

Matrix-gestützte Laser-Desorption und Ionisation (MALDI) mit ultrakurzen Laserpulsen

vorgelegt von
Jörg Wichmann

Berlin, 10.11.2010

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
am Fachbereich Physik
der Freien Universität Berlin

Freie Universität



Berlin

Tag der mündlichen Prüfung:

20.12.2010

1. Gutachter:

Prof. Dr. Drs. h.c. Ludger Wöste

2. Gutachter:

Prof. Dr. Holger Dau

Nichts versteht sich von selbst.

Damit ist nicht gesagt, daß jede Gemeinsamkeit Zufall ist, wohl aber, daß sie als Problem gesehen werden muß.

Niklas Luhmann, Politische Soziologie

So hat wohl schon jeder Experimentalