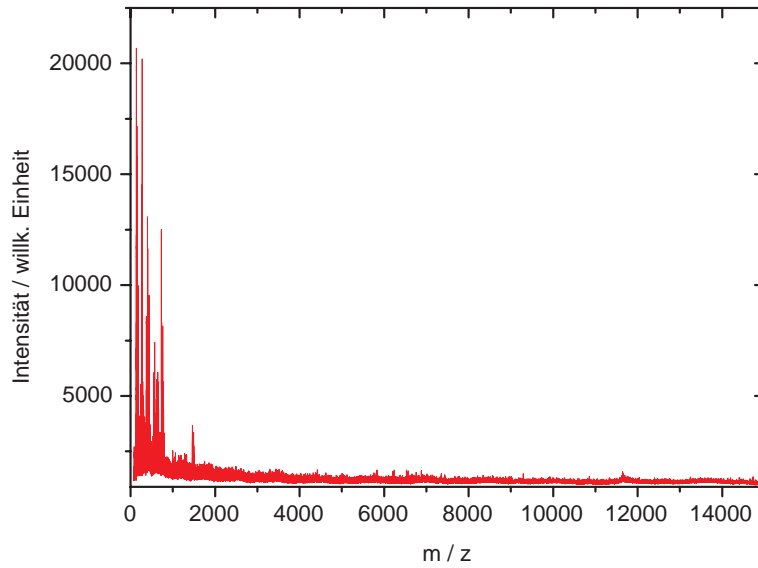
Nr.	Label [dp]	[u]	Max. [dp]	[u]
1	3408.208	184.146	3407	184.118
2	9534.779	355.178	9534	355.153
3	9717.770	361.143	9717	361.118
4	10141.028	375.130	10140	375.096
5	10621.315	391.323	10621	391.312
6	11259.514	413.370	11259	413.352
7	12048.183	441.449	12047	441.406
8	12810.958	469.484	12810	469.448
9	13446.319	493.495	13446	493.483
10	14090.912	518.467	14090	518.431
11	14564.143	537.192	14563	537.146
12	14912.354	551.182	14912	551.168
13	15427.324	572.203	15426	572.148
14	17563.074	663.580	17563	663.576
15	18056.209	685.640	18056	685.630
16	18519.770	706.706	18519	706.670
17	18996.857	728.719	18996	728.679
18	19126.266	734.748	19125	734.689
19	19594.256	756.760	19593	756.700
20	20138.404	782.762	20139	782.791
21	20674.004	808.784	20673	808.735
22	20715.191	810.803	20714	810.745
23	21294.508	839.464	21294	839.439

### 5.5.4 Mikrosondenmessungen an Hefezellen

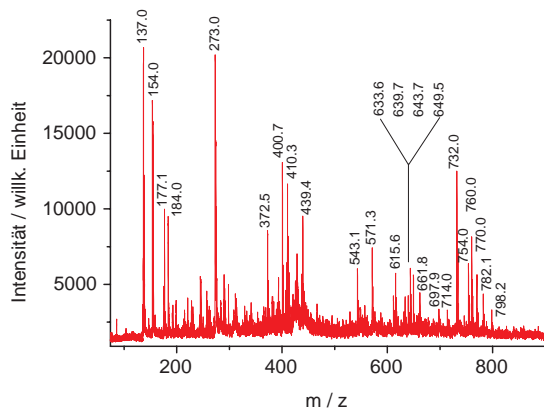
Die Qualität der nach einer Sprühpräparation erhaltenen Spektren von Hefezellen (*S. cerevisiae*) ist zunächst überraschend. Es zeigen sich sowohl im niedrigen, als auch im mittleren und im höheren Massenbereich auswertbare Peaksignale, die eindeutig organischen Ursprungs sind. Bei den (relativ) hohen Massen handelt es sich dabei sehr wahrscheinlich um Oligosaccharide aus der Zellwand. Die Signale im niedrigen Massenbereich sind sehr wahrscheinlich Phospholipiden zuzuordnen, die aus der Zellmembran stammen (siehe auch Massentabellen im Anhang). Aufgrund der unzureichenden Massengenauigkeit der vorliegenden Messungen kann aber keine abschliessend eindeutige Identifizierung erfolgen.

In einer Reihe von weiteren Messungen u.a. an Extrakten aus getrockneten Hefezellen, konnte nach einem bekannten Protokoll [302] eine Zuordnung der einzelnen Spektrenbestandteile aus Abbildung 5.85 zu Zellwand und Zellmembran erfolgen. Eine Sprühpräparation mit der Matrix 2,5-DHB erwies sich hier bei allen Messungen als die geeignetste Präparationsmethode, einerseits hinsichtlich eines guten SNR, wie andererseits einer homogenen Abdeckung aller Präparatbestandteile.

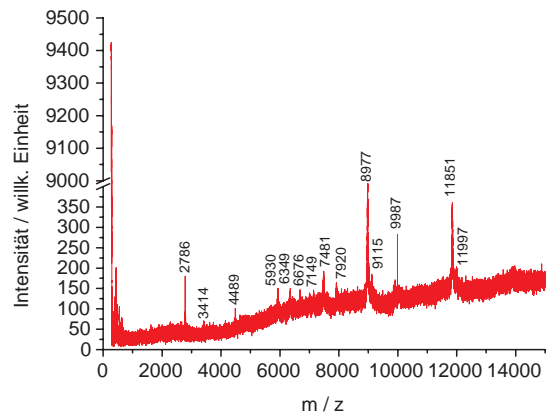
*Saccharomyces cerevisiae*



(a)



(b)



(c)

Abbildung 5.85: (a) Reflektromessung: Sumpenspektrum aus 119 Einzelspektren von einer Messstelle. (b) Ausschnitt aus (a). (c) Linearermessung an einer Hefezellpräparation (Sprühpräparation mit 2,5-DHB). Sumpenspektrum aus 41 Einzelspektren an einer Messstelle.



Tabelle 5.31: Peakliste 1: Sprühpräparation an Hefezellen. Peak Nr.2 = PC-Kopfgruppe. Peak Nr.42 =  $[Hex_2 + Na]^+$ . **Verifizierte Masse:** Peak Nr.2,  $\delta m = 400.3$  ppm.

Nr.	Label dp	[u]	Max. in dp	[u]
1	4580.594	154.020	4574	153.879
2	5929.452	184.147	5929	184.136
3	6260.833	191.960	6258	191.893
4	6301.794	192.937	6303	192.966
5	6515.397	198.072	6517	198.111
6	6556.084	199.058	6554	199.007
7	7160.750	213.996	7160	213.977
8	7200.990	215.010	7204	215.085
9	7433.694	220.916	7433	220.899
10	7710.857	228.056	7709	228.008
11	7746.877	228.992	7748	229.022
12	7783.543	229.947	7784	229.959
13	7821.948	230.950	7820	230.899
14	8271.595	242.848	8271	242.832
15	8314.556	244.001	8313	243.959
16	8348.487	244.913	8346	244.846
17	8384.271	245.877	8385	245.896
18	8423.093	246.924	8423	246.922
19	8540.081	250.095	8539	250.066
20	8791.059	256.966	8789	256.909
21	8934.476	260.934	8933	260.893
22	9041.780	263.923	9040	263.873
23	9365.324	273.038	9363	272.972
24	9574.711	279.019	9574	278.999
25	9719.854	283.203	9718	283.149
26	9916.439	288.920	9914	288.849
27	10018.292	291.904	10018	291.896
28	10123.637	295.007	10119	294.870
29	10232.980	298.245	10232	298.216
30	10324.909	300.981	10324	300.954
31	10571.013	308.367	10570	308.336
32	10669.234	311.339	10668	311.302
33	11303.859	330.890	11302	330.832
34	11369.297	332.940	11367	332.868
35	11536.833	338.217	11534	338.127
36	11621.104	340.887	11621	340.884
37	11724.906	344.190	11724	344.161
38	11842.049	347.937	11840	347.871
39	12004.900	353.179	12005	353.183
40	12222.179	360.235	12222	360.229
41	12309.581	363.093	12309	363.074
42	12367.900	365.006	12367	364.977
43	12485.612	368.883	12486	368.896
44	12586.508	372.222	12585	372.172
45	12668.908	374.961	12663	374.764
46	12845.215	380.854	12846	380.880
47	13200.468	392.867	13199	392.817
48	13416.639	400.269	13415	400.212
49	13590.559	406.274	13589	406.220
50	13664.943	408.856	13665	408.858
51	13693.430	409.847	13693	409.832
52	13789.641	413.203	13789	413.180
53	13990.333	420.247	13989	420.200
54	14175.733	426.807	14175	426.781
55	14204.852	427.842	14205	427.847
56	14238.746	429.048	14240	429.093
57	14270.299	430.173	14267	430.055
58	14512.643	438.858	14512	438.835
59	14576.592	441.165	14577	441.179
60	15224.926	464.889	15223	464.818
61	15384.358	470.818	15385	470.842

Tabelle 5.32: Peakliste 2: Sprühpräparation an Hefezellen. Peak Nr. **88** = PC(26:1). Peak Nr. **92** = PC(26:1) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr. **95** = PC(26:0) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **99** = PC(29:1) als  $[M + Na]^+$ , nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **100** = PC(31:2), nicht natürlich vorkommend. Peak Nr. **101** = PC(32:2). Peak Nr. **102** = PC(32:2) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr. **103** = PC(34:2). Peak Nr. **104** = PC(32:2) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **105** = PC(34:2) als  $[M + Na]^+$ . Peak Nr. **106** = PC(34:2) als  $[M + K]^+$ . Peak Nr. **108** = SM(23:0) als  $[M + K]^+$ , nicht natürlich vorkommend.

Nr.	Label dp	[u]	Max. in dp	[u]
62	16002.378	494.157	16002	494.143
63	16356.707	507.793	16356	507.766
64	16521.541	514.199	16521	514.178
65	16918.477	529.792	16918	529.773
66	17107.344	537.293	17106	537.239
67	17231.730	542.261	17230	542.192
68	17357.215	547.297	17356	547.248
69	17443.801	550.786	17443	550.753
70	17578.873	556.249	17578	556.214
71	17654.475	559.319	17653	559.259
72	17802.889	565.371	17803	565.375
73	17861.525	567.770	17860	567.708
74	17922.604	570.276	17922	570.251
75	18044.438	575.289	18044	575.271
76	18311.547	586.357	18311	586.334
77	18480.336	593.406	18479	593.350
78	18740.842	604.367	18739	604.289
79	18929.920	612.385	18929	612.346
80	18978.775	614.466	18976	614.348
81	19257.076	626.384	19256	626.338
82	19302.625	628.346	19302	628.319
83	19350.391	630.406	19350	630.389
84	19398.176	632.471	19397	632.420
85	19535.246	638.412	19536	638.445
86	19582.408	640.462	19581	640.401
87	19629.240	642.502	19628	642.448
88	19759.369	<b>648.185</b>	19758	648.126
89	19902.230	654.454	19901	654.400
90	19992.135	658.415	19990	658.321
91	20038.557	660.464	20037	660.396
92	20262.201	<b>670.384</b>	20260	670.286
93	20395.977	676.352	20396	676.353
94	20532.176	682.456	20531	682.403
95	20666.693	<b>688.511</b>	20665	688.435
96	20841.885	696.438	20841	696.398
97	20886.240	698.452	20885	698.396
98	20907.223	699.406	20906	699.350
99	21191.213	712.379	21192	712.415
100	21276.996	716.321	21274	716.183
101	21580.469	<b>730.354</b>	21579	730.286
102	22049.049	<b>752.289</b>	22048	752.240
103	22177.156	<b>758.343</b>	22176	758.288
104	22386.326	<b>768.279</b>	22385	768.216
105	22637.643	<b>780.303</b>	22638	780.320
106	22968.518	<b>796.275</b>	22968	796.250
107	23100.504	802.692	23101	802.716
108	23849.215	839.578	23846	839.418
109	24207.082	857.502	24206	857.447
110	24759.279	885.530	24758	885.464
111	25302.697	913.552	25301	913.464
112	25821.180	940.695	25820	940.633
113	26880.389	997.381	26879	997.306
114	29237.674	1129.489	29237	1129.450
115	32180.293	1305.926	32181	1305.970
116	33318.484	1377.604	33317	1377.510
117	33586.047	1394.732	33586	1394.729
118	33770.688	1406.613	33769	1406.505
119	34249.539	1437.661	34249	1437.626
120	34585.668	1459.658	34585	1459.614
121	35010.727	1487.714	35010	1487.665

Tabelle 5.33: Nominelle Peakmassen der potentiellen Glycane aus der Vermessung von Hefezellen (Abbildung 5.85 c). Signale i.d.R. als  $[M + X]^+$  mit  $X = \text{Na}^+, \text{K}^+, \text{NH}_4^+$ .

Nr.	av. mass [u]
121	2786
122	3414
123	4489
124	5930
125	6349
126	6676
127	7149
128	7481
129	7920
130	8977
131	9115
132	9987
133	11851
134	11997

### 5.5.5 Fazit

Es zeigte sich im Laufe der Versuche, daß bereits ohne vorausgehenden Verdau der Proben zumindest eine eingeschränkte MALDI-MS-Analytik möglich ist, da einige Signalmuster bezogen auf die untersuchten Spezies (relativ) nur mit geringen Unterschieden vorkommen. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Signale von Phospholipiden im Intervall von  $m/z$  500 u bis  $m/z$  1000 u. Eine einfache und effektive Art eines automatischen Mustervergleiches bietet hier die Generierung von Ranglisten und Ranglistenvergleichen als Vorstufe zu einer weiterführenden Ranganalyse [303]. Eine differenzierte Ranganalyse ist in dieser Arbeit aber nicht durchgeführt worden. Neben dem direkten Vergleich der Spektren wird durch die Bildung von Rangdifferenzen eine Identifizierung erster Hinweise auf Ähnlichkeiten zwischen Signalmustern in Spektren möglich, ohne dabei eine exakte Kenntnis über die chemische Struktur der beteiligten Analyte vorauszusetzen. Die exakte Identifizierung chemischer Unterschiede bedingt i.d.R. zuvor die eindeutige Kenntnis der einzelnen chemischen Ionenspezies, was wiederum nur mittels hochauflösender Massenspektrometrie zu leisten ist. Eine exakte Identifizierung chemischer Ähnlichkeit bleibt deshalb bei komplexen nativen Proben in jedem Fall einem direkten Vergleich der MS-Daten z.B. mit verifizierten MS-Referenzdaten vorbehalten, an die sich dann weitere statistische Methoden anschließen können. In der Analyse zeigte sich, daß die Präparationstechnik einen überaus großen Einfluss auf die „Ähnlichkeit“ der Spektren in nahezu identischen Proben hat. Beispielhaft wurde dies an den nativen biologischen Gewebeschnitten einer Maus gezeigt. Ein Abgleich der Spektrendaten mit theoretischen Ionenmassen von Phospholipidvertretern (siehe Anhang) zeigt einige (wenige) Übereinstimmungen, deren sichere Identifizierung letztlich (nur) an zwei Phospholipiden möglich war. Es handelt sich dabei um die Lecithine PC (32:0) und PC (34:1). Diese Phospholipide sind Bestandteil tierischer Zellmembrane und konnten auch in den vermessenen Pilzproben (*S. cerevisiae*) gefunden werden. Vor allem die Quasimolekülionen mit Natrium und Kalium sowie die PC-Kopfgruppe sind bei Messungen mit kleinem Laserfokus ( $d \approx 1 \mu m$ ) zur bildgebenden Darstellung mit einer räumlichen Auflösung im einstelligen Mikrometermaßstab geeignet.

Es zeigte sich bei diesen Vergleichen, daß bereits ohne chemische Zusatzinformation eine eingeschränkte Regressionsanalyse der geordneten Datenpunktintensitäten sinnvolle Ergebnisse erzeugt. Da bei den untersuchten Proben teilweise unterschiedliche Funktionalitäten vorliegen (Zellen aus differenziertem Gewebe, Einzeller), muss davon ausgegangen werden, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit auch ein evolutiver Zusammenhang bei erhaltenen Ähnlichkeiten besteht. Interessant ist, wie bereits gesagt, daß Präparationstechniken einen Einfluss auf die Analyse haben. Der Vergleich von Sprüh- mit Dried droplet-Präparationen zeigt, daß hier zumeist aufgrund sehr unterschiedlicher Intensitäts- und SNR-Verteilungen Abweichungen in den nach Datenpunkten geordneten Rängen auftreten. Vergleicht man die zentroiden Peakmassen in den erhaltenen MALDI-TOF-Spektren mit den theoretischen Massen in Frage kommender Molekülionen bestimmter Substanzklassen, so wird deutlich, daß zu einer eindeutigen Strukturbestimmung, bis auf wenige Ausnahmen, hochauflösende Spektrometer ( $R \geq 30000$ ) mit sehr geringer Massenabweichung und ggf. zusätzlich MSMS-Messungen nötig sind (Massetabellen im Anhang). In nahezu allen Spektren in denen Phospholipide auftreten, zeigt sich eine „Doppelbindungsverteilung“ der Gestalt, daß neben der Peakverteilung von Lipiden mit mindestens einfach ungesättigten Fettsäureketten auch die Vertreter mit den gesättigten Fettsäureketten vorkommen ( $\Delta m \approx 2$  Da). Ebenso tritt häufig eine Serie mit  $\Delta m \approx 28$  Da auf ( $C_2H_4$ -Differenz). Dies entspricht den Erwartungen bei einer komplexen Lipidzusammensetzung und nicht vorgetrennten Proben.

Der gefundene Einfluss der Präparationstechniken auf die Analyse hat darüberhinaus Bedeutung bei einer bildgebenden Analytik. Dried droplet-Präparationen neigen bekanntermaßen zu einer Hot-Spot-

Bildung im Präparat, homogene Sprühpräparationen können dagegen sehr gut die relative Intensitätsverteilung von Analyten in nativen biologischen Proben abbilden und eignen sich deshalb hervorragend zur Anwendung bei bildgebenden Mikrosonden-Messungen, wie hier im nächsten Abschnitt gezeigt werden wird. Die sehr einfache Methode einer intensitätsabhängigen Rangbildung der Datenpunkte in einem Spektrum ermöglicht eine erste (schnelle) und von einem tieferen Verständnis der chemischen Zusammensetzung der erhaltenen Signale zunächst unabhängige Möglichkeit zum Vergleich von Massenspektren, auch wenn diese an unterschiedlichen Spektrometern aufgenommen wurden. Die Rangbildung ergibt hierbei einen von der tatsächlichen Intensität in den Spektren freigemachten Datensatz, der ggf. aber auch zu einer weiteren Verarbeitung (z.B. einer Peakerkennung) herangezogen werden kann. Über die Bildung der absoluten oder relativen Rangdifferenzen kann eine Mustererkennung durchgeführt werden. Da bei der Differenzbildung der Rang-Spektren die Übereinstimmung der Datenpunkte bei einem Vergleich mit erkannten Peaks aus den Intensitäts-Spektren sehr genau sein muss, ist es hier hilfreich neben dem markierten (virtuellen) Datenpunkt aus einem Intensitäts-Spektrum, auch den Datenpunkt mit der Maximalintensität in einem erkannten Peak zu betrachten. Aufgrund der großen Anzahl der Datenpunkte in einem Spektrum bzw. bereits in einem Spektrenausschnitt ist eine weitere manuelle Bearbeitung und Bewertung i.d.R. nicht möglich. Es bieten sich hier eine Reihe von weiterführenden multivariaten statistischen Verfahren an, die in einer Vielzahl kommerzieller Programme enthalten sind, die in dieser Arbeit aber nicht eingesetzt wurden.



## Kapitel 6

# Ergebnisse der bildgebenden Experimente

### 6.1 Artificielle Matrix-Präparationen

Bei den hier dargestellten Ergebnissen handelt es sich um MALDI-Proben, die auf unterschiedlichen Targetmaterialien aufgebracht und am Spektrometer LAMMA 2000 bildgebend vermessen werden. Die in die Silizium-Wafer geätzten Mikrostrukturen (siehe S. 169) eignen sich besonders zum Auftrag artifizierender Proben mit der Methode des Sprühens. Alle anderen Matrixpräparationsverfahren, wie z.B. dried droplet oder auch das Druckverfahren, eignen sich nicht zu einer vergleichbar guten Darstellung der Strukturen mittels der bildgebenden Massenspektrometrie. In den Abbildungen 6.1 und 6.4 sind zunächst Messungen dokumentiert, bei denen es sich um reine Matrixpräparationen, mit der Substanz 2,5-DHB handelt. Diese zeigen die prinzipielle Leistungsfähigkeit bei der Abbildung von Strukturen vergleichbarer Größe und Form, anhand von Messungen am Spektrometer LAMMA 2000. Hierbei werden, bis auf wenige bekannte und prinzipiell vermeidbare Artefakte, realitätstreue Darstellungen der vermessenen Objekte erzeugt.

#### 6.1.1 Abbildung von Hohlraumlinien nach Sprühpräparation

In Abbildung 6.1 sind die geätzten Linienstrukturen zu erkennen. Es handelt sich bei dem vermessenen Bereich um einen Randbereich, der an den vertikalen Flanken keine geätzten Strukturen aufweist (siehe Abbildung 6.2). Innerhalb der in die Tiefe gehenden Linien-Hohlräume bleibt die während der Sprühpräparation aufgebrachte und auskristallisierte Matrix auch nach einer mechanischen Oberflächenreinigung mit einem feinen wenige Millimeter großen Chloropren-Kautschukstreifen (Neopren) erhalten. Die Oberflächenreinigung wird dabei unter lichtmikroskopischer Kontrolle durchgeführt. Die Ionenintensitätsverteilungsbilder der Spalten (a) bis (c) in Abbildung 6.1 zeigen dabei in absteigender Reihenfolge Verteilungen der 2,5-DHB-Massensignale  $m/z$  137,  $m/z$  154 und  $m/z$  273. Sie stellen drei unmittelbar benachbarte Bereiche dar, die nacheinander und an derselben Präparation aufgenommen wurden. Die Rasterrichtung verläuft in allen Darstellungen von links nach rechts und von oben nach unten. Diese Rasterorientierung wird in ULISSES als *regulär* bezeichnet. Die Ionenintensitätsverteilungsbilder in Abbildung 6.1 lassen keine Artefakte erkennen. Die Stege an der Oberfläche des Wafers werden mit ca. 5  $\mu\text{m}$  und die Breite der geätzten Linien werden mit ca. 15  $\mu\text{m}$ , durch die Ionenintensitätsverteilungsbilder der Infokusmessungen, korrekt dargestellt.



Tabelle 6.1: Parameterkombinationen zu den Messungen von Abbildung 6.1.

Geräteparameter	
Targetpotential	: 10 kV
Blendenpotential	: 7.5 kV
Gitterpotential	: 0 kV
MCP-Potential	: -1.96 kV
z-Achsenposition	: in b*, fix
Laserpulsenergie	: ca. 90 $\mu J$
Abschwächung	: 32
ND-Filter	: kein Filter
Restgasdruck	: ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Puls-pro-Pixel	: 1
Schrittweite	: 1 $\mu m$
Pixelkantenlänge	: 1 $\mu m$
Raumtemperatur	: ca. 18°C
Scangeschwindigkeit	: ca. 8 Hz
Kontrastauflösung	: 1 Byte/Pixel
* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.	
Präparationsparameter	
Matrix	: 2,5-DHB
Molmasse	: 154.7 Da
Summenformel	: $C_7H_6O_4$
Konzentration	: 30 mg/ml
Lösungsmittel	: EtOH/0.1% TFA, 1:1 (v/v)
Präp.-Technik	: Sprühpräparation, modifiziert
Raumtemperatur	: ca. 18°C
Umgebungsdruck	: Sprükkammervordruck ca. 1 bar
Umgebungsgas	: Stickstoff

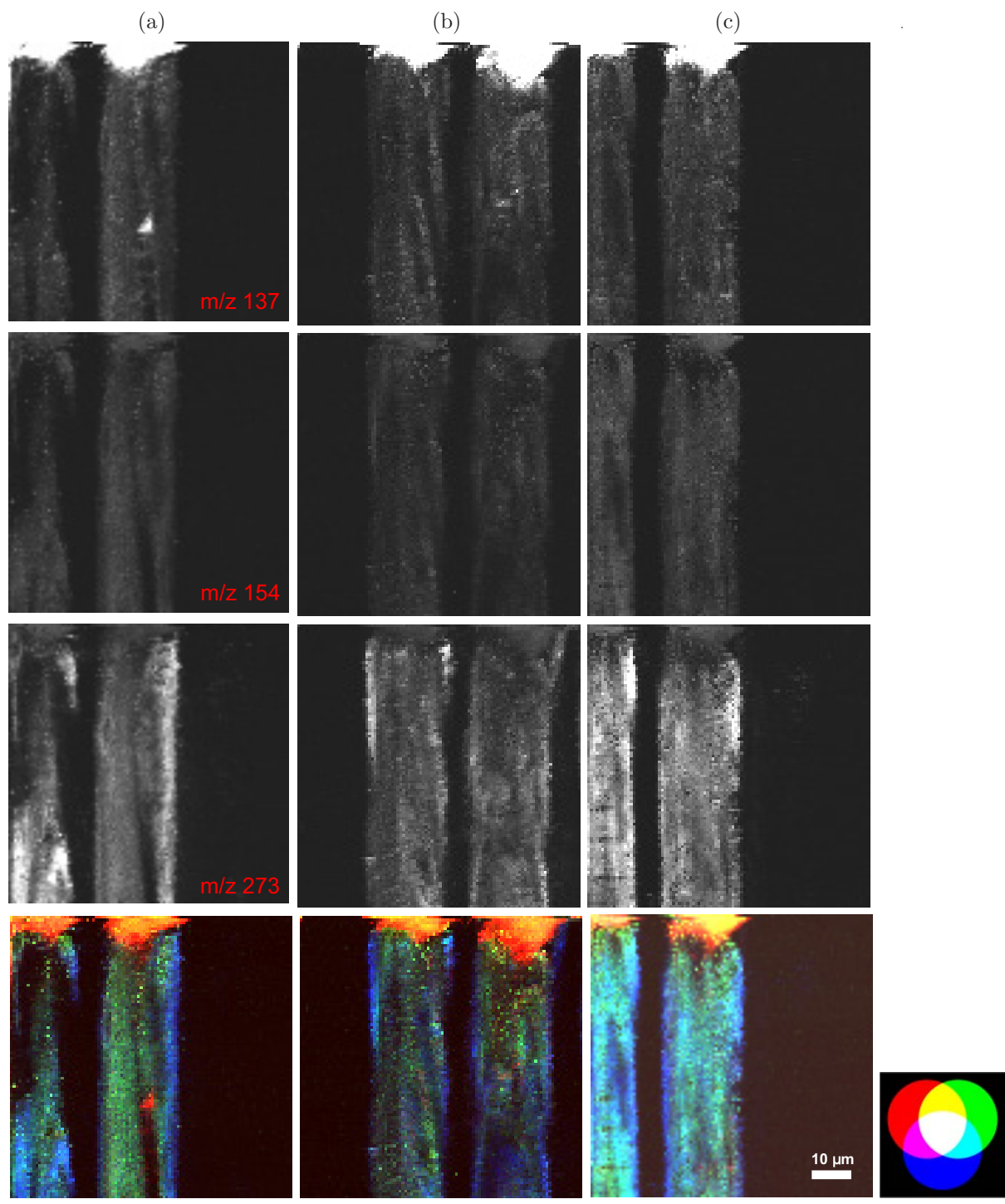
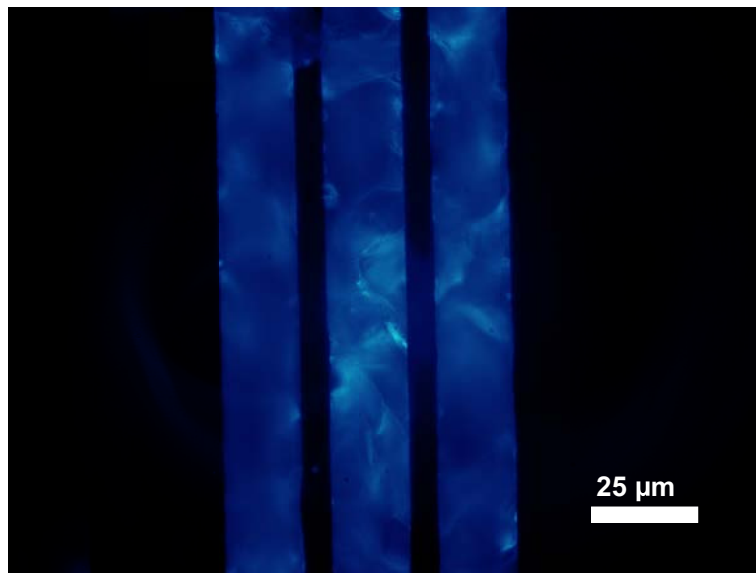


Abbildung 6.1: Darstellung der in einem Siliziumwafer geätzten Linien durch Ionenintensitätsverteilungsbilder der Matrixsignale  $m/z$  137 (R), 154 (G), 273 (B) in den ersten drei Zeilen sowie RGB-Überlagerungsbilder der Spalten (a - c) in der letzten Zeile. Aufnahme am Spektrometer LAMMA 2000 mit zentrischer Laserjustierung. **Pixelgröße = 1 µm.**



---

Abbildung 6.2: Epifluoreszenz der Matrix 2,5-DHB in den geätzten Linienstrukturen des verwendeten Silizium-Wafer. Erkennbar ist die vereinzelte Randlage dreier Linienhöhlräume. Zur Größenorientierung siehe auch Abbildung 4.18, S. 169.

### 6.1.2 Abbildung von Hohlräumlinien nach Dried droplet-Präparation

In einem weiteren Versuch ist untersucht worden, ob die Linienhölräume adäquat durch Signale von Peptidionenverteilungen dargestellt werden können. Hierbei ist zur Präparation eine Art Dried droplet-Methode verwendet worden. Da die Sprühpräparation Matrix und Analyte über einem Präparat gleichmäßig verteilt, ist sie bei Verwendung von Lösungen mit Peptidkonzentrationen um  $c \approx 10^{-4}$  M und einem effektiven Auftrag von ca. 30 %, der auf das Sprühvolumen bezogenen Masse, sehr ineffektiv bzw. teuer. Da die Desorptions-/Ionisierungsbedingungen von der Waferoberfläche zudem deutlich schlechter sind, als von entsprechenden goldbeschichteten Probenträgern, ist eine Methode, die dagegen zu lokaler Konzentrierung der Analyte neigt hier klar von Vorteil, soweit eine Befüllung der Hohlräumlinien mit geeigneten Lösungsmitteln sichergestellt werden kann. In Abbildung 6.3 sind die Ergebnisse der rasternden Vermessung der modifizierten Dried droplet-Präparation mit einer 2,5-DHB/Melittin-Lösung zu erkennen. Das Messraster ist dabei gegenüber der vertikalen Linienstruktur, in etwa um einen Winkel von  $\angle = 4^\circ$  verschoben, d.h. die Linien werden schräg von links unten nach rechts oben abgebildet. Diese Anordnung vermindert das laterale Auflösungsvermögen der Methode. In Teilbild (a) ist deutlich zu erkennen, daß die Matrixsignale im Sättigungsbereich der Empfindlichkeitseinstellung des Transientenrekorders, bei einer Auswahl von 40 mV im Vollausschlag, liegen. Die Einstellung entspricht der höchsten Sensitivität der verwendeten Transientenrekorderelektronik.

Tabelle 6.2: Parameterkombinationen zu den Messungen von Abbildung 6.3.

Geräteparameter	
Targetpotential	: 10 kV
Blendenpotential	: 7.5 kV
Gitterpotential	: 0 kV
MCP-Potential	: -1.96 kV
z-Achsenposition	: in b*, fix
Laserpulsenergie	: ca. 50 $\mu$ J
Abschwächung	: 40
ND-Filter	: kein Filter
Restgasdruck	: ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Puls-pro-Pixel	: 1
Schrittweite	: 1 $\mu$ m
Pixelkantenlänge	: 1 $\mu$ m
Raumtemperatur	: ca. 18°C
Kontrastauflösung	: 1 Byte/Pixel
* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.	
Präparationsparameter	
Analyt	: Melittin
Molmasse	: 2845 Da
Summenformel	: $C_{99}H_{155}N_{31}O_{23}$
Konzentration	: $1.0 \cdot 10^{-4}$ M
Lösungsmittel	: EtOH/0.1% TFA, 3:7 (v/v)
Präparationsvolumen	: 8.5 $\mu$ l
Matrix	: 2,5-DHB
Molmasse	: 154.7 Da
Summenformel	: $C_7H_6O_4$
Konzentration	: 10 mg/ml
Lösungsmittel	: Aceton/0.1% TFA, 1:1 (v/v)
Präp.-Technik	: Dried droplet, modifiziert
Raumtemperatur	: ca. 18°C
Umgebungsdruck	: Atmosphärendruck
Umgebungsgas	: Luft
Präparationszeit	: ca. 1 min.
Target	: strukturierter Silizium-Wafer

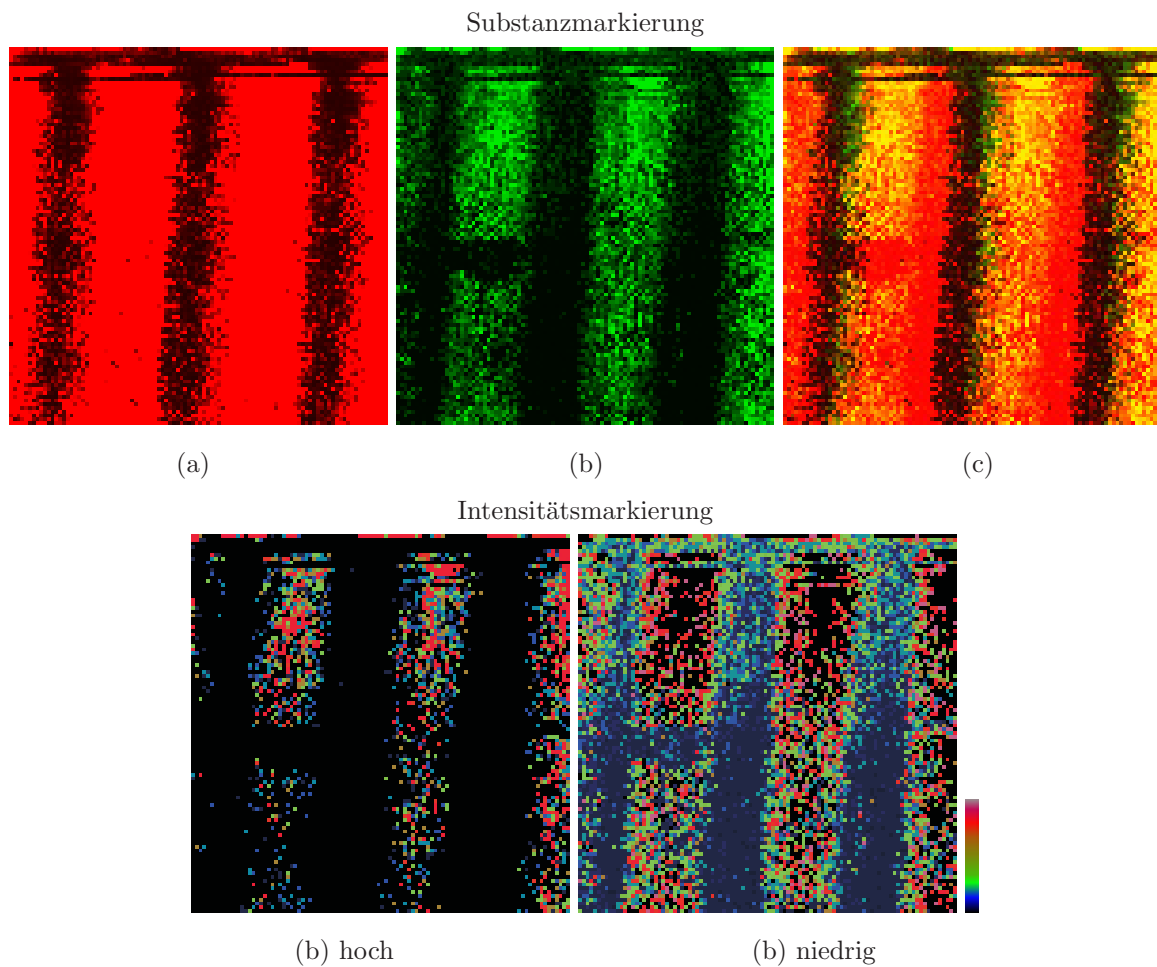


Abbildung 6.3: Peptidmessung in Linienstrukturen des Silizium-Wafer. (a) Signalintensitätsverteilung 2,5-DHB  $m/z$  137, (b) Signalintensitätsverteilung Melittin  $m/z$  2845 und (c) Überlagerung der Massesignale  $m/z$  137 und  $m/z$  2845. Untere Reihe: Intensitätsverteilung der Melittinsignale. Linkes Bild: relativ hohe Signalintensitäten ( $I > 0.5 \times I_{max}$ ), rechtes Bild: relativ niedrige Signalintensitäten ( $I \leq 0.5 \times I_{max}$ ).

In der Abbildung (b) ist die Verteilung des Peptides Melittin, anhand der detektierten Signalintensität der nominalen Masse  $m/z$  2845 u, zu erkennen. Unterteilt man den Intensitätsbereich (40 mV Vollausschlag) in hohe ( $> 50$  % max. Intensität) und niedrige ( $\leq 50$  % max. Intensität) Intensitäten und stellt die Ergebnisse als spektrales Falschfarbenbild dar, so wird deutlich, daß die intensivsten Signale aus dem seitlichen Bereich der Hohlraumlinienpräparation stammen (gelbe Pixel in c). Vermutlich hängt dies mit dem Verlauf der Matrixkristallisation und Einlagerung von Peptiden zusammen.

### 6.1.3 Abbildung von Hohlraumkreuzen nach Sprühpräparation

Die in Abbildung 6.4 erkennbaren Darstellungen zeigen anhand der Matrixmassensignale  $m/z$  137 (a.1, b.1, c.1) und  $m/z$  273 (a.2, b.2, c.2) sowie der Verteilung des leichten Kaliumisotops (a.3, b.3, c.3) die kreuzförmigen Ätzstrukturen der vermessenen Silizium-Wafer (siehe auch Abb. 4.18). Die Präparation ist in diesem Fall nicht durch eine nachträgliche mechanische Oberflächenreinigung verändert worden. In den Bildern sind deshalb auch außerhalb der geätzten Hohlraumstrukturen Matrixsignale feststellbar. Insgesamt wird anhand der detektierten Massensignale die Struktur, der zuvor lichtmikroskopisch vermessenen kreuzförmigen Ätzungen, bis auf die hier im linken Bildbereich vertikal auftretenden Artefakte deutlich erkennbar. Die Kreuzstruktur erscheint in den Abbildungen aber auch vertikal in die Länge gezogen. Diese Verzerrung basiert zum Teil auch auf der Asymmetrie des Laserpulsprofils, wird aber hauptsächlich durch die mechanisch unterstützte Positionsarretierung der Piezokristalle, bei einer zu starren Klemmung der Elektrode hervorgerufen (Asymmetrie  $\geq 1.19$ , siehe Tabelle 4.6, S.150). Der eintretende Effekt wird auch durch die Wahl der Rasterrichtung beeinflusst (*regular*, *irregular*). Es handelt sich um Aufnahmen, bei denen die Probenebene in der Nähe des oberen Endes des Rayleighbereiches liegt. Der voreingestellte Rasterbereich von  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  erzeugt deshalb hier reale Ablationsmaße, die einer Rasterfläche von ca.  $68 \mu\text{m} \times 56 \mu\text{m}$  entsprechen.

Tabelle 6.3: Parameterkombinationen zu den Messungen von Abbildung 6.4.

#### Geräteparameter

Targetpotential	:	10 kV
Blendenpotential	:	7.5 kV
Gitterpotential	:	0 kV
MCP-Potential	:	-1.96 kV
z-Achsenposition	:	in b*, fix
Laserpulsenergie	:	ca. 92 $\mu\text{J}$
Abschwächung	:	32
ND-Filter	:	11 %-Filter
Restgasdruck	:	ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Schuss-pro-Pixel	:	1
Schrittweite	:	1 $\mu\text{m}$
Pixelkantenlänge	:	1 $\mu\text{m}$
Raumtemperatur	:	ca. 18°C
Kontrastauflösung	:	1 Byte/Pixel

\* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.

#### Präparationsparameter

Matrix	:	2,5-DHB
Molmasse	:	154.7 Da
Summenformel	:	$C_7H_6O_4$
Konzentration	:	30 mg/ml
Lösungsmittel	:	EtOH/0.1% TFA, 1:1 (v/v)
Präp.-Technik	:	Sprühpräparation
Raumtemperatur	:	ca. 18°C
Umgebungsdruck	:	Sprühgasvordruck 1 bar
Umgebungsgas	:	Stickstoff
Präparationszeit	:	ca. 20 min.

In Abbildung 6.5 sind logische Operationen mit den Signalintensitäten der Messungen aus der Spalte (a) gezeigt. Zum Vergleich ist das lichtmikroskopische Auflichtbild des Rasterbereiches dargestellt. Die logischen Operationen der Matrixsignale  $m/z$  137 (a.1) und  $m/z$  273 (a.2) zeigen einerseits, daß geringfügige Positionsunterschiede im Auftreten der Signale bestehen. Überlagert man beide Signale im Bild der Gestalt, daß entweder nur Pixel mit einer Intensität dargestellt werden die immer beide Signale

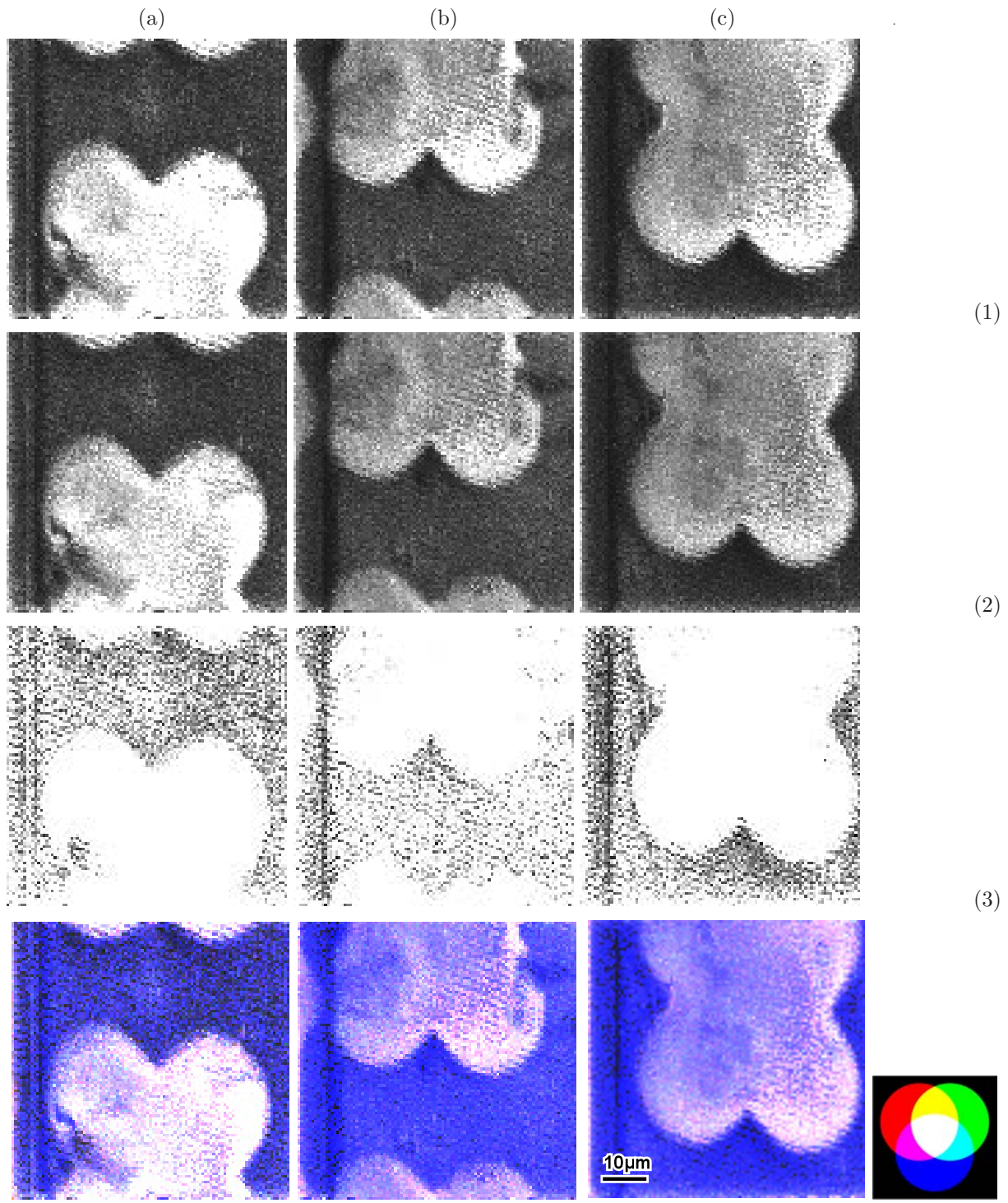


Abbildung 6.4: Darstellung der in einen Siliziumwafer geätzten Kreuzstrukturen anhand der Ionenintensitätsverteilungsbilder der Matrixsignale  $m/z$  137 (R), 273 (G) und des Kaliumsignals  $m/z$  39 (B) sowie RGB-Überlagerungsbilder unmittelbar benachbarter Strukturen (a - c). Aufnahme am Spektrometer LAMMA 2000 mit zentrischer Laserjustage. **Pixelgröße = 1  $\mu m$ .**

enthalten (AND) oder aber alle Pixel die mindestens ein Signal, entweder  $m/z$  137 oder  $m/z$  273 (OR) enthalten, verändert sich im Wesentlichen die Ähnlichkeit der abgebildeten Struktur nicht. Stellt man dagegen nur die Pixelintensitäten dar, die (ausschließlich) entweder die eine oder die andere Intensität



enthalten, verbleibt dagegen lediglich der Umriss der geätzten Struktur erhalten. Aufgrund der deutlichen Sättigung der Kaliumsignale wirkt sich das Kriterium, das nur Summenpixelintensitäten dargestellt werden die beide Matrixsignale und zusätzlich ein Kaliumsignal aufweisen ebenfalls gering aus.

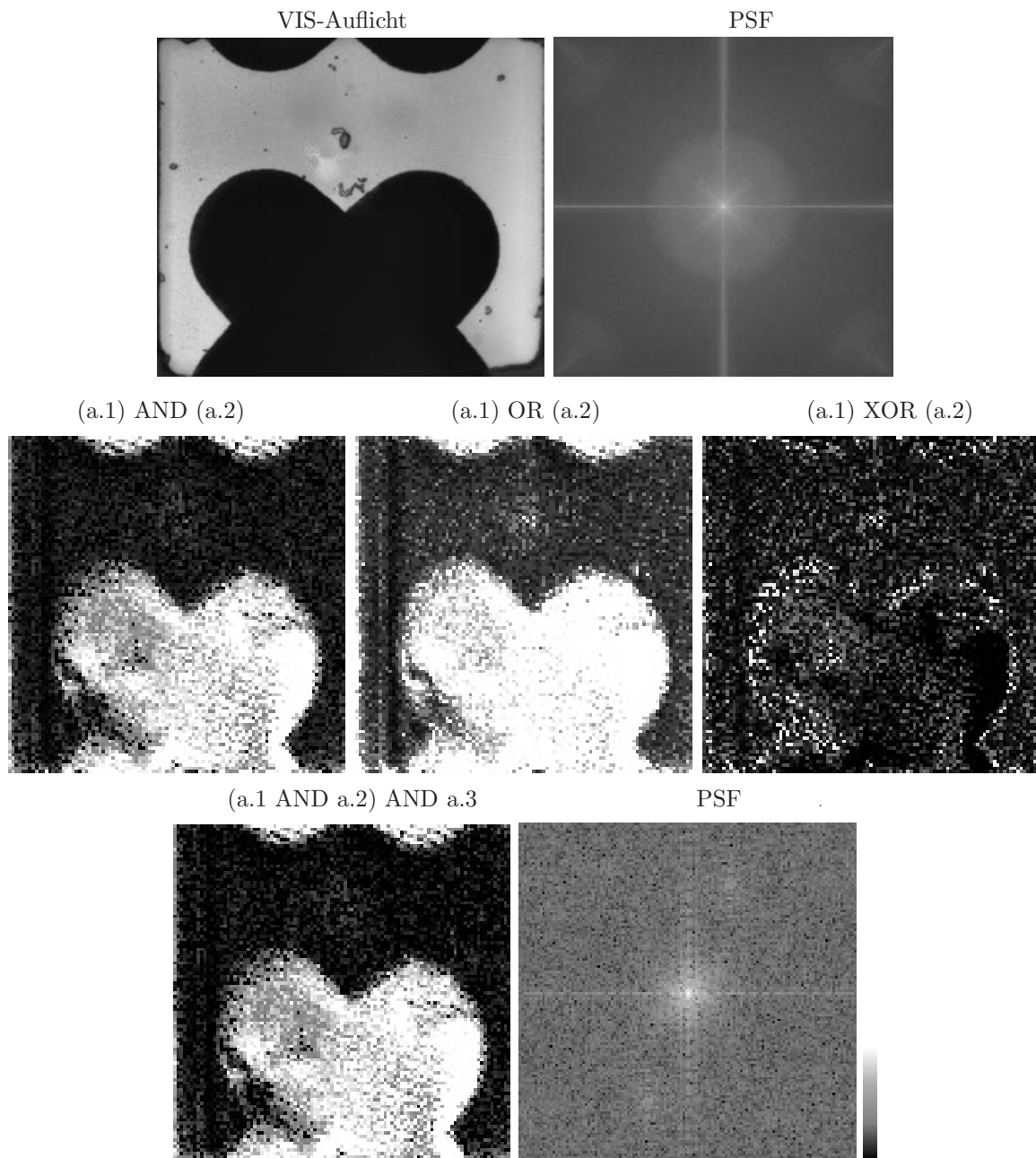


Abbildung 6.5: Logische Operationen an den Aufnahmen der Spalte (a) aus Abbildung 6.4: (a.1) AND (a.2); (a.1) OR (a.2); (a.1) XOR (a.2) sowie (a.1 AND a.2) AND  $[K]^+$ .

Bei allen rasternden MALDI-Messungen an den geätzten Silizium-Wafern konnten auch bei gleichmäßiger Bedeckung der intakten Waferoberfläche um die Mikrohohlraumstrukturen herum, relativ starke Ionensignale nur am Randbereich oder innerhalb der Hohlraumstruktur erhalten werden. Eine Ausnahme stellen Signale von Natrium- und/oder Kaliumionen dar, wenn mit der empfindlichsten Einstellung des Transientenrekorders gemessen wird (40 mV Vollausschlag). Hierbei erreichen Na/K-Ionen innerhalb der Hohlraumstrukturen den Sättigungsbereich – ihre Peakintensität wird abgeschnitten. Eine i.d.R. recht aufwendige Reinigung der Waferoberfläche von aufgebrachtener Matrix, stellte sich im Laufe der Messungen (bei den meisten Fragestellungen) als nicht notwendig heraus.

Ein Grund weshalb diese Strukturen bei den Messungen mit hinreichend guter Qualität dargestellt werden können, obwohl die umliegende Umgebung bei Einzelpulsmessungen einen (oberflächlich betrachtet) gleichwertigen Matrix- bzw. Analytauftrag zeigt, könnte in der physikalischen Struktur des Silizium-Wafers bzw. dessen Oberflächenschichtung liegen (siehe auch S. 169). Bei höherer Bestrahlung wird auch die Waferoberfläche direkt bestrahlt, was eine größere Anzahl von freigesetzten Elektronen bedeuten könnte. Diese könnten dann zu einer Neutralisation der positiven Ladungsträger führen. Nur an Bereichen einer Präparation, bei der die Waferoberfläche nicht bzw. schwächer bestrahlt wird, verändert sich das Verhältnis der Elektronen/Ionen, da hier im fokalen Bestrahlungsvolumen im wesentlichen nur Matrix vorhanden ist. Eine andere Erklärung könnte im höheren Desorptionsvolumen, das an den Hohlraumstrukturen vorliegt, zu finden sein d.h. einfach auf den relativen Intensitätsunterschieden basieren. Sehr wahrscheinlich kommt aber eine Kombination beider Effekte vor. In Abbildung 6.6 sind Epifluoreszenzaufnahmen nach einer Sprühpräparation mit der Matrix 2,5-DHB zu sehen. Abbildung 6.7 zeigt den strukturierten Wafer mit einer dünnen Beschichtung aus schwarzem Farbstoff. Die Auswirkungen von Positionierungsfehlern bei rasternden Messungen sind exemplarisch an dem Beispiel von drei hintereinander folgenden Messungen in Abbildung 6.8 gezeigt.

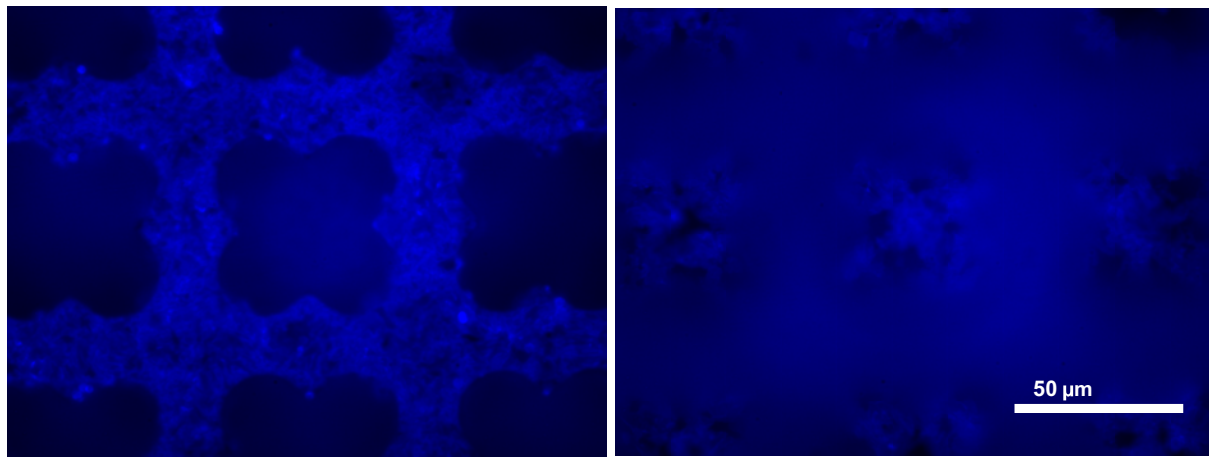


Abbildung 6.6: Epifluoreszenzaufnahmen der Matrixpräparation. Links: Waferoberfläche. Rechts: Bodenbereich der geätzten Hohlraumstruktur. **Bildmaße: 178  $\mu\text{m}$  x 133  $\mu\text{m}$  (Vergrößerung: 500x).**

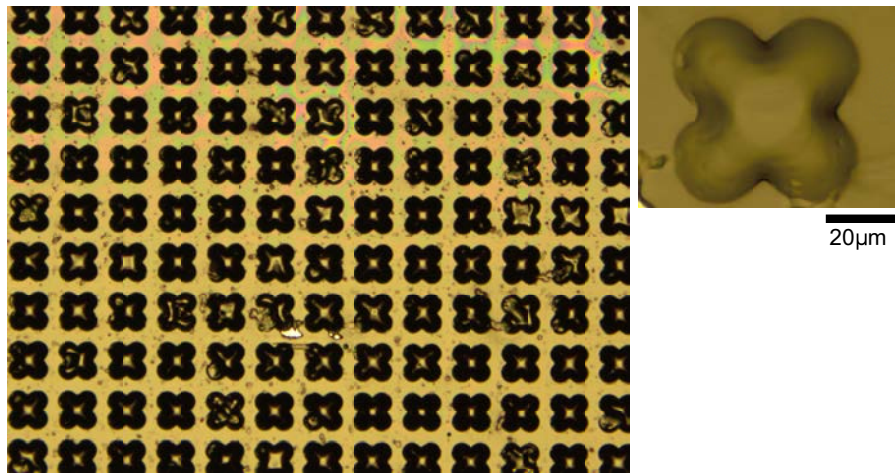


Abbildung 6.7: Lichtmikroskopische Aufnahme der Kreuzstrukturen an der Waferoberfläche, nach Auftrag von schwarzem Filzstiftfarbstoff.

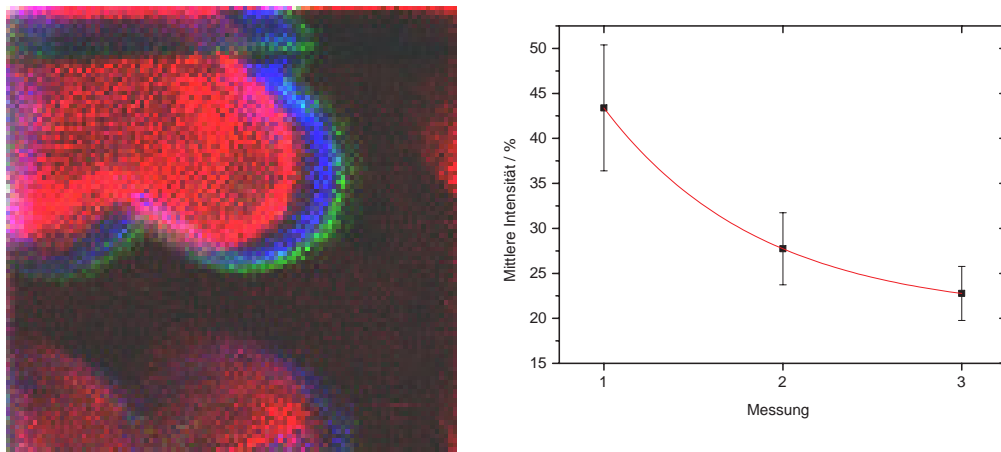


Abbildung 6.8: Positionierungsungenauigkeit des Piezoverfahrtisches bei Kontaktierung über eine Stahlelektrode ( $d = 1$  mm). (Links) Dargestellt sind drei hintereinander folgende Messungen mit einem Puls pro Pixel (1. Messung = rot, 2. Messung = blau, 3. Messung = grün). Objekt: Si-Wafer mit Kreuzstruktur nach 2,5-DHB-Spraypräparation. (Rechts) Relative mittlere Signalintensität der Masse  $m/z$  137 u, je Messung. Mittelung über jeweils 10000 Einzelspektren. Normierung auf den Matrix-Basispeak der Masse  $m/z$  137. Die waagerechte Verschiebung bei drei Messungen beträgt ca. 10 Pixel. Die senkrechte Verschiebung ca. 5 Pixel. **Pixelgröße:  $1 \mu\text{m}$ .**

## 6.2 Laterale analytische Auflösung am Beispiel artifizierlicher Proben

### 6.2.1 MALDI-Vermessung von Linienstrukturen auf einer Goldoberfläche mit räumlicher Submikrometerauflösung

Die maximal erreichbare laterale analytische Auflösung soll hier, anhand einer MALDI-Präparation mit einem Auftrag der Analyt/Matrixlösung aus Micro-Gel-Loader-Tips abgeschätzt werden. Diese ermöglichen den Auftrag der Lösung in der Form dünner Linien. Es wird dazu ein deutlich sichtbarer Tropfen auf das Target aufgebracht. Dieser Tropfen enthält aber nur einen Bruchteil des insgesamt aufgezogenen Volumens ( $v_{Gesamt} = 10 \mu\text{l}$ ). In diesen Tropfen kann der Rand der aufliegenden Tipspitze eingetaucht und dann in einer Richtung vom Tropfen weggezogen werden. Auf diese Weise erhält man Flüssigkeitsfäden, die sich mit zunehmender Entfernung zum Tropfen verjüngen, soweit während des Vorgangs nicht erneut Lösung aus dem Tip gelangt. Die so entstandenen Linien der eintrocknenden Lösung bilden eine besonders einfache geometrische Struktur, anhand derer die laterale Auflösung des Ionenintensitätsverteilungsbildes eines Analyten bestimmt werden kann. Die Matrix kristallisiert hierbei nicht großflächig aus, sondern bildet kleinere Kristalle bzw. amorphe Bereiche. Normale Dried droplet Präparationen mit Analytlösungen (ohne Matrix) im selben Konzentrationsverhältnis, bilden beim Eintrocknen nur an den Randbereichen lokale Häufungen aus. Diese sind zudem i.d.R. breiter als  $1 \mu\text{m}$ . Zieht man zunächst, wie zuvor, nur mit Analytlösung Linien und beschichtet in einem zweiten Schritt z.B. durch eine Sprühpräparation mit Matrix, besteht die Gefahr, die erhaltenen Strukturen nachträglich zu verbreitern bzw. sie nach der Matrixpräparation nur schwer wiederfinden zu können.

Da die Laserstrahlfokussierung selbst bei zentrisch justiertem Strahl oft kein idealsymmetrisches Querschnittsprofil zeigt, muss die erreichbare laterale Auflösung nach jedem Justiervorgang und für jede Raumrichtung einzeln ermittelt werden. Der einfachste Weg hierzu ist bei einer unveränderten Lage der Probe zwischen zwei Messungen, ein Wechsel der Rasterrichtung, d.h. des 1. Probenvorschubs (Linienrichtung). Die Öffnung des Micro-Gel-Loader-Tips hat einen Durchmesser von ca.  $170 \mu\text{m}$ . Die Auflagefläche der Außenseite des Tips erzeugt beim Ziehen zwei Linien, die im Abstand von ca.  $8 \mu\text{m}$  liegen und im Lichtmikroskop betrachtet, bis unter  $1 \mu\text{m}$  dünn werden können. Dies kann anhand von Fluoreszenzbildern z.B. von 2,5-DHB oder fluorophormarkierten Peptiden auch optisch spezifisch der Verteilung von Matrix und/oder Analyt zugeordnet werden (Bilder hier nicht gezeigt). Um einen möglichst biasfreien Vergleich zwischen beiden Rasterrichtungen zu erhalten, werden beide Messungen an einer Probe mit nahezu identischer z-Achsenposition (Rückstellung des Piezotisches) im ein Puls-pro-Pixel Verfahren mit einer Digitalisierung von 1 Byte/Pixel aufgenommen. Hierzu muss eine ausreichend konzentrierte Analyt/Matrixlösung verwendet werden, da mindestens drei Messungen von einem identischen Probenareal einer Probe erfolgen sollen, um etwaige Unterschiede feststellen zu können. Die Rasterrichtung bei der die laterale Auflösung im erzeugten Ionenintensitätsverteilungsbild des identischen Signals schlechter ist, wird wiederholt vermessen.

Abbildung 6.9 zeigt die Schemazeichnung einer Gel-Loader-Spitze und MSI-Abbildungen der erhaltenen Linienstrukturen von dem präparierten Peptid Dynorphin A. Die Dimensionierung der Gel-Loader-Spitze und die Art der Präparation sind hierbei angedeutet. In Abbildung 6.10 werden die MSI-Ergebnisse bei unterschiedlicher Rasterrichtung über die Linienstruktur präsentiert. Mitdargestellt sind die 2-D-Punktverwaschungsfunktionen (PSF) und die Modulationsübertragungsfunktionen für jedes Ergebnis bei unterschiedlichen Rasterrichtungen. Die MTF der Rasterrichtung mit der höchsten Auflösung ist absch-

liessend gegen die Zyklen/Mikrometer aufgetragen. Die Darstellungen in Abbildung 6.11 stellen Liniencans aus den in Abbildung 6.9 angegebenen Bereichen der Präparation dar. Hierbei sind die relativen Signalintensitäten des Peptidanalyten Dynorphin A gegen die Entfernung in Pixeln aufgetragen.

Aus den Ergebnissen der Experimente wird klar erkennbar, daß am Spektrometer LAMMA 2000 an einer MALDI-Präparation mit Peptidanalyten einer Masse um 2 kDa eine räumliche Auflösung von unter  $1 \mu\text{m}$  erhalten werden kann.

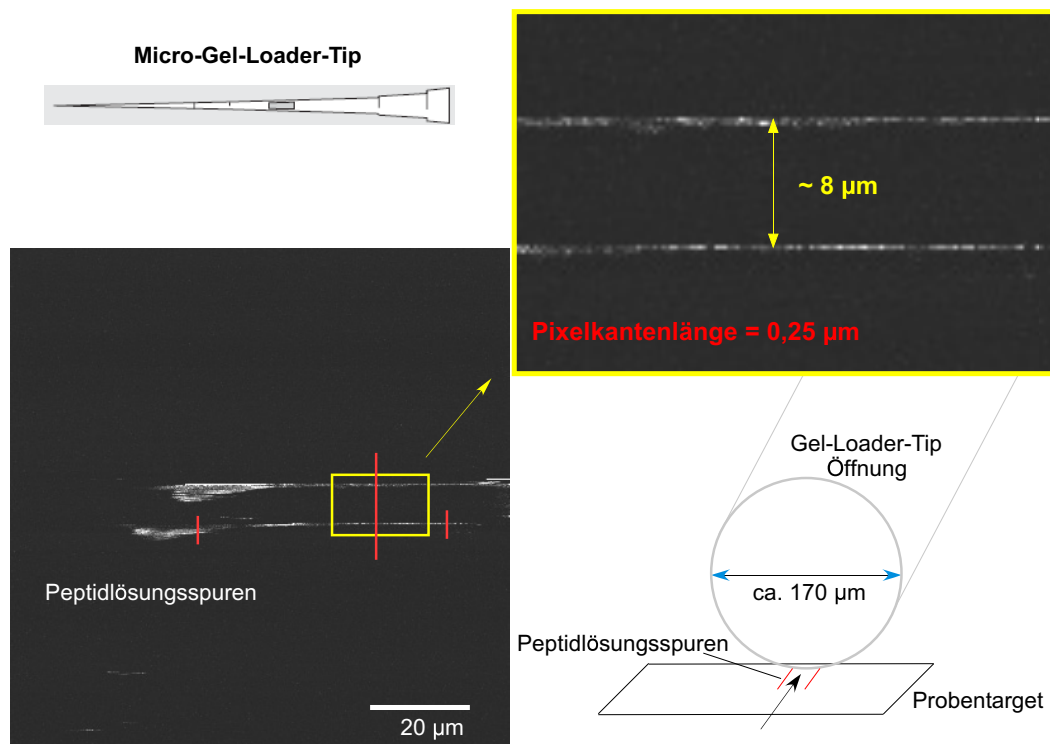
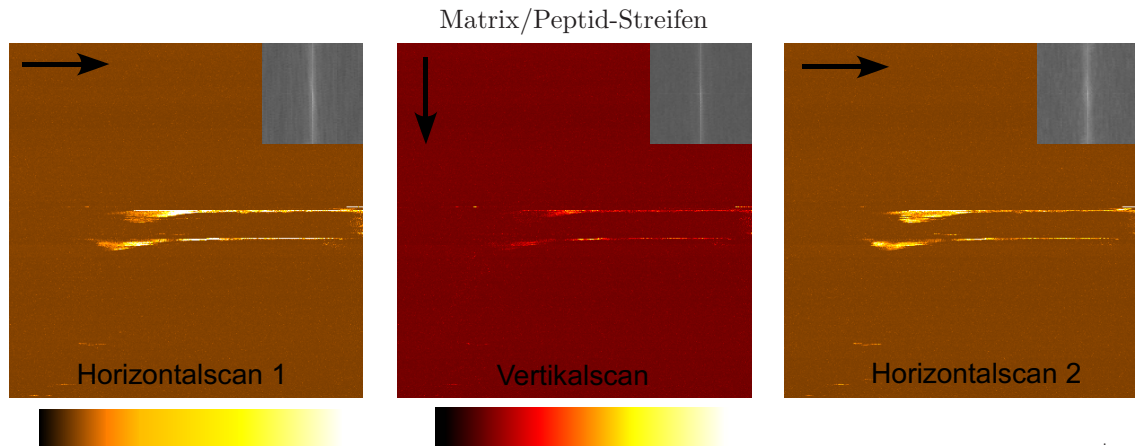


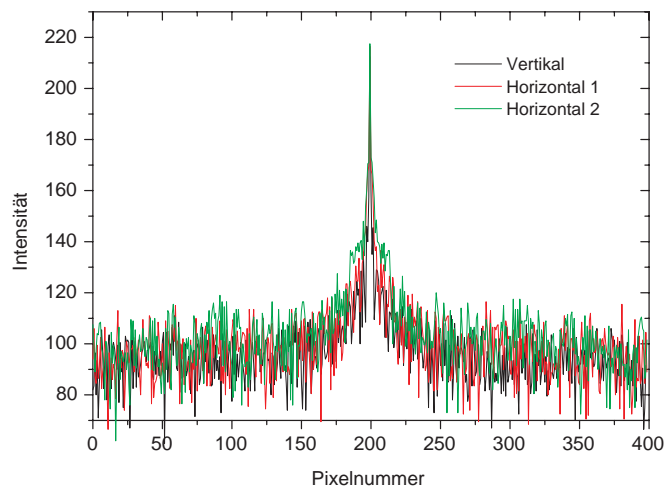
Abbildung 6.9: (Oben links) Micro-Gel-Loader-Tip-Darstellung entnommen aus Herstellerprospekt. Präparationsschema und Lage der Linienmessungen im Ionenintensitätsverteilungsbild des Peptidanalyten Dynorphin A ( $M_r = 2147.5 \text{ g/mol}$ ,  $C_{99}H_{155}N_{31}O_{23}$ ) zusammen mit der Matrix 2,5-DHB. **Pixelgröße =  $0.25 \mu\text{m}$ .**

Tabelle 6.4: Parameterkombinationen zu Abbildung 6.9 und 6.10.

Geräteparameter	
Targetpotential	: 10 kV
Blendenpotential	: 7.5 kV
Gitterpotential	: 0 kV
MCP-Potential	: -1.96 kV
z-Achsenposition	: in b*, fix
Laserpulsenergie	: ca. 47 $\mu J$
Abschwächung	: 21
ND-Filter	: kein Filter
Restgasdruck	: ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Schuss-pro-Pixel	: 1
Schrittweite	: 0.25 $\mu m$
Pixelkantenlänge	: 0.25 $\mu m$
Raumtemperatur	: ca. 18°C
Scangeschwindigkeit	: ca. 10 Hz
Kontrastauflösung	: 1 Byte/Pixel
* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.	
Präparationsparameter	
Analyt	: Dynorphin-a (1-17) Val-5-Angiotensin I Bombesin
Molmasse	: 2147.5 Da 1282.45 Da 1619.87 Da
Summenformel	: $C_{99}H_{155}N_{31}O_{23}$ $C_{61}H_{87}N_{17}O_{14}$ $C_{71}H_{110}N_{24}O_{18}$
Konzentration	: ca. $1.0 \cdot 10^{-5}$ M
Lösungsmittel	: EtOH/0.1% TFA, 3:7 (v/v)
Matrix	: 2,5-DHB
Molmasse	: 154.7 Da
Summenformel	: $C_7H_6O_4$
Konzentration	: 10 mg/ml
Lösungsmittel	: EtOH/0.1% TFA, 3:7 (v/v)
Präp.-Technik	: Dried droplet, modifiziert
Raumtemperatur	: ca. 18°C
Umgebungsdruck	: Atmosphärendruck
Umgebungsgas	: Luft
Präparationszeit	: ca. 1 min.
Target	: Aluminiumteller, vergoldet



Punktverwaschungsfunktion (PSF)



Modulationsübertragungsfunktion (MTF)

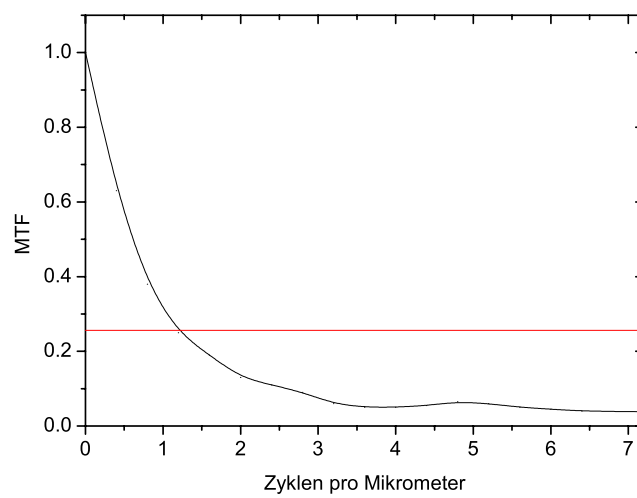
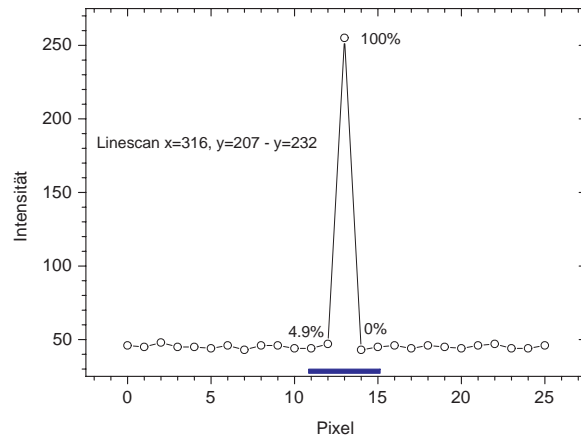
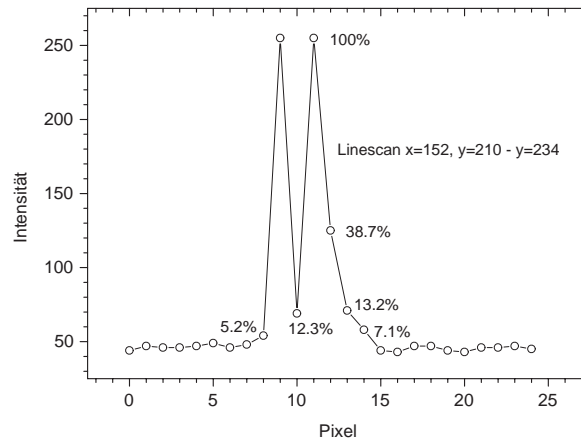


Abbildung 6.10: MS-Ionenintensitätsverteilungsbilder des Peptidanalyten Dynorphin-(1-17) und PSFs (Messreihenfolge: 1. Horizontalscan 1, 2. Vertikalscan, 3. Horizontalscan 2). Mitte: Zentraler Linescan durch die 2D-iPSFs der Abbildungen. Unten: MTF der vertikalen Rasterrichtung.

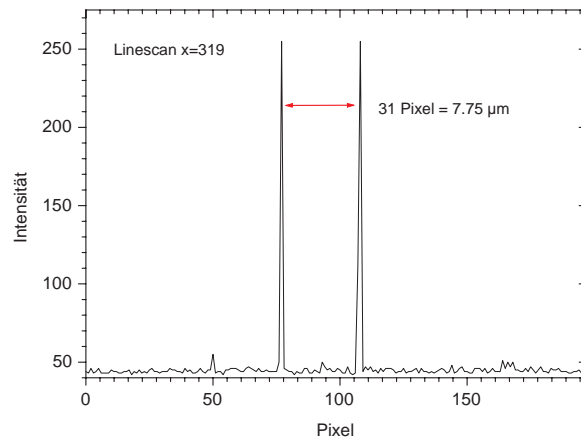




(a)



(b)



(c)

Abbildung 6.11: (a) Einzelpunkt- und (b) Zweipunktauflösung anhand der Messungen des MS-Pixelbildes Horizontalscan 1 in Abbildung 7.10. (c) Linieneabstand im Bereich sehr dünner Linien, anhand einer ein Pixel-Linie über die y-Achse. Vermessung der in Abbildung 7.9 mit roten vertikalen Linien markierten Stellen. **Schrittweite = 0.25  $\mu\text{m}$ .**

## 6.3 In- und Defokussmessungen zur Charakterisierung von Abbildungseigenschaften

### 6.3.1 Abbildung von Hohlräumkreuzen nach Sprühpräparation der Matrix

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der In- und Defokussmessungen an strukturierten Si-Wafern dargestellt. Diese Messungen sollen die Abbildungseigenschaften des Spektrometers bei einer möglichen Defokussierung aufzeigen und ggf. auftretende Effekte beschreiben.

Dargestellt werden die Ionenintensitätsverteilungsbilder der Signale  $m/z$  137 und  $m/z$  273 (Signale der Matrix 2,5-DHB) in Abbildung 6.13 (1 - 3). Diese zeigen Defokussmessungen mit unterschiedlichen Pixelgrößen und teilweise unterschiedlicher Pulszahl pro Pixel (Kennzeichnung mit Profil a). Bei allen anderen Bildern (4 - 7, Profil b) handelt es sich dagegen um Infokussmessungen. Die Defokussposition wird dabei schrittweise von einer Position (a) in Abbildung 6.12 zu einer Infokussposition (c) in Abbildung 6.12 verändert (1.-6. in Abbildung 6.13). An den Abbildungen 6.15/16 kann der Einfluss von Oversampling bei den Pixelgrößen 500 nm und 250 nm, nach einer Zusammenfassung einer zusätzlichen Anzahl benachbarter Pixel (+1, +2, +6 Pixel), betrachtet werden. Alle Bilder in diesem Abschnitt sind nacheinander und von einem nahezu gleichbleibenden Bereich aufgenommen worden. Die Matrixabdeckung der jeweils folgenden Messung ist dabei zuvor lichtmikroskopisch auf ihre Vergleichbarkeit zur vorhergehenden Präparation geprüft worden. Abbildung 6.12 zeigt die Vermessung des Laserintensitätsprofils an den unterschiedlichen Stellen der Strahlausbreitungsachse. Man erkennt darin die wechselnde Bestrahlungsfläche an den exemplarisch gewählten Positionen. Profil a (rote Kennzeichnung) in den Intensitätsverteilungsbildern entspricht dabei einem Bereich (a) in Abbildung 6.12. Profil b (rote Kennzeichnung) in den Intensitätsverteilungsbildern ist in etwa identisch mit einem Bereich (b) – (c) in Abbildung 6.12. Die Laserpulsintensität wird während der Messungen, durch Variation der Pulsleistung und/oder der Abschwächung, immer so eingestellt, daß ein  $\text{SNR} \approx 2$  ungefähr im unteren Drittel bzw. in der Mitte der Häufigkeitsskala bei der gewählten Empfindlichkeit auftritt. Die Abbildungen 6.15/16 (6), (7) sind vor der Pixelzusammenfassung zunächst auf den TIC normiert. Die Normierung auf den TIC wird gewählt, da es möglich ist, daß bei den Messungen der Basispeak im Spektrum wechselt. Wenn der jeweils abgebildete Peak nicht der Basispeak (des Spektrums) ist, kann es sein, daß eine Intensitätsverteilung nicht immer dem Verlauf der TIC-Intensität entspricht. Dies wiederum ist ungünstig, wenn ein deutlicher Intensitätsunterschied zwischen (moderaten) De- und Infokussmessungen erkannt werden soll, da der Kontrast einer Abbildung hier nur auf eine Peakintensitätsverteilung (deren Maximum) bezogen wird (siehe hierzu auch Abb. 2.8 S. 30).

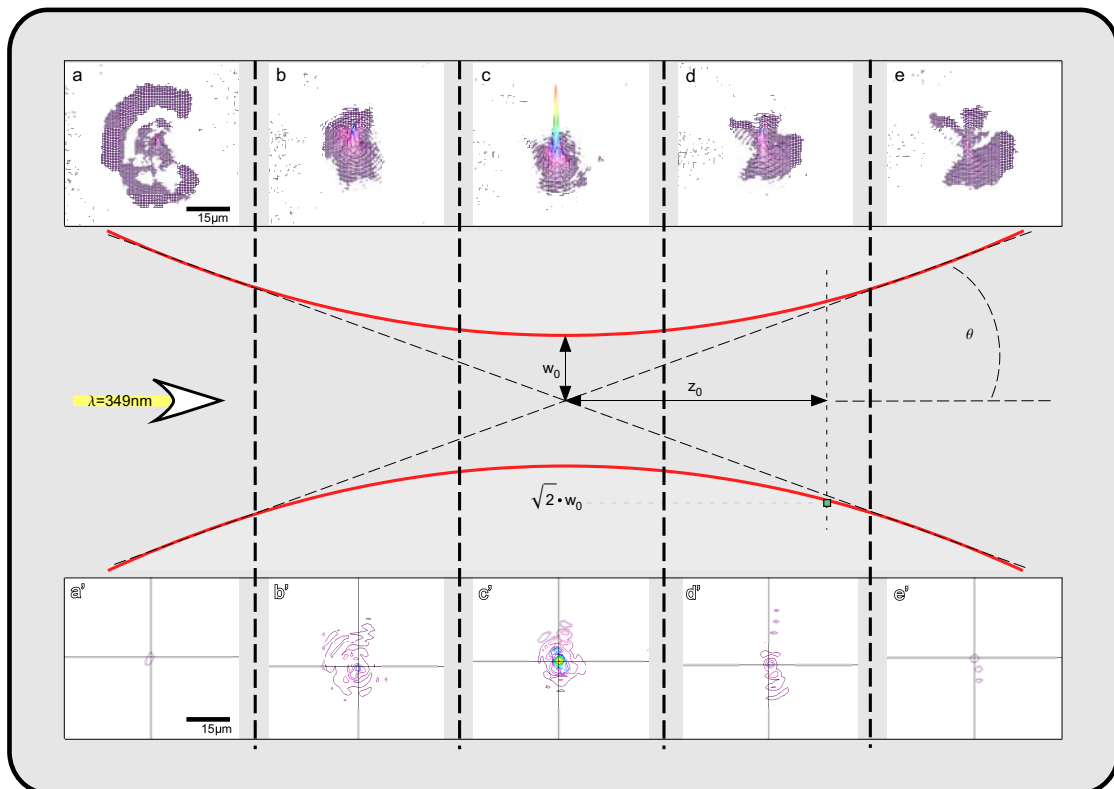


Abbildung 6.12: Laserprofile bei In- und Defokusmessungen am Spektrometer LAMMA 2000 und Verlaufsskizze der Strahl-einhüllenden.

Tabelle 6.5: Parameterkombinationen zu den Messungen von Abbildung 6.13 - 16.

## Geräteparameter

Targetpotential	:	10 kV
Blendenpotential	:	7.5 kV
Gitterpotential	:	0 kV
MCP-Potential	:	-2 kV
z-Achsenposition	:	wechselnd
Laserpulsenergie	:	von 74 $\mu\text{J}$ - 170 $\mu\text{J}$
Abschwächung	:	von 21 - 48
ND-Filter	:	kein Filter
Restgasdruck	:	ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Schuss-pro-Pixel	:	wechselnd
Schrittweite	:	wechselnd
Pixelkantenlänge	:	wechselnd
Kontrastauflösung	:	wechselnd

## Präparationsparameter

Matrix	:	2,5-DHB
Molmasse	:	154.7 Da
Summenformel	:	$C_7H_6O_4$
Konzentration	:	30 mg/ml
Lösungsmittel	:	EtOH/0.1% TFA, 1:1 (v/v)
Präp.-Technik	:	Sprühpräparation
Raumtemperatur	:	ca. 18°C
Umgebungsdruck	:	Sprühgasvordruck ca. 1 bar
Umgebungsgas	:	Stickstoff
Präparationszeit	:	wechselnd
Target	:	Silizium-Wafer

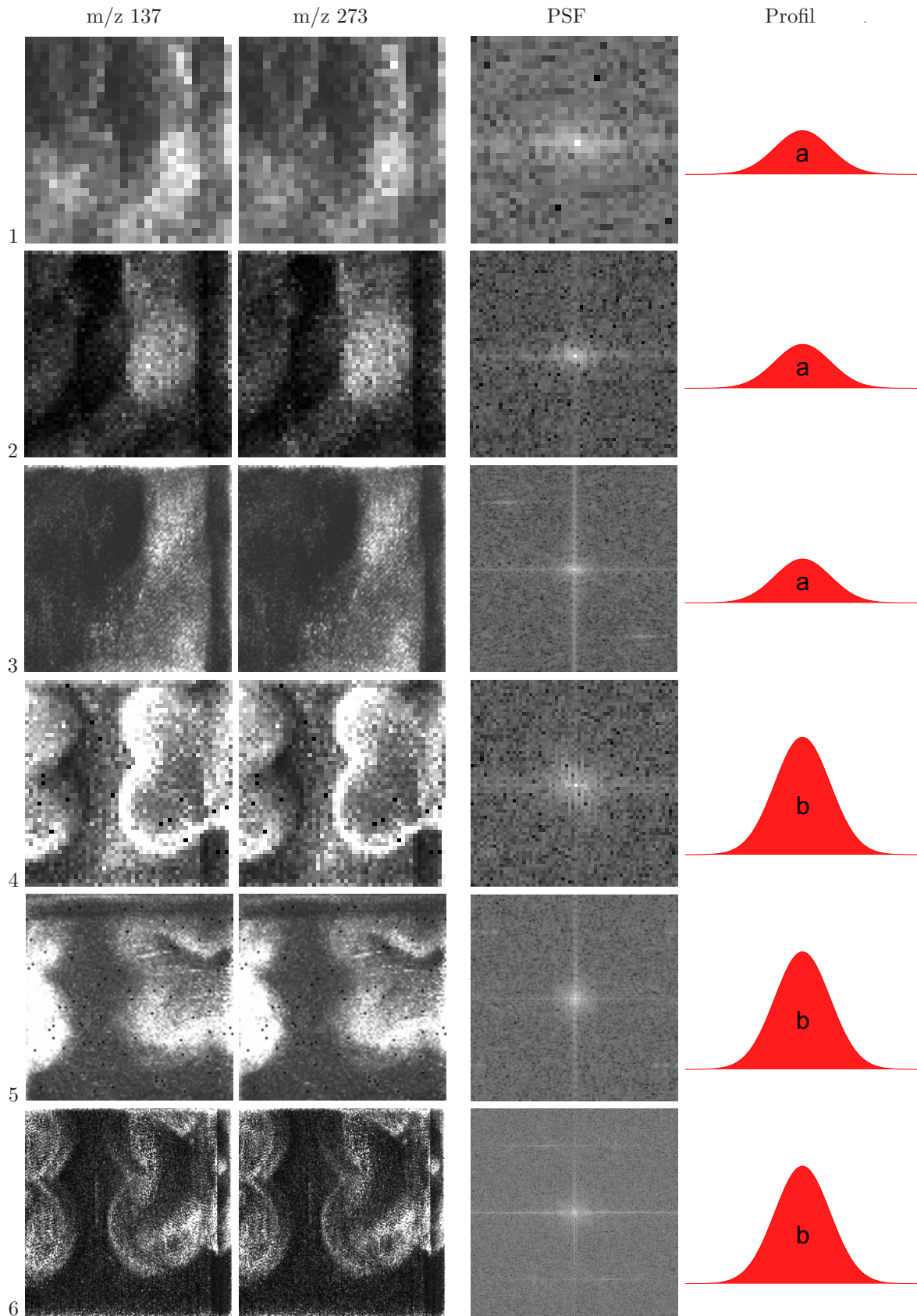


Abbildung 6.13: SMALDI-Messungen an 2,5-DHB Spraypräparationen. (1) Einzelpulsmessung, **Pixelgröße 4 μm**. (2) Zweipulse pro Pixel, **Pixelgröße 2 μm**. (3) Einzelpulsmessung, **Pixelgröße 1 μm**. (4) Einzelpulsmessung, **Pixelgröße 2 μm** (60 mV). (5) Einzelpulsmessung, **Pixelgröße 1 μm** (40 mV). (6) Einzelpulsmessung, **Pixelgröße 0.5 μm** (100 mV). Laserpulsenergie vor Abschwächung von 74 μJ bis 170 μJ. PSF = PSF von Masse 273 u.

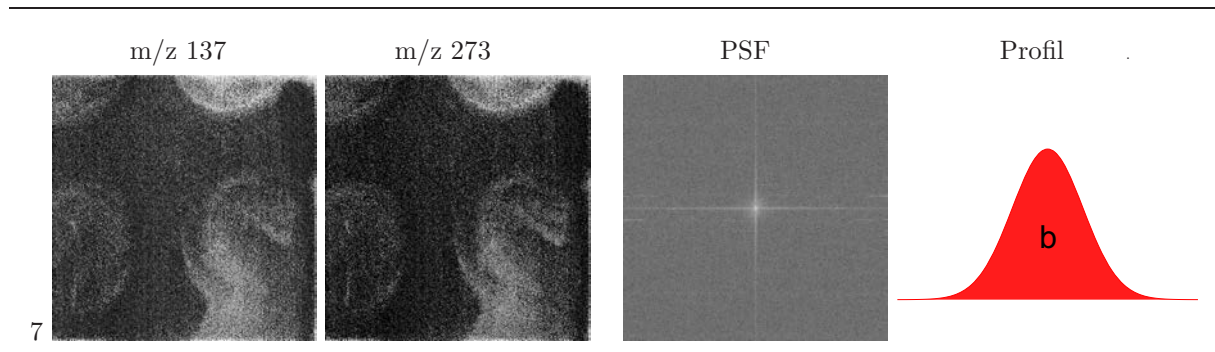


Abbildung 6.14: (7) Einzelpulsmessungen, **Pixelgröße 0.25  $\mu m$** , Laserenergie vor Abschwächung ca. 142  $\mu J$ . Messdauer ca. 7 h 21 min. PSF = PSF von Masse 273 u.

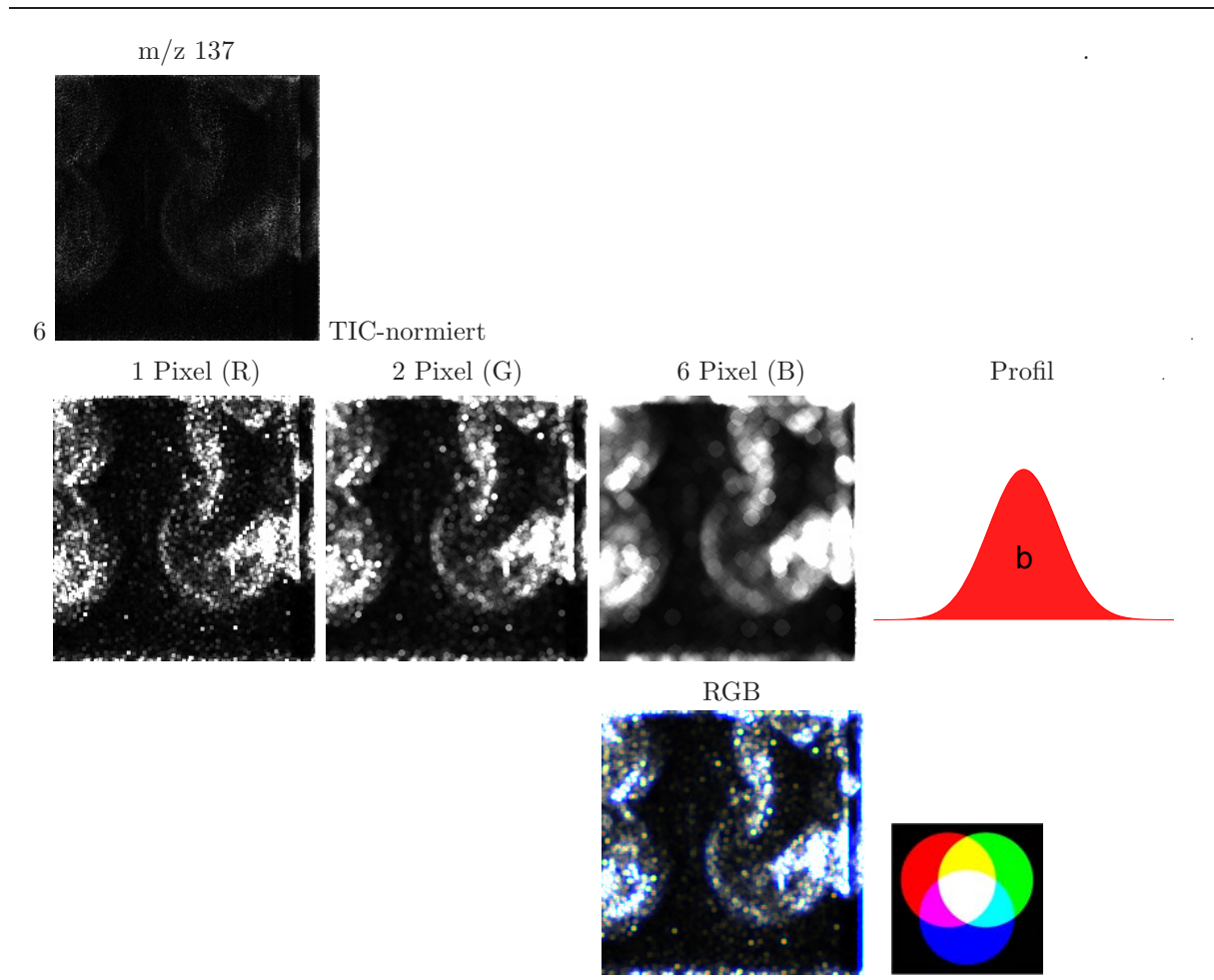


Abbildung 6.15: (Oben) Auf den TIC normiertes Ionenintensitätsverteilungsbild der Darstellung 6 aus Abbildung 6.13. Gezeigt werden Ergebnisse nach einer Überlagerung von n Pixel und der Annahme einer gaussförmigen Ursprungsverteilung der Signalintensitäten. Falschfarbenüberlagerungsbild der Einzelergebnisse (+1, +2, +6 Pixel).

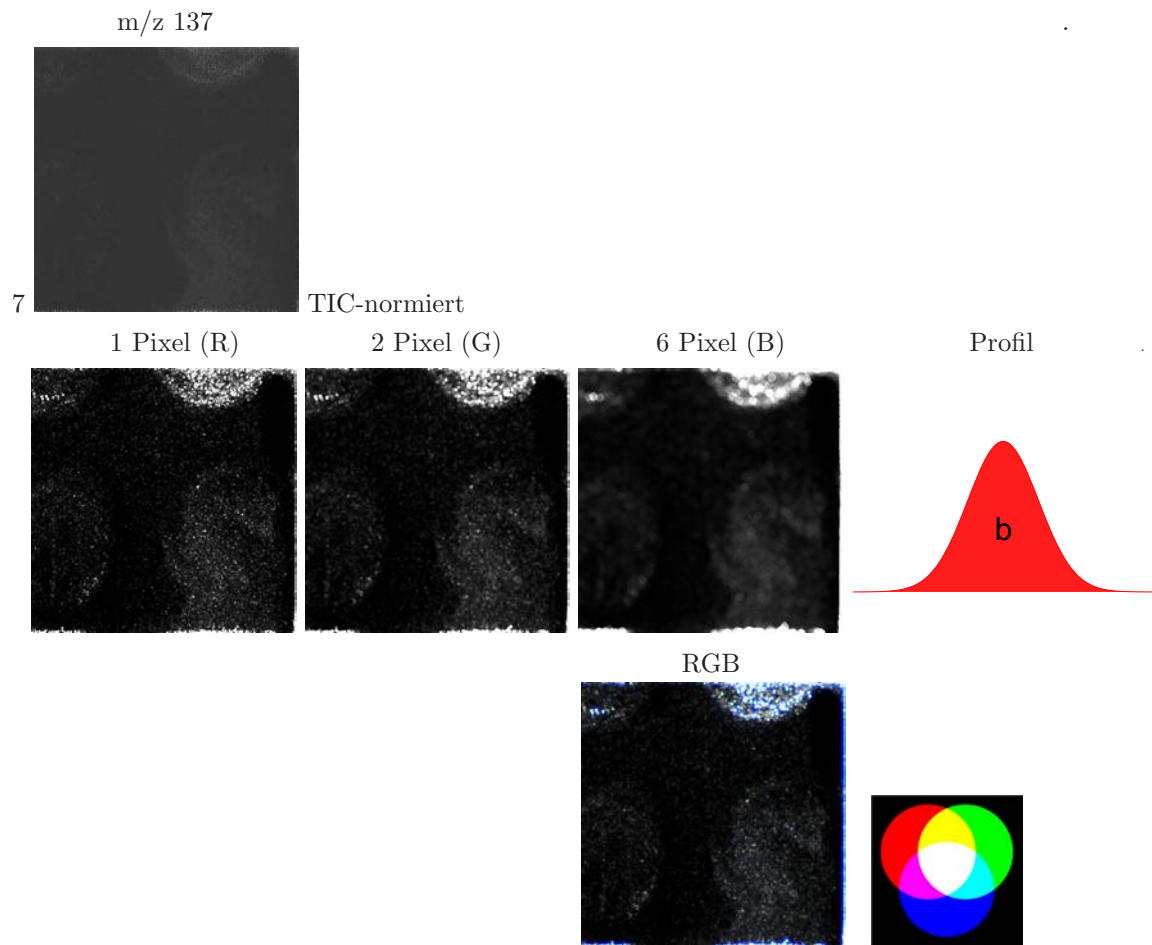


Abbildung 6.16: (Oben) Auf den TIC normiertes Ionenintensitätsverteilungsbild der Darstellung 7 aus Abbildung 6.14. Gezeigt werden Ergebnisse nach einer Überlagerung von n Pixel und der Annahme einer gaussförmigen Ursprungsverteilung der Signalintensitäten. Falschfarbenüberlagerungsbild der Einzelergebnisse (+1, +2, +6 Pixel).



Aus den Darstellungen in Abbildung 6.13 (1, 2, 3) geht zunächst hervor, daß es auch bei der gewählten Defokussierung möglich ist eine ausreichende Ionenintensität der Matrix 2,5-DHB zu erhalten, um kontrastreiche Pixelbilder zu erzeugen. Die Intensitätsunterschiede zwischen den prominenten Peaks der 2,5-DHB-Spezies-Verteilung, d.h.  $m/z$  137 und  $m/z$  273 fallen (bezogen auf eine TIC-Normierung, nicht explizit dargestellt) gering aus. Anders sieht es bei der Wiedergabe der Strukturen in den Pixelbildern aus. Aufgrund der flacheren Energieverteilung im Laserprofil wirkt sich eine Steigerung der Laserenergie bei einer Messposition außerhalb des Rayleigh-Bereiches (6.13, 1) auf die Größe der potentiellen Desorptionsfläche aus. Der Durchmesser der potentiellen Desorptionsfläche kann in etwa bis zur Hälfte der Größe der hier abzubildenden Struktur der Hohlraumkreuze anwachsen ( $\approx 15 \mu\text{m}$ ). Die in Teilbild (1) in Abbildung 6.13 gewählte Pixelgröße von  $4 \mu\text{m}$  erweist sich als unzureichend, um teilweise strukturähnliche Darstellungen der Hohlraumkreuze erhalten zu können. Als Ursache für die unähnlichen Abbildungen sind Oversampling- und/oder Undersampling-Effekte denkbar. Liegt die Probenebene am „Beginn“ des Rayleighbereiches, wie es in den Teilbildern (2) und (3) der Fall ist (relativ größte Entfernung zum Fokus = schmalster Bereich der Taille), bildet sich weder bei einer gewählten Pixelgröße von  $2 \mu\text{m}$  noch bei einer Pixelgröße von  $1 \mu\text{m}$  eine teilweise Strukturähnlichkeit in den Abbildungen aus. Erst die Messungen bei einer Lage der Probenebene unmittelbar im schmalsten Bereich der Strahltaile des Lasers (4, 5, 6) ermöglicht die Aufnahme von Pixelbildern, die bei den gewählten Pixelgrößen  $2 \mu\text{m}$  (4),  $1 \mu\text{m}$  (5) und  $0.5 \mu\text{m}$  (6) strukturähnliche Darstellungen der Hohlraumkreuze zeigen. Die Aufnahme mit einer Pixelgröße von  $0.25 \mu\text{m}$  (7) lässt auch eine Strukturähnlichkeit erkennen, die Abbildung zeigt aber noch stärker ausgeprägt als in Teilbild (6) Lücken zwischen benachbarten intensitätstragenden Pixeln.

Da nach Lage der Kenndaten des Laserfokusedurchmesser von ca.  $1 \mu\text{m}$  und der Pixelgröße von  $0.5 \mu\text{m}$  (6) bzw.  $0.25 \mu\text{m}$  (7) in den Teilbildern (6, 7) Oversampling-Bedingungen vorliegen, ist in den Abbildungen 6.15 und 6.16 eine Zusammenfassung der Intensitäten aus einer Umgebung von jeweils +1, +2 und +6 Umgebungspixeln relativ zu einem zentralen Pixel (*center pixel*) erstellt worden. Über die Art und Bedeutung des „zentralen Pixel“ sowie die Vorgehensweise siehe Abb. 4.30 auf S. 182. Hierbei wurde zuvor am Ausgangspixelbild eine TIC-Normierung durchgeführt. Es wird in diesen Darstellungen erkennbar, dass mit einer Intensitätszusammenfassung teilweise eine deutliche Zunahme der Strukturähnlichkeit erhalten werden kann. Dies deutet mindestens darauf hin, daß die Interpretation der „lückenhaften“ Darstellung(en) in den Teilbildern (6) und (7) als Oversampling-Artefakte im Bereich des Möglichen liegt.

## 6.4 Native biologische Präparate

### 6.4.1 Vermessung von Hefezellen und Valinomycin in Kreuzhohlräumen nach Sprühpräparation der Matrix

Die Untersuchungen in diesem Abschnitt dienen der Klärung der Frage, ob Valinomycin direkt aus der Umgebung der Hefezellwand bzw. der Hefezellmembran mittels MALDI vermessen werden kann. Die bildgebende Darstellung ermöglicht hierbei eine Korrelation der Desorptionsorte aller erhaltenen Signale. Da das cyclische Dodecapeptid Valinomycin massenspektrometrisch auch ohne Matrix mittels LDI dargestellt werden kann, sollte hierzu eine räumliche Übereinstimmung von Matrix- und Analytsignalen ermittelt werden können. Ein charakteristisches LDI-Summen- und Einzelpulsspektrum von Valinomycin ist in Abbildung 6.17 gezeigt. Diese zu den Makroliden zählende Substanz ist in physiologisch aktiver Form ein selektiver Kalium-Ionophor (und besteht dann nach bisherigem Kenntnisstand aus zwei Molekülen).

Zu Beginn erfolgt zunächst die Bestückung von Hohlraumkreuzen (Si-Wafer) mit Hefezellen (S. ce-

revisiae). Diese wird dann fluoreszenzmikroskopisch bei drei Wellenlängenbereichen kontrolliert (siehe Abbildung 6.22 oben und auch Abbildung 4.11). Zu den Hefezellen in den Hohlraumstrukturen des Si-Wafers wird dann ein Volumen von ca.  $10 \mu\text{l}$  einer  $10^{-4}$  M Valinomycinlösung (99 % EtOH + 1 % TFA) gegeben. Die Zugabe erfolgt mit einer Kolbenhubpipette. Nach einer kurzen Trocknungszeit (ca. 1 min.) startet die Matrixpräparation (Sprühpräparation) mit der MALDI-Matrix 2,5-DHB. Die erste bildgebende MS-Vermessung findet dann ca. 30 min. nach der abgeschlossenen Matrixpräparation statt. Nach der durchgeführten Einpuls-pro-Pixel Rasterung wird die Probe mit Ethanol gewaschen (2x für ca. 30 s). Im Anschluss erfolgt eine zweite Matrixpräparation (Sprühpräparation) mit 2,5-DHB. Die zweite Einpuls-pro-Pixel Rasterung wird dann, im Rahmen der Positioniergenauigkeit und nach weiteren ca. 30 min., in dem Bereich der ersten Messung durchgeführt.

Beide Messungen sind erfolgreich und in Abbildung 6.18 dargestellt. Die erste Messung zeigt, daß Valinomycin im Bereich der Hohlraumstrukturen deutlich häufiger ist, als auf der Waferoberfläche. Die Korrelation mit den Matrixsignalen ist dabei  $> 90$  %. In der zweiten Messung wird erkennbar, daß nur noch im Bereich der Hohlraumstrukturen und damit direkt an Hefezellen Valinomycin nachweisbar ist. Die Korrelation mit Matrixsignalen der ersten Messung beträgt hier  $< 30$  %. Im RGB-Überlagerungsbild wird dann erkennbar, daß eine Korrelation der Signale: Matrix (1. + 2. Messung) + Valinomycin (1. Messung) + Valinomycin (2. Messung), keinen Nachweis für eine ausschliessliche Verbindung von Matrix (1. + 2. Messung) + Valinomycin (2. Messung) gibt (Kombination: blau + grün = cyan). Eine überwiegende Korrelation von Valinomycin (1. Messung) und Valinomycin (2. Messung) besteht dagegen in einigen Pixeln deutlich erkennbar (Kombination: rot + grün = gelb, 8-Bit). Die letztgenannte Korrelation deutet dabei auf eine Desorption/Ionisierung der Peptidanalyte ohne Matrixeinfluss, d.h. LDI-Ereignisse hin. Der reine LDI-Anteil an der Desorption/Ionisierung von Valinomycin ist damit insgesamt gering. Wie diese Ergebnisse belegen, lässt sich Valinomycin unmittelbar aus der Umgebung von Hefezellwänden ggf. sogar von Hefezellmembranen vermessen.

Tabelle 6.6: Parameterkombinationen zu den Messungen von Abbildung 6.18.

## Geräteparameter

---



---

Targetpotential	:	10 kV
Blendenpotential	:	7.5 kV
Gitterpotential	:	0 kV
MCP-Potential	:	-2.1 kV
z-Achsenposition	:	in b*, fix
Laserpulsenergie	:	ca. 80 $\mu J$
Abschwächung	:	35
ND-Filter	:	kein Filter
Restgasdruck	:	ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Puls-pro-Pixel	:	1
Schrittweite	:	1 $\mu m$
Pixelkantenlänge	:	1 $\mu m$
Raumtemperatur	:	ca. 18°C
Kontrastauflösung	:	1 Byte/Pixel

\* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.

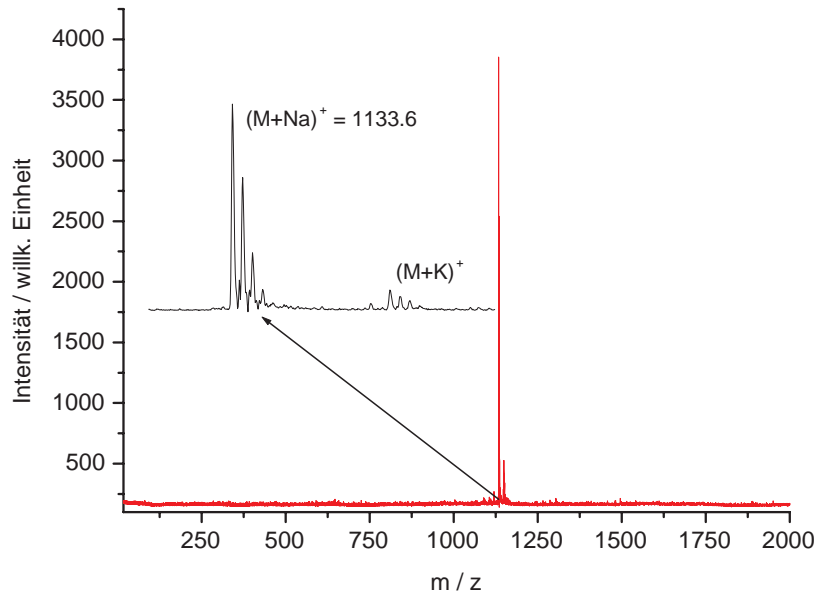
## Präparationsparameter

---

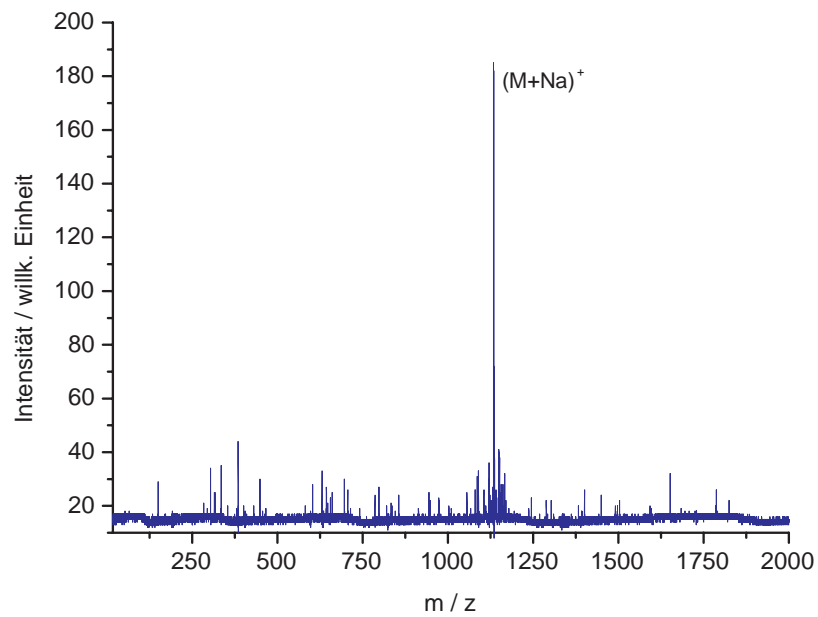


---

Analyt	:	Valinomycin
Molmasse	:	1111.32 Da
Summenformel	:	$C_{54}H_{90}N_6O_{18}$
Konzentration	:	$1.0 \cdot 10^{-4}$ M
Lösungsmittel	:	EtOH/0.1% TFA, 99:1 (m/m)
Präp.-Technik	:	Dried droplet
Matrix	:	2,5-DHB
Molmasse	:	154.7 Da
Summenformel	:	$C_7H_6O_4$
Konzentration	:	30 mg/ml
Lösungsmittel	:	EtOH/0.1% TFA, 1:1 (v/v)
Präp.-Technik	:	Sprühtechnik
Raumtemperatur	:	ca. 18°C
Umgebungsdruck	:	Sprühgasvordruck 1 bar
Umgebungsgas	:	Stickstoff
Präparationszeit	:	ca. 30 min.
Target	:	Si-Wafer, mikrostrukturiert.



(a)



(b)

Abbildung 6.17: (a) LDI-Summenspektrum des cyclischen Dodecapeptides Valinomycin (62 Einzelmessungen, SNR = 30.15 dB(mV)), ca.  $1 \mu\text{l}$ ,  $c = 9 \cdot 10^{-4}$  M Valinomycin. Wellenlänge  $\lambda = 337$  nm. Messung am Spektrometer ALADIM II. (b) LDI-Einzelspektrum (SNR = 15.01 dB(mV)), aufgenommen mit der Wellenlänge  $\lambda = 349$  nm am Spektrometer LAMMA 2000.

## UV-Kontrolle der Zellpositionen in den Waferstrukturen

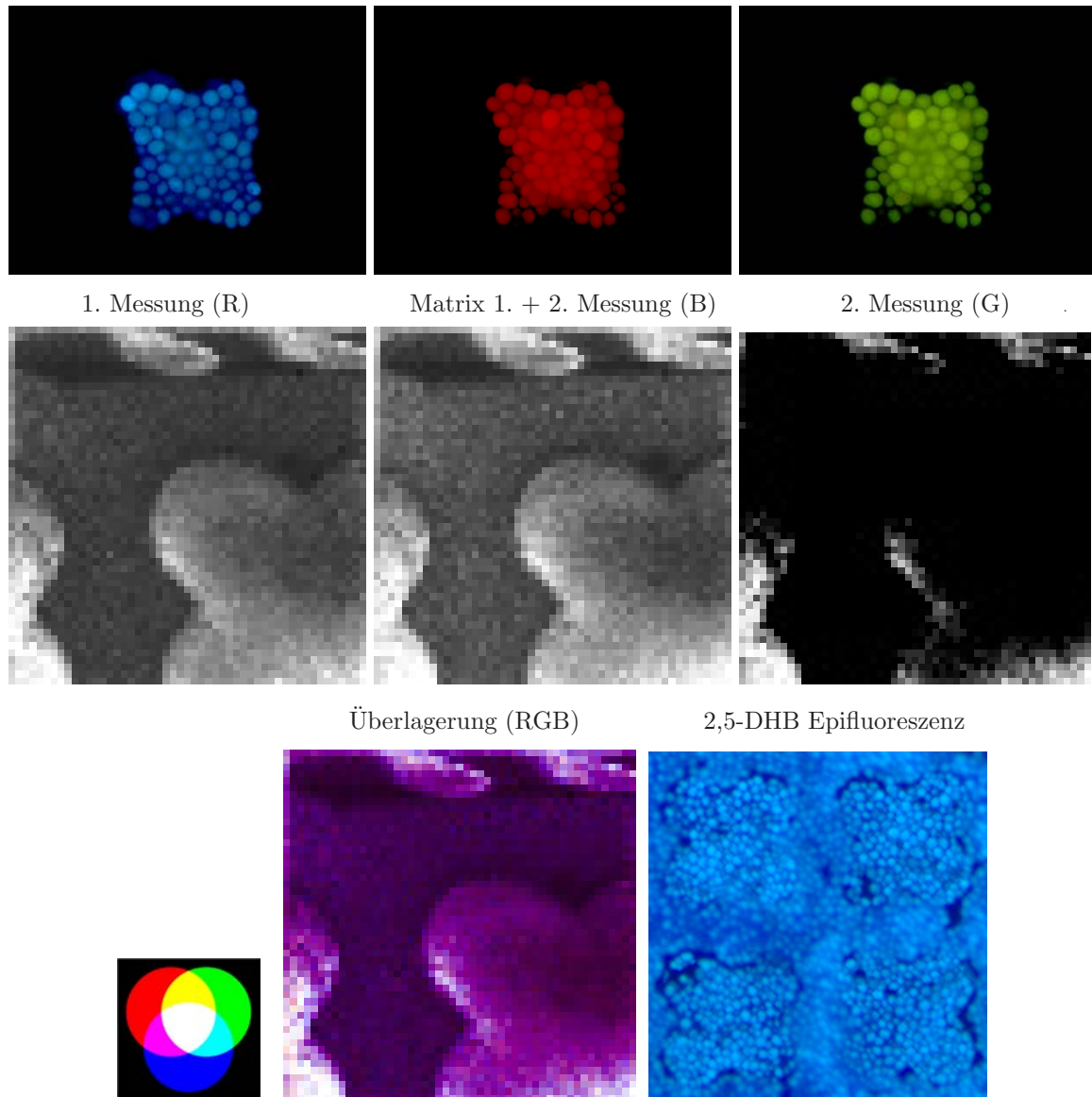


Abbildung 6.18: Experiment mit Valinomycinzugabe an Hefezellpräparationen in Mikrostrukturen (Si-Wafer mit Kreuzstruktur). Eine Stunde nach Zugabe von ca.  $10 \mu\text{l}$ ,  $10^{-4}$  M Valinomycin gelöst in EtOH/1%-TFA 99:1 (v/v) und Vermessung (1. Messung), erfolgt ein Waschen mit Ethanol. Nach erneuerter Matrixpräparation wird die Probe wieder vermessen (2. Messung). Valinomycin zeigt sich dann nur noch in Bereichen von Hefezellen. (Oben) Fluoreszenzaufnahmen der Hefezellen in den Kreuzstrukturen des Wafers mit drei unterschiedlichen Fluoreszenzfiltern (siehe Abb. 4.11 unten, S. 158). (Rechts unten) Epifluoreszenzaufnahme der matrixpräparierten Waferstruktur mit Hefezellen vor der MSI-Messung.

### 6.4.2 Vermessung eines Nierengewebeschnittes nach Sprühpräparation und Umkristallisation der Matrix

Der Gewebeschnitt wird zunächst mit einer Sprühpräparation (2x ca. 20  $\mu\text{l}$  30 mg/ml 2,5-DHB) beschichtet und im Anschluss daran für ca. 24 h in einer Wasserdampf-atmosphäre ( $\text{H}_2\text{O}$  bidest.) einer geschlossenen Umgebung belassen. Die lichtmikroskopischen Ausschnitte des median angelegten Nierengewebeschnittes einer Maus sind in Abbildung 6.19 dargestellt. Zu erkennen ist hier die Epifluoreszenz des Nierengewebes im Bereich des Nierenmarkes (Medulla renalis, Pyramis renalis) vor (links) und weiterhin die Epifluoreszenz von 2,5-DHB nach der Präparation (rechts, einschliesslich Umkristallisation). Von rechts oben nach links unten verläuft in den Bildern erkennbar ein zusammenhängender Bereich, der bei der Matrixpräparation nur schlecht bedeckt werden kann. Es handelt sich hierbei sehr wahrscheinlich um Zellen einer Bowmannschen Kapsel mit angrenzender Basalmembrane (parietales Blatt). Im rechten lichtmikroskopischen Bild ist deutlich die sehr feinkörnige Struktur der 2,5-DHB-Kristalle nach der Umkristallisation in einer Wasserdampf-atmosphäre zu erkennen. Die bildgebende massenspektrometrische Vermessung eines 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  großen Areales aus dem oberen linken Bereich der lichtmikroskopischen Aufnahme ist in Form der besonders charakteristischen Verteilungen der Massen  $m/z$  352 u und  $m/z$  405 u sowie der Matrixmasse  $m/z$  137 u dargestellt. Aufgrund der niedrigen Massenauflösung im Linearmodus kann hier aber keine genaue Zuordnung der Massen zu chemischen Strukturen erfolgen. Das Signal der Matrix ist dagegen eindeutig dem Ion  $[M - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$  zuzuordnen. Die Signale  $m/z$  352 u und  $m/z$  405 u zeigen eine laterale Verteilung, die Lipidfragmente oder Peptid-/Proteinfragmente als Ursprung am wahrscheinlichsten macht. Im RGB-Überlagerungsbild werden die Bereiche mit nur geringer Signalkorrelation deutlich hervorgehoben.

Tabelle 6.7: Parameterkombinationen zu den Messungen von Abbildung 6.19.

## Geräteparameter

Targetpotential	: 10 kV
Blendenpotential	: 7.5 kV
Gitterpotential	: 0 kV
MCP-Potential	: - 2.1 kV
z-Achsenposition	: in b*, fix
Laserpulsenergie	: ca. 80 $\mu J$
Abschwächung	: 39
ND-Filter	: 11 %
Restgasdruck	: ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Puls-pro-Pixel	: 1
Schrittweite	: 1 $\mu m$
Pixelkantenlänge	: 1 $\mu m$
Raumtemperatur	: ca. 20°C
Kontrastauflösung	: 1 Byte/Pixel

\* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.

## Präparationsparameter

Matrix	: 2,5-DHB
Molmasse	: 154.7 Da
Summenformel	: $C_7H_6O_4$
Konzentration	: 30 mg/ml
Lösungsmittel	: EtOH/0.1% TFA, 1:1 (v/v)
Präp.-Technik	: Sprühtechnik + Umkristallisation
Raumtemperatur	: ca. 20°C
Umgebungsdruck	: Sprühgasvordruck 1 bar, Atmosphärendruck
Umgebungsgas	: Stickstoff, Luft
Präparationszeit	: ca. 24 h 30 min.
Target	: BK-07-Glas, unbeschichtet.

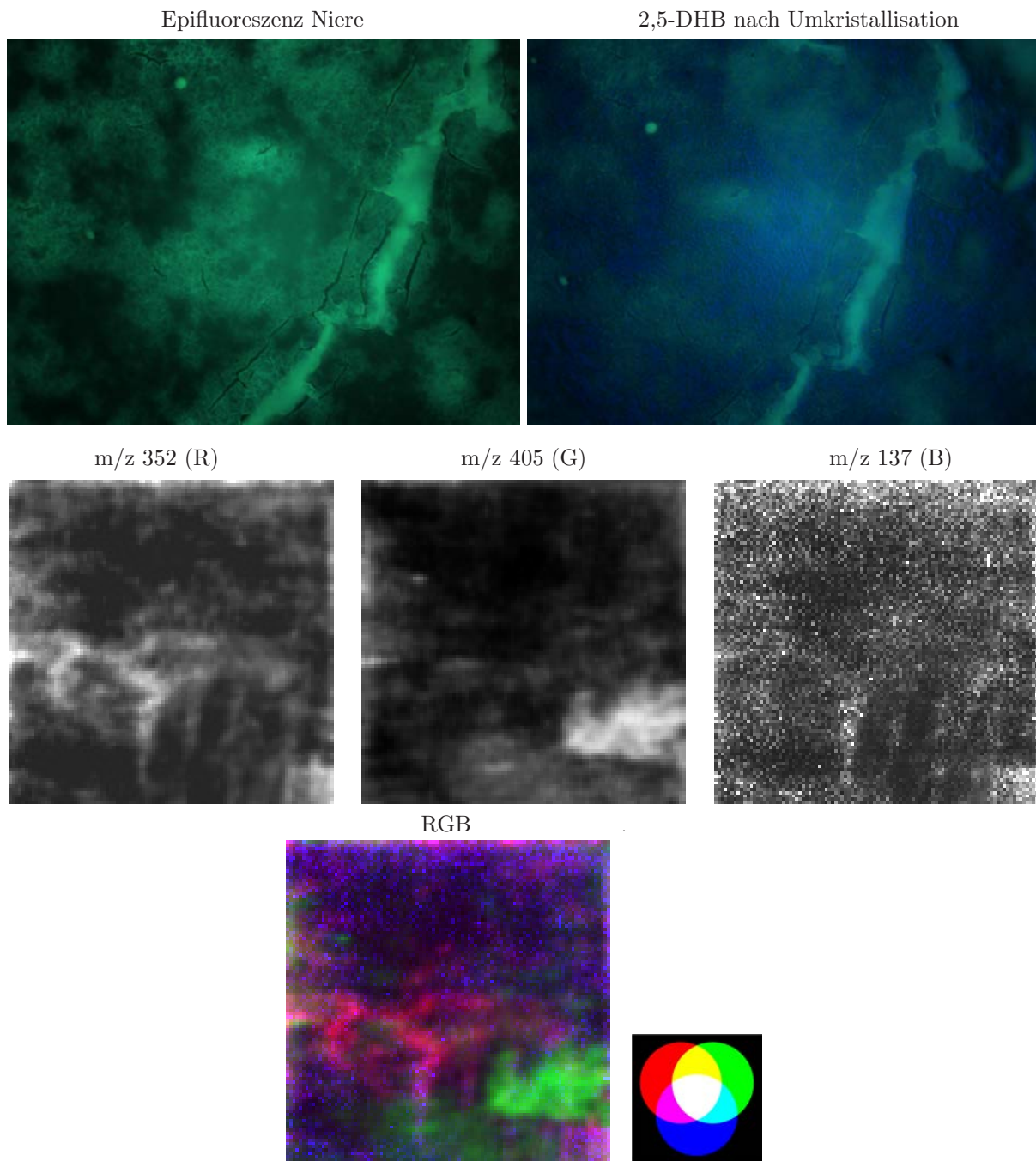


Abbildung 6.19: Langzeitpräparation von Nierengewebe einer Maus. (Oben) Epifluoreszenzaufnahmen vor der Matrixpräparation und nach einer Matrixspraypräparation (2,5-DHB) mit anschließender Umkristallisation in einer Wasserdampf-atmosphäre (rechts). SMALDI-Messungen der Massen  $m/z$  352 u,  $m/z$  405 u und  $m/z$  137 u (Matrix). Bildgröße der Epifluoreszenzaufnahmen:  $178 \mu\text{m} \times 133 \mu\text{m}$ . SMALDI-Aufnahmen:  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  aus dem Bereich der oberen linken Ecke der lichtmikroskopischen Aufnahmen. **Pixelgröße** =  $1 \mu\text{m}$ .



## Überlagerung der MSI-Bilder

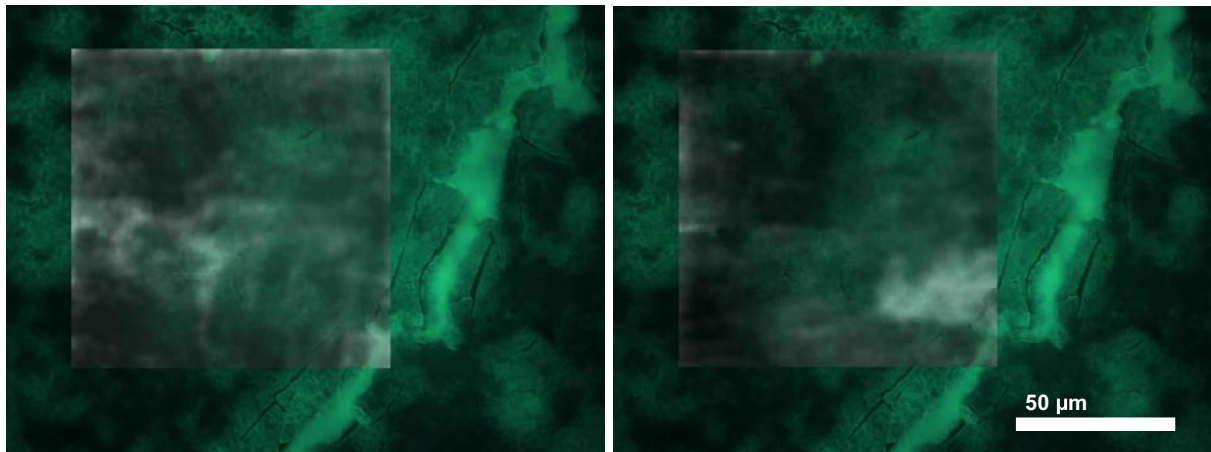


Abbildung 6.20: Einordnung der MSI-Bilder als halbtransparentes Graustufenbild in das RGB-Epifluoreszenzbild vor der Matrixpräparation. (Links)  $m/z$  352 u, (Rechts)  $m/z$  405 u. Bildgröße der Epifluoreszenzaufnahme:  $178 \mu m \times 133 \mu m$ . SMALDI-Aufnahmen:  $100 \mu m \times 100 \mu m$ , Einpassung mit 50 % Transparenz.

### 6.4.3 Vermessung von Hefezellen auf einer Goldoberfläche nach Sprühpräparation der Matrix

Das nachfolgend beschriebene Experiment zeigt die Möglichkeit der Darstellung einzelner Eukaryotenzellen mit einer Größe zwischen  $3\ \mu\text{m}$  bis  $15\ \mu\text{m}$  unter Verwendung der Methode der bildgebenden MALDI-Massenspektrometrie mit einem Desorptions-/Ablationsdurchmesser von ca.  $1\ \mu\text{m}$ .

Auf einem goldbeschichteten Aluminiumprobenträger erfolgt die Aufnahme von zuvor isolierten Hefezellen (*S. cerevisiae*). Diese werden mittels einer Kolbenhubpipette aus einem isotonischen Medium entnommen. Das Medium wird vor der Matrixpräparation entfernt und die verbleibenden Hefezellen dann kurzzeitig mit einer Eiswasser/Ethanol-Lösung (1:1 ; v/v) gewaschen. Nach einer kurzen Trocknungszeit setzt die Sprühpräparation mit der Matrix 2,5-DHB ein. Hierzu werden insgesamt ca.  $60\ \mu\text{l}$  Matrixlösung ( $3 \times 20\ \mu\text{l}$ ) aufgetragen. Nach der Matrixpräparation startet unmittelbar die (Einpuls-pro-Pixel) MS-Vermessung am Spektrometer LAMMA 2000. Die größte räumliche Übereinstimmung mit der Struktur der Hefezellen kann mit dem Ionenintensitätsverteilungsbild der Masse  $m/z\ 184\ \text{u}$  erhalten werden (Abbildung 6.21). Diese Masse entspricht mit hoher Wahrscheinlichkeit (chemisch) der Kopfgruppe von Phosphatidylcholinen, die hauptsächlich Bestandteile der Zellmembrane sind aber auch im Bereich der Zellwand von Hefe vorkommen können. Neben der potentiellen Masse der Kopfgruppe werden auch Massen gefunden, die intakten Lipiden oder einzelnen Fettsäuren zuordbar sind. Freie Fettsäuren sind als positive Ionen bei MALDI i.d.R. selten und deshalb als Analyt zur Darstellung strukturbildender Bereiche eher ungeeignet. Aufgrund der relativ niedrigen Massenauflösung ist hier, anhand der MALDI-TOF-Messungen, keine eindeutige Bestimmung möglich. Es ist deshalb letztlich unklar, ob es sich bei der Masse  $m/z\ 74\ \text{u}$  in Abbildung 6.21 um eine Fragmentmasse der Matrix 2,5-DHB oder um eine Fragmentmasse eines Lipides oder eines anderen Analyten handelt. In den gezeigten Ionenintensitätsverteilungsbildern sind einzelne Hefezellen erkennbar.

Tabelle 6.8: Parameterkombinationen zu den Messungen von Abbildung 6.21.

## Geräteparameter

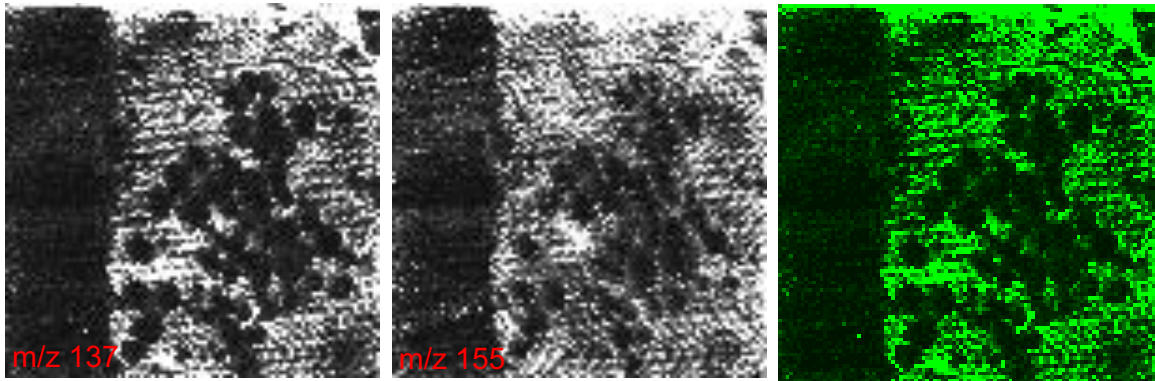
Targetpotential	: 10 kV
Blendenpotential	: 7.5 kV
Gitterpotential	: 0 kV
MCP-Potential	: -2.1 kV
z-Achsenposition	: in b*, fix
Laserpulsenergie	: ca. 83 $\mu J$
Abschwächung	: 32
ND-Filter	: 11 % Filter
Restgasdruck	: ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Puls-pro-Pixel	: 1
Schrittweite	: 1 $\mu m$
Pixelkantenlänge	: 1 $\mu m$
Raumtemperatur	: ca. 18°C
Kontrastauflösung	: 1 Byte/Pixel

\* Konfokaler Parameter = 2 x Rayleighlänge.

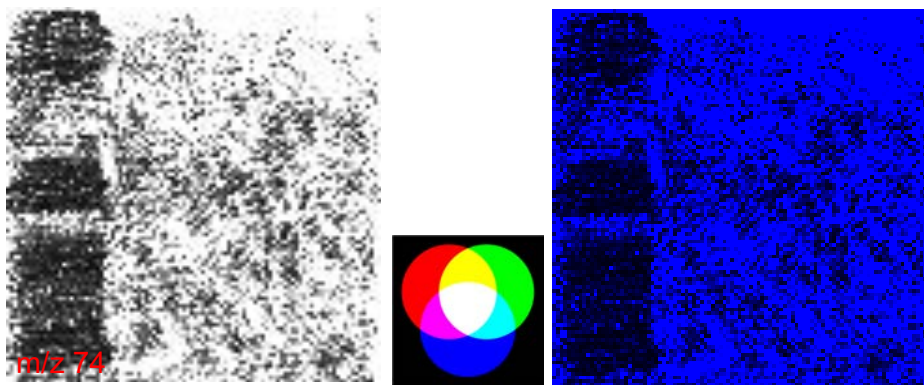
## Präparationsparameter

Matrix	: 2,5-DHB
Molmasse	: 154.7 Da
Summenformel	: $C_7H_6O_4$
Konzentration	: 30 mg/ml
Lösungsmittel	: EtOH/0.1% TFA, 1:1 (v/v)
Präp.-Technik	: Sprühpräparation
Raumtemperatur	: ca. 18°C
Umgebungsdruck	: Sprühgasvordruck 1 bar
Umgebungsgas	: Stickstoff
Präparationszeit	: ca. 30 min.
Target	: Aluminiumteller, vergoldet

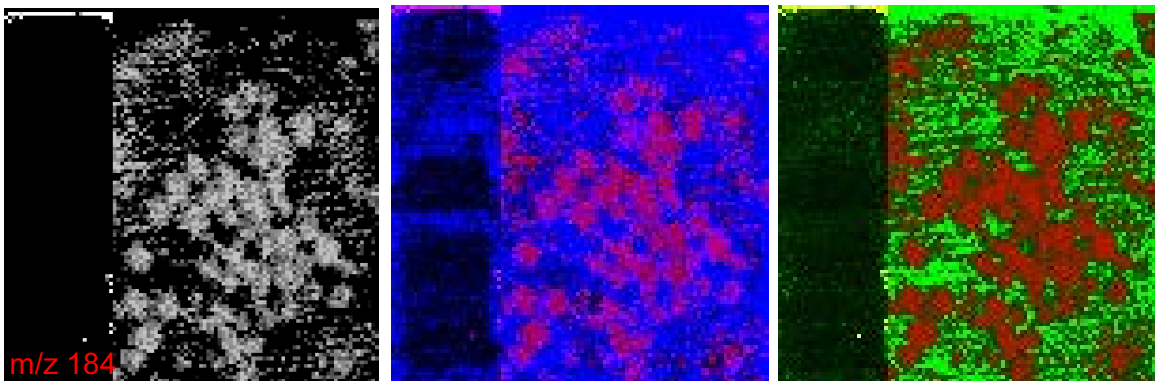
2,5-DHB Matrix m/z 137 (grün)



Fragmentmasse m/z 74 (blau)



PC-Kopfgruppe m/z 184 (rot)



Epifluoreszenzaufnahme nach MS-Messung

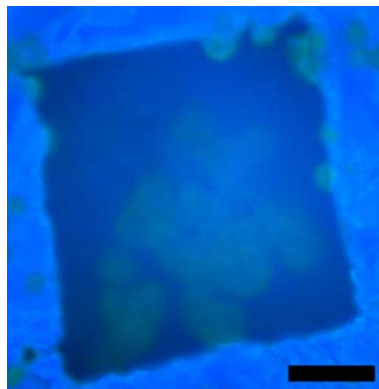


Abbildung 6.21: SMALDI-MS: Aufnahmen einer Hefezellpräparation mit der aufgespritzten Matrix 2,5-DHB. **Pixelgröße:** 1  $\mu\text{m}$  Kantenlänge. Messbalkenlänge: 10  $\mu\text{m}$  (für alle Teilbilder maßstabsgerecht).

#### 6.4.4 Komplementäre MS-Analytik an Drüsengewebepräparaten des Kopffüßlers *Nautilus pompilius* L.

Die Proben des Kopffüßlergewebes stellen methodisch die aufwendigsten Präparate in dieser Arbeit dar. Sie sind mittels nanoHPLC-nanoESI-MS (online), HPLC-ESI-MS (offline und online), MALDI-MS sowie SMALDI-MS (bildgebend) untersucht worden. Genauer handelt es sich bei den Präparaten einerseits um Gewebe des *Proboscis-like-organ* (Drüse) und andererseits um Drüsensekret in Salzwasser. Das Gewebe ist dabei zuvor bereits mit einer Rasierklinge (der Länge nach) in Scheiben geschnitten worden. Das zunächst unverdünnte Sekret ist zu einer Hälfte unverdünnt belassen und zur anderen Hälfte mit  $H_2O$  bidest. verdünnt verwendet worden. Beide Ansätze wurden im weiteren Verrauf (mechanisch) homogenisiert und zur MS-Vermessung aliquotiert. Die Gewebeschnitte sind dann einzeln einer Sprühpräparation mit der Matrix 2,5-DHB zugeführt sowie bildgebend analysiert worden. Darüberhinaus wurden von bestimmten Bereichen dieses Gewebes Vorbereitungen mittels On-Target-Verdau (Dried droplet, Peptidasen) vorgenommen.

##### HPLC-Trennung

In Abbildung 6.22 sind im rechten oberen Teilabschnitt die Ergebnisse der HPLC-Trennung des Sekretes in der Form von UV-Absorptionsdiagrammen bei der Wellenlänge  $\lambda = 215$  nm dargestellt<sup>1</sup>. Zu den Offline-HPLC-Messungen sind dabei die Lösungsmittelmischungen A: 95 % 0.1 %-TFA, 5 % MeCN (Laufmittel) und B: 95 % MeCN, 5 % 0.1 %-TFA (Elutionsmittel) in nichtisokratischen Läufen eingesetzt worden (Flussrate: ca. 4  $\mu$ l/min). Der Start des Laufes erfolgt mit 5 % B, nach 12 min werden 20 % B erreicht, nach 40 min 50 % B und nach 60 min 100 % B. Die effektiven Elutionszeiten (Spur: 215 nm) bei der optimierten Methode sind: a = 10.24 min, b = 11.84 min, c = 13.60 min, c' = 14.24 min, d = 16.48 min, e = 17.68 min, f = 19.28 min. Zum Vergleich sind Trennungen eines Peptidgemisches unter denselben Bedingungen durchgeführt worden.

Die Online nanoHPLC-Messungen (Ultimate nanoHPLC, Dionex) erfolgten mit der Säule PepMap C18 3  $\mu$ m 100 Å (75  $\mu$ m ID x 150 mm) bei einer Flussrate von ca. 200 nl/min. Die Probenzugabe bei den Offline-Messungen erfolgte manuell über eine Probenbeladungsschleife (Summit) bzw. automatisch über einen Autosampler bei den Online-Messungen (Famos-Switchos-Ultimate). An der Ultimate-HPLC wurden isokratische und nicht-isokratische Läufe an den aliquotierten Proben des Sekretes durchgeführt und das Eluat dann vermessen.

Das TIC-Diagramm aller erhaltenen Ladungszustände im Massenbereich zwischen m/z 800 und m/z 900 bei den Online HPLC-Messungen ist in Abbildung 6.24 (Summit, Dionex; LTQ-FTICR-MS, Thermo) dargestellt und zeigt eine Überschneidung mit den Absorptionsspuren der Offline HPLC-Fraktionen c und c' in Abbildung 6.22. Diese werden unter den gewählten Bedingungen dabei nicht vollständig getrennt. Die relative Intensität ist aber invers zur entsprechenden HPLC-Absorptionsspur. Bei der Masse m/z 806.7 (z = 4+), dem Basispeak der HPLC-Fraktion c', könnte es sich um einen physiologisch aktiven Bestandteil des Drüsensekretes handeln. Es wird vermutet, daß über bestimmte Bestandteile des Drüsensekretes eine Kommunikation zwischen einzelnen Individuen im natürlichen Habitat (Ozean) erfolgt. *Nautilus pompilius* l. ist ein (bislang) genetisch vollständig unsequenzierter Organismus aus der Klasse der Mollusken (Wirbellosen). Die durchgeführten Messungen erlauben eine Eingrenzung der hauptsächlich im Sekret

<sup>1</sup>Summit-HPLC, Dionex. Säule: Acclaim C16 3  $\mu$ m 120 Å (300  $\mu$ m ID x 150 mm).

vorhandenen chemischen Substanzklassen, zeigen aber bei der Einzelidentifizierung einige Probleme auf.

Aufgrund der relativ viskosen Konsistenz der Sekretprobe und der in HPLC-Fraktion b auftretenden Massenserie mit Hexose-Abständen ( $\Delta m/z = 162$  u) ist ein Glycan bzw. ein Glycopeptid insgesamt als Hauptbestandteil sehr wahrscheinlich. Glycopeptide aus Drüsen Gewebe von Mollusken sind bereits massenspektrometrisch untersucht worden, wobei zu eindeutigen Charakterisierungen meist Modifikationen und eine enzymatische Spaltung der Glycane notwendig wurden [326].

Primärstrukturen bekannter N-Glycane weisen einen gemeinsamen Konsensbereich auf. Dieser setzt sich aus drei Hexosen und zwei N-Acetylglucosaminen ( $\text{Hex}_3\text{GlucNAc}_2$ ) zusammen. In einer Strukturvariante kann zusätzlich eine Fucose über eine  $\alpha$ -1-3-glycosidische oder  $\alpha$ -1-6-glycosidische Bindung an die endständige GlucNAc angefügt werden. Auf der Glycanseite verzweigen i.d.R. zwei Ketten über eine  $\alpha$ -1-3- und  $\alpha$ -1-6-Bindung, wobei eine Kette nochmals verzweigen kann (triantennäres Glycan). Bei den Hexosen handelt es sich häufig um Mannose. Peptide binden über den Rest von Asparagin an die endständige GlucNAc und bilden dabei das Strukturmotiv N-X-(S, T). O-Glycane weisen dagegen keinen vergleichbaren Konsensbereich auf. Die Aminosäuren werden hier i.d.R. über S, T, hP, hK an die Glycane gebunden<sup>2</sup>, häufig sind einfache Verzweigungen anzutreffen [8] (Kapitel 6).

### MSMS-Messungen

Im Rahmen der Analyse wurde schnell erkennbar, daß eine eindeutigere Bestimmung MSMS-Messungen erforderlich macht. Diese sind von der Precursormasse  $m/z$  3223 u an zwei Sekretaliquoten durchgeführt wurden. Zum einen an unverdünntem, homogenisiertem Sekret (qTOF) und weiterhin an der HPLC-Fraktion c' (LTQ-FTICR-MS) aus Abbildung 6.22. In dem MSMS qTOF-MALDI-Spektrum der Precursormasse  $m/z$  3223 u in Abbildung 6.26 sind zunächst einige Hinweise auf ein Glycopeptid zu finden. Eine nähere Analyse der Aminosäuren ist dabei nicht möglich. Hier wird zunächst die Fragmentmasse  $m/z$  429 u ( $Z_2$ -Ion,  $[\text{GlcNAc}_2 - (\text{H}_2\text{O})_2 + \text{Na}]^+$ ) detektiert sowie die Massen  $m/z$  313 u,  $m/z$  583 u und die Masse  $m/z$  1405 u. Die Masse  $m/z$  1405.64 u liefert eine mögliche Übereinstimmung mit dem theoretischen Ion  $[\text{NANA} - \text{H}_2\text{O} + 3 \text{Hex} - (\text{H}_2\text{O})_3 + 3 \text{GlucNAc} - (\text{H}_2\text{O})_2 + \text{H}]^+$ ,  $m/z$  1405.509845 u. Die Masse  $m/z$  313 u mit dem Ion  $[\text{NANA} - \text{H}_2\text{O} - \text{H} + \text{Na}]^+$ ,  $m/z$  313.076812 u. (Abkürzungen siehe auch Massetabellen im Anhang).

Die MSMS-Experimente im Rahmen der nanoHPLC-Trennung und nanoESI-FTICR-Messung ergeben die in Abbildung 6.26 c dargestellten, deconvulierten Signale. Die Daten ermöglichen eine eingeschränkte Prognose über die Struktur hinter dem (Precursor)Signal bei  $m/z$  3223 u. Ausgehend von dem Signal bei  $m/z$  429 u,  $[\text{GlcNAc}_2 - (\text{H}_2\text{O})_2 + \text{Na}]^+$ , ergibt sich hier eine Serie<sup>3</sup> die auch eine Prognose über die beteiligten Aminosäuren anhand ihrer Residualmassen ermöglicht. Man erhält die Massen:

- $m/z$  429 u + Hex =  $m/z$  609 u,
- $m/z$  666 u - G +  $\text{H}_2\text{O}$  =  $m/z$  609 u ( $\delta m(\text{G}) = -0.7$  ppm),
- $m/z$  813 u - F +  $\text{H}_2\text{O}$  =  $m/z$  666 u ( $\delta m(\text{F}) = -1.6$  ppm),
- $m/z$  944 u - M +  $\text{H}_2\text{O}$  =  $m/z$  813 u ( $\delta m(\text{M}) = -8.5$  ppm),

<sup>2</sup>X = alle AS außer Prolin. hX = Hydroxy-X.

<sup>3</sup>Die Notierungen entsprechen dem Einbuchstaben-Code der Aminosäuren, siehe S. 74.

- $m/z$  944 u - Hex + H<sub>2</sub>O =  $m/z$  782 u,
- $m/z$  1043 u - V + H<sub>2</sub>O =  $m/z$  944 u ( $\delta m(V) = -2.3$  ppm).

Mit der CID-Anwendung und einer Elektronen-Energie von ca. 30 eV (Low-Energy CID) treten im dargestellten Spektrum überwiegend y-Ionen und teilweise z- ( $m/z$  429 u) bzw. b-Ionen ( $m/z$  609 u) des Glycananteiles auf. Die Massendifferenz des Basispeaks zur Precursormasse beträgt dann:

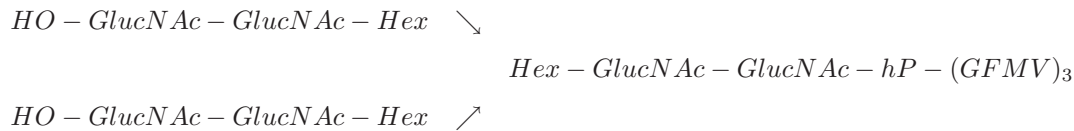
- $m/z$  3223 u -  $m/z$  3107 u = 116 u.

Die Masse  $m/z$  3107 u könnte anhand der gefundenen Fragmentmassen durch das Ion [GlucNAc<sub>6</sub> - (H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub> + 3 Hex + 12 As + 2 Na]<sup>+</sup> erklärt werden. Diese Interpretation ist aber auf Grundlage der Spektren nicht eindeutig. Das Ion  $m/z$  429.28183 u lässt sich mit GlucNAc (N-Acetyl-Glucosamin, C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub>) nur mit einer Abweichung von  $\delta m = 312$  ppm zu der theoretischen Masse  $m/z$  429.147966 u in Verbindung bringen. Die Abweichung des gefundenen Ions  $m/z$  609.33496 u zur erwarteten Masse  $m/z$  609.211354 u (als  $m/z$  429 + Hex) beträgt  $\delta m = 203$  ppm. Anstelle des Hex-GlucNAc Ions  $m/z$  609 u, wäre auch das Ion [Hex<sub>2</sub>-NeuAc - (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> mit  $m/z$  609.234889 u möglich (NeuAc = Sialinsäure, C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>8</sub>). Hinweise auf Sialinsäure ergeben sich aus dem MSMS-Spektrum der Precursormasse  $m/z$  3223 u aus dem vollständigen Sekret. Dort findet man auch die Masse  $m/z$  499.19 u. Die theoretische Masse des Ions [NeuAc<sub>2</sub> - (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup> beträgt  $m/z$  499.176980 u. Das Ion  $m/z$  662.31 u könnte dann dem theoretischen Ion [NeuAc<sub>2</sub> - (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> + Hex - OH + H]<sup>+</sup>,  $m/z$  662.237629 u entsprechen.

In den MALDI-Messungen des Gewebepräparates mit Sekretanlagerung findet sich im Abstand  $\Delta m = 498$  u ( $m/z$  3721 u) ein weiterer Hinweis auf Sialinsäure. Das in MALDI und ESI-Spektren vorkommende Ion  $m/z$  583 u könnte dem theoretischen Ion der N-Acetylneuraminsäure = NANA (Lactaminsäure, O-Sialinsäure, C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>9</sub>), [NANA<sub>2</sub> - (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup> mit  $m/z$  583.198109 u zugeordnet werden.



Bei der Zusammensetzung der Masse  $m/z$  3223.7 u könnte es sich demnach um das Ion  $[\text{GlucNAc}_6 - (\text{H}_2\text{O})_3 + 3 \text{ Hex} + 13 \text{ As} + 2 \text{ Na} + \text{H}]^+$  handeln, wobei als 13. Aminosäure dann 4-Hydroxy-Prolin ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3$ ) angenommen wird<sup>4</sup>. Ein Strukturvorschlag mit GlucNAc ist demnach:



Die Abweichung des gemessenen Ions  $m/z$  3223.662125 u zur theoretischen Masse  $m/z$  3223.312872 u der angenommenen Struktur beträgt dabei  $\delta m = 108$  ppm. Es handelt sich dann um ein O-Glycopeptid, wobei über die Art der Verzweigung keine Aussage getroffen werden kann. Die obige Anordnung ist ein willkürlicher Vorschlag. Es wird angenommen, daß die Struktur bei den Messungen zerstört wird und in den Spektren deshalb bereits als Cluster auftritt. Die Messungen legen insgesamt nahe, das es sich bei der Masse  $m/z$  3223 u nicht um das intakte Glycopeptid handelt, sondern sehr wahrscheinlich bereits um ein Fragment. Weiterhin muss, aufgrund der sehr stark abweichenden MSMS-Ergebnisse (qTOF, FTICR) des identischen Precursorions  $m/z$  3223 u angenommen werden, das mehr als eine Substanz hinter dieser isolierten Precursormasse liegt. Die Breite des Massenfensters zur Precursorionenselektion lag bei beiden Methoden in etwa bei 1 u, was eine solche Vermutung klar bestätigt.

Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse aus den MSMS-Experimenten sind zusätzliche Verdauexperimente mit der Offline-HPLC-Fraktion c' durchgeführt worden. Es sollte damit die Möglichkeit untersucht werden, daß es sich nicht um ein glycosyliertes Peptid (N-Glycan oder O-Glycan) handelt, sondern etwa um ein Peptid mit ggf. anderer oder gar fehlender Modifizierung. Fraktion c' enthält hauptsächlich die Masse  $m/z$  3223 (1+) bzw.  $m/z$  806 (4+). Die HPLC-Peaks c, c' konnten mittels des gewählten Säulenmaterials (in beiden Ansätzen, C16,C18) und den Elutionsverfahren (isokratisch, nicht-isokratisch) aber nicht vollständig getrennt werden, weshalb es vor allem bei der Offline-Fraktionierung zu einer ungünstigen Überlagerung kommt. Eine Mascot-Suche in mehreren Datenbanken (u.a. Swiss-Prot) mit den intensivsten Signalen aus den tryptischen und chymotryptischen Verdauspektren der Fraktion c', ergeben bei einer Sequenzabdeckung die zwischen 28 % bis 40 % liegt, nicht zuletzt auch deshalb, unsichere Vorschläge<sup>5</sup>. Diese werden deshalb hier nicht weiter diskutiert.

Die in den MALDI-Spektren erhaltenen Massen, die Lipiden zuordbar sind, zeigen wahrscheinlich hauptsächlich Phosphatidylcholine. Das intensivste Signal ist dabei  $m/z$  782.804 u, ein PC(34:1), das als  $[\text{M} - \text{H} + \text{Na}]^+$  auftritt und der theoretischen Masse  $m/z$  782.567026 u entspricht (siehe Massetabelle im Anhang). Die Ergebnisse aus den On-Target-Verdauansätzen ergeben kein eindeutiges Bild. Es zeigte sich hier eine große Zahl von Peaks, die Peptiden zuordbar sind. Insgesamt sind die erhaltenen Spektren aber zu komplex, als das sie innerhalb der Glycopeptidanalyse hilfreich sein könnten. Sie werden im weiteren deshalb explizit nicht dargestellt.

<sup>4</sup>Diese ergibt sich aus einem schwachen Signal und einer Residualmasse,  $\Delta m = 113.03699$ ,  $\delta m = -95$  ppm.

<sup>5</sup>MOWSE-Score: 44 bis 62, signifikant wenn Score > 76 mit  $p(\alpha) < 0.05$ .



**Fazit**

Aufgrund der teilweise für FTICR-Messungen sehr hohen Massenabweichungen der detektierten Ionen gegenüber den theoretischen Vorschlägen konnte im Rahmen der Analyse nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob es sich bei dem Basispeak der MALDI-Messungen wirklich um ein Glycopeptid handelt. Vor allem die angenommenen Glycan-Spezies zeigen dort teilweise hohe Abweichungen von den theoretischen Massen. Bei der Bestimmung der Residualmassen der zugeordneten Aminosäuren im MSMS-Spektrum des HPLC-Aliquotes (FTICR-Messung) werden dagegen überwiegend niedrige relative Massenabweichungen zu den theoretischen Residualmassen der vorgeschlagenen Aminosäuren erhalten, wobei eine Aussage über die tatsächliche Anzahl der einzelnen Aminosäuren und ihre Primärstruktur im Glycopeptid, anhand der vorliegenden Messungen, nicht mit Sicherheit möglich ist.

Im vollständigen Sekret sowie der HPLC-Fraktion c' und auch bei Messungen direkt vom Drüsengewebe, wird als Basispeak im Massenbereich  $m/z > 1000$  Da, übereinstimmend, die Masse  $m/z$  3223 ( $z = 1, 2, 3, 4, 5$ ) gefunden. Es muss angenommen werden, dass es sich bei der Masse  $m/z$  3223 u bereits um ein Fragment und nicht um das intakte Glycopeptid handelt. Das intakte Glycopeptid ist sehr wahrscheinlich in einer anderen HPLC-Fraktion enthalten und hat eine höhere Masse, als das letztlich untersuchte Ion. Es zeigte sich, daß eine enzymatische Spaltung der Glycane vor der MS-Analytik in diesem Falle notwendig ist, da die MSMS-Daten sonst schwer zu interpretieren sind. Ebenso muss eine bessere Precursorselektion mit deutlich kleinerem Massenfenster verwendet werden und eine weitere Optimierung der HPLC-Methode entwickelt werden. Aufgrund der insgesamt geringen Ausbeute der Fraktionierung des Sekrets konnte diese Analyse mit der vorhandenen Probenmenge im Untersuchungszeitraum nicht mehr durchgeführt werden.

**Bildgebende MS**

Im Rahmen der MALDI-TOF-Messungen an den Gewebepreparaten der Drüse ist es gelungen ein Ionenintensitätsverteilungsbild des Signales  $m/z$  3223 u aufzunehmen. Es handelt sich hierbei um einen Ausschnitt der Innenseite des präparierten Organs, von dem angenommen werden kann, daß er unmittelbar Drüsenzellen enthält ( $100 \mu m \times 100 \mu m$ , ein Puls-pro-Pixel, Abbildungen 6.22, 6.23). Die erkennbare Verteilung lässt darauf schließen, daß es sich bei der Substanz um einen Sekretbestandteil handelt, der unmittelbar auf den Zellstrukturen aufliegt. Neben der Masse  $m/z$  3223 u ergibt das Verteilungsbild der Masse  $m/z$  184 u, das der Kopfgruppe von PC-Lipiden zugeordnet werden kann, die Oberfläche der Drüsenzellen wieder, wobei im aufgenommenen Ausschnitt keine klare Trennung zwischen einzelnen Zellen erkennbar wird.

Tabelle 6.9: Peakliste der MALDI-Messung von HPLC-Fraktion b am Spektrometer ALADIM II. Ab Peak Nr. 3 ergibt sich für die höheren Massen die Anlagerung eines Hexosemonomers (Hex - H<sub>2</sub>O). Markierte Massen zeigen das Vorkommen in mehreren Spektren an. Für diese Massen wird i.d.R. ein Strukturvorschlag angegeben.

Nr.	Label dp	[u]	Max. in dp	[u]
1	23282.453	583.927	23282	583.908
2	24161.666	620.046	24161	620.018
3	27728.330	782.358	27727	782.294
4	30940.055	944.623	30939	944.567
5	33886.258	1106.894	33885	1106.822
6	36623.316	1269.155	36623	1269.135

Tabelle 6.10: Peakliste potenzieller Lipidsignale der MALDI-Messungen an Nautilus-Gewebe am Spektrometer ALADIM II.

Nr.	Label dp	[u]	Max. in dp	[u]
1	10970.948	184.288	10971	184.290
2	12087.480	211.285	12086	211.248
3	12864.191	231.152	12862	231.095
4	13392.381	245.173	13394	245.216
5	13837.997	257.322	13837	257.295
6	16389.904	332.559	16388	332.499
7	17313.414	362.161	17311	362.082
8	17496.854	368.191	17496	368.163
9	18771.223	411.457	18771	411.449
10	18829.424	413.491	18828	413.441
11	19171.777	425.553	19170	425.490
12	19616.209	441.470	19615	441.426
13	19949.070	453.583	19947	453.507
14	20379.666	469.496	20379	469.471
15	20727.617	482.555	20727	482.531
16	21095.994	496.575	21095	496.537
17	21771.893	522.823	21771	522.788
18	22186.496	539.258	22186	539.238
19	22475.857	550.879	22475	550.844
20	23561.213	595.572	23560	595.521
21	23649.467	599.283	23649	599.263
22	27716.822	782.804	27716	782.764
23	28173.111	804.919	28170	804.767
24	28496.764	820.792	28496	820.755
25	29039.680	847.767	29039	847.733
26	29081.838	849.880	29080	849.788
27	31227.479	960.888	31226	960.809
28	31637.934	982.900	31637	982.850
29	32552.166	1032.824	32553	1032.870

Tabelle 6.11: Peakliste der MSMS-Messungen des Nautilus-Sekrets am Spektrometer Q-Star XL (Precursorion:  $m/z$  3223,  $z = 1+$ ) und LTQ-FTICR (Precursorion:  $m/z$  806,  $z = 4+$ ). Die angegebenen FTICR-Massen sind deconvuliert. In mehreren Spektren vorkommende Peaks bzw. Peaks mit Strukturvorschlag sind rot markiert.

Nr.	qTOF-MS	FTICR-MS
1	3207.32	(16767.32227)
2	2457.97	3108.33252
3	1949.88	<b>3107.564209</b>
4	1863.87	3106.977783
5	1847.80	3104.6521
6	1692.77	3101.666016
7	<b>1405.64</b>	3089.549072
8	1097.61	2979.467529
9	<b>1060.52</b>	2893.434326
10	<b>782.45</b>	2795.381104
11	767.33	2792.414307
12	752.36	2789.45874
13	750.39	2777.370117
14	739.33	2724.346191
15	685.32	2499.234131
16	662.31	2442.213135
17	600.28	2295.14502
18	<b>583.27</b>	2164.104248
19	553.34	2065.038086
20	520.28	<b>1060.558838</b>
21	<b>499.19</b>	<b>1043.532104</b>
22	455.17	<b>944.463928</b>
23	437.25	926.461548
24	<b>429.28</b>	<b>813.424561</b>
25	427.21	<b>782.451599</b>
26	419.23	708.401917
27	412.25	<b>666.356384</b>
28	394.23	<b>609.334961</b>
29	385.14	<b>429.28183</b>
30	375.16	-
31	324.19	-
32	<b>313.17</b>	-
33	308.13	-
34	301.13	-
35	299.17	-

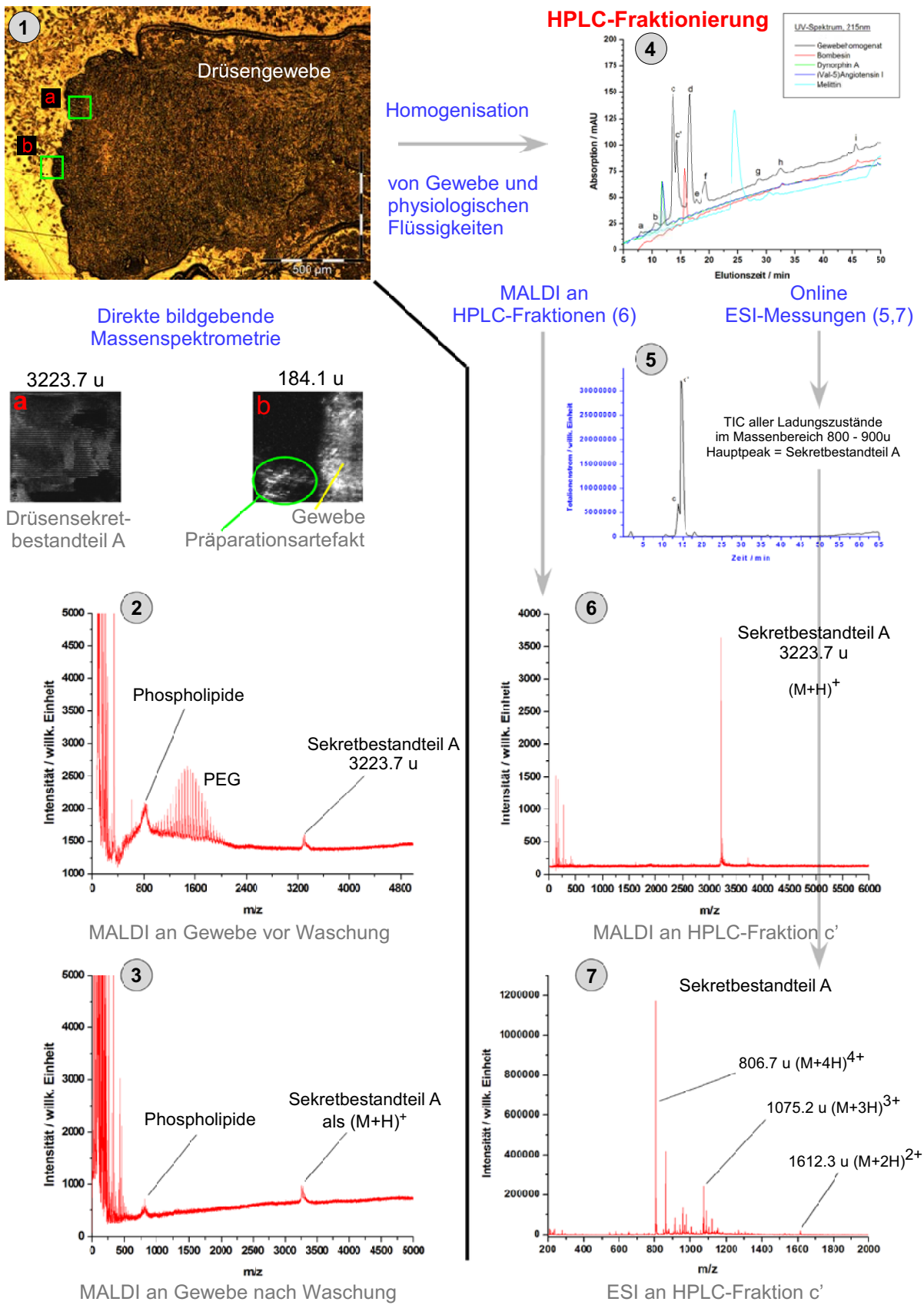


Abbildung 6.22: Kombinierte MALDI/SMALDI/ESI-HPLC-MS Analytik an nativen biologischen Proben. Einzelheiten siehe Haupttext.

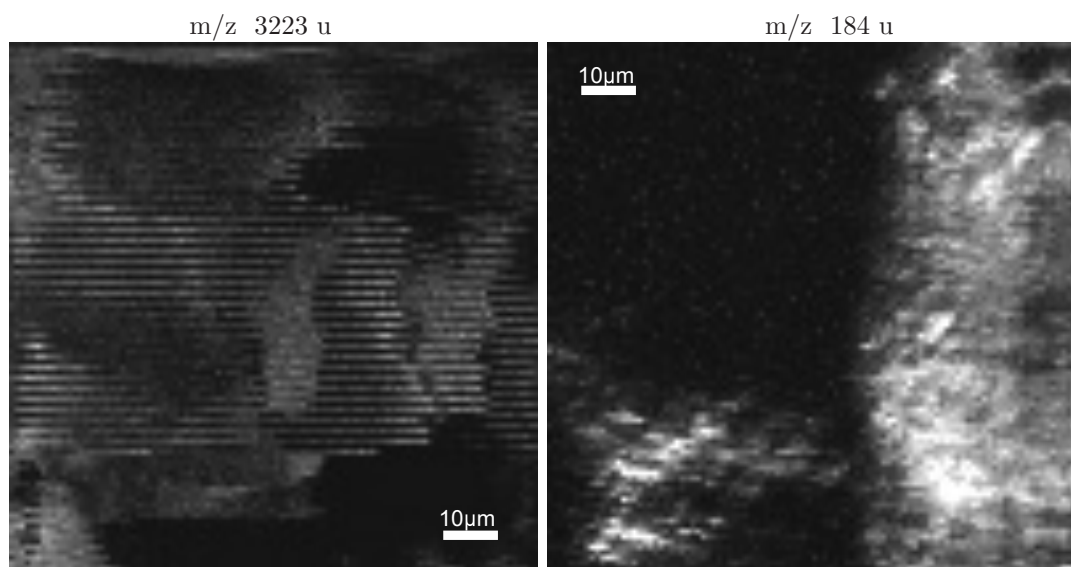


Abbildung 6.23: Vergrößerung der MSI-Darstellungen aus Abbildung 6.22. (Links) Hauptbestandteil des ionisierten Drüsensekretes auf der Oberfläche des Schnittpräparates. (Rechts) Signale der PC-Kopfgruppe auf dem Gewebepreparat. **Pixelgröße** = 1  $\mu m$ . Einpuls pro Pixel Messungen am Spektrometer LAMMA 2000. Bildgröße = 100  $\mu m$  x 100  $\mu m$ .

Online HPLC-ESI-MS

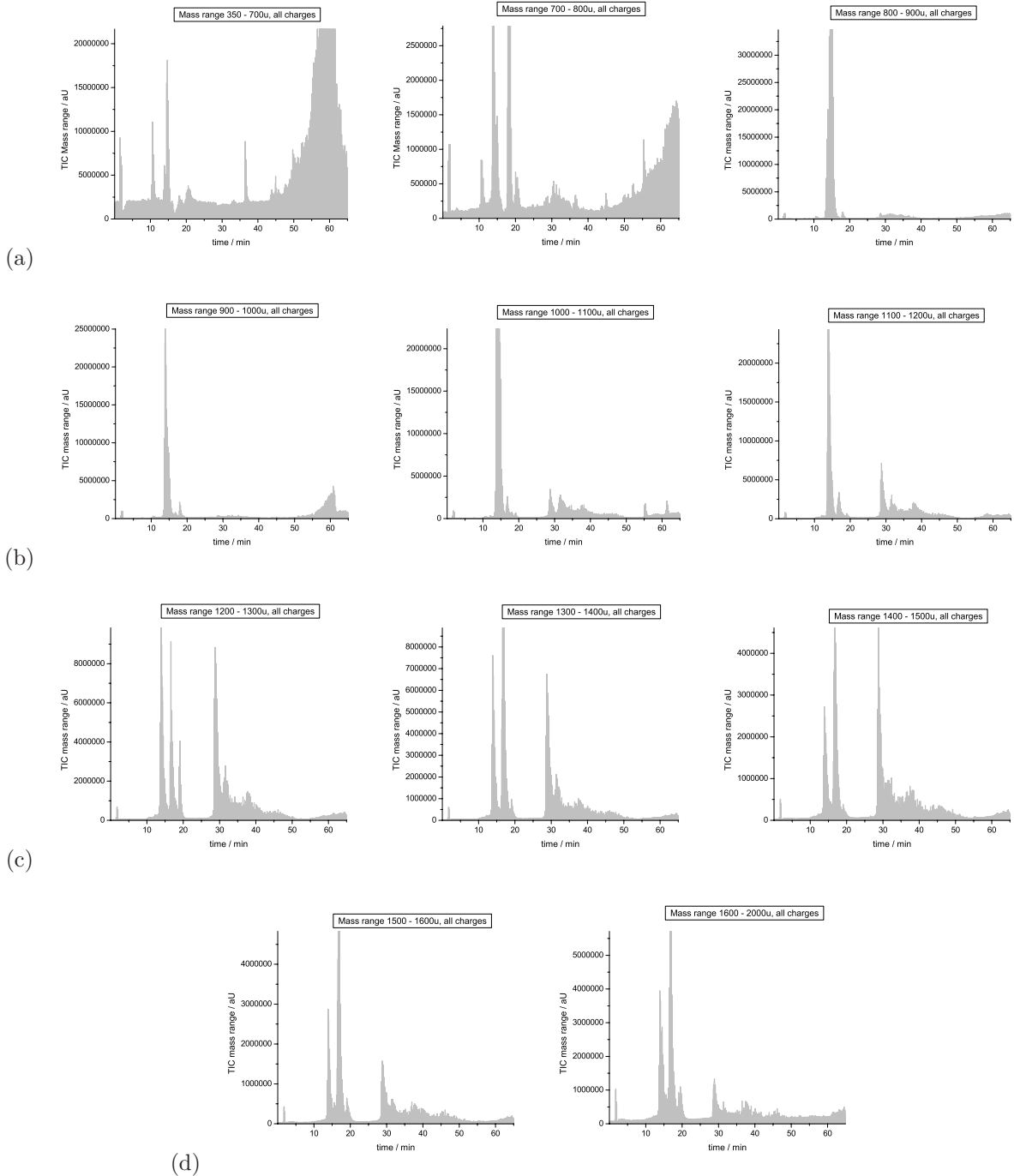


Abbildung 6.24: TIC-Chromatogramme der Online HPLC ESI-Messungen nach Massenbereichen. (a)  $m/z$  350 - 700; 700 - 800; 800 - 900, (b)  $m/z$  900 - 1000; 1000 - 1100; 1100 - 1200, (c)  $m/z$  1200 - 1300; 1300 - 1400; 1400 - 1500, (d)  $m/z$  1500 - 1600; 1600 - 2000.

## Online nano-HPLC-ESI-MS

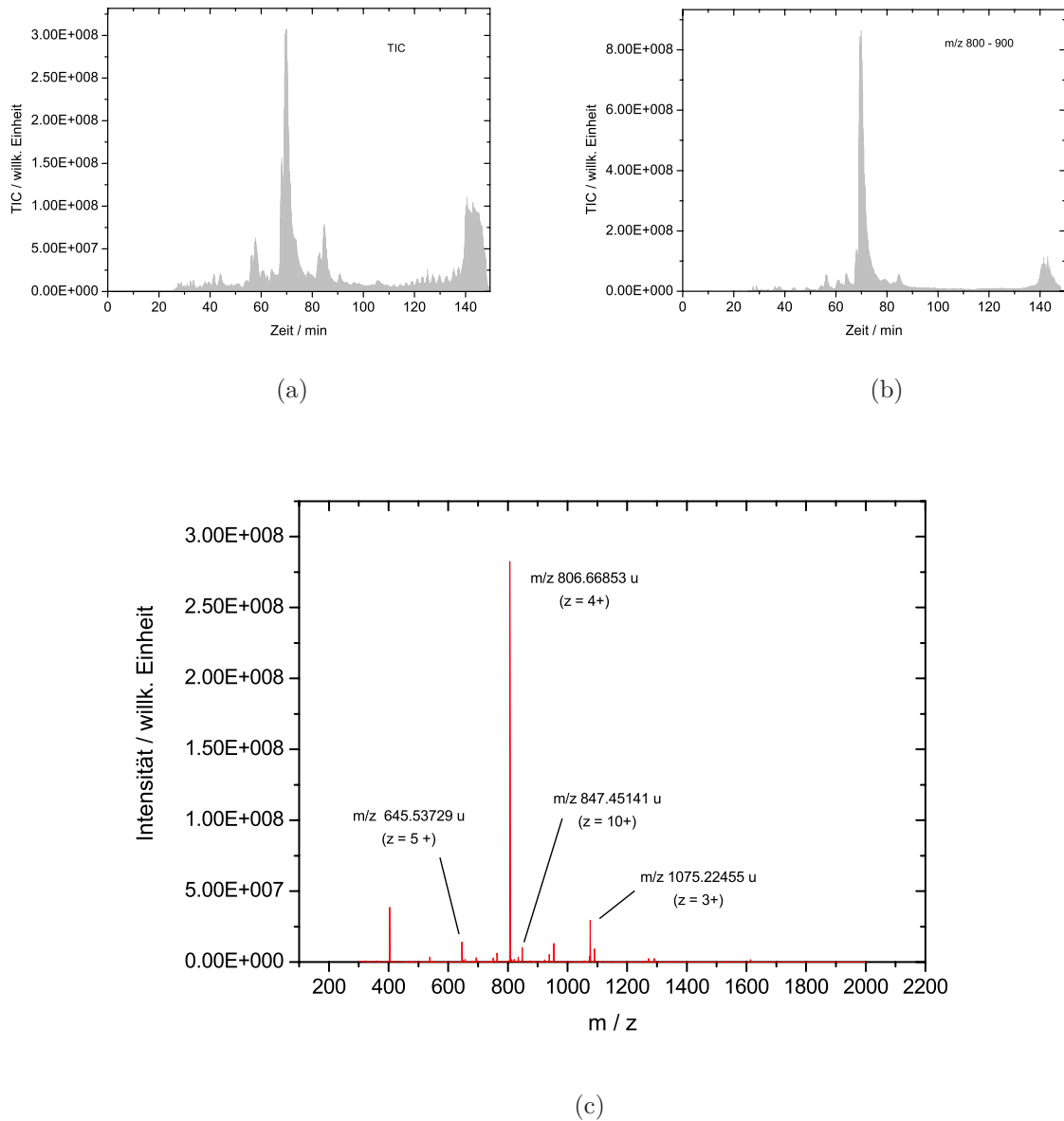
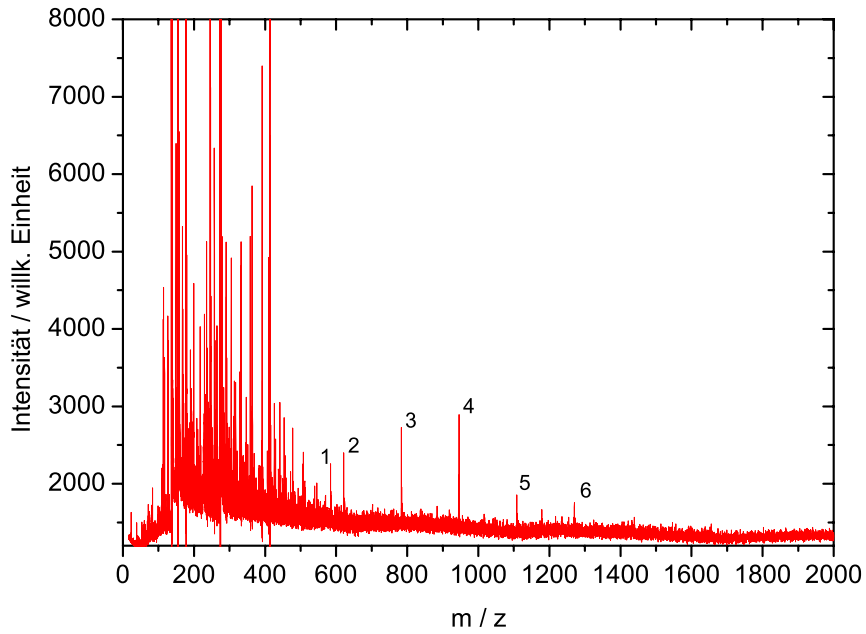
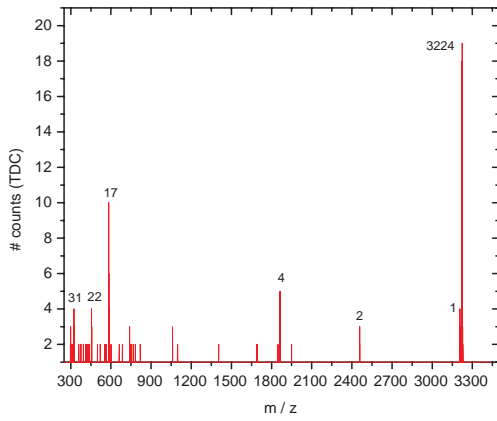


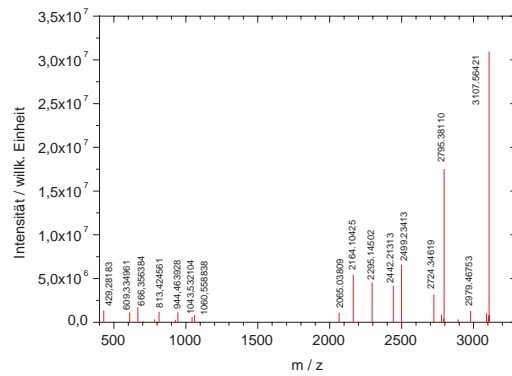
Abbildung 6.25: (a) TIC-Chromatogramm der Online HPLC ESI-Messung (Ultimate, Nano-HPLC). (b) TIC-Chromatogramm der Spektren mit Basispeak im Bereich  $m/z$  800 u - 900 u. (c) FTICR-Spektrum des Zeitabschnitts  $t = 68 \text{ min} - 73 \text{ min}$ .



(a)



(b)



(c)

Abbildung 6.26: (a) MALDI-MS an HPLC-Fraktion b. Elutionszeit = 10.2 min. (b) MSMS-Messung aus dem unfraktionierten Nautilus-Sekret am Spektrometer Q-Star XL (qTOF-Hybridspektrometer). (c) Deconvulierte MSMS-Messung am LTQ-FTICR-MS.



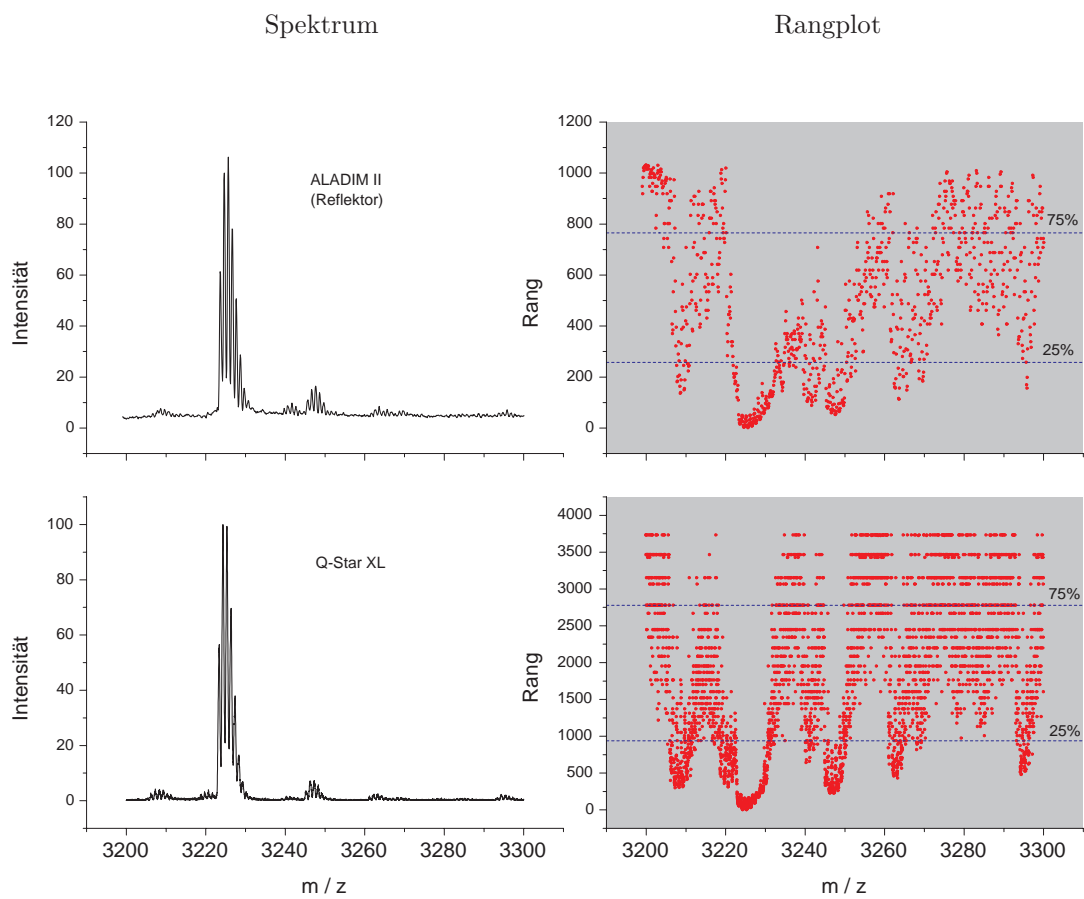


Abbildung 6.27: Vergleich der MALDI-Flugzeitspektren einer nativen Probe mit 2,5-DHB. Aufnahmen am Spektrometer Q-Star XL (Q-TOF, Hybridspektrometer) und ALADIM II.

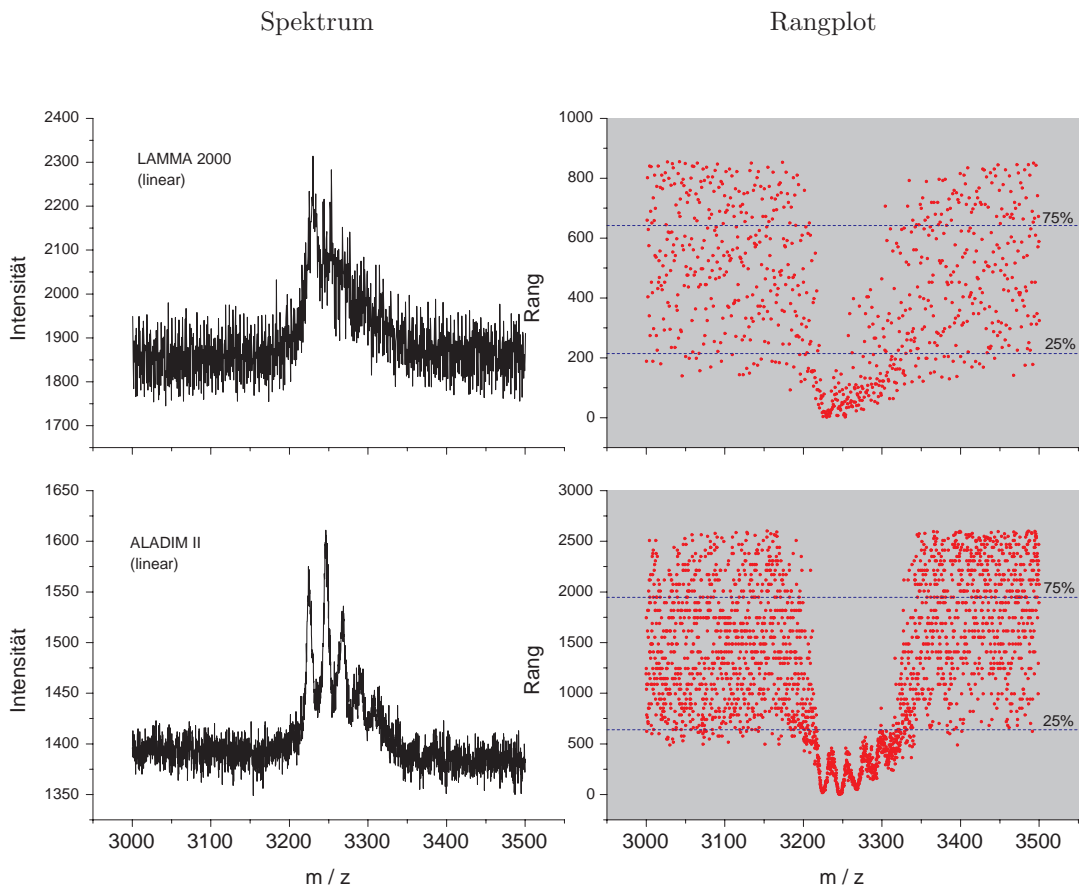


Abbildung 6.28: Potenziell physiologisch aktives (Glyko)Peptid des Cephalopoden *Nautilus pompilius L.*. Vergleichende lineare MALDI-TOF-Messungen an den Spektrometern LAMMA 2000 und ALADIM II. Rangplot der Datenpunkte im dargestellten Massenintervall zum Vergleich der Intensitätsverteilungen in einer quantitativen Auswertung.

Am Beispiel der Präparation von nativem Drüsengewebe des Kopffüßlers *Nautilus pompilius L.* konnten Spektren mit potentiellen Peptidanalyten erhalten werden. Aufgrund der zum Untersuchungszeitraum ausstehenden Sequenzierung des Genomes dieses Organismus und der Größe des häufigsten vermessenen Ions (potentielles Glycopeptid,  $M > 3$  kDa), war eine direkte Identifizierung, im Rahmen der durchgeführten MALDI-Analytik mit Flugzeitspektrometern, nicht möglich. Die deshalb begonnene LC-ESI-FTICR-MS-Analytik lieferte Daten, die, hinsichtlich der auftretenden Ladungszustände und Fragmente, dennoch Strukturvorschläge ermöglichte. Die HPLC-Läufe geben dabei in Summe Aufschluss über das Elutionsverhalten der Sekretbestandteile, auch im Vergleich zu Referenzsubstanzen (Peptiden in Abbildung 6.22). Im Falle von Lipiden (z.B. Phospholipiden) ist die Aussagefähigkeit hier aber stark eingeschränkt, da die Elutionsbedingungen für diese Substanzen nicht geeignet sind.

Die verwendete Sprühpräparationstechnik zeigt sich an nativen biologischen Gewebeproben, wie dem hier vorliegenden Gewebe des Kopffüßlers anwendbar und auch im einstelligen Mikrometermaßstab zu einer Analytik mit Peptiden ist sie erfolgreich einsetzbar. Die (ohne geeignete Nachkalibrierung) eingeschränkte Massengenauigkeit der TOF-MS-Technik setzt hier aber klar Grenzen bei der direkten *in-situ* Identifizierung. Dies ist aber von vornherein erwartet worden und schmälert die Ergebnisse der erhaltenen MSI-Darstellungen bei einer Pixelgröße von  $1 \mu m$  nicht.

#### 6.4.5 Fazit

Die ortsauflösend vermessenen artifiziellen Matrix- und Peptidproben zeigen die im aktuellen Aufbau erreichbare laterale Auflösung am Spektrometer LAMMA 2000, indem z.B. mit Matrix präparierte Mikrometerhohlraumstrukturen korrekt abgebildet werden können. Die bislang höchste erreichte laterale Strukturauflösung an artifiziellen Peptidproben beträgt dabei in etwa  $0.5 \mu m$  bei einer Pixelgröße von  $0.25 \mu m$ . Sie liegt damit klar unter  $1 \mu m$ . Die höchste erreichte laterale Strukturauflösung an nativen Proben bei Mehrpulsmessungen beträgt dann in etwa  $2 \mu m$  bei einer Pixelgröße von  $1 \mu m$ . Zudem ermöglichen diese Messungen die Bestimmung der realen analytischen (physikalischen) Auflösung am einzelnen Rasterort. Diese wird auf die Absolutmenge der Analyte und die reale Desorptionsfläche bei n-Pulsen in einer Messung bezogen und ist höher, als die erreichte „Bildauflösung“, die formal durch die Pixelgröße festgelegt ist. In den vermessenen artifiziellen Peptidproben beträgt sie in etwa zwischen  $0.2 \mu m$  und  $0.7 \mu m$  bei Ein-Puls-pro-Pixel-Messungen. Es konnte gezeigt werden, daß die strukturelle Darstellung von Hefezellen, die in den Abbildungen eine Größe zwischen  $3 \mu m$  und  $15 \mu m$  im lateralen Querschnitt aufweisen, prinzipiell über Fragmentmassen von Phospholipiden möglich ist. Aus den Messungen folgt für Lipide eine analytische Auflösung an nativen biologischen Proben von in etwa  $0.6 \mu m$  bis  $1 \mu m$  bei Einpulsmessungen.

Bei der Vermessung des Nierengewebeschnittes einer Maus konnte eine eindeutige Zuordnung der detektierten und sehr wahrscheinlich im Gewebe strukturbildenden Massen/Fragmente nicht erfolgen, da hierzu die Massengenauigkeit nicht ausreichend war. Auf diesem Gebiet kann mittlerweile aber bereits auf Fortschritte verwiesen werden, die innerhalb der AG Spengler mittels Nutzung der Orbitalfallentechnologie in Kombination mit der hier entwickelten Sprühpräparation und der Verwendung einer im Hause entwickelten AP-SMALDI-Quelle mit einem Laserfokus von ca.  $10 \mu m$  erreicht wurden. Es handelt sich hierbei um noch unveröffentlichte Daten aus der Promotionsarbeit von Frau K. Huber und Herrn D. R. Bhandari.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß molekulare Aggregate der Zellwandstrukturen von Hefe

ebenso in MALDI-Massenspektren detektiert werden können. Ihre genauere Zusammensetzung ist dabei nicht bestimmt worden, dies scheint aber anhand der Spektrenqualität durchaus möglich zu sein. Die Zugehörigkeit zur Zellwand konnte dagegen, anhand der Vermessung fraktionierter Proben, überprüft werden. Hierzu ist zunächst das Trockengewicht der Hefezellen ermittelt worden. Dieses entsprach bei den vermessenen Proben ca.  $36 \% \pm 5 \%$  des Feuchtgewichtes. Ein Teil der getrockneten Proben wurde zur gezielten Extraktion der einzelnen Bestandteile, gemäß einem bekannten Protokoll (Methode nach Freimund et al. 2003 [302]), verwendet. Für diese Ergebnisse gilt ähnliches, wie für die Verdauergebnisse. Sie wurden wegen der geringen Zusatzinformation nicht näher beschrieben. Der andere Teil der getrockneten Proben ist präpariert und massenspektrometrisch vermessen worden. Auch bei MSI-Messungen von Hefen kann mittlerweile ebenso auf einen Fortschritt, gegenüber den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen, verwiesen werden. So sind in Kombination der hier entwickelten Sprühpräparation mit der Orbitalfallentechnologie sowie dem Einsatz von einer im Hause entwickelten AP-SMALDI-Quelle mit einem Laserfokus von ca.  $10 \mu m$ , Messungen von intakten Lipiden an Hefezellen gelungen. Es handelt sich hierbei um Messungen von Herrn D. R. Bhandari, die in Zusammenarbeit mit Herrn Th. Hennich (Uni Genf) durchgeführt wurden<sup>6</sup>.

Es konnte ebenso gezeigt werden, daß unter bestimmten Voraussetzungen an artifiziellen MALDI-Proben Undersampling- und/oder Oversampling-Artefakte auftreten. Die aufgrund von Undersampling eintretenden Artefakte beeinflussen hierbei in erster Linie die Strukturähnlichkeit der erhaltenen Abbildung. Oversampling verändert in den untersuchten Beispielen die Intensitätsverteilung innerhalb einer Abbildung deutlich, ohne dabei jedoch die Strukturähnlichkeit (Silhouette) wesentlich zu beeinträchtigen. Es konnte festgestellt werden, daß Abweichungen aufgrund von Positionierungenauigkeiten innerhalb der Rastermechanik zu bedeutsameren Auswirkungen bei bildgebenden Messungen in den untersuchten Dimensionen führen, als die durch (moderates) Oversampling herbeigeführten Artefakte.

---

<sup>6</sup>Bislang unveröffentlichte Messungen.

## 6.5 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Die Reflexionsgrade<sup>7</sup> der vermessenen artifiziiellen Proben liegen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 349$  nm zwischen  $R \approx 18$  % für Diamant<sup>8</sup> ( $R = 0.18277$ ,  $n = 2.49356$ ,  $\theta_B = 68.148^\circ$ ),  $R \approx 36$  % für Gold ( $R = 0.36193$ ,  $n = 1.7538$ ,  $\theta_B = 68.564^\circ$ , Fm3m),  $R \approx 57$  % für kristallines Silizium ( $R = 0.56706$ ,  $n = 5.40474$ ,  $\theta_B = 80.801^\circ$ , [111]) und  $R \approx 93$  % für Aluminium ( $R = 0.92525$ ,  $n = 0.36448$ ,  $\theta_B = 76.656^\circ$ , Fm3m). Die Berechnung von  $R$  kann nach Fresnel erfolgen, über:

$$R = \left( \frac{n_1 - n_0}{n_1 + n_0} \right)^2 \quad (6.1)$$

mit  $n_1$ ,  $n_0$  den Brechungsindizes des Materials und der Umgebung. Zudem haben die Oberflächenstruktur und mögliche Verunreinigungen im Material einen Einfluss auf die Reflexion. Die relative Reihenfolge der Reflexionsgrade der vermessenen Materialien,  $\text{Al} > \text{Si-Wafer} > \text{Au} > \text{Diamant}$ , wird anhand der benötigten Leistung der Laserpulse bei den CLSM-Aufnahmen in den Versuchen bestätigt. Die Leistung wird bei (nahezu) konstanter Pulslänge über die Pulsenergie (Diodenstrom) verändert.

### 6.5.1 Blendenauswahl und Messmethodik

Die optimale Blendengröße eines CLSM-Detektors stellt einen Kompromiss dar. Am Laserobjektiv des Spektrometers LAMMA 2000 wird für die Wellenlänge  $\lambda = 349$  nm in etwa ein Vergrößerungsfaktor von  $M = 13.9$  bei einer rückwertigen Abbildung erreicht. Die rechnerisch optimale Blendengröße für CLSM-Messungen kann nach der approximierten Gleichung [269]:

$$D = \frac{0.5 \lambda M}{NA}$$

auf  $D \approx 39 \mu\text{m}$  abgeschätzt werden. Hierbei erfolgt die laterale Begrenzung auf die FWHM-Querschnittsfläche. Die im CLSM-Aufbau wechselseitig als Detektionsblenden verwendeten Aperturen besitzen Lochkreisdurchmesser von  $10 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$  und  $20 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$ . Am Ort des rückwertigen Fokus entspricht dies rechnerisch in etwa  $0.21$  AU ( $10 \mu\text{m}$  Blende) bzw.  $0.42$  AU ( $20 \mu\text{m}$  Blende), bezogen auf Reflexionen der Wellenlänge  $\lambda = 349$  nm. Der Zuwachs an Kontrast bei Verwendung der  $10 \mu\text{m}$ -Blende im Gegensatz zur  $20 \mu\text{m}$ -Blende in den Beispielaufnahmen eines goldbeschichteten Probenträgers in Abbildung 6.29 steht dabei der Verlust an Lichtintensität gegenüber. In der Darstellung zeigt sich bei identischen analogen Bedingungen eine (arithmetisch) mittlere Pixelintensität (8 Bit) von  $165.22 \pm 17.10$  mit der  $20 \mu\text{m}$ -Blende, gegenüber einer (arithmetisch) mittleren Pixelintensität von  $123.30 \pm 42.78$  mit der  $10 \mu\text{m}$ -Blende. Das entspricht einem mittleren relativen Intensitätsunterschied von ca. 25 %. Dieser steht einem theoretisch erwarteten Intensitätsverlust von ca. 33 % gegenüber. Man erkennt bei einem Vergleich der Teilbilder in Abbildung 6.29, das die axiale Auflösung bei der  $10 \mu\text{m}$ -Messung deutlich höher ist, als bei der  $20 \mu\text{m}$ -Messung. Die erwartete axiale Auflösung (FWHM) mit der  $10 \mu\text{m}$ -Blende beträgt nach Approximation über [269]:

$$d_z = \frac{0.67 \lambda}{n \left( 1 - \sqrt{1 - \left( \frac{NA}{n} \right)^2} \right)}$$

in etwa  $1.09 \mu\text{m}$ . Die axiale Distanz des Beugungsmaximums zum ersten Minimum im 3D-iPSF-Profil (*Peak-to-Valley*) bei zentrisch justiertem Laserstrahl ist in Abbildung 5.61 (a) auf S. 303 zu erkennen. Diese entspricht im Wesentlichen dem theoretisch nach Linfoot und Wolf beschriebenen Verhalten [269].

<sup>7</sup>Referenz: <http://refractiveindex.info> Retrieved on Jan. 01, 2012.

<sup>8</sup>Die Messungen an Diamanten sind nicht explizit dargestellt.

In Abbildung 6.30 wird das beugungsbegrenzte Intensitätsprofil an der CLSM-(Detektions-)Blende sowie der Verlauf der transmittierten Energie dargestellt.

Im Rahmen der Untersuchungen von MALDI-Matrixpräparationen und Teststrukturen sind in dieser Arbeit hauptsächlich Reflexions-CLSM Messungen durchgeführt worden. Die Reflexionsmessungen entsprechen der bereits auf S. 17 angegebenen Charakteristik. Es handelt sich bei allen Messungen um Ein-Puls-pro-Pixel Darstellungen. Zu Testzwecken ist auch der Versuch unternommen worden, mit einem zusätzlichen Fluoreszenzfilter (siehe Abb. 4.7) im Aufbau vor dem CLSM-PMT (Abb. 4.5), Fluoreszenzsignale entsprechender Proben zu detektieren. Die Abbildung des Fluoreszenzsignals ist dabei gegenüber der Lage der Reflexionsabbildung verschoben und erfordert eine angepasste Lage der zweiten Blende und des Detektors. Das Fluoreszenzsignal ist zudem sehr schwach und benötigt gegenüber den Reflexionsmessungen eine höhere Verstärkung. Die Ergebnisse der Fluoreszenztestmessungen sind, da sie gegenüber den Reflexionsmessungen hier keine Zusatzinformation liefern, nicht explizit dargestellt.

Tabelle 6.12: Parameter der CLSM-Messungen zu Abbildung 6.29.

Geräteparameter	
PMT-Potential	: -1 kV
Blendengröße	: 10 bzw. 20 $\mu m$
Laserpulsenergie	: ca. 58 $\mu J$
Abschwächung	: 39
ND-Filter	: 11 %
Restgasdruck	: ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Pulse-pro-Pixel	: 1
Schrittweite	: 1 $\mu m$
Pixelkantenlänge	: 1 $\mu m$
Kontrastauflösung	: 1 Byte/Pixel

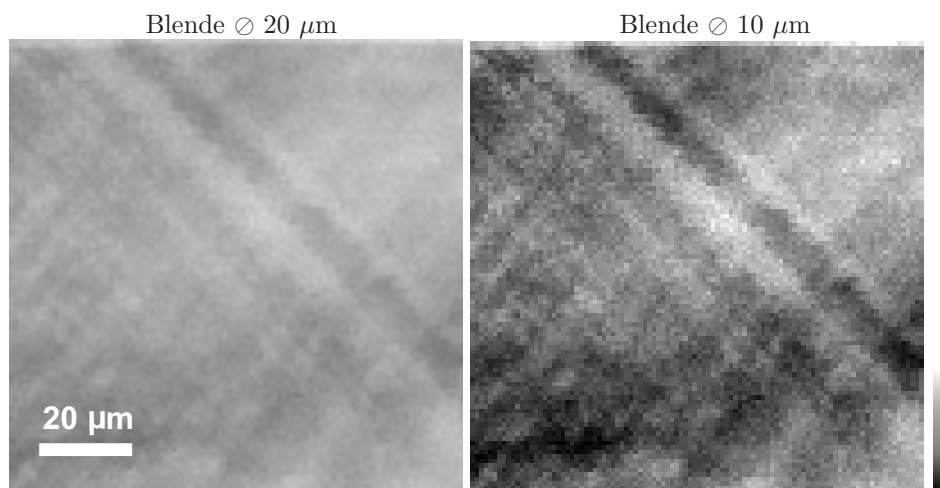
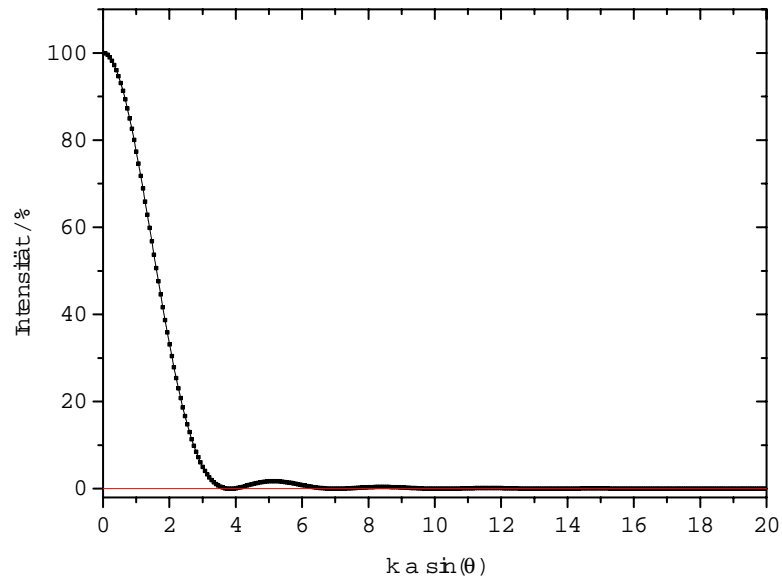
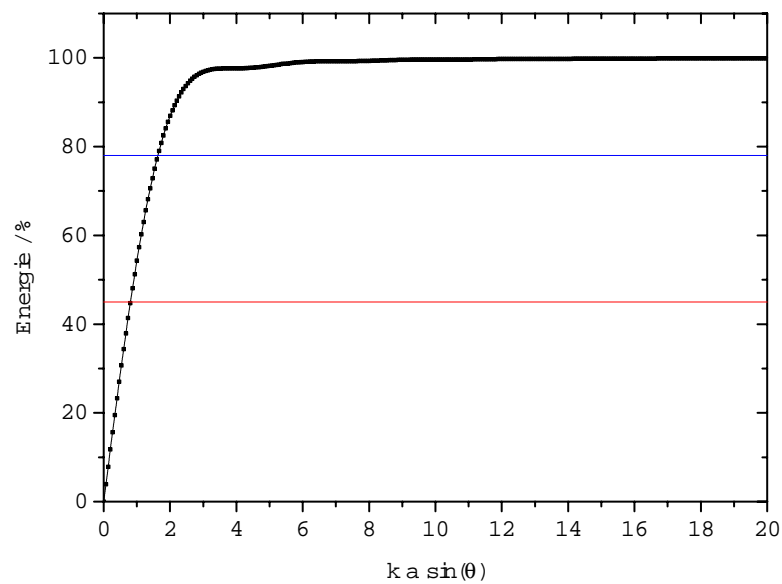


Abbildung 6.29: 100  $\mu m$  x 100  $\mu m$  CLSM-Aufnahmen eines identischen Bereiches einer vergoldeten Aluminiumtelleroberfläche. (Bild links) 20  $\mu m$  Detektionsblende (Blende 2). (Bild rechts) 10  $\mu m$  Detektionsblende.



(a)



(b)

Abbildung 6.30: (a) Beugungsbegrenztes Intensitätsprofil an der CLSM-Blende. (b) Transmittierte Laserenergie bei einer Blendengröße von ca. 0.21 AU (ca. 45 %, rot) und ca. 0.42 AU (ca. 78 %, blau).  $k = 2\pi/\lambda$ ,  $a$  = Radius der Austrittsapertur,  $\theta$  = Beugungswinkel.

### 6.5.2 Rauheit einer Targetoberfläche

Anhand von sequenziellen Rastermessungen eines  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$  großen Areals konnte die Rauigkeit der spanend bearbeiteten und grob polierten Aluminiumtelleroberfläche abgeschätzt werden. Die ab-

schliessende dünne Goldbeschichtung hat einen geringen Einfluss auf das Topologieprofil des Tellers. Die ermittelte RMS-Rauheit beträgt  $R_{rms} = 1.25 \mu\text{m} \pm 0.25 \mu\text{m}$ . Das Ergebnis ist in Abbildung 6.31 gezeigt. Werte für den größten Höhenunterschied einer plangedrehten metallischen Fläche liegen (üblicherweise) im Bereich von  $R_z = 2.5 \mu\text{m}$ . Bei anschliessender polierender Nachbearbeitung können dann Werte um  $R_z \approx 0.04 \mu\text{m}$  erreicht werden [295]. Gängige Werte, die in der hauseigenen mechanischen Werkstatt für plangedrehte metallische Oberflächen erreicht werden, liegen dagegen im Bereich von  $R_z \approx 8 \mu\text{m}$  [296]. Die auflichtmikroskopische (VIS) Betrachtung der via CLSM vermessenen Targetoberfläche bestätigt die vermessenen Werte (siehe Tabelle 4.8 S. 157).

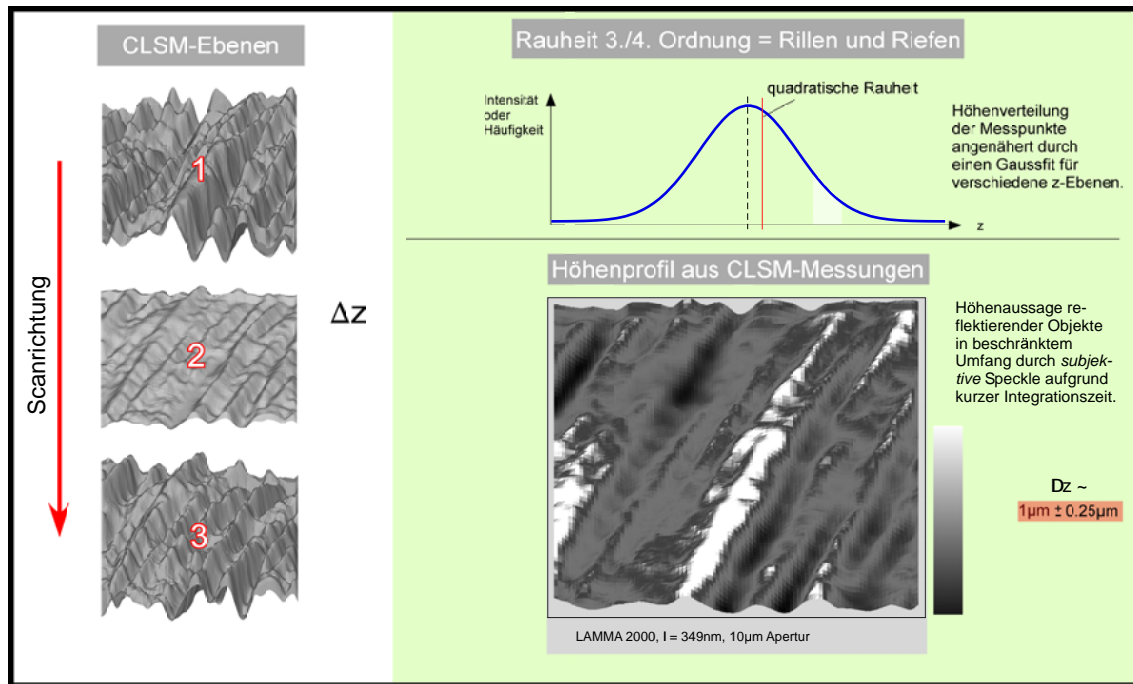


Abbildung 6.31: Abschätzung der *quadratischen Rauheit* eines Standardprobenträgers aus Aluminium mit Goldbeschichtung. CLSM-Vermessung mehrerer Ebenen und Zusammensetzung zu einem Bild. Die Rauheit wird als RMS-Wert ermittelt,  $R_{rms} = \sqrt{\frac{1}{MN} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N (z(x_m, y_n) - \bar{z})^2}$ , mit dem arithmetischen Mittelwert  $\bar{z}$ . Die Beschränkung der *Präzision* liegt im Wesentlichen in dem *systematischen Fehler*, der von der Probenverstellung (entlang der z-Achse) erzeugt wird und einem *Jitter*, der bei der Synchronisation der Laserfrequenz mit der ADC-Messzeit auftritt und dann zu *subjektiven Speckle* führen kann. Die Richtigkeit kann gesteigert werden, wenn mehrere Messungen von jeder einzelnen Probenstelle, aus den unterschiedlichen Ebenen herangezogen werden. Dies entspricht in erster Näherung einer Integration der Signalintensität über eine längere Messzeit und reduziert so die Standardabweichung des Mittelwertes, hat aber keinen Einfluss auf den systematischen Fehler der mechanischen Probenverstellung.



### 6.5.3 Ablationsprofil von Hohlräumlinienstrukturen

#### Vermessung der MALDI-Präparation aus Abbildung 6.3

Die CLSM-Vermessung der mittels einer Dried droplet-MALDI-Präparation hergestellten Probe von S. 354 Abb. 6.3 zeigt gegenüber dem unpräparierten Siliziumwafer deutliche Unterschiede bei der Darstellung der Linienhohlräumstrukturen. Wie bereits dargelegt, können die Hohlräumlinien bei Verwendung einer geeigneten Präparationstechnik sehr spezifisch mit der MALDI-Matrix 2,5-DHB beschichtet werden. Die Dried droplet-Präparation erzeugt dagegen eine deutlich ungleichmäßigere Verteilung der Matrix, die zudem größere und relativ langsam auf der Präparatoberfläche wachsende Kristalle entstehen lässt. Dementsprechend schlechter ist auch die Bildqualität der Dried droplet-Präparation bei der MS- wie auch bei der CLSM-Vermessung. Die Reflexionen lassen eine deutliche „Ausfransung“ an den Kristallausläufern erkennen. Diese, sehr wahrscheinlich aufgrund von zusätzlichen Reflexionen bzw. Reflexionsverlusten durch ungünstige Grenzflächenwinkel erzeugten, Artefakte beeinträchtigen die Abbildungsqualität gegenüber den CLSM-Messungen an den unpräparierten Wafern (siehe hierzu Abb. 6.35). Dennoch ist es möglich, wie in Abbildung 6.32 zu erkennen ist, eine Analyse der Ablation nach der zuvor durchgeführten MALDI-Messung im Vergleich zur Desorption anzustellen. Aufgrund der bekannten z-axialen Positionen während der MALDI-Messung, können gezielt Bereiche über bzw. unter dieser Position mittels CLSM vermessen werden, um den Hauptablationsbereich in der Präparation zu ermitteln. Überlagerungspositionen (Pixel in unterschiedlichen Ebenen) zeigen dabei eine sehr ähnliche bzw. eine identische Höhentopologie an. Es kann so ein Ablationsprofil anhand der CLSM-Messungen über der Fläche der MALDI-Rasterung erstellt werden. In Abbildung 6.33 ist eine Überlagerung (a) des MSI-Bildes des Matrixsignals  $m/z$  137 (rot) mit einer z-axialen Position aus einem tiefer liegenden Bereich (grün) als bei der MALDI-Rasterung zu erkennen. In Teilbild (b) liegt der eingestellte CLSM-Fokus dagegen im Bereich des gewählten MALDI-Fokus. Hierbei können dann den intensivsten Signalen in der MALDI-Abbildung die topologischen Bereiche aus den CLSM-Messungen zugeordnet werden, wenn die Übereinstimmung der Rasterrahmen dieser Aufnahmen gewährleistet ist. Diese Vergleiche in Abbildung 6.33 zeigen, daß sowohl in tiefer liegenden z-axialen Bereichen, wie auch im Bereich der MALDI-Fokusebene gemeinsame laterale Positionen intensive Pixel (hier gelb) besitzen. Die Kombination von Hauptdesorptionsbereich (intensive MALDI-Pixel) mit dem Hauptablationsbereich (intensive Bereiche aus einer tiefer liegenden CLSM-Ebene) kann dann im Zusammenhang mit der Präparationstechnik betrachtet werden. Wie anhand eines Vergleiches mit den Ergebnissen in Abbildung 6.3 auf S. 354 festgestellt werden kann, korrelieren die intensivsten Signale des Peptidanalyten Melittin eindeutig mit dem Bereich der stärksten Ablation in den CLSM-Bildern in Abbildung 6.33, was auch für das Matrixsignal  $m/z$  137 zutrifft. Aus dem MSI-Bild des Matrixsignals  $m/z$  137 im MSI-Bild in Abbildung 6.3 auf S. 354 geht eine Gleichverteilung der intensiven Signale in den (gesamten) Hohlräumstrukturen hervor, was sehr wahrscheinlich an der hohen Sensitivitätseinstellung des Messkanals liegt, d.h. die intensivsten Matrixsignale werden in ihrer Intensität beschnitten. Aus der Kombination der Untersuchungen mit den CLSM-Messungen geht demnach hervor, daß die intensivsten Analytsignale (Melittin) auch aus dem Bereich der stärksten Ablation hervorgehen.

Tabelle 6.13: Parameter der CLSM-Messungen zu Abbildung 6.32.

Geräteparameter	
PMT-Potential	: -1.96 kV
Blendengröße	: 20 $\mu m$
Laserpulsenergie	: 54 $\mu J$
Abschwächung	: 40
ND-Filter	: 11 %
Restgasdruck	: ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Pulse-pro-Pixel	: 1
Schrittweite	: 1 $\mu m$
Pixelkantenlänge	: 1 $\mu m$
Raumtemperatur	: ca. 18°C
Kontrastauflösung	: 1 Byte/Pixel

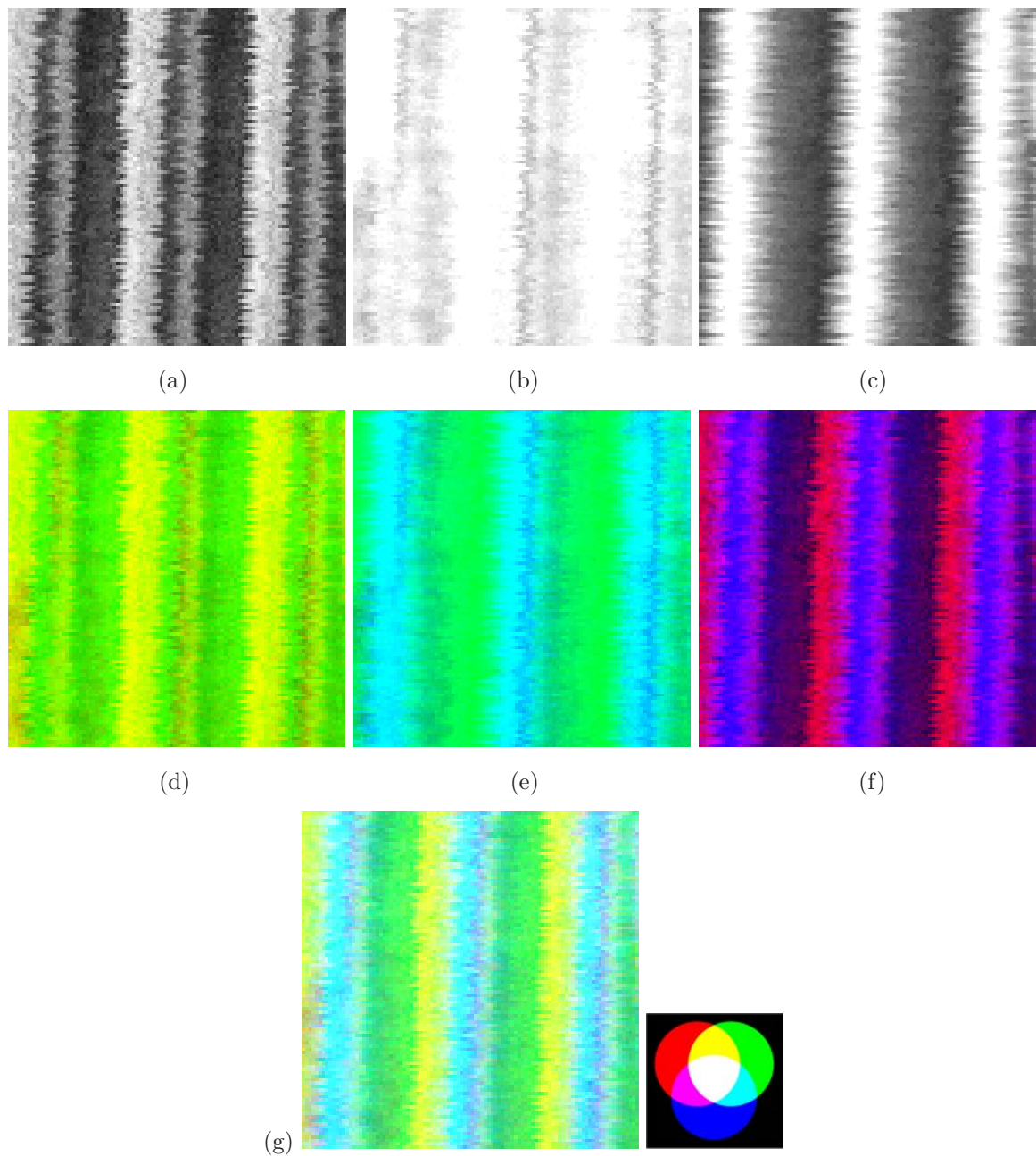
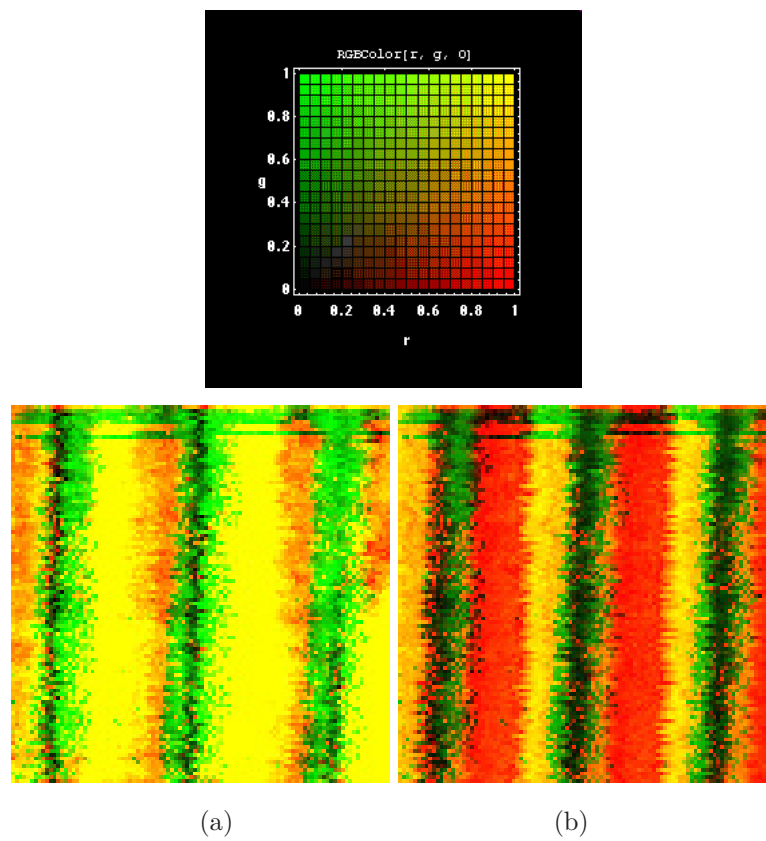


Abbildung 6.32: CLSM-Vermessung der MALDI-Präparation aus Abbildung 6.3 auf S. 352. (a) Der fokussierte Bereich liegt zwischen der Waferoberfläche der schmalen Stege und den mit Matrix und Peptid gefüllten Hohlraumlinien. Diese Position entspricht der Messposition der MALDI-Messungen. (b) Fokussierung der Bereiche der gefüllten Hohlraumlinien. (c) Fokussierung der Waferoberfläche (schmale Stege). Falschfarbzuordnung (a) = Rot, (b) = Grün, (c) = Blau. (d) Überlagerungsbild (a) und (b). (e) Überlagerungsbild (b) und (c). (f) Überlagerungsbild (a) und (c). (g) RGB-Überlagerungsbild der drei Aufnahmen (a), (b), (c).



---

Abbildung 6.33: Überlagerung des Ionenintensitätsverteilungsbildes  $m/z$  137 mit dem CLSM-Bild nach der MS-Messung von (a) einer tieferliegenden  $z$ -Position und (b) der MS-Messposition. Die Falschfarbe des MS-Bildes ist Rot, die der CLSM-Bilder ist Grün. In (b) ist ein deutlicher Matrixabtrag an der MS-Messposition zu erkennen (rot).

### Laterale Auflösung in Rasterrichtung am Beispiel der senkrechten Hohlraumlinien

Die Vermessung der (unpräparierten) Hohlraumlinienstrukturen des Siliziumwafer erfolgt zunächst mit der justierten 20  $\mu\text{m}$ -PMT Blende. Hierbei werden erst die Linienböden fokussiert und dann, durch senken des Proben targets, die Stege. Zwischen der Aufnahme der Böden und der Stege erfolgt eine Energieanpassung, wobei die Stege mit der justierten 10  $\mu\text{m}$ -Blende ca. 40 % mehr Energie benötigen, um die Maximalintensität erreichen zu können. Die Stege mit der justierten 20  $\mu\text{m}$ -Blende erscheinen im Vergleich zu den Messungen der Böden mit der 20  $\mu\text{m}$ -Blende und der Stege mit der 10  $\mu\text{m}$ -Blende unterbelichtet. Insgesamt wird durch die Darstellungen der dynamische Bereich, der an der vermessenen Siliziumoberfläche realisierbar ist, deutlich. Aufgrund der relativ geringen Absorption des Siliziumwafer-substrates bzw. der stärkeren Reflexion im Vergleich zu einer Goldoberfläche, ist eine relativ geringere Leistung erforderlich, um kontrastreiche Aufnahmen von den Mikrostrukturen zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.34 dargestellt. In Teilbild (c) ist dabei zu erkennen, daß die Wandbereiche zwischen den Stegen und dem Boden keinen 90°-Winkel zur Waagerechten ausbilden können, da vereinzelt Reflexionen in „Zwischenbereichen“ erkennbar sind. Im dargestellten Beispiel ist zudem die Lage der Böden gegenüber der Lage der Stege in den oberen Abbildungen (a), (b) um ca. 3 bis 5 Pixel in der Waagerechten nach links verschoben. Abbildung 6.35 gibt die Intensitätshäufigkeitsverteilung der Messungen mit der 20  $\mu\text{m}$ -Blende wieder. In Abbildung 6.36 ist eine über alle y-Positionen gemittelte Linienraasterung in x-Richtung zu erkennen und Abbildung 6.37 zeigt die MTF der Einzelmessungen aus Abbildung 6.34.

Tabelle 6.14: Parameter der CLSM-Messungen zu Abbildung 6.34.

Geräteparameter	
PMT-Potential	: -1 kV
Blendengröße	: 10 bzw. 20 $\mu\text{m}$
Laserpulsenergie	: 55 $\mu\text{J}$ bis 77 $\mu\text{J}$
Abschwächung	: 40
ND-Filter	: 11 %
Restgasdruck	: ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Pulse-pro-Pixel	: 1
Schrittweite	: 1 $\mu\text{m}$
Pixelkantenlänge	: 1 $\mu\text{m}$
Kontrastauflösung	: 1 Byte/Pixel

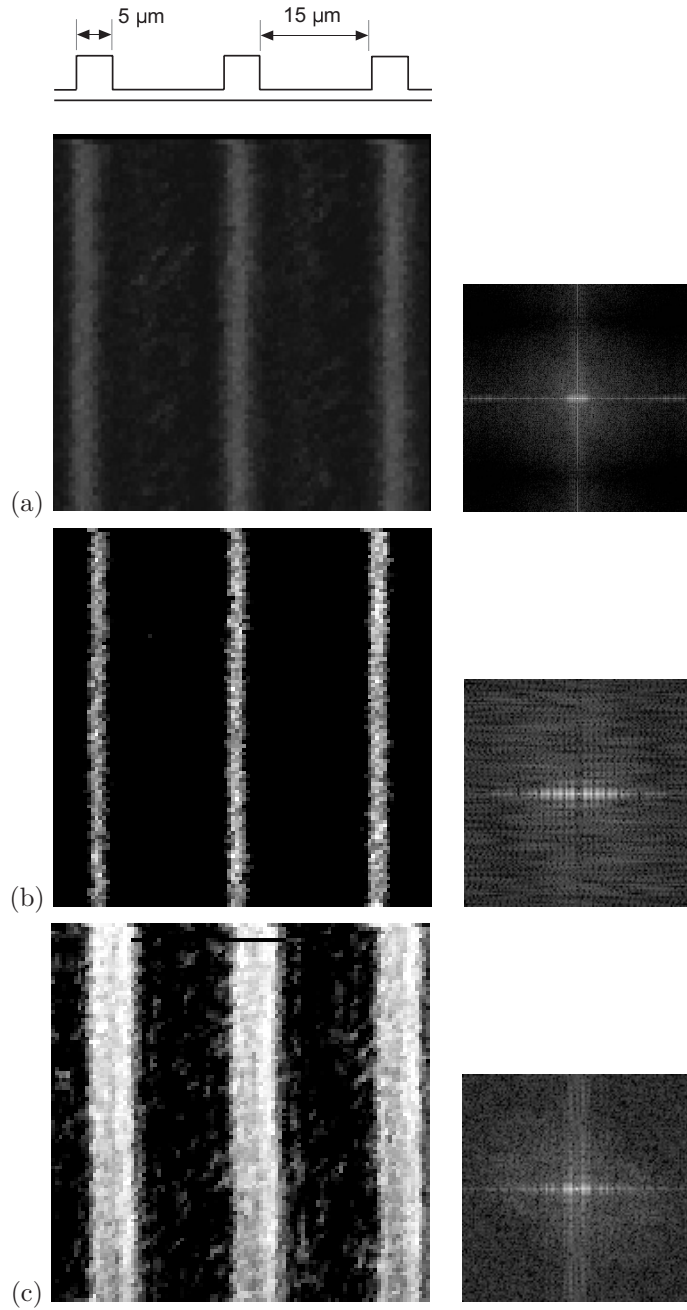


Abbildung 6.34: (Oben) Schemaschnitt durch den Wafer. CLSM-Aufnahmen (links) und PSFs (rechts) der Stege (a,b) und des Bodens (c) der geätzten Siliziumwafer (Abbildung 4.18). (a,c)  $20 \mu\text{m}$  Blende = Apertur 2, (b)  $10 \mu\text{m}$  Blende = Apertur 1. Pixelgröße =  $1 \mu\text{m}$ .

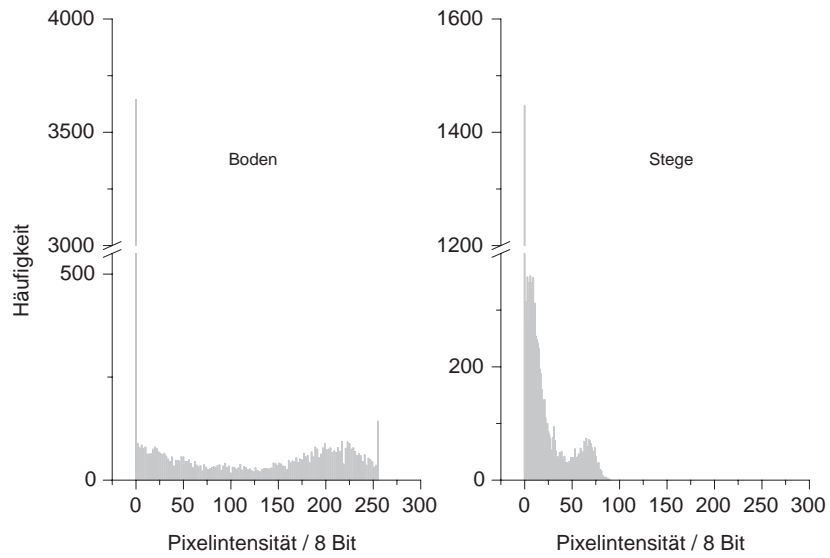


Abbildung 6.35: Histogramme der 20  $\mu\text{m}$ -Messungen aus Abbildung 6.34. Insgesamt 10000 Datenpunkte je Abbildung.

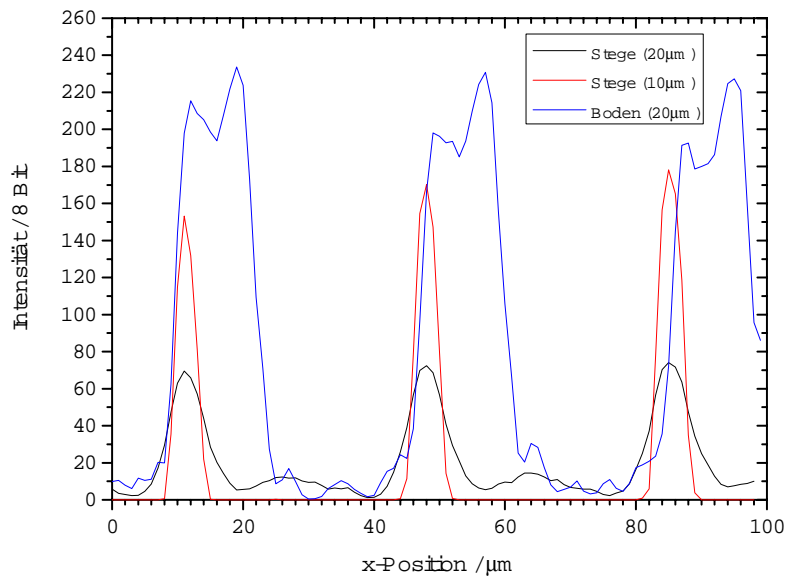


Abbildung 6.36: Über alle y-Positionen gemittelte Linienraster in x-Richtung. Daten aus Abbildung 6.34.

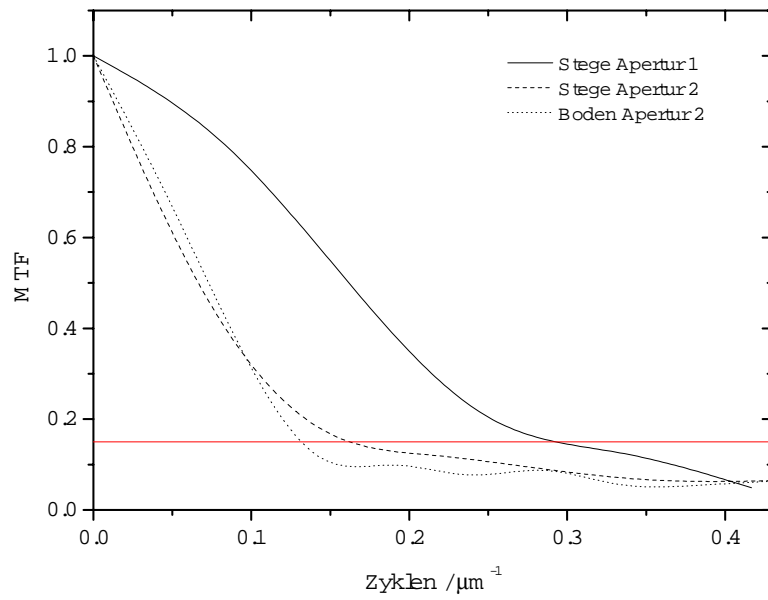


Abbildung 6.37: MTF der Linienstrukturdarstellungen aus Abbildung 6.34.



### Kombinierte Analytik am Beispiel der Hohlraumlinienstrukturen

Die ausgewählten Messungen zeigen Bereiche, die im Falle der UV-, CLSM- und MS-Messungen einen identischen Bildausschnitt des strukturierten Wafers abbilden. Hierbei wird zunächst die CLSM-Aufnahme des blanken Wafers hergestellt. Danach erfolgt die Sprühpräparation und die Aufnahme des UV-Bildes. Zuletzt wird die MS-Rasterung durchgeführt. Die UV- und die MS-Messungen sind hier direkt vergleichbar, da sie identische Strukturen abbilden (siehe Abbildung 6.38). Die CLSM-Messung zeigt dagegen die ca.  $5 \mu m$  breiten Stege, d.h. die zwischen den geätzten Strukturen verbleibende und im Vergleich zu den MS- und UV-Messungen etwas höher liegende Waferoberfläche. Erwartungsgemäß zeigen die MS- und die UV-Abbildungen die größten Übereinstimmungen bei der Überlagerung der Signale (MALDI+UV). Die Abbildung bei der nur Pixelintensitäten gezeigt werden, die in beiden Darstellungen ab einer relativen Intensität vorhanden sind (MALDI AND UV) lässt erkennen, daß die Bereiche mit der stärksten UV-Intensität nicht unbedingt auch die Bereiche mit dem stärksten MS-Signal sind. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, daß es sich in der MS-Abbildung nur um das Signal einer möglichen DHB-Spezies handelt. Die Kombination aller vorhandenen DHB-Spezies in einem Spektrum erhöht die Wahrscheinlichkeit die intensivsten UV-Regionen deutlicher hervorzuheben, liefert allerdings auch keine vollständige (100 %) Übereinstimmung (Bilder nicht dargestellt). Die Darstellung aller UV- und MS-Pixel ab einer gewissen relativen Intensität, wenn mindestens eines der Signale vorhanden ist, stellt die beste Umrissähnlichkeit mit der vis-mikroskopischen Abbildung (nicht dargestellt) der Präparation her. In Abbildung 6.39 sind vertikal gemittelte waagerechte Linienscans der RGB-Überlagerung aus Abbildung 6.38 gezeigt.

Tabelle 6.15: Parameter der CLSM-Messungen zu Abbildung 6.38.

Geräteparameter	
PMT-Potential	: -1 kV
Blendengröße	: $20 \mu m$
Laserpulsenergie	: ca. $54 \mu J$
Abschwächung	: 40
ND-Filter	: 11 %
Restgasdruck	: ca. $9.0 \cdot 10^{-7}$ mbar
Pulse-pro-Pixel	: 1
Schrittweite	: $1 \mu m$
Pixelkantenlänge	: $1 \mu m$
Kontrastauflösung	: 1 Byte/Pixel

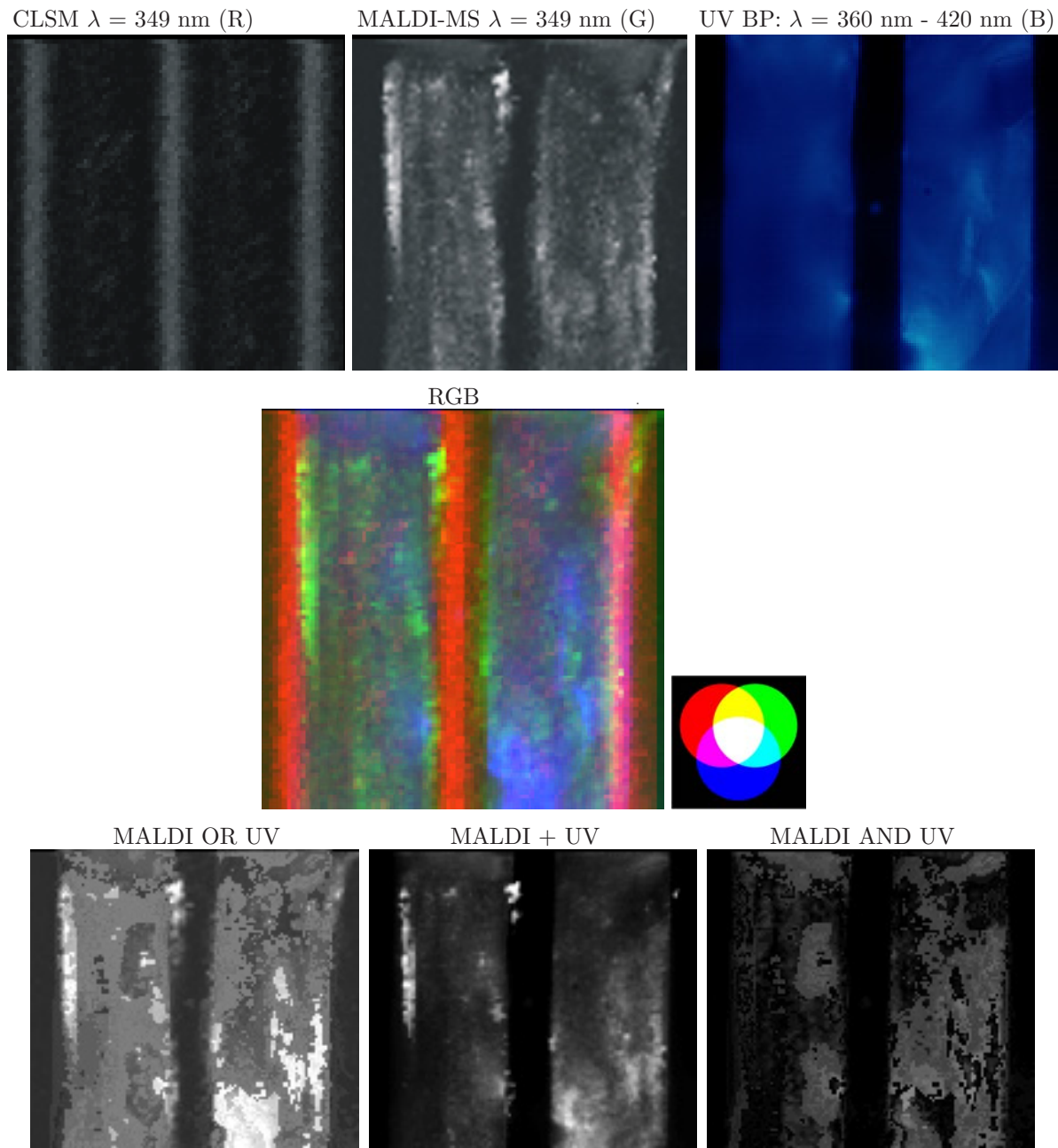


Abbildung 6.38: Kombination verschiedener Methoden. Obere Reihe Bild 1: CLSM-Aufnahme der Linienwaferstege (Waferoberfläche). Bild 2: MS-Ionenintensitätsverteilungsbild von 2,5-DHB-Kristallen, Massesignal  $[M - H_2O + H_2]^+$ . Bild 3: 2,5-DHB-Fluoreszenzsignal der kristallinen Probe. **Pixelgröße CLSM, MS = 1  $\mu\text{m}$ , Pixelgröße UV-Fluoreszenz = 0.645  $\mu\text{m}$ .** Mitte: Das Überlagerungsbild kombiniert die CLSM-Aufnahme (8 bit, rot, kontrastmaximierte Intensitätsspreizung), MS-Aufnahme (8 bit, grün) und UV-Aufnahme (8 bit, blau). Untere Reihe: Logische Operationen (1. Reihe 2. Bild, 1. Reihe 3. Bild) OR, Überlagerung, AND.

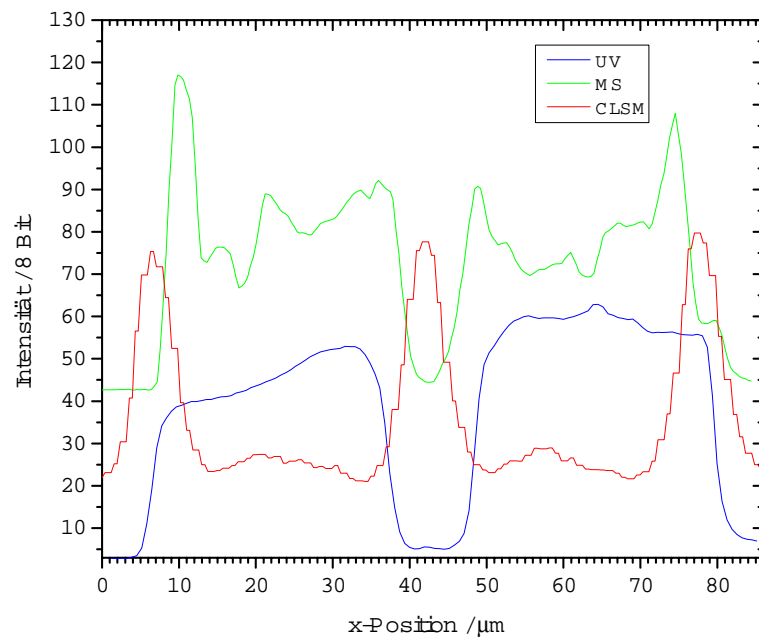


Abbildung 6.39: Vertikal über alle y-Werte gemittelte horizontale Linienraster der UV-, CLSM- und MS-Bilder aus Abbildung 6.38.

#### 6.5.4 Fazit

Neben der bildgebenden MS-Analytik ist auch eine CLSM-Analytik eingesetzt worden. Diese zeigt einerseits die prinzipielle Vereinbarkeit beider Techniken in einem Gerät und ergänzt andererseits vor allem die Untersuchungen an der Ablations- und Kristallisationscharakteristik von Matrixpräparationen. Es konnte gezeigt werden, daß eine Kombination von SMALDI- (MSI) und CLSM-Messungen an einer identischen Probe eine Korrelation zwischen dem Bereich des stärksten Materialabtrages (CLSM) und den intensivsten Ionenintensitäten (SMALDI) herstellen kann. Ebenso ist deutlich geworden, daß eine „Oberflächenanalyse“ im weiteren Sinne mit den Methoden SMALDI und CLSM zu räumlich kombinierbaren Messungen führt und für die Charakterisierung von Strukturen im ein- bis zweistelligen Mikrometerbereich anwendbar ist.

## Kapitel 7

# Ausblick

Die in dieser Arbeit dargelegten Messungen und Experimente stehen insgesamt in der Reihe einer Entwicklung innerhalb der Bioanalytik, die noch nicht abgeschlossen ist und die letztlich zu einer qualitativ neuen, chemisch-analytischen Abbildungsmethode führt. Besonders die rasant fortschreitende Entwicklung auf dem Gebiet der Atmosphärendruck-MALDI-Quellen (AP-MALDI), die in Kombination mit modernen elektrostatisch arbeitenden Orbitalfallenanalysatoren eingesetzt werden können, lässt dabei bereits für die nähere Zukunft den endgültigen Durchbruch erwarten. Zweifellos werden sich schnell Anwendungen hierfür auf einem breiten wissenschaftlichen sowie medizinisch-diagnostischen Gebiet finden. Sollte es dann in der nahen Zukunft möglich werden, auch den Bereich der mehrfachgeladenen Ionen für AP-MALDI routinemäßig zugänglich zu machen, so könnte auch hier die Funktionalität der TOF-Technik im hohen Massenbereich erlangt werden. Dieser vor allem innerhalb der Biowissenschaften wichtige Aspekt, macht die TOF-Technik auch weiterhin zu einem festen Bestandteil aktueller Forschung. Im Ansatz ist erkennbar, daß die Kombination der konfokalen Mikroskopie mit der abbildenden Lasermassenspektrometrie praktisch anwendbar und vorteilhaft ist. Ein deutlicher Fortschritt auf diesem Gebiet wäre hier in der nahen Zukunft die Nutzung von Fluoreszenzsignalen (der Analyte und auch der MALDI-Matrix) in einem zu den MALDI-Messungen parallelen Aufbau. Diese Erweiterung wäre, vor allem bei nicht extrem hochauflösenden Spektrometern wie TOF-Geräten, eine sinnvolle Ergänzung im Rahmen der Strukturidentifizierung bei bildgebenden Messungen, da hier die CLSM-Technologie zweifelsohne ihre höchste Leistungsfähigkeit erreicht.





- . Protostomia (Urmünder)
- . Lophotrochozoen (Überstamm)
  - . Mollusca (Weichtiere, Stamm)
    - . Cephalopoda (Kopffüßler, Klasse)
      - . Palcephalopoda (Altkopffüßler, Unterklasse)
        - . Nautiloidea (Unterklasse)
          - . Nautilida (Ordnung)
            - . Nautilidae (Familie)
              - . Nautilus (Gattung)
                - . *Nautilus pompilius.*
- . Ecdysozoa (Häutungstiere, Überstamm)
  - . Nematoda (Fadenwürmer, Stamm)
    - . Adenophorea (Klasse)
      - . Enoplea (Unterklasse)
        - . Trichocephalida (Ordnung)
          - . Trichinellidae (Familie)
            - . Trichinella (Gattung)
              - . *Trichinella spiralis.*

und weiterhin für die untersuchten Pilze:

- . Fungi (Pilze, Reich)
  - . Ascomycota (Schlauchpilze, Abteilung)
    - . Saccharomycotina (Unterabteilung)
      - . Saccharomycetes (Klasse)
        - . Saccharomycetales (Ordnung)
          - . Saccharomycetaceae (Familie)
            - . Saccharomyces (Gattung)
              - . *Saccharomyces cerevisiae.*

Die Verwandtschaftsverhältnisse untereinander können aus der weitgehend akzeptierten übergeordneten Systematik entnommen werden:

- . Eukaryota (Domäne)
  - . Amoebozoa (Gruppe)
  - . Opisthokonta (Gruppe)
    - . *Fungi* (Reich)
    - . *Metazoa* (Reich)
      - . Rhizaria (Gruppe)
      - . Archaeplastida (Gruppe)
      - . Chromalveolata (Gruppe)
      - . Excavata (Gruppe)



---

Die (biologische) Systematik ist in weiten Teilen, auch nach der Meinung von Experten, nicht konsistent und es herrschen wissenschaftlich abweichende Ansichten über ihre Exaktheit und ihre Aussagekraft in speziellen Fällen. Ein (relativ) neuerer Ansatz legt ein stärkeres Gewicht auf genetische Analysen zur Klärung von Verwandtschaftsverhältnissen einzelner Organismen untereinander und führt dabei oft zu einer Modifizierung der ursprünglichen Systematik [297].

## **A.2 Naturkonstanten und isotopspezifische Nachkommastellen**

Tabelle A.1: Naturkonstanten, Massen und Massedifferenzen.

Naturkonstanten		Größe	Einheit	
Vakuumlichtgeschwindigkeit	$c$	$2.99792458(0) \cdot 10^8$	m/s	
Elementarladung	$e$	$1.60217733(59) \cdot 10^{-19}$	C	
Magnetische Feldkonstante	$\mu_0$	$4\pi \cdot 10^{-7}$	Tm/A	
Elektrische Feldkonstante	$\epsilon_0$	$8.854187817(0) \cdot 10^{-12}$	F/m	
Avogadrokonstante	$N_A$	$6.0221367(36) \cdot 10^{23}$	$mol^{-1}$	
Boltzmannkonstante	$k$	$8.617385(73) \cdot 10^{-5}$	eV/K	
Elektronenruhemasse	$m_e$	$5.4857990943(23) \cdot 10^{-4}$	u	
Protonenmasse	$m_p$	1.00727646677(10)	u	
Neutronenmasse	$m_n$	1.00866491597	u	
Kreiszahl	$\pi$	3.1415926535(89)		
Atomare Masseneinheit		931.49432(28)	$MeV/c^2$	
(unified atomic mass unit)	u, Da	$1.66053886(28) \cdot 10^{-27}$	kg	
Isotope		Größe	Einheit	Häufigkeit [%]
Wasserstoff	$^1H$	1.00782503207(10)	u	99.9885(70)
Deuterium	$^2H, D$	2.0141017778(4)	u	0.000115(70)
Kohlenstoff	$^{12}C$	12	u	98.93(8)
Kohlenstoff	$^{13}C$	13.0033548378(10)	u	1.07(8)
Stickstoff	$^{14}N$	14.0030740048(6)	u	99.636(20)
Stickstoff	$^{15}N$	15.0001088982(7)	u	0.364(20)
Sauerstoff	$^{16}O$	15.99491461956(16)	u	99.757(16)
Sauerstoff	$^{17}O$	16.99913170(12)	u	0.038(1)
Sauerstoff	$^{18}O$	17.9991610(7)	u	0.205(14)
Schwefel	$^{32}S$	31.97207100(15)	u	94.99(26)
Schwefel	$^{33}S$	32.97145876(15)	u	0.75(2)
Schwefel	$^{34}S$	33.96786690(12)	u	4.25(24)
Schwefel	$^{36}S$	35.96708076(20)	u	0.01(1)
Phosphor	$^{31}P$	30.97376163(20)	u	100
Natrium	$^{23}Na$	22.9897692809(29)	u	100
Kalium	$^{39}K$	38.96370668(20)	u	93.2581(44)
Kalium	$^{40}K$	39.96399848(21)	u	0.0117(1)
Kalium	$^{41}K$	40.96182576(21)	u	6.7302(44)
Massedifferenzen		Größe	Einheit	
$^2H - ^1H$		1.00627674588	u	
$^{13}C - ^{12}C$		1.00335483781	u	
$^{15}N - ^{14}N$		0.99703489341	u	
$^{17}O - ^{16}O$		1.00421708164	u	
$^{18}O - ^{17}O$		1.00002936880	u	
$^{33}S - ^{32}S$		0.99938776000	u	
$^{34}S - ^{33}S$		0.99640813970	u	
$^{39}K - ^{23}Na$		15.97393740107	u	

Quelle der Naturkonstanten: Review of Particle Physics, Particle Data Group, Phys. Rev. D, 54, 1996, 1, und CODATA, NIST Reference on Constants, Units, and Uncertainty.

Quelle der Isotopmassen: NIST Database, basierend auf den Veröffentlichungen von [298] [299] [300].

Tabelle A.2: Nachkommastellen der leichtesten Isotope einiger Elemente, die in biologischen Molekülen bzw. Quasimolekülen auftreten. Bezogen auf eine ganze Masse. Bei einfach positiv geladenen Ionen muss zudem noch die Ruhemasse eines Elektrons berücksichtigt werden,  $m_e = 0.00054(8)$  u. Die Nachkommastellen einer ganzen Masse, ergeben sich durch die Addition aller Nachkommastellen der beteiligten Isotope, abzüglich der Elektronenmasse. Nach IUPAC-Definition stellt die Differenz von monoisotopischer Masse zur nominellen Masse den Massendefekt eines Ions dar.

Isotop	relative Häufigkeit	Nachkommastellen [u]
<sup>1</sup> H	99.99885	.00782(5)
<sup>12</sup> C	98.93(8)	.00000(0)
<sup>14</sup> N	99.636(20)	.00307(4)
<sup>16</sup> O	99.757(16)	.99491(4)
<sup>23</sup> Na	100	.98976(9)
<sup>31</sup> P	100	.97376(1)
<sup>32</sup> S	94.99(26)	.97207(1)
<sup>35</sup> Cl	75.76(10)	.96885(2)
<sup>39</sup> K	93.2581(44)	.96370(6)



## A.3.1 Phosphatidylcholine

Tabelle A.4: Monoisotopische Massen der theoretischen Phosphatidylcholine PC(nn:0) mit  $nn = 24 - 52$ . Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$	$[M - 183]^+$
24:0	622,444231	644,426175	660,400113	639,470780	440,386012
25:0	636,459881	658,441825	674,415763	653,486430	454,401662
26:0	650,475531	672,457475	688,431413	667,502080	468,417312
27:0	664,491181	686,473126	702,447063	681,517730	482,432962
28:0	678,506831	700,488776	716,462713	695,533380	496,448612
29:0	692,522481	714,504426	730,478363	709,549031	510,464262
30:0	706,538131	728,520076	744,494013	723,564681	524,479912
31:0	720,553782	742,535726	758,509663	737,580331	538,495562
32:0	734,569432	756,551376	772,525313	751,595981	552,511212
33:0	748,585082	770,567026	786,540963	765,611631	566,526862
34:0	762,600732	784,582676	800,556613	779,627281	580,542512
35:0	776,616382	798,598326	814,572263	793,642931	594,558162
36:0	790,632032	812,613976	828,587914	807,658581	608,573812
37:0	804,647682	826,629626	842,603564	821,674231	622,589462
38:0	818,663332	840,645276	856,619214	835,689881	636,605112
39:0	832,678982	854,660926	870,634864	849,705531	650,620763
40:0	846,694632	868,676576	884,650514	863,721181	664,636413
41:0	860,710282	882,692226	898,666164	877,736831	678,652063
42:0	874,725932	896,707877	912,681814	891,752481	692,667713
43:0	888,741582	910,723527	926,697464	905,768131	706,683363
44:0	902,757232	924,739177	940,713114	919,783781	720,699013
45:0	916,772882	938,754827	954,728764	933,799432	734,714663
46:0	930,788533	952,770477	968,744414	947,815082	748,730313
47:0	944,804183	966,786127	982,760064	961,830732	762,745963
48:0	958,819833	980,801777	996,775714	975,846382	776,761613
49:0	972,835483	994,817427	1010,791364	989,862032	790,777263
50:0	986,851133	1008,833077	1024,807014	1003,877682	804,792913
52:0	1014,882433	1036,864377	1052,838315	1031,908982	832,824213

Tabelle A.5: Monoisotopische Massen der theoretischen Phosphatidylcholine PC(nn:1) mit nn = 24 - 52. Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$	$[M - 183]^+$
24:1	620,428581	642,410525	658,384463	637,455130	438,370362
25:1	634,444231	656,426175	672,400113	651,470780	452,386012
26:1	648,459881	670,441825	686,415763	665,486430	466,401662
27:1	662,475531	684,457475	700,431413	679,502080	480,417312
28:1	676,491181	698,473126	714,447063	693,517730	494,432962
29:1	690,506831	712,488776	728,462713	707,533380	508,448612
30:1	704,522481	726,504426	742,478363	721,549031	522,464262
31:1	718,538131	740,520076	756,494013	735,564681	536,479912
32:1	732,553782	754,535726	770,509663	749,580331	550,495562
33:1	746,569432	768,551376	784,525313	763,595981	564,511212
34:1	760,585082	782,567026	798,540963	777,611631	578,526862
35:1	774,600732	796,582676	812,556613	791,627281	592,542512
36:1	788,616382	810,598326	826,572263	805,642931	606,558162
37:1	802,632032	824,613976	840,587914	819,658581	620,573812
38:1	816,647682	838,629626	854,603564	833,674231	634,589462
39:1	830,663332	852,645276	868,619214	847,689881	648,605112
40:1	844,678982	866,660926	882,634864	861,705531	662,620763
41:1	858,694632	880,676576	896,650514	875,721181	676,636413
42:1	872,710282	894,692226	910,666164	889,736831	690,652063
43:1	886,725932	908,707877	924,681814	903,752481	704,667713
44:1	900,741582	922,723527	938,697464	917,768131	718,683363
45:1	914,757232	936,739177	952,713114	931,783781	732,699013
46:1	928,772882	950,754827	966,728764	945,799432	746,714663
47:1	942,788533	964,770477	980,744414	959,815082	760,730313
48:1	956,804183	978,786127	994,760064	973,830732	774,745963
49:1	970,819833	992,801777	1008,775714	987,846382	788,761613
50:1	984,835483	1006,817427	1022,791364	1001,862032	802,777263
52:1	1012,866783	1034,848727	1050,822664	1029,893332	830,808563

Tabelle A.6: Monoisotopische Massen der theoretischen Phosphatidylcholine PC(nn:2) mit  $nn = 24 - 52$ . Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$	$[M - 183]^+$
24:2	618,412931	640,394875	656,368813	635,439480	436,354711
25:2	632,428581	654,410525	670,384463	649,455130	450,370362
26:2	646,444231	668,426175	684,400113	663,470780	464,386012
27:2	660,459881	682,441825	698,415763	677,486430	478,401662
28:2	674,475531	696,457475	712,431413	691,502080	492,417312
29:2	688,491181	710,473126	726,447063	705,517730	506,432962
30:2	702,506831	724,488776	740,462713	719,533380	520,448612
31:2	716,522481	738,504426	754,478363	733,549031	534,464262
32:2	730,538131	752,520076	768,494013	747,564681	548,479912
33:2	744,553782	766,535726	782,509663	761,580331	562,495562
34:2	758,569432	780,551376	796,525313	775,595981	576,511212
35:2	772,585082	794,567026	810,540963	789,611631	590,526862
36:2	786,600732	808,582676	824,556613	803,627281	604,542512
37:2	800,616382	822,598326	838,572263	817,642931	618,558162
38:2	814,632032	836,613976	852,587914	831,658581	632,573812
39:2	828,647682	850,629626	866,603564	845,674231	646,589462
40:2	842,663332	864,645276	880,619214	859,689881	660,605112
41:2	856,678982	878,660926	894,634864	873,705531	674,620763
42:2	870,694632	892,676576	908,650514	887,721181	688,636413
43:2	884,710282	906,692226	922,666164	901,736831	702,652063
44:2	898,725932	920,707877	936,681814	915,752481	716,667713
45:2	912,741582	934,723527	950,697464	929,768131	730,683363
46:2	926,757232	948,739177	964,713114	943,783781	744,699013
47:2	940,772882	962,754827	978,728764	957,799432	758,714663
48:2	954,788533	976,770477	992,744414	971,815082	772,730313
49:2	968,804183	990,786127	1006,760064	985,830732	786,745963
50:2	982,819833	1004,801777	1020,775714	999,846382	800,761613
52:2	1010,851133	1032,833077	1048,807014	1027,877682	828,792913

Tabelle A.7: Monoisotopische Massen theoretischer Phosphatidylcholine PC(nn:3) mit nn = 24 - 52. Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$	$[M - 183]^+$
24:3	616,397281	638,379225	654,353163	633,423830	434,339061
25:3	630,412931	652,394875	668,368813	647,439480	448,354711
26:3	644,428581	666,410525	682,384463	661,455130	462,370362
27:3	658,444231	680,426175	696,400113	675,470780	476,386012
28:3	672,459881	694,441825	710,415763	689,486430	490,401662
29:3	686,475531	708,457475	724,431413	703,502080	504,417312
30:3	700,491181	722,473126	738,447063	717,517730	518,432962
31:3	714,506831	736,488776	752,462713	731,533380	532,448612
32:3	728,522481	750,504426	766,478363	745,549031	546,464262
33:3	742,538131	764,520076	780,494013	759,564681	560,479912
34:3	756,553782	778,535726	794,509663	773,580331	574,495562
35:3	770,569432	792,551376	808,525313	787,595981	588,511212
36:3	784,585082	806,567026	822,540963	801,611631	602,526862
37:3	798,600732	820,582676	836,556613	815,627281	616,542512
38:3	812,616382	834,598326	850,572263	829,642931	630,558162
39:3	826,632032	848,613976	864,587914	843,658581	644,573812
40:3	840,647682	862,629626	878,603564	857,674231	658,589462
41:3	854,663332	876,645276	892,619214	871,689881	672,605112
42:3	868,678982	890,660926	906,634864	885,705531	686,620763
43:3	882,694632	904,676576	920,650514	899,721181	700,636413
44:3	896,710282	918,692226	934,666164	913,736831	714,652063
45:3	910,725932	932,707877	948,681814	927,752481	728,667713
46:3	924,741582	946,723527	962,697464	941,768131	742,683363
47:3	938,757232	960,739177	976,713114	955,783781	756,699013
48:3	952,772882	974,754827	990,728764	969,799432	770,714663
49:3	966,788533	988,770477	1004,744414	983,815082	784,730313
50:3	980,804183	1002,786127	1018,760064	997,830732	798,745963
52:3	1008,835483	1030,817427	1046,791364	1025,862032	826,777263



Tabelle A.8: Monoisotopische Massen theoretischer Phosphatidylcholine PC(nm:4) mit nm = 24 - 52. Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$	$[M - 183]^+$
24:4	614,381631	636,363575	652,337512	631,408180	432,323411
25:4	628,397281	650,379225	666,353163	645,423830	446,339061
26:4	642,412931	664,394875	680,368813	659,439480	460,354711
27:4	656,428581	678,410525	694,384463	673,455130	474,370362
28:4	670,444231	692,426175	708,400113	687,470780	488,386012
29:4	684,459881	706,441825	722,415763	701,486430	502,401662
30:4	698,475531	720,457475	736,431413	715,502080	516,417312
31:4	712,491181	734,473126	750,447063	729,517730	530,432962
32:4	726,506831	748,488776	764,462713	743,533380	544,448612
33:4	740,522481	762,504426	778,478363	757,549031	558,464262
34:4	754,538131	776,520076	792,494013	771,564681	572,479912
35:4	768,553782	790,535726	806,509663	785,580331	586,495562
36:4	782,569432	804,551376	820,525313	799,595981	600,511212
37:4	796,585082	818,567026	834,540963	813,611631	614,526862
38:4	810,600732	832,582676	848,556613	827,627281	628,542512
39:4	824,616382	846,598326	862,572263	841,642931	642,558162
40:4	838,632032	860,613976	876,587914	855,658581	656,573812
41:4	852,647682	874,629626	890,603564	869,674231	670,589462
42:4	866,663332	888,645276	904,619214	883,689881	684,605112
43:4	880,678982	902,660926	918,634864	897,705531	698,620763
44:4	894,694632	916,676576	932,650514	911,721181	712,636413
45:4	908,710282	930,692226	946,666164	925,736831	726,652063
46:4	922,725932	944,707877	960,681814	939,752481	740,667713
47:4	936,741582	958,723527	974,697464	953,768131	754,683363
48:4	950,757232	972,739177	988,713114	967,783781	768,699013
49:4	964,772882	986,754827	1002,728764	981,799432	782,714663
50:4	978,788533	1000,770477	1016,744414	995,815082	796,730313
52:4	1006,819833	1028,801777	1044,775714	1023,846382	824,761613

## A.3.2 Phosphatidylethanolamine

Tabelle A.9: Monoisotopische Massen theoretischer Phosphatidylethanolamine PE(nn:0) mit nn = 24 - 52. Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$	$[M - 141]^+$
24:0	580,397281	602,379225	618,353163	597,423830	440,386012
25:0	594,412931	616,394875	632,368813	611,439480	454,401662
26:0	608,428581	630,410525	646,384463	625,455130	468,417312
27:0	622,444231	644,426175	660,400113	639,470780	482,432962
28:0	636,459881	658,441825	674,415763	653,486430	496,448612
29:0	650,475531	672,457475	688,431413	667,502080	510,464262
30:0	664,491181	686,473126	702,447063	681,517730	524,479912
31:0	678,506831	700,488776	716,462713	695,533380	538,495562
32:0	692,522481	714,504426	730,478363	709,549031	552,511212
33:0	706,538131	728,520076	744,494013	723,564681	566,526862
34:0	720,553782	742,535726	758,509663	737,580331	580,542512
35:0	734,569432	756,551376	772,525313	751,595981	594,558162
36:0	748,585082	770,567026	786,540963	765,611631	608,573812
37:0	762,600732	784,582676	800,556613	779,627281	622,589462
38:0	776,616382	798,598326	814,572263	793,642931	636,605112
39:0	790,632032	812,613976	828,587914	807,658581	650,620763
40:0	804,647682	826,629626	842,603564	821,674231	664,636413
41:0	818,663332	840,645276	856,619214	835,689881	678,652063
42:0	832,678982	854,660926	870,634864	849,705531	692,667713
43:0	846,694632	868,676576	884,650514	863,721181	706,683363
44:0	860,710282	882,692226	898,666164	877,736831	720,699013
45:0	874,725932	896,707877	912,681814	891,752481	734,714663
46:0	888,741582	910,723527	926,697464	905,768131	748,730313
47:0	902,757232	924,739177	940,713114	919,783781	762,745963
48:0	916,772882	938,754827	954,728764	933,799432	776,761613
49:0	930,788533	952,770477	968,744414	947,815082	790,777263
50:0	944,804183	966,786127	982,760064	961,830732	804,792913
52:0	972,835483	994,817427	1010,791364	989,862032	832,824213

Tabelle A.10: Monoisotopische Massen theoretischer Phosphatidylethanolamine PE(nn:1) mit nn = 24 - 52. Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$	$[M - 141]^+$
24:1	578,381631	600,363575	616,337512	595,408180	438,370362
25:1	592,397281	614,379225	630,353163	609,423830	452,386012
26:1	606,412931	628,394875	644,368813	623,439480	466,401662
27:1	620,428581	642,410525	658,384463	637,455130	480,417312
28:1	634,444231	656,426175	672,400113	651,470780	494,432962
29:1	648,459881	670,441825	686,415763	665,486430	508,448612
30:1	662,475531	684,457475	700,431413	679,502080	522,464262
31:1	676,491181	698,473126	714,447063	693,517730	536,479912
32:1	690,506831	712,488776	728,462713	707,533380	550,495562
33:1	704,522481	726,504426	742,478363	721,549031	564,511212
34:1	718,538131	740,520076	756,494013	735,564681	578,526862
35:1	732,553782	754,535726	770,509663	749,580331	592,542512
36:1	746,569432	768,551376	784,525313	763,595981	606,558162
37:1	760,585082	782,567026	798,540963	777,611631	620,573812
38:1	774,600732	796,582676	812,556613	791,627281	634,589462
39:1	788,616382	810,598326	826,572263	805,642931	648,605112
40:1	802,632032	824,613976	840,587914	819,658581	662,620763
41:1	816,647682	838,629626	854,603564	833,674231	676,636413
42:1	830,663332	852,645276	868,619214	847,689881	690,652063
43:1	844,678982	866,660926	882,634864	861,705531	704,667713
44:1	858,694632	880,676576	896,650514	875,721181	718,683363
45:1	872,710282	894,692226	910,666164	889,736831	732,699013
46:1	886,725932	908,707877	924,681814	903,752481	746,714663
47:1	900,741582	922,723527	938,697464	917,768131	760,730313
48:1	914,757232	936,739177	952,713114	931,783781	774,745963
49:1	928,772882	950,754827	966,728764	945,799432	788,761613
50:1	942,788533	964,770477	980,744414	959,815082	802,777263
52:1	970,819833	992,801777	1008,775714	987,846382	830,808563

Tabelle A.11: Monoisotopische Massen theoretischer Phosphatidylethanolamine PE(nn:2) mit nn = 24 - 52. Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$	$[M - 141]^+$
24:2	576,365981	598,347925	614,321862	593,392530	436,354711
25:2	590,381631	612,363575	628,337512	607,408180	450,370362
26:2	604,397281	626,379225	642,353163	621,423830	464,386012
27:2	618,412931	640,394875	656,368813	635,439480	478,401662
28:2	632,428581	654,410525	670,384463	649,455130	492,417312
29:2	646,444231	668,426175	684,400113	663,470780	506,432962
30:2	660,459881	682,441825	698,415763	677,486430	520,448612
31:2	674,475531	696,457475	712,431413	691,502080	534,464262
32:2	688,491181	710,473126	726,447063	705,517730	548,479912
33:2	702,506831	724,488776	740,462713	719,533380	562,495562
34:2	716,522481	738,504426	754,478363	733,549031	576,511212
35:2	730,538131	752,520076	768,494013	747,564681	590,526862
36:2	744,553782	766,535726	782,509663	761,580331	604,542512
37:2	758,569432	780,551376	796,525313	775,595981	618,558162
38:2	772,585082	794,567026	810,540963	789,611631	632,573812
39:2	786,600732	808,582676	824,556613	803,627281	646,589462
40:2	800,616382	822,598326	838,572263	817,642931	660,605112
41:2	814,632032	836,613976	852,587914	831,658581	674,620763
42:2	828,647682	850,629626	866,603564	845,674231	688,636413
43:2	842,663332	864,645276	880,619214	859,689881	702,652063
44:2	856,678982	878,660926	894,634864	873,705531	716,667713
45:2	870,694632	892,676576	908,650514	887,721181	730,683363
46:2	884,710282	906,692226	922,666164	901,736831	744,699013
47:2	898,725932	920,707877	936,681814	915,752481	758,714663
48:2	912,741582	934,723527	950,697464	929,768131	772,730313
49:2	926,757232	948,739177	964,713114	943,783781	786,745963
50:2	940,772882	962,754827	978,728764	957,799432	800,761613
52:2	968,804183	990,786127	1006,760064	985,830732	828,792913

Tabelle A.12: Monoisotopische Massen theoretischer Phosphatidylethanolamine PE(nn:3) mit nn = 24 - 52. Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$	$[M - 141]^+$
24:3	574,350331	596,332275	612,306212	591,376880	434,339061
25:3	588,365981	610,347925	626,321862	605,392530	448,354711
26:3	602,381631	624,363575	640,337512	619,408180	462,370362
27:3	616,397281	638,379225	654,353163	633,423830	476,386012
28:3	630,412931	652,394875	668,368813	647,439480	490,401662
29:3	644,428581	666,410525	682,384463	661,455130	504,417312
30:3	658,444231	680,426175	696,400113	675,470780	518,432962
31:3	672,459881	694,441825	710,415763	689,486430	532,448612
32:3	686,475531	708,457475	724,431413	703,502080	546,464262
33:3	700,491181	722,473126	738,447063	717,517730	560,479912
34:3	714,506831	736,488776	752,462713	731,533380	574,495562
35:3	728,522481	750,504426	766,478363	745,549031	588,511212
36:3	742,538131	764,520076	780,494013	759,564681	602,526862
37:3	756,553782	778,535726	794,509663	773,580331	616,542512
38:3	770,569432	792,551376	808,525313	787,595981	630,558162
39:3	784,585082	806,567026	822,540963	801,611631	644,573812
40:3	798,600732	820,582676	836,556613	815,627281	658,589462
41:3	812,616382	834,598326	850,572263	829,642931	672,605112
42:3	826,632032	848,613976	864,587914	843,658581	686,620763
43:3	840,647682	862,629626	878,603564	857,674231	700,636413
44:3	854,663332	876,645276	892,619214	871,689881	714,652063
45:3	868,678982	890,660926	906,634864	885,705531	728,667713
46:3	882,694632	904,676576	920,650514	899,721181	742,683363
47:3	896,710282	918,692226	934,666164	913,736831	756,699013
48:3	910,725932	932,707877	948,681814	927,752481	770,714663
49:3	924,741582	946,723527	962,697464	941,768131	784,730313
50:3	938,757232	960,739177	976,713114	955,783781	798,745963
52:3	966,788533	988,770477	1004,744414	983,815082	826,777263

Tabelle A.13: Monoisotopische Massen theoretischer Phosphatidylethanolamine PE(nn:4) mit nn = 24 - 52. Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$	$[M - 141]^+$
24:4	572,334681	594,316625	610,290562	589,361230	432,323411
25:4	586,350331	608,332275	624,306212	603,376880	446,339061
26:4	600,365981	622,347925	638,321862	617,392530	460,354711
27:4	614,381631	636,363575	652,337512	631,408180	474,370362
28:4	628,397281	650,379225	666,353163	645,423830	488,386012
29:4	642,412931	664,394875	680,368813	659,439480	502,401662
30:4	656,428581	678,410525	694,384463	673,455130	516,417312
31:4	670,444231	692,426175	708,400113	687,470780	530,432962
32:4	684,459881	706,441825	722,415763	701,486430	544,448612
33:4	698,475531	720,457475	736,431413	715,502080	558,464262
34:4	712,491181	734,473126	750,447063	729,517730	572,479912
35:4	726,506831	748,488776	764,462713	743,533380	586,495562
36:4	740,522481	762,504426	778,478363	757,549031	600,511212
37:4	754,538131	776,520076	792,494013	771,564681	614,526862
38:4	768,553782	790,535726	806,509663	785,580331	628,542512
39:4	782,569432	804,551376	820,525313	799,595981	642,558162
40:4	796,585082	818,567026	834,540963	813,611631	656,573812
41:4	810,600732	832,582676	848,556613	827,627281	670,589462
42:4	824,616382	846,598326	862,572263	841,642931	684,605112
43:4	838,632032	860,613976	876,587914	855,658581	698,620763
44:4	852,647682	874,629626	890,603564	869,674231	712,636413
45:4	866,663332	888,645276	904,619214	883,689881	726,652063
46:4	880,678982	902,660926	918,634864	897,705531	740,667713
47:4	894,694632	916,676576	932,650514	911,721181	754,683363
48:4	908,710282	930,692226	946,666164	925,736831	768,699013
49:4	922,725932	944,707877	960,681814	939,752481	782,714663
50:4	936,741582	958,723527	974,697464	953,768131	796,730313
52:4	964,772882	986,754827	1002,728764	981,799432	824,761613

### A.3.3 Sphingomyeline

Tabelle A.14: Monoisotopische Massen theoretischer Sphingomyeline SM(nn:0) mit nn = 12 - 30 bzw. genauer als SM(d18:1/nn:0). Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$
12:0	647.512251	669.494195	685.468133	664.538800
13:0	661.527901	683.509845	699.483783	678.554450
14:0	675.543551	697.525495	713.499433	692.570100
15:0	689.559201	711.541146	727.515083	706.585750
16:0	703.574851	725.556796	741.530733	720.601400
17:0	717.590501	739.572446	755.546383	734.617051
18:0	731.606151	753.588096	769.562033	748.632701
19:0	745.621802	767.603746	783.577683	762.648351
20:0	759.637452	781.619396	797.593333	776.664001
21:0	773.653102	795.635046	811.608983	790.679651
22:0	787.668752	809.650696	825.624633	804.695301
23:0	801.684402	823.666346	839.640283	818.710951
24:0	815.700052	837.681996	853.655934	832.726601
25:0	829.715702	851.697646	867.671584	846.742251
26:0	843.731352	865.713296	881.687234	860.757901
27:0	857.747002	879.728946	895.702884	874.773551
28:0	871.762652	893.744596	909.718534	888.789201
29:0	885.778302	907.760246	923.734184	902.804851
30:0	899.793952	921.775896	937.749834	916.820501

Tabelle A.15: Monoisotopische Massen theoretischer Sphingomyeline SM(nn:1) mit nn = 12 - 30 bzw. SM(d18:1/nn:1). Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$
12:1	645.496601	667.478545	683.452483	662.523150
13:1	659.512251	681.494195	697.468133	676.538800
14:1	673.527901	695.509845	711.483783	690.554450
15:1	687.543551	709.525495	725.499433	704.570100
16:1	701.559201	723.541146	739.515083	718.585750
17:1	715.574851	737.556796	753.530733	732.601400
18:1	729.590501	751.572446	767.546383	746.617051
19:1	743.606151	765.588096	781.562033	760.632701
20:1	757.621802	779.603746	795.577683	774.648351
21:1	771.637452	793.619396	809.593333	788.664001
22:1	785.653102	807.635046	823.608983	802.679651
23:1	799.668752	821.650696	837.624633	816.695301
24:1	813.684402	835.666346	851.640283	830.710951
25:1	827.700052	849.681996	865.655934	844.726601
26:1	841.715702	863.697646	879.671584	858.742251
27:1	855.731352	877.713296	893.687234	872.757901
28:1	869.747002	891.728946	907.702884	886.773551
29:1	883.762652	905.744596	921.718534	900.789201
30:1	897.778302	919.760246	935.734184	914.804851

Tabelle A.16: Monoisotopische Massen theoretischer Sphingomyeline SM(nn:2) mit nn = 12 - 30 bzw. SM(d18:1/nn:2). Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$
12:2	643.480951	665.462895	681.436833	660.507500
13:2	657.496601	679.478545	695.452483	674.523150
14:2	671.512251	693.494195	709.468133	688.538800
15:2	685.527901	707.509845	723.483783	702.554450
16:2	699.543551	721.525495	737.499433	716.570100
17:2	713.559201	735.541146	751.515083	730.585750
18:2	727.574851	749.556796	765.530733	744.601400
19:2	741.590501	763.572446	779.546383	758.617051
20:2	755.606151	777.588096	793.562033	772.632701
21:2	769.621802	791.603746	807.577683	786.648351
22:2	783.637452	805.619396	821.593333	800.664001
23:2	797.653102	819.635046	835.608983	814.679651
24:2	811.668752	833.650696	849.624633	828.695301
25:2	825.684402	847.666346	863.640283	842.710951
26:2	839.700052	861.681996	877.655934	856.726601
27:2	853.715702	875.697646	891.671584	870.742251
28:2	867.731352	889.713296	905.687234	884.757901
29:2	881.747002	903.728946	919.702884	898.773551
30:2	895.762652	917.744596	933.718534	912.789201



Tabelle A.17: Monoisotopische Massen theoretischer Sphingomyeline SM(nn:3) mit nn = 12 - 30 bzw. SM(d18:1/nn:3). Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$
12:3	641.465301	663.447245	679.421183	658.491850
13:3	655.480951	677.462895	693.436833	672.507500
14:3	669.496601	691.478545	707.452483	686.523150
15:3	683.512251	705.494195	721.468133	700.538800
16:3	697.527901	719.509845	735.483783	714.554450
17:3	711.543551	733.525495	749.499433	728.570100
18:3	725.559201	747.541146	763.515083	742.585750
19:3	739.574851	761.556796	777.530733	756.601400
20:3	753.590501	775.572446	791.546383	770.617051
21:3	767.606151	789.588096	805.562033	784.632701
22:3	781.621802	803.603746	819.577683	798.648351
23:3	795.637452	817.619396	833.593333	812.664001
24:3	809.653102	831.635046	847.608983	826.679651
25:3	823.668752	845.650696	861.624633	840.695301
26:3	837.684402	859.666346	875.640283	854.710951
27:3	851.700052	873.681996	889.655934	868.726601
28:3	865.715702	887.697646	903.671584	882.742251
29:3	879.731352	901.713296	917.687234	896.757901
30:3	893.747002	915.728946	931.702884	910.773551

Tabelle A.18: Monoisotopische Massen theoretischer Sphingomyeline SM(nn:4) mit nn = 14 - 30 bzw. SM(d18:1/nn:3). Einheit Da.

Struktur	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + NH_4]^+$
14:4	667.480951	689.462895	705.436833	684.507500
15:4	681.496601	703.478545	719.452483	698.523150
16:4	695.512251	717.494195	733.468133	712.538800
17:4	709.527901	731.509845	747.483783	726.554450
18:4	723.543551	745.525495	761.499433	740.570100
19:4	737.559201	759.541146	775.515083	754.585750
20:4	751.574851	773.556796	789.530733	768.601400
21:4	765.590501	787.572446	803.546383	782.617051
22:4	779.606151	801.588096	817.562033	796.632701
23:4	793.621802	815.603746	831.577683	810.648351
24:4	807.637452	829.619396	845.593333	824.664001
25:4	821.653102	843.635046	859.608983	838.679651
26:4	835.668752	857.650696	873.624633	852.695301
27:4	849.684402	871.666346	887.640283	866.710951
28:4	863.700052	885.681996	901.655934	880.726601
29:4	877.715702	899.697646	915.671584	894.742251
30:4	891.731352	913.713296	929.687234	908.757901

## A.3.4 Plasmalogene und Methyl-PC

Tabelle A.19: Monoisotopische Massen einiger bekannter Plasmalogene und methylierter PC. Quelle der CAS-Lipide: www.lmsd.tcd.ie, Lipid Molecular Structure Database (LSMD) 14.05.2012 (Lipid-Herkunft: unterschiedliche Spezies). Einheit Da.

Plasmalogene	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$
PE(O-16:0,18:1)	700.527567	722.509511	738.483448
PE(O-16:0,20:1)	728.558867	750.540811	766.514749
PE(O-16:0,22:4)	750.543217	772.525161	788.499099
PE(O-16:0,20:4)	722.511917	744.493861	760.467798
PE(O-16:0,22:6)	746.511917	768.493861	784.467798
PE(O-18:0,18:1)	728.558867	750.540811	766.514749
PE(O-18:0,20:1)	756.590167	778.572111	794.546049
PE(O-18:0,22:4)	778.574517	800.556461	816.530399
PE(O-18:0,20:4)	750.543217	772.525161	788.499099
PE(O-18:0,22:6)	774.543217	796.525161	812.499099
PE(O-16:0,O-16:0) <sup>1</sup>	692.595252	714.577197	730.551134
PE(O-16:0,O-16:0) <sup>2</sup>	678.579602	700.561547	716.535484
PE(O-16:0,O-16:0) <sup>3</sup>	664.563952	686.545897	702.519834
PC(O-16:0,O-16:0) <sup>4</sup>	706.610903	728.592847	744.566784
PC(O-14:0,O-14:0) <sup>5</sup>	650.548302	672.530246	688.504184
PC(O-18:0,O-18:0) <sup>6</sup>	762.673503	784.655447	800.629384
PC(O-16:0,O-1:0) <sup>7</sup>	496.376152	518.358096	534.332033
PC(O-10:0,O-10:0) <sup>8</sup>	538.423102	560.405046	576.378983
PC(O-16:0,2:0) <sup>9</sup>	524.371066	546.353010	562.326948
PC-Methylierung			
PC(16:1me,16:1me) <sup>10</sup>	762.600732	784.582676	800.556613
PC(16:4me,16:4me) <sup>11</sup>	846.694632	868.676576	884.650514
PC(17:1me,17:1me) <sup>12</sup>	790.632032	812.613976	828.587914
PC(16:4me,16:0) <sup>13</sup>	790.632032	812.613976	828.587914
PC(18:1me,18:1me) <sup>14</sup>	818.663332	840.645276	856.619214
<sup>1</sup> CAS 54285-62-0.			
<sup>2</sup> CAS 54285-61-9.			
<sup>3</sup> CAS 54285-60-8.			
<sup>4</sup> CAS 36314-47-3.			
<sup>5</sup> CAS 36314-48-4.			
<sup>6</sup> CAS 45322-29-0.			
<sup>7</sup> CAS 85405-05-6.			
<sup>8</sup> CAS 92312-23-7.			
<sup>9</sup> CAS 77286-68-1.			
<sup>10</sup> CAS 87025-49-8, 103313-71-9.			
<sup>11</sup> CAS 64626-70-6.			
<sup>12</sup> CAS 58045-79-7.			
<sup>13</sup> CAS 110261-13-7.			
<sup>14</sup> CAS 53694-86-3.			

## A.4 Glucane

Wichtige Massen sind neben den in Tabelle A.20 angegebenen Ionen folgende, teilweise im Haupttext der Arbeit verwendete, Massen:

N-Acetylglucosamin,  $M(\text{GlucNAc}) = 221.089937 \text{ u}$ ,  $M(\text{GlucNAc} - \text{H}_2\text{O}) = 203.079373 \text{ u}$ ; Sialinsäure,  $M(\text{NeuAc}) = 267.095417 \text{ u}$ ,  $M(\text{NeuAc} - \text{H}_2\text{O}) = 249.084852 \text{ u}$ ; N-Acetyl-Neuraminsäure,  $M(\text{NANA}) = 309.105981 \text{ u}$ ,  $M(\text{NANA} - \text{H}_2\text{O}) = 291.095417 \text{ u}$ .

Tabelle A.20: Monoisotopische Massen theoretischer Hexose bzw. Fucose-Polymere. Einheit Da.

n	M(Hex)	M(Fuc)	$[Hex_n + Na]^+$	$[Hex_n + K]^+$	$[Hex_n + NH_4]^+$
1	180,063388	164,068473	203,052609	219,026546	198,097214
2	342,116212	310,126382	365,105432	381,079370	360,150037
3	504,169035	456,184291	527,158256	543,132193	522,202860
4	666,221858	602,242200	689,211079	705,185016	684,255684
5	828,274682	748,300109	851,263902	867,237840	846,308507
6	990,327505	894,358017	1013,316726	1029,290663	1008,361331
7	1152,380329	1040,415926	1175,369549	1191,343487	1170,414154
8	1314,433152	1186,473835	1337,422373	1353,396310	1332,466978
9	1476,485975	1332,531744	1499,475196	1515,449134	1494,519801
10	1638,538799	1478,589653	1661,528020	1677,501957	1656,572624
11	1800,591622	1624,647561	1823,580843	1839,554780	1818,625448
12	1962,644446	1770,705470	1985,633666	2001,607604	1980,678271
13	2124,697269	1916,763379	2147,686490	2163,660427	2142,731095
14	2286,750093	2062,821288	2309,739313	2325,713251	2304,783918
15	2448,802916	2208,879197	2471,792137	2487,766074	2466,836742
16	2610,855739	2354,937105	2633,844960	2649,818897	2628,889565
17	2772,908563	2500,995014	2795,897783	2811,871721	2790,942388
18	2934,961386	2647,052923	2957,950607	2973,924544	2952,995212
19	3097,014210	2793,110832	3120,003430	3135,977368	3115,048035
20	3259,067033	2939,168741	3282,056254	3298,030191	3277,100859
21	3421,119856	3085,226649	3444,109077	3460,083015	3439,153682
22	3583,172680	3231,284558	3606,161901	3622,135838	3601,206505
23	3745,225503	3377,342467	3768,214724	3784,188661	3763,259329
24	3907,278327	3523,400376	3930,267547	3946,241485	3925,312152
25	4069,331150	3669,458285	4092,320371	4108,294308	4087,364976
26	4231,383974	3815,516193	4254,373194	4270,347132	4249,417799
27	4393,436797	3961,574102	4416,426018	4432,399955	4411,470623
28	4555,489620	4107,632011	4578,478841	4594,452779	4573,523446
29	4717,542444	4253,689920	4740,531665	4756,505602	4735,576269
30	4879,595267	4399,747829	4902,584488	4918,558425	4897,629093
31	5041,648091	4545,805737	5064,637311	5080,611249	5059,681916
32	5203,700914	4691,863646	5226,690135	5242,664072	5221,734740
33	5365,753737	4837,921555	5388,742958	5404,716896	5383,787563
34	5527,806561	4983,979464	5550,795782	5566,769719	5545,840386
35	5689,859384	5130,037373	5712,848605	5728,822542	5707,893210
36	5851,912208	5276,095281	5874,901428	5890,875366	5869,946033
37	6013,965031	5422,153190	6036,954252	6052,928189	6031,998857
38	6176,017855	5568,211099	6199,007075	6214,981013	6194,051680
39	6338,070678	5714,269008	6361,059899	6377,033836	6356,104504
40	6500,123501	5860,326917	6523,112722	6539,086660	6518,157327
41	6662,176325	6006,384825	6685,165546	6701,139483	6680,210150
42	6824,229148	6152,442734	6847,218369	6863,192306	6842,262974
43	6986,281972	6298,500643	7009,271192	7025,245130	7004,315797
44	7148,334795	6444,558552	7171,324016	7187,297953	7166,368621
45	7310,387619	6590,616461	7333,376839	7349,350777	7328,421444
46	7472,440442	6736,674369	7495,429663	7511,403600	7490,474267
47	7634,493265	6882,732278	7657,482486	7673,456423	7652,527091
48	7796,546089	7028,790187	7819,535309	7835,509247	7814,579914
49	7958,598912	7174,848096	7981,588133	7997,562070	7976,632738
50	8120,651736	7320,906005	8143,640956	8159,614894	8138,685561
51	8282,704559	7466,963913	8305,693780	8321,667717	8300,738385
52	8444,757382	7613,021822	8467,746603	8483,720541	8462,791208

# Anhang B

## Erläuterungen zur Massenspektrometrie

### B.1 Aufbau- und Funktionsprinzip

Ein heute in der (bio)chemischen Analytik eingesetztes Massenspektrometer ist i.d.R. unabhängig vom Typ des Analysators und ohne Berücksichtigung der Vakuumtechnik zur Erzeugung und Kontrolle des niedrigen Residualgasdruckes, aus fünf abgrenzbaren Einheiten zusammengesetzt. Hierzu zählen: 1. Probenzufuhr bzw. Einlasssystem, 2. Probenquelle, 3. Massenanalysator, 4. Detektor, 5. Auswertungs-/Steuerungssystem(e) (EDV). Es folgt eine kurze Darstellung des Trennprinzips bewegter Ladungen in elektrostatischen und magnetischen Feldern sowie eine stichpunktartige Abhandlung der Punkte 2 bis 4.

#### B.1.1 Trennung von bewegten Ladungen

Der gerichtete Transport geladener Teilchen in elektrischen und/oder magnetischen Feldern im Vakuum wird durch die Lorentz-Kraft hervorgerufen,  $F = q(E + v \times B)$ . Die Bewegungsgleichung stabiler Ionen ergibt sich über das zweite newtonsche Gesetz der klassischen Mechanik (Kraft = Masse · Beschleunigung)

$$\frac{d(mv)}{dt} = q(E + v \times B) \quad (\text{B.1})$$

$q$  = Ladung,  $E$  = elektrische Feldstärke,  $v$  = Geschwindigkeit,  $B$  = magnetische Flussdichte,  $p = mv$  = Impuls,  $t$  = Zeit. Die Begründung der Massenspektrometrie, als Analysetechnik, geht auf die Entdeckung der Kanalstrahlen durch Eugen Goldstein sowie die weitergehende Beschreibung von Wilhelm Wien<sup>1</sup> und Joseph John Thomson<sup>2</sup> sowie folgende Entwicklungen weiterer Forscher zurück. Wien und etwas später Thomson beschrieben die Gesetzmäßigkeiten, die ein bewegtes geladenes Teilchen in *elektrischen* und *magnetischen* Feldern zu Geschwindigkeits- und Richtungsänderungen veranlasst in einem analytischen Zusammenhang [304] [305]. Betrachtet wird hier die Apparatur die Thomson verwendet hat: eine Vakuumapparatur mit einer Ionenquelle (Kathode) einem Analysator und einem Detektionsschirm. Der Analysator ist eine Kombination aus zwei Helmholtzspulen (magnetische Induktion) und zwei elektrostatischen Ablenkplatten. Die Anordnung wird so gewählt, das die elektrischen und magnetischen Feldvektoren zunächst parallel zueinander verlaufen. Sie stehen dabei senkrecht zur axialen Teilchenflugbahn (Querfelder). Der skizzierte Aufbau ist als *Parabelspektrograph* bekannt. Ionen unterschiedlicher Masse und identischer Ladung können dabei gleichzeitig z.B. auf einer Photoplatte detektiert werden. Die Flugzeit der Teilchen im Kondensator mit der effektiven Plattenlänge  $l$  beträgt  $t = \frac{l}{v_0}$  und ein geladenes Teilchen wird entlang der elektrischen Feldvektorrichtung, gemäß seiner Polarität, um eine Länge

---

<sup>1</sup>Nobelpreis 1911

<sup>2</sup>Nobelpreis 1906, Entdecker des Elektrons.

$s = d \tan \alpha = \frac{zeEl}{mv_0^2} D$ , bzw.  $s = \frac{lU_K}{2dU_0} D$  abgelenkt. Wenn über die Helmholtzspulen eine magnetische Flussdichte  $B$  induziert wird, zwingt diese das geladene Teilchen gleichzeitig auf eine Kreisbahn mit dem Krümmungsradius  $r_m = \frac{mv_0}{zeB}$ . Aus dem Krümmungsradius ergibt sich der Teilchenimpuls in Ausbreitungsrichtung  $p = mv_0 = zeBr_m$  bzw. eine der Lorentzkraft entgegengerichtete Zentrifugalkraft mit dem Betrag,  $\frac{mv_0^2}{r_m} = zev_0B$ . Fängt man die so abgelenkten geladenen Teilchen in einer Entfernung  $D$  auf einem geeigneten Detektor auf, kann aus der erhaltenen Projektion die jeweilige Ablenkung in zwei Richtungen der Ebene ermittelt werden. Diese gibt Auskunft über die *kinetische Energie* und den *Impuls* der vermessenen Teilchen. Ordnet man die Helmholtzspulen so an, daß sich die Feldlinien kreuzen und kompensiert durch Variation beider Feldstärken die Ablenkungen gerade, kann daraus das *Masse-zu-Ladungsverhältnis* eines Teilchens bestimmt werden. Der Einfluss der elektrischen Feldstärke auf die Geschwindigkeit der geladenen Teilchen folgt der zweiten Potenz, der Einfluss der induzierten magnetischen Flussdichte auf die Geschwindigkeit ist dagegen linear. Elektrische Felder verändern immer die kinetische Energie geladener Teilchen und ggf. ihre Flugrichtung. Magnetische Felder verändern nur die Flugrichtung bzw. den Teilchenimpuls.

Aufgrund einer Geschwindigkeitsverteilung treffen nicht alle Teilchen eines  $\frac{m}{ze}$ -Verhältnisses an einem Punkt am Schirm auf, sondern ordnen sich mit Abständen, die im Fall der parallelen Feldvektoren auf einer *parabelförmigen* Kurve angeordnet sind. Teilchen mit einer großen initialen kinetischen Energie bzw. Geschwindigkeit, treffen dabei nahezu unabgelenkt im Scheitelpunkt eines Parabelarmes auf. Teilchen eines Masse-zu-Ladungsverhältnisses mit niedriger Geschwindigkeit werden, entsprechend der Feldstärkenabstimmung, stärker abgelenkt. Nähert man die eintretenden Richtungsänderungen durch eine Betrachtung mit Kreisbögen, mittels des Tangens und der Kleinwinkelnäherung für Projektionsebenen im Abstand  $D$  an, gelten für kleine Ablenkwinkel  $\alpha_e \approx \frac{lD}{r_e}$ ,  $\alpha_m \approx \frac{lD}{r_m}$  die gefundenen Beziehungen:

$$\tan \alpha = \frac{v_{\perp}}{v_{\parallel}} = \alpha_e \approx \frac{lE}{2E_{kin}} = \frac{lzeE}{mv_0^2} ; \quad \alpha_m \approx lB \sqrt{\frac{ze}{2mE_{kin}}} = \frac{lzeB}{mv_0} \quad (\text{B.2})$$

mit  $E$  der elektrischen Feldstärke,  $B$  der magnetischen Flussdichte<sup>3</sup>, (*flux density*),  $l$  der (effektiven) Länge der Querfelder,  $z$  der Ladungszahl,  $e$  der Elementarladung,  $v_0$  der Geschwindigkeit aus der elektrostatischen Quellbeschleunigung,  $m$  der Teilchenmasse und  $E_{kin}$  der kinetischen Energie des Teilchens. Es gilt dann für die Ablenkung in beide Richtungen auf einer Projektionsebene in linearer Näherung:

$$y \approx lD \frac{zeE}{mv_0^2} ; \quad x \approx lD \frac{zeB}{mv_0} \quad (\text{B.3})$$

Für Teilchen eines Masse-zu-Ladungsverhältnisses muß zunächst aber die Geschwindigkeit  $v_0 = \frac{zeBlD}{mx}$  eliminiert werden, um die Betrachtungen unabhängig von der initialen Geschwindigkeitsverteilung zu machen. Man erhält dann die Parabelgleichung für ein  $\frac{m}{ze}$  und den Fall, daß  $m$  konstant ist. Geladene Teilchen eines Masse-zu-Ladungsverhältnisses mit unterschiedlicher Geschwindigkeit werden so auf einer Parabel abgebildet (Abbildung B.1):

$$y \approx \frac{mE}{lDzeB^2} x^2 \quad (\text{B.4})$$

Andere  $\frac{m}{ze}$  erzeugen entsprechend versetzte Parabeläste.

Das erste voll funktionsfähige Massenspektrometer wurde, basierend auf den Entwicklungen der Parabelmethode, aber als fokussierendes Spektrometer, ab dem Jahr 1919 von F. W. ASTON entwickelt [306]. Frühe Massenanalysatoren waren i.d.R. immer eine Kombination aus impulsdispersivem Magnetfeld

<sup>3</sup> $B = \mu_0 H$  [ $Vsm^{-2}$ ].

und energiedispersiven elektrostatischen Feld(ern). Als *Spektrograph* betrieben wird dabei die Zeitachse nicht näher aufgelöst z.B. bei einer Detektion mit Photoplatten. *Spektrometer* selektieren hingegen die Ionenintensitäten der  $m/ze$  zeitdiskret [14].

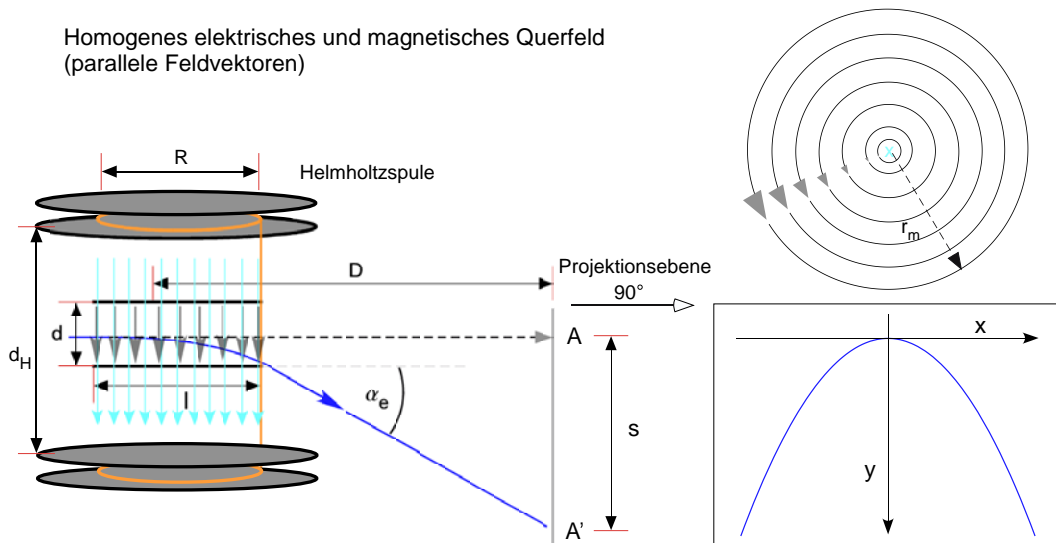


Abbildung B.1: Schematisches Funktionsprinzip eines Parabelspektrographen, nach [165]. Angenommen werden parallele Ionentrajektorien am Eintritt in den Bereich der induzierten magnetischen Flussdichte und das statische E-Feld.

### B.1.2 MALDI-Ionenquellen

Die klassische Ausführung einer MALDI-Ionenquelle ist eine Hochvakuumquelle. Diese arbeitet mit einer zweistufigen elektrostatischen Ionenextraktion nach dem Prinzip von WILEY und McLAREN aus den 1950er Jahren [17]. Eine Erweiterung, der in Verbindung mit MALDI nutzbaren Analysortypen, die primär nicht mit einer MALDI-Hochvakuumquelle ausgerüstet sind, stellt die Entwicklung von Atmosphärendruckquellen dar (*AP-MALDI*). Diese können meist direkt z.B. an Ionenfallenspektrometer gekoppelt werden [29] [307]. Eine klassische elektrostatische MALDI-Ionenquelle entspricht prinzipiell dem Aufbau einer Kathodenlinse. Sie kann aber durchaus zusätzliche Elemente enthalten. Die Desorption/Ionisierung aus der festen Probe erfolgt mit einem gepulsten und i.d.R. fokussierten Laserstrahl, wobei unmittelbar oder zeitlich verzögert eine Extraktion und Beschleunigung der erzeugten bzw. freigesetzten Ionen erfolgt.

Ein wesentlicher Bestandteil einer solchen Ionenquelle ist, neben dem elektrostatischen Aufbau der Ionenoptik, der Laser und die benötigte Laseroptik. Die heute noch am häufigsten in kommerziellen Spektrometern eingesetzten Laseroptiken bestehen dabei aus der Kombination von Glasfaserleitungen und Linsen und/oder Teleskopoptiken (i.d.R. nach dem Prinzip von Kepler). In einigen Ausführungen werden aber auch *Cassegrain-Optiken* bzw. Abwandlungen dieser verwendet. Sie eignen sich besonders bei einer Miniaturisierung von Spektrometern oder dann, wenn eine Einkopplung des Lasers entgegengesetzt zur Ionenextraktionsrichtung erfolgt [55] [308]. Zur Desorption/Ionisierung biologischer Moleküle aus geeigneten Matrixumgebungen können sowohl UV-, als auch IR-Wellenlängen primärer Lasersysteme oder frequenzmodulierter Aufbauten verwendet werden. Bekannt ist der Einsatz von Gas-, Festkörper-, Excimer- (*excited dimer*) und prinzipiell möglich, der von Farbstofflasern [8]. Moderne Festkörperlaser decken dabei in Verbindung mit OPO's (*optisch parametrische Oszillatoren*<sup>4</sup>) und OPA's (*optisch parametrische Verstärker*) mehrere Nutzwellenlängen im UV und IR ab, die nicht den primären Wellenlängen der laseraktiven Medien entsprechen. Die am häufigsten im ultravioletten Frequenzbereich eingesetzten Wellenlängen sind gegenwärtig  $\lambda = 337$  nm (N<sub>2</sub>, Gaslaser),  $\lambda = 355$  nm (frequenzverdreifacht, Nd:YAG),  $\lambda = 349$  nm (frequenzverdreifacht, Nd:YLF). Vor allem in der frühen Entwicklungsphase von MALDI waren auch die Wellenlängen  $\lambda = 266$  nm (frequenzvervierfacht, Nd:YAG) und  $\lambda = 262$  nm (frequenzvervierfacht, Nd:YLF) häufig. Die maximal erreichbaren Frequenzen gepulster Festkörperlaser liegen meist über 1 kHz und übertreffen damit die maximalen Repetitionsraten der meisten Gaslaser deutlich. Hier zeichnet sich ein Trend zu Festkörperlasern ab, wobei in den kommerziell angebotenen UV-MALDI-Quellen noch die Stickstofflaser überwiegen. Die verwendeten Festkörperlaser sind i.d.R. deutlich langlebiger als die Stickstofflaser und ermöglichen eine stärkere Fokussierung der Strahlung. Bei den Stickstofflasern handelt es sich um Laser ohne echten *Resonator*, weshalb diese auch oft als *Superstrahler* bezeichnet werden. Superstrahler sind nicht im Dauerstrichverfahren (cw, continuous wave) einsetzbar und besitzen Pulsfrequenzen von häufig  $20 \text{ Hz} \leq f < 100 \text{ Hz}$  [8]. Die maximale Laserpulsfrequenz begrenzt die Geschwindigkeit und Dauer einer bildgebenden Messung [80] [81]. Bei der orts aufgelösten Massenspektrometrie kann eine lange Messdauer im Besonderen mit Hochvakuumquellen problematisch werden. Nimmt die Messdauer Größenordnungen von mehreren Stunden ein, kann dies zu einer Vakuumdesorption von Probenbestandteilen führen. Diese sind einer Analyse nicht mehr zugänglich und können die relativen Häufigkeiten in der Probe verschieben.

Ein im weiteren Sinne zusätzlicher Bestandteil von MALDI-Quellen können sogenannte *Ionenmobilitätszellen* sein. Diese erweitern die Funktionalität eines Spektrometers und sind im physikalischen Sinne Analysatoren, und damit auch als eigenständige Spektrometer verwendbar. In ihnen kann die unterschied-

---

<sup>4</sup>Optisch nichtlineare Kristalle in Resonatoren.



liche Mobilität (Beweglichkeit<sup>5</sup>) von *isobaren* Ionen in einem gasgefüllten (meist He,  $P = 10^{-1}$  mbar bis  $P = 1$  bar) Raum mit einem anliegenden elektrischen Längsfeld erfolgen. Die Trennung der Spezies findet, soweit sich unterschiedliche *Kollisionsquerschnitte* der Ionen in dem inerten Gas ergeben, aufgrund von unterschiedlichen Driftgeschwindigkeiten statt. Die Ionen bewegen sich im äquilibrierten Zustand mit einer spezifischen Geschwindigkeit und erreichen deshalb das Ende der Zelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten (*Ionenchromatographie*). Es handelt sich bei solchen Spektrometern mit MALDI-Option um Hybridgeräte, deren Abstimmung relativ aufwändig ist. Ein kommerzielles Massenspektrometer mit Ionenmobilitätszelle ist z.B. das SYNAPT HDMS (Waters Corporation), ein qTOF-Spektrometer bei dem die Ionenmobilitätszelle unmittelbar vor dem *Pulser* des orthogonalen TOF-Analysators angebracht ist [309] [310] [311].

### B.1.3 Analysatortechnik

Die derzeit leistungsfähigsten Analysatoren für Experimente mit Biomolekülen sind zum einen die seit ca. 6 Jahren auf dem Markt erhältliche dreidimensionale *elektrostatische* Orbitalfalle (Orbitrap,  $R \approx 10^5$  [312], Thermo Scientific) und die aus einer *Penning-Falle* mit einem *supraleitenden* Magneten (magnetische Flussdichte,  $B \leq 18$  Tesla) bestehende FT-ICR-Falle ( $R \leq 10^7$ ). Letztere wird kommerziell schon deutlich länger und von verschiedenen Anbietern in unterschiedlichen Ausführungen angeboten [313] [314] [315] [316]. Beide Techniken arbeiten während des Ionennachweises nicht mit einer destruktiven Detektion der Ionen, sondern nach dem Induktionsprinzip. Dieses iterative Verfahren ermöglicht in Kombination mit einer diskreten Fourier-Transformation (i.d.R. handelt es sich um eine FFT, *Fast Fourier Transformation*) eine sehr *präzise* Massenbestimmung mit relativen Fehlern, die in einem dynamischen Bereich von ca.  $10^2$  bis  $10^3$  auf Werte von  $\delta \leq 1$  ppm (parts per million) veranschlagt werden können. Die erreichbare Massengenauigkeit korreliert dabei positiv mit der Anzahl der Iterationen bzw. der Messzeit. Die Abhängigkeit von der Messzeit bedingt eine massenabhängige Genauigkeit. Es existiert weiterhin, neben einem unteren auch ein oberes Massenlimit von i.d.R.  $m \approx 2$  kDa.

Der wahrscheinlich weltweit am häufigsten in Massenspektrometern eingesetzte Analyserotyp ist der Quadrupolanalysator (Multipolordnung  $n=2$ ). Möglich sind auch Ausführungen mit sechs (Sextupol-,  $n=3$ ), acht (Oktupolanalysator,  $n=4$ ) oder mehr Stäben. Die verwendeten Hohlstäbe haben entweder eine hyperbolische oder eine runde Geometrie und sind mit ihren Querschnitten auf einem Kreisumfang um die optische Achse angeordnet. Es kann ausgehend von diesem Kreisumfang, an den jeweils übernächsten Stäben, ein identisches Gleichspannungspotential einer Polarität angelegt werden. Auf jeden Fall liegt aber an den diagonal gegenüberliegenden Stäben eine gleichphasige Hochfrequenzwechselfspannung (i.d.R. Radiofrequenzen,  $\approx 1$  MHz) an. Werden die Gleich- und Wechselfspannungen überlagert, kann ihr Verhältnis gezielt zur Transmission von Ionen bestimmter Masse-zu-Ladungsverhältnisse eingesetzt werden. Das ausgebildete RF-Quadrupolfeld ist immer für eine Richtung der Projektionsebene fokussierend und für eine defokussierend (astigmatisch). Id.R. bildet sich um die zentrale optische Achse des Quadrupols (halber Abstand der gegenüberliegenden Stäben) im Betrieb ein (symmetrisches) parabolisches Pseudopotential aus (effektives Potential), daß im axialen Querschnitt kreisrunde Äquipotentiallinien aufweist. Diese stellen entlang der optischen Achse einen Potentialboden auf. In diesem können die Ionen, entlang der optischen Achse, oszillieren. Die Pseudopotentialwände steigen dabei zu den Stäben hin und in Abhängigkeit ihrer Anzahl unterschiedlich steil an. Damit begrenzen so die Oszillationen der stabilen Ionen auf einen mehr oder weniger engen Bereich um die optische Achse. Die entsprechenden

<sup>5</sup>Beweglichkeit  $\mu = \frac{ze l}{2m v_{th}} = \frac{ze}{2m v_{th} n A}$ ,  $v_{th}$  thermische Geschwindigkeit,  $n$  Anzahldichte der Gasmoleküle,  $A$  Stoßquerschnitt der Gasmoleküle,  $l$  Ausbreitungsstrecke.

Bedingungen für stabile Oszillationen können bis zum Erreichen eines Grenzwertes aus den Bewegungsgleichungen der Ionen (Elektrodynamik), für die eingeschränkt analytische Lösungen möglich sind ermittelt werden (Typ: Mathieu'sche Differentialgleichungen). Aus den gefundenen Lösungen erhält man z.B. im reinen RF-Modus, bei denen der Stabilitätsparameter<sup>6</sup> kleiner als ein Instabilitätslimit ( $q < 0.908$ ) bleibt stabile Oszillationen. Die passierenden Ionen eines  $m/z$ -Verhältnisses können während der Oszillationen die Pseudopotentialwände dann i.d.R. nicht durchqueren und verbleiben im axialen Bereich des Multipolfeldes. Analysatoren diesen Typs können allein oder in Kombination mit anderen Analysatoren eingesetzt werden (Hybridspektrometer). Sie besitzen ein minimales Cut-Off  $m/z$ -Verhältnis, unterhalb dessen keine Ionen transmittiert werden können. Im reinen RF-Betriebsmodus („Transmissionsmodus“), ohne (angepasstes) Gleichspannungspotential, dienen sie oft als vorgeschaltetes System zur gezielten Einleitung möglichst vieler  $\frac{m}{z}$  in weitere Analysatoren. Neben Ionenfallen, die ebenfalls ein Quadrupolfeld erzeugen und Hybridanalysatoren, werden vereinzelt auch nur Quadrupolanalysatoren eingesetzt. Eine im Zusammenhang mit MALDI erwähnenswerte Ausführung ist der Triple-Quadrupol-Analysator in Kombination mit einer Vakuum-MALDI-Quelle und einem Festkörperlaser einer Frequenz von 1.4 kHz. Das Spektrometer eignet sich besonders zur Untersuchung kleiner Molekülonen [317].

Außer den *linearen* Ionenfallen, wie z.B. dem kommerziellen Typ LTQ (*Linear trap quadrupole*, Thermo Scientific, 2D trap) werden auch kubische Ionenfallen in der molekularen Bioanalytik eingesetzt z.B. vom Typ LCQ (Thermo Scientific, 3d trap). Beide entsprechen dem Prinzip nach einer *Paul-Falle*. Paul-Fallen erzeugen ein Quadrupolfeld und zeigen, neben einem unteren, auch ein oberes Massenlimit.

Der am häufigsten in Kombination mit MALDI eingesetzte Analysatortyp ist gegenwärtig (noch) der Flugzeitanalysator (TOF, *time-of-flight*). Er kommt in unterschiedlichen Konstruktionen vor. Als TOF<sup>n</sup> (n=1,2,3), RE-TOF (Reflektor-TOF) oder MR-TOF (Multireflexions-TOF) aber auch in Kombination mit anderen Analysatoren z.B. als qTOF (Quadrupol-TOF, Hybridspektrometer). Er besteht aus einem evakuierten, feldfreien Flugrohr. Der größte effektive Nachteil von TOF-Analysatoren ist ihre eingeschränkte Massenauflösungsfähigkeit. Bei Flugzeitmessungen wird die Massenauflösung R (*resolution*) üblicherweise nach dem FWHM-Kriterium (Halbwertsbreite) an einem einzelnen Peak bestimmt. Sie liegt im linearen Modus in etwa in der Größenordnung von  $R \approx 10^3$ , im Reflektormodus (RE-TOF) bei  $R \approx 10^4$  und für sehr kleine Ionen ( $m/z \leq 415^7$ ) im Multireflexions-TOF (MR-TOF) bei bis zu  $R \approx 10^5$  [18] [318]. Die elektrostatischen Ionenspiegel (Reflektoren) arbeiten dabei nach dem selben Prinzip, wie die elektrostatischen Ionenquellen. Sie korrigieren im wesentlichen den feldvektorparallelen Beitrag einer Energiespreizung auf die Flugzeit der Ionen, am Ort ihrer Detektion. Durch unterschiedliche Verweilzeiten der Ionen im Bremsfeld bzw. den Bremsfeldern eines Reflektors, kehren energiereichere Ionen eines  $m/z$  (relativ schnellere Ionen) später um, als energieärmere Ionen (relativ langsamere Ionen). Ionen mit einer initialen Energiedifferenz verlassen den Reflektor mit einer, zu ihrer Eintrittsgeschwindigkeit identischen Austrittsgeschwindigkeit wieder, und werden idealerweise zeitgleich in der Detektorebene abgebildet (Ortsfokussierung). Der immer noch sehr häufig eingesetzte zweistufige Gitterreflektor nach Mamyrin gleicht so z.B. eine maximale initiale Energiespreizung aus, die bis zu ca. 20% der kinetischen Gesamtenergie der Ionen betragen kann [172]. Idealisierte Reflektor-Flugzeitspektrometer mit nichtlinearen Feldstärkeverläufen (*curved field*) arbeiten analog zum Prinzip eines mathematischen Pendels. Eine exakte mathematische Beschreibung dieser Feldverläufe ist, im Gegensatz zur praktischen Realisierung

<sup>6</sup> $q = \frac{4QV}{m\omega^2 r^2}$  mit V = Wechselspannungspotential, Q = Ladung,  $\omega$  = Kreisfrequenz der Oszillation, r = maximaler Radius ausgehend von der optischen Multipolachse.

<sup>7</sup>Als eine i.d.R. mit den meisten Analysatortypen darstellbare Masse wird zu Vergleichen oft das Auflösungsvermögen des Spektrometers bei  $415 \frac{m}{z}$  angegeben.

solcher Anordnungen, schwierig. Für eine Population eines geladenen Teilchens identischer und konstanter Masse in den Potentialfeldern der Quelle und des Reflektors, wird dabei eine identische Zykluszeit auch bei unterschiedlichen Amplituden (Amplitude = kinetische Energie,  $K$ ) erreicht [18] [20] [34] [318] [319].

Der größte Vorteil eines TOF-Analysators ist der theoretisch nicht begrenzte, darstellbare Massenbereich. Dieser wird allerdings praktisch doch eingeschränkt. Zum einen durch eine sinnvolle Länge des Flugrohres und zum anderen durch stärkere spontane Fragmentierungen biologischer Moleküle nach elastischen Stößen in der Quellregion (ISD), metastabile Zerfälle (u.a. PSD) sowie durch den Einsatz von destruktiven Ionendetektionsverfahren (z.B. MCP).

### Fragmentierungstechniken

In diesem Zusammenhang soll hier auch kurz auf die Entwicklung verschiedener Fragmentierungsmethoden, teilweise in Verbindung mit der apparativen  $MS^n$ -Technik<sup>8</sup>, hingewiesen werden. Dieser kommt, im Besonderen, im Rahmen einer Primärstrukturaufklärung (Aminosäuresequenz) von Biomolekülen, neben der Technik der enzymatischen Spaltung, eine erhebliche Bedeutung zu. Fragmentierungsmethoden sind die sogenannte CID (*collision-induced dissociation* - elastische Stossfragmentierung) [320], die SID (*surface-induced dissociation* - inelastische Stossfragmentierung) und GI-SID (*grazing-incidence SID*) [321], die ISD (*in-source decay* - spontane Fragmentierung) [322], die PSD (*post-source decay* - metastabile Fragmentierung) [323], die ECD (*electron capture dissociation* - radikalische Fragmentierung) [233] und nicht zuletzt die IRMPD (*infrared multiphoton dissociation* - rovibronische Anregung und Fragmentierung) [324]. Sie unterscheiden sich dabei teilweise deutlich in der Art der hauptsächlich erzeugten Peptidfragmentionen (Nomenklatur nach Roepstorff [325]) und können deshalb oft, in geeigneter Paarung, komplementär verwendet werden. Neben der chemischen bzw. enzymatischen Methode der (mehr oder weniger) definierten Spaltung von polymer aufgebauten Molekülen (Proteine, Nukleinsäuren, Zucker), sind diese apparativen Techniken auch an enzymatisch nicht oder schwer zugänglichen Verbindungen, wie z.B. Metaboliten und kleineren organischen Molekülen wie z.B. Pharmazeutika oder molekulare Medizinprodukte anwendbar.

#### B.1.4 Häufig verwendete TOF-MS-Detektoren

Im Rahmen einer Time-of-flight Analyse positiv geladener Ionen werden i.d.R. destruktive Ionendetektoren verwendet. Ihr Prinzip beruht entweder auf der Basis inelastischer Stöße der Primärionen mit den Strukturen in einer Dynodenoberfläche<sup>9</sup> und der daraus resultierenden Erzeugung von Sekundärteilchen (hauptsächlich Elektronen, Sekundärionen) oder auf der prompten Ladungskompensation (z.B. Faraday-Detektor) [327]. Am Faraday-Detektor, der auf einem Ladungsausgleich basiert, ist die Nachweisempfindlichkeit masseunabhängig und zeitlich konstant aber i.d.R. auch deutlich schlechter als z.B. bei MCP-Detektoren (*Micro-Channel-Plate*). Der minimale detektierbare Ionenstrom in einer Detektionsanordnung wird durch das elektronische Rauschen begrenzt und erfordert i.d.R. eine Größenordnung von ca.  $10^3$  Ionen, wenn Messungen im schnellen ADC-Mode erfolgen sollen [8] [328].

<sup>8</sup> $q$ -TOF, TOF<sup>n</sup>, Triple-Quad, Fallenspektrometer.

<sup>9</sup>Konversionsdynode, MCP, Daly-Detektor mit Szintillationsschirm, Micro-Sphere-Plate, Channeltron.

### Mikrokanalplatten-Detektor (MCP)

Der MCP-Detektor wird an dieser Stelle etwas genauer beschrieben, da er Bestandteil der in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometer ist. Eine Mikrokanalplatte (kurz MCP) wird aus einer großen Anzahl von parallelen Glasfasern (Durchmesser:  $2 \mu\text{m}$  bis  $12 \mu\text{m}$ ) gefertigt. Die Kapillarglasstränge werden dazu in großer Zahl ( $N \approx 10^6$ ) zusammen mit umgebendem mineral säureresistenten Mantelglas (Bleiglas) verschmolzen. Nach der Verschmelzung können die nicht säureresistenten Faserstränge herausgeätzt werden. Die durch den Ätzzvorgang entstandenen Hohlräume bilden dabei die Mikrokanäle im zurückbleibenden Mantelglas. Quer zu den entstandenen Kapillarachsen werden dünne Platten von ca.  $450 \mu\text{m}$  bis  $600 \mu\text{m}$  Dicke und Durchmessern von ca.  $18 \text{ mm}$  bis  $50 \text{ mm}$  geschnitten. Das Verhältnis von Plattenstärke zu Plattendurchmesser beträgt i.d.R.  $\alpha = 1/40$  oder  $1/100$ , wobei die effektiv wirksame Fläche kleiner ist als der Plattendurchmesser. Die Schnittebene verläuft dabei gewinkelt ( $\angle$  ca.  $7^\circ$  bis  $13^\circ$ ) zu den Mikrokanälen. Der Umfang der Kanäle ist für massenspektrometrische Anwendungen i.d.R. kreisförmig, die Ordnung der Kanäle ist i.d.R. hexagonal. Ihr mittlerer Mittenabstand beträgt ca.  $10 \mu\text{m}$ . Jeder einzelne Kanal arbeitet im Betrieb unabhängig nach dem Prinzip eines Sekundärelektronenvervielfachers (SEV, SEM) und ermöglicht so insgesamt eine sehr geringe Totzeit<sup>10</sup> des gesamten Detektors. Die Oberfläche der Platte und Kanäle wird entweder in einer Wasserstoffatmosphäre halbleitend gemacht oder mit einem speziellen Halbleiter beschichtet, der eine effektivere Sekundärelektronenherauslösung in Abhängigkeit der detektierten Primärteilchenart ermöglicht. Im Betriebszustand wird dann an den Plattenoberflächen, über angelegte Potentiale mit einer Widerstandskette, eine Spannungsdifferenz erzeugt. An der Oberfläche treten nach einer „Kollision“ emittierte Sekundärelektronen (Initialenergie ca.  $1 \text{ eV}$ ) in parabelförmigen Bahnen in die Kanalöffnungen ein und schlagen aus den Wandungen weitere Elektronen heraus, die ihrerseits wieder Elektronen herauslösen und so insgesamt eine Vervielfältigungskaskade an freigesetzten Elektronen mit einem typischen Verstärkungsfaktor von  $G = 10^6 - 10^7$  erzeugen. An der Austrittsseite werden die Elektronen zur Anode abgeführt. Da i.d.R. die Totzeit der Ausleseelektronik und der AD-Wandlung geringer ist, als die Totzeit aufgrund einer kapazitiven Sättigung des Aufbaus, ist es sehr entscheidend, wie schnell der durch ein initiales Ereignis erhaltene Ladungsverstärkerimpuls abklingt. Aus der Wahrscheinlichkeit voneinander unabhängiger Auftreffereignisse, bei Impulsabständen die größer sind als die effektive Totzeit, ergibt sich eine maximale Anzahl registrierbarer Stoßereignisse pro Zeit, gemäß der Beziehung:

$$N_{max} = \frac{1}{\tau_{eff}} \frac{1}{e} \quad (\text{B.5})$$

mit dem theoretischen Maximum  $N_0 = 1/\tau_{eff}$ . D.h. während der Totzeit eintreffende Signale führen zu einem Nachtriggern der effektiven Totzeit. Eine alternative Ausführung besteht, wenn die Analogimpulsdauer vernachlässigbar gegenüber der AD-Wandlungszeit wird und die (primären) analogen Signale in einem speziellen Abtast-Halte-Glied zwischengespeichert werden können. Signale die dann zusätzlich innerhalb der Wandlungszeit eintreffen, können so ignoriert werden und die maximale Anzahl der registrierbaren Ereignisse steigt auf den theoretischen Maximalwert  $N_{max} = \frac{1}{\tau_{eff}}$  an [210]. Für orts aufgelöste MCP-Abbildungen werden z.B. Szintillationsschirme in Kombination mit CCD-Kameras oder entsprechend modifizierte Anoden (z.B. Keilstreifenanode, Delay-Line-Detektor etc.) verwendet, um den erzeugten Elektronenstrom orts aufgelöst abbilden zu können (Microscope Mode). Der Ausgangsstrom einer MCP ist in einem großen dynamischen Bereich ( $> 10^7$ ) linear proportional zum Eingangsstrom. Der durch die MCP fließende Strom errechnet sich aus dem angelegten Potential und dem ohmschen Widerstand, der in der Größenordnung von  $R \approx 10^2 \text{ M}\Omega$  liegt. Erst bei eintreffenden Ionen- bzw. Elektronenströmen, die

<sup>10</sup>Die Detektortotzeit ist u.a. abhängig von dessen Kapazität. Diese ist proportional zur Detektorquerschnittsfläche. Bei kapazitiver Sättigung  $\tau_D \approx 10 \text{ ns} - 100 \text{ ns}$ , Totzeit der Ausleseelektronik  $\tau_A \approx 1 \text{ ns}$  [328]

den in der Leitungsschicht der MCP (maximal) fließenden Strom erreichen oder übersteigen, ist ein Abreißen des linearen Verhaltens, aufgrund der Abreicherung von Elektronen in der stromführenden Schicht feststellbar. Die Obergrenze des MCP-Ausgangsstroms liegt bei ca.  $I_{MCP} = 10^{-6}$  A (Mikroamper) bis  $I_{MCP} = 10^{-5}$  A. Die Nachweisgrenze wird im Wesentlichen durch das thermische Eigenrauschen des MCP-Detektors (sehr niedrig) und der z.B. analogen nachgeschalteten Vorverstärkung (typischerweise  $I_{noise} \leq 10^{-13}$  A) begrenzt [327]. Einzelionennachweise sind mit MCP-Detektoren möglich, dann i.d.R. als TDC-Schaltung. Der sogenannte Dunkelstrom, der durch den radioaktiven Zerfall instabiler Isotope im Glasmaterial (hauptsächlich  $\beta$ -Zerfall von  $^{40}K$ ) ausgelöst wird, ist nachweisbar aber im Messbetrieb i.d.R. unbedeutend (ca. 5 Ereignisse pro s und  $cm^2$ ) [8]. Er kann bei stark erhöhtem Potential messtechnisch erfasst werden. Die sogenannte Chevron-Anordnung besteht aus zwei hintereinander in Reihe geschalteten MCP (Spannungsteilerschaltung), bei denen die Ebenen zueinander um die gemeinsame Achse im  $90^\circ$ -Winkel (Azimuth) gedreht werden (v-like shape). Das an einer einzelnen MCP angelegte Potential im Messbetrieb beträgt ca. -1 kV. Der maximale (empfohlene) Betriebsdruck eines MCP-Detektors liegt bei ca.  $1.3 \cdot 10^{-6}$  mbar [329].

Die relativ geringere Geschwindigkeit schwerer Biomolekülonen führt an der Kontaktfläche destruktiver Detektoren zu einer vergleichsweise niedrigen Anzahl an erzeugten Sekundärelektronen und damit letztlich zu einer schwächeren Signalintensität im Verhältnis zu gleich großen Ionenströmen leichter Ionenpezies [33] [330]. Das kann besonders bei nativen Proben, bei denen keine Aufkonzentrierung der Analyte stattfindet, den Nachweis größerer Biomoleküle aus chemisch komplexen Gemischen zusätzlich erschweren. Für das Vermessen von Biomolekülen ab einer Molekularmasse von ca. 30 kDa bzw. Ionen-geschwindigkeiten von  $v \approx 10^4 \text{ ms}^{-1}$  bei einer angelegten Beschleunigungsspannung von  $U_{acc} = 20 \text{ kV}$ , wird deshalb meistens das Targetpotential erhöht ( $50 \text{ kV} \geq U_{acc} > 20 \text{ kV}$ ) und/oder eine Nachbeschleunigung der Ionen am Detektor durchgeführt (*post acceleration*). Ebenso werden Detektoren nach dem Prinzip: Konversionsdynode  $\rightarrow$  Szintillator  $\rightarrow$  Photomultiplier (PMT) relativ häufig in Massenspektrometern verwendet [331] [332]. Der Photomultiplier kann dabei ausserhalb der Vakuumapparatur angebracht werden. Ein Verfahren der Signalverstärkung, das oft im Zusammenhang mit Reflektoranordnungen eingesetzt wird, ist die Kombination von *Konversionsdynoden* und MCP. Hierbei wird zunächst eine *Ion-zu-Elektron* Wandlung durchgeführt und die erzeugten Elektronen dann auf die MCP geleitet. Es ist mit Anordnungen dieser Art möglich Biomoleküle einer Masse bis ca.  $5 \cdot 10^5 \text{ Da}$  darzustellen (UV-MALDI: Proteine, IR-MALDI: Proteine, Nukleinsäuren) [8] [333]. Eine Möglichkeit die Geschwindigkeitsabhängigkeit der Detektion zu umgehen, besteht in dem Einsatz von *Kryodetektoren* mit sehr niedriger Energieschwelle [334]. An einer MALDI-TOF-Kryodetektor Kombination<sup>11</sup> konnten die bislang größten Biomolekülonen als einfachgeladene Spezies (Immunglobulin M) mit einem Molekulargewicht von über 1 MDa intakt vermessen werden [335]. Ebenso werden erste Imaging-Experimente mit dieser Art der Detektion erwähnt.

### Signalumsetzung (Digitalisierung)

Neben einer reinen Analog-zu-Digital Umsetzung (ADC) wird an einigen Spektrometern auch eine *Zeit-zu-Digital Umsetzung* (TDC) der analogen Signale eingesetzt [336]. Diese entspricht einer binären absoluten Häufigkeitsdetektion innerhalb mehrerer, aufeinanderfolgender schmaler Zeitfenster ( $t_{bin} \approx 10^2 \text{ ps}$  z.B. Multi-Hit-TDC). Das Register (oder der Speicher) eines Mikroprozessors enthält dann die Gesamtzahl aller Auftreffereignisse im entsprechenden Zeitintervall, für jedes Bin. Die Totzeit nach einem Zählereignis beträgt i.d.R.  $\tau_{tot} \leq 10 \text{ ps}$  und die Speichertiefe je Bin beträgt lediglich ein Bit (Zählereignis = 1, kein

<sup>11</sup>16-element superconducting tunnel junction detector, macromizer Comet AG.

Tabelle B.1: Detektionseffizienz von Primärstrahlung an Mikrokanalplatten.

Strahlungsart	Energie, Wellenlänge	Detektionseffizienz (%)
Elektronen	0.2 - 2 keV	50 - 85
	2 - 50 keV	10 - 60
atomare Ionen und Protonen	0.5 - 2 keV	5 - 85
	2 - 50 keV	60 - 85
	50 - 200 keV	4 - 60
ferne UV-Strahlung	30 - 110 nm	5 - 15
	110 - 150 nm	1 - 5
Röntgenstrahlung	2 - 50 Å	5 - 15
	0.12 - 0.2 Å	≈ 1

Quelle: Schagen, P.: *Advances in image pick-up and display, vol. 1*, Academic Press, New York, 1974.

Zählereignis = 0). Gleichzeitig auftreffende Ionen können so nicht getrennt identifiziert werden, und auch die Intensität eines eintreffenden Teilchens kann nicht näher bestimmt werden. Es liegt bei entsprechender Abstimmung über einer zu definierenden Rauschschwelle des Sensors. Dies wiederum ermöglicht eine Bereinigung der Basislinie von thermischem elektronischen Hintergrundrauschen und vermindert, bei geeigneter Einstellung bis zu einem gewissen Grad, auch den Einfluss des weißen chemischen Rauschen in den Spektren [336]. Eine TDC-Schaltung ist mit Frequenzen von  $f \geq 10$  GHz möglich und kann damit einen relativ großen Massenbereich, mit i.d.R. mindestens vier Bins pro Massenpeak und mehreren 100 Abfragen pro Bin scannend erfassen. Der Anwender betrachtet dann das digitale Histogramm-Massenspektrum nach einer Umrechnung der Flugzeiten, gemäß der TOF-Formel. Die (reine) ADC-Detektion kommt in der Literatur häufiger vor, als die TDC-Detektion. Zu einer TDC verwendete Transientenrekorder arbeiten, je nach technischer Ausführung und Anforderung der Messungen, i.d.R. mit Sampling-Raten von ca. 250 MHz bis zu 4 GHz [8]. Das entspricht einem Abtastzeitfenster (Bin frame) von ca. 4 ns bzw. 250 ps und bedeutet i.d.R. Aufnahmezeiten für ein vollständiges Einzelpulsmassenspektrum mit z.B. 80000 Bins, bei 250 MHz von ca. 320  $\mu$ s bzw. mit 200000 Bins, bei 4 GHz von ca. 50  $\mu$ s.

### B.1.5 Ionenstrahleigenschaften und Strahlparameter

Nach dem Liouville-Theorem (*Satz von Liouville*) ändert sich das (besetzte) Phasenraumvolumen in einem konservativen System aus geladenen Teilchen mit der Zeit nicht, wenn äußere elektrische und magnetische Felder auf den Teilchenstrahl wirken. Es kann zur (formalen) Beschreibung der Strahldynamik in elektrostatischen Ionenquellen und Flugzeitmassenanalysatoren angewandt werden [21] [166]. Bei gepulsten Ionenstrahlen ist hierzu ein  $N_6$ -dimensionaler Phasenraum mit den Parametern zur Bestimmung der Abweichungen von Ortskoordinaten  $(x_1, x_2, \delta_l)$ , Richtungen  $(x'_i)$  und relativer Impulsabweichung  $(\delta_p)$  für alle  $N$  Teilchen notwendig,  $\rho(x) = (x_1, x'_1, x_2, x'_2, \delta_l, \delta_p)$ . Jede Parameterkombination sämtlicher Teilchen im Phasenraum beschreibt dabei einen Zustand des Systems, jedes einzelne Koordinatentupel ein Teilchen im Phasenraum. Allgemein wird der Phasenraum aber mit den Impuls- und Ortskoordinaten als Parameter aufgestellt. Betrachtet man den Phasenraum mit den Ortskoordinaten und Impulskomponenten in einer Zeitreihe, so beschreiben die Teilchen (Tupel) Trajektorien:

$$x_i \equiv x(t_0 + dt) ; p_i \equiv p(t_0 + dt) \quad (\text{B.6})$$



Eine vollständige Betrachtung (*Liouville measure*) erfasst alle Ortskoordinaten und Impulskomponenten [337]:

$$\prod_{i=1}^N dp_i dx_i \quad (\text{B.7})$$

Das Integral liefert dabei eine Konstante gegenüber der erfolgenden Bewegung [346]:

$$\prod_{i=1}^N \int dp_i dx_i \quad (\text{B.8})$$

In linearen Flugzeitanalysatoren kreuzen sich die Trajektorien des Phasenraums nicht. Die Ortskoordinaten der transversalen Ebene hier  $x_i$  mit  $i=1,2$  und die longitudinale Ortskoordinate  $x_i$  mit  $i=3$  bzw.  $l$  stellen den dreidimensionalen (kartesischen) Raum mit den zugehörigen Komponenten der Teilchenimpulse dar ( $x_1, p_{x_1}, x_2, p_{x_2}, x_3, p_{x_3}$ ). Die kinetische Energie,  $K = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{p^2}{2m}$ , ist als Funktion der Orts- und Impulskoordinaten im elektrostatischen Feld aus einer Hamiltonfunktion  $H(t, x, p) = \frac{p^2}{2m} + V(x)$ , mit dem Potential  $V(x)$  ableitbar (konservatives System).

In der Ionenoptik verwendet man zur Beschreibung des Phasenraumes einen festen Impuls und anstelle der Impulskomponenten die Richtungen. Bei radiärsymmetrischen Strahlprofilen sind die transversalen Richtungen und in der Regel auch die transversale von der longitudinalen Ausdehnung entkoppelt. Von Interesse ist oft die transversale Ausdehnung des Teilchenstrahles an einer bestimmten Stelle im Strahlverlauf. Das Phasenraumellipsoid umschließt einen gewissen Anteil (z.B. 90 %) oder auch die Gesamtheit  $N$  der propagierenden Teilchen im  $N_6d$ -Phasenraum. Eine Phasenraumellipse ist eine  $n$ -dimensionale Einschränkung des gesamten Phasenraumes. Diese kommt durch eine Projektion des Phasenraumellipsoides auf eine Ebene zustande. Die 2d-Dichteverteilung einer Ebene z.B.  $\rho(x_1, x'_1)$  lässt sich i.d.R. durch Ellipsen umranden. Die Fläche einer Ellipse ist die entsprechende Emittanz mit der Einheit [ $m \text{ rad}$ ] bzw. [ $mm \text{ mrad}$ ]. Anschaulich dargestellt werden die Ellipsen als Auftragung der Winkel ( $x'_i$  in rad, mrad) gegen die Ortskoordinate ( $x_i$  in m, mm). Anhand der Lage der Ellipse in den Quadranten eines orthogonalen Koordinatensystems kann so auf die Art der Strahldynamik geschlossen werden<sup>12</sup> [166].

Eine *Maxwell-Boltzmann-Verteilung* von Ensemblespezies ist ein Spezialfall des Liouville Theorems, bei dem die mittlere quadratische Abweichung der Teilchengeschwindigkeit(en) unmittelbar die Translationstemperatur(en) für jede Richtung widerspiegelt [15] [166]:

$$\frac{\overline{p_{x_i}^2}}{2m} = \frac{kT_i}{2} = \frac{p^2}{2m} \sigma_{x'_i}^2 \quad (\text{B.9})$$

$$\frac{\overline{p_{x_3}^2}}{2m} = \frac{kT_3}{2} = \frac{p^2}{2m} \sigma_{\delta_p}^2 \quad (\text{B.10})$$

$$\sigma_{\delta_p} = \frac{\sqrt{mkT}}{p_{x_3}} ; \sigma_{x'_i} = \frac{\sqrt{mkT}}{p_{x_i}} \quad (\text{B.11})$$

Im Zusammenhang mit MALDI ist besonders die axiale Richtung bzw. die entsprechende Impulskomponente von Bedeutung, da diese im zeitlichen Mittel betragsmäßig bei der hauptsächlich „vorwärts“ gerichteten Bewegung der Expansion und Beschleunigung überwiegt. Die (Ensemble-)Ionen im geformten Teilchenstrahl erlangen am Ende der Beschleunigungsstrecke einen konstanten (mittleren) axialen Impuls  $p_{x_3} = m v_z$ , der in axialen Flugbahnen nahezu dem Gesamtimpuls  $p$  entspricht. Die transversalen Emittanzen können über die Standardabweichungen der Ortskoordinaten und Richtungen bzw. der relativen

<sup>12</sup>Konvergenter Strahl , divergenter Strahl oder paralleler Strahl bzw. Strahltaile.

Impulsabweichung ( $\delta_p$ ) berechnet werden. Für die Standardabweichungen der Richtungen gilt:

$$\sigma_{x'} = \sigma_{y'} = \frac{\sqrt{mkT}}{p_z} \quad (\text{B.12})$$

Die Standardabweichungen der Ortskoordinaten können gleichgesetzt werden mit den Wurzeln der entsprechenden Elemente der  $\sigma$ -Matrix, ebenso die der Impulsabweichung. Die Sigma-Matrix beschreibt die Transformation des gesamten Teilchenstrahles eines ionenoptischen Aufbaus und ist das Pendant zu den R-Matrizen einzelner Teilchen(trajektorien). Der Transport von Ionenstrahlen in radiärsymmetrischen elektrostatischen Feldern ist aber prinzipiell nicht auf transversale Strahlsymmetrien beschränkt. Man erhält für *aufrecht stehende* Ellipsen mit den kartesischen Ortskoordinaten  $x,y,z$  dann die Emittanzen gemäß [166]:

$$E_x = \pi \sigma_x \sigma_{x'} \quad (\text{B.13})$$

$$E_y = \pi \sigma_y \sigma_{y'} \quad (\text{B.14})$$

$$E_z = \pi \sigma_l \sigma_{\delta_p} \quad (\text{B.15})$$

Zur Berechnung geneigter Ellipsen werden sogenannte Twissparameter benötigt, die sich aus den Halbachsen und dem Neigungswinkel der Ellipse errechnen lassen. Für einen fokussierten radiärsymmetrischen Strahl in einem axialen Aufbau erhält man nach der Beschleunigung die transversale Emittanz über die Beziehung:

$$E_{x,y} = \pi \sigma_{x,y} \sigma_{x',y'} = \pi \sigma_{x,y} \frac{\sqrt{mkT}}{p_z} \quad (\text{B.16})$$

Die Größe der Fläche (Emittanz) ist ein Maß für die Strahlqualität (kleine Fläche = hohe Strahlqualität). Wichtig ist noch die *adiabatische Dämpfung*, die zu kleineren transversalen Emittanzen führt. Diese kann eintreten, da im (zeitlichen) Mittel in beschleunigten Teilchenstrahlen nur die Änderung der longitudinalen Impulskomponente eine wesentliche Rolle spielt und die transversalen Emittanzen über das Verhältnis des konstanten Produktes der Änderungen radialer Orts- und Impulskomponenten zum momentanen Impuls definiert sind [166]:

$$E_x = \pi \Delta x \frac{\Delta p_x}{p} = \frac{const}{p} \quad (\text{B.17})$$

In realen elektrostatischen Anordnungen kann die Strahlbildung und Propagation allerdings durch Raumladungseffekte z.B. in der Form einer Coulombabstossung, Streueffekte an Restgasteilchen (Kleinwinkelstreuung) und/oder Gitterelektroden bzw. durch Felddurchgriffe an Elektroden mitunter erheblich beeinflusst werden. Diese Tatsache schränkt eine realistische Simulation i.d.R. stark ein. Eine praktische Messung von Phasenraumellipsen und Emittanzen erfolgt oft in Driftstrecken. Ein Vergleich von Strahlqualitäten zwischen unterschiedlichen Ionenquellen/Geräten erfordert dabei die Normierung der Emittanzen auf einen Impuls [166].

Eine realistische Annahme über eine 2d-Dichteverteilung in einem Strahlprofil ist in den meisten Fällen die einer zweiseitigen Gaußverteilung. Die eindimensionale Dichteverteilung entlang einer Koordinate der transversalen Ebene  $\rho(x)$  entspricht dann der Projektion der zweidimensionalen Dichteverteilung z.B.  $\rho(x, x')$  auf die Achse der (jeweiligen) Ortskoordinate [166]:

$$\rho(x) = \int \rho(x, x') dx' \equiv \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma_x} \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{x^2}{\sigma_x^2}\right) \quad (\text{B.18})$$



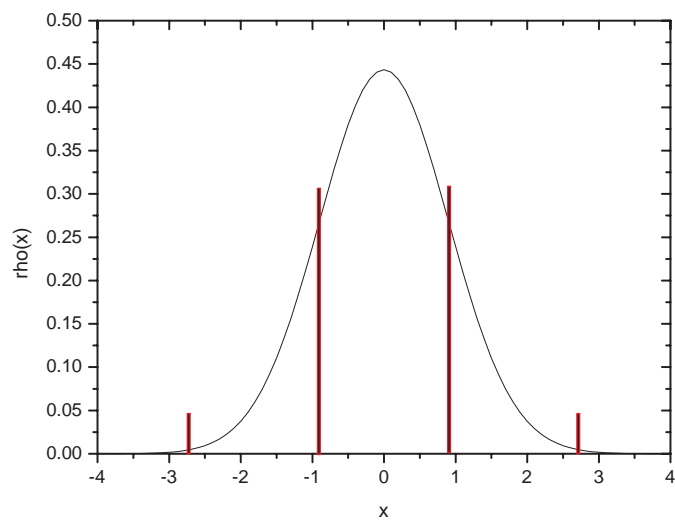
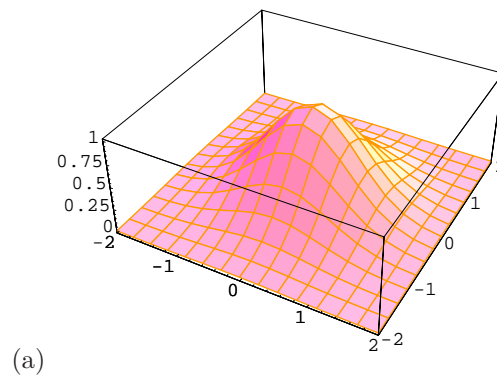


Abbildung B.2: (a) Darstellung der Strahldichte als 2d-Phasenraumplot  $\rho(x)$  und (b) als eindimensionale Projektion entlang der  $x$ -Koordinate. Gaussverteilungsdichte mit der Standardabweichung  $\sigma_x = \pm 0.9$ ,  $3\sigma_x = \pm 2.7$ .

### Einfluss der Raumladung

Eine Berücksichtigung der Raumladungseffekte kann bei der Entstehung dichter Teilchenstrahlen in einer Quelle mit der Geometrie einer Kathodenlinse über die Beziehung des *Child-Langmuir-Gesetzes* erfolgen. Diese Gesetzmäßigkeit beschreibt exakt die Verhältnisse kontinuierlicher Glühkathodenemissionen<sup>13</sup>. Die Raumladung eines expandierenden Plasmas, unmittelbar über der Kathode, kann dabei das elektrostatische Feld der Quelle in Kathodennähe nahezu vollständig abschirmen, solange es eine bestimmte Dichte besitzt. Die maximal erreichbare Teilchenstromdichte  $j$  innerhalb einer Beschleunigungsstrecke  $S$  zwischen den koplanar angebrachten Elektroden errechnet man nach [16]:

$$j = \frac{4}{9} \varepsilon_0 \sqrt{\frac{2q}{m}} \frac{U^{3/2}}{S^2} \quad (\text{B.19})$$

Mit  $\varepsilon_0$  der Permittivität des Vakuums,  $q := z e$  der Ionenladung,  $m$  der Ionenmasse,  $U$  der Extraktionsspannung bzw. der Potentialdifferenz zwischen den Elektroden mit dem Abstand  $S$ . Der maximale Ionenstrom, der durch eine Apertur geleitet werden kann, wird als *Akzeptanz* bezeichnet. Die Ladungsverteilung in einem radiärsymmetrischen Ionenstrom,  $I = \pi r^2 j$ , wird dabei als homogen angenommen und die Ionenbewegung entspricht einer laminaren Strömung mit der Ionenstromdichte  $j = \rho v_{x_3}$ .

Ein weiterer Parameter, die *Perveanz*, hängt für einen raumladungsbegrenzten Teilchenstrahl *einer* Ionensorte nur von der Geometrie der Extraktionsanordnung ab. Die Perveanz ist definiert über:

$$P = \frac{I}{U^{3/2}} = \frac{\pi r^2 j}{(mv^2/2q)^{3/2}} \quad (\text{B.20})$$

Für jede Ionensorte existiert dabei eine *spezifische* Konstante  $P_0 = 2\pi\varepsilon_0\sqrt{2q/m}$ . Die Bedingung  $P = P_0$  wird dabei als *Raumladungsgrenze* für diese Ionensorte benannt. Mit der zweiten Ableitung des Strahlradius  $r$  nach der Koordinate der Translation ( $x_3 = z$ ) erhält man unter der Berücksichtigung, daß in dichten Teilchenstrahlen die innerhalb des Strahls wirkende Lorentz-Kraft zu einer Strahlaufweitung führt den Zusammenhang [166]:

$$\frac{d^2 r}{dz^2} = \frac{q}{2v^3 m \varepsilon_0} j(z) r \quad (\text{B.21})$$

$$= \frac{P}{P_0} \frac{1}{r} \quad (\text{B.22})$$

Der Ionenstrom zeigt so bis zum Erreichen eines Sättigungsstroms  $I_{max}$  bei der maximalen Stromdichte  $j_{max}$  eine  $U^{\frac{3}{2}}$ -Abhängigkeit mit  $I_{max} = r^2 \pi j_{max} q \sqrt{\frac{kT}{m}}$ . Der maximale Ionenstrom *einer* Teilchensorte hängt damit von der Geometrie der Ionenquelle bzw. Kathodenlinse, der Krümmungsfläche der Kathode bzw. der ausgebildeten Plasmagrenze sowie dem Abstand der Elektroden und auch dem Aperturdurchmesser bzw. der Aperturgeometrie ab. Für ebene und konvexe Kathodenoberflächen bzw. Plasmagrenzen erhält man theoretisch eine maximale Perveanz. Konkave Oberflächen hingegen führen zu einer *reduzierten* Perveanz. Mit koplanaren Elektroden findet man, daß das Verhältnis der radiärsymmetrischen Emissionsfläche zum Elektrodenabstand,  $\frac{r^2 \pi}{S^2}$ , die entscheidende Größe für eine Teilchensorte ist. Eine numerische Näherung ergibt dann die Abhängigkeit,  $r \propto \sqrt{\frac{P}{P_0}} z$ . Ein Ionenstrahl an der Raumladungsgrenze erreicht demnach schon nach einer Strecke von  $z = 2r$  eine Strahlradiusverdopplung. Eine weitere charakteristische Größe eines Teilchenstromes ist die *Brillanz*. Diese stellt den Teilchenstrom ins Verhältnis zu dem Produkt der Emittanzen und der relativen Impulsabweichung (Impulsunschärfe) [166].

<sup>13</sup>Die emittierten Ionen verweilen dabei lange genug an der Kathodenoberfläche, um mit dieser in ein thermisches Gleichgewicht gelangen zu können, ca.  $10^{-5}$  bis  $10^{-3}$  s.

### B.1.6 Ionentrajektorien in elektrostatischen Längsfeldern

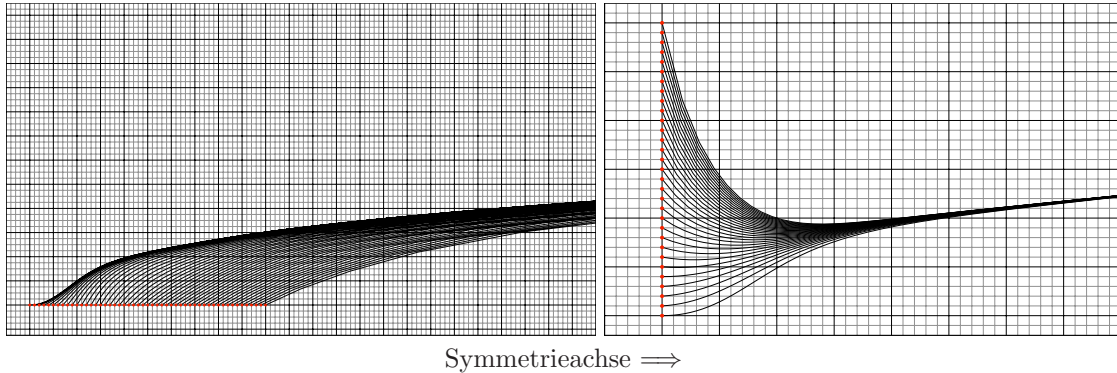


Abbildung B.3: Simulation von Ionentrajektorien mit (links) unterschiedlichem Startpunkt auf der TOF Achse für eine Seite der symmetrischen elektrostatischen Feldverteilung und (rechts) mit unterschiedlichem Startpunkt in der Ebene der Probe. Angenommen wird in beiden Darstellungen eine Parallel-zu-Punkt Abbildung. Die Darstellungen sind nicht maßstabsgerecht (vergleichbar) und dienen nur der Veranschaulichung.

Homogene elektrische Felder können über den Gradienten eines skalaren Potentialfeldes ausgedrückt werden. Dieses weist jedem Raumpunkt z.B. in kartesischen Koordinaten ein Potential  $V(x, y, z)$  zu. In Vakuumquellen (konstante Permittivität  $\varepsilon$ ) ist dies durch lösen der *Poisson-Gleichung* zu erhalten. Diese beschreibt die Ladungsdichte im Raum ( $\Delta V = -\rho/\varepsilon$ ;  $\rho = \frac{\text{Ladung}}{\text{Volumen}}$ ). Das elektrostatische Feld kann somit entweder durch die skalare Potentialfunktion  $V(x, y, z)$ , die jedem Raumpunkt einen Wert zuweist oder durch das Vektorfeld  $E(x, y, z)$ , daß jedem Punkt drei Komponenten  $E_x, E_y, E_z$  zuweist, beschrieben werden.

Eine Möglichkeit dieses Problem - die Lösung einer (elliptischen) partiellen Differentialgleichung - numerisch (diskret) zu behandeln, besteht im dreidimensionalen (euklidischen) Raum in der Annahme eines festen Raumgitters mit entsprechenden Netzkoordinaten. Für den kontinuierlichen Fall besteht zunächst der Zusammenhang:

$$\frac{\partial^2 U}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 U}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 U}{\partial z^2} = c \tag{B.23}$$

mit einer Konstante  $c$  und  $x, y, z$  den kartesischen Koordinaten des Raumes. Die nötigen Koordinaten zu einer Lösung des Problems im diskreten Fall, kann dann über eine entsprechende Matrix  $M$  von Netzkoordinaten erhalten werden, die eine Einschränkung der möglichen kartesischen Koordinaten des kontinuierlichen Raumes für den dreidimensionalen Fall darstellt, der Gestalt

$$MU = c \tag{B.24}$$

$U$  und  $c$  ist eine Aufstellung von Werten (i.d.R. in Spalten) für jeden entsprechenden Netzpunkt des Gitters. Insgesamt entspricht der diskretisierte Raum dann einer Matrix, äquivalent zu

$$\begin{matrix} m_{11}v_1 & + \dots + & m_{1n}v_n & = & c_1 \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ m_{m1}v_1 & + \dots + & m_{m1}v_n & = & c_m \end{matrix}$$

Mit  $M := (m_{ik}), U := (v_1, \dots, v_n), c := (c_1, \dots, c_m)$ . Wie aufwendig eine solche Simulation wird, hängt im weiteren Verlauf davon ab, wie viele Netzpunkte für eine Approximation verwendet werden [232] [339]. Die Matrixdarstellung wird im weiteren Verlauf nicht näher behandelt.

Nur bei vollständig ladungsfreiem Raum (Vakuum) geht die Poisson-Gleichung in die *Laplace-Gleichung* über, und es gilt  $\Delta V = 0$  bei  $\rho = 0$ . Die elektrische Spannung entspricht einer Potentialdifferenz zwischen zwei Punkten im elektrischen Feld,  $U = V(x_1, y_1, z_1) - V(x_2, y_2, z_2) = \int_1^2 E ds$ , und ist eine vektorielle Größe. Alle hypothetischen Teilchen einer identischen Polarität mit der Ladung  $q$ , den gleichen Startkoordinaten, der gleichen initialen Startrichtung sowie der gleichen initialen kinetischen Energie und konstanter Masse  $m$ , durchlaufen die gleichen Trajektorien in einer *homogenen* elektrostatischen Anordnung. Die Teilchentrajektorien sind energieabhängig und masseunabhängig. Sie können für eine Referenz exakt beschrieben werden [15] [16] [45]. Es folgt für eine Ladung  $q$  der Masse  $m$  dann der Zusammenhang mit dem *zweiten Newtonschen Gesetz* der klassischen Mechanik, d.h. die Beschleunigung eines Körpers ist umgekehrt proportional zu seiner Masse und direkt proportional zur wirkenden Kraft:

$$\frac{dp}{dt} = F = ma ; a = \frac{F}{m} \quad (\text{B.25})$$

Das elektrische Feld ist der Gradient des Potentialfeldes und es gilt für jede Komponente:

$$\frac{d}{dt}(m\dot{x}) = -q\frac{\partial V}{\partial x} ; \frac{d}{dt}(m\dot{y}) = -q\frac{\partial V}{\partial y} ; \frac{d}{dt}(m\dot{z}) = -q\frac{\partial V}{\partial z} \quad (\text{B.26})$$

Die einzelnen Ionen in einem rotationssymmetrischen Teilchenstrahl können dabei in einem kartesischen Koordinatensystem  $x, y, z$  mit ihren Bewegungen verfolgt werden. Die Ionengeschwindigkeit in Hauptausbreitungsrichtung  $z$  wird hierbei als *Momentangeschwindigkeit* betrachtet:

$$v_z = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta z}{\Delta t} = \frac{dz}{dt} = \dot{z} \quad (\text{B.27})$$

$\dot{z}$  ist die erste Ableitung des Weges nach der Zeit. Es ist üblich in *elektrostatischen* Quellen die Differentiation aber auf die zurückgelegte Strecke  $S$  der Koordinate  $z$  zu beziehen und nicht auf die Zeit  $t$  [263]. Zusammen mit der gefundenen Definition der Momentangeschwindigkeit gilt dann (beispielhaft):

$$\dot{x} = \frac{dx}{dt} = v_z \frac{dx}{dz} = v_z x' \quad (\text{B.28})$$

Betrachtet werden so schrittweise transversale Ebenen ( $x, y$ ) bei Ausbreitung entlang der  $z$ -Achse. Transversale Geschwindigkeitsanteile eines Ions sind die ersten Ableitungen des Ortsanteils  $x, y$  nach der Zeit  $\dot{x}, \dot{y}$ , werden aber jetzt als Produkt der Momentangeschwindigkeit mit der ersten Ableitung des Ortsanteils  $x, y$ , nach dem Weg  $z$  ( $x', y'$ ) dargestellt:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= v_z x' ; \dot{y} = v_z y' \\ v^2 &= v_z^2 (1 + x'^2 + y'^2) \end{aligned} \quad (\text{B.29})$$

Man kann diesen Sachverhalt analog zur geometrischen Strahlenoptik zunächst für infinitesimale Änderungen betrachten. Aufgrund der angenommenen Radiärsymmetrie eines Ionenstrahls wird im weiteren nur die Situation bezogen auf eine transversale Ortskoordinate dargestellt. Über die Kettenregel der Differentiation kann schrittweise von der Zeitbeziehung für ein Referenzion zur Wegbeziehung gewechselt werden:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} (m v_z x') &= -q \frac{\partial V}{\partial x} \\ x' \frac{d}{dt} (m v_z) + m v_z \frac{d}{dt} x' &= -q \frac{\partial V}{\partial x} \\ x' \left( -q \frac{\partial V}{\partial z} \right) + m v_z^2 x'' &= -q \frac{\partial V}{\partial x} \end{aligned} \quad (\text{B.30})$$

Die zweite Ableitung der Strecke nach der Zeit entspricht einer Beschleunigung  $\ddot{x} = \frac{d^2 x}{dt^2} = \frac{dv}{dt} = a$ , und für eine gleichmäßig beschleunigte Bewegung gilt  $a = \text{const.}$  Aus einer Integration erhält man zunächst die Geschwindigkeit und dann den zurückgelegten Weg [166].

### Paraxiale Strahlengleichung

Unter Berücksichtigung der Beziehungen auf der vorherigen Seite ergibt sich dann die *paraxiale* Strahlengleichung [166]:

$$x'' = \frac{1 + x'^2 + y'^2}{pv} q \left( x' \frac{\partial V}{\partial z} - \frac{\partial V}{\partial x} \right) \quad (\text{B.31})$$

Die Summe aus potentieller Energie und kinetischer Energie in den Grenzen des elektrostatischen Feldes ist  $E_{pot} + E_{kin} = 0$ . Kinetische und potentielle Energie sind skalare Größen und die Änderung der potentiellen Energie eines Systems entspricht vom Betrag her der Arbeit, die eine konservative Kraft im System verrichtet. Ihr Vorzeichen ist dem der Arbeit entgegengerichtet,  $E_{kin} = -qV$  und es gilt als Näherung:

$$pv = mv^2 \approx 2K = -2qV \quad (\text{B.32})$$

Die Arbeit, die beim Durchqueren des elektrischen Feldes an den Ionen verrichtet werden muss, erhält man nach einer Integration. Sie ist unabhängig von der Teilchentrajektorie<sup>14</sup>:

$$W_{ion} = q \int_1^2 E dz = \frac{1}{2} mv_2^2 - \frac{1}{2} mv_1^2 = m a L = q U \quad (\text{B.33})$$

Die paraxialen Strahlengleichungen sind in der Form (als totales Differential) nur schwer lösbar und man nähert deshalb die partiellen Ableitungen des Potentialgradienten *linear*, d.h. unter Vernachlässigung der quadratischen Beziehungen  $x'^2, x''^2$  [166]. Gilt für die Reihenentwicklung unter idealen Vakuumbedingungen  $\Delta V = 0$  und wird die Reihe bereits nach  $n = 1$  abgebrochen, erhält man einen Koeffizienten der linearen Näherung. Der Vektor  $r$  ist (hier) der Verschiebungsvektor der betrachteten transversalen Ebene und  $\varphi$  der Winkel der Kreiskoordinatendarstellung der Ebene<sup>15</sup>:

$$V(r, \varphi, z) = \sum_{n=0}^{\infty} (-1)^n \frac{V_{(z)}^{(2n)}}{(n!)^2} \left(\frac{r}{2}\right)^{2n} \quad (\text{B.34})$$

$$V(x, y, z) = V(z) - \frac{x^2 + y^2}{4} V''(z) + \dots \quad (\text{B.35})$$

$$\frac{\partial V}{\partial x} = -\frac{x}{2} V'' \quad (\text{B.36})$$

$$x'' = \frac{q}{pv} \left( x' V' + \frac{x}{2} V'' \right) \quad (\text{B.37})$$

Lösungen der linearen Näherung der paraxialen Strahlengleichung kann man dann über eine Integration, zunächst für die Richtungsanteile der Ionen an den Kanten eines Potentialübergangs zu einem homogenen elektrostatischen Feld erhalten. Innerhalb des Feldes greift eine weitere Näherungsbeziehung. Eine detailliertere Darstellung mit entsprechenden Literaturverweisen findet sich z.B. in [166].

### Matrizendarstellung

In der Regel erfolgt eine numerische Berechnung elektrostatischer Elemente bzw. Aufbauten mit Matrizen. Sie kann im Fall einfacher Elemente mit Punkt-zu-Punkt Abbildung analog zu einem Vorgehen mittels ABCD-Matrix und den entsprechenden Translationsmatrizes der geometrischen Optik behandelt werden.

<sup>14</sup>Bei einer Verschiebung auf einer Äquipotentialfläche muss keine Arbeit geleistet werden.

<sup>15</sup> $x = r \cos(\varphi), y = r \sin(\varphi)$ .

Für den Fall einer Rohrlinse erhält man mit der Substitution  $N = \frac{K_1}{K_2}$  die resultierende R-Matrix  $R_x$  eines Teilchens:

$$\begin{aligned}
 R_x &= \underbrace{\begin{pmatrix} 1 & 0 \\ +\frac{N-1}{4N} \frac{1}{L} & 1 \end{pmatrix}}_{2.Kante} \begin{pmatrix} 1 & \frac{2}{1+\sqrt{N}} L \\ 0 & \frac{1}{\sqrt{N}} \end{pmatrix} \underbrace{\begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{N-1}{4} \frac{1}{L} & 1 \end{pmatrix}}_{1.Kante} \\
 &= \begin{pmatrix} \frac{3-\sqrt{N}}{2} & \frac{2}{1+\sqrt{N}} L \\ -\frac{3}{8} \frac{(N-1)(\sqrt{N}-1)}{N} \frac{1}{L} & \frac{3\sqrt{N}-1}{2N} \end{pmatrix} \quad (\text{B.38})
 \end{aligned}$$

Gilt dabei  $K_2 > K_1$  folgt daraus der Zusammenhang: Sammellinse - modifizierte Driftstrecke - Zerstreuungslinse bzw.  $K'' = -qV'' > 0$  mit fokussierender Wirkung oder im entgegengesetzten Fall  $K_2 < K_1$ : Zerstreuungslinse - modifizierte Driftstrecke - Sammellinse bzw.  $K'' = -qV'' < 0$  und Defokussierung. Die fokussierende Wirkung für beide Fälle überwiegt dabei immer die defokussierende Wirkung. Dieser Sachverhalt ist vor allem bei Kombinationen mehrerer elektrostatischer Elemente wichtig. Die Determinante der Matrix entspricht in diesem Fall dem Verhältnis der Impulse:

$$\det(R_x) = \frac{p_1}{p_2} \quad (\text{B.39})$$

Die einfachste Form einer elektrostatischen Linse ist die Aperturlinse. Im symmetrischen kreisrunden Fall entspricht ihre radiale Transfermatrix:

$$R_x = R_y = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{(K'_2 - K'_1)}{2pv} & 1 \end{pmatrix} \quad (\text{B.40})$$

und ihre Brechkraft kann äquivalent zu dem Formalismus einer dünnen Linse beschrieben werden:

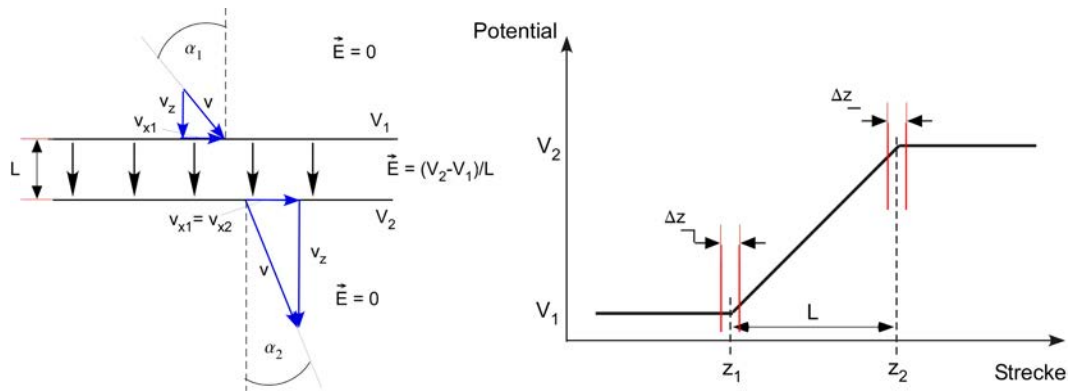
$$\frac{1}{f} = \frac{K'_2 - K'_1}{2pv} \quad (\text{B.41})$$

Die Apertur liegt auf einem Potential, das die Änderung des Energiegradienten  $\frac{dK_1}{ds}$  im elektrostatischen Feld vor der Apertur, im Vergleich zur Änderung des Energiegradienten  $\frac{dK_2}{ds}$  hinter der Apertur ermöglicht. Die Linse wirkt dabei räumlich fokussierend auf die Ionen, wenn gilt  $K'_2 > K'_1$  und räumlich defokussierend bei Umkehrung der Ungleichung. Praktische Ausführungen von Aperturlinsen erfordern immer mindestens drei Elektroden, um zwei möglichst homogene Felder erzeugen zu können.

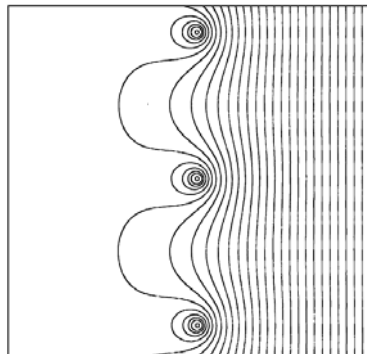
### Reihenschaltung elektrostatischer Elemente

Kombiniert man eine Aperturlinse mit (mehreren) *Einzellinsen* (in geeigneter Weise) kann dadurch eine *Taille-zu-Taille* Abbildung des Ionenstrahls in Analogie zu *teleskopischen* Systemen der Fokussierung gaußscher Strahlprofile erfolgen. Hierzu müssen die Brennweiten der kombinierten Einzellinsen räumlich zusammenfallen. Eine Einzellinse ist typischerweise aus drei Rohrlinsen aufgebaut, wobei die mittlere Rohrlinse mit dem Potential  $V_2$  und die erste und letzte mit einem einheitlichen Potential  $V_1 = V_3$  versehen werden. Der Potentialgradient ist dabei entweder für positive oder für negative Ionen fokussierend. Die Einzellinse wirkt generell immer fokussierend, muß aber nicht zwingend aus Rohrlinsen aufgebaut sein. Ausführungen mit Aperturblenden kommen auch vor [166] [263].

Eine sehr häufig verwendete kommerzielle Software zur Simulation von Ionentrajektorien bzw. elektrostatischen Potentialverteilungen und Feldverläufen in Hochvakuumquellen von Massenspektrometern



Boundary-Element-Methode



Gitter mit Felddurchgriff

Abbildung B.4: (Links oben) Ionenein- und Austrittswinkel nach passieren eines homogenen elektrostatischen Feldes. (Rechts oben) Näherung einer Ionentrajektorie durch getrennte Betrachtung, einerseits der Übergangsbereiche an den Potentialkanten und andererseits im homogenen Feld, nach [166]. (Unten) Äquipotentiallinienverlauf an einem Gitter. Die parallelen Stäbe ( $d = 25 \mu m$ ) liegen auf einem Potential von 0 V und trennen die rechte Seite mit einer Feldstärke von 1 kV/m von der linken feldfreien Seite. Die berechneten 29 Äquipotentiallinien betragen, ausgehend von der rechten Seite 0.15 V bis 1.45 V in Schritten von 0.05 V (Quelle: Read, F. et al.: *Short- and long-range penetration of fields and potentials through meshes, grids or gauzes*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 427, 363-367, 1999).

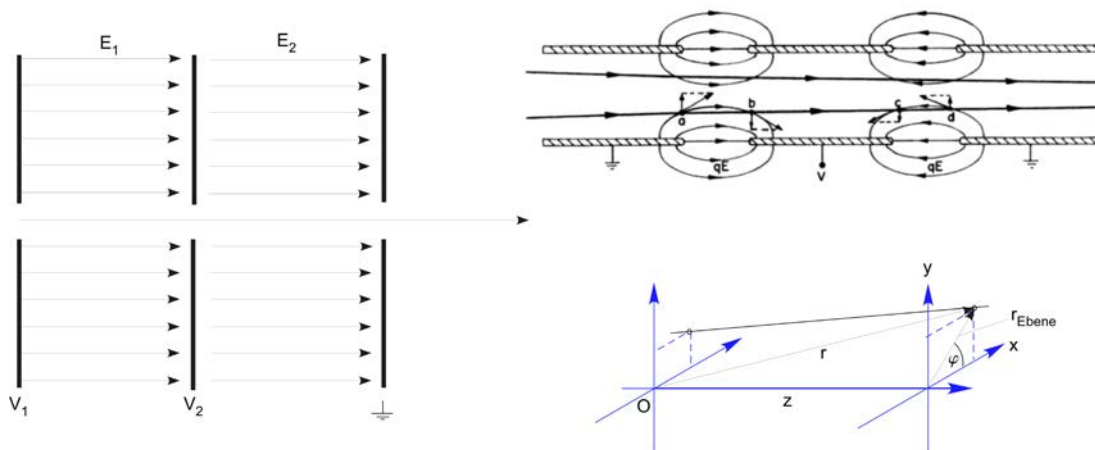


Abbildung B.5: Links: Einfachste physikalische Anordnung einer Aperturlinse (drei Elektroden). Rechts: (oben) eine aus drei Rohrlinsen aufgebaute Einzellinse. Abbildung (rechts oben) entnommen aus [340]. Rechts (unten) x-y-z-Bezugssystem zur Beschreibung der Richtungsänderung im Strahlverlauf, zwischen einzelnen transversalen Ebenen.

ist das Programm SIMION. Dieses simuliert unter weitgehend idealisierten Annahmen und berücksichtigt keine Randbedingungen, wie sie etwa durch Raumladungseffekte, raumladungsbegrenzte Kathoden-Emissionen oder Dielektrika (Restgasatmosphäre) hervorgerufen werden können. Ansätze zur Berücksichtigung dieser Ausgangssituation(en) verwenden z.B. die kommerzielle Software *Charged Particle Optics Software* (CPO). Die Berechnungen dieser Software basieren auf der *Boundary Element Method* (BEM). Das Grundprinzip dieser Methode besteht in der Annahme, daß an kontaktierten Elektroden durch angelegte Potentiale, Ladungen an der Elektrodenoberfläche erzeugt werden und auch erhalten bleiben, wenn die initiierenden Quellen wegfallen, sofern keine Leckströme fließen können. Raumladungen werden dann in einem zweiten Schritt, ausgehend von den isolierten Oberflächenladungen der Elektroden, als ursächliche Quelle(n), berechnet. Es handelt sich hierbei nicht um eine klassische Finite-Elemente Methode (→ [www.simion.com](http://www.simion.com)).



# Anhang C

## Erläuterungen zur Lichtmikroskopie

### C.1 Geometrische Optik und Bildkonstruktion

Die laterale Auflösungsfähigkeit eines (stigmatisch) fokussierenden optischen Apparates hängt davon ab, wie gut Punktquellen aus der Objektebene erfasst (Aperturbene) und anschliessend in die Bildebene projiziert werden können. Es gilt dabei in mikroskopischen Anwendungen der Zusatz, das die Darstellbarkeit einzelner Punkte nicht nur für sehr geringe Abstände zur optischen Achse erfüllt sein muss. Um einen Abbildungsprozess im Modell der gaußschen Strahlenoptik (Geometrische Optik) von einem Gegenstandspunkt in endlicher Entfernung zur abbildenden Linse zu einem Bildpunkt verfolgen zu können, reicht es i.d.R. aus den *Hauptstrahl* und einen Brennpunktstrahl zu betrachten. Der (zunächst) entscheidende physikalische Vorgang ist dabei die Brechung (*refraction*) der Strahlung an den Grenzflächen, aufgrund der Unterschiede der Brechungsindizes der durchlaufenen Medien. Ein einfaches vergrößerndes optisches Gerät mit homogenem Medium ist die dünne Sammellinse aus Glas. Der Hauptstrahl trifft im Beispiel der einzelnen dünnen Linse mit dem achsparallelen Strahl, der durch den rückwertigen Brennpunkt verläuft, in der Abbildungsebene zusammen und markiert dort im Schnittpunkt den Bildpunkt der Projektion. Formal sind die Definitionen der Bezeichnungen, von im Modell wichtigen Strahlen (Hauptstrahl, Randstrahl, etc.) und auch der beteiligten Blenden (Aperturblende, Feldblende, etc.), abhängig von der Anordnung der Elemente im System [341]. E. Abbe entwickelte auf der Basis von Fouriertransformationen eine Theorie zur mikroskopischen Abbildung nichtselbstleuchtender Objekte mit kohärenter Beleuchtung. Im folgenden wird eine (überwiegend) trigonometrische Betrachtung gewählt, um einige wesentliche Zusammenhänge darzustellen. Diese sind mit ihren Bezeichnungen auf die, hinsichtlich des „Optikrechnens“, formal inkorrekte Abbildung C.1 (c) bezogen.

Eine fehlerfreie Abbildung wird (zunächst) für einen Punkt auf der optischen Achse gewährleistet sein, wenn die *Abbesche Sinusbedingung* erfüllt werden kann.

#### C.1.1 Abbe'sche Sinusbedingung

Befinden sich vor und hinter dem Medium der Linse die Medien mit den Brechungsindizes  $n, n'$ , gilt für Strahlen von Ausgangspunkten auf der optischen Achse mit einem Eintrittswinkel  $\sigma$  zur optischen Achse:

$$\frac{n \cdot \sin(\sigma)}{n' \cdot \sin(\varphi)} = \frac{(B)}{(G)} = \frac{NA}{NA'} = \beta \quad (\text{C.1})$$

mit  $\beta$  dem Abbildungsmaßstab,  $B$  der Bildgröße,  $G$  der Gegenstandsgröße und  $NA$  der numerischen Apertur auf der Gegenstandsseite sowie  $NA'$  der numerischen Apertur auf der Bildseite. Bei aplanatischen

Optiken kann diese Bedingung auch mit zusammengesetzten Linsensystemen und für unterschiedliche Abbildungsmaßstäbe erfüllt werden, wobei dann auch keine sphärische Aberration stattfindet.

Um eine Punktabbildung *achspareller* Objektstrahlen, zunächst für einen infinitesimal kleinen Abstand  $dh$  zur optischen Achse, gewährleisten zu können muss ein gemeinsamer Brennpunkt auf der Bildseite im Abstand  $f'$  existieren:

$$\frac{dh}{\sin(\varphi)} = f' = \text{const.} \quad (\text{C.2})$$

Fasst man beide Bedingungen für eine dünne Linse zusammen, erhält man:

$$n \cdot dh \cdot \sin(\sigma) = n' \cdot dh' \cdot \sin(\varphi) \quad (\text{C.3})$$

Die Beziehung kann über die Betrachtung jeder einzelnen Medium-Medium-Grenzfläche zusammengesetzt werden. Beim Übertritt der Strahlung von einem Medium in ein anderes Medium mit *unterschiedlichem* aber konstantem Brechungsindex, ändert sich die Phasenausbreitungsgeschwindigkeit des Lichtes. Für transparente Medien (bezogen auf Abbildung C.1 c,  $n < n_L$ ) gilt dabei das *Snelliussche* Brechungsgesetz:

$$\frac{\sin(\epsilon)}{\sin(\epsilon')} = \frac{n_L}{n} \quad (\text{C.4})$$

Zur Abbildungskonstruktion einer *bikonvexen* Linse, deren Oberfläche aus nach außen gewölbten Kugelmantelflächen besteht, erhält man mit den Krümmungsradien der brechenden Linsenoberflächen  $Kr_n$  und der konstanten Brechzahl der Linse  $n_L$ , die *Abbesche Invariante* für jede Kugelmantelfläche. Diese Beziehung ist grundlegend für die *paraxialen Abbildungsgleichungen* der *geometrischen* Optik. Sie ist streng genommen (exakt) nur für Parallelstrahlen mit infinitesimalem Abstand zur optischen Achse und einer Wellenlänge  $\lambda \rightarrow 0$  erfüllt. Dieses theoretische Konstrukt wird auch gelegentlich als „Fadenraum“ bezeichnet:

$$\begin{aligned} n \left( \frac{1}{Kr_1} - \frac{1}{s_1} \right) &= n_L \left( \frac{1}{Kr_1} - \frac{1}{s'_1} \right) \\ n_L \left( \frac{1}{Kr_2} - \frac{1}{s_2} \right) &= n' \left( \frac{1}{Kr_2} - \frac{1}{s'_2} \right) \end{aligned} \quad (\text{C.5})$$

Löst man nach  $s'_1$  (g) und  $s_2$  (b) auf und nimmt als Näherung an, daß für den Abstand der Krümmungsflächenscheitel gilt  $d \rightarrow 0$ , erhält man:

$$\begin{aligned} \frac{n_L Kr_1 s_1}{n Kr_1 + (n_L - n) s_1} &= \frac{n_L Kr_2 s'_2}{n' Kr_2 + (n_L - n') s'_2} \\ \frac{n'}{b} - \frac{n}{g} &= \frac{n_L - 1}{Kr_1} - \frac{n_L - 1}{Kr_2} \end{aligned} \quad (\text{C.6})$$

### C.1.2 Paraxiale Strahlengleichung

Die paraxiale Strahlengleichung lässt sich dagegen besser in vektorieller Form darstellen. Für eine differenzielle Wegstrecke  $ds$  entlang einer Strahltrajektorie entspricht sie in kompakter Form der Differentialgleichung:

$$\frac{d}{ds} \left( n \frac{dr}{ds} \right) = \nabla n \quad (\text{C.7})$$

mit dem Ortsvektor  $r(x, y, z)$ . Werden parallel zur optischen Achse verlaufende Strahlen betrachtet, gilt dabei die (lineare) paraxiale Näherung ( $d^2x/dz^2 = 0$ ,  $d^2y/dz^2 = 0$ ). Für eine Richtung der Ebene erhält man:

$$\frac{d}{dz} \left( n \frac{dx}{dz} \right) \approx \frac{\partial n}{\partial x} \quad (\text{C.8})$$

Da in einem homogenen Medium die Funktion  $n(x, y, z)$  konstant ist ( $\nabla n(r) = 0$ ), werden die Ortskoordinaten der Ebene lineare Funktionen von  $z$ , die Strahlen breiten sich geradlinig aus.

### C.1.3 Paraxiale Schnittweitengleichung

Für eine einzelne Krümmungsgrenzfläche eines homogenen Mediums kann in linearer Näherung die paraxiale Schnittweitengleichung aufgestellt werden:

$$s'_1 = Kr \frac{n_L}{n_L - 1} = f' \quad (\text{C.9})$$

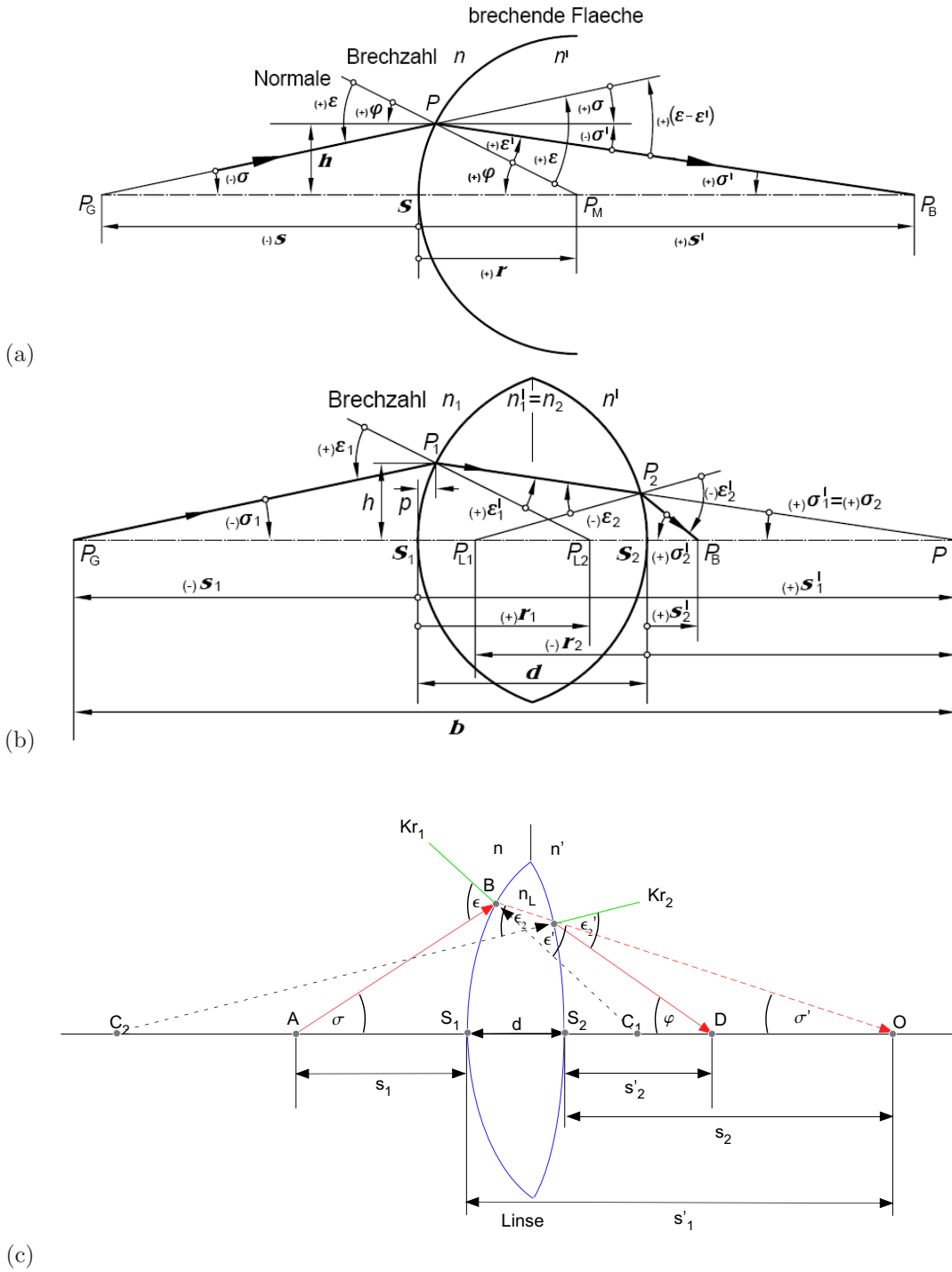


Abbildung C.1: Brechung an sphärischen Flächen. Formale Darstellung zum trigonometrischen Optikrechnen an einer einzelnen sphärischen Fläche (a) und an einer bikonvexen Linse (b). (c) Vereinfachte aber formal inkorrekte Abbildung. Abbildung eines auf der optischen Achse liegenden Punktes durch eine bikonvexe Linse mit einheitlichem Brechungsindex. Gilt für  $n = n' = n_m$  und  $d < Kr_1, Kr_2$  kann die Approximation der dünnen Linse  $\frac{1}{f} \approx \left(\frac{n_L - n_m}{n_m}\right) \left[\frac{1}{Kr_1} - \frac{1}{Kr_2}\right]$  verwendet werden. In Luft gilt die Linsenmachergleichung  $\frac{1}{f} = (n_L - 1) \left[\frac{1}{Kr_1} - \frac{1}{Kr_2} + \frac{(n_L - 1)d}{n_L Kr_1 Kr_2}\right]$ . Die Darstellungen (a, b) sind entnommen aus dem Skript von Prof. em. E. Schäfer.

Für eine *ideale* Abbildung einer nicht mehr infinitesimal kleinen Gegenstandsgröße  $h$  in eine Bildgröße  $h'$  kann die *Tangensbedingung* bzw. *Helmholtz-Lagrange*<sup>1</sup> Beziehung herangezogen werden [342]:

$$n \cdot h \cdot \tan(\sigma) = n' \cdot h' \tan(\varphi) \tag{C.10}$$

Für relativ kleine (halbe) Öffnungswinkel,  $0^\circ < \sigma < 15^\circ$ , ist in erster Näherung die Gleichsetzung  $\sin(\sigma) \approx \tan(\sigma) \approx \sigma$  möglich. Man erhält die *Helmholtz-Lagrange Invariante*:

$$n(G)\sigma = n'(B)\varphi \tag{C.11}$$

Aus dieser folgt direkt ein *konstanter* Abbildungsmaßstab selbstleuchtender Objekte für die *gaußsche* Bildebene:

$$\beta = \frac{n \cdot b}{n' \cdot g} = \frac{(B)}{(G)} = \frac{h'}{h} = \text{const.} \tag{C.12}$$

Diese ist als gute Näherung auch für die Abbildung von Objektpunkten mit nicht infinitesimalem Abstand zur optischen Achse erfüllt. In der numerischen Optik ist, wie auch in der Elektronen-/Ionenoptik, eine

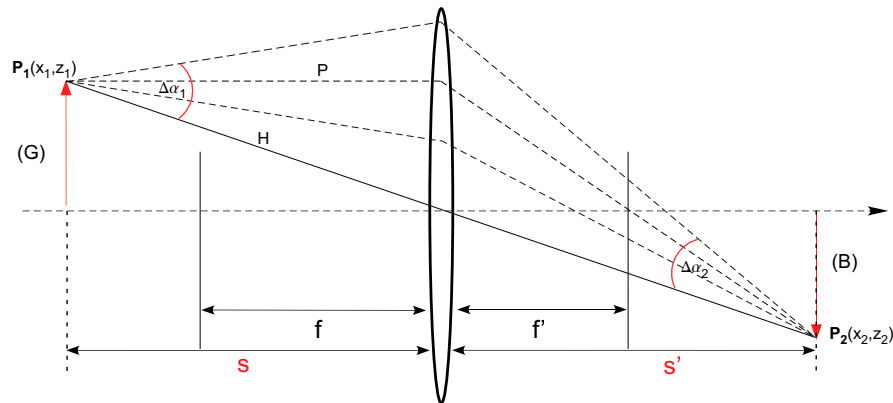


Abbildung C.2: *Punkt-zu-Punkt* Abbildung mit einer dünnen Sammellinse (+ Linse, geometrische Optik) anhand eines Parallel- und Hauptstrahles. Andeutung der Übertragung der ersten Beugungsmaxima des Parallelstrahles.

Matrixdarstellung der entsprechenden Elemente die Regel.

### C.1.4 ABCD-Matrix

Im Falle einer dünnen Linse kann eine Punktabbildung der konjugierten Ebenen über die Multiplikation zweier Translationsmatrizes mit einer Matrix für die Ausbreitung im optischen System, die sogenannte ABCD-Matrix, dargestellt werden. Es folgt daraus die resultierende Matrix  $M_L$  einer dünnen Linse [343]:

$$\begin{aligned} M_L &= \begin{pmatrix} \underline{A} & \underline{B} \\ \underline{C} & \underline{D} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & -s' \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & s \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \\ &= \begin{pmatrix} A - Cs' & B + As - Ds' - Css' \\ C & D + Cs \end{pmatrix} \end{aligned} \tag{C.13}$$

<sup>1</sup>H. HELMHOLTZ beschrieb zuerst den kleinsten lateralen Bildpunktabstand selbstleuchtender Objekte (inkohärente Strahlung) durch optische Apparate z.B. Teleskope.

Die bildseitige Strahlhöhe  $x_2 = \underline{A} x_1 + \underline{B} \alpha_1$  und Strahlrichtung  $\alpha_2 = \underline{C} x_1 + \underline{D} \alpha_1$  können dann in Form von Spaltenvektoren dargestellt werden. Es gilt  $\underline{A} = \frac{x_2}{x_1}|_{\alpha_1=0}$ ,  $\underline{B} = \frac{x_2}{\alpha_1}|_{x_1=0}$ ,  $\underline{C} = \frac{\alpha_2}{x_1}|_{\alpha_1=0}$ ,  $\underline{D} = \frac{\alpha_2}{\alpha_1}|_{x_1=0}$  mit der Determinante  $\det(M_L) = \underline{A} \underline{D} - \underline{B} \underline{C} = n/n'$ :

$$\begin{pmatrix} x_2 \\ \alpha_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \underline{A} & \underline{B} \\ \underline{C} & \underline{D} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ \alpha_1 \end{pmatrix} \quad (\text{C.14})$$

Die Abbildungsbedingung wird winkelunabhängig erfüllt, wenn  $\underline{B} = 0$  zutrifft:

$$\underline{B} = B + A s - D s' - C s s' = 0 \quad (\text{C.15})$$

woraus sich dann ebenso der Abbildungsmaßstab ergibt:

$$\beta = \frac{x_2}{x_1} = \underline{A} = A - C s' \quad (\text{C.16})$$

Eine eintretende Polarisationsänderung kann durch Jones-Vektoren und entsprechende Jones-Matrizes behandelt werden. Im Zusammenhang mit mikroskopischen Systemen wird dies z.B. in [277] dargestellt.

### C.1.5 Abbildung am Lichtmikroskop

Bei modernen Lichtmikroskopen zur Weitfeldmikroskopie handelt es sich um zusammengesetzte optische Systeme. Die Linsenkombinationen der Objektive sind dabei hinsichtlich ihres Glas-Luftabstandes und ihrer Oberflächen für mehrere Wellenlängen aufeinander abgestimmt. Dabei können vorab auch alle zusätzlichen im Strahlengang liegenden Elemente (außer dem realen Objekt) berücksichtigt werden [277]. Objektive kombinieren in ihrem Aufbau *Kron-* und *Flintgläser*. Diese unterscheiden sich in ihrer chemischen Zusammensetzung und damit physikalisch in ihrem Brechungsindex<sup>2</sup>. Für Fluoreszenzanwendungen wird *Quarzglas* verwendet. An Mikroskopen wird insgesamt im umgekehrten Verhältnis zu Teleskopen, von einem möglichst nah am Objektiv liegenden Gegenstand ( $s \rightarrow f$ , *working distance*) auf der Bildseite zunächst ein vergrößertes reelles Zwischenbild erzeugt [165]. Dieses Zwischenbild kann dann, wie bei manchen Ausführungen, in einem endlichen Abstand liegen (reelles Bild) oder aber ins Unendliche versetzt werden (virtuelles Bild). Bei Lichtmikroskopen mit endlich abbildender (Objektiv)Optik wird bei der Lage des Zwischenbildes  $s'$  im Tubus meist ein Kompromiss zwischen der *Lichtstärke* und der *Größe* der Abbildung getroffen. Die häufigste Tubuslänge für endlich abbildende Objektive ist dabei  $t=160$  mm (mit einem korrespondierenden Arbeitsabstand der einzelnen Objektive). Eine Beschränkung der Vergrößerung des Zwischenbildes ist nicht zuletzt auch wegen des begrenzten Auflösungsvermögens eines Objektivs notwendig. In der Zwischenbildebene sind primäre Abbildungsfehler i.d.R. bereits ausreichend durch die berechnete Optik korrigiert. Eine theoretisch einheitlich hell ausgeleuchtete Objektivoptik überträgt den durch die Ausgangsapertur fallenden Lichtstrom  $\Phi$  bildwinkelabhängig nach dem sogenannten  $\cos^4$ -Gesetz:

$$\Phi' = \Phi \cdot \cos(\alpha)^4 \quad (\text{C.17})$$

Die Strahlungsflussdichte  $E$  nimmt dabei mit steigendem Vergrößerungsfaktor  $\beta_{Obj.}$  ab, und führt bei Objektiven mit kürzeren Brennweiten zu einem Randlichtabfall im (einheitlich großen) Bildfeld der Zwischenbildebene:

$$E = \frac{\Phi'}{dA'} = \frac{\Phi \cos(\alpha)^4}{\beta_{Obj.}^2 dA_{\perp}} \quad (\text{C.18})$$

---

<sup>2</sup>Kronglas BK1  $n \approx 1.510$ , Flintglas F3  $n \approx 1.613$ . Der Brechungsindex von Krongläsern variiert ungefähr zwischen  $n=1.5$  und  $n=1.6$ . Eine Einteilung von Flintgläsern erfolgt i.d.R. nach ihrem Bleigehalt (PbO).

In beidseitig<sup>3</sup> bzw. bildseitig ( $\infty$ -Objektiv) telezentrischer Anordnung kann dieser Effekt aber abgeschwächt werden. Eine weitere Möglichkeit den zunehmend gaussförmigen Intensitätsabfall zum Randbereich im Bildfeld zu verringern, besteht im Einsatz von Neutraldichtefiltern (Neutralgraufilter, *centerfilter*) mit gaussförmiger Absorptionscharakteristik<sup>4</sup> (*apodization*). Hierbei muss dann, da absolut ein weiterer Intensitätsverlust eintritt, die Belichtungszeit entsprechend erhöht werden. Bei Objektiven mit  $\infty$ -Optik wird das Zwischenbild am Ende der Tubuslänge in die Brennebene des Okulars gelegt. Das entspannte Auge betrachtet das virtuelle im Unendlichen liegende Zwischenbild  $B''$  des Gegenstandes (*Normalvergrößerung* des Mikroskops) dann nahezu ermüdungsfrei. Das Okular wirkt dabei effektiv wie eine Lupe. Auch Okulare bestehen i.d.R. aus einer Kombination von Linsen. In modernen Weitfeldmikroskopen verwendete Okulare entsprechen oft dem Aufbau nach *Kellner* (ein Achromat zur Farbfehlerkorrektur) oder weitestgehend verzeichnungsfreie *orthoskopische* Okulare. In der Regel werden in der Kombination mit Apochromaten höherer Vergrößerungen spezielle Kompensationsokulare notwendig, um eine optimal fehlerreduzierte Abbildung auf der Retina des menschlichen Auges zu ermöglichen.

### C.1.6 Abbildungsgleichung einer dünnen Linse

Die mikroskopische Vergrößerung kann durch eine Zusammenfassung der Objektivlinsen formal - zwecks Vereinfachung im Rahmen des *kollinearen Modells* - mit dem „Ersatzschaltbild“ einer dünnen Sammellinse (+ Linse) und ihrer Abbildungsgleichung (mit der Brennweite  $f$ ) angegeben werden:

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{s} + \frac{1}{s'} \quad (\text{C.19})$$

mit der Gegenstandsweite  $s$  und der Bildweite  $s'$ . Die Brennweite eines zusammengesetzten Linsensystems aus zwei (+) Linsen, die im Abstand  $z$  zueinander aufgestellt sind, kann explizit berechnet werden:

$$f = \frac{f_1 f_2}{f_1 + f_2 - z} \quad (\text{C.20})$$

### C.1.7 Abbildungsmaßstab eines Mikroskopes

Der Abbildungsmaßstab eines Objektivs entspricht am vereinfachten Beispiel eines Ersatzschaltbildes, der einzelnen dünnen Linse:

$$\beta_{Obj.} = \frac{B'}{G} = \frac{|s'|}{|s|} \quad (\text{C.21})$$

Bei der *Normalvergrößerung* des Objektivs mit  $\infty$ -Optik liegt das Zwischenbild  $B'$  in der Brennebene des Okulars. Diese ergibt sich aus der rückwertigen Brennweite des Objektivs und der Tubuslänge, gemäß  $s' = f'_{Obj.} + t$ . Damit gilt für den Abbildungsmaßstab:

$$\beta_{Obj.} = -\frac{s'}{f'_{Obj.}} + 1 = -\frac{t}{f'_{Obj.}} \quad (\text{C.22})$$

### C.1.8 Normalvergrößerung eines Mikroskopes

Die Normalvergrößerung des Mikroskops  $M$  ergibt sich dann aus dem Produkt der Vergrößerung des Objektivs und der Vergrößerung durch das Okular  $M_{Ok} = s/f_{Ok}$ , wobei  $s$  der *Bezugssehweite* des menschlichen Auges (25cm, deutliche Sehweite) entspricht:

$$M = \beta_{Obj.} \cdot M_{Ok} = -\frac{t \cdot s}{f_{Obj.} \cdot f_{Ok}} \quad (\text{C.23})$$

<sup>3</sup>Telezentrische Beleuchtung, z.B. im Durchlicht mit Kondensoranordnung und Beleuchtung nach Köhler und  $\infty$ -Objektiv.

<sup>4</sup>Eine Alternative besteht im Zusammenhang mit Online CCD-Kameras in einer Softwarekorrektur anhand des Livebildes, wenn eine telezentrische Beleuchtung und Abbildung nicht erreicht werden kann.

Das zu dieser Arbeit verwendete aufrechte Labormikroskop *Olympus BX 41* arbeitet mit  $\infty$ -Objektiven und bietet zusätzlich die Möglichkeit in einem zweiten Strahlengang mit einer Projektionslinse optional eine Abbildung auf einen CCD-Array zu projizieren. Der feste Abbildungsmaßstab dieser Linse  $\beta_{Proj}$  erzeugt dann jeweils reelle Abbildungen auf der Oberfläche des CCD-Array:

$$\beta_{CCD} = \beta_{Obj} \cdot \beta_{Proj} = \frac{|s'|}{|s|} \cdot \frac{|s''|}{|s'|} \quad (\text{C.24})$$

Das Zwischenbild B' liegt dabei *vor* der Brennweite der Projektionslinse. Die Projektionen können theoretisch bis zum *Nyquist-Kriterium*, zeilenweise ausgelesen und mit einer *Frame-Grabber-Karte* digitalisiert werden [344]. Die kleinste effektiv genutzte Fläche einer photosensitiven Einheit des CCD-Array entspricht einem Pixel in der digitalen Darstellung. Die fehlerfreie Abbildung einer beugungsbegrenzten zweidimensionalen Punktintensität mit *Airy pattern* benötigt dabei mindestens ein Feld von 4 Pixel  $\cdot$  4 Pixel.

### C.1.9 Stereoskopische Tiefenwahrnehmung

Das menschliche Auge besitzt die Fähigkeit zur stereoskopischen Tiefenwahrnehmung. Diese wird über die physikalischen Parameter des Abbildungssystems Auge und weiteren physiologischen Parametern im Verlauf der Bildverarbeitung im Gehirn bestimmt. Im folgenden werden die stereoskopischen (beide Augen im Zusammenspiel) physikalischen Rahmenparameter angegeben. Es kann für die stereoskopische Tiefenauflösung eine Formel verwendet werden:

$$\Delta z_{stereo} = \frac{\alpha s^2}{p} \quad (\text{C.25})$$

Dabei entspricht  $\alpha$  hier der stereoskopischen Winkelauflösung beider Augen. Diese beträgt bei helladaptierten und vollfunktionsfähigen Augen ca. 10 Winkelminuten. Nimmt man zudem einen Pupillenabstand von etwa  $p \approx 65 \text{ mm}$  an und eine deutliche Sehweite von  $s \approx 250 \text{ mm}$ , erhält man eine stereoskopische Tiefenauflösung des menschlichen Auges von in etwa  $45 \mu\text{m}$  [345]. Die stereoskopische Winkelauflösung am Stereomikroskop errechnet sich dann nach:

$$\Delta z_{stereo} = \frac{\alpha f_{Obj}^2}{\alpha \frac{f'_{Obj}}{f_{Ok}} \pm \alpha f_{Obj}} \quad (\text{C.26})$$

und erhöht bei stärkeren Vergrößerungen auch die stereoskopische Winkelauflösung des („nackten“) Auges. In digitalen Pixelbildern fokussierter Weitfeldmethoden kann die stereoskopische Tiefenwahrnehmung, die vom menschlichen Betrachter wahrgenommen wird, nicht durch die Aufnahme eines einzelnen Bildes einer Schärfenebene konserviert werden.



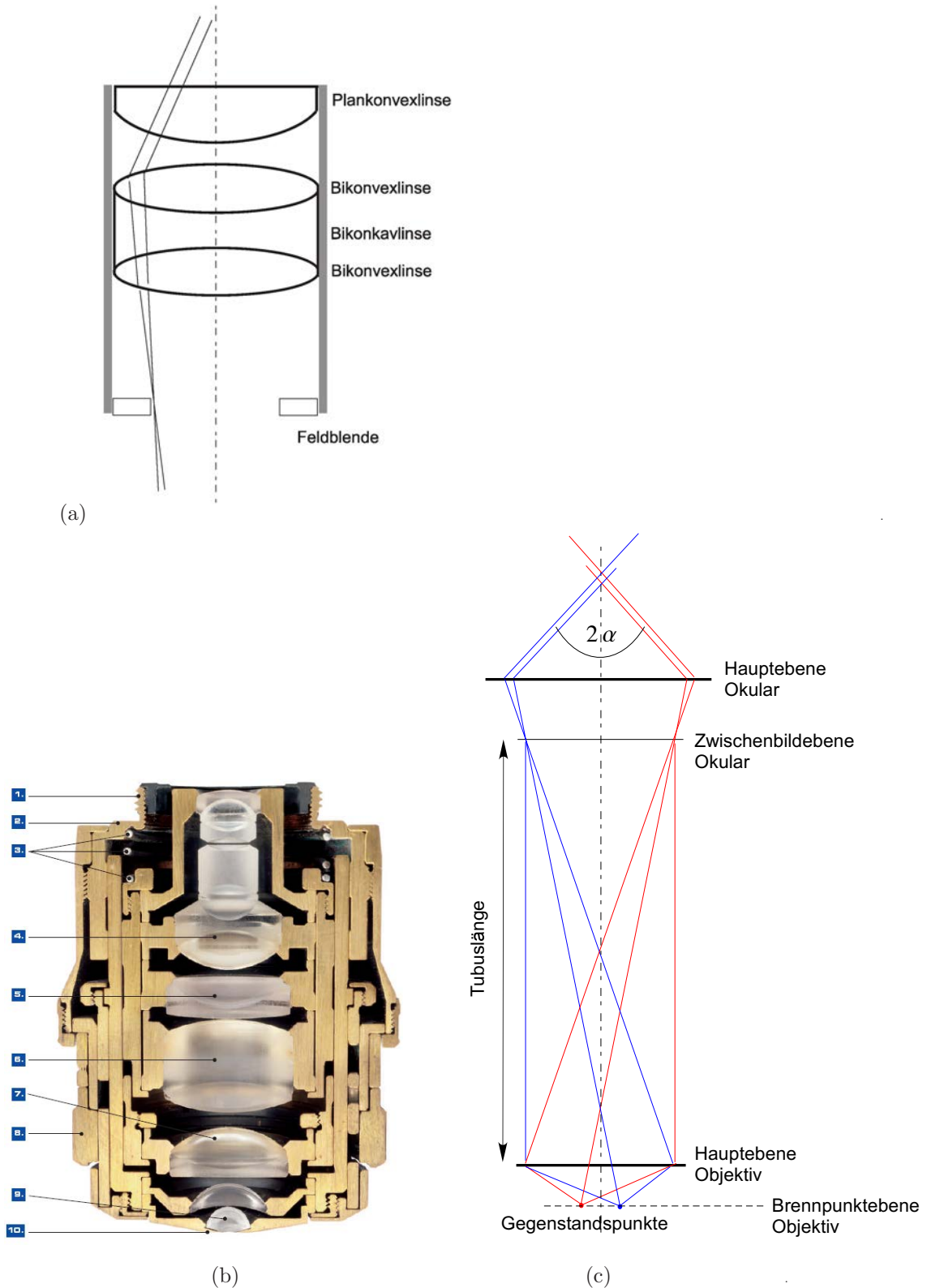


Abbildung C.3: (a) Schematischer Querschnitt durch ein orthoskopisches Okular nach E. Abbe mit halbsseitig angedeutetem Strahlverlauf. (b) Querschnittsphotographie eines stark vergrößernden  $\infty$ -Mikroskopobjektives des Herstellers Zeiss. Bezeichnungen: 1. Objektivgewinde, 2. Anlagefläche des Objektivs, 3. Federsystem für den Präparateschutz-Mechanismus, 4.-7. Linsengruppen zur Korrektur von Bildfehlern, 8. Korrektionsring zur Anpassung an abweichende Deckglasdicken oder Temperaturen, 9. Frontlinsensystem, 10. Frontlinsenfassung. Abbildung entnommen aus: Zeiss-Broschüre 46-0108 d 09.2007. (c) Abbildungsstrahlengang für zwei Gegenstandspunkte mit je einem Brennstrahl und Hauptstrahl. Der Brennstrahl entspricht in der Darstellung gleichzeitig einem Randstrahl des Objektivs.  $2\alpha$  gibt den Schwinkel an. Das vom menschlichen Auge betrachtete Objekt liegt im Unendlichen (nicht dargestellt).

### C.1.10 Aberrationen und Absorption in dielektrischen Medien

#### Brechungsindex

Der Brechungsindex  $n$  ist in *dielektrischen* Medien eine Funktion der Wellenlänge des Lichtes und erklärt das Phänomen der *chromatischen* (Längs- und Quer-) Aberration bzw. der Dispersion. Man erhält z.B. über eine *Cauchy*-Folge für transparente Medien eine Approximation die i.d.R. nach dem zweiten Glied abgebrochen werden kann<sup>5</sup>. Für die meisten optischen Materialien wie z.B. Quarz- und Borosilikatglas ist die Näherung bereits mit zwei Konstanten ausreichend, um die im entsprechenden Material eintretende Dispersion zu beschreiben. Mit den Konstanten  $A, B, C$  gilt:

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4}, \dots \quad (\text{C.27})$$

Eine oft im Zusammenhang mit laseraktiven Medien verwendete Beziehung ist die Sellmeier-Gleichung, die als eine Erweiterung von (C.27) angesehen werden kann. Nach dem *fermatschen* Prinzip ( $\delta \int_a^b n(r) ds = 0$ ,  $r = (x, y, z)$ ) propagieren Strahlen so, daß i.d.R. die Ausbreitungszeit ein Minimum darstellt. In einem *homogenen* (isotropen) Medium breiten sich die Strahlen demnach *geradlinig* aus und die Brechzahl an jedem Ort im Medium entspricht dem Verhältnis der Phasengeschwindigkeit des Lichtes im Vakuum  $c_0$  zur Phasengeschwindigkeit im Medium  $c$ :

$$n = \frac{c_0}{c} = \sqrt{\varepsilon/\varepsilon_0}; \quad n^2 = 1 + \chi, \quad (\text{C.28})$$

mit  $\varepsilon$  der elektrischen Permittivität des Mediums (Durchlässigkeit für elektrische Felder,  $\varepsilon/\varepsilon_0 = \varepsilon_r$ ) und  $\chi$  der elektrischen Suszeptibilität (Faktor der *dielektrischen Verschiebung* im elektrischen Feld = *Polarisation*). Für absorbierende Medien ist die Brechzahl komplex:  $n = n_1 + in_2$ . Der Imaginärteil  $n_2$  kann dabei über den *Absorptionskoeffizienten*  $\alpha$  ausgedrückt werden,  $\alpha = 2n_2 \frac{2\pi}{\lambda c_0}$ . D.h. je höher der Imaginärteil für eine Wellenlänge wird, umso stärker absorbiert der Stoff diese Energie. Eine Resonanzfrequenz, für im sichtbaren Wellenlängenbereich transparente Stoffe, liegt i.d.R. im UV-Bereich, sehr wahrscheinlich existieren aber mehrere Resonanzfrequenzen. Bei Dielektrika ist der Imaginärteil dagegen null und es tritt höchstens dielektrische Relaxation ein. Im Falle von Luft als Medium ist diese nicht messbar.

#### Absorption und Reflexion

Der Absorptionskoeffizient ( $\alpha$ , linearer Schwächungskoeffizient) eines teiltransparenten Mediums kann praktisch aus dem gemessenen Anteil der *Reflexion*  $R$  und der *Transmission*  $T$  bestimmt werden. Es gilt als Näherung,  $\alpha = 1/d \cdot (\ln(1 - R) - \ln(T))$ , mit der Schichtdicke  $d$  des Mediums. Tritt im Medium eine *Einphotonenabsorption* auf, wird der Intensitätsabfall  $I/I_e$  im Medium über das *Lambert-Beersche* Gesetz bestimmbar, d.h.  $I_z = I_e e^{-\alpha z}$ . Die *effektive* Eindringtiefe  $\delta$  in das Medium wird durch den Wert des  $I_e/e$ -Abfalls ( $I_e = I_0(1 - R)$ , eintretendes Licht) angegeben und entspricht dem *Kehrwert* des Absorptionskoeffizienten bei der entsprechenden Wellenlänge,  $\delta = 1/\alpha$ . Das Lambert-Beersche Gesetz kann somit direkt aus dem Abklingverhalten der elektromagnetischen Welle im Medium abgeleitet werden:

$$\begin{aligned} E(z, t) &= E_0 e^{i\left((n_1 + in_2) \frac{\omega}{c_0} z - \omega t\right)} \\ &= E_0 e^{-\alpha z} e^{i\left(n_1 \frac{\omega}{c_0} z - \omega t\right)} \end{aligned} \quad (\text{C.29})$$

Die Reflexion von zunächst unpolarisiertem Licht an Grenzflächen zweier dielektrischer Medien<sup>6</sup> mit unterschiedlichem Brechungsindex z.B. Luft ( $n$ ) und Glas ( $n_L$ ) hat bei dem sogenannten *Brewsterwinkel*

<sup>5</sup>Weitere Approximationen sind bekannt, z.B. die *Sellmeier-Gleichung*.

<sup>6</sup>nicht bzw. schwach absorbierender Medien.

$\epsilon_B = \arctan(n_L/n)$ , der aus dem Snelliusschen Brechungsgesetz abgeleitet werden kann, eine polarisierende Wirkung. Man unterscheidet zwei Reflexionsgrade. Zum einen für den Fall der transversalelektrischen Komponente (TE,  $R_{\perp}$ ) des einfallenden Lichtes, die die Amplitude senkrecht zur Einfallsebene linear polarisiert und zum anderen für den Fall der transversalmagnetischen Komponente (TM,  $R_{\parallel}$ ), die die Amplitude parallel zur Einfallsebene linear polarisiert. Der *arithmetische* Mittelwert beider Reflexionsgrade ergibt für unpolarisiertes Licht den *Reflexionsgrad*  $R^7$ . Die Summe aus Reflexionsgrad (R), Transmissionsgrad (T) und Dissipationsgrad (D) ist konstant:

$$1 = R + T + D \quad (\text{C.30})$$

Der Reflexionsgrad entspricht dem Verhältnis der reflektierten zur einfallenden Leistung:

$$R = \frac{P_r}{P_0} \quad (\text{C.31})$$

Ungerichtete (diffuse) Reflexion wird auch als Remission bezeichnet<sup>8</sup>.

### Brennweite

Die Brennweitenänderung  $df$  hängt mit der Änderung des Brechungsindex  $dn$  zusammen, so das gilt [278]:

$$\frac{df}{f} + \frac{dn}{n-1} = 0 \quad (\text{C.32})$$

Die *relative Teildispersion* eines verwendeten Glases für polychromatisches Licht  $\vartheta_e$  berücksichtigt gegenwärtig die Brechungsindizes für die zwei Wellenlängen  $\lambda_{C'} = 643.8 \text{ nm}$  (Cadmium, rot),  $\lambda_{F'} = 480.0 \text{ nm}$  (Cadmium, blau) und die zentrale Bezugswellenlänge  $\lambda_e = 546.1 \text{ nm}$  (Hg, grün):

$$\vartheta_e = \frac{n_{F'} - n_e}{n_{F'} - n_{C'}} \quad (\text{C.33})$$

Eine weitere Definition  $\nu$  wird als *Abbesche Zahl* bezeichnet und entspricht, gemäß den in der obigen Darstellung enthaltenen Wellenlängen, dem Kehrwert der Dispersion eines Glases. Die *relative Dispersion* leitet sich aus (C.33) und der mittleren Bezugswellenlänge ab:

$$\nu = \frac{n_e - 1}{n_{F'} - n_{C'}} \quad (\text{C.34})$$

In der Literatur sind aber auch andere Wellenlängen im blauen bzw. roten Spektralbereich zu finden und auch die Bezugswellenlänge kann in Abhängigkeit der spektralen Empfindlichkeit des Sensors wechseln z.B. zur Wellenlänge der d-Linie  $\lambda = 587.6 \text{ nm}$  (Na, gelb).

### Axialer Farbfehler

Bei *dichromatischen* Linsensystemen wird der *axiale* Farbfehler (chromatische Längsaberration) z.B. für die zwei Wellenlängen F' und C' korrigiert (sekundäres Spektrum). Der Farbblängsfehler einer dünnen Linse entspricht:

$$\Delta f = \frac{f}{\nu} \quad (\text{C.35})$$

<sup>7</sup>Für Kronglas mit  $n \approx 1.55$  und Luft mit  $n \approx 1$  erhält man für  $\epsilon_B \approx 57^\circ$  und  $R \approx \frac{0.17+0}{2} = 8.5\%$ ,  $R_{\perp} = 0.1699$ ,  $R_{\parallel} = 0$ . Das bedeutet für unpolarisierte Strahlung die im Brewsterwinkel auf die Glasfläche trifft, tritt eine Reflexion mit  $8.5\%I_0$  von linear *senkrecht* zur Einfallsebene polarisierter Amplitude ein. Das transmittierte Licht ist linear *parallel* zur Einfallsebene polarisiert.

<sup>8</sup>Zur Bestimmung des Remissionsgrades werden i.d.R. als Referenz matte weiße Flächen von Bariumsulfat oder speziell gefüllte PTFE-Standards sowie Schwarzstandards und ggf. Graustufenstandards verwendet.

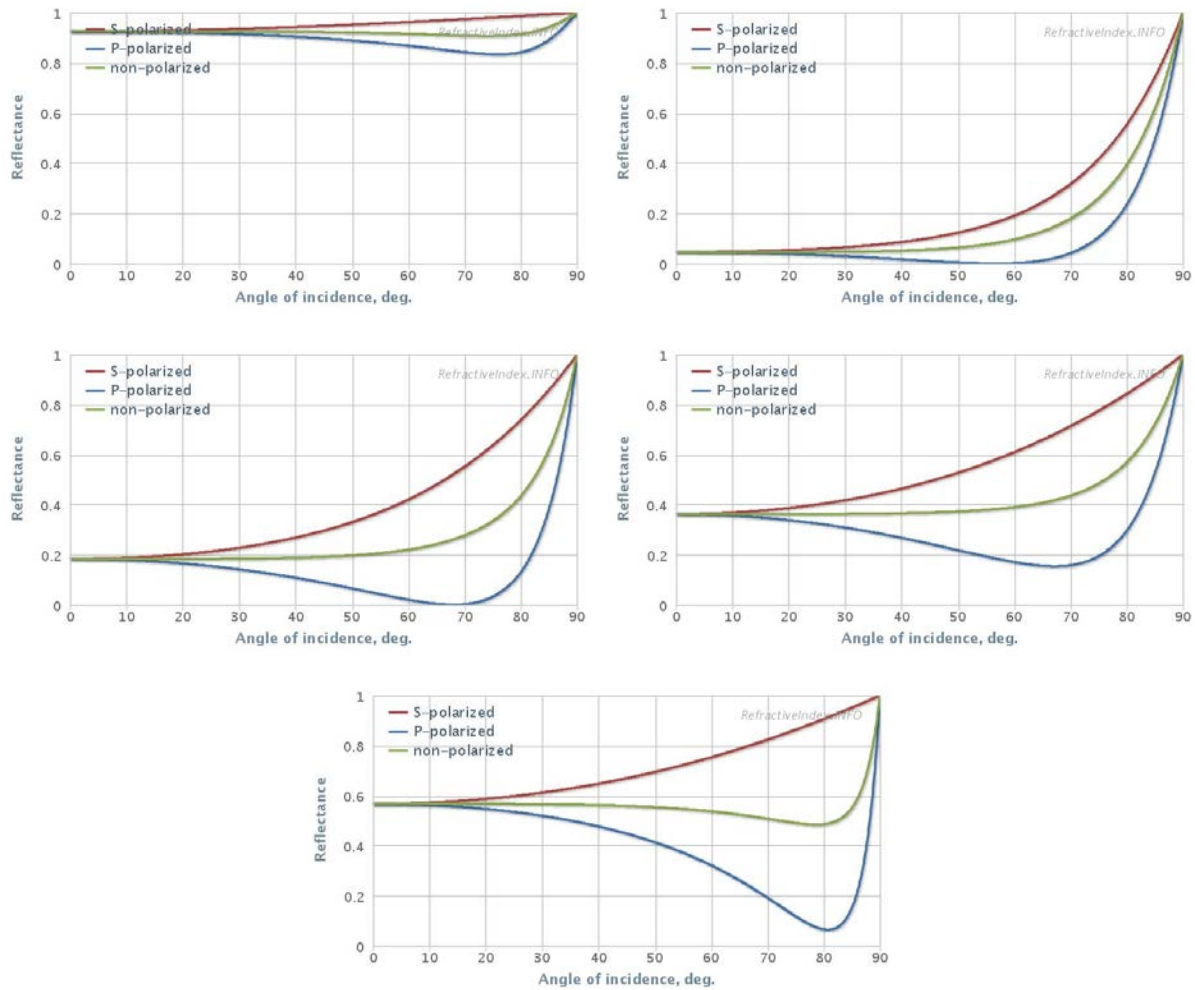


Abbildung C.4: Reflexionsspektren (oben): Aluminiumoberfläche (d = 5mm), BK07-Glas, Diamand, Goldoberfläche (d = 8 μm), kristallines Silizium. Quelle: <http://refractiveindex.info> ; 04.05.2012.

wobei  $f$  die Brennweite bei einer mittleren Wellenlänge des polychromatischen Spektrums ist. Der Farblängsfehler kann direkt aus der *Abbildungsgleichung* einer dünnen Linse und der gefundenen Beziehung der *Linseformel* hergeleitet werden. Alternativ ist auch die Formulierung mit der Bildweite möglich:

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{s} + \frac{1}{s'} = (n - 1) \left( \frac{1}{Kr_1} - \frac{1}{Kr_2} \right) = F [dpt] \tag{C.36}$$

$$\Delta F = \frac{1}{f} - \frac{1}{f + \Delta f} = \frac{\Delta f}{f(f + \Delta f)} \tag{C.37}$$

$$\Delta s' = \frac{\Delta n}{n - 1} f (1 - \beta)^2 \tag{C.38}$$

$F$  entspricht der Brechkraft einer Linse und wird i.d.R. mit der Einheit  $1 \text{ dpt} \equiv 1 \text{ m}^{-1}$  versehen [347]. Der Farblängsfehler einer dünnen Linse (einer Glassorte) ergibt sich damit aus der mittleren Brennweite geteilt durch die Abbesche Zahl bzw. der Brechkraftfehler aus der mittleren Brechkraft geteilt durch die Abbesche Zahl. Die *relative Teildispersion* unterschiedlicher Glasmaterialien wird bei der Kombination mehrerer Linsen nützlich.

### Achromate

Der axiale chromatische Abbildungsfehler einer dünnen (+) Linse kann durch die Kombination mit einer hinsichtlich des Brechungsindex abgestimmten (-) Linse für zwei Wellenlängen (blauer und roter Spektralbereich) z.B.  $\lambda_{F'}$ ,  $\lambda_{C'}$  korrigiert werden. Hierzu betrachtet man zunächst das sekundäre Spektrum, das durch die *relative Teildispersion* in Abhängigkeit der Abbezahl der kombinierten Gläser (1,2) berechnet werden kann:

$$\Delta f = \frac{\vartheta_1 - \vartheta_2}{\nu_1 - \nu_2} = -m f \quad (\text{C.39})$$

Mit *normaldispersiven* Gläsern (Kron- und Flintglas) erhält man nur geringe Abweichungen von einer Ausgleichsgeraden mit der Steigung  $m \approx -5 \cdot 10^{-4}$  bzw. eine Konstante  $\Delta f \approx \frac{f}{2000}$ , wenn man die relative Teildispersion gegen die Abbesche Zahl aufträgt. Eine Korrektur durch zwei *normaldispersive* Glassorten über diesen Restfarbfehler des sekundären Spektrums ist deshalb unmöglich. Linsensysteme, die auf diese Weise korrigiert sind, bezeichnet man als Achromate. Eine entsprechende zweilinsige Kombination die, die blaue und rote Brennweite bis auf  $\frac{f}{2000}$  an die Brennweite der mittleren Wellenlänge annähert, bezeichnet man in diesem Fall als Dichromat (z.B. Korrektur für  $F'$  und  $C' =$  Achromasiebedingung, Abweichung zu  $e$ ). Als klassischer Achromat gilt der *Fraunhofer-Achromat*, der aus einer Kombination einer (+ Linse) aus BK7-Kronglas (Abbezahl  $\approx 63.86$ ) mit einer (- Linse) aus F2-Flintglas (Abbezahl  $\approx 36.09$ ) besteht. Ein auf den grünen Wellenlängenbereich ( $\lambda \approx 550 \text{ nm}$ ) scharf fokussiertes farbiges Objekt hat demnach einen maximalen axialen Farbfehler hinsichtlich roter und blauer Spektralanteile von in etwa  $f/2000$  und ist im Falle eines menschlichen Betrachters, aufgrund der geringeren Empfindlichkeit für Licht entsprechender Wellenlängen vernachlässigbar. Generell gilt, daß der Korrekturscheitel der Fehlerkurve (sekundäres Spektrum) im Bereich der größten spektralen Empfindlichkeit des Sensors liegen sollte. Die zu erfüllende *Achromasiebedingung* für zwei kombinierte Linsen entspricht:

$$\frac{F_1}{\nu_1} + \frac{F_2}{\nu_2} = 0 \quad (\text{C.40})$$

bzw. alternativ formuliert:

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{f_2}{f_1} = -\frac{\nu_1}{\nu_2} \quad (\text{C.41})$$

Eine weitergehende Korrektur des sekundären Spektrums, kann nur durch die Kombination eines normal- mit einem *anormaldispersiven* Glas erreicht werden. Eine solche Korrektur des sekundären Spektrums gelingt z.B. mit der Kombination einer Kronglaslinse mit einer Linse aus sogenanntem *Kurzflintglas* (KzF,  $Sb_2O_3 \leq 20\%$ ). Solche Linsensysteme werden als *Halbapochromate* bezeichnet, da sie gegenüber dem Fraunhofer-Achromaten bereits eine deutliche Reduzierung des sekundären Spektrums erreichen. Apochromate können aus zwei Linsen, aber auch aus drei Linsen bestehen. Mit zwei Linsen kann gegenüber einem Halbapochromat bereits eine noch stärkere Verminderung des sekundären Spektrums erreicht werden<sup>9</sup>. Kombinationen mit drei aufeinander abgestimmten Linsen ermöglichen die Korrektur der chromatischen Farbfehler für alle drei Wellenlängen z.B.  $\lambda_F$ ,  $\lambda_C$ ,  $\lambda_e$ . Hierzu muss die Achromasiebedingung (C.40) erweitert werden (*Trichromasiebedingung*):

$$\frac{F_1}{\nu_1} + \frac{F_2}{\nu_2} + F_3\nu_3 = 0 \quad (\text{C.42})$$

und zusätzlich muss:

$$\frac{F_1\vartheta_1}{\nu_1} + \frac{F_2\vartheta_2}{\nu_2} + \frac{F_3\vartheta_3}{\nu_3} = 0 \quad (\text{C.43})$$

<sup>9</sup>Kombinationen aus Fluorkronglas (ED-Glas, *extra low dispersion*) mit normaldispersivem Kronglas oder Lanthankronglas mit einem Flintglas mit hohem Flusspat-Anteil ( $CaF_2$ ).

erfüllt sein. Geschliffene optische Linsenoberflächen sind sehr empfindlich, weshalb auch bei chromatisch korrigierten Systemen Aberrationen aufgrund von Oberflächenveränderungen eintreten können z.B. durch das Schleifmittel. Durch numerische Näherungsrechnungen<sup>10</sup> wird es möglich in Kombination mit weiteren optischen Elementen, erkennbar auftretende Linsenfehler bzw. Positionsabweichungen bis zu einem gewissen Grad zu korrigieren. Die Differenz einer Abbildung mit korrigierten realen optischen Systemen (ohne Abbildungsfehler) zu idealen optischen Systemen gleicher Dimensionierung (ohne Abbildungsfehler), wird über den sogenannten Strehl-Wert charakterisiert.

### Kleinwinkelnäherung

Betrachtet man Strahlen die in großem Abstand von der optischen Achse oder unter einem relativ großen Winkel (Feld- oder Aperturwinkel) auf die Linsenoberfläche treffen, dann kann die Kleinwinkelnäherung nicht mehr verwendet werden. Zu einer ggf. numerischen Beschreibung der Abbildungseigenschaften und möglicher Aberrationen wird es zudem notwendig sein, den Sinus des Winkels über eine Reihenentwicklung zu approximieren. Der Winkel liegt dann, wie zuvor im Bogenmaß vor ( $x \in \mathbb{R}$ ):

$$\begin{aligned}\sin(x) &\approx \sum_{k=0}^{\infty} (-1)^k \frac{x^{2k+1}}{(2k+1)!} \\ \sin(\sigma) &\approx \sigma - \frac{\sigma^3}{3!} + \frac{\sigma^5}{5!} - \frac{\sigma^7}{7!} \pm \dots\end{aligned}\tag{C.44}$$

Die Näherung ist dabei nach der Fehlertheorie 3. Ordnung ausreichend, wenn die Reihe nach dem zweiten Glied abgebrochen wird.

### Abbildungsfehler

Man erhält dadurch die Möglichkeit die fünf monochromatischen Abbildungsfehler 3. Ordnung (primäre Seidel-Aberrationen) über wiederum eine Reihenentwicklung mit Polynomen zu berücksichtigen. Eine Korrektur schliesst auch die Fehler 1. Ordnung der Kleinwinkelnäherung für den linearen Fall, d.h. dem Abbruch nach dem ersten Glied ein [278]. Die möglichen Abbildungsfehler werden allgemein bezeichnet als

1. *Sphärische* Aberration (Öffnungsfehler) =  $S$
2. *Koma* (Asymmetriefehler) =  $K$
3. *Astigmatismus* (Schärfefehler, Zweischalenfehler) =  $A$
4. *Petzval-Bildfeldwölbung* (Defokus) =  $P$
5. *Verzeichnung* (tonnen-, kissenförmig) =  $V$

Die *sphärische* Aberration stellt den unkorrigierten Einfluss des unterschiedlichen Eintrittswinkels achsparalleler Strahlen zur Grenzflächennormalen der Krümmungsfläche einer Linse dar. Die *Koma* erfolgt, wenn von achsfernen Punkten Strahlen durch unterschiedliche Bereiche der Krümmungsfläche asymmetrisch auf der Bildseite zusammengeführt werden (Sinusfehler). *Astigmatismus* (Punktlosigkeit) tritt auf, wenn die Fokussierung nur für eine Richtung der Ebene erfüllt wird, für die andere Richtung aber eine Defokussierung stattfindet. Die *Bildfeldwölbung* tritt ein, wenn eine im Unendlichen liegende ebene Fläche durch sphärische Brechungsflächen in der gaußschen Abbildungsebene nicht als Ebene, sondern als

<sup>10</sup>Unter sehr speziellen Bedingungen können auch *rigorose* Methoden verwendet werden.

*Petzval-Schale* mit Krümmungsradius  $r_p$  dargestellt wird. Dabei werden i.d.R. äußere Punkte in Defokusebenen (zur Linse hin) liegen, wenn auf die Bildmitte fokussiert wird. Bei der *Verzeichnung* entsteht der Eindruck einer entweder tonnenförmigen Verzerrung über die Bildrandbereiche nach aussen (mit konvexen Linsen) bzw. einer kissenförmigen Verzerrung der Bildrandbereiche zur Bildmitte hin (mit konkaven Linsen). Die Ursache ist der nicht konstante Abbildungsmaßstab paralleler Strahlen, die über die gesamte Linsenoberfläche eintreten. Dieser nimmt i.d.R. zum Linsenrand hin, d.h. für achsferne Strahlen deutlich ab [278].

Die aufgeführten *primären* Abbildungsfehler können dann in Form einer Transversalabweichung  $\Delta h$ , als

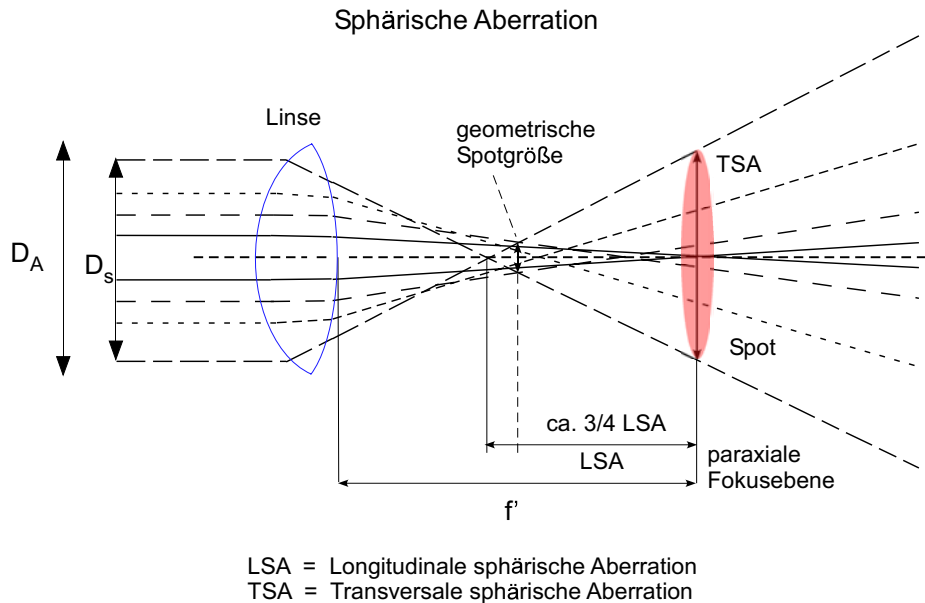


Abbildung C.5: Sphärische Längs- und Queraberration am Beispiel positiver Linsen. Strahldurchmesser auf der Linsenfläche  $D_s$ , Durchmesser der Apertur  $D_a$ . Die kleinste geometrische Spotgröße liegt in etwa bei  $3/4$  der longitudinalen sphärischen Aberration, gemessen vom Brennpunkt der Linse.

Summe unterschiedlicher Terme mit dem Pupillenradius und der Bildgröße  $(r, h)$  aus einem Polynom erhalten werden. Bezeichnet man die Bildgröße als Abstand zur optischen Achse mit  $h$  und den Radius der Pupille mit  $r$ , erhält man ein Polynom der Gestalt:

$$\Delta h = r^3 S + r^2 h K + r h^2 A + r h^2 P + h^3 V \tag{C.45}$$

aus dem die jeweilige (exponentielle) Abhängigkeit der primären Aberrationen erkennbar wird [278].

### Zernike-Polynome

Eine Möglichkeit die Fehler höherer Ordnung in Abhängigkeit der angenommenen Wellenfrontdeformationen und/oder Winkelabweichungen in der Abbildungsebene eines optischen Systems darzustellen, bieten die *Zernike-Polynome*  $Z_n^{\pm m}(r, \phi) = R_n^m(r) G^m(\phi)$  mit  $m, n \in \mathbb{N}, n \geq m$ . Diese setzen sich aus den Radialpolynomen  $R_n^m(r)$  mit dem auf 1 normierten Radius und einem winkelabhängigen (Azimuth, Bildebene) Faktor für *gerade* Polynome ( $Z_n^m(r, \phi)$ ),  $G^m(\phi) = \cos(m\phi)$  und für *ungerade*<sup>11</sup> ( $Z_n^{-m}(r, \phi)$ ),  $G^m(\phi) = \sin(m\phi)$  zusammen [278] [348]. Auch die Seidel/Petzval-Aberrationen (Primärfehler) können

<sup>11</sup>Eine gerade Funktion liegt allgemein vor, dann wenn  $f(x) = f(-x)$  gilt. Eine ungerade Funktion dann, wenn  $f(-x) = -f(x)$ , für alle Werte des Definitionsbereiches der Funktion zutreffend ist.



mi den Zernike Polynomen dargestellt werden. Auf die Berechnungsvorschrift wird hier nicht weiter eingegangen. Die Radialpolynome lassen sich auch über die Besselfunktionen erster Gattung definieren. Die Besselfunktionen erster Gattung erhält man als Lösung der zweidimensionalen Fouriertransformation der Pupillenfunktion kreisrunder Aperturen. Sie sind damit ein wesentliches Element der sogenannten *Fourieroptik*.

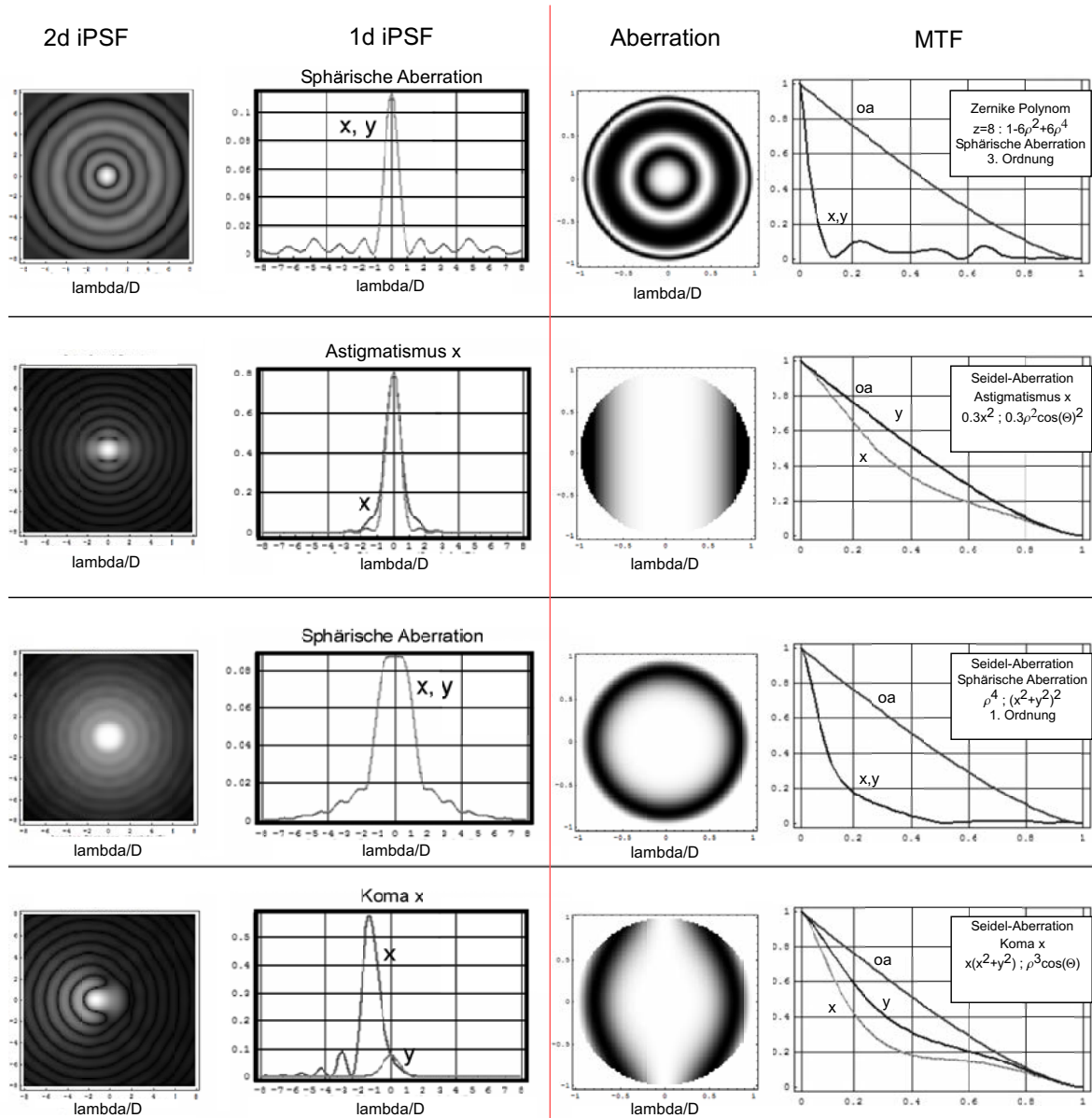


Abbildung C.6: Links: Darstellung einiger iPSF bei unterschiedlichen Aberrationen der Pupillen-/Transmissionsfunktion. Rechts: Zweidimensionale Darstellung der Aberrationen und Plot der MTFs gemäß der Zernike Polynome. Dargestellt nach Berechnungen (*webMathematica*) der Website von James C. Wyant, College of Optical Sciences University of Arizona (<http://wyant.optics.arizona.edu/math.htm>).

## C.2 Intensität und Wellenausbreitung

Bei elektromagnetischen Wellen handelt es sich um Transversalwellen. Die Lichtstrahlung breitet sich dabei orthogonal zur Wellenfläche aus, hier als z-Richtung bezeichnet. Die elektrischen Feldvektoren ( $E_x$ ,



$E_y$ ) schwingen in der transversalen Ebene und in isotropen homogenen Medien hängt die elektrische Induktion mit der elektrischen Feldstärke und der Dielektrizitätskonstante zusammen [349]:

$$D = \varepsilon E \quad (\text{C.46})$$

Die magnetische Induktion  $B$  ist in nicht magnetisierbaren Medien um einige Größenordnungen geringer, als die elektrische Feldstärke und kann durch die magnetische Feldstärke  $H$  repräsentiert werden. Die Feldgleichungen (erste Ableitung gegen die Zeit) ergeben sich sodann zu:

$$\dot{D} = c \operatorname{rot} H \quad (\text{C.47})$$

$$\dot{H} = -c \operatorname{rot} E \quad (\text{C.48})$$

mit dem Zusatz:  $\operatorname{div} D = 0$ ,  $\operatorname{div} H = 0$ . Für jede Komponente der Ebene gilt dann die Differentialgleichung:

$$\frac{\partial^2 E_x}{\partial z^2} = \frac{\varepsilon}{c^2} \frac{\partial^2 E_x}{\partial t^2} \quad (\text{C.49})$$

Eine Lösung dieser Gleichung stellt die *Wellenfunktion* für *harmonische Wellen* dar. Diese kann als Sinusfunktion aufgestellt werden:

$$E(x, t) = E_{x0} \sin(kz - \omega t) \quad (\text{C.50})$$

mit der Kreisfrequenz  $\omega = \frac{2\pi}{T}$ ,  $T =$  Periodendauer. Kohärente Strahlung zeigt dabei das Phänomen der *Interferenz der Amplituden* mehrerer Wellen (Superposition). Bei inkohärenter Strahlung stehen die Phasen der Teilwellen weder räumlich noch zeitlich in einer *konstanten* Beziehung, d.h. Interferenz im Sinne kohärenter Strahlung bleibt aus und man betrachtet stattdessen eine *mittlere* Amplitude. Man erhält dadurch eine lineare Beziehung der Intensitäten. Eine vollständige Behandlung findet sich z.B. in den Originalarbeiten von RICHARDS und WOLF [350] [351] oder in Lehrbüchern [278] [349].

Für ebene harmonische Wellen die sich in  $z$ -Richtung ausbreiten formuliert man eher in komplexer Schreibweise, da trigonometrische Ausdrücke weniger gut handhabbar sind:

$$E(x, t) = E_{x0} e^{i(kz - \omega t)} = E_{x0} e^{ikz} e^{i\omega t} = E_{x0} e^{i\varphi} \quad (\text{C.51})$$

$E_{x0}$  entspricht der *Amplitude* und repräsentiert die sich im Medium fortpflanzende *maximale Störung*. Die Phase der Welle entspricht hier  $\varphi$ . In *isotropen* Medien gilt für alle Raumrichtungen eine einheitliche *Phasengeschwindigkeit*  $v = \omega/k = \frac{dr}{dt} = c$ , im Vakuum  $c_0$ . Der Betrag des Wellenvektors  $k$  entspricht  $k = 2\pi/\lambda$ . Es gilt die Beziehung der *Euler-Formel*:

$$\cos(x) + i \sin(x) = e^{ix} \quad (\text{C.52})$$

Bei der Betrachtung von Überlagerungen der Wellen im Raum ist eine Berücksichtigung der Ausbreitungsrichtung, der Polarisierung (Schwingungsrichtung) und der Wellenlänge notwendig [165] [341]. Allgemein gilt das Superpositionsprinzip bei der Betrachtung des elektrischen Feldes (in Zylindersymmetrie):

$$E(r, t) = \sum_m E_m(r, t) e^{i\varphi_m} \quad (\text{C.53})$$

Während der maximalen Kohärenzzeit  $\Delta t_c$  besitzen die interferenzfähigen Wellen eine maximale Phasendifferenz von  $2\pi$ ,  $\Delta\varphi_i = (2\pi/\lambda_i)\Delta l$ . Der zeitliche Mittelwert der Superpositionen beträgt dann:

$$\langle E(r, t) \rangle = \frac{1}{\Delta t_c} \int_0^{\Delta t_c} \sum_m E_m(r, t) e^{i\varphi_m} dt \equiv 0 \quad (\text{C.54})$$

mit  $E_m$  der komplexen Feldamplitude. Räumliche Kohärenz tritt auf, wenn die räumliche Differenz der Phase, innerhalb der Beobachtungszeit kleiner als  $2\pi$  ist,  $\Delta r\varphi_i = \varphi_i(r_1) - \varphi_i(r_2)$ . Die Kohärenzlänge entspricht der Strecke, die das Licht innerhalb der Kohärenzzeit zurücklegt. Als Kohärenzfläche wird die Fläche senkrecht zur Ausbreitungsrichtung bezeichnet, für die gilt,  $\Delta r\varphi = 0$ . Das Produkt aus Kohärenzlänge und Kohärenzfläche wird als Kohärenzvolumen bezeichnet. Interferenzstrukturen treten nur innerhalb des Kohärenzvolumens auf [352]. Breitet sich eine *ebene* Welle in einer beliebigen Raumrichtung aus, kann mit dem Wellenvektor  $k = (k_x, k_y, k_z)$  eine vektorielle Darstellung stattfinden. Der Wellenvektor ist der Normalenvektor ( $\perp$ ) auf den *Phasenebenen*. Die Phasenebenen werden als Wellenfront bezeichnet. Betrachtet man eine Ausbreitung nur in z-Richtung, gilt dann mit dem *Ortsvektor* des Koordinatenursprungs  $r$ ,  $k = (0, 0, k_z)$  und  $k \cdot r = k_x x + k_y y + k_z z = k z$ . Liegt linear polarisiertes Licht vor oder wird die Polarisation vernachlässigt, kann die skalare Approximation angewandt werden.

Die Überlagerung zweier Teilwellen mit gleicher Frequenz (monochromatisch) aber (konstant) unterschiedlicher Ausbreitungsrichtung führt zu einer resultierenden Welle der Form [165]:

$$E = 2 E_0 \cos\left(\frac{(k_2 - k_1)r}{2}\right) e^{i\left(\frac{(k_1 + k_2)r}{2} - \omega t\right)} \quad (\text{C.55})$$

Besteht hingegen eine *zeitliche Phasendifferenz*  $\Delta\varphi$  zwischen Teilwellen identischer Ausbreitungsrichtung, erhält man ein abweichendes Ergebnis für die Superpositionswelle. Mit Werten für die Phasendifferenz  $\Delta\varphi = 2\pi m$ , wobei  $m=1,2,3,\dots$ , verdoppelt sich die Amplitude (maximale Interferenz). Auslöschung erfolgt dagegen bei  $\Delta\varphi = \pi m$ :

$$E = 2 E_0 \cos\left(\frac{\Delta\varphi}{2}\right) e^{i(kr - \omega t + \frac{\Delta\varphi}{2})} \quad (\text{C.56})$$

Für den Fall gegenläufiger Ausbreitungsrichtungen  $k_1 = -k_2$  können unter bestimmten Bedingungen stehende Wellen erhalten werden. Dies ist z.B. bei der Reflexion an optisch dichteren Medien wie Spiegeln möglich, wobei zusätzlich ein *Phasensprung* bei der reflektierten Welle von  $\lambda/2$  eintritt. Einer sich im Medium ausbreitenden Störung mit konstantem  $E_0, \omega$  und  $k$  (homogene Wellen) sind einheitliche *ebene* Wellenfronten zuordbar. Im Falle von Punktquellen (Kugelwellen) sind die Wellenfronten in einem Raumwinkelement Kugelmantelflächen. Unterscheiden sich die Frequenzen einzelner Teilwellen nur geringfügig, erhält man bei der Überlagerung sogenannte *Schwebungen*. Diese sind bandbegrenzt, d.h. die Breite der vorhandenen Frequenzschar definiert die Amplituden- und Zeitmodulation der erhaltenen Überlagerung(en). Es entstehen einerseits *räumliche* Amplitudenmodulationen (langsame Oszillation mit der Modulationsfrequenz  $\omega_m \equiv 1/2(\omega_1 - \omega_2)$ ) sowie *zeitliche* Interferenzbilder der Wellen gleicher Amplitude. Die Bestrahlungstärke bzw. die Intensität oszilliert dann mit der *Schwebungsfrequenz*. Die Schwebungsfrequenz entspricht in diesem Fall der Differenz der beiden Teilfrequenzen bzw. dem Betrag der doppelten *Modulationsfrequenz* [341].

Betrachtet man ein kontinuierliches Frequenzspektrum eines Temperaturstrahlers (natürlicher Strahler), so ist eine explizite Angabe i.d.R. nur in Bereichen geringer Bandbreiten (der Wellenlänge) und innerhalb einer *Kohärenzlänge* ( $\Delta l_c = v\Delta t_c$ ,  $\Delta t_c = \frac{1}{\Delta\nu}$ ) sinnvoll [353]. Der Kohärenzgrad kann dabei während der Strahlungsausbreitung z.B. durch transformierende Elemente verändert werden. Die Emission einzelner bandbegrenzter Wellenzüge (atomare Ereignisse) eines Temperaturstrahlers ist dabei immer zeitlich begrenzt (endlich) und bei Betrachtungsintervallen die größer als die Phase eines solchen Wellenzugs sind (i.e.R. ca. 10 ns) inkohärent. In [353] wird eine Definition für das Verhalten (zeitlich) inkohärenter, ausgedehnter Temperaturstrahler angegeben, die eine Einteilung in *vollständig inkohärente*, *kohärente* oder *teilkohärente* Strahlung am Ort der Bildentstehung erlaubt. Theoretisch besteht die Möglichkeit jede be-

liebige Kombination harmonischer Wellen durch eine *Fourier-Analyse* zu erhalten. Auch anharmonische Wellen können auf diese Art nachvollzogen werden [165] [278] [341].

### Praktische Berechnungsgrundlagen

Bei vollständig inkohärenter Strahlung stehen die Phasen der Amplituden einzelner Wellen während des Betrachtungszeitraumes in keiner geordneten Beziehung zueinander. Interferenz im Sinne mehrerer kohärenter Wellen ist nicht möglich und man erhält im Durchschnitt eine *mittlere* Amplitude. Da sich die Kombinationen aller Teilwellen mit jeder möglichen Phase *gleichwahrscheinlich* gestalten, muss über die Phase gemittelt werden. Die gemeinsame Amplitude inkohärenter Wellen, am Beispiel zweier Teilwellen, addiert man gemäß  $A = \sqrt{A_1^2 + A_2^2}$ , für die Energie der Welle gilt  $W = W_1 + W_2$  [165].

Die Lichtintensitäten zweier vollständig inkohärenter Teilwellen (1,2) können demnach einfach addiert werden  $I_{(1,2)} = I_1 + I_2$ . Die Intensitäten sind linear. Die Intensität an der betrachteten Stelle ist die Summe der Amplitudenbetragsquadrate der Teilwellen. Die Wellen kohärenter Strahlung stehen, je nach Phase, in einem definierten Verhältnis und ihre Amplituden an einem Ort im Raum können sich *resonant* überlagern (Superposition). Die Änderung der Phase kohärenter Wellen verursacht i.d.R. eine Umverteilung der resultierenden *Flussdichte*. Diese kann an bestimmten Stellen größer oder kleiner als die Summe der Einzelflussdichten der überlagernden Wellen sein. Ohne explizit auf die Phase und die Koordinaten im Raum einzugehen, errechnet sich eine Punktintensität dann nach der Vorschrift:

$$I_{(1,2)} = |A_1 + A_2|^2 \quad (\text{C.57})$$

Die komplexen Amplituden sind linear. Der Fall vollständig inkohärenter Strahlung wird damit ein *statistischer* Sonderfall der Verhältnisse mit kohärenter Strahlung. In allgemeiner Form kann eine *Flussdichte* als *Poynting-Vektor*, der in Ausbreitungsrichtung der Strahlung zeigt, formuliert werden:

$$S = \frac{E \times B}{\mu_0} \quad (\text{C.58})$$

oder auch speziell für *ebene* Wellen und Ausbreitung im Vakuum:

$$S = c^2 \varepsilon_0 E_0 \times B_0 \cos^2(kr - \omega t) \quad (\text{C.59})$$

Die gemessene Lichtintensität einer Welle ist der *mittlere Betrag* des Poynting-Vektors:

$$I = \langle W \rangle c = \frac{1}{2} \frac{E_0 B_0}{\mu_0} = \frac{1}{2} \frac{E_0^2}{\mu_0 c} = \langle |S| \rangle \quad (\text{C.60})$$

Mit  $\langle W \rangle$  der *mittleren Energie* der Welle,  $E_0, B_0$  der elektrischen Feldamplitude und der magnetischen Induktion,  $\mu_0$  der magnetischen Feldkonstante und  $c$  der Lichtgeschwindigkeit für Vakuumbedingungen. Eine wichtige Beziehung z.B. für den zeitlichen Mittelwert einer harmonischen Wellenfunktion in den Grenzen einer Periode  $T$  ist:

$$\langle e^{i\omega t} \rangle_T = \left( \frac{\sin(\omega T/2)}{\omega T/2} \right) e^{i\omega t} \quad (\text{C.61})$$

Der Ausdruck  $\sin(x)/x$  hat dabei in der Optik (Fourieroptik) allgemeine Bedeutung. Er trägt eine eigene Bezeichnung,  $\sin(x)/x = \text{sinc}(x)$ , und kommt auch im Zusammenhang der Beugungserscheinungen vor. Für den über die Periodendauer gemittelten Realteil gilt:

$$\langle \cos(\omega t) \rangle_T = \text{sinc}(x) \cos(\omega t) \quad (\text{C.62})$$

Von elektromagnetischer Strahlung geht ein *Impuls* aus, dieser entspricht  $p = 1/cW$ . Der Impuls pro Zeit-

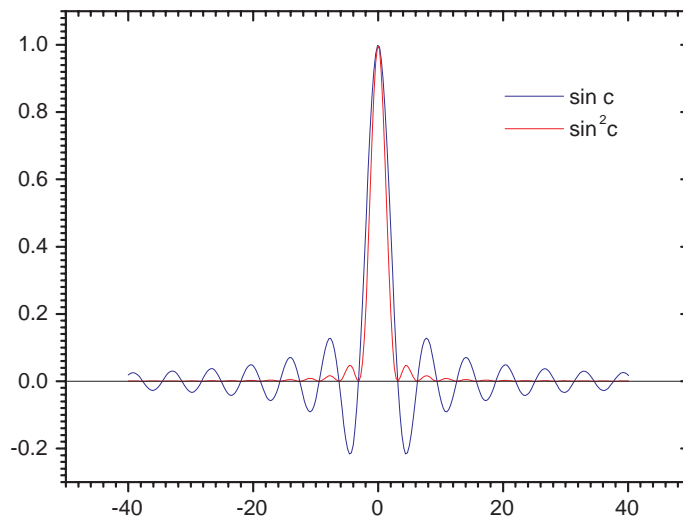


Abbildung C.7: Die eindimensionale SinC-Funktion, mit der Substitution  $p = \sin c$ . Sie ist u.a. bei der Betrachtung „rechteckiger“ Modulationen bedeutsam. So z.B. auch bei der diskreten Form der Fourier Transformation (Fast Fourier Transformation, FFT) in Pixelbildern oder der Digitalisierung mit Rechteckfunktionen (Fensterfunktion). Die FT der Rechteckfunktion (*boxcar function*) entspricht der SinC-Funktion.

einheit ist dabei eine *Kraft*. Ebenso kann ein *Strahlungsdruck* angegeben werden mit  $P_s = I/c$ . Vollständig absorbierende ausgedehnte Oberflächen erhalten einen *Impulsübertrag*. Der dabei entstehende Druck entspricht dem Strahlungsdruck. Werden Wellen (vollständig) reflektiert, entsteht auf der Oberfläche ein dem doppelten Energiebetrag entsprechender Impulsübertrag, der Druck entspricht dem doppelten Strahlungsdruck. Ein intakter absorbierender/reflektierender Gegenstand erhält so einen Rückstoß. Ähnliches gilt für frei bewegliche Partikel, die z.B. von Laserstrahlung erfasst werden. In Abhängigkeit der Partikelgröße und ihrer optischen Eigenschaften sowie der Wellenlänge hat i.d.R. hier die Streuung der Strahlung (im engeren Sinne) aber einen größeren Einfluss. Ein Überblick hierzu findet sich z.B. in [354] [355].

In der praktischen (mikroskopischen) Handhabung mit Temperaturstrahlern und *biologischen* Präparaten kommt oft *teilweise kohärente* Strahlung vor. Vollständig inkohärente Strahlung liegt in der Regel nur bei Fluoreszenzanwendungen vor.

### C.2.1 Beugung

Die Abbildung *paralleler* Strahlen, durch eine (Sammel)Linse, erfolgt nach den Gesetzen der *geometrischen* Optik in einem Punkt hinter der Linse. Dieser Bildpunkt stellt strukturell aber keine homogene Intensitätsverteilung dar. Bei der Abbildung eines Gegenstandes aus großer Entfernung zur Linse, liegt das Bild in der rückwertigen Brennpunktebene. Die Abbildung von Gegenständen in geringem Abstand zum Brennpunkt ist bei korrigierten optischen Systemen eine Abbildung in der zur Objektebene konjugierten Ebene und die beteiligten PSFs der einzelnen Bildpunkte sind dabei ortsunabhängig. Neben der Lichtbrechung, Reflexion und Dispersion erhält praktisch die Beugung (*diffraction*) eine entscheidende Bedeutung. Wie die Brechung, die Reflexion und die Dispersion, welche prinzipiell als Sonderfälle der Streuung (*scattering*) aufgefasst werden können, ist auch die Beugung theoretisch als ein Spezialfall

der Streuung anzusehen. Bei diesem Phänomen werden durch Superposition der Wellen Modulationen erzeugt, die die Intensitätsverteilung beeinflussen und auch zur Lichtausbreitung in den geometrischen Schattenraum führen. Die räumliche Auflösung von Objekten ist nach der Transformation durch ein optisches System in der Bildpunktebene damit zusätzlich durch eintretende *Beugungserscheinungen* am Hindernis (Blende, Linsenfassung) beeinflusst. Diese führen zu einer „Verwaschung“ der Intensitätsverteilung auf der Abbildungsseite. Zur numerischen Handhabung erfolgt eine Beschreibung meist im Fourierraum. Die eintretende Beugung sortiert (gewissermaßen) die parallel verlaufenden Strahlbündel der (paarweisen) Beugungsordnungen und bildet damit periodische Strukturen ab. Die (einzelne) 0. Ordnung trägt dabei keinerlei (geometrische) Strukturinformation. Die erhaltene Intensitäts- bzw. Amplitudenverteilung lässt sich quantitativ mit der Wellennatur des Lichtes erklären und kann als solche im reziproken Raum betrachtet werden (Ortsraum). Ihr physikalischer Ursprung sind allesamt *Interferenzerscheinungen*. Im Zusammenhang mit realen mikroskopischen Objekten ist eine exakte Beschreibung der Beugung oft kompliziert bzw. analytisch nicht immer möglich. Beugung entsteht dabei bereits bei der Lichtaussendung selbstleuchtender Objekte bzw. auch bei der Transmission/Reflexion an beleuchteten Objekten (*Kirchhoffsche Beugungstheorie*, Sommerfeld).

Das Prinzip von Huygens-Fresnel geht von der freien Ausbreitung elektromagnetischer Wellen im Raum aus. Es werden dabei unendlich ausgedehnte Wellenfronten angenommen. Jeder Punkt auf einer Wellenfront soll dabei als potenzielles Zentrum einer sekundären *sphärischen* Welle angesehen werden. *Punktlichtquellen* zeigen in ausreichend großer Entfernung zur Quelle physikalisch hinreichend ebene Wellenfronten. Die Amplituden der Lichtwellen sind im Medium fortschreitende Störungen, die auf Hindernisse stoßen können. Das absolute Bezugsmedium ist das Vakuum. Trifft eine Wellenfront auf eine kreisrunde Blende, so treten i.d.R. ortsabhängige Veränderungen in Phase und Amplitude ein. Die Wellenfront(fläche) wird dabei verändert. Alle Punkte, die Zentren für sekundäre sphärische Wellen und damit von Beugungserscheinungen im Fernfeld sein können, lassen sich in der Blendenebene, als sogenannte *Fresnel-Zonen* darstellen. Die Anzahl der Zonen  $N_F$  kann anhand von theoretischen Überlegungen zu  $N_F = \frac{a^2}{\lambda f}$  bestimmt werden, mit dem Aperturradius  $a$  und der Brennweite  $f$  [278]. Linsen stellen ebenfalls Blenden dar, ihre charakteristische Größe ist die *numerischen Apertur*. Es muss bei positiven Linsen zusätzlich die vergrößernde Wirkung auf die Abbildung berücksichtigt werden. Im Falle einer einzelnen dünnen (+) Linse kann man formal annehmen, daß ihre Ein- und Austrittsapertur einander entsprechen. In mikroskopischen Systemen sind i.d.R. mehrere Blenden zu berücksichtigen. Die erste Annahme ist, daß der Blendendurchmesser klein gegenüber dem Abstand der Blende zur Punktlichtquelle ist. Ist die betrachtete Wellenlänge gegenüber dem Blendendurchmesser relativ groß und erfolgt eine *Projektion* in ausreichender Entfernung zur Blendenebene, handelt es sich um Fernfeldabbildungen. Für diese gilt eine Fresnelzonenzahl  $N_F \ll 1$  und man bezeichnet die Beugung als *Fraunhofer-Beugungserscheinungen*. Unter *Nahfeldbedingungen* gilt dagegen  $N_F \geq 1$ . Eine Projektion dieses Phänomens hat i.d.R. einen sehr geringen Abstand zur Linse/Apertur und/oder die Wellenlänge ist relativ klein gegenüber der Blendengröße. Man spricht dann von *Fresnel-Beugungserscheinungen*. Diese sind im Zusammenhang mit fokussierten Abbildungen aber zu vernachlässigen, da in diesem Fall immer Fernfeldbedingungen vorliegen. Der mathematisch sehr viel kompliziertere Fall der Fresnelbeugung tritt in Bereichen auf, die für Abbildungen nicht (direkt) genutzt werden können. Beide Erscheinungen stellen Grenzfälle des Kirchhoffschen Beugungsintegrals dar. Neben diesen klar abgrenzbaren Bereichen stellt sich zudem ein Zwischen- oder Übergangsbereich ein auf den nicht weiter eingegangen wird.

### C.2.2 Fourieroptik

Im Modell der Fourier-Optik werden (unendlich) ebene Wellen verwendet. Ein mit diesen Wellen beleuchteter oder selbstleuchtender Gegenstand beugt das Licht und verändert dabei die Wellenfront. Trifft dieses bereits gebeugte Licht dann im weiteren Verlauf auf eine dünne Sammellinse bzw. eine Apertur eines optischen Systems, wird es auch an dieser gebeugt. Die Annahme der unendlich ebenen Flächen ist mathematisch notwendig aber physikalisch exakt natürlich nicht zu erfüllen. Man betrachtet in der Summe immer mehrere Beugungserscheinungen. Die Helligkeitsverteilung in der Abbildungsebene kann über die Blendenöffnungsfunktion und die Helligkeitsverteilung in der Blendenebene berechnet werden. Die Darstellung der Intensität eines Bildpunktes in der Abbildungsebene entspricht insgesamt einer inversen Fouriertransformation (IFT). Die Situation kann im Modell der geometrischen Optik nur angedeutet werden, am geeignetsten mit zwei hintereinander aufgestellten (+) Linsen. Eine physikalisch korrekte Erklärung bzw. Beschreibung ist mit den Operationen der geometrischen Optik im Ortsraum dagegen nicht möglich. Aus einer theoretisch ideal schmalen, zweidimensionalen Punktintensitätsverteilung in der Objektebene (die praktisch auch nicht vorkommt) entsteht ein beobachtbares Interferenzmuster in der Projektionsebene (Ortsraum). Die erhaltenen Fraunhofer-Beugungsmuster sind dabei geordnet und ändern sich mit fortschreitendem Projektionsabstand in ihrer Lagebeziehung, zueinander, nicht. Die Größe der Abbildung auf einer Projektionsebene wächst dagegen mit zunehmendem Abstand zur Blende bzw. Linse. Das Bild wird dadurch insgesamt lichtschwächer und primäre (monochromatische) Abbildungsfehler werden verstärkt. Die Symmetrie von Aperturgeometrien ist im Falle von Linsen meist kreisförmig bzw. rund. *Elliptische* Blendenformen führen zu gestauchten Beugungserscheinungen in der Richtung der längeren Halbachse. Die *Größe* der Beugungsstruktur bzw. die des ungebeugten Intensitätsmaximum (*Airy-Scheibchen*) ist allgemein *invers* zur verwendeten *Blendengröße* [278].

### C.2.3 Stigmatische Infokuspunktabbildung

Abschliessend soll beispielhaft die Berechnung einer Fraunhofer-Beugungsstruktur in der Projektionsebene betrachtet werden, die bei der homogenen Beleuchtung einer kreisrunden Apertur entsteht. Der Faltung der Funktionen im Ortsraum kann eine Multiplikation der Fouriertransformierten im Fourierraum gegenübergestellt werden. Die Betrachtungen im Fourierraum identifizieren dabei symmetrische Strukturen. Als Apertur wird im folgenden eine einfache radiärsymmetrische Blende mit dem Radius  $a$  angenommen. Die Darstellung erfolgt, aufgrund der Radiärsymmetrie, in Kreiskoordinaten. Die zweidimensionale Fouriertransformation der Pupillenfunktion entspricht

$$\begin{aligned} \mathcal{F}_{2d}\{P(\rho, \phi)\} &= \int_0^a a \int_0^{2\pi} e^{-2\pi\rho a(\cos(\phi')\cos(\phi)+\sin(\phi')\sin(\phi))} da d\phi \\ &= \int_0^a a da \left\{ \int_0^{2\pi} e^{-2\pi\rho a(\cos(\phi-\phi'))} d\phi \right\} \end{aligned} \quad (\text{C.63})$$

Sie wird auch als *Amplitudentransferfunktion* bezeichnet. Es sind dabei der Azimuth-Winkel mit den Definitionen der Blendenebene  $\phi = \arctan(y_0/x_0)$  und der Bildebene  $\phi' = \arctan(y_i/x_i)$  und der Substitution  $\rho = \sqrt{u^2 + v^2}$ ,  $u = \rho \cos \phi'$ ,  $v = \rho \sin \phi'$ ,  $x_0 = a \cos \phi$ ,  $y_0 = a \sin \phi$ . Der Arcustangens ist die Umkehrfunktion des Tangens und gibt das Bogenmaß zu dem entsprechenden Tangenswert an. Das Bogenmaß ist der Umfang des Kreissegmentes, das allgemein von einem Winkel am Einheitskreis erzeugt wird. Es wird die Punktabbildung paralleler, aus dem Unendlichen kommender Strahlung in der Brennpunktebene auf der optischen Achse betrachtet ( $x,y=0$ ) mit  $\rho = \frac{1}{\lambda} \frac{b}{r} = \frac{\sin \theta}{\lambda}$  und  $b = \sqrt{x_i^2 + y_i^2}$  sowie dem Abstand  $r$

vom Mittelpunkt der Blende ebene zum Bildpunkt<sup>12</sup>.  $\theta$  entspricht dem Beugungswinkel ausgehend von der Aperturebene (Zenith-Winkel). Der in Klammern stehende funktionale Zusammenhang des inneren Integrals ist eine Fouriertransformation:

$$J_0(2\pi\rho a) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{-2\pi i \frac{\rho}{\lambda z_i} a \cos(\phi - \phi')} d\phi \quad (\text{C.64})$$

und enthält als Lösung die *Besselfunktion* 1. Gattung und 0. Ordnung. Die Fouriertransformation einer kreisrunden Pupille lässt sich damit angeben, als:

$$\mathcal{F}_{2d}\{P(\rho)\} = 2\pi \int_0^a a J_0(2\pi\rho a) da \quad (\text{C.65})$$

Eine Lösung des Integrals führt zu einer Besselfunktion 1. Gattung und 1. Ordnung. Mit einer Umformung (Rekursion) von Besselfunktionen 1. Gattung und n-ter Ordnung und der Substitution ( $\omega = 2\pi\rho a$ ) [278]:

$$\mathcal{F}_{2d}\{P(\rho)\} = \frac{1}{2\pi\rho^2} \int_0^\omega \omega J_0(\omega) d\omega \quad (\text{C.66})$$

$$\omega \frac{dJ_n}{d\omega} + nJ_n = \omega J_{n-1} \quad (\text{C.67})$$

erhält man mit  $n = 1$  und Integration:

$$\begin{aligned} \omega \frac{dJ_1}{d\omega} + J_1 &= \omega J_0 \\ \frac{d(\omega J_1)}{d\omega} &= \omega J_0 \\ \omega J_1(\omega) &= \int_0^\omega \omega J_0(\omega) d\omega \end{aligned} \quad (\text{C.68})$$

Für die Besselfunktion gilt mit dem Grenzwert  $\lim_{\omega \rightarrow 0} \left( \frac{J_1(\omega)}{\omega} \right) = \frac{1}{2}$  und im Zusammenhang mit einer vollständigen Kreisfläche (Radius =  $a$ ), erhält man für die (konstante) Amplitude:

$$A = \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^a a da = \pi a^2 \quad (\text{C.69})$$

Die zweidimensionale Amplitudenverteilung der Fraunhofer Beugungsstruktur entspricht damit der fouriertransformierten Pupillenfunktion (Blendenöffnungsfunktion) ggf. mit einem zusätzlichen Phasenfaktor:

$$E(\rho) = A \left( \frac{2J_1(2\pi\rho a)}{2\pi\rho a} \right) e^{i(\phi - \phi')} \quad (\text{C.70})$$

Hieraus lässt sich dann, mittels Quadrierung die *Intensitätsverteilung* in der Abbildungsebene angeben. Im Falle inkohärenter Strahlung fällt der Phasenfaktor weg und mit der Substitution  $x = 2\pi\rho a$  folgt:

$$\begin{aligned} I(\rho) &= I(0) \left( \frac{2J_1(2\pi\rho a)}{2\pi\rho a} \right)^2 \\ I(\rho) &= I(0) \left( \frac{2J_1(x)}{x} \right)^2 \end{aligned} \quad (\text{C.71})$$

---

<sup>12</sup>Im angenommenen Fall gilt  $r \approx z_i \left( 1 + \frac{1}{2} \left( \frac{x_i - x_0}{z_i} \right)^2 + \frac{1}{2} \left( \frac{y_i - y_0}{z_i} \right)^2 \right)$  im Zusammenhang mit der Fresnel- und Fraunhoferapproximation:  $z_i^3 \gg \frac{\pi}{4\lambda} ((x_i - x_0)^2 + (y_i - y_0)^2)_{max}^2$ ;  $z_i \gg \frac{k(x_0^2 + y_0^2)_{max}}{2}$



Es entsteht im aberrationsfreien Fall ein Lichtintensitätsscheibchen mit der Peakintensität  $I(0)$ , das auch als Airy-Scheibchen (*Airy disc*)<sup>13</sup> bezeichnet wird. Dieses ist von Minima und Maxima umgeben. Man erhält die Nullstellen der eindimensionalen Intensitätsfunktion über die Nullstellen der Besselfunktion  $J_1(x)$ , hier mit der Substitution  $x = kb \sin(\theta)$ , zu 3.8317, 7.0156, 10.1735, 13.3268, ... und damit die Lage der Minima in der Abbildungsebene [165] [278]. Es ergeben sich daraus die Werte für eine beugungsbegrenzte Punktabbildung in der Infokusebene mit inkohärenter Strahlung. Bei kohärenter Strahlung muss zudem noch die Phase beachtet und für alle reellen Lösungen berücksichtigt werden [353].

Betrachtet man zwei unmittelbar benachbarte, symmetrische Punktintensitäten und verändert sukzessiv den Peakabstand  $d$ , so werden die Bedingungen der Auflösungskriterien zweidimensionaler Abbildungen anschaulich. Bei vollständig inkohärenten Wellen, von denen die eine Punktquelle in  $y = 0$  und die andere im variablen Abstand  $y = d$  liegt, entfällt der Phasenfaktor und die Summenintensitätsfunktion kann, aufgrund der Linearität der Intensitäten, errechnet werden über:

$$I_{(y,d)} = \left| \frac{2J_1\left(\frac{\pi}{\lambda f\#} y\right)}{\frac{\pi}{\lambda f\#} y} \right|^2 + \left| \frac{2J_1\left(\frac{\pi}{\lambda f\#} (y - d)\right)}{\frac{\pi}{\lambda f\#} (y - d)} \right|^2 \tag{C.72}$$

### Eindimensionale Ortsauflösung (inkohärenter Strahlung)

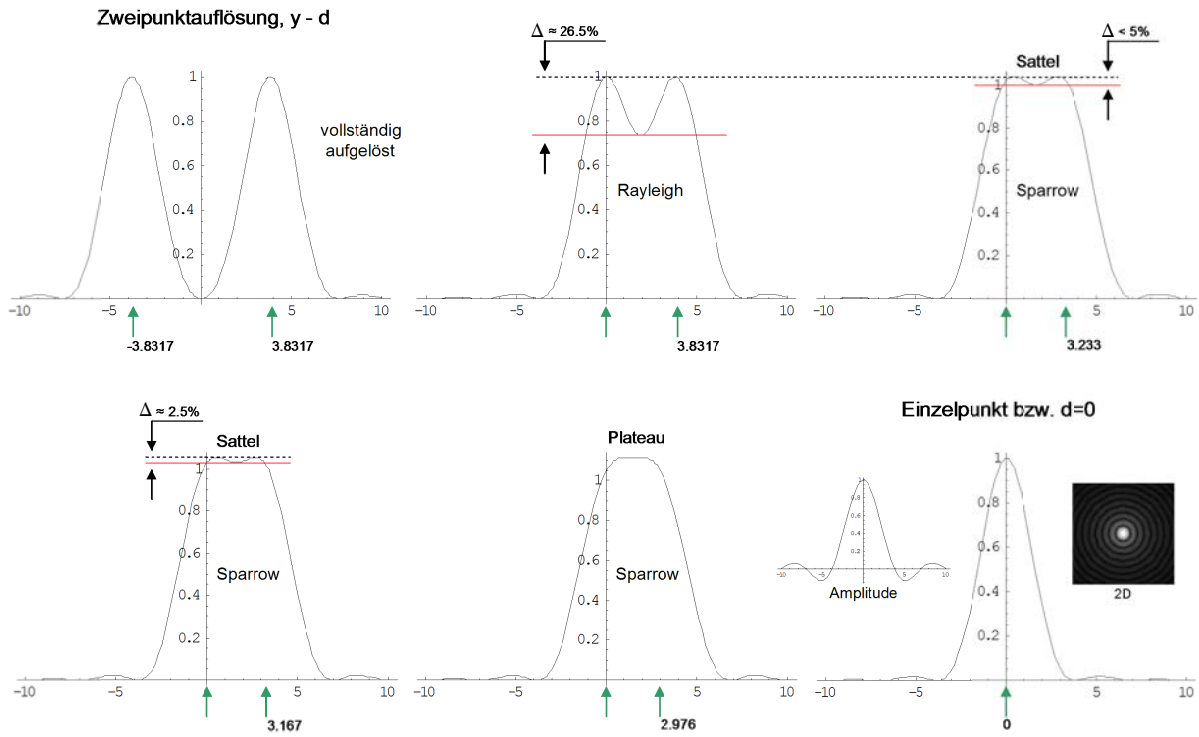


Abbildung C.8: Laterale Bildpunktauflösung als Projektion der 2D-PSF auf eine Raumrichtung. Ergebnisse mit *inkohärenter* Strahlung nach den Definitionen von Sparrow und Rayleigh.

<sup>13</sup>Benannt nach G.B. Airy, auf den die erste theoretische Beschreibung der Beugungsmuster zurückgeht.



Im Falle kohärenter Strahlung ist die Betrachtung zweier aufeinanderfolgender Interferenzprozesse i.d.R. geeigneter, als die Betrachtung in Form einer Überlagerung der zweidimensionalen Intensitätsverteilungen. Ähnliches gilt auch bei Systemen mit Aberrationen. Effekte die in der Weitfeldmikroskopie i.d.R. zu einer Kontraststeigerung führen, ziehen, soweit dies verallgemeinert werden kann, meist eine Schwächung der Strukturähnlichkeit des Bildes mit dem des Objektes nach sich [278]. In Pixelbildern ist neben einem ausreichenden Signalpegel immer auch ein minimales SNR-Verhältnis erforderlich, um eine ausreichende Bildähnlichkeit mit einer bekannten Objektstruktur gewährleisten zu können. Bei medizinisch diagnostischen Abbildungen findet oft das sogenannte Rose-Kriterium Anwendung.

Die Berechnung des effektiven Energieanteiles für jede Beugungsordnung einer beliebigen aPSF (Kombination) ist im allgemeinen nicht trivial und erfordert i.d.R. eine Lösung der Maxwell-Gleichungen. Die Anwendung rigoroser Methoden ist dabei oft schwierig [356]. Eine Blende wirkt generell immer als Tiefpassfilter (im Fourierraum). Eine Verkleinerung der Blende kommt dabei einem Abtrennen hoher Raumfrequenzen gleich (Nebenmaxima höherer Ordnung fallen weg) was dazu führt, daß im Bild kleine Strukturen nicht richtig abgebildet werden können (Unschärfe). Ein Ausblenden niedriger Raumfrequenzen (z.B. durch eine zentrale Abschattung) führt dagegen zu einer Überbetonung der Nebenmaxima, was den Kontrast im Bild erhöht, die Abbildung aber insgesamt sehr lichtschwach werden lässt.

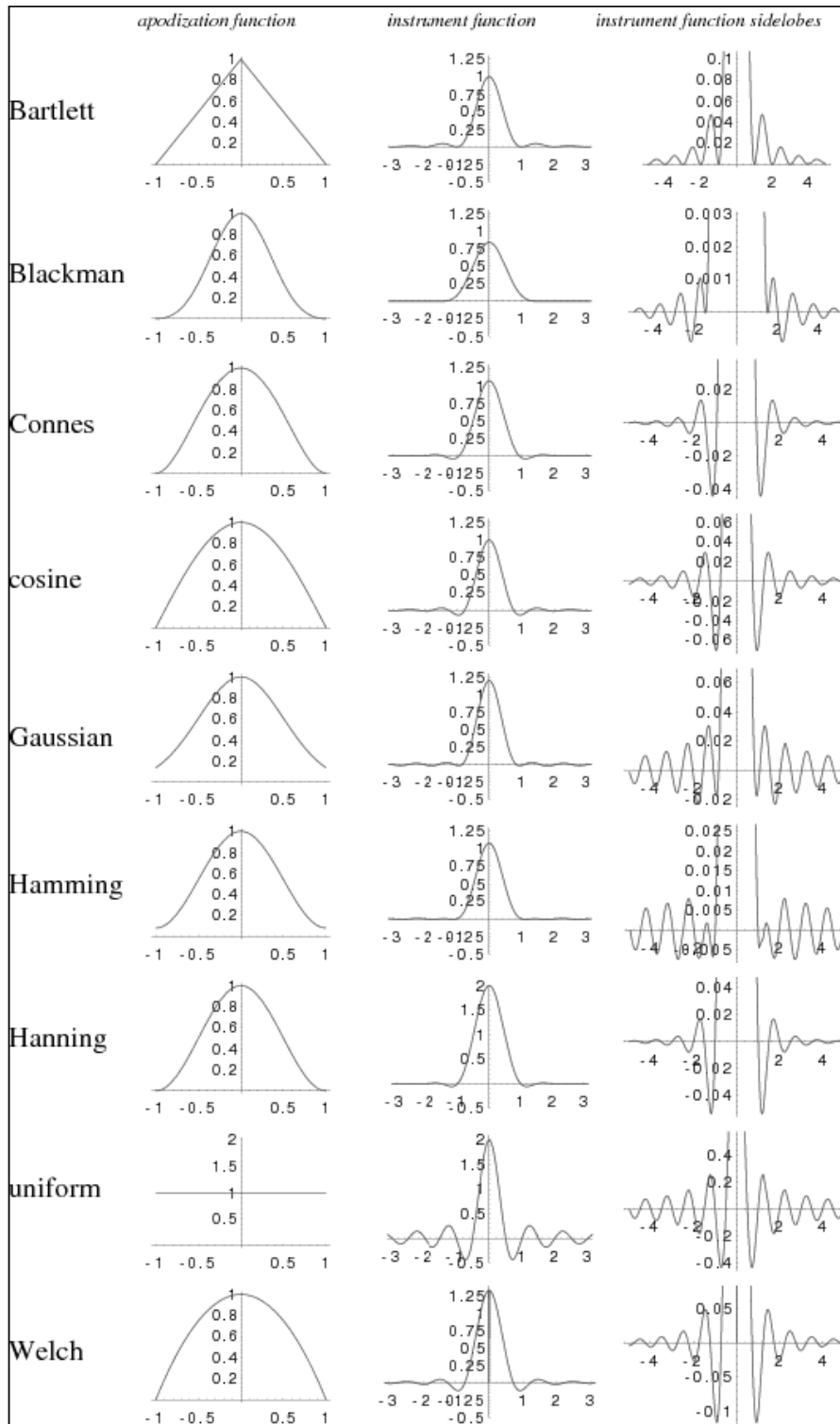


Abbildung C.9: (Links) Apodisation entsprechender Pupillenfunktionen. (Mitte) PSF (*instrument function*) und (rechts) Vergrößerung der Nebenmaxima der PSF. Entnommen aus [357].

### C.2.4 Ringblende

Als weiteres Beispiel soll hier noch die Zentralabschattung (*annular aperture*) bei homogener Blendenausleuchtung mit inkohärenter Strahlung betrachtet werden. Dabei lässt eine zentrisch vor einer runden Apertur mit dem Radius  $r$  angebrachte lichtundurchlässige Blende, nur Licht in einem Ring ab einem Radius  $\varepsilon r$  ( $0 \leq \varepsilon < 1$ ) bis  $r$  passieren. Für den Grenzfall  $\varepsilon \rightarrow 1$  findet man  $I/I_0 \rightarrow J_0^2(kr \sin(\theta))$  und damit für den Abstand des ersten Beugungsminimums zur zentrischen Peakintensität des 0. Maximums ( $f \frac{k\lambda}{r}$ ) den Vorfaktor  $k=0.38$ , bzw.  $\Delta x = f \cdot 0.76\lambda/D$ . Die Funktion  $J_0$  erzeugt aber relativ intensive Nebenmaxima. Dieser Umstand hebt deshalb in der Regel den relativen Auflösungsgewinn von ca. 38% gegenüber dem Fall  $\varepsilon=0$  mit  $k=0.61$  einer unabgeblendeten Kreispupille auf. Mit  $\varepsilon=0.5$  erhält man  $k=0.50$ . Die winkelabhängige Intensitätsverteilung in einer Richtung der Abbildungsebene entspricht dabei dann [278]:

$$I(\theta) = \frac{1}{(1 - \varepsilon^2)^2} \left( \left( \frac{2J_1(x)}{x} \right) - \varepsilon^2 \left( \frac{2J_1(\varepsilon x)}{\varepsilon x} \right) \right)^2 I_0 \quad (\text{C.73})$$

### C.2.5 Poisson-Spot

Im laseroptischen Aufbau der Massenspektrometer ALADIM II und LAMMA 2000 kommt es, bedingt durch das Einkopplungsprinzip der Laserstrahlung, zu einer elliptischen Strahlausblendung, immer dann, wenn die Laserstrahlachse parallel auf die optische Achse justiert wird. Im Gegensatz zu inkohärenten Wellen tritt mit kohärenten ebenen Wellen eines Lasers ein Phänomen auf, das in einem gewissen Abstand zum Hindernis ein Intensitätsprofil erzeugt, bei dem, mit einer ideal kreisrunden Zentralausblendung im Zentrum des Schattenraumes der Beugungsgeometrie, ein deutlicher Intensitätspeak auftritt (*Poisson spot*, *Arago spot*). Dieser Peak erlangt in ausreichender Entfernung zum Hindernis die (unabgeblendete) Ausgangsintensität. Im Aufbau der Laseroptik, der in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometer, sind aber mehrere Einflüsse zu berücksichtigen, wobei die in Summe erhaltenen Beugungsphänomene teilweise nur noch schwer einzelnen Primärquellen zuzuordnen sind.

### C.2.6 OTF und SR

Die laterale Auflösung, die bei Verwendung inkohärenter Wellen erreicht werden kann übertrifft i.d.R. die Auflösung, die mit kohärenten Lichtwellen unter der Bedingung einer *minimalen* Phasendifferenz erreichbar ist. Bei einer Phasendifferenz von  $\Delta\varphi = \pi$  trifft allerdings das Gegenteil zu. Zwei Punkte würden im Falle des „Rayleighabstandes“ dann vollständig getrennt. Bei weiterer Annäherung der Punkte, überwiegt aber dann allerdings sehr schnell die Gesamtintensitätsabnahme, d.h. Signalpegel und Kontrast verschlechtern sich erheblich. Wie zuvor bereits erwähnt, wird für die Kontrastdarstellung in Bildern oft der Fourierraum verwendet. Die Definition der optischen Transferfunktion (OTF)  $\mathcal{H}$  bzw. der Modulationsübertragungsfunktion (MTF)  $|\mathcal{H}|$  ist hierzu das geeignete Maß. Für inkohärente Strahlung kann die OTF in folgender Form aufgestellt werden [353]:

$$\mathcal{H}(f_x, f_y) = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} |h(x_i, y_i)|^2 \exp(-i2\pi(f_x x_i + f_y y_i)) dx_i dy_i}{\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} |h(x_i, y_i)|^2 dx_i dy_i} \quad (\text{C.74})$$

Im Zusammenhang mit dem *Parseval Theorem* bzw. mit der *Schwarzschen Ungleichung* kann gezeigt werden, daß es sich bei der (normierten) OTF um die *Autokorrelationsfunktion* der Amplitudentransferfunktion  $H(f_x, f_y)$  handelt, für die u.a. gilt  $|\mathcal{H}(f_x, f_y)| \leq |\mathcal{H}(f_0, f_0)| \equiv 1$ . Man erhält für ein aberrationsfreies System (hauptsächlich keine Koma) einer symmetrischen Abbildung mit inkohärenter Strahlung

nach Ausformulierung mit der Pupillenfunktion [353]:

$$\mathcal{H}(f_x, f_y) = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} P\left(x + \frac{\lambda z_i f_x}{2}, y + \frac{\lambda z_i f_y}{2}\right) P\left(x - \frac{\lambda z_i f_x}{2}, y - \frac{\lambda z_i f_y}{2}\right) dx_i dy_i}{\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} P(x, y) dx_i dy_i} \quad (\text{C.75})$$

Der Nenner nimmt dabei entweder die Werte 0 oder 1 an, weshalb auf eine Quadrierung verzichtet werden kann. Die Gleichung kann damit bei aberrationsfreien und symmetrischen Abbildungen auch rein *geometrisch* interpretiert werden. Nämlich als Überlappung zweier verschobener Pupillenfunktionen [353]:

$$\mathcal{H}(f_x, f_y) \equiv \frac{\text{Überlappungsfläche}}{\text{Gesamtfläche}} \quad (\text{C.76})$$

Die Definition des bereits zuvor erwähnten Strehlwertes bzw. der Strehlschen Definitionshelligkeit (SR, *Strehl ratio*) dient der Klassifizierung realer Linsensysteme im Fourierraum. Er stellt das Verhältnis der realen OTF ( $\mathcal{H}(f_x, f_y)_{ab}$ ) zu einer idealen aberrationsfreien (*idealen*) OTF ( $\mathcal{H}(f_x, f_y)_{oa}$ ) dar:

$$\begin{aligned} SR &= \frac{\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \mathcal{H}(f_x, f_y)_{ab} df_x df_y}{\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \mathcal{H}(f_x, f_y)_{oa} df_x df_y} \\ &\approx \exp\left(-\left(2\pi \cdot RMS(W)\right)^2\right) \end{aligned} \quad (\text{C.77})$$

Eine generelle Möglichkeit auch kompliziertere Verhältnisse an optischen Systemen (Pupillengeometrie, Transmissionsfunktion bzw. Apodisation) mit inkohärenter Strahlung hinsichtlich ihrer OTF zu charakterisieren, besteht praktisch zunächst im Berechnen der Fouriertransformierten der Pupillenfunktion. Hierbei wird die aPSF (*amplitude point spread function*) erhalten. Deren Betragsquadrat entspricht der iPSF (*intensity point spread function*). Aus der Fouriertransformation der iPSF erhält man die *nichtnormierte* OTF. Der Absolutbetrag der nichtnormierten OTF legt die Amplitudenänderungen der unterschiedlichen Frequenzanteile fest und ihre Phase die Phasenänderung.

Alternativ kann eine direkte Autokorrelation, durch Multiplikation der Pupillenfunktion im Fourierraum mit einer identischen aber verschobenen Pupillenfunktion durchgeführt werden. Aus der anschließenden Integration erhält man dann die OTF [341] [348] [353].

## C.3 Bewertung optischer Abbildungen

### C.3.1 Kontrast

Der Kontrast eines Objektes im Ortsraum mit (deutlich) erkennbaren Strukturen setzt sich i.d.R. aus einem konstanten Hintergrund  $A_0$  und einem kleinen ortsabhängigen Signal  $A(x)$  zusammen. Bezogen auf die ortsabhängige Amplitude in einer Richtung der abzubildenden Ebene gilt der Zusammenhang:

$$A(x_1) = A_0 + A(x) \quad (\text{C.78})$$

Für die Bildebene im Ortsraum gilt während einer Transformation, daß der ortsabhängige Anteil einer Faltung mit der aPSF des optischen Systems unterliegt, wohingegen der Hintergrund addiert wird:

$$A(x_2) = A_0 + A(x_1) \otimes aPSF \quad (\text{C.79})$$

Physikalische Sensoren registrieren i.d.R. aber die Intensität des Messsignales und nicht die Amplitude. Der Helligkeitskontrast von Punktintensitäten kann dabei mit der nach MICHELSON benannten

Gleichung aus der Interferometrie relativ quantifizierend angegeben werden [358]. Auf mikroskopische Abbildungen ist dies u.a. von BEREK angewandt und in mehreren Abhandlungen über *Kohärenz und Konsonanz*, im Zusammenhang mit *selbstleuchtenden* und *nichtselbstleuchtenden* Objekten, diskutiert worden [359]. Abbildungen selbst- und nichtselbstleuchtender Objekte zeigen dabei theoretisch keine Unterschiede, wenn sie in der (den) Aperturebene(en) des abbildenden optischen Systems eine identische Helligkeitsverteilung erzeugen.

### Modulation

Betrachtet man die Modulation der Intensität als Funktion des Beugungswinkels  $\theta$  (ausgehend von der Apertur), entspricht der *Kontrast* der in der Abbildungsebene erreicht wird einer Modulation:

$$\text{Modulation} = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (\text{C.80})$$

$$= \left( \frac{\sin\left(\frac{\pi d}{\lambda} \sin\theta\right)}{\frac{\pi d}{\lambda} \sin\theta} \right)^2 \cdot \cos^2\left(\frac{\pi x}{\lambda} \sin\theta\right) \quad (\text{C.81})$$

In der beispielhaft gewählten Modulation ist das Objekt dabei eine Spaltlichtquelle und das modulierende System ein Doppelspalt, jeweils mit der Spaltbreite  $d$  und dem Spaltabstand  $x_a$  (Spaltmittenmaß). Alle Spalte weisen eine homogene Transmission der Strahlung auf und zeigen Beugungs- bzw. Interferenzphänomene. Verwendet wird inkohärente Strahlung. Auf einer ebenen Projektion im Abstand  $L$  hinter den spaltförmigen Aperturen betrachtet man bei kleinen Beugungswinkeln eine Überlagerung. Diese beinhaltet zum einen Nullstellen bei  $\sin\theta = \frac{n\lambda}{d}$ , mit  $n = 1, 2, 3, \dots$  bzw. vollständige Dunkelheit, wenn gilt ( $d < x_a$ ), und außerdem den Einfluss der Doppelspaltfunktion mit den Beugungsmaxima bei  $\sin\theta = \frac{n\lambda}{2x}$ , mit  $n = 0, 2, 4, \dots$  und den Minima mit  $n = 1, 3, 5, \dots$ . Dies entspricht einer Superposition der „Beugungsfunktion“ der Intensität für einen einzelnen Spalt:

$$I(x) = I_0 \left( \frac{\sin\left(\frac{\pi d}{\lambda} \sin\theta\right)}{\frac{\pi d}{\lambda} \sin\theta} \right)^2 \quad (\text{C.82})$$

mit der „Beugungsfunktion“ der Intensität für einen Doppelspalt:

$$I(x) = I_0 \cos^2\left(\frac{\pi x}{\lambda} \sin\theta\right) \quad (\text{C.83})$$

Wird die Bedingung  $d \cdot x_a < \lambda$  erfüllt, ist kein Unterschied zwischen selbstleuchtenden Objekten und beleuchteten Objekten festzustellen. Ein lineares (aberrationsfreies) optisches System transformiert die Lichtintensitätsverteilung eines *beleuchteten* oder *selbstleuchtenden* Objektpunktes zu einer Intensitätsverteilung im entsprechenden Bildpunkt. Die Kontrastdefinition bezieht sich dabei zunächst nur auf eine feste Größe  $d$  bzw. einen festen Abstand in der Aperturebene ( $x_a$ ) und eine Wellenlänge. Die Intensitätsverteilung selbstleuchtender und nichtselbstleuchtender Objektpunkte in der Objektebene weist i.d.R. bereits Interferenzerscheinungen auf. Der Kontrast in der Bildebene wird im Vergleich zum Kontrast in der Objektebene durch das optische System weiter verringert. Im Ortsraum handelt es sich dabei um eine Faltung zweier Funktionen. Es wird aber bei der näheren Charakterisierung eines optischen Systems i.d.R. nicht der Ortsraum, sondern der Fourierraum mit den entsprechenden Raumfrequenzen betrachtet.

### Betrachtungen im Fourierraum

Die *Modulationsübertragungsfunktion* (MTF) stellt einen Vergleich des Bildkontrastes mit dem Objektkontrast als Funktion der Raumfrequenzen im Fourierraum her. Das Modell wird in Summe auch als

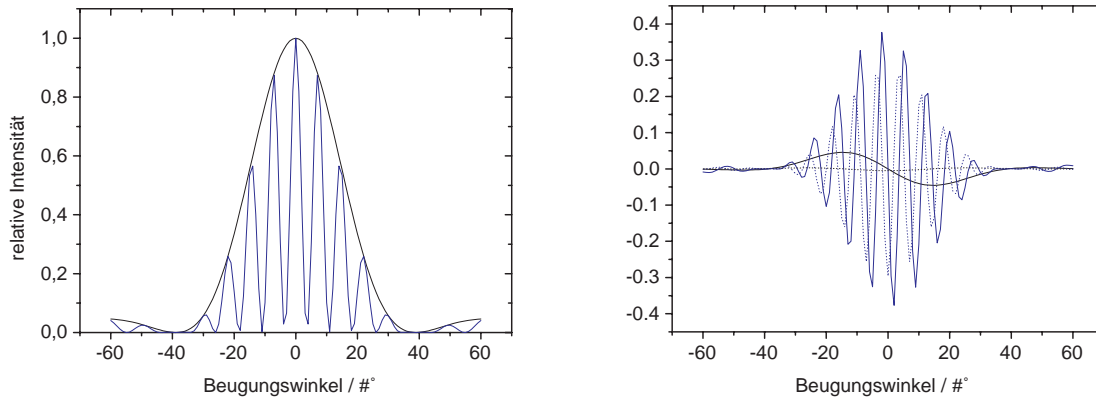


Abbildung C.10: Beugung am Doppelspalt (grau), Beugung am Einzelspalt (schwarz). Spaltmaß  $5 \mu\text{m}$ , Spaltabstand  $25 \mu\text{m}$ , Wellenlänge  $1 \mu\text{m}$ . Erste Ableitung der Intensität gegen den Beugungswinkel (Beugung am Doppel-/Einzelspalt).

*Fourieroptik* bezeichnet. Für die Modulationsübertragung gilt allgemein der Zusammenhang:

$$MTF \equiv \frac{\text{Bildkontrast}}{\text{Objektkontrast}} \tag{C.84}$$

Die MTF bildet damit das Verhältnis aus der Modulation des Lichtes der Bildintensität, zur Modulation des Lichtes der Gegenstandsintensität. Betrachtungen dieser Art entsprechen praktisch *photometrische* Messungen der (mittleren) Lichtintensitäten in einem Messzeitintervall über einer Sensorfläche. Vor allem in Verbindung mit inkohärenter Strahlung wird dabei die Definition der OTF (*Optical Transfer Function*) verwendet. Diese ist eine auf die Größe der Pupille des optischen Systems im Ortsraum bzw. der entsprechenden Grenzfrequenz im Fourierraum, im unsymmetrischen Fall, für jede Richtung der Ebene einzeln normierte *Autokorrelationsfunktion* der *Amplitudentransferfunktion*  $H(f_x, f_y)$ . Die PSF des optischen Systems wird oft auch als *Impulsantwortfunktion* bezeichnet. Die Amplitudentransferfunktion gibt an, welche objektseitigen Raumfrequenzen durch das optische System im Fourierraum übertragen werden können. Im Falle kohärenter Strahlung wird gelegentlich in der Literatur auch die Bezeichnung CTF (*Coherent Transfer Function*) verwendet. Einer Faltung zweier Funktionen im Ortsraum entspricht eine Multiplikation komplexer Ausdrücke im Fourierraum:

$$\mathcal{F}\{\text{Bild}\} = \mathcal{F}\{\text{Objekt}\} \cdot OTF \tag{C.85}$$

In der Projektionsebene im Ortsraum entspricht das Bild einer Faltung des Objektes mit der Punktfunktion. Die *Punktfunktion*, auch häufig Punktverwaschungsfunktion (PSF, *point spread function*) genannt beschreibt dabei die reale Intensitäts- bzw. Amplitudenverteilung in der Brennpunktebene (Ortsraum) eines optischen Systems. Allgemein kann ein elektromagnetisches Feld, für das im folgenden nur das elektrische Feld berücksichtigt wird z.B. für eine Dimension  $x$  der transversalen Ebene und der Ausbreitungsrichtung  $z$  an der Position  $z = 0$ , als Überlagerung ebener harmonischer Wellen dargestellt werden:

$$E(x, z) = \frac{1}{2\pi} \int \mathcal{F}\{E(k_x)\} e^{i(k_x x + k_z z)} dk_x \tag{C.86}$$

$E(x, z) = \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}\{E(k_x)\}\}$  entspricht der invers Fouriertransformierten der Fouriertransformierten  $\mathcal{F}\{E(k_x)\}$ . Es gilt:

$$\mathcal{F}\{E(k_x)\} = \int E(x, 0) e^{-ik_x x} dx \tag{C.87}$$

Mit einem fokussierenden optischen System stehen die transversale Raumfrequenz  $l$  und der Wellenvektor  $k$  in der Beziehung  $k = 2\pi \frac{x}{\lambda f} = 2\pi l$  und für den Beugungswinkel gilt  $\theta = \frac{k_x \lambda}{2\pi}$ . Die resultierende Welle wird in die Brennebene  $z = 0$  am Ort  $x = \theta f = \frac{k_x \lambda f}{2\pi}$  abgebildet.

Mit einer rotationssymmetrischen kreisrunden Blende und einem Öffnungsradius  $r$  sowie gleichmäßigen Transmissioneigenschaften, erhält man für eine Pupillenfunktion in der Blendenebene (*Blendenöffnungsfunktion*) und Durchstrahlungsorten mit einem Achsabstand  $r' \leq r$ , theoretisch  $P(r) = 1$  und an Orten mit Achsabständen  $r' > r$ ,  $P(r) = 0$ . Die übertragbare Grenzfrequenz  $l_0$  einer symmetrischen kreisrunden Pupille im Fourierraum ist dann für jede Richtung der Ebene (x,y) gleich groß  $2l_0$ . Photometrische Intensitätsmessungen ermitteln den Betrag, der auf die Pupille (maximale Transmission) in der Blendenebene normierten OTF am Ort der Projektion (Abbildungsebene). Der Betrag der OTF entspricht der MTF und ist ein reeller Wert [360]. Die *Phase* der betrachteten Lichtwellen wird bei der Messung von einem Sensor i.d.R. nicht miterfasst (imaginärer Teil). Ihre Information ist in der Intensitätsverteilung aber enthalten. Der Phasenfaktor fällt bei aberrationsfreien, korrigierten optischen Systemen und einer Abbildung in der Infokusebene mit vollständig inkohärenter Strahlung weg [341].

Phasenverschiebungen mit inkohärenter Strahlung können ausserhalb des paraxialen Abstandes in der Infokusebene stattfinden, treten dort aber zunächst nicht in Erscheinung, da eine gemittelte Amplitude und Phase betrachtet wird. In Defokusebenen treten sie auch im paraxialen Raum auf und wirken sich auf die Intensität aus, da der Phasenfaktor anders als bei Infokusabbildungen auch ohne Aberrationen nicht eliminiert wird. Eine allgemeine Definition der OTF ist:

$$\begin{aligned} OTF &= MTF \exp(-i \cdot PTF) \\ &= \mathcal{F}\{PSF\} \end{aligned} \quad (C.88)$$

Sie entspricht der fouriertransformierten PSF. Man erkennt, daß die *OTF* bzw. deren Äquivalente für eine Betrachtung im Fourierraum herangezogen werden, während bei einer Betrachtung des Ortsraumes die *PSF* verwendet wird. Mit inkohärenter Strahlung wird in der Weitfeldmikroskopie (*wide-field microscopy*<sup>14</sup>) das *Rayleigh*-Kriterium für gerade noch trennbare und unmittelbar benachbarte Objektpunkte verwendet. Dieses bezieht die Beugung bzw. Interferenz zweier benachbarter Punktintensitäten mit ein. Eine (weitere) Grenzfrequenz zur Darstellung von Objektstrukturen erhält man dann bei einer  $OTF \approx 0.25$  im Zusammenhang mit dem Rayleigh-Kriterium. Es ist möglich eine rein geometrische MTF anzugeben (GMTF). Diese legt die Strahldichteverteilung im jeweiligen Bild zu Grunde, trifft aber i.d.R. nur für sehr niedrige Ortsfrequenzen bzw. große Abstände im Bild richtige Vorhersagen. Die monochromatische beugungsbegrenzte (normierte) 2d MTF einer kreisrunden Apertur für Infokusabbildungen kann über die transversale Ortsfrequenz ( $l$ ) definiert werden [266]:

$$MTF(l, s = 0) = \frac{2}{\pi} \left( \cos^{-2}(l/2) - \frac{l}{2} \sqrt{1 - \left(\frac{l}{2}\right)^2} \right) \quad (C.89)$$

Die 2D-MTF ist eine Projektion der 3D-MTF. Diese besitzt eine Singularität bei  $l = 0$  und einen „Cut-Off“ bei  $|l| = 2$ . Unter Berücksichtigung einer zentralen kreisrunden Ausblendung mit dem Radius  $\varepsilon$  (ringförmige Transmission) erhält man Gleichung (C.90). Der Fall einer kreisrunden Lochapertur, der auch der Situation an einer dünnen Linse entspricht entsteht dann, wenn  $\varepsilon = 0$  wird. Die Raumfrequenzen sind auf die numerische Apertur der Linse normiert,  $l_0 = \lambda^{-1} \sin \alpha$  bzw.  $s_0 = 4\lambda^{-1} \sin^2 \alpha/2$ . Die laterale

<sup>14</sup>Gleichzeitige Beleuchtung aller Objekt- und Detektion aller Bildpunkte.



Cut Off Frequenz der 2d MTF mit inkohärenter Strahlung in konfokalen Anordnungen ist um den Faktor 0.5 geringer.

$$MTF_{\varepsilon}(l, s) = \frac{2}{|l|} \left( \operatorname{Re} \left( \sqrt{1 - \left( \frac{s}{l} + \frac{l}{2} \right)^2} \right) - \operatorname{Re} \left( \sqrt{\varepsilon^2 - \left( \frac{s}{l} - \frac{l}{2} \right)^2} \right) \right) \quad (\text{C.90})$$

$\operatorname{Re}()$  bezeichnet den Realteil. Ein Cut-Off erfolgt mit  $\varepsilon = 0$ , wenn  $|l| = 2$  und  $|s| = 0.5$ . Mit zentraler Ausblendung bleibt der Cut-Off der Raumfrequenz für die Ebene erhalten, der axiale Cut-Off erfolgt dagegen wenn  $|s| = (1 - \varepsilon^2)/2$  ( $s =$  axiale Raumfrequenz). Um das Zentrum der 3d MTF mit ( $\varepsilon > 0$ ) und ohne zentrale Obstruktion ( $\varepsilon = 0$ ) verläuft axial und radial ein undefinierter Bereich. Dieser wird als *Missing cone* bezeichnet. Von Raumfrequenzen die aus diesem Bereich stammen sind keine Abbildungen möglich. Der axiale Raumfrequenz Cut-Off einer Linse mit zentraler Obstruktion ist kleiner, als der einer Linse ohne Obstruktion. D.h. die Fokustiefe einer Linse mit zentraler Ausblendung ist größer und damit die axiale Auflösung geringer, als die einer vergleichbaren Linse ohne Obstruktion [266] [361]. Die Phase der fouriertransformierten Punktfunktion (PSF, point spread function) wird als *Phasentransferfunktion* (PTF) bezeichnet und gibt die relative Phasenverschiebung der beteiligten Teilwellen an. Im Falle inkohärenter Strahlung fällt der Phasenfaktor bei der Bertagsbildung zur Intensitätsermittlung weg, wenn es sich um konjugierte Ebenen von Infokusabbildungen handelt. In einem linearen optischen System wird die Fouriertransformation für jeden Punkt auf der Objektebene und der Bildebene ortsunabhängig möglich (2d Ortsinvarianz). Als Punktfunktion wird in der Literatur sowohl die Punktfunktion der Intensität *iPSF* (intensity point spread function) wie auch die Punktfunktion der Amplituden *aPSF* (amplitude point spread function) als PSF bezeichnet. In linearen optischen Systemen ist die *laterale* aPSF für einen Punkt in der konjugierten Ebene nicht abhängig von der Punktposition in der Ebene, es verändert sich lediglich die Phase der überlagernden Teilwellen und diese fällt als Vorfaktor mit inkohärenter Strahlung weg. Laterale und axiale PSFs sind prinzipiell für den idealen (achs)symmetrischen Fall durch identische mathematische Beziehungen beschreibbar. Diese werden im Zusammenhang einiger Aberrationen oder den Randbedingungen aber nur noch als Reihenentwicklung und damit approximativ handhabbar. Besonders durch den Einsatz von Laserstrahlung mit TEM<sub>00</sub>-Profil (Gaußprofil) zur Beleuchtung/Anregung in konfokalen Anordnungen, stellt sich die *dreidimensionale* PSF in den Grenzen der Halbwertsbreiten der 0. Maxima bei sehr kleiner Blendenöffnung am Detektionsort ( $d < 0.25$  AU), zurückgerechnet auf den Objektraum, als *Rotationsellipsoid* dar. Dies ermöglicht (lateral und axial) am Ort der Detektion, anders als in der Weitfeldmikroskopie, eine Diskriminierung von *Defokuslicht* in der Abbildungsebene (Infokusebene). Die Verknüpfung von Kontrast und Auflösung ist damit bei konfokalen Geräten auch auf die axiale Ebene erweiterbar und macht diese dadurch leistungsfähiger.

Es besteht praktisch immer die Notwendigkeit Objekte mit bekannten Geometrien (z.B. Ronchi-Gitter oder Lineatur, Simensstern, etc.) einzusetzen, um ein reales optisches System hinsichtlich seiner Kontrastübertragung und Auflösungsfähigkeit beurteilen zu können. Bei der Beschreibung der eintretenden Interferenzerscheinungen ist dabei immer zu berücksichtigen ob *inkohärente* oder *kohärente* Strahlung, direkte oder indirekte Beleuchtung oder Selbstleuchter vorliegen. Je nachdem, kann es sich um reine „Amplitudenobjekte“ oder „Phasenobjekte“ handeln.

## Objektive

Charakterisierungen von Objektiven finden während der Fertigung und nach der Herstellung, meist bei einer OTF = 0.5 statt. Idealerweise besitzen alle parallelen Strahlen bei der Propagation im optischen



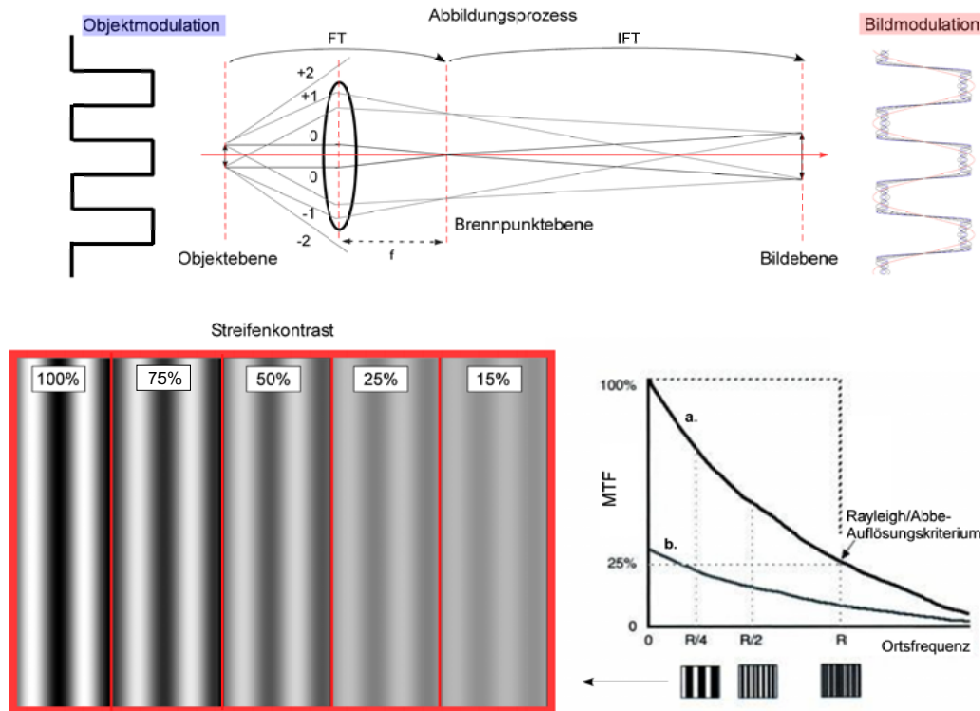


Abbildung C.11: Oben: Eine eindimensionale rechteckförmige Objektstruktur in der Form eines Liniengitters (Rechteckfunktion, praktisch z.B. eine Ronchi-Lineatur) wird durch eine Linse (Fouriertransformator) zunächst als FT in der Brennpunktebene und letztlich als inverse FT in der Abbildungsebene dargestellt. Die Brennebene wird auch als „reziproker Raum“ bezeichnet, da hier eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Größe eines Objektes im Ortsraum und der Lage der Interferenzstruktur im Fourierraum besteht. Kleine Objekte erzeugen Interferenzstrukturen weiter weg von der optischen Achse, große im zentralen Bereich. Im Beispiel werden dabei gerade die 0. und die beiden ersten Beugungsordnungen übertragen (Auflösungsgrenze). Rechts in der Bildmodulation sind aber die ersten drei Harmonischen berücksichtigt. Unten links: Unterschiedliche Kontrastübertragungen bei gleichbleibender Linienzahl im Bildbereich (Raumfrequenz = Linienzahl/Längenmaß). Unten rechts: Der erreichbare Intensitätsunterschied zwischen den beiden Maxima 0. Ordnung und dem gemeinsamen lokalen Minimum benachbarter, überlappender iPSFs liegt im *Rayleigh-Limit* mit inkohärenter Strahlung bei ca. 26%. Dieses Limit legt nach Konvention die Grenzfrequenz der Modulation fest. Die Größe der kleinsten übertragbaren Struktur im Ortsraum ist dadurch i.d.R. festgelegt.

System eine OPL<sup>15</sup> (*optical path length*) und damit eine OPD = 0<sup>16</sup> (*optical path difference*). Sie werden dann *beugungsbegrenzt* in der Bildebene dargestellt. Die laterale 2d iPSF der Infokusebene ist dabei symmetrisch und zeigt eine „verwaschene“ Intensitätsverteilung (*Airy pattern*). Bei dieser Verteilung befinden sich ca. 84% der Intensität im zentralen *Airyscheibchen*, ca. 91% im Scheibchen einschliesslich der ersten Nebenmaxima und ca. 94% einschliesslich der zweiten Nebenmaxima. Verwendet man Laserstrahlung mit einem TEM<sub>00</sub>-Profil (Transmission T=99%, Beleuchtungsblende) befinden sich noch ca. 86% der Ausgangsintensität im transmittierten Strahlprofil, innerhalb der 1/e<sup>2</sup>-Taille (ohne Berücksichtigung des Verlustes an Luft/Glas-Grenzflächen). Real wird eine vollkommen aberrationsfreie Abbildung i.d.R. nicht für alle Strahlen, die über die gesamte Krümmungsfläche der Linse („Strahlen-F-Zahl“) treten, vollständig erfüllt sein. In der Praxis kommt wahrscheinlich immer eine OPD ≠ 0, hinsichtlich einer idealen Kugelwelle mit einem Krümmungsmittelpunkt im Ort des idealen Bildpunktes, vor. Aberrationen, die aufgrund von Fehlern der Linsenoberfläche(n) zur idealen Sphäre entstehen können bzw. Korrekturen dieser, werden i.d.R. in berechneten optischen Systemen als Bruchteil der Wellenlänge angegeben, für

<sup>15</sup>Mit  $OPL = n \cdot x; \Lambda = \int n(x) \cdot dx; \Lambda = \sum_n^N n_i x_i = \Delta\varphi/k$ , wird die optische Weglänge bezeichnet. Betrachtet werden also die unterschiedlichen Glas- und Luftabstände der Strahlen bzw. Laufzeitdifferenz ebener Wellen. n = Brechzahl, k = Wellenzahl, x = Länge.

<sup>16</sup>Bei symmetrischen Anordnungen wird das Integral über den Pupillendurchmesser = 0.

die sie zutreffen. Eine OPD von Teilwellen zu einer Referenzwelle bedeutet außerdem eine Änderung der Phase im Bildpunkt [362].

### Gütemaß

Als relatives *Gütemaß* zur Beurteilung der Amplitudenverteilung in der Infokusebene wird einerseits die mittlere quadratische Abweichung aller Meßpunkte einer *realen Wellenfront* gegenüber einer idealen Wellenfront (rms-error, root-mean-square) gebildet. Aus dem RMS-Wert kann dann die *Strehlsche Definitionshelligkeit* ( $SR$ ), d.h. das Verhältnis der Intensitätsmaxima  $SR = \frac{I_{max,real}}{I_{max,ideal}}$ , bestimmt werden. Bei einer Wellenlänge ergibt der *maximale* Weglängenunterschied  $PV$  (Peak-to-Valley Wert) eine Länge, die im Verhältnis zur Wellenlänge der verwendeten Strahlung als Charakterisierung der Güte der Linsenfläche(n) herangezogen werden kann. Für ein ideales System ohne Abweichung erhält man eine Strehlsche Definitionshelligkeit von  $SR = 1$ . In der Fertigung hochwertiger Objektive können heute i.d.R. Werte von  $SR \approx 0.9$  oder sogar größer erreicht werden [363]. Eine Optik wird i.d.R. als beugungsbegrenzt bezeichnet, wenn ein Strehlwert von  $SR \geq 0.8$  in (nahen) Defokusebenen erreicht werden kann. Dies entspricht in etwa für die mittlere Wellenlänge polychromatischen sichtbaren Lichtes (VIS) von  $\lambda = 550 \text{ nm}$  einem  $RMS \approx \lambda/14$ . Es werden dabei ausschliesslich Öffnungsfehler berücksichtigt, mit einem  $PV \leq \lambda/4$  (Rayleigh-Kriterium). Verallgemeinert kann dies auch auf andere Bildfehler erweitert werden (Marechalnäherung mit Zernikekoeffizienten).

## C.4 Räumliche Ortsauflösung

Die Berechnung der hier angegebenen Kriterien zur Definition einer Punktauflösung kann aus dem Konzept der Beschreibung einer dreidimensionalen Punktbildfunktion (iPSF) abgeleitet werden.

### Defokusebenen

Geht man zunächst von nicht notwendigerweise symmetrischen Verhältnissen in beiden Raumrichtungen der betrachteten Bildpunktebene aus, erhält man für die aPSF mit  $x_0, y_0$  den Koordinaten der Aperturbene (dünne Linse) und  $f$  der Brennweite sowie  $d_1, d_2$  den Abständen der konjugierten Defokusebenen im Objekt- (1) und Bildraum (2) [266]:

$$h'(x, y) = \int \int P(x_0, y_0) \exp\left(\frac{-ik}{2} \left(\frac{1}{f} - \frac{1}{d_1} - \frac{1}{d_2}\right) (x_0^2 + y_0^2)\right) \exp\left(\frac{ik}{d_1}(x_0x + y_0y)\right) dx_0 dy_0 \quad (\text{C.91})$$

Bei einer linearen ortsunabhängigen Übertragung einer 2D-Punktfunktion aus der Objektebene (nicht dargestellt) in die konjugierte Bildebene entspricht die erhaltene Projektion gerade der aPSF, wenn die Linsengleichung erfüllt ist. Es können weiterhin auch dreidimensionale Objektpunkte betrachtet werden. D.h. wenn man zusätzlich Defokusebenen hinzuzieht, für die dann die Linsengleichung nicht erfüllt wird. Gilt für (C.91)  $d_1 = s - z_1$ ,  $d_2 = s' + z_2$  und für  $s, s', f$  die Linsengleichung ( $z_1 = z_2 = 0$ ), dann ist Gleichung (xx) gültig für den paraxialen Bereich ( $NA < 0.7$ ) mit inkohärenter Strahlung. Wird die Linsengleichung dagegen nicht erfüllt z.B. da,  $\frac{1}{d_1} + \frac{1}{d_2} - \frac{1}{f} = \frac{1}{d_0} \neq 0$ , muss bei der Transformation die veränderte (effektive) Pupillenfunktion  $P_{eff}(x, y) = P(x_0, y_0) \exp\left(-\frac{ik}{2d_0}(x_0^2 + y_0^2)\right)$  und damit der Term des inneren Integrals in (xx) berücksichtigt werden. Die effektive Pupillenfunktion wird auch als defokussierte Pupillenfunktion bezeichnet. Für die defokussierte 2D-Punktfunktion erhält man explizit

aufgestellt dann:

$$h(x, y) = \int \int P_{eff}(x_0, y_0) \exp\left(\frac{ik}{d_1}(x_0x + y_0y)\right) dx_0 dy_0 \quad (\text{C.92})$$

### 3D-PSF bei hoher numerischer Apertur

Im Falle kreisrunder symmetrischer Pupillen wird i.d.R. eine Formulierung in Polarkoordinaten verwendet. Aus der Fouriertransformation der Pupillenfunktion einer kreisrunden Apertur kann die Besselfunktion erster Gattung und nullter Ordnung erhalten werden (Hankel-Transformation). Die 3D-aPSF entspricht dann [266]:

$$h(v, u) = \exp\left(-\frac{iu}{4\sin^2(\alpha/2)}\right) \int_0^\alpha P(\theta) J_0\left(\frac{v\sin(\theta)}{\sin(\alpha)}\right) \exp\left(\frac{iu\sin^2(\theta/2)}{2\sin^2(\alpha/2)}\right) \sin\theta d\theta \quad (\text{C.93})$$

Sie ist gültig für Objektive mit einer hohen numerischen Apertur ( $NA > 1/\sqrt{2} \approx 0.7$ ) und inkohärente Strahlung. Wird die Sinusbedingung erfüllt, gilt für die Pupillenfunktion  $P(\theta) = \cos^{1/2}\theta$ . Eine axiale Verschiebungsinvarianz ist dagegen nur für  $P(\theta) = \text{const.}$  gegeben (Herschel Bedingung). Mit den Koordinaten des Ortsraums bzw.  $r = \sqrt{x^2 + y^2}$  (Ebene) und  $z$  (optische Achse), gilt für die (substituierten) Variablen  $u, v$  dann:

$$\begin{aligned} v &= \frac{2\pi}{\lambda} r \sin(\alpha) \\ u &= \frac{8\pi}{\lambda} z \sin^2(\alpha/2) \end{aligned}$$

mit der Wellenlänge der Strahlung  $\lambda$ , der numerischen Apertur  $\sin\alpha$  ( $n = 1$ ) und dem Beugungswinkel  $\theta$ .

#### C.4.1 Laterale Auflösung nichtkonfokaler Systeme

Bleibt der halbe *Öffnungswinkel*  $\alpha$  der abbildenden Linse bzw. der Eintrittswinkel der Strahlung zur optischen Achse ausreichend klein ( $\alpha < 14^\circ$ ,  $\delta < 1\%$ ), kann die Kleinwinkelnäherung des *paraxialen* Raumes verwendet werden, d.h.  $\alpha \approx \sin(\alpha) \approx \tan(\alpha)$  mit  $\cos(\alpha) = 1$ . Weiterhin sollen die monochromatischen Abbildungsfehler vernachlässigt werden können. Bei der Auflösungsdefinition sind zwei unterschiedliche Betrachtungen möglich. Einerseits die Definition über eine *Einzelpunktauflösung*. Diese richtet sich hauptsächlich bei konfokalen Systemen nach dem FWHM-Kriterium der Beugungsbegrenzung homogener Strahlprofile (Airy pattern) oder eines Gaussprofils das mit unterschiedlichen Aperturgrößen beschnitten wird. Alternativ zum FWHM-Kriterium der konfokalen Mikroskopie steht die Einzelpunktauflösungsdefinition, anhand der Lage der ersten Nullstellen, jeweils zwischen dem Hauptmaximum und den 1. Nebenmaxima, sofern diese deutlich genug ausgeprägt sind. Oftmals treten an die Stelle der Nullstellen deshalb lokale Minima. Andererseits existiert eine Definition der Auflösung durch eine Darstellung *zweier* unmittelbar benachbarter *Bildpunkte* mit dann i.d.R. identischer Helligkeit (Zweipunktauflösung). Da unmittelbar benachbarte Punkte eine gemeinsame Intensitätsfunktion bilden, besteht prinzipiell kein Unterschied, ob eine (reine) Einzelpunktintensität oder zwei benachbarte Punktintensitäten betrachtet werden. Hier wird im weiteren Verlauf der Begriff der „Auflösung“ i.d.R. als räumlich kleinste Längendimension in der betrachteten Richtung im Ortsraum verwendet.

#### Kriterium nach Rayleigh

Die laterale beugungsbegrenzte Auflösung der Weitfeldmikroskopie mit inkohärenter Strahlung wird i.d.R. mit dem Rayleigh-Kriterium bestimmt (Phil. Mag., 8, 261, 1879). Hieraus resultiert ein deutlich erkenn-

barer Abstand  $\Delta x$  in der Objekt- und Bildebene. Der Faktor 1.22 in (C.94) ergibt sich aus dem Betrag der ersten Nullstelle der *Besselfunktion* erster Gattung und erster Ordnung, normiert mit der Kreiszahl  $\pi$ <sup>17</sup>. Für eine Punktabbildung im paraxialen Bereich des Mediums Luft, erhält man (bezogen auf eine dünne Linse):

$$\Delta x = 1.22 \cdot \frac{f \lambda}{D_{eff}} = \frac{0.61 \lambda}{n \sin(\alpha)} \quad (\text{C.94})$$

Der effektive Durchmesser  $D_{eff}$  entspricht der *Apertur* der Linse. Die Wellenlänge des transmittierten monochromatischen Lichtes ist  $\lambda$ . Der Ausdruck  $n \cdot \sin(\alpha)$  wird als *numerische Apertur NA* bezeichnet. Eine alternative Formulierung mit der sogenannten f-Zahl (*Blendenzahl*) einer Linse ergibt eine Näherung für den paraxialen Raum:

$$f^\# = \frac{f}{D_{eff}} = \frac{n}{2NA} \approx (1 - m) \frac{f}{D_{eff}} \quad (\text{C.95})$$

und wird in dieser Form sehr häufig in der Laseroptik verwendet. Neben  $f^\#$  ist auch die Schreibweise  $f/\#$  sehr gebräuchlich. Hier stellt  $m$  den Vergrößerungsfaktor der Linse dar.

Zwei in der paraxialen Zone nebeneinanderliegende Objektpunkte sind (nach Definition) gerade noch als deutlich getrennt abbildbar, wenn ihre gleichintensiven ungebeugten Helligkeitsmaxima, um mehr als eine Halbwertsbreite (FWHM des 0. Maximums) auseinanderliegen. Das Rayleighkriterium legt das 0. Maximum der Punkte exakt in das erste Minimum des jeweils anderen Punktes (1. Nullstellen, symmetrische Airy pattern). Geht man von einer homogen ausgeleuchteten Linse bzw. Apertur aus, beträgt der vorhandene Unterschied (lokales Minimum) zwischen den ungebeugten Maxima der gemeinsamen Intensitätsfunktion dann noch ca. 26.4% und entspricht einer Modulation von 0.15. Die Objektpunkte befinden sich dabei in einem Längsabstand zur Linsenoberfläche von  $2f \geq s \geq f$ . Der Abstand  $s$  bei endlich nahen Gegenständen wird bei zusammengesetzten Objektiven auch als Arbeitsabstand (*working distance*) bezeichnet.

### Strahldurchmesser im Fokus

Es lässt sich mit obiger Definition auch ein Fokusbereich  $d_{Airy}$  eines beugungsbegrenzten und zentrisch um die optische Achse abgebildeten monochromatischen Strahlenbündels in der Brennpunktebene angeben. Abbildungen die nicht auf der optischen Achse liegen können bei nichtkorrigierten optischen Systemen, aufgrund der ausgedehnten Kaustik, erhebliche Bildfehler aufweisen. Für eine *homogen* und von einer ausreichend weit entfernten Punktstrahlquelle ausgeleuchteten dünnen Linse, beträgt der Strahlungsdurchmesser in den Grenzen eines ausgebildeten Airyscheibchens in der Brennpunktebene:

$$d_{Airy} = 2.44 \cdot \lambda f^\# \quad (\text{C.96})$$

Er ist dabei abhängig von der Linsenausleuchtung (Apertur), d.h. dem wirksamen (effektiven) Strahlungsdurchmesser auf der Linse. Die Definition eines Fokusbereichs „spezieller“ Beleuchtung ist oftmals nicht eindeutig. Optische Methoden der Weitfeldmikroskopie dieser Art verbessern i.d.R. nicht die Auflösung (SMI, *Spatially Modulated Illumination*) [266]. Eine strukturierte Beleuchtung einiger fokussierender Methoden erfordert deshalb ggf. mehrere Ansätze zur Bestimmung eines brauchbaren Fokusbereichs. Ein häufig für radiärsymmetrische Laserprofile verwendetes Maß, ist das des  $I_{Peak}/e^2$ -Kriteriums oder aber auch dasjenige der (zentralen) zweiten Momente (= Varianz) der Intensitätsverteilung. Man

<sup>17</sup>Es besteht durch umstellen der Gleichung eine einfache Beziehung zwischen Winkelauflösung (Raumwinkel) und lateraler Ortsauflösung als Abstand in der Ebene, in einer Projektionsentfernung.

kann hierbei, je nach Strahlprofil und Strahlbegrenzung bzw. der effektiven Strahlgröße auf der Linse, Ergebnisse erhalten die von (C.96) abweichen. Im weiteren Verlauf wird der Linsendurchmesser  $D = D_{eff}$  i.d.R. im Sinne des effektiven Strahlungsdurchmesser auf der Linse verwendet.

### Kriterium nach Sparrow

Neben dem Auflösungskriterium nach Rayleigh, ist die Interpretation des *Auflösungskriteriums nach Sparrow* bei einigen Detektionsarten anwendbar (ApJ, 44, 76, 1916). Demnach können zwei Objektpunkte noch als voneinander getrennt erkannt werden, wenn ihre gemeinsame Intensitätsfunktion entlang ihrer zentralen Verbindungsachse ein (lokales) Minimum aufweist, obwohl der Kontrast praktisch verschwindet. Für inkohärente Strahlung selbstleuchtender Objektpunkte, deren 0. Maxima gleichintensiv sind, gilt für den kleinsten noch trennbaren Abstand nach Sparrow ein Vorfaktor von ca.  $2.98/\pi$ :

$$\Delta x = 0.95 \cdot f \cdot \frac{\lambda}{D} \quad (\text{C.97})$$

Hierbei tritt anstelle des Minimum-Kriteriums die Bedingung, daß die zweite Ableitung der (gemeinsamen) Intensitätsfunktion gegen den Beugungswinkel einen Vorzeichenwechsel durchführt bzw. im entsprechenden Abstand eine Nullstelle aufweist. Dieses Kriterium greift damit auch bei einem Maximum. Eine getrennte Bildpunktdarstellung erfordert dabei allerdings eine Entfaltung im Ortsraum (*Dekonvolution*). Während im Falle kohärenter Strahlung (Interferenz) das Auflösungskriterium nach Rayleigh unverändert gemäß (C.94) bleibt, sind die Punkte aber ad hoc nicht mehr als getrennt voneinander erkennbar. Das Kriterium nach Sparrow ändert sich, wenn man von einer minimalen Phasenverschiebung bzw.  $\Delta\varphi \rightarrow 0$  beleuchteter Punkte ausgeht (ca.  $4.59/\pi$ ):

$$\Delta x = 1.46 \cdot f \cdot \frac{\lambda}{D} \quad (\text{C.98})$$

Das Ausmaß der Phasenverschiebung bei nichtselbstleuchtenden Objekten legt im Falle des Sparrow-Kriteriums generell unterschiedliche Argumentationen nahe, da bei einer Phasenverschiebung um  $\pi$  praktisch immer ein lokales Minimum der Summenintensität, zwischen den sich annähernden Punktintensitäten vorhanden ist. Die Summenintensität wird dabei aber durch destruktive Interferenz der Amplituden extrem abgeschwächt. Die physikalische Natur eines Objektpunktes ist aber (natürlich) unabhängig von der Art des Kriteriums seiner Beschreibung, weshalb die Behandlung von Intensitätsverteilungen mit Funktionen (bei Spektrometern und/oder Mikroskopen), die sich in der Zentrums- und Flankenverteilung unterscheiden aber ein identisches FWHM-Maß besitzen, oft nur von akademischem Wert bzw. ein gerätespezifisches Phänomen [267].

### Mikroskopische Abbildung und Beleuchtung

Der Vorfaktor  $k$ , der auch oft als „physiologischer“ Faktor bezeichnet wird, kann aufgrund unterschiedlicher Definitionen für ein bestehendes optisches System wechseln. Das Verhältnis der (monochromatischen) Wellenlänge zur numerischen Apertur bleibt dagegen konstant und hängt nicht z.B. von der Art der Beleuchtung bzw. Strahlung und deren Kohärenz ab:

$$CD = k \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (\text{C.99})$$

Man erkennt, daß für die Weitfeldmikroskopie mit in der Objektebene fokussierter inkohärenter bzw. teilkohärenter Strahlung (polychromatische Temperaturstrahler) die Abbildungen mit apochromatischen Objektiven eine maximale laterale Punktauflösung ( $CD$ , *critical dimension*) besitzen, die durch die Brechungsindizes der Medien (zwischen Objekt und Objektiv) und den Öffnungswinkel des Objektivs und

damit durch das Phänomen der Beugung beschränkt sind. Das Quadrat der numerischen Apertur ist nach Abbe proportional der gesamten Beleuchtungsstärke des Bildes (Helligkeit des Bildpunktes). Macht man das Auflösungsvermögen beleuchteter Objekte nach Abbe an einem minimal darstellbaren eindimensionalen Gitterabstand fest, wobei das Gitter mit zur optischen Achse parallelen kohärenten Strahlen beleuchtet wird, dann ist mindestens das Licht einer der beiden ersten Beugungsordnungen notwendig, um Informationen über den Gitterabstand erhalten zu können. Die Intensität der 0. Ordnung liefert keine Information über die Struktur. Der maximal auflösbare minimale Gitterabstand ist dann gekennzeichnet durch die numerische Apertur des Objektivs. Diese muss mindestens dem Sinus des Winkels der ersten Beugungsordnung(en) entsprechen,  $n \sin(\alpha) \geq n \sin(\theta_1) = \frac{\lambda}{g}$ , und der kleinste Gitterabstand ist dann  $g = \frac{\lambda}{NA}$ . Diese Situation kann praktisch nicht unterboten werden. Mit kohärenter paralleler Strahlung ist es demnach möglich, wenn es sich bei dem betrachteten Gitter um ein reines „Amplitudenobjekt“ handelt oder die Phase eine maximale Interferenz erlaubt, den Gitterabstand  $g$  und damit die Anzahl der Stege noch korrekt zu bestimmen, wenn eine „Foucaultsche Schneide“ eingesetzt wird, die die Hälfte der Pupille abdeckt, das 0. Maximum aber symmetrisch passieren lässt. Das erhaltene Bild ist dann um den Faktor 0.5 kontrastschwächer und es wird zusätzlich nur eines der 1. Nebenmaxima übertragen. Der Gitterabstand bzw. die Anzahl der Stege im Bild wird dennoch korrekt abgebildet.

Verwendet man die Halbwertsbreitendefinition der Peakintensität (FWHM) für eine Einzelpunktauflösung (*scanning microscopy*) auch bei der Weitfeldmikroskopie, ergibt sich mit inkohärenter Strahlung als Näherung für die Besselfunktion  $J_1(x) = \frac{x}{2\sqrt{2}}$ , an der Stelle  $x_{FWHM} = \pm 1.61633$  und damit ein Vorfaktor  $k \approx 0.51$ . Betrachtet man nicht die Halbwertsbreite, sondern den  $I_0/e^2$ -Abstand an der Stelle  $x_{1/e^2} = \pm 2.58383$ , entspricht das einem Vorfaktor  $k \approx 0.82$ . Mit der Besselfunktion erhält man Lösungen des Kirchhoffschen Beugungsintegrals.

Handelt es sich um kohärente Strahlung und betrachtet man ein „Phasenobjekt“ (wechselnder Brechungsindex) unter *Defokusbedingungen* (symmetrische CTF, sphärische Aberration), kann die Phasenverschiebung in der Fourierebene des optischen Systems mit der Wellenfrontaberration (für eine Richtung der Ebene z.B.  $x$ )  $\Delta W = \frac{1}{2}\Delta z \frac{x^2}{f^2}$  berechnet werden:

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi\Delta W}{\lambda} = \frac{\pi\Delta z}{\lambda} \frac{x^2}{f^2} \quad (\text{C.100})$$

### Hellfeld-Beleuchtungsprinzipien

Eine Art der Beleuchtung nichtselbstleuchtender Objekte kann im Durchlichtverfahren z.B. mit einem Kondensator erreicht werden (Beleuchtung nach Nelson). Diese Art der Beleuchtung wird gelegentlich auch als *kegelförmige* oder *kritische* Beleuchtung bezeichnet, bei der direkt die (i.d.R. punktförmige) Lichtquelle in der Präparatebene abgebildet wird. Der Bildhintergrund weist so aber fast immer Artefakte aus der Oberfläche der Lichtquelle auf, die oftmals störend wirken können. Die Abbildung ist an der Grenze des Auflösungsvermögens meistens undeutlich, da eine Ortsunschärfe auftritt. Bei biologischen Proben wird im Durchlichtverfahren deshalb überwiegend eine veränderte Kondensatoranordnung verwendet. Diese gewährleistet einen einheitlich hellen Bildhintergrund ohne Artefaktabbildungen, die aus unterschiedlichen Ebenen stammen können (Linse, Lichtquelle, etc.). Durch minimale Veränderung der axialen Kondensatorposition kann die Schärfebene der Leuchtfeldblende eingeregelt und damit der Lichtstrom der entsprechenden Stelle projiziert werden. Es handelt sich bei diesem Prinzip um die *köhlersche* Beleuchtung. Der *köhlersche* Beleuchtungsstrahlengang bildet die Leuchtfeldblende der Durchlichtstrahlungsquelle in der betrachteten Präparatebene ab und gewährleistet so eine gleichmäßige Probenbeleuchtung mit einem



einheitlich hellen Hintergrund im Bildfeld. Dies sorgt für eine optimale Kontrastbildung mit den abzubildenden Strukturen des Objektes. Bei der Lichtmikroskopie nicht selbstleuchtender Objekte wird i.d.R. mindestens die Phasenbeziehung des Lichtes bei der Propagation im Objekt verändert. Bei Reflexionen an einem optisch dichteren Medium entsteht zusätzlich ein Phasensprung um  $\lambda/2$ . Bei der Köhlerschen-Beleuchtung ist also unabhängig von der Beleuchtungsquelle überwiegend mit inkohärenter Strahlung zu rechnen. Im Falle der Verwendung eines Kondensors im Durchlichtverfahren ist die numerische Apertur zur Berechnung der Bildpunktauflösung eine Zusammensetzung aus Objektiv und Kondensor ( $NA_{\text{Objektiv}} + NA_{\text{Kondensor}}$ ). Ein dabei theoretisch abbildungsfehlerfreier (ideal korrigierter) Kondensor kann die prinzipiell erreichbare laterale Auflösung betrachteter Objekte aber nicht über die zuvor genannten Grenzen steigern [269].

### Steigerung der Auflösung

Praktisch kann durch Verwendung von z.B. Immersionsflüssigkeiten mit einem Brechungsindex, der in der Größenordnung des verwendeten Glasmaterials liegt, ein Übergang von einem optisch dichteren Medium (Deckglas, Durchlicht) zu einem optisch dünneren Medium (Luft) vermieden werden. Werte für die  $NA \geq 0.7$  werden so auch mit Objektiven einer geringen  $NA \leq 0.6$  möglich. Man erhält auf diese Weise bei gleichbleibendem Öffnungswinkel des Objektivs, praktisch immer eine größere numerische Apertur im Vergleich zu Luft, da die Totalreflexion an der Grenzfläche zum optisch dünneren Medium vermieden werden kann. Effektiv bedeutet das eine Vergrößerung des Eintrittswinkels<sup>18</sup> der Strahlung. Zu beachten bleibt, daß eine echte Detailinformation i.d.R. verlorengeht, wenn bei Weitfeldanordnungen Beugungsnebenmaxima von der Übertragung ausgeschlossen werden. Vergrößerungen, die keine Detailinformationen darstellen, werden auch als „Leervergrößerung(en)“ bezeichnet. Einzelne Punkte erscheinen so lediglich deutlicher getrennt voneinander. Eine detailliertere Darstellung strukturierter Objekte erfordert, wie zuvor erwähnt, mindestens die 1. Nebenmaxima. Es verbleibt als letzte Option mit monochromatischen Anordnungen noch die Möglichkeit, die eingesetzte Wellenlänge zu verringern, um in einer Apparatur noch eine höhere Auflösung erreichen zu können.

### C.4.2 Laterale Auflösung konfokaler Systeme

In konfokalen Auflichtmikroskopen verwendet man zur Beleuchtung (Reflexion, Fluoreszenz) und Abbildung von Punktintensitäten ein und dasselbe Objektiv. Die Optiken konfokaler Mikroskope zeigen prinzipiell kein anderes Auflösungslimit, als das des konservativen Rayleigh-Kriteriums. Es wird dabei aber nicht unmittelbar gleichzeitig aus einer Beleuchtung des gesamten Objektes eine Abbildung erstellt, wie in der Weitfeldmikroskopie. Das Bild wird aus diskreten Punkten (Punktintensitäten) einzeln und nacheinander rasternd aufgebaut. Dies ermöglicht die Anwendung einer realen Einzelpunktauflösung, gemäß der Nullstellenlage oder alternativer Definitionen z.B. der Halbwertsbreite einer Intensitätsverteilung [269]. Das Haupteinsatzgebiet konfokaler Systeme in der biologischen Forschung ist die Fluoreszenzmikroskopie. Hier wird die erreichbare laterale Auflösungssteigerung, aufgrund von i.d.R. vollständig inkohärenter Strahlung der selbstleuchtenden Objektpunkte, im Zusammenhang mit sehr kleinen Detektionspupillen maximal. Konfokale Systeme mit einer Detektionspupillengröße zwischen 1 AU und 5 AU (AU = Airy Unit) erreichen zunächst nur die laterale Halbwertsbreitenauflösung der Weitfeldmikroskopie,

$$d_{(FWHM)} = 0.51 \frac{\lambda}{NA} \quad (\text{C.101})$$

<sup>18</sup>Eine einfache Beispielrechnung zeigt, daß durch Verwendung eines Immersionsöls (z.B. Zedernöl) mit Brechungsindex  $n \approx 1.5$  mit einem Objektiv einer  $NA = 0.6$  an Luft ( $\alpha \approx 37^\circ$ , Luft) eine Vergrößerung des Winkels  $\theta \rightarrow 65^\circ$  ( $NA=1,36$ ) erreicht werden kann. Die laterale Bildpunktauflösung der Weitfeldmikroskopie würde sich dabei dem theoretischen Limit von  $d \approx \lambda/2$  nähern.

reduzieren aber gegenüber dieser den Streulichtanteil der Abbildung und führen damit i.d.R. zu einer deutlichen Kontrastverbesserung. Erst bei Blendengrößen im Bereich von  $D \leq 0.25$  AU verbessert sich die laterale Auflösung dann deutlich. Es folgt in guter Näherung für Fluoreszenzmessungen:

$$d_{(FWHM)} = 0.61 \frac{\lambda_{em}}{NA \sqrt{2}} \quad (C.102)$$

$$\approx 0.4 \frac{\lambda_{em}}{NA} \quad (C.103)$$

bzw. unter Verwendung der gemittelten Wellenlänge aus Anregungs- und Fluoreszenzlicht,  $\bar{\lambda} \approx \sqrt{2} \frac{\lambda_{em} \lambda_{an}}{\sqrt{\lambda_{an}^2 + \lambda_{em}^2}}$  [269]:

$$d_{(FWHM)} \approx 0.74 \cdot f \cdot \frac{\bar{\lambda}}{D} = 0.37 \frac{\bar{\lambda}}{NA} \quad (C.104)$$

Ein weiterer Vorteil betrifft die axiale Auflösung.

### C.4.3 Axiale Auflösung

#### Weitfeldmikroskopie

Auch die axiale Auflösung (entlang der z-Achse) der Weitfeldmikroskopie und der konfokalen Mikroskopie können durch das Konzept der dreidimensionalen iPSF (3D-iPSF) beschrieben werden [269]. Die Schärfentiefe (DOF, *depth of field*) lässt sich, wie die laterale Auflösung mit der Wellenlänge und der numerischen Apertur berechnen. Für den Bereich in dem die axiale Intensitätsverteilung in etwa 80% der Infokusintensität erreicht, gilt die allgemeine Beziehung:

$$DOF = \frac{n\lambda}{2(NA)^2} \quad (C.105)$$

Der Mindestabstand  $\Delta z$  zweier axial hintereinanderliegender Punkte kann dann für sichtbares Licht durch die Näherung, nach der *Berekschen Formel*, ermittelt werden:

$$\Delta z = n \left( \frac{\lambda}{2(NA)^2} + \frac{340 \mu m}{NA \cdot M} \right) \geq \frac{n\lambda}{2(NA)^2} \quad (C.106)$$

wobei  $M$  dem Vergrößerungsfaktor entspricht. Bei Verwendung von Weißlichtquellen (polychromatisches Licht) wählt man i.d.R. eine mittlere Wellenlänge im sichtbaren Bereich,  $\lambda = 0.55 \mu m$ , bzw. die Wellenlänge, für die der Sensor am empfindlichsten ist. Mit korrigierten Apochromaten eines Strehl-Wertes von  $SR \geq 0.8$  bleibt der chromatische axiale Bildpunktfehler,  $\Delta s' \leq DOF$ , dann i.d.R. kleiner als die errechnete Schärfentiefe. Das hat zur Folge, daß ein nicht wellenlängenauflösender Detektor (Sensor), höchstens eine axiale Intensitätsverteilung gemäß Gleichung (C.105) wahrnimmt. Für den Abstand des 0. Maximums zum ersten axialen Minimum (*Peak-to-Valley*) in einer 3D-iPSF gilt dabei näherungsweise für den Objektraum die Beziehung:

$$\Delta z_{PV} = 1.77 \cdot \frac{n\lambda}{(NA)^2} \quad (C.107)$$

xy-Ebenen außerhalb der Fokusebene ( $z = f$ ) werden als Defokusebenen bezeichnet. Da in der Weitfeldmikroskopie Strahlung aus Defokusebenen nicht ausgeblendet werden kann, tragen diese im Präparat zur Helligkeitsverteilung im Bild bei (Zerstreuungskreis). Eine reale optische Schnittdicke in einem ausgedehnten Präparat kann deshalb im Falle der Weitfeldmikroskopie nicht mit ausreichender Genauigkeit angegeben werden.



### Konfokalmikroskopie

Anders ist hingegen die Situation bei konfokalen Anordnungen/Apparaturen. Die effektive axiale Auflösung hängt hier, wie auch bei der lateralen Auflösung, entscheidend von der Blendengröße  $D$  des Detektors ab. Man erhält so eine Auflösung, die im Sinne einer echten Punktauflösung im Raum zu verstehen ist. Sie beträgt zunächst mit einer Pupillengröße die zwischen  $1 \text{ AU} < D < 5 \text{ AU}$  liegt, bezogen auf den Objektraum:

$$d = \frac{0.88\lambda_{ex}}{n - \sqrt{n^2 - (NA)^2}} \quad (\text{C.108})$$

Eine echte optische Schnittdicke, die nach dem axialen Auflösungs-Kriterium der 3D-iPSF mit einer Pupillengröße zwischen  $1 \text{ AU} < D < 5 \text{ AU}$  erhalten werden kann, beträgt dann bei Fluoreszenzmessungen, zurückgerechnet auf den Objektraum:

$$d = \sqrt{\left(\frac{0.88\lambda_{em}}{n - \sqrt{n^2 - (NA)^2}}\right)^2 + \left(\frac{\sqrt{2} n D}{NA}\right)^2} \quad (\text{C.109})$$

Verkleinert man die Blendengröße weiter, auf Werte  $D < 0.25 \text{ AU}$ , dann entsprechen sich die optische Schnittdicke und die axiale Auflösung und man erhält unter Berücksichtigung des Stokes-Shifts einer Fluoreszenzmessung, mit einer gemittelten Wellenlänge  $\bar{\lambda}$ , zurückgerechnet auf den Objektraum in etwa:

$$d = \frac{0.64\bar{\lambda}}{\left(n - \sqrt{n^2 - (NA)^2}\right)} \quad (\text{C.110})$$

bzw.

$$d = \frac{1}{4}(z_{min+} - z_{min-}) \quad (\text{C.111})$$

mit  $z_{min+}, z_{min-}$  dem Abstand der ersten axialen Minima zum 0.Maximum.

Axial höchstauflösende konfokale Laser-Mikroskope, bei denen dieses Kriterium noch unterboten werden kann, sind sogenannte  $4\pi$ -Mikroskope. Die Beleuchtung bzw. Anregung und Abbildung wird dabei mit einer Strahlquelle (Laser) über einen Strahlteiler und *zwei* koaxiale Objektive hergestellt. Das Objekt liegt in der konfokalen Infokusebene beider Objektive. Entstehendes Fluoreszenzlicht wird dabei aus der  $4\pi$ -Anordnung, durch die koaxialen NA's beider Objektive gesammelt und vor der Detektion phasengau überlagert [364].

#### C.4.4 Nyquist-Kriterium

Eine Beziehung, die die kleinstmögliche Objektgröße für optisch rasternde Systeme zusammen mit der numerischen Apertur und einem gewählten Auflösungskriterium festlegt, ist die sogenannte *Nyquist-Frequenz*  $f_N$ . Sie wird in der Literatur nicht immer einheitlich definiert und verwendet. Die laterale Auflösung von Objekten ist i.d.R. von der Rasterrichtung und der Lage des abzubildenden Objektes abhängig. Die Abtastfrequenz  $f_a$  einer Rasterung muss zur Darstellung eines periodischen Signales *mindestens* größer als der doppelte Betrag der Signalfrequenz bzw. dem hochfrequentesten Anteil (Frequenzband)  $f_s$  sein, um Aliasing-Effekte (*undersampling*) zu vermeiden:

$$f_a \geq 2 \cdot f_s \quad (\text{C.112})$$

In manchen Referenzen wird die Gleichung  $f_a = 2f_s$  auch als Nyquist-Rate bezeichnet. Die Nyquist-Frequenz  $f_N$  entspricht dann dem höchsten Frequenzanteil, der aus einer Dekonvolution bzw. einer inversen (diskreten) Fouriertransformation, noch als eine ursprüngliche analoge Signalkomponente rekonstruiert werden kann. Anteile höherer Frequenzen werden deshalb i.d.R. ausgeblendet (*Tiefpassfilterung*). Die

ursprünglich von C.E. Shannon vorgeschlagene Definition der Nyquist-Frequenz entspricht der halben Abtastfrequenz [365] [366] [367]:

$$f_N = \frac{1}{2} \cdot f_a \quad (\text{C.113})$$

Abtastfrequenzen über der Nyquist-Rate können ebenso zu Aliasing-Effekten führen (*oversampling*). In Abhängigkeit der Art der Messung kann hierüber eine Steigerung der Auflösung erreicht werden. Im Zusammenhang mit einer ADC-Detektion wird dabei für jedes n. bit einer zusätzlichen Auflösung ein Oversamplingfaktor von 4 benötigt, gemäß:

$$f_{aos} = 4^n \cdot f_a$$

Der Vergleich zwischen einer gewählten Oversampling-Frequenz zur Nyquist-Frequenz, wird dabei als Oversampling-Rate bezeichnet:

$$OSR = \frac{f_a}{2 f_s} \quad (\text{C.114})$$

## Anhang D

# Einige statistische und physikalische Definitionen

Da die Gaussverteilung zur Beschreibung/Approximation von zufallsverteilten Messwerten in vielerlei Hinsicht von zentraler Bedeutung ist, werden im folgenden kurz wichtige Beziehungen zu untersuchender Populationen angegeben und auf diese Verteilung bezogen [219] [45] [368]. Für eine stetige Funktion von reellen Messwerten  $f(x)$  (Dichtefunktion) soll gelten:

$$\int_{-\infty}^{\infty} f(x) dx = 1 \quad (\text{D.1})$$

mit dem Erwartungswert des arithmetischen Mittelwerts  $\langle x \rangle$  der Verteilung (erstes Moment):

$$\langle x \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} x f(x) dx \quad (\text{D.2})$$

In realen Messwertverteilungen ist der wahre Wert  $X$  i.d.R. unbekannt und bei diskreten Messwertverteilungen mit  $n$  Messwerten entspricht der arithmetische Mittelwert einer Stichprobe  $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$ . Der Erwartungswert diskreter reeller Messwerte ist die Summe der Produkte von Messwerten und ihren Wahrscheinlichkeiten (relative Häufigkeiten). Kann man die Anwesenheit des Bias ausschliessen, wird der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$  einer Verteilung i.d.R. als bester Schätzer für den wahren Wert  $X$  angenommen. Der zufällige wahre Fehler  $e_i$  einer Einzelmessung  $x_i$  ist dann  $e_i = x_i - X$  und die Wurzel der mittleren Fehlerquadrate aller Messungen einer Verteilung, die Standardabweichung,  $\sigma = \langle e^2 \rangle^{1/2}$ . Der Wert  $\sigma^2$  (zweites Moment) wird als Varianz oder mittlerer quadratischer Fehler bezeichnet:

$$\sigma^2 = \langle e^2 \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} (x - X)^2 f(x) dx \quad (\text{D.3})$$

Der wahre Fehler des arithmetischen Mittelwertes ist  $E = \bar{x} - X$ . Gedanklich kann man eine abzählbar unendliche Grundgesamtheit ( $x \in \mathbb{N}$ ) in sehr viele kleinere Teilpopulationen (mit hinreichend vielen Werten) aufteilen. Jede der Populationen bildet ihrerseits Mittelwerte aus, die wiederum eine Verteilung erzeugen, die Verteilung der Mittelwerte. Diese Verteilung der Mittelwerte hat die Standardabweichung  $\sigma_m$ , die Standardabweichung der Grundgesamtheit wird hier mit  $\sigma$  bezeichnet. Eine einzelne Meßreihe ist nun eine zufällige Teilpopulation aus vielen möglichen Teilpopulationen und ihr Mittelwert ein Element der Menge der Mittelwertpopulation. Der Fehler des Mittelwertes einer Population, hier als  $E$  bezeichnet, steht mit dem Fehler der Einzelmessung  $e_i$  in Beziehung:

$$E = \bar{x} - X = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - X) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i \quad (\text{D.4})$$

und mit  $i \neq j$  (die Paare  $i=j$  fallen weg)

$$E^2 = \frac{1}{n^2} \sum_{i=1}^n e_i^2 + \frac{1}{n^2} \sum_i^n \sum_j^n e_i e_j \quad (\text{D.5})$$

Der Mittelwert der Varianz (mittlerer quadratischer Fehler) des Mittelwertes ist damit  $\langle E^2 \rangle = \frac{1}{n} \langle e^2 \rangle$  und per Definition ohne Bias gleich der Varianz  $\sigma_m^2 = \langle E^2 \rangle$ . Daraus ergibt sich die Beziehung der Standardabweichung der Grundgesamtheit  $\sigma$  zur Standardabweichung des Mittelwertes:

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (\text{D.6})$$

Eine weitere Bezeichnung für die Standardabweichung des Mittelwertes ist auch Standardfehler. Er wird kleiner, je größer die untersuchte Population wird. Da bei realen Messungen aber nie der wahre Wert  $X$  als Bezug in Frage kommt, da dieser i.d.R. meist unbekannt ist, wählt man den Weg über eine Schätzung von  $X$ . Hierzu werden die Abweichungen der Einzelmessungen zu einem festen Wert  $c$  berechnet,  $d_i = x_i - c$ . Die  $d_i$  werden auch als Residuen bezeichnet und für  $c$  wählt man i.d.R. den arithmetischen Mittelwert der Stichprobenmessungen oder einen gerundeten Wert von diesem. Für kleine  $d_i$  gilt dann  $|c - X| \ll 1$ . Besonders im Zusammenhang mit den quadratischen Abstandsmaßen wählt man das arithmetische Mittel als Bezugsgröße, denn die absolute Differenz:  $\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \leq \sum_{i=1}^n (x_i - c)^2$  besitzt die sogenannte Minimumeigenschaft des arithmetischen Mittels<sup>1</sup>. Die Varianz der Stichprobe, (empirische Varianz) entspricht dann:

$$s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d_i^2 \quad (\text{D.7})$$

Zusammen mit der Definition der wahren meistens aber unbekanntem Fehler über die bekanntem Messgrößen  $x_i - \bar{x} = e_i - E$  erhält man:

$$s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (e_i - E)^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2 - E^2 \quad (\text{D.8})$$

Die Stichprobenmessungen ermitteln also i.d.R. nicht die wahren Fehler, sondern nur scheinbare Fehler. Bei der Massenbestimmung mittels Massenspektrometrie sind die theoretischen Massen der untersuchten Ionen dagegen sehr genau bekannt und die Fehler der Massenabweichung entsprechender Messungen bilden hier den exakten Fehler bis zu einer bestimmten Genauigkeit ab. Theoretisch kann über eine sehr grosse Anzahl von Messreihen der Mittelwert der Varianz  $\langle s^2 \rangle$  bestimmt werden und es gilt der Zusammenhang:

$$\langle s^2 \rangle = \sigma^2 - \sigma_m^2 \quad (\text{D.9})$$

Für  $\sigma^2$  und  $\sigma_m^2$  erhält man unter Berücksichtigung des Besselschen Korrekturfaktors:

$$\sigma^2 = \frac{n}{n-1} \langle s^2 \rangle \quad ; \quad \sigma_m^2 = \frac{1}{n-1} \langle s^2 \rangle \quad (\text{D.10})$$

Praktisch ist eine Vorgehensweise über extrem große Stichprobenumfänge aber i.d.R. ausgeschlossen und man muss für  $\langle s^2 \rangle$  eine Schätzung vornehmen. Als bester Schätzer gilt die aus der Messpopulation erhaltene Größe  $s^2$ . Hierdurch wird dann eine Abschätzung von  $\sigma_m$  und  $\sigma_m^2$  bei unbekanntem  $X$  aus den erhaltenen Stichprobenmesswerten möglich:

$$\sigma_m \cong \frac{s}{\sqrt{(n-1)}} = S \quad ; \quad \sigma_m^2 \cong \frac{1}{n-1} \underbrace{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}_{S_{xx}} = S^2 \quad (\text{D.11})$$

<sup>1</sup>Die Minimumeigenschaft des Medians gilt für  $\sum_{i=1}^n |x_i - \tilde{x}_{0.5}| \leq \sum_{i=1}^n |x_i - c|$ .

Dieser Zusammenhang wird oft als empirische Stichprobenstandardabweichung  $S$  bzw. korrigierte empirische Varianz  $S^2$  bezeichnet. Die korrigierte empirische Varianz ist ein erwartungstreuer Schätzer der Varianz der Grundgesamtheit, die empirische Stichprobenstandardabweichung für die Standardabweichung der Grundgesamtheit i.d.R. dagegen nicht. Nach der sogenannten Jensenschen Ungleichung, angewandt auf die Erwartungswerte:  $\mathbf{E}S = \mathbf{E}\sqrt{S^2} \leq \sqrt{\mathbf{E}(S^2)} = \sigma$ , ist die empirische Stichprobenstandardabweichung oft geringer als die Standardabweichung der Grundgesamtheit, unterschätzt diese also.

Nimmt man an, daß die Stichprobenpopulation aus einer Grundgesamtheit stammt die einer Normalverteilung entspricht, gibt es noch eine weitere Möglichkeit zur Abschätzung von  $\sigma_m$ . Man führt dazu die hier mit  $r$  bezeichnete Größe, als mittleren Betrag der Residuen über  $n$  Messungen ein,  $r = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |d_i|$ . Bildet man erneut mehrere Messreihen, erzeugen diese eine Verteilung ihrer Mittelwerte  $r$  mit einer Standardabweichung  $\langle s^2 \rangle^{1/2}$  sowie der mittleren Abweichung  $\rho = \langle r \rangle$ . Wenn auch diese Verteilung der Mittelwerte (der Residuen)  $r$  einer Gaussverteilung entspricht, gilt:

$$\frac{\langle s^2 \rangle^{1/2}}{\langle r \rangle} = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \quad (\text{D.12})$$

Die Standardabweichung des Mittelwerts ergibt dann

$$\sigma_m = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \frac{\langle r \rangle}{(n-1)^{1/2}} \quad (\text{D.13})$$

Für  $\langle r \rangle$  kann als bester Schätzer  $r$  dienen, für eine Approximation von  $\sqrt{\frac{\pi}{2}} \approx 5/4$ . Damit erhält man die auch als Peters Formel bekannte Abschätzung der Standardabweichung des Mittelwerts für eine Gaussverteilung:

$$\sigma_m \cong \frac{5}{4} \frac{r}{(n-1)^{1/2}} \quad (\text{D.14})$$

Es ist damit auch möglich den Standardfehler einer Einzelmessung abzuschätzen mit  $\sigma = \sqrt{n}\sigma_m$ :

$$\sigma \cong \frac{5}{4} \left( \frac{n}{(n-1)} \right)^{1/2} r \quad (\text{D.15})$$

bzw. mit der Näherung  $[n(n-1)]^{1/2} \cong n - 1/2$ , die nicht zwingend einen Mittelwert als Lagemaß voraussetzt:

$$\sigma \cong \frac{5 \sum_{i=1}^n |d_i|}{4 n - 1/2} \quad (\text{D.16})$$

Bei einer Gaussverteilung ist eine Abschätzung von  $\sigma_m$  über Peters Formel um ca. 7% größer als die über  $S$ . Eine solche Fehlerabschätzung ist also tendenziell etwas ungenauer.

## D.1 Die Gaussverteilung

Legt man als stetige Dichtefunktion der reelwertigen Messwerte eine Gaussverteilung  $f(x) = e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}}$  zu Grunde, führt eine Normierung hinsichtlich der Fläche durch und bestimmt die Lageparameter  $\mu$  und  $\sigma$  mit  $\mu \in \mathbb{R}$  und  $\sigma^2 \in (0, \infty)$ , erhält man die Normalverteilung  $N(\mu, \sigma^2)$  aus der mit  $\mu = 0$  und  $\sigma^2 = 1$  die Standardnormalverteilung wird:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-(x-\mu)^2/2\sigma^2}; \quad \varphi(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-z^2/2} \quad (\text{D.17})$$

$\varphi(z)$  ist mit der Transformation  $z = x - \mu/\sigma$ , die allgemeine Form, in die jede Normalverteilung zu einer Standardnormalverteilung gebracht werden kann. Es folgt für die Varianz der Normalverteilung:

$$\sigma^2 = \int_{-\infty}^{\infty} x^2 f(x) dx = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} x^2 e^{-x^2/2\sigma^2} dx \quad (\text{D.18})$$

Besonders im Zusammenhang mit Tests ist man daran interessiert, welcher Anteil einer Messpopulation in einem bestimmten Intervall einer Messwertverteilung anzutreffen ist. Dieser entspricht bei stetigen Verteilungen dem Integral der Dichtefunktion in bestimmten Grenzen. Der wahre Wert  $X$  einer zufallsverteilten Größe wird im Zusammenhang mit der Gaussverteilung in der Literatur oft mit  $\mu$  bezeichnet und  $X$  als Zufallsgröße. Es liegen 50 Prozent aller Messwerte einer zweiseitigen Normalverteilung innerhalb der Grenzen von  $\mu \pm 0.67\sigma$ . Da eine geschlossene Integration nicht möglich ist, wird die Verteilungsfunktion der Gaussfunktion, wie die Dichtefunktion numerisch approximiert. Nach (D.1) ist das Integral über alle Werte = 1 und im Fall der Gaussfunktion erhält man über ein Zweifachintegral mit Polarkoordinaten den Wert  $2\pi$ . Die gaußsche Dichtefunktion ist damit durch den Faktor  $1/\sqrt{2\pi}$  normiert. Für die Verteilungsfunktion erhält man:

$$F(x) = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-(y-\mu)^2/2\sigma^2} dy = \phi\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right) ; \phi(z) = \int_{-\infty}^z \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-y^2/2} dy \quad (\text{D.19})$$

beziehungsweise nach einer Transformation und Substitution der Integrationsgrenzen  $\phi(z)$  oftmals auch als  $\phi_{0,1}(z)$  bezeichnet sowie  $\phi_0(z)$ , das gaußsche Fehlerintegral, das für diskrete  $z \in \mathbb{R}^+$  in Tabellen vertafelt ist. Negative Werte sind mit der Beziehung  $\phi_0(-z) = 1 - \phi_0(z)$  zu berechnen, Zwischenwerte kann man durch Interpolation erhalten. Im Prinzip kann somit jede Normalverteilung mit beliebigem  $\mu$  und  $\sigma^2$ ,  $N(\mu, \sigma^2)$  als Standardnormalverteilung  $N(0, 1)$  behandelt werden, wenn eine entsprechende lineare Transformation:

$$X \sim N(\mu, \sigma^2) \implies \frac{X-\mu}{\sigma} = Z \sim N(0, 1)$$

und im Anschluss eine Substitution der Integrationsgrenzen erfolgt. Das gaußsche Fehlerintegral  $\phi_0(z)$  in den Integrationsgrenzen 0 und  $z$ , mit  $z \rightarrow \infty$ :

$$\phi_0(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_0^z e^{-y^2/2} dy = \phi(z) - \frac{1}{2} \quad (\text{D.20})$$

steht mit der (gaußschen) Fehlerfunktion  $\text{erf}(z)$  in folgender Beziehung:

$$\text{erf}(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z e^{-y^2} dy = 2\phi_0(z\sqrt{2}) \quad (\text{D.21})$$

In den entsprechenden Tabellen geben die Werte des gaußschen Fehlerintegrals die Wahrscheinlichkeit dafür an, daß bei bekannter Streuung  $\sigma^2$  zu einem bestimmten Fehlerniveau ( $\alpha$ ) ein Prozentsatz der Daten bzw. der Mittelwert der Verteilung innerhalb bestimmter Vertrauensgrenzen liegt. Die normierte Zufallsvariable  $Z$  kann entweder auf die Mittelwertverteilung ( $\bar{Z}$ ) oder auf eine Verteilung aus der Grundgesamtheit bezogen werden:

$$\frac{\sqrt{n}\bar{X}-\mu}{\sigma} = \bar{Z} \sim N(0, 1) ; \frac{X-\mu}{\sigma} = Z \sim N(0, 1) , \text{ für } n \geq 1.$$

Wobei  $\bar{X}$  der aus den Messungen bekannte Mittelwert der Mittelwertverteilung ist. Die Werte von Intervallgrenzen  $x_1, x_2$  von hinsichtlich  $\mu$  und  $\sigma^2$  beliebig gaussverteilter Zuallsvariablen können dabei in die Werte  $z_1, z_2$  der Standardnormalverteilung übertragen werden und als Schranken Verwendung finden. Die Dichtefunktion der Mittelwertverteilung liegt dabei „enger“ um den Wert  $\mu$ , als eine Dichtefunktion aus der Grundgesamtheit. Es gilt für die Wahrscheinlichkeit  $P$  mit zu bestimmenden Schranken  $\varepsilon$ :

$$P(|X - \mu| \leq \varepsilon) = 2\phi\left(\frac{\varepsilon}{\sigma}\right) - 1$$

und

$$P(|\bar{X} - \mu| \leq \varepsilon) = 2\phi\left(\frac{\sqrt{n}\varepsilon}{\sigma}\right) - 1$$

In einer „Entfernung“ von höchstens  $\mu \pm 3\sigma$  liegen ca. 99.8% aller Werte der Standardnormalverteilung. Wählt man z.B.  $\varepsilon = 0.5\sigma$ , folgt, daß bei einem Stichprobenumfang von  $n=49$ ,  $\bar{x}$  mit einer Sicherheit von 99.95% maximal von  $\mu$  um  $\pm 0.5\sigma$  entfernt liegt. Wenn eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  vorgegeben wird, soll der Zusammenhang gelten:

$$P(|Z| \leq \varepsilon) = 2\phi(\varepsilon) - 1 = 1 - \alpha$$

Die Tabellenwerte entsprechen dann  $\varepsilon = \varepsilon(\alpha)$ . Durch die Beziehung  $|Z| \leq \varepsilon(\alpha)$  erhält man damit sogenannte Vertrauensgrenzen, die ein Intervall (Konfidenzintervall)  $\bar{x} \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \varepsilon(\alpha)$  mit einem Konfidenzniveau  $1-\alpha$  beschreiben. Der entsprechende Wert  $\varepsilon$  der Verteilung zu einer Wahrscheinlichkeit  $P$  wird als P-Quantil bezeichnet. Das P-Quantil gibt die obere Schranke an, die P-% aller Werte der Verteilung enthält.

Die Approximation der Verteilungsfunktion  $\phi(x)$  der Standardnormalverteilung nach Hastings für  $x > 0$  ist:

$$\phi(x) \cong 1 - \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot e^{x^2/2} \cdot (a_1 t + a_2 t^2 + a_4 t^4 + a_5 t^5)$$

mit

$$t = \frac{1}{1+bx}, a_1 = 0.31938153, a_2 = -0.356563782, a_3 = 1.781477937, a_4 = -1.821255978, a_5 = 1.330274429$$

Weiterhin kann für eine beliebige, also nicht zwingend normalverteilte, Zufallsgröße die sogenannte mittlere Abweichung der Verteilung, der mittlere Fehler  $\rho$  ermittelt werden:

$$\rho = \langle |e| \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} |x - X| f(x) dx \quad (\text{D.22})$$

dieser beträgt für die Normalverteilung mit  $x \rightarrow \infty$ :

$$\rho = \frac{2}{\sqrt{2\pi}\sigma} \int_0^{\infty} x e^{-x^2/2\sigma^2} dx = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \sigma \quad (\text{D.23})$$

mit  $\rho \approx 0.798$  bzw.

$$\frac{\sigma}{\rho} = \sqrt{\frac{\pi}{2}} = 1.253 \quad (\text{D.24})$$

Im Falle einer Fehlernormalverteilung ist die Wahrscheinlichkeit, daß der auftretende Fehler den Wert für  $\rho$  nicht übersteigt ( $P(|e| \leq \rho) = 2\phi(\rho/\sigma) - 1 = 0.576$ ) und damit ca. 57.6 %. Weiterhin wird auch der Begriff der Genauigkeit  $h$  und der des wahrscheinlichen Fehlers  $\gamma$  im Zusammenhang mit einer Gaussverteilung verwendet. Die Genauigkeit ist definiert als  $h = 1/\sigma\sqrt{2\pi} = 1/\sqrt{\pi}\rho$ . Der wahrscheinliche Fehler steht mit z.B. dem mittleren Fehler in Beziehung und entspricht einer oberen Schranke für den Betrag des absoluten Fehlers,  $\gamma = 0.4769 \sqrt{\pi} \rho$ .

Betrachtet man allgemein die ermittelte Varianz und die Standardabweichung einer gaussverteilten Zufallsgröße, kann auch für diese ein Fehler  $u$  angegeben werden. Der Fehler der Varianz ist  $u = s^2 - \langle s^2 \rangle$ . Der relative Fehler von  $s^2$  beträgt ungefähr  $u/s^2 \approx [2/(n-1)]^{1/2}$  sowie der relative Fehler von  $s$  bei ausreichend großen Stichproben approximiert in etwa die Hälfte dieses Wertes  $\sqrt{u}/s \approx [1/(2n-2)]^{1/2}$ .

### Praktische Berechnung von S

Da im Zusammenhang mit numerischen Berechnungen die Verwendung der Einzelmesswerte fortlaufend erfolgt und der arithmetische Mittelwert des jeweiligen Anteils vom Stichprobenumfang dabei nicht

konstant bleiben muss, kann die empirische Standardabweichung  $S$  sukzessive über die Berechnung der Summe der Abweichungsquadrate  $S_{xx}$  erfolgen:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left( \left( \sum_{i=1}^n x_i^2 \right) - \frac{1}{n} \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \right)} \tag{D.25}$$

ermittelt werden.

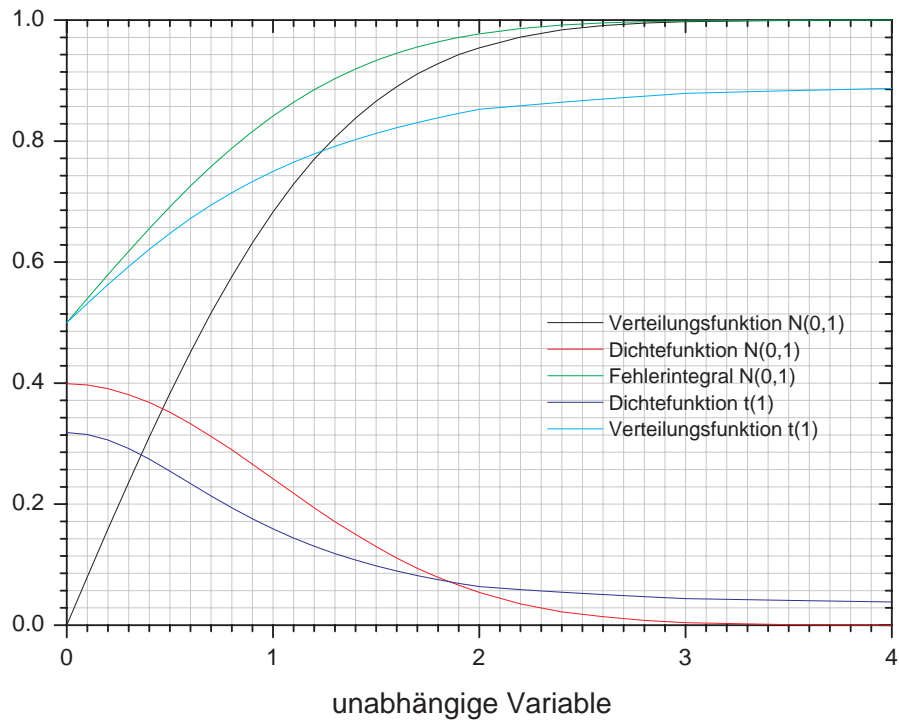


Abbildung D.1: Plott einiger stetiger Dichte- und Verteilungsfunktionen.



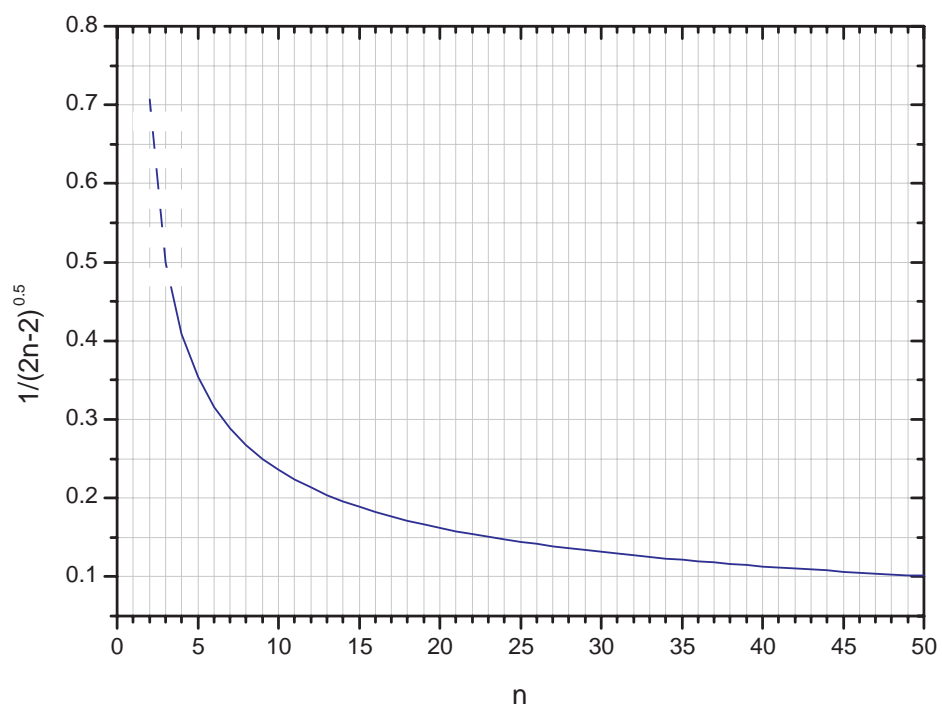


Abbildung D.2: Fehlerentwicklung nach der Anzahl voneinander unabhängiger Ereignisse.

### D.1.1 Drittes und viertes Moment einer eingipfligen Verteilung

Das dritte Moment einer eingipfligen Verteilung wird auch als *Schiefe* (Skewness) bezeichnet:

$$g_1 = \frac{\left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})\right)^3}{\sqrt{\left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2\right)^3}} = \frac{\mu_3}{\sigma^3} \quad (\text{D.26})$$

Dabei sind Verteilungen mit  $g_1 < 0$  linksschief sowie rechtsschief wenn  $g_1 > 0$  gilt und symmetrisch bei exakt  $g_1 = 0$ . Das vierte Moment, daß auch *Exzess*, Kurtosis oder Wölbung genannt wird, zeigt die relative Lage des Maximums einer eingipfligen Verteilung gegenüber dem Maximum einer Normalverteilung mit identischer Varianz an:

$$g_2 = \frac{\left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})\right)^4}{\left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2\right)^2} - 3 = \frac{\mu_4}{\sigma^4} - 3 \quad (\text{D.27})$$

Für  $g_2 < 0$  gilt ein gegenüber der Normalverteilung verringertes Maximum (*platykurtisch*, subgaussförmig), für  $g_2 > 0$  ein gegenüber der Normalverteilung erhöhtes Maximum (*leptokurtische*, supergaussförmig). Die Wölbung einer Normalverteilung ist dementsprechend  $g_2 = 0$  bzw.  $\mu_4/\sigma^4 = 3$  (*mesokurtisch*).

### D.1.2 Der Korrelationskoeffizient

Eine weitere Beziehung der explorativen Datenanalyse, die hier erwähnt werden soll, ist die Korrelation zweier metrisch skalierten Datensätze durch einen repräsentativen Zahlenwert. Von Bedeutung ist dies bei der Flugzeitmassenspektrometrie u.a. bei der Kalibrierung von Ionenmassen anhand gemessener Flugzeiten. Dazu betrachtet man zunächst die Kovarianz  $cov_{xy}$  der zu vergleichenden Datensätze mit den Zufallsgrößen X,Y:

$$cov_{xy} := \frac{1}{n-1} \underbrace{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}_{:=S_{xy}} \quad (\text{D.28})$$

mit  $S_{xy}$  der Summe der gemischten Abweichungsquadrate. Kennt man die empirischen Standardabweichungen der zu vergleichenden Verteilungen ( $S_x, S_y$ ) ergibt sich der (Pearsonsche) Korrelationskoeffizient  $r_{xy}$ :

$$r_{xy} = \frac{cov_{xy}}{S_x S_y} \quad (\text{D.29})$$

Die Division durch die Stichprobenstandardabweichungen ( $S_x, S_y$ ) entspricht dabei einer Normierung. Eine numerische Berechnung kann über die Summen der Abweichungsquadrate  $S_{xy}, S_{xx}, S_{yy}$  erfolgen:

$$r_{xy} = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} S_{yy}}} \quad (\text{D.30})$$

mit

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{1}{n} \left( \sum_{i=1}^n x_i \right) \left( \sum_{i=1}^n y_i \right) \quad (\text{D.31})$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{1}{n} \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \quad (\text{D.32})$$

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{1}{n} \left( \sum_{i=1}^n y_i \right)^2 \quad (\text{D.33})$$

Für den Korrelationskoeffizienten gilt  $-1 \leq r_{xy} \leq 1$ . Er macht eine Aussage über einen linearen Zusammenhang der untersuchten Datensätze. Ein Wert von  $r_{xy} = \pm 1$  entspricht dabei einer perfekten Korrelation. Der Wert  $r_{xy} = 0$  zeigt dagegen vollkommen unkorrelierte Daten an, für die kein linearer Zusammenhang vorliegt. Die Bereiche zwischen diesen Extremwerten werden in der Regel in Intervalle zusammengefasst:

$$\begin{aligned} 0 < |r_{xy}| \leq 0.5 & \quad \text{schwache Korrelation,} \\ 0.5 < |r_{xy}| \leq 0.8 & \quad \text{mittlere Korrelation,} \\ 0.8 < |r_{xy}| \leq 1 & \quad \text{starke Korrelation.} \end{aligned}$$

Nichtlineare funktionale Zusammenhänge können nicht erkannt werden. Für mehr als zwei zu vergleichende Merkmale (multivariate Datensätze) können paarweise Vergleiche in sogenannten Korrelationsmatrizen erfolgen. Möchte man eine relative Abschätzung darüber erhalten, wieviele der untersuchten Daten eines Datensatzes, durch die Korrelation mit den Daten des zweiten (abhängigen) Datensatzes erklärt werden können, bildet man das Quadrat des Korrelationskoeffizienten  $r_{xy}^2$  als sogenanntes Bestimmtheitsmaß.

### D.1.3 Vertrauensbereiche für Punktschätzer

#### Arithmetisches Mittel

Geht man von Daten aus deren Verteilungsart und Varianz unbekannt sind, ist zur Ermittlung von Erwartungswerten (soweit dies möglich ist) i.d.R. ein Umfang von  $n \geq 50$  voneinander unabhängiger Einzelmessungen nötig. Bei normalverteilten Daten mit bekannter Varianz kann in Abhängigkeit der Messwertanzahl  $n$ , die dann auch sehr viel geringer sein kann, ein Konfidenzintervall in den Grenzen:

$$\left[ \bar{x} - \bar{Z}_{(1-\frac{\alpha}{2})} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} ; \bar{x} + \bar{Z}_{(1-\frac{\alpha}{2})} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right]$$

angegeben werden. Dabei entspricht  $\bar{Z}$  der normierten Zufallsvariable  $\bar{Z} = \frac{\bar{X}-\mu}{\sigma} \sqrt{n}$ . Das Konfidenzintervall gibt damit Grenzen an, die die Lage von  $1-\alpha$  Prozent aller Messwerte einschliesst. Geht man bei den vorliegenden Daten von einer Normalverteilung aus, kennt aber ihre Varianz nicht, kann zwar wie zuvor bei bekannter Varianz ein Konfidenzintervall angegeben werden, dieses ist aber i.d.R. breiter. Die zugrundeliegende Dichte der Mittelwerte ist dann selbst nicht mehr normalverteilt, sondern entspricht der sogenannten t-Verteilung,  $\frac{\bar{X}-\mu}{S} \sqrt{n} \sim t_{n-1}$  (Gosset, Student'sche t-Verteilung). Die unbekanntes Varianz  $\sigma^2$  muss aus der Stichprobenvarianz geschätzt werden und die Näherung hierzu wirkt sich besonders für kleine Stichprobenumfänge ( $n < 30$ ) auf das vierte Moment (Exzeß) der Normalverteilung aus. Für die Wahrscheinlichkeit  $P\left(t_{n-1; \alpha/2} \leq \frac{\bar{X}-\mu}{S} \sqrt{n} \leq t_{n-1; 1-\alpha/2}\right) = 1 - \alpha$  erhält man das  $1 - \alpha$  Konfidenzintervall für  $\mu$  bei unbekanntem  $\sigma^2$ :

$$\left[ \bar{x} - t_{(1-\frac{\alpha}{2}, n-1)} \frac{S}{\sqrt{n}} ; \bar{x} + t_{(1-\frac{\alpha}{2}, n-1)} \frac{S}{\sqrt{n}} \right]$$

$S$  ist die empirische Stichprobenstandardabweichung. Die t-Verteilung steht mit der Standardnormalverteilung aber über die  $\chi^2$ -Verteilung (diese ist normalverteilt) in Zusammenhang:  $t_n = N(0, 1) / \sqrt{\chi_n^2/n}$ .

Ab einer Messwertanzahl  $n > 100$  kann die t-Verteilung dann wieder durch eine Standardnormalverteilung approximiert werden. Bei einem gleichen Konfidenzniveau zu  $1-\alpha$  erhält man allerdings für die t-Verteilung immer noch ein etwas größeres Intervall, als für eine Standardnormalverteilung. Bei einem  $\alpha = 5\%$  entsprechend  $\bar{x} \pm 1.96 \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ .

Varianz und Standardabweichung

Es kann auch für die Varianz und die Standardabweichung ein Konfidenzintervall angegeben werden, wenn man eine Normalverteilung voraussetzt. Der Schätzwert für die Varianz aus der Stichprobenvarianz ist  $\chi^2$ -verteilt:  $(n - 1)\frac{S^2}{\sigma^2} \sim \chi_{n-1}^2$ . Das entsprechende  $1-\alpha$  Konfidenzintervall für  $\sigma^2$  und für  $\sigma$  ergibt sich dadurch zu:

$$\left[ \frac{(n - 1)S^2}{\chi_{n-1;1-\alpha/2}^2} ; \frac{(n - 1)S^2}{\chi_{n;\alpha/2}^2} \right] ; \left[ S\sqrt{\frac{n - 1}{\chi_{n-1;1-\alpha/2}^2}} ; S\sqrt{\frac{n - 1}{\chi_{n;\alpha/2}^2}} \right]$$

**D.1.4  $\chi^2$ -Verteilung, Cauchy-Lorentz-Verteilung und Entropie der Information**

Die Dichtefunktion der zentralen  $\chi_n^2$ -Verteilung (Pearson) für  $x > 0$  und  $n$  Freiheitsgrade ist:

$$f_{\chi_n^2}(x) = \frac{1}{2^{x/2}\Gamma(n/2)} x^{(n/2)-1} e^{-x/2} ; \Gamma(x) = \int_0^\infty e^{-t} t^{x-1} dt$$

mit  $\Gamma$  der Gammafunktion, wobei für ganzzahlige Werte  $x = n$  gilt:  $\Gamma(n) = (n - 1)!$ ,  $\Gamma(n + 1) = n!$  und für  $0 < x < 1$ ,  $\Gamma(1 - x) = \frac{\pi}{\Gamma(x) \cdot \sin \pi x}$ .

Aus der student'schen t-Verteilung erhält man für den Spezialfall  $n=1$  und  $\Gamma(1/2) = \sqrt{\pi}$  die Cauchy-Lorentz-Verteilung, eine stetige Wahrscheinlichkeitsverteilung mit der Dichte:

$$f(x) = \frac{1}{\pi} \frac{\gamma}{(x - x_0)^2 + \gamma^2} ,$$

für  $\gamma \in \mathbb{R}^+$  und  $-\infty < x_0 < \infty$  mit der Verteilungsfunktion:

$$F(x) = \frac{1}{\pi} \arctan\left(\frac{x - x_0}{\gamma}\right) + \frac{1}{2}$$

Mit  $x_0 = 0$  (dem Median) und dem HWHM-Breitenmaß<sup>2</sup>  $\gamma = 1$ , erhält man die Standard-Cauchy-Lorentz-Verteilung bzw. die t-Verteilung mit einem Freiheitsgrad, deren Dichte dann  $f(x) = \frac{1}{\pi(1+x^2)}$  entspricht. Für die Cauchy-Lorentz-Verteilung sind Mittelwert, Standardabweichung und Varianz nicht definiert. Wenn man für  $x_0 = 0$  annimmt, wird die Varianz unendlich. Die Entropie der Standard-Cauchy-Lorentz-Verteilung beträgt  $H(x) = \ln(4\pi\gamma)$ . Der Quotient zweier unabhängiger und normalverteilter Zufallsgrößen ist Cauchy-Lorentz-verteilt. In der Physik wird die Verteilung i.d.R. nur als Lorentz-Verteilung bezeichnet.

Die  $\chi^2$ -Verteilung ist ein geeignetes Werkzeug, um Ähnlichkeiten in Distanzen und umgekehrt Distanzen in Ähnlichkeiten gegenübergestellter Verteilungen zu transformieren [303].  $\chi^2$ -Verteilung und Gammafunktion liegen als numerische Approximationen in Tabellenform vor [219]. Die Entropie  $H$ , nach der Definition aus der Informationstheorie, kann über die Chi<sup>2</sup>-Verteilung der Zufallsvariablen mit den entsprechenden Freiheitsgraden erhalten werden:

$$H = \int_{-\infty}^\infty f_{\chi_n^2}(x) \ln(f_{\chi_n^2}(x)) dx ; H = f(P) = K \cdot \ln(P)$$

bzw. im Fall diskreter Ereignisse als Funktion der Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses dargestellt werden. Mit  $P$  der Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses als Anzahl der günstigen Fälle zur Anzahl der möglichen Fälle. Als Einheit der Entropie wird in der Informationstechnik häufig das Bit (binary digit) verwendet, womit  $K = -1/\ln(2) = -1.443$  und damit:

$$H = -1.443 \ln(P) = -\log_2(P)$$

---

<sup>2</sup>HWHM = Half-width at half-maximum.

Setzt man für  $K$  die Boltzmannkonstante  $k$  ein (Tabelle X.xx), kann der Informationsgehalt auch formal in (thermodynamischen) Entropieeinheiten  $[J/K]$  angegeben werden. Es ist mit der Definition der Entropie aus der Informationstheorie z.B. möglich den (formalen) Informationsgehalt eines Proteins zu berechnen [369]. Dies macht die Annahme einer bestimmten a priori Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Aminosäure erforderlich, die i.d.R. aus statistischen Erhebungen bekannter Proteine ermittelt werden<sup>3</sup>.

Die Entropie kann also im Sinne eines Erwartungswertes des Informationsgehaltes von Zeichen  $n_i$  einer Menge  $N$  (Alphabet) in einer Reihe von  $n$  ausgewählten Zeichen betrachtet werden, ohne dabei zunächst näher auf eine bestimmte Abfolge dieser Zeichen einzugehen. Haben dabei  $n$  diskrete Zeichen die binäre Ausprägung: abwesend = 0 oder anwesend = 1, wobei  $p_i$  die Wahrscheinlichkeit Anwesenheit anzeigt, kann die Entropie einer Zeichenreihe berechnet werden durch:

$$H = - \sum_{i=1}^n p_i \cdot \log_2(p_i)$$

Die maximale Entropie ist dabei diejenige, die bei einer Gleichverteilung aller Zeichen bzw. den Einzelwahrscheinlichkeiten  $p_i = 1/n, i \in (1, n)$  der diskreten Verteilung mit  $n$  Zeichen angenommen werden kann:

$$H_{max} = - \sum_{i=1}^n \frac{1}{n} \log_2 \left( \frac{1}{n} \right) = \log_2(n)$$

Die maximale Entropie wird i.d.R. zu einer Normierung herangezogen, hier für das Beispiel diskreter Ereignisse:

$$\frac{H}{H_{max}} = - \sum_{i=1}^n p_i \cdot \frac{\log_2(p_i)}{\log_2(n)} = - \sum_{i=1}^n p_i \log_n(p_i) \leq 1$$

Die maximale Entropie der stetigen eindimensionalen Standardnormalverteilung  $N(\mu = 0, \sigma^2 = 1)$  mit  $p(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi^2}} \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma^2}\right)$  beträgt:

$$\begin{aligned} H_{max,N(\mu,\sigma^2)} &= - \int_{-\infty}^{\infty} p(x) \ln(p(x)) dx = \int_{-\infty}^{\infty} p(x) \left( -\frac{x^2}{2\sigma^2} - \frac{1}{2} \ln(2\pi\sigma^2) \right) dx \\ &= \frac{1}{2} \ln(2\pi e\sigma^2) \quad [nats] \\ &= \frac{1}{2} \frac{\ln(2\pi e\sigma^2)}{\ln(2)} = 2.04 \quad [bit] \end{aligned}$$

Die Werte der Entropie sind mit Ausnahme der differentiellen Entropie (Blockentropie), in der hier verwendeten Weise immer positiv. Die differentielle Entropie der Normalverteilung hat im Vergleich mit anderen Verteilungen gleicher Varianz<sup>4</sup> die größte Entropie [370]. Die Normalverteilung bietet neben z.B. der Cauchy-Lorentzverteilung in der Bildverarbeitung die Möglichkeit zu einer Approximation der iPSF von Punktabbildungen und kann so im Zusammenhang mit der Maximum-Entropie-Methode z.B. zur Rauschreduktion eingesetzt werden [290]. In [88] wird im Rahmen einer PCA (Principal Component Analysis) eine durch Entropieberechnungen gestützte Überlagerung von TIC-Teilbildern (Total Ion Count) verwendet, um aus diesen automatisch größere Mosaikbilder zu erzeugen.

<sup>3</sup>Die Primärstruktur eines Proteins in Bezug auf die gebildeten Sekundärstruktur motive bzw. Supersekundärstrukturen und ihre räumliche Anordnung.

<sup>4</sup>Diskrete Laplace-Verteilung,  $H(x) = 1.94$  [bit]; stetige Gleichverteilung  $H(x) = 1.79$  [bit].

### D.1.5 Die Kombinatorik diskreter Ereignisse und die Poisson-Verteilung

#### Permutationen und Kombinationen

Sogenannte Bernoulli-Experimente sind Zufallsexperimente, bei denen lediglich zwei Möglichkeiten bzw. Ereignisse mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit eintreten können (z.B. das Element kommt vor oder nicht). Laplace-Wahrscheinlichkeiten sind für das Auftreten aller möglichen Elemente einer Menge gleich, so z.B. die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der Zahlen eins bis sechs beim fairen Würfeln. Interessiert man sich für das Auftreten eines Elementes in einer Reihe von mehreren Elementen mit Laplace-Wahrscheinlichkeiten, gelten für die Anordnungs- und Kombinationsmöglichkeiten der Elemente folgende Regeln.

- Sind alle betrachteten  $n$  Elemente unterschiedlich, so gibt es  $n!$  mögliche Anordnungen der einzelnen Elemente.
- Sind von den betrachteten  $n$  Elementen  $r$  Sorten verschiedener Elemente mit der Anzahl  $n_i$  vorhanden, dann ergeben sich  $\frac{n!}{n_1! \dots n_r!}$  Möglichkeiten.

Die Anordnungen werden auch als Permutationen (Vertauschungen) bezeichnet. Kombiniert man in einer Reihe von insgesamt  $n$  Elementen  $k$  unterschiedliche Elemente ( $k \leq n$ ), erhält man

- unter Berücksichtigung der Reihenfolge genau  $\frac{n!}{(n-k)!}$  verschiedene Möglichkeiten (Variationen).
- Bleibt die Reihenfolge der Elemente unberücksichtigt sind es dagegen  $\binom{n}{k} = \frac{n!}{k!(n-k)!}$  Möglichkeiten (Kombinationen).

Können die  $k$  Elemente sich dabei mehrfach in der Reihe wiederholen erhält man

- unter Berücksichtigung der Elementreihenfolge  $n^k$  Möglichkeiten (Variationen)
- und ohne Berücksichtigung der Reihenfolge  $\binom{n+k-1}{k} = \frac{(n+k-1)!}{k!(n-1)!}$  Möglichkeiten (Kombinationen).

Spielt die Reihenfolge der Elemente eine Rolle, spricht man von Variationen. Ist die Reihenfolge ohne Bedeutung werden die unterschiedlichen Möglichkeiten als Kombinationen bezeichnet.

#### Poisson-Verteilung

Die Poisson-Verteilung ist eine diskrete Verteilung bei der für sehr viele Möglichkeiten  $n$  aber nur sehr wenige wahrscheinliche Ereignisse  $k$ , aus der Binomialverteilung erhalten werden können. Sie stellt damit bei einer Vorannahme über einen Erwartungswert  $\lambda$  (Mittelwert, Varianz) die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten seltener Zufallsereignisse  $k$  unter vielen möglichen Ereignissen dar. Die Zeit die zwischen dem Eintreten zweier seltener Ereignisse vergeht ist in naturwissenschaftlichen Anwendungen oft exponentialverteilt [45]. Ihre Dichtefunktion ist gegeben durch:

$$f(k, \lambda) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}$$

Der Wert  $\lambda$  (positive reelle Zahlen ohne 0) ist gleichzeitig Mittelwert und Varianz der Verteilung. Für große  $\lambda$  kann sie durch eine Gaussverteilung approximiert werden:

$$f(k, \lambda) \approx N(\lambda, \lambda) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\lambda}} \exp\left(-\frac{(k-\lambda)^2}{2\lambda}\right) \quad (\text{D.35})$$

## D.2 Allgemeine Strahlungsparameter

$L$  in D.36 entspricht der Leuchtdichte [ $cd/m^2$ ] (physiologisch) bzw. der Strahlungsdichte [ $W/m^2$ ] und beschreibt das Verhältnis der von einer Quelle raumwinkelabhängig ( $\vartheta$ ) ausgestrahlten Lichtstärke  $I$  [ $cd/sr$ ] (Candela, physiologisch) bzw. der Strahlungsstärke  $J$  [ $W/sr$ ] zur Größe, der zur Strahlungsrichtung senkrechten Projektionsfläche  $A$ :

$$L = \frac{\partial^2 \Phi}{\partial \Omega \partial A \cos(\vartheta)} \quad ; \quad I = \frac{\partial \Phi}{\partial \Omega} \quad (D.36)$$

$\Omega$  entspricht einem Raumwinkel und ist dimensionslos ( $sr = \text{Steradian}$ ). Bei Punktstrahlern bilden die Flächen gleicher Leistungsdichte im Abstand  $r$  (Radius) eine Kugel. Für den Lichtstrom bzw. den Strahlungsfluss isotroper Lichtquellen (Punktstrahler) gilt, daß dieser dem Integral über die komplette Kugeloberfläche in einem bestimmten Zentrumsabstand  $r$  entspricht und damit genähert im Mittel  $\Phi = 4 \cdot \pi \cdot I$ . Bei anisotropen Lichtquellen kann der Lichtstrom unter einem Winkel für einen Halbraum ( $-\pi < \vartheta < \pi$ ) zur Hauptstrahlungsrichtung ( $\theta = 0$ ) bestimmt werden mit,  $\Omega = 2\pi(1 - \cos(\vartheta))$ :

$$\Phi = \int I d\Omega = 2\pi(1 - \cos(\vartheta)) I \quad (D.37)$$

Die Strahlungsdichte und Leistung<sup>5</sup> nimmt dabei quadratisch mit der Entfernung vom Kugelzentrum oder Strahlungsursprung ab. Wenn näherungsweise eine richtungsunabhängige Strahlungsdichte angenommen werden kann, gilt das Lambert-Gesetz für die gesamte ausgesandte Lichtstärke  $I$  bzw. Strahlungsstärke  $J$ :

$$J = J_0 \cos(\vartheta) \quad ; \quad B = \frac{dJ}{dA \cos(\vartheta)} \quad (D.38)$$

Die Strahlungsdichte  $B$  [ $W/m^2 sr$ ] ist winkelabhängig nur bei Lambert-Strahlern konstant. Diese erzeugen eine diffuse Lichtemission bzw. Reflexion. Angewandt auf eine leuchtende Kugel bedeutet dies, daß diese unabhängig vom Betrachtungswinkel immer gleich hell erscheint. Die (photometrische) Intensität  $E$  [ $Wm^{-2}$ ] (Strahlungsflussdichte) oder *Bestrahlungsstärke* bezieht sich auf die bestrahlte Querschnittsfläche:

$$E = \frac{d\Phi}{dA_{\perp}} \quad (D.39)$$

Die *Bestrahlung* (Fluenz)  $H$  [ $Jm^{-2}$ ] ist dann das Integral der Bestrahlungsstärke über die Bestrahlungszeit:

$$H = \int E dt \quad (D.40)$$

Der Lichtstrom  $\Phi$  bzw. der Strahlungsfluss entspricht einer Strahlungsleistung (Einheit [ $lm$ ], [ $W$ ]). Im Falle eines menschlichen Betrachters wird der Lichtstrom mit einer Funktion  $V(\lambda)$  (*spektrale Hellempfindlichkeit* des Auges) und dem maximalen *photometrischen Strahlungsäquivalent*  $K(\lambda)_m$ , einer Konstante für Tagsehen bei  $\lambda=555\text{nm}$  ( $683 [lm/W]$ , fotopisch) oder Nachtsehen bei  $\lambda=500\text{nm}$  ( $1699 [lm/W]$ , skotopisch) berechnet. Äquivalente eines technischen Sensors sind die *spektrale Empfindlichkeit* und die *Quanteneffizienz*.

$$\Phi = \frac{dQ}{dt} \quad ; \quad Q = \int \Phi dt \quad (D.41)$$

$$\Phi_{\text{vis}} = K(\lambda)_m \int_{380 \text{ nm}}^{800 \text{ nm}} \frac{\partial \Phi_e(\lambda)}{\partial \lambda} \cdot V(\lambda) d\lambda \quad (D.42)$$

<sup>5</sup>Poyntingscher Vektor, steht senkrecht auf der Ebene des elektrischen und magnetischen Feldes.

$$K(\lambda) = \frac{\Phi}{\Phi_e} \quad ; \quad K(\lambda) = V(\lambda) \cdot K(\lambda)_m \quad (\text{D.43})$$

$\Phi_e$  [W] emittierter Strahlungsfluss,  $\Phi_{\text{vis}}$  [lm] Lichtstrom im sichtbaren Wellenlängenbereich, Q [lm · s] Lichtmenge bzw. W [J] Lichtenergie. Die Lichtenergie z.B. bei gepulster Laserstrahlung weist eine Pulsverteilung mit i.d.R. einer steigenden Flanke, einer Peakspitze und einer fallenden Flanke auf [165] [280] [371]. Die Pulsdauer  $\tau$  der Laserstrahlung wird meistens nach dem FWHM-Kriterium bestimmt. Die klassische Mikroskopiebeleuchtung (Ausnahme Lasermikroskopie) nutzt kontinuierlich<sup>6</sup> emittierende Temperaturstrahler zur Objektbe- bzw. Durchleuchtung oder Anregung (Fluoreszenz).

Die Strahlungsleistung  $\Phi_{\text{emission}}$  eines nicht ideal schwarzen Körpers<sup>7</sup> entspricht nach dem Stefan-Boltzmannschen Strahlungsgesetz mit  $\varepsilon$ =integraler Emissionsgrad,  $\sigma$ = Stefan-Boltzmann-Konstante,  $k$ = Boltzmannkonstante,  $c$ =Lichtgeschwindigkeit,  $h$ =Planksches Wirkungsquantum:

$$\Phi_e = \varepsilon \sigma T^4 A \quad ; \quad \sigma = \frac{2\pi^5 k^4}{15c^2 h^3} \quad (\text{D.44})$$

bzw. bei Berücksichtigung der Umgebungstemperatur  $T_u$ :

$$\Phi_e = \varepsilon \sigma A (T^4 - T_u^4) \quad (\text{D.45})$$

Die Empfindlichkeit des menschlichen Auges ist nicht für jede Spektralfarbe im sichtbaren Wellenlängenbereich gleich. Ein auf Tagsehen adaptiertes Auge nimmt Licht der Wellenlänge 550nm (Zitronengelb) um einen Faktor  $10^4$  empfindlicher wahr, als das der Wellenlänge 750nm (Karminrot). Das Empfindlichkeitsmaximum des helladaptierten menschlichen Auges liegt bei ca. 555nm. Für das Farbsehen sind dabei drei unterschiedliche Typen von Zapfen in der menschlichen Netzhaut vorhanden (Trichromatische Theorie des Farbsehens nach Young und Helmholtz). Diese decken den violett-blauen (B), den grünen (G) und den gelb-roten (R) Spektralbereich ab. In den Stäbchen ist für das Nacht- bzw. Dämmerungssehen Rhodopsin verantwortlich. Grün-blaues Licht erscheint dunkeladaptiert am hellsten, rotes am dunkelsten.

Die Farbigkeit mikroskopischer CCD-Farbbildaufnahmen kann mitunter vom Farbeindruck während der Okularbeobachtung abweichen, ist aber i.d.R. hinreichend korrigierbar (Metameriekalibrierung<sup>8</sup>). Für den Weissabgleich einer Glüh- bzw. Halogenlampe eignet sich besonders trockenes Papier. Dieses verhält sich nahezu wie ein Lambert-Strahler und erzeugt eine diffuse Lichtreflexion der eingestrahelten spektralen Charakteristik der Lichtquelle [165]. Der Mensch besitzt die Fähigkeit ungefähr 50 bis 60 verschiedene Graustufen (Helligkeitsstufen, Buntstufen) unterscheiden zu können. Die häufigste Anzahl digitaler Intensitätsabstufungen in Pixelbildern ist die 8-Bit Darstellung. Sie übertrifft bereits mit ihren 255 theoretischen Stufen die vom menschlichen Betrachter wahrnehmbare Graustufenunterscheidungsfähigkeit deutlich. An Farbabstufungen aus Farbmischungen hingegen, sind für den Menschen bis zu  $10^4$  Unterschiede wahrnehmbar. Das additive RGB-System (Rot, Grün, Blau) oder auch Lichtfarbensystem wird i.d.R. für das Auslesen der Farbzusammensetzung durch einen CCD-Chip in herkömmlichen Digitalkameras herangezogen (CCD, charge-coupled device). Vor den CCD-Sensoren befindet sich dabei eine Maske, bestehend aus 4 Farbfiltern. Diese Farbfilter transmittieren jeweils die Wellenlängen einer spektralen Primärfarbe auf Photodioden<sup>9</sup>. Es entstehen so abwechselnd grün-blaue und grün-rote Pixelzeilen, die nacheinander bzw. versetzt ausgelesen werden. Die Farbinformation eines Pixel entsteht dabei erst nachträglich. Man berechnet sie aus interpolierten Pixeln derselben Farbmaske in unmittelbarer Umgebung durch i.d.R. arithmetische Mittelung. Auf diese Art entsteht, im Fall der 8 Bit Tiefe, ein 24 Bit

<sup>6</sup>50Hz Gleichrichtung entsprechender Netzteile.

<sup>7</sup>Auch nicht ideale schwarze Körper werden als schwarze Strahler bezeichnet, wenn sie alle Umgebungsstrahlung absorbieren.

<sup>8</sup>Metamerie = Unterschiedliche spektrale Kombinationen erzeugen einen gleichen Farbeindruck.

<sup>9</sup>Bayer-Pattern, theoretisch 25% Rot- und Blauanteil sowie 50% Grünanteil pro Pixelberechnung.



Farbsignal. Neben dem 8 Bit Standard kommen auch 12 Bit (i.d.R. nur unbunt) und 16 Bit Speichertiefen vor. Als unbunt wird die Graustufung bezeichnet, die somit auch als „farbig“ angesehen werden kann.

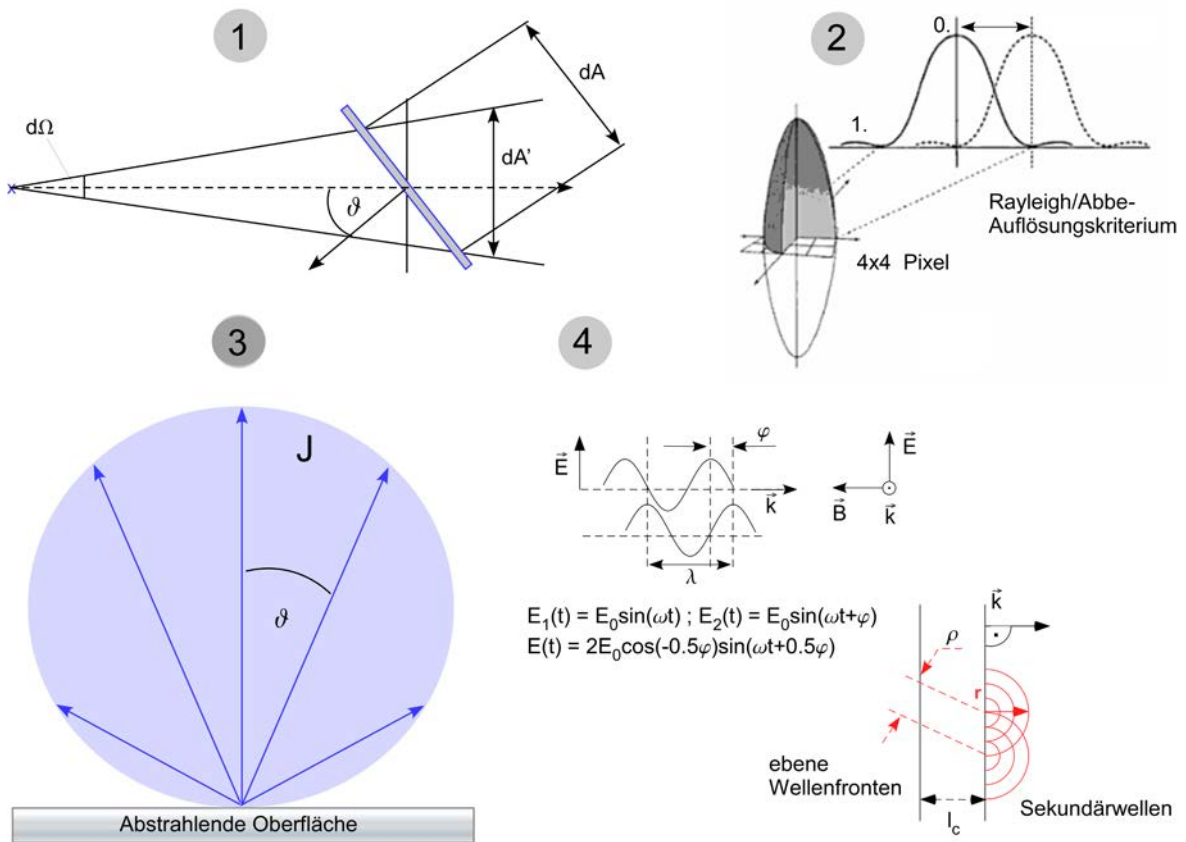


Abbildung D.3: (1) Zwei-dimensionale Darstellung der Strahlungsstärke von Reflexionen, an zur einfallenden Hauptstrahlung gewinkelt stehenden Flächen. (1) und (3) nach [165]. (2) Verbindung des Kontrasttransfers mit der Nyquist-Frequenz und dem Rayleigh/Abbe-Auflösungskriterium (OPD, optical path difference, inkohärente Strahlung) eines abbildenden Systems in einer zwei-dimensionalen Pixelbilddarstellung, entnommen aus [269]. (3) Darstellung der (Ab)Strahlungscharakteristik einer Oberfläche, die sich wie ein Lambert-Strahler verhält. Die richtungsabhängige Strahlungsstärke beschreibt als Pfeillänge die Oberfläche einer Kugel. (4) Wellenausbreitung.

Nach einer Zuordnung des relativen Maximums und Minimums – von weiss bis schwarz bzw. umgekehrt – liefert eine solche Darstellung einen reinen Helligkeitskontrast.

### D.3 Farbsysteme, Farbmodelle, Farbraum und Normung

Erwähnt werden sollen die Farbsysteme der Licht- und Körperfarben, das additive RGB-System (Rot, Grün, Blau), das negative (multiplikative) RGB-System (Rot, Gelb, Blau) und das CMY-System (Cyan, Magenta, Gelb). Ein Farbmodell enthält zunächst alle theoretisch darstellbaren Farben. In Abbildung D.4 ist ein theoretisches Farbdreieck gezeigt. Real sind nicht alle theoretisch darstellbaren Farben auch herzustellen bzw. vom menschlichen Betrachter (als solche) wahrnehmbar. Diese Tatsache stimmt mit der Theorie des menschlichen Farbensehens von Young/Helmholtz überein, da die Absorptionsspektren der Farbstoffkombinationen in den einzelnen Rezeptortypen teilweise Überlagerungen zeigen. Der, den menschlichen Sinneseindrücken, zugängliche Anteil bildet einen metrischen (n-dimensionalen), theoretisch kontinuierlichen Farbraum (n-Tupel, n=Anzahl der Primärfarben). Im Falle des RGB-Modells und seiner

zweidimensionalen Darstellung als Dreieck, füllt er dabei nur einen Teilbereich. Innerhalb eines solchen Farbraumes ist dann nur ein kleinerer Bereich (*Gamut*) durch Druck- bzw. Darstellungstechniken (z.B. Monitor) reproduzierbar.

Technische Systeme der Bilderstellung arbeiten primär oft mit dem sogenannten *HSI*-Modell. Bei diesem wird eine Farbe aus dem *Farbton* (hue, H) mit der *Farbsättigung* (saturation, S) und der *Lichtintensität* (intensity, I) des additiven RGB-Systems berechnet<sup>10</sup>. Grundfarben sind z.B. im kontinuierlichen Spektrum von Temperaturstrahlern Purpur, Indigo, Blau, Grün, Gelb, Gelbrot und Rot (Gerade im Farbraum, Abbildung D.4). Eine international weithin anerkannte Normung stellt das System der CIE<sup>11</sup> dar. Darin wird der für den menschlichen Beobachter erkennbare Farbraum, anhand einer genormten Durchschnittsabsorption der Sehfärbstoffe in den entsprechenden Rezeptortypen angegeben<sup>12</sup>. Der Bereich der Fovea centralis<sup>13</sup> auf der menschlichen Netzhaut liegt ca. 5° von der optischen Achse entfernt und definiert die Bezugsachse des menschlichen Sehens. Der geringste Abstand für deutlich erkennbare Gegenstände beträgt nach Definition 25 cm und wird als deutliche Sehweite oder Bezugssehweite bezeichnet. Lichtstrahlen die unter einem Sehwinkel von 1°/60 (eine Bogenminute = 0.016°, 1') von der optischen Achse bzw. der Bezugsachse aus auf das Auge treffen, erzeugen ungefähr eine Abbildungsgröße von 5 μm auf der Netzhaut (Macula). Dieser Winkel trägt die Bezeichnung physiologischer Grenzwinkel. Strahlung die unter einem kleineren Winkel in das Auge fällt kann dieses ohne optische Hilfsmittel nicht zur Erkennung von Strukturen auf der Netzhaut abbilden. Lichtstrahlen von Bildpunkten mit einem entsprechenden Winkel (1') und einem Abstand gleich der deutlichen Sehweite, erzeugen eine Erregungsunterbrechung von zwei in der Ebene der Netzhaut auseinanderliegenden Zapfen, mit einem zwischen ihnen liegenden erregten Zapfen. Bei Anwendung des Rayleigh- bzw. Sparrow-Kriteriums für inkohärente Strahlung kann dieser Abstand noch unterboten werden. Im vollständig getrennten Zustand (Abstand > Rayleighkriterium) wird der mittlere Zapfen von den Nebenmaxima der Punktintensitäten getroffen. Reicht diese nicht aus, um seine Dunkelerregung zu unterbrechen (mittlerer Zapfenabstand ≈ 2.5 μm - 3 μm), erscheinen die Bildpunkte vollständig getrennt. Punkte in einem Abstand von ca. 5 μm auf der Netzhaut können damit in der Region des schärfsten Sehens vollständig aufgelöst werden. Von der Fovea centralis radial nach aussen hin, nimmt der mittlere Zapfenabstand schnell zu und beträgt bei einem Sehwinkel von 4° bzw. 6°, ausgehend von der optischen Achse, ca. 10 μm. Im Zentrum des schärfsten Sehens befinden sich nur M-Typ (grün) und L-Typ (rot) Zapfen, in größerem Abstand dann auch S-Typ Zapfen (blau). Die Anordnung der Stäbchen liegt ausserhalb der Fovea centralis in einem Bereich von ca. 15°-20° Sehwinkel von der optischen Achse am dichtesten vor. In der Fovea centralis fehlen die Stäbchen dagegen vollständig. Der Weisspunkt ist der Bereich im Farbraum der (theoretisch) alle Primärfarben zu gleichen Anteilen enthält (Weisspunkt der CIE-Normfarbtafel). Jeder zur Beleuchtung eingesetzte Temperaturstrahler besitzt ein charakteristisches Emissionsspektrum. Sein Emissionsmaximum liegt, je nach Temperatur, auf einer als Unbuntlinie bezeichneten Kurve im Farbraum. Mit steigender (blauverschoben) oder sinkender (rotverschoben) Farbtemperatur weicht dieser Unbuntpunkt vom theoretischen Weisspunkt der Normfarbtafel ab. Die Unbuntpunkte verschiedener Temperaturstrahler sind in der CIE-Normfarbtafel bestimmt. Einige Koordinaten für Unbuntpunkte nach CIE 1931 sind [372]:

- Norm A: r = 0.4476, g = 0.4074 (Glühlampe), bei T ≈ 2300 bis 2900 K.

<sup>10</sup>  $H = \frac{1}{2\pi} \arctan\left(\frac{2R-G-B}{\sqrt{3(G-B)}}\right)$ ,  $S = \sqrt{R^2 + G^2 + B^2 - RG - RB - GB}$ ,  $I = \frac{1}{3}(R + G + B)$ , Berechnungen aus Zylinderkoordinaten.

<sup>11</sup> Internationale Beleuchtungskommission.

<sup>12</sup> Normbeobachter unter einem Sichtfeld in die Pupille eintretender Strahlung von 2° CIE 1931 oder 10° CIE 1964=Weitwinkelsichtfeld, im Verhältnis zur optischen Achse.

<sup>13</sup> Größte Zapfendichte, ca.  $6 \cdot 10^6$  Zapfen, d ≈ 1.5 mm, Bereich des schärfsten Sehens. Die laterale Auflösung wird durch die Größe der einzelnen Rezeptorfläche und deren mittlere Abstände zueinander bestimmt und beträgt ungefähr d ≈ 6 μm.

- Norm C:  $r = 0.3101, g = 0.3162$ .
- Norm E:  $r = \frac{1}{3}, g = \frac{1}{3}$  (Weisspunkt der Normfarbtafel).
- D50:  $r = 0.3457, g = 0.3585$ , bei  $T \approx 5500$  K.
- D65:  $r = 0.312713, g = 0.329016$ , bei  $T \approx 6504$  K.

D65 entspricht den durchschnittlichen Tageslichtverhältnissen eines Mittagshimmels, betrachtet auf der nördlichen Hemisphäre durch einen Normbeobachter nach CIE 1931, mit einem maximalen Einfallswinkel von  $4^\circ$ . Der D65 Weisspunkt gilt als Standard für die darstellbaren Farbräume sRGB und Adobe-RGB. In TIFF-Bildern (Tagged Image File Format) sind meistens (Header)Informationen über den *Whitepoint*, *PrimaryChromaticities*, *TransferFunction*, *TransferRange* und *ReferenceBalckWhite* enthalten, wenn die Empfehlungen des TIFF 6.0 Standards berücksichtigt werden [373]. Bei der vergleichenden Kontrastbewertung von Abbildungen, die mit unterschiedlichen Farbsystemen dargestellt werden, ist das spezifische Helligkeitsverhalten zu beachten. Komplementärfarbkombinationen aus z.B. subtraktiver RGB-Farbsynthese erscheinen dunkler, die aus additiver RGB-Farbsynthese dagegen heller als die jeweiligen Einzelfarben. In Drucksystemen wird zur Darstellung des CMY-Farbraums i.d.R. der Zusatz von schwarzen Pigmenten gewählt (Cyan, Magenta, Yellow, Key, *CMYK*).

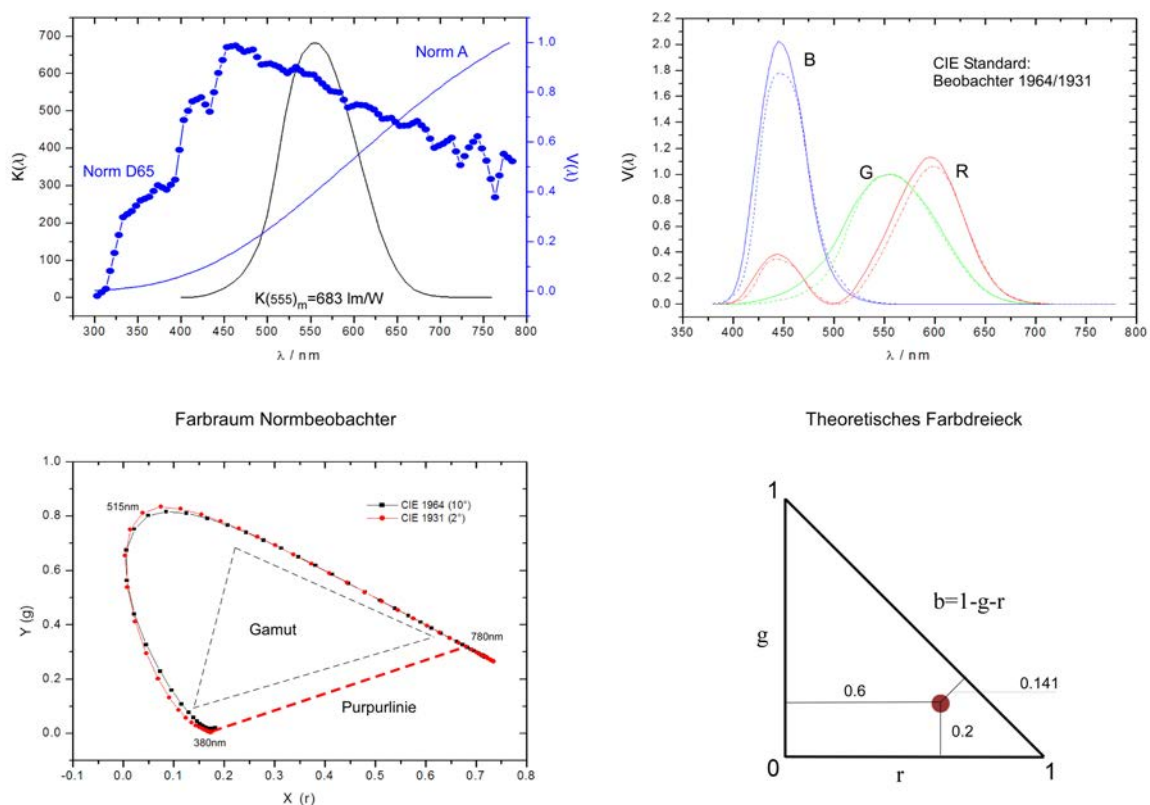


Abbildung D.4: Norm Angaben, Farbraum, theoretisches Farbdreieck und sRGB-Werte (Standard RGB mit D65-Weißpunkt). In der Regel wird der angepasste Adobe-RGB-Farbraum verwendet, der den CMYK-Farbraum der Drucksysteme an den sRGB-Farbraum von z.B. CRT-Monitoren besser annähert. Rechts oben: Abweichungen der CIE-Standards.



# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Spengler für die Unterstützung und Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit an seinem Institut in den vergangenen Jahren.

Weiterer aufrichtiger Dank geht an die langjährigen wissenschaftlichen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe auf dem Gebiet der Lasermassenspektrometrie an biologischen Proben, Herrn Dr. Dieter Kirsch und Herrn Dr. Werner Bouschen, für die gemeinsam durchgeführten Experimente und Diskussionen in der Anfangszeit meiner Arbeit. Bedanken möchte ich mich ebenso besonders bei den ehemaligen wissenschaftlichen Mitarbeitern Frau Dr. Sabine Günther, Herrn Dr. Martin Köstler und Herrn Dr. Götz Pilarczyk für die gute Zusammenarbeit und die hilfreichen Diskussionen sowie bei Frau Dipl.-Inf. (FH) Carmen Paschke und dem wissenschaftlichen Mitarbeiter Herrn Dipl.-Math. Alfons Hester. Nicht vergessen möchte ich auch die bereits im Ruhestand angelangten technischen Mitarbeiter, Herrn Udo Wilfer und Herrn Günter Klossek.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Holger Zorn für seine Tätigkeit als Zweitgutachter dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch den (zusätzlichen) Prüfern des Disputationsverfahrens, die zum Zeitpunkt der Drucklegung noch nicht namentlich bekannt waren.

Stellvertretender Dank geht an alle wissenschaftlichen und technischen Mitarbeiter, die im Laufe der Zeit an meiner Weiterbildung aktiv beteiligt waren und deren namentliche Nennung den Rahmen sprengen würde.

Ebenso gilt stellvertretender Dank allen internen wie externen, direkten und indirekten Kooperationspartnern der durchgeführten Projekte ISCAN, NGFN/NGFN II, COMPUTIS und AmbiProbe.

Weiterhin möchte ich mich für die finanzielle Förderung durch das BMBF (NGFN, NGFN II), die DFG, die EU (COMPUTIS) und das Land Hessen (LOEWE, AmbiProbe) bedanken.

Die größte Dankbarkeit empfinde ich gegenüber meiner Familie.



# Literaturverzeichnis

- [1] Dreisewerd K.: *The Desorption Process in MALDI*, Chem. Rev. 103, 2, 395-426, 2003.
- [2] Zhigilei L., Yingling Y., Itina T., Schoolcraft T., Garrison B.: *Molecular dynamics simulations of matrix-assisted laser desorption—connections to experiment*, International Journal of Mass Spectrometry, 226, 85-106, 2003.
- [3] Vorm O., Roepstorff P., Mann M.: *Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation*, Anal.Chem., 66, 3281-3287, 1994.
- [4] Przybilla L., Brand J., Yoshimura K., Räder H., Müllen K.: *MALDI-TOF Mass Spectrometry of Insoluble Giant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a New Method of Sample Preparation*, Anal.Chem., 72, 4591-4597, 2000.
- [5] Karas M., Krüger R.: *Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism*, Chem. Rev., 103, 427-439, 2003.
- [6] Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F.: *Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules*, Anal. Chem., 57, 2935-2939, 1985.
- [7] Karas M., Hillenkamp F.: *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*, Anal. Chem. 60, 2293-2299, 1988.
- [8] Hillenkamp F., Peter-Katalinic, J.: *MALDI MS. A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
- [9] Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., Matsuo T.: *Protein and Polymer Analyses up to  $m/z$  100000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 2, 20, 151-153, 1988.
- [10] Dole M., Mack L., Hines R., Mobley R., Ferguson L., and Alice M.: *Molecular Beams of Macroions*, Journal of Chemical Physics, 49, 5, 2240-2249, 1968.
- [11] Fenn J., Mann M., Meng C., Wong S., Whitehouse C.: *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*, Science, 246, 4926, 64-71, 1989.
- [12] Seng P., Drancourta M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P., Rolain J., and Raoult D.: *Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*, Clinical Infectious Diseases, 49, 4, 543-551, 2009.
- [13] Samgina T., Artemenko K., Gorshkov V., Ogourtsov S., Zubarev R., Lebedev A.: *Mass spectrometric study of peptides secreted by the skin glands of the brown frog *Rana arvalis* from the Moscow region*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 23, 1241-1248, 2009.

- [14] Wollnik H., Grüner U., Li G.: *Flugzeit-Massenspektrometer mit gitterfreien Ionenspiegeln und Elektronenstoß-Ionenquellen*, Annalen der Physik, 7, 48, 215-288, 1991.
- [15] Wolf B.: *Handbook of Ion Sources*, 1. Edition, CRC-Press, 1995.
- [16] Brown I.: *The Physics and Technology of Ion Sources*, 2. Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
- [17] Wiley W., McLaren I. H.: *Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution*, Rev. Sci. Instrum., 26, 1150, 1955.
- [18] Mamyrin B., Karataev V., Shmikk D., and Zagulin V.: *The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high mass resolution*, Sov. Phys. JETP, 37, 45, 1973.
- [19] Amft M., Moritz F., Weickhardt C., Grotemeyer J.: *Application of the Post-source Pulse-focusing Technique in MALDI-TOF : Optimization of the Experimental Parameters and their Influence on the Capability of the Method*, Rapid Commun. Mass. Spectrom. 12, 1879-1888, 1998.
- [20] Ioanovicu D.: *The application of ion optics in time-of-flight mass spectrometry*, International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 131, 43-65, 1994.
- [21] Yavor M.: *Advances in Imaging and Electron Physics: Optics of charged Particle Analyzers*, Elsevier Science, Band 157, 2009.
- [22] Vestal M.: *Modern MALDI time-of-flight mass spectrometry*, J. Mass. Spectrom. 44, 303-317, 2009.
- [23] Patentschrift: *Verbesserte Kalibrierkurven für Flugzeitmassenspektrometer*, DE102007027143B3 08.01.2009, Anmelder Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen.
- [24] Hinz K., Gelhausen E., Schafer K., Takats Z. and Spengler, B.: *Characterization of surgical aerosols by the compact single-particle mass spectrometer LAMPAS 3*, Anal Bioanal Chem, 401, 3165-3172, 2011.
- [25] Takats Z., Denes J., Kinross J.: *Identifying the margin: a new method to distinguish between cancerous and noncancerous tissue during surgery*, Future Oncol., 8, 2, 113-116, 2012.
- [26] Gerbig S., Golf O., Balog J., Denes J., Baranyai Z., Zarand A., Raso E., Timar J., Takats Z.: *Analysis of colorectal adenocarcinoma tissue by desorption electrospray ionization mass spectrometric imaging*, Anal Bioanal Chem, 403, 2315-2325, 2012.
- [27] Cotter R.: *Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research*, American Chemical Society, 1997.
- [28] Laiko V., Moyer S., Cotter R.: *Atmospheric Pressure MALDI/Ion Trap Mass Spectrometry*, Anal. Chem. 72, 5239-5243, 2000.
- [29] Koestler M., Kirsch D., Hester A., Leisner A., Guenther S., Spengler B.: *A high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization ion source for imaging analysis on an ion trap/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 22, 20, 3275-3285, 2008.
- [30] Krutchinsky A., Loboda A., Bromirski M., Standing K., Ens W.: *Orthogonal injection of matrix-assisted laser desorption/ionization ions into a time-of-flight spectrometer through a collisional damping interface*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 12, 508-518, 1998.



- [31] Roempp A., Guenther S., Schober Y., Schulz O., Takats Z., Kummer W., Spengler B.: *Histology by Mass Spectrometry: Label-free Tissue Characterization Obtained from High-Accuracy Bioanalytical Imaging*, Angewandte Chemie International Edition, 49, 22, 3834-3838, 2010.
- [32] Guenther S., Roempp A., Kummer W., Spengler B.: *AP-MALDI imaging of neuropeptides in mouse pituitary gland with 5  $\mu$ m spatial resolution and high mass accuracy*, Int. Journal of Mass Spectrom. 305, 2, 228-237, 2011.
- [33] Twerenbold D., Gerber D., Gritti D., Gonin Y., Netuschil A., Rossel F., Schenker D., Vuilleumier J.: *Single molecule detector for mass spectrometry with mass independent detection efficiency*, Proteomics, 1, 66-69, 2001.
- [34] Wollnik H.: *Time-of-flight mass analyzers*, Mass Spectrometry Reviews, 12, 89-114, 1993.
- [35] Gac and Berg: *Miniaturization and Mass Spectrometry*, RSC Publishing: Cambridge CB4, UK, 2009.
- [36] Deng Y., Zhang H., Henion J.: *Chip-Based Quantitative Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry Determination of Drugs in Human Plasma*, Anal. Chem. 73, 1432-1439, 2001.
- [37] Kersten B., Wanker E., Hoheisel J. and Angenendt P.: *Multiplex approaches in protein microarray technology*, Experte Reviews in Proteomics, 2, 4, 499-510, 2005.
- [38] Becker C., Wacker R., Bouschen W., Seidel R., Kolaric B., Lang P., Schroeder H., Müller O., Niemeyer C., Spengler B, Goody R., Engelhard M.: *Direct readout of protein-protein interactions by mass spectrometry from protein-DNA microarrays*, Angewandte Chemie International Edition, 44, 46, 7635-7639, 2005.
- [39] Chughtai K., Heeren R.: *Mass Spectrometric Imaging for Biomedical Tissue Analysis*, Chem. Rev. 110, 3237-3277, 2010.
- [40] Chen H., Gamez G., Zenobi R.: *What can we learn from Ambient Ionization Techniques?*, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 20, 1947-1963, 2009.
- [41] Holle A., Haase A., Kayser M., Höhndorf J.: *Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance*, J. Mass Spectrom. 41, 705-716, 2006.
- [42] Bouschen W., Schulz O., Eikel D. and Spengler B.: *Matrix vapor deposition/recrystallization and dedicated spray preparation for high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (SMALDI-MS) of tissue and single cells*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 24, 3, 355-364, 2010.
- [43] Bouschen W. and Spengler B.: *Artifacts of MALDI sample preparation investigated by high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization (SMALDI) imaging mass spectrometry*, Int. J. Mass Spectrom. 266, 129-137, 2007.
- [44] Arnould M.: *Understanding and Optimizing the MALDI Process using a Heated Sample Stage: a 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Study*, Proceedings of the 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, Tennessee, 2004.
- [45] Bronstein, Semendjaew: *Taschenbuch der Mathematik*, 6. Auflage, Verlag Harri Deutsch GmbH.
- [46] Eigene Messungen im Rahmen dieser Dissertation (nicht explizit dargestellt).

- [47] Chaurand P., Schriver K., Caprioli R.: *Instrumental design and characterization for high resolution MALDI-MS imaging of tissue sections*, J. Mass Spectrom. 42, 476-489, 2007.
- [48] Caprioli R., Farmer T. and Gile J.: *Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS*, Anal. Chem. 69, 4751-4760, 1997.
- [49] Schwartz S., Reyzer M., Caprioli R.: *Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation*, J. Mass Spectrom. 38, -699, 2003.
- [50] McDonnell L., Heeren R.: *Imaging Mass Spectrometry*, Mass Spec. Rev. 26, 606-643, 2007.
- [51] Spengler B., Hubert M.: *Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (SMALDI) Mass Spectrometry: Instrumentation for Sub-Micrometer Resolved LDI and MALDI Surface Analysis*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 13, 735-748, 2002.
- [52] Puolitaival S., Burnum K., Cornett D., Caprioli R.: *Solvent-free Matrix Dry-Coating for MALDI Imaging of Phospholipids*, J Am Soc Mass Spectrom., 19, 6, 882-886, 2008.
- [53] Guenther S., Koestler M., Schulz O., Spengler B.: *Laser spot size and laser power dependence of ion formation in high resolution MALDI imaging*, Int. J. Mass Spectrom. 294, 7-15, 2010.
- [54] Spengler B. et al.: *MALDI ion imaging and biological ion imaging with a new scanning UV-laser microprobe*, Proceedings of the 42nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, Illinois, May 29 - June 03, p. 1041, 1994.
- [55] Hillenkamp F., Unsöld E., Kaufmann R., Nitsche R.: *A High-Sensitivity Laser Microprobe Mass Analyzer*, Appl. Phys., 8, 341-348, 1975.
- [56] Van Vaeck L., Gijbels R.: *Laser Microprobe Mass Spectrometry: Potential and Limitations for Inorganic and Organic Micro-Analysis. Part I. Technique and Inorganic Applications*, Fresenius J. Anal. Chem., 337, 743-754, 1990.
- [57] Van Vaeck L.: *Laser Microprobe Mass Spectrometry: Potential and Limitation for Inorganic and Organic Micro-Analysis. Part II. Organic Applications*, Fresenius J. Anal. Chem., 337, 755-765, 1990.
- [58] *Dissertation* Werner Bouschen, Universität Giessen, 2004.
- [59] Pacholski M., Winograd N.: *Imaging with Mass Spectrometry*, Chem. Rev. 99, 2977, 1999.
- [60] Agar N., Yang H., Carroll R., Black P., Agar J.: *Matrix Solution Fixation: Histology-Compatible Tissue Preparation for MALDI Mass Spectrometry*, Anal. Chem. 79, 7416-7423, 2007.
- [61] Chaurand P., Schwartz S., Billheimer D., Xu B., Crecelius A., Caprioli R.: *Integrating histology and imaging mass spectrometry*, Anal. Chem. 76, 1145-1155, 2007.
- [62] Henzel W., BILLECI T., STULTS J., WONG S., GRIMLEY C., WATANABE C.: *Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 11, 5011-5015, 1993.
- [63] Spengler B.: *De Novo Sequencing, Peptide Composition Analysis, and Composition-Based Sequencing: A New Strategy Employing Accurate Mass Determination by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15, 703-714, 2004.

- [64] Thieu V., Kirsch D., Flad T., Müller C., Spengler B.: *Direct Protein Identification from Nonspecific Peptide Pools by High-Accuracy MS Data Filtering*, Angewandte Chemie International Edition 45, 20, 3317-3319, 2006.
- [65] Langsdorf M., Ghassempour A., Römpf A., Spengler B.: *Characterization of a peptide family from the skin secretion of the Middle East Tree Frog Hyla savignyi by composition-based de novo sequencing*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 24, 19, 2885-2899, 2010.
- [66] Langsdorf M., Ghassempour A., Römpf A., Spengler B.: *Isolation and sequence analysis of peptides from the skin secretion of the Middle East tree frog Hyla savignyi*, Anal. Bioanal. Chem. 398, 2853-2865, 2010.
- [67] *Dissertation* Dieter Kirsch, Universität Würzburg, 2000.
- [68] *Dissertation* Vinh-An Thieu-Simchen, Universität Giessen, 2007.
- [69] Seely E., Oppenheimer S., Mi D., Chaurand P., Caprioli R.: *Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections*, J Am Soc Mass Spectrom., 19, 8, 1069-1077, 2008.
- [70] Pingoud A., Urbanke C.: *Arbeitsmethoden der Biochemie*, de Gruyter 1997.
- [71] Vogel A., Venugopalan V.: *Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues*, Chem. Rev. 103, 2, 577-644, 2003.
- [72] Heeren R., McDonnell L., Amstalden E., Luxembourg S., Altelaar A., Piersma S.: *Why don't biologists use SIMS?: A critical evaluation of imaging MS*, Appl. Surf. Sci. 252, 6827, 2006.
- [73] Caprioli R., Farmer T., Gile J.: *Molecular imaging of biological samples: Localization of peptides and proteins using MALDI-TOFMS*, Anal. Chem. 69, 4751, 1997.
- [74] Andersson M., Groseclose M., Deutch A., Caprioli R.: *Imaging mass spectrometry of proteins and peptides: 3D volume reconstruction*, Nat. Methods 5, 1, 101-108, 2008.
- [75] Bullock G., Petrusz R.: *Technics in immunocytochemistry*, Vol. 3, Academic Press, 1985.
- [76] Kühnel W.: *Taschenatlas der Cytologie und mikroskopischen Anatomie*, Thieme-Verlag.
- [77] Groseclose M., Massion P., Chaurand P., Caprioli R.: *High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry*, Proteomics, 8, 18, 3715-3724, 2008.
- [78] Setou M.: *Imaging Mass Spectrometry. Protocols for Mass Microscopy.*, Springer, 2010.
- [79] Chughtai K., Heeren R.: *Mass Spectrometric Imaging for Biomedical Tissue Analysis*, Chem. Rev. 110, 5, 3237-3277, 2010.
- [80] Trim P., Djidja M., Atkinson S., Oakes K., Cole L., Anderson D., Hart P., Francese S., Clench M.: *Introduction of a 20 kHz Nd:YVO<sub>4</sub> laser into a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer for MALDI-MS imaging*, Anal. Bioanal. Chem. 397, 3409-3419, 2010.
- [81] Spraggins J., Caprioli R.: *High-Speed MALDI-TOF Imaging Mass Spectrometry: Rapid Ion Image Acquisition and Considerations for Next Generation Instrumentation*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. April, 2011.

- [82] Spraggins J., Caprioli R.: *High-Speed MALDI-TOF imaging mass spectrometry: rapid ion image acquisition and considerations for next generation instrumentation*, J Am Soc Mass Spectrom., 22, 6, 1022-1031, 2011.
- [83] Todd P., Schaaff T., Chaurand P., Caprioli R.: *Organic Ion Imaging of biological tissue with Secondary Ion Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, J. Mass Spectrom. 36, 355, 2001.
- [84] Hutchinson R., Cox A., McLeod W., Marshall P., Harper A., Dawson E., Howlett D.: *Imaging and spatial distribution of beta-amyloid peptide and metal ions in Alzheimer's plaques by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry*, Anal. Biochem., 346, 225-33, 2005.
- [85] Wang S.: *Application of laser ablation-ICPMS to the spatially-resolved microanalysis of biological tissue*, Appl., Spectrosc., 48, 1321-1325, 1994.
- [86] Hedges R., Jiang Z., Ramsey C., Cowey A., Roberts J., Somogyi P.: *Imaging of radiocarbon-labeled tracer molecules in neural tissue using accelerator mass spectrometry*, Nature, 383, 823-826, 1996.
- [87] Liebl H.: *Grenzen der Ortsauflösung bei SIMS*, Fresenius Z Anal Chem 314, 244, 1983.
- [88] Broersen A., van Liere R., Altelaar A., Heeren R., McDonnell L.: *Automated, Feature-Based Image Alignment for High-Resolution Imaging Mass Spectrometry of Large Biological Samples*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 19, 823-832, 2008.
- [89] *Dissertation* Ralf Kamischke, Universität Münster, 2001.
- [90] Howard R., Barber M., Panico M.: *Fast atom bombardment: A new mass spectrometric method for peptide sequence analysis*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 2, 623-631, 1981.
- [91] Qiang L.: *Mass Spectrometry Imaging of Small Molecules Using Desorption/Ionization on Silicon*, Anal. Chem. 79, 3535-3541, 2007.
- [92] Harris Daniel C.: *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*, Springer Verlag 1. Auflage 1998, Nachdruck 2002.
- [93] Xu T., Kincaid H., Atala A., YOO J.: *High-Throughput Production of Single-Cell Microparticles using an Inkjet Printing Technology*, J. Manuf. Sci. Eng., 130, 2, 0217, 2008.
- [94] Boland T., Xu T., Brook D., Xiaofeng C.: *Application of inkjet printing to tissue engineering*, Biotec. Journ., 1, 9, 910-917, 2006.
- [95] HARP, *Highly Accurate and Reliable Positioning System*, Deutsches Patent Nr. 197 52 010.3 (Kalkum & Müller).
- [96] Cheng S., Chandra S.: *A pneumatic droplet-on-demand generator*, Experiments in Fluids 34, 755-762, 2003.
- [97] Tuszyński W., Angermann R., Metzger J., Woisch R.: *Production of polyatomic ions by  $^{252}\text{Cf}$ -fission fragments and by short laser pulses*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B88, 184-190, 1994.
- [98] Wangler N., Zengerle R., Koltay P.: *Optische Qualitätskontrolle für hoch parallelen Top Spot Microarray Printer*, VDE Verlag GmbH Berlin-Offenbach, 2007.

- [99] Wei H., Nolkrantz K., Powell D., Woods J., Ko M., Kennedy R.: *Electrospray sample deposition for matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) and atmospheric pressure MALDI mass spectrometry with attomole detection limits*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 18, 11, 1193-1200, 2004.
- [100] *Dissertation* Anette Jacob, Universität Hamburg, 1999.
- [101] Technical Note: *TM-Sprayer<sup>TM</sup> Tissue MALDI Sample Preparation System, Optimization of Automated Matrix Spraying for MALDI Imaging*, LEAP Technologies, Inc., Carrboro, NC 27510.
- [102] MALDI-Spotter, SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH, <http://www.sunchrom.de>.
- [103] ImagePrep, Bruker Daltonik GmbH, <http://www.bdal.de>.
- [104] Lin S., Reitz R.: *Drop and Spary Formation from a Liquid Jet*, Annu. Rev. Fluid Mech., 30, 85-105, 1998.
- [105] Bach F., Nürnberger F., Philipp K., Schaper K.: *Statistische Beschreibung der Tropfengrößenverteilung bei stationären Zerstäubungsprozessen*, Forschung im Ingenieurwesen, 69, 181-186, 2005.
- [106] Wozniak G.: *Zerstäubungstechnik*, Springer Verlag, 2003.
- [107] Zhigilei V., Garrison E., Yingling Y., Zeifman M.: *Computer Simulations of Laser Ablation of Molecular Substrates*, Chem. Rev. 103, 2, 321-348, 2003.
- [108] Georgiou S., Koubenakis A.: *Laser-Induced Material Ejection from Model Molecular Solids and Liquids: Mechanisms, Implications, and Applications*, Chem. Rev. 103, 2, 349-394, 2003.
- [109] Karas M., Krüger R.: *Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism*, Chem. Rev. 103, 2, 427-440, 2003.
- [110] Knochenmuss R., Zenobi R.: *MALDI Ionization: The Role of In-Plume Processes*, Chem. Rev. 103, 2, 441-452, 2003.
- [111] Lippert T., Dickinson J.: *Chemical and Spectroscopic Aspects of Polymer Ablation: Special Features and Novel Directions*, Chem. Rev. 103, 2, 453-486, 2003.
- [112] Paltauf G., Dyer P.: *Photomechanical Processes and Effects in Ablation*, Chem. Rev. 103, 2, 487-518, 2003.
- [113] Bityurin N., Luk'yanchuk B., Hong M., Chong T.: *Models for Laser Ablation of Polymers*, Chem. Rev. 103, 2, 519-552, 2003.
- [114] Chrisey D., Pique A., McGill R., Horwitz J., Ringeisen B., Bubb D., Wu P.: *Laser Deposition of Polymer and Biomaterial Films*, Chem. Rev. 103, 2, 553-576, 2003.
- [115] Karas M., Hillenkamp F.: *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons*, Anal. Chem., 60, 20, 2299-2301, 1988.
- [116] Strupat K., Karas M., Hillenkamp F.: *2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry*, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 72, 111, 89-102, 1991.
- [117] Beavis R., Chait B.: *Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 3, 12, 436-439, 1989.

- [118] Beavis R., Chait B.: *Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 3, 12, 432-435, 1989.
- [119] Tang K., Taranenko N., Allman S., Chang L., Chen C., Lubman D.: *Detection of 500-nucleotide DNA by laser desorption mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 8, 9, 727-730, 1994.
- [120] Wu K., Steding A., Becker C.: *Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using of 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 7, 2, 142-146, 1993.
- [121] Zabet-Moghaddam M., Krüger R., Heinzle E., Tholey A.: *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the characterization of ionic liquids and the analysis of amino acids, peptides and proteins in ionic liquids*, Am. J. Mass Spectrom., 39, 1494-1505, 2004.
- [122] Li Y., Gross M., Hsu F.: *Ionic-Liquid Matrices for Improved Analysis of Phospholipids by MALDI-TOF Mass Spectrometry*, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 16, 679-682, 2005.
- [123] Carda-Broch S., Berthod A., Armstrong D.: *Ionic matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight detection of DNA oligomers*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 17, 553-560, 2003.
- [124] Mank M., Stahl B., Boehm G.: *2,5-Dihydroxybenzoic acid butylamine and other ionic liquid matrixes for enhanced MALDI-MS analysis of biomolecules*, Anal. Chem. 76, 2938-2950, 2004.
- [125] Knochenmuss R.: *Photoionization Pathways and Free Electrons in UV-MALDI*, Anal. Chem., 76, 3179-3184, 2004.
- [126] Frankevich V., Zhang J., Friess S., Dashtiev M., Zenobi R.: *Role of Electrons in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*, Anal. Chem., 75, 6063-6067, 2003.
- [127] Horneffer V., Dreisewerd K., Lüdemann H., Hillenkamp F., Läge M., Strupat K.: *Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid*, Int. J. Mass Spectrom., 185/186/187, 859, 1999.
- [128] Schiller J., Süß R., Fuchs B., Müller M., Petkovic M., Zschörnig O., Waschipky H.: *The suitability of different DHB isomers as matrices for the MALDI-TOF MS analysis of phospholipids: which isomer for what purpose?*, Eur. Biophys J., 36, 517-527, 2007.
- [129] Haisa M., Kashino S., Hanada S., Tanaka K., Okazaki S., Shibagaki M.: *The structures of 2-hydroxy-5-methylbenzoic acid and dimorphs of 2,5-dihydroxybenzoic acid*, Acta Crystallogr., Sect. B, 38, 1480-1485, 1982.
- [130] Beavis R., Bridson J.: *Epitaxial protein inclusion in sinapinic acid crystal*, J. Phys. D., 26, 442, 1993.
- [131] Cohen D., Benedict J., Morlan B., Chiu D., Kahr B.: *Dyeing Polymorphs: The MALDI Host 2,5-Dihydroxybenzoic Acid*, Crystal Growth & Design, Vol. 7, No. 3, 492-495, 2007.
- [132] Benedict J., Cohen D., Lovell S., Rohl A., Kahr B.: *What is syncrystallization? States of pH indicator methyl red in single phthalic acid crystals*, J. Am. Chem. Soc., 128, 5548-5559, 2006.



- [133] Braun G.: *Vorkommen von Phthalaten in Oberflächenwasser und Abwasser*, Landesumweltamt NRW, Essen 2001.
- [134] Horneffer V., Forsmann A., Strupat K., Hillenkamp F., Kubitscheck U.: *Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser scanning microscopy*, Anal. Chem., 73, 1016-1022, 2001.
- [135] Durchschlag H., Zipper P.: *Comparative investigations of biopolymer hydration by physicochemical and modeling techniques*, Biophys. Chem. 93, 141-157, 2001.
- [136] Durchschlag H., Zipper P.: *Modeling the hydration of proteins: prediction of structural and hydrodynamic parameters from x-ray diffraction and scattering data*, Eur. Biophys. J. 32, 487-502, 2003.
- [137] Fournier I., Beavis R., Blais J., Tabet J., Bolbach G.: *Hysteresis effects observed in MALDI using oriented, protein-doped matrix crystals*, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 169/170, 19-29, 1997.
- [138] Allwood D., Dreyfus R., Perera I., Dyer P.: *UV Optical Absorption of Matrices Used for Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*, Rap. Commun. Mass Spectrom. 10, 1575-1578, 1996.
- [139] Knochenmuss R., Zenobi R.: *MALDI Ionization: The Role of In-Plume Processes*, Chem. Rev. 103, 441-452, 2003.
- [140] Mormann M., Bashir S., Derrick P., Kuck D.: *Gas-Phase Basicities of the Isomeric Dihydroxybenzoic Acids and Gas-Phase Acidities of their Radical Cations*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11, 544-552, 2000.
- [141] Karas M., Ehring H., Nordhoff E., Stahl B., Strupat K., Hillenkamp F., Grehl M., Krebs B.: *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry with Additives to 2,5-Dihydroxybenzoic Acid*, Organic Mass Spectrometry, 28, 1476-1481, 1993.
- [142] Beeky H.: *Principles of Field Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry*, Pergamon, Oxford, 1977.
- [143] Stevenson E., Breuker K., Zenobi R.: *Internal energies of analyte ions generated from different matrix-assisted laser desorption/ionization matrices*, J. Mass Spectrom. 35, 1035-1041, 2000.
- [144] *Dissertation Matthias Glückmann, Universität Frankfurt, 2000.*
- [145] Price D., Bashir S., Derrick P.: *Sublimation properties of x,y-dihydroxybenzoic acid isomers as model matrix assisted desorption ionisation (MALDI) matrices*, Thermochimica Acta 327, 167-171, 1999.
- [146] Lüdemann H., Redmond R., Hillenkamp F.: *Singlet-singlet annihilation in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization studied by fluorescence spectroscopy*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 16, 1287-1294, 2002.
- [147] Spengler B., Karas M., Bahr U., Hillenkamp F.: *Excimer Laser Desorption Mass Spectrometry of Biomolecules at 248 and 193 nm*, J. Phys. Chem. 91, 6502-6506, 1987.
- [148] Knochenmuss R.: *A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization*, J. Mass Spectrom. 37, 867-877, 2002.
- [149] Karbach V., Knochenmuss R.: *Do single matrix molecules generate primary ions in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization*, Rapid Commun. Mass Spectrometry, 12, 968-974, 1998.

- [150] Krueger R., Pfenninger A., Fournier I., Glückmann M., Karas M.: *Analyte incorporation and ionization in MALDI visualized by pH indicator molecular probes*, Anal. Chem., 73, 5812-5821, 2001.
- [151] Trimpin S., Keune S., Räder H., Müllen K.: *Solvent-Free MALDI-MS: Developmental Improvements in the Reliability and the Potential of MALDI in the Analysis of Synthetic Polymers and Giant Organic Molecules*, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 17, 661-671, 2006.
- [152] Trimpin S., Räder H., Müllen K.: *Investigations of theoretical principles for MALDI-MS derived from solvent-free sample preparation Part I. Preorganization*, International Journal of Mass Spectrometry, 253, 13-21, 2006.
- [153] Karas M., Glückmann M., Schäfer J.: *Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors*, J. Mass Spectrom., 35, 1-12, 2000.
- [154] König S., Kollas O., Dreisewerd K.: *Generation of Highly Charged Peptide and Protein Ions by Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Infrared Laser Desorption/Ionization Ion Trap Mass Spectrometry*, Anal. Chem., 79, 5484-5488, 2007.
- [155] Sampson J., Hawkridge A., Muddiman D.: *Development and Characterization of Ionization Technique for Analysis of Biological Macromolecules: Liquid Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization*, Anal. Chem. 80, 6773-6778, 2008.
- [156] Sampson J., Muddiman D.: *Atmospheric pressure infrared (10.6 $\mu$ m) laser desorption electrospray ionization (IR-LDESI) coupled to a LTQ Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 23, 1989-1992, 2009.
- [157] Trimpin S., Inutan E., Herath T., McEwen C.: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Method for Selectively Producing Either Singly or Multiply Charged Molecular Ions*, Anal. Chem. 82, 11-15, 2010.
- [158] Mc Ewen C., Larsen B., Trimpin S.: *Laserspray Ionization on a Commercial Atmospheric Pressure-MALDI Mass Spectrometer Ion Source: Selecting Singly or Multiply Charged Ions*, Anal. Chem., 82, 4998-5001, 2010.
- [159] Jaskolla T., Karas M.: *Compelling Evidence for Lucky Survivor and Gas Phase Protonation: The Unified MALDI Analyte Protonation Mechanism*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 22, March 2011.
- [160] Kelly R., Miotello A.: *Contribution of vaporization and boiling to thermal-spike sputtering by ions or laser pulses*, Phys. Rev., 60, 2616, 1999.
- [161] Zhao S., Somayajula K., Sharkey A., Hercules D., Hillenkamp F., Karas M., Ingendoh A.: *Novel Method for Matrix-Assisted Laser Mass Spectrometry of Proteins*, Anal. Chem. 63, 450-453, 1991.
- [162] Rohlfing A., Leisner A., Hillenkamp F., Dreisewerd K.: *Investigation of the Desorption Process in UV-MALDI with a liquid 3-Nitrobenzyl Alcohol Matrix by Photoacoustic Analysis, Fast Flash Imaging, and UV-Laser Postionization*, J. Phys. Chem. C, 114, 5367-5381, 2010.
- [163] Vertes A., Irinyit G., Gijbels R.: *Hydrodynamic Model of Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry*, Anal. Chem., 65, 2389-2393, 1993.
- [164] Knochenmuss R.: *A Quantitative model of Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Including Analyte Ion Generation*, Anal. Chem. 75, 2199-2207, 2003.



- [165] Vogel H.: *Gerthsen Physik*, 18. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [166] Hinterberger F.: *Physik der Teilchenbeschleuniger und Ionenoptik*, Springer 1997.
- [167] Westman A., Huth-Fehre T., Demirev P., Bielawski J., Medina N., Sundqvist B., Karas M.: *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization: Dependence of the ion Yield on Laser Beam Incidence Angle*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 8, 388-393, 1994.
- [168] Valentine S., Counterman A., Clemmer D.: *A database of 660 peptide ion cross sections: use of intrinsic size parameters for bona fide predictions of cross sections*, J. Am Soc. Mass Spectrom. 10, 1188-1211, 1999.
- [169] Benesch J., Ruotolo B., Simmons D., Robinson C.: *Protein Complexes in the Gas Phase: Technology for Structural Genomics and Proteomics*, Chem. Rev. 107, 3544-3567, 2007.
- [170] Hautreux M., Hue N., Du Fou de Kerdaniel A., Zahir A., Malec V., Laprevote O.: *Under non-denaturing solvent conditions, the mean charge state of a multiply charged protein ions formed by electrospray is linearly correlated with the macromolecular surface*, Int. J. Mass Spectrom., 231, 131-137, 2004.
- [171] Tao L., McLean J.R., McLean J.A., Russell D.: *A Collision Cross-Section Database of Singly-Charged Peptide Ions*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 18, 1232-1238, 2007.
- [172] Mamyrin B. A.: *Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects)*, Int J Mass Spectrom 206, 251-266, 2001.
- [173] Puretzky A., Geohegan D., Hurst G., Buchanan M., Luk'yanchuk B.: *Imaging of Vapor Plumes Produced by Matrix Assisted Laser Desorption: A Plume Sharpening Effect*, Phys. Rev. Lett. 83, 444-447, 1999.
- [174] Spengler B., Kirsch D.: *On the formation of initial ion velocities in matrix-assisted laser desorption ionization: Virtual desorption time as an additional parameter describing ion ejection dynamics*, Int. J. Mass Spectrom. 226, 71-83, 2003.
- [175] Anisimov S., Bäuerle D., Luk'yanchuk B.: *Gas dynamics and film profiles in pulsed-laser deposition of materials*, Phys. Rev. B 48, 16, 12076-12081, 1993.
- [176] Allwood D., Dyer P., Dreyfus R.: *Ionization Modelling of Matrix Molecules in Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 11, 499-503, 1997.
- [177] Knochenmuss R., Zhigilei, V.: *Molecular dynamics simulations of MALDI: laser fluence and pulse width dependence of plume characteristics and consequences for matrix and analyte ionization*, Int. J. Mass Spectrom. 45, 333-346, 2010.
- [178] Spengler B., Bökelmann V.: *Angular and time resolved intensity distributions of laser-desorbed matrix ions*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 82, 379-385, 1993.
- [179] Glückmann M., Karas M.: *The initial ion Velocity and its Dependence on Matrix, Analyte and Preparation Method in Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*, J. Mass Spectrom. 34, 467-477, 1999.
- [180] Pittenauer E., Allmaier G.: *The Renaissance of High-Energy CID for Structural Elucidation of Complex Lipids: MALDI-TOF/RTOF-MS of Alkali Cationized Triacylglycerols*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 20, 1037-1047, 2009.

- [181] Sinngemäß wiedergegebenes Zitat während einer Vorlesung von Prof. Dr. W. Clauss, Institut für Tierphysiologie, JLU-Giessen.
- [182] Schwann T.: *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen*, Nachdruck der Originalschrift von 1839, Trapeza, 2012.
- [183] Baumgart T., Hess S., Webb W.: *Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension*, Nature 425, 821 - 824, 2003.
- [184] Malinska K., Malinsky J., Opekarova M., Tanner W.: *Visualization of Protein Compartmentation within the Plasma Membrane of Living Yeast Cells*, Mol Biol Cell 14, 11, 4427 - 4436, 2003.
- [185] Voet D., Voet J.: *Biochemie*, Wiley-VCH, 1994.
- [186] Harbich W., Helfrich W.: *Adhesion in egg lecithin multilayer systems produced by cooling*, J. Phys. France 50, 1027-1048, 1990.
- [187] Mutz M., Servuss R., Helfrich W.: *Giant membranes of swollen phosphatidylethanolamines and glycolipids*, J. Phys. France 51, 2557-2570, 1990.
- [188] Lipowsky R., Sackmann E.: *Handbook of Biological Physics*, 1B, 691-721, Elsevier Science, 1995.
- [189] Helfrich W.: *Elastic properties of lipid bilayers: Theory and possible experiments*, Z. Naturforsch. 28c, 693-703, 1973.
- [190] *Dissertation* Andreas Jud, FU Berlin 1998.
- [191] Brown F.: *Regulation of Protein Mobility Via Thermal Membrane Undulations*, An. Rev. Biophys. Biomol. Struc. 26, 373-399, 2002.
- [192] Sackmann E.: *Haftung für Zellen*, Physik Journal 5, 27-34, 2006.
- [193] Cleffmann G.: *Stoffwechselphysiologie der Tiere*, Ulmer-Verlag, 1992.
- [194] Nagan N., Zoeller R.: *Plasmalogens: biosynthesis and functions*, Progress in Lipid Research, 40, 199-229, 2001.
- [195] Lipke P., Ovalle R.: *Cell Wall Architecture in yeast: new structure and new challenges*, J. Bacteriol. 180, 3735 - 3740, 1998.
- [196] Kolb G.: *Vergleichende Histologie*, Springer-Verlag, 1990.
- [197] Wu C., Yates R.: *The application of mass spectrometry to membrane proteomics*, Nature Biotechnology, 21, 262 - 267, 2003.
- [198] Schlegel H.: *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme-Verlag, 7. Auflage, 1992.
- [199] Abraham T., Lewis R., Hodges R., McElhaney R.: *Isothermal titration calorimetry studies of the binding of the antimicrobial peptide gramicidin S to phospholipid bilayer membranes*, Biochemistry 44(33), 11279-11285, 2005.
- [200] Baer T., Mayer P.: *Statistical Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus Quasiequilibrium Theory Calculations in Mass Spectrometry*, J. of Am. Soc. Mass Spectrom. 8, 103-115, 1996.

- [201] Wehofsky M.: *Discrimination of ions from fast decay reactions in MALDI-Postsource Decay by pulsed ion deflection*, Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando FL, May 31-June 4, 1998.
- [202] Luo G., Marginean I., Vertes A.: *Internal Energy of Ions Generated by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, Anal. Chem. 74, 6185-6190, 2002.
- [203] Lexikon der Biologie, Spektrum Verlag der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, Print und Online-Version.
- [204] Leonhardt H.: *Histologie und Zytologie des Menschen*, Thieme-Verlag, Stuttgart 1985.
- [205] Lang G.: *Histotechnik*, Springer-Verlag New York 2006.
- [206] Posterpräsentation, 54. ASMS Konferenz in Seattle: *Investigation of unknown pheromone-like peptides of the non gene-sequenced marine cephalopod Nautilus pompilius L. by mass spectrometry*.
- [207] *Dissertation* Martin Köstler, Universität Giessen, 2010.
- [208] Winter R., Noll F.: *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner Studienbücher, 1998.
- [209] Boesl U., Weinkauff R., Schlag E.: *Reflectron time-of-flight mass spectrometry and laser excitation for the analysis of neutrals, ionized molecules and secondary fragments*, International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 112, 121-166, 1992.
- [210] Barnstedt J., Kappelmann N., Appenzeller I., Fromm A., Goelz M., Grewing M., Gringel W., Haas C., Hopfensitz W., Kraemer G., Krautter J., Lindenberger A., Mandel H., Widmann H.: *The ORFEUS II Echelle Spectrometer*, Astronomy & Astrophysics Suppl.Ser.134, 561-568, 1999.
- [211] Danks A., Joseph C., Bybee R., Argebright V., Abraham J., Kimble R., Woodgate B.: *Current Detector Performance*, ESA SP-356, 269-274, 1992.
- [212] Fraser G.: *X-Ray Detectors in Astronomy*, Cambridge University Press 1989.
- [213] Lampton M., Carlson C.: *Low-distortion resistive anodes for two dimensional position-sensitive MCP systems*, Rev. Sci. Instrum. 50, 1093-1097, 1979.
- [214] Lampton M., Siegmund O., Raffanti R.: *Delay line anodes for microchannelplate spectrometers*, Rev. Sci. Instrum. 58, 2298-2305, 1987.
- [215] Siegmund O., Malina R., Coburn K., Werthimer D.: *Microchannel plate imaging detectors for the ultraviolet*, ESA SP-356, 89-96, 1992.
- [216] Vallerga J., Gibson J., Siegmund O., Vedder P.: *Flat field response of the microchannel plate detectors used on the Extreme Ultraviolet Explorer*, Proc. SPIE 1159, 382-391, 1989.
- [217] Mann M., Meng C., Fenn J.: *Interpreting Mass Spectra of Multiply Charged Ions*, Anal. Chem. 61, 1702-1708, 1989.
- [218] LLoyd A. Currie : *Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities*, IUPAC Recommendations 1995, Pure & Appl. Chem., Vol. 67, No.10, pp. 1699-1723.
- [219] Hartung J.: *Statistik : Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik*, 13. Auflage, Wissenschaftsverlag Oldenburg 2002.

- [220] Natrella M.: *Experimental Statistics, NBS Handbook 91*, US Government Printing Office, Washington, 1963.
- [221] *International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology, (VIM)*, 2. Edition, 1993.
- [222] Kaiser H.: *Die Berechnung der Nachweisempfindlichkeit*, Spectrochim. Acta. 3, 40, 1947.
- [223] Budzikiewicz H.: *Massenspektrometrie. Eine Einführung.*, VCH-Verlag 3. Auflage 1992.
- [224] Olson M., Yergey A.: *Calculation of the Isotope Cluster for Polypeptides by Probability Grouping*, J Am Soc Mass Spectrom. 20, 295-302, 2009.
- [225] Yergey J.: *A General Approach to Calculating Isotopic Distributions for Mass-Spectrometry*, Int. J. Mass Spectrom. 52, 337-349, 1983.
- [226] Hsu C.: *Diophantine Approach to Isotopic Abundance Calculations*, Anal. Chem. 56, 1356-1361, 1984.
- [227] Kubinyi H.: *Calculation of isotope distributions in mass spectrometry. A trivial solution for a non-trivial problem*, Analytica Chimica Acta 247, 107-119, 1991.
- [228] Datta B.: *Polynomial Method of Molecular Isotopic Abundance Calculations: a Computational Note*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 11, 1767-1774, 1997.
- [229] Rockwood A., Van Orden S., Smith R.: *Rapid Calculation of Isotope Distributions*, Anal. Chem. 67, 2699-2704, 1995.
- [230] Snider R.: *Efficient Calculation of Exact Mass Isotopic Distributions*, J Am Soc Mass Spectrom., 18, 8, 1511-1515, 2007.
- [231] Schiller J., Müller M., Zschörnig O.: *Lipidanalytik mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und Dünnschichtchromatographie*, Praktikumsanleitung Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Leipzig, 2007.
- [232] Press W.: *Numerical Recipes in C*, 2. Auflage, Cambridge 1992.
- [233] Zubarev R., Kelleher N., McLafferty F.: *Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process*, J. Am. Chem. Soc., 120, 3265-3266, 1998.
- [234] *Dissertation Marco Wehofsky*, Universität Giessen, 2001.
- [235] Zubarev R., Bonddarenko P.: *An A Priori Relationship between the Average and Monoisotopic Masses of Peptides and Oligonucleotides*, Rapid. Commun. Mass Spectrom. 5, 276-277, 1991.
- [236] Horwitz W., Kamps L., Boyer K.: *Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63, 1344, 1980.
- [237] Patent der Firma Bruker Daltonik GmbH: *Massenspektren ohne elektronisches Rauschen*, DE10152821B4 16.11.2006.
- [238] Rost A.: *Grundlagen der Elektronik*, 3. Auflage Akademie-Verlag GmbH, Berlin 1992.
- [239] Detlefsen J., Siart U.: *Grundlagen der Hochfrequenztechnik*, 3. Auflage, Oldenbourg-Verlag, München 2009.

- [240] Krutchinsky A., Chait B.: *On the Nature of the Chemical Noise in MALDI Mass Spectra*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 13, 129-134, 2002.
- [241] Bradbury N., Nielsen R.: *Absolute Values of the Electron Mobility in Hydrogen*, Phys. Rev. 49, 388-393, 1936.
- [242] Sachon E., Clodic G., Blasco T., Bolbach G.: *Protein Desolvation in UV Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 18, 1880-1890, 2007.
- [243] Widrow B., Kollar I.: *Quantization Noise: Roundoff Error in Digital Computation, Signal Processing, Control, and Communications*, Cambridge Press, Cambridge, UK, 2008.
- [244] Vorlesungsunterlagen: *Technische Informatik II*, Bähring H., FU Hagen, 2002.
- [245] Bushberg J.: *The essential physics of medical imaging*, 2nd ed., LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2002.
- [246] National Communications System Technology and Standards Division: *Telecommunications: Glossary of Telecommunication Terms*, General Services Administration Information Technology Service, Institute for Telecommunication Sciences, Boulder, Colorado, August 7, 1996.
- [247] Russell D., Edmondson R.: *High-resolution Mass Spectrometry and Accurate Mass Measurements with Emphasis on the Characterization of Peptides and Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*, J. Mass Spectrom. 32, 263-276, 1997.
- [248] Brock A., Rodriguez N., Zare R.: *Hadamard Transform Time-of-Flight Mass Spectrometry*, Anal. Chem., 70, 3735-3741, 1998.
- [249] Brock A., Rodriguez N., Zare R.: *Characterization of a Hadamard transform time-of-flight mass spectrometer*, Rev. Sci. Instrum. 71, 3, 1306-1318, 2000.
- [250] Zare R., Fernandez F., Kimmel J.: *Hadamard-Transformations-Flugzeitmassenspektrometrie: gesteigerte Signalintensität bei gleicher Messzeit*, Angew. Chem., 113, 30-36, 2003.
- [251] Gardner M., Brodbelt J.: *Reduction of Chemical Noise in Electrospray Ionization Mass Spectrometry by Supplemental IR Activation*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 20, 2206-2210, 2009.
- [252] Baldwin M., Medzihradszky K., Lock C., Fisher B., Settineri T., Burlingame A.: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Coupled with Quadrupole/Orthogonal Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometry for Protein Discovery, Identification, and Structural Analysis*, Anal. Chem. 73, 1707-1720, 2001.
- [253] Arnould M.: *Understanding and Optimizing the MALDI Process using a Heated Sample Stage: a 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Study*, Proceedings of the 52. ASMS Conference on Mass Spectrometry, Tennessee, May 22-27, 2004.
- [254] Wolff M., Stephens W.: *A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion*, Rev. Sci. Instrum. 24, 616-617, 1953.
- [255] Enke C., Dobson G.: *Achievement of energy focus for distance-of-flight mass spectrometry with constant momentum acceleration and ion mirror*, Anal. Chem. 79, 8650-8661, 2007.
- [256] Vestal M., Juhasz P., Martin S.: *Resolution and Mass Accuracy in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight*, J Am Soc Mass Spectrom 9, 892-911, 1998.

- [257] Maaß K., Bouschen W., Spengler B.: *Development of Topological Mass Spectrometry in Surface Microanalysis*, 10th International Conference Desorption, St. Petersburg August 29 – September 2 2004.
- [258] Maaß K., Bouschen W., Leisner A., Spengler B.: *Flugzeiteffekte in der topologischen Massenspektrometrie*, 38. DGMS Jahrestagung, 06.03. – 09.03.2005, Rostock.
- [259] Spengler B., Bouschen W., Hinz K.-P.: *Dreidimensionale Abbildung der chemischen Oberflächenzusammensetzung von Objekten*, PCT Patent DE2004/000455, 2004.
- [260] Secombe D., Reddish T.: *Theoretical study of space focusing in linear time-of-flight mass spectrometers*, Rev. Sci. Instrum. 72, 2, 1330-1338, 2001.
- [261] Juhasz P., Vestal M., Martin S.: *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*, J Am Soc Mass Spectrom, 8, 209-217, 1997.
- [262] Kinsel G., Johnston M.: *Post Source Pulse Focusing : A simple Method to achieve improved Resolution in a time-of-flight mass spectrometer*, International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 91, 157-176, 1989.
- [263] Bergmann T., Martin T.: *How to specify the ion optical system of a time-of-flight mass spectrometer*, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 131, 21-41, 1994.
- [264] Minsky M.: *Microscopy Apparatus*, US Patent 3.013.467, 19.12.1961.
- [265] Sheppard C., Shotton D.: *Three- dimensional coherent transfer function in a reflectron-mode confocal scanning microscope*, Opt. Commun. 81 (5), 281-284, 1991.
- [266] Gu M.: *Principles of three-dimensional imaging in confocal microscopes*, 1. Auflage, World Scientific Publishing, 1996.
- [267] Jones A., Bland-Hawthorn J., Shopbell P.: *Towards a General Definition for Spectroscopic Resolution*, Astronomical Data Analysis Software and Systems IV, ASP Conference Series, 77, 503-506, 1995.
- [268] Wang E., Babbey C., Dunn K.: *Performance comparison between the high-speed Yokogawa spinning disc confocal system and single-point scanning confocal systems.*, Journal of Microscopy 218, 148-159, 2005.
- [269] Pawley J.B.: *Handbook of biological confocal microscopy*, Springer Science+Business Media, 2006.
- [270] Bretschneider S., Eggeling C., Hell S.: *Breaking the Diffraction Barrier in Fluorescence Microscopy by optical Shelving*, Phys. Rev. Lett. 98 (21), 218103 (2007).
- [271] Fölling J., Belov V., Kunetsky R., Medda R., Schönle A., Egner A., Eggeling C., Bossi M., Hell S.: *Photochromic Rhodamines provide Nanoscopy with Optical Sectioning*, Angew. Chem. Int. Ed. 46, 6266-6270 (2007).
- [272] Egner A., Geisler C., von Middendorff C., Bock H., Wenzel D., Medda R., Andresen M., Stiel A., Jakobs S., Eggeling C., Schönle A., Hell S.: *Fluorescence nanoscopy in whole cells by asynchronous localization of photoswitching emitters*, Biophys. J. 93, 3285-3290 (2007).



- [273] Sieber J., Willig K., Kutzner C., Gerding-Reimers C., Harke B., Donnert G., Rammner B., Eggeling C., Hell S., Grubmüller H., Lang T.: *Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster*, Science 317, 1072-1076 (2007).
- [274] Hell S.: *Toward fluorescence nanoscopy*, Nature Biotechnol. 21, 1347, 2003.
- [275] Hell S.: *Far-Field Optical Nanoscopy*, Science 316, 1153, 2007.
- [276] Hell S.: *Strategy for far-field optical imaging and writing without diffraction limit*, Phys. Lett. A 326, 140, 2004.
- [277] Nasse M., Woehl J.: *Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy*, J. Opt. Soc. Am. A 27, 2, 295-302, 2010.
- [278] Born M.: *Optik. Ein Lehrbuch der elektromagnetischen Lichttheorie*, Nachdruck der dritten Auflage, Springer-Verlag, 1985.
- [279] Francon M.: *Einführung in die neueren Methoden der Lichtmikroskopie*, Verlag G. Braun, Karlsruhe, 1967.
- [280] Siegman A. E.: *Lasers*, University Science Books, 1986.
- [281] Self S.A.: *Focusing of spherical Gaussian beams*, Applied Optics, 22, 5, 658-661, 1993.
- [282] Stark H.: *Applications of Optical Fourier Transforms*, Academic Press, New York, 1982.
- [283] ULISSES: Auswerte- und Steuersoftware für TOF-Massenspektrometer, Prof. Dr. B. Spengler, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, JLU Giessen.
- [284] Schmitt T., Deninger A., Lison F.: *Zwei - Drei - Vier - UV! Kontinuierlich abstimmbare UV-Laser auf Halbleiterbasis*, Physik Journal 5, Nr. 3, 78 - 79, 2006.
- [285] Hansch W., Biba J., Vorlesungsmaterial WS 2010, Universität der Bundeswehr, München.
- [286] Vertes A.: *Chapter 20: Soft Laser Desorption Ionization - MALDI, DIOS and Nanostructures*, C. R. Phipps, Laser Ablation and its Applications, Springer, 505-528, 2007.
- [287] Prakash M.: *Microfluidic Bubble Logic*, Science 315, 5813, 832 - 835, 2007.
- [288] Wutz, Adam, Walcher: *Theorie und Praxis der Vakuumtechnik*, 5. Auflage, Vieweg Verlag, 1992.
- [289] Wedler G.: *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, 4. Auflage, Wiley-VCH, 1997.
- [290] Pratt W.: *Digital Image Processing*, John Wiley & Sons, Inc., 1978.
- [291] Richter T.: *Zerstäuben von Flüssigkeiten. Düsen und Zerstäuber in Theorie und Praxis*, 3. Auflage, expert Verlag Renningen, 2012.
- [292] *Diplomarbeit* Oliver Schulz, Universität Giessen, 2004.
- [293] Saito Y., Noda T.: *Bimetallic cluster cations ejected from a liquid metal ion source: Li-Na and Li-Mg*, Z.Phys. D - Atoms, Molecules and Clusters 19, 129-131, 1991.
- [294] *Dissertation* Andreas Wieghaus, Universität Marburg, 2001.
- [295] Fischer R., Kilgus H., Paetzold K., Schilling M., Heinzler F., Näher W., Röhrer A., Stephan K.: *Tabellenbuch Metall*, 44. Auflage Europa Lehrmittelverlag, 2008.

- [296] Mündliche Mitteilung von Herrn Christian Schinz, Universität Giessen.
- [297] Siewing R.: *Lehrbuch der Zoologie. Band 2 Systematik*, 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 1985.
- [298] Wieser M., Coplen T.: *Atomic weights of the elements 2007 (IUPAC Technical Report)*, Pure Appl. Chem., Vol. 81, 11, 2131-2156, 2009.
- [299] Böhlke J., de Laeter P., De Bièvre H., Hidaka H., Peiser H., Rosman K., Taylor P.: *Isotopic Compositions of the Elements, 2001*, J. Phys. Chem. Ref. Data, Vol. 34, 1, 57-67, 2005.
- [300] Audi G., Wapstra A., Thibault C.: *The AME2003 atomic mass evaluation (II). Tables, graphs and references*, Nuclear Physics A 729, 337-676, 2003.
- [301] Williams S., Brodbelt J.: *MS<sup>n</sup> Characterization of Protonated Cyclic Peptides and Metal Complexes*, J Am Soc Mass Spectrom, 15, 1039-1054, 2004.
- [302] Freimund S., Sauter M., Kappeli O., Dutler H.: *A new non-degrading isolation process for (1 → 3)-β-D-glucan of high purity from baker's yeast Saccharomyces cerevisiae*, Carbohyd. Polym. 54, 159 - 171, 2003.
- [303] Mucha H.: *Clusteranalyse mit Mikrocomputern*, Akademie Verlag GmbH, Berlin 1992.
- [304] Wien W.: *Kanalstrahlen und Ionisation bei hohen Temperaturen*, 1. Auflage, Salzwasser-Verlag 2012.
- [305] Mayer-Kuckuk T.: *Atomphysik*, 5. Auflage, Teubner Studienbücher Physik, Stuttgart 1997.
- [306] Aston F. W.: *A Positiv Ray Spectrograph*, Phil. Mag., 38, 709, 1919.
- [307] Moyer S., Marzillib L., Woodsc A., Laikod V., Doroshenkod V., Cotter R.: *Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization (AP MALDI) on a quadrupole ion trap mass spectrometer*, Int. J. Mass Spectrom. 226, 133-150, 2003.
- [308] KORE Technology Ltd, Cambridgeshire Business Park Ely, Cambridgeshire CB7 4EA U.K., [www.kore.co.uk](http://www.kore.co.uk).
- [309] Pringle S., Giles K., Wildgoose J., Williams J., Slade S., Thalassinos K., Bateman R., Bowers M., Scrivens J.: *An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-TOF instrument*, Int. J. Mass Spectrom. 261, 1, 2007.
- [310] Nölting B.: *Methods in Modern Biophysics*, 2. Auflage, Springer-Verlag 2005.
- [311] Kanu A., Dwivedi P., Tam M., Matz L., Hill H.: *Ion mobility-mass spectrometry*, J. Mass Spectrom. 43, 1, 1-22, 2008.
- [312] Hu Q., Noll R., Li H., Makarov A., Hardman M., Cooks R.: *The Orbitrap: a new mass spectrometer*, J. Mass Spectrom., 40, 430-443, 2005.
- [313] Marshall A., Schweikhard L.: *Fourier-Transform Ion-Cyclotron Resonance Mass spectrometry technique developement*, Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc., 118, 37-70, 1992.
- [314] Marshall A.: *Milestones in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry technique developement*, Int. J. Mass Spectrom., 200, 331-356, 2000.
- [315] SolariX, Qq-FTMS, Bruker Daltonics Inc. Billerica, [www.bdal.com](http://www.bdal.com).



- [316] Thermo Scientific Corporation, Bremen.
- [317] Gobey J., Cole M., Janiszewski J., Covey T., Chau T., Kovarik P., Corr J.: *Characterization and Performance of MALDI on a Triple Quadrupole Mass Spectrometer for Analysis and Quantification of Small Molecules*, Anal. Chem. 77, 5643-5654, 2005.
- [318] Toyoda M., Ishihara M., Yamaguchi S., Ito H., Matsuo T., Roll R., Rosenbauer H.: *Construction of a new multi-turn time-of-flight mass spectrometer*, J. Mass Spectrom., 35, 163-167, 2000.
- [319] Tanaka K.: *The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation*, Nobel Lecture, 12.08.2002.
- [320] Biemann K.: *Sequencing of peptides by tandem mass spectrometry and high-energy collision-induced dissociation*, Methods in Enzymology 193, 455-479, 1990.
- [321] Dekrey M., Mabud M., Cooks R.: *Applications of Linked Scan Procedures in Investigating Polyatomic Ion/Surface Interactions*, International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 67, 285-294, 1985.
- [322] Brown R., Lennon J.: *Sequence-specific fragmentation of matrix-assisted laser-desorbed protein/peptide ions*, Anal. Chem. 67, 3990, 1995.
- [323] Spengler B.: *Post-source decay analysis in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules*, J. Mass Spectrom. 32, 1019-1036, 1997.
- [324] Colorado A., Shen J., Vartanian V., Brodbelt J.: *Use of infrared multiphoton photodissociation with SWIFT for electrospray ionization and laser desorption applications in a quadrupole ion trap mass spectrometer*, Anal. Chem., 68, 4033-4043, 1996.
- [325] Roepstorff P., Fohlman J.: *Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides*, Biomed. Mass Spectrom., 11, 11, 601, 1984.
- [326] Jimenez J., Li K., Dreisewerd K., Mansvelder H., Brussaard A., Reinhold B., Van der Schors R., Karas M., Hillenkamp F., Burbach J., Costello C., Geraerts W.: *Pattern changes of pituitary peptides in rat after salt-loading as detected by means of direct, semiquantitative mass spectrometric profiling*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 94, 9481-9486, 1997.
- [327] Jousten K.: *Wutz Handbuch der Vakuumtechnik : Theorie und Praxis*, Vieweg + Teubner, 9. Auflage 2006.
- [328] Wiza J.: *Microchannel Plate Detectors*, Nuclear Instruments and Methods, Vol. 162, 587-601, 1979.
- [329] PHOTONIS USA, Sturbridge, MA 01566, [www.photonis.com](http://www.photonis.com).
- [330] *Dissertation* S. Rutzinger, TU München, 2003.
- [331] Daly N.: *Scintillation Type Mass Spectrometer Ion Detector*, Rev. Sci. Instrum. 31, 264, 1960.
- [332] Dubois F., Knochenmuss R., Zenobi R.: *An ion-to-photon conversion detector for mass spectrometry*, International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 169/170, 89-98, 1997.
- [333] Berkenkamp S., Kirpekar F., Hillenkamp F.: *Infrared MALDI Mass Spectrometry of Large Nucleic Acids*, Science, 281, 260-262, 1998.
- [334] Kraus H.: *Cryogenic detectors and their application to mass spectrometry*, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 215, 45-58, 2002.

- [335] Wenzel R., Matter U., Schultheis L., Zenobi R.: *Analysis of Megadalton Ions Using Cryodetection MALDI Time-of-Flight Mass Spectrometry*, Anal. Chem., 77, 4329-4337, 2005.
- [336] Ens W., Mao Y., Mayer F., Standing K.: *Properties of Matrix-assisted Laser Desorption. Measurements with a Time-to-Digital Converter*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 5, 3, 117-123, 1991.
- [337] Weisstein E.: „*Liouville Measure.*“ From MathWorld-A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/LiouvilleMeasure.html>.
- [338] Berkenkamp S., Menzel C., Hillenkamp F., Dreisewerd K.: *Measurements of Mean Initial Velocities of Analyte and Matrix Ions in Infrared MALDI*, J Am Soc Mass Spectrom, 13, 209-220, 2002.
- [339] Engeln-Müllges E., Reutter F.: *Numerik-Algorithmen mit ANSI C-Programmen*, BI-Wissenschaftsverlag 1993.
- [340] Feynman R.: *Vorlesungen über Physik: Band II: Elektromagnetismus und Struktur der Materie*, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, 3. Auflage 2001.
- [341] Hecht E.: *Optik*, Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH, 4. Auflage, 2005.
- [342] Daniel H.: *Physik Band 3: Optik, Thermodynamik, Quanten*, 1. Auflage, de-Gruyter-Verlag, 1998.
- [343] Kühlke D.: *Optik. Grundlagen und Anwendungen*, Nachdruck der 2. Auflage, Verlag Harri Deutsch, 2007.
- [344] [www.olympus.de/microscopy](http://www.olympus.de/microscopy).
- [345] Schober H.: *Das Sehen.*, Band I, VEB Fachbuchverlag Leipzig, 1964.
- [346] Weisstein E.: „*Liouville's Phase Space Theorem.*“ From MathWorld-A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/LiouvillesPhaseSpaceTheorem.html>.
- [347] Witt V.: *Wie funktionieren Achromat und Apochromat*, Sterne und Weltraum 44, Teil 1, 10, 72 ff. 2005, Teil 2, 12, 46 ff. 2005.
- [348] Kintner E., Sillitto R.: *A new „analytic“ method for computing the optical transfer function*, Optica Acta, 23, 8, 607-619, 1976.
- [349] Planck M.: *Einführung in die Theoretische Optik*, IV. Band, S. Hirzel Verlag, 1927.
- [350] Wolf E.: *Electromagnetic Diffraction in Optical Systems. I. An Integral Representation of Image Field*, Proc. R. Soc. Lond. A 253, 349-357, 1959.
- [351] Richards B. and Wolf, E.: *Electromagnetic Diffraction in Optical Systems. II. Structure of Image Field in an Aplanatic System*, Proc. R. Soc. Lond. A 253, 358-379, 1959.
- [352] Demtröder W.: *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik*, 3. Auflage Springer-Verlag, 2004.
- [353] Goodman J.: *Introduction to Fourier Optics*, Roberts & Company Publishers, 3. Ausgabe 2005.
- [354] Durst F., Ruck B.: *Einfluß von Laserstrahlen auf Teilcheneigenschaften, Teil 1. Einwirkung des Strahlungsdrucks auf die Teilchenbewegung*, Technisches Messen, 47, 6, 223-229, 1980.
- [355] Durst F., Ruck B.: *Einfluß von Laserstrahlen auf Teilcheneigenschaften, Teil 2. Teilchenerwärmung durch Strahlungsabsorption*, Technisches Messen, 47, 7/8, 267-272, 1980.

- [356] Kleemann B.: *Beugen, Filtern, Komprimieren*, Physikjournal Nr. 6, 5, 2005.
- [357] <http://mathworld.wolfram.com/>.
- [358] Heynacher E.: *Einige Bemerkungen zum Problem der optischen Bildgütebeurteilung*, Journal of modern Optics 7 : 2, 173-178, 1960.
- [359] Berek M.: *Über Kohärenz und Konsonanz des Lichtes*, The European physical journal, 40, 420 - 450, 1927.
- [360] Williams T.: *The Optical Transfer Function of Imaging Systems*, Institute of Physics Publishing, 1999.
- [361] Sheppard C., Gu M.: *Three-dimensional optical transfer function for an annular lens*, Opt. Commun. 81 (5), 276-280, 1991.
- [362] Miks A., Novak J.: *Conditions for identical position of optimal image plane for axial imaging with different values of f-number*, Opt. Commun. 284, 2420-2423, 2011.
- [363] Sure T.: *Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven*, Mitteilungen für Wissenschaft und Technik, CDR 2, S. 27-48, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, 1999.
- [364] Hell S., Stelzer E., Lindek S., Cremer C.: *Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-B  $4\pi$  confocal microscopy*, Optics Letters, 19, 222-224, 1994.
- [365] Shannon C.: *Communication in the Presence of Noise*, Proc. of the IEEE, Vol. 86, 2, 447-457, 1998.
- [366] Oppenheim A., Schafer R.: *Discrete-Time Signal Processing*, New Jersey: Prentice Hall, 1999.
- [367] Candy J., Temes G.: *Oversampling Methods for A/D and D/A Conversion*, IEEE Transactions on Circuits and Systems, 1987.
- [368] Squires G.: *Messergebnisse und ihre Auswertung*, de Gruyter & Co, Berlin 1971.
- [369] Glaser R.: *Biophysik*, 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena, 1996.
- [370] Werner M.: *Information und Codierung*, 2. Auflage Vieweg+Teubner — GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden 2008.
- [371] Mende D.: *Physik: Gleichungen und Tabellen*, 11. Auflage, Fachbuchverlag Leipzig GmbH, 1994.
- [372] CIE, *Commission Internationale de l'Eclairage*, CIE Central Bureau, Kegelgasse 27, A-1030 Vienna, Austria.
- [373] TIFF 6.0 Revision, 03.06.1992, Adobe Developers Association, Adobe Systems Incorporated.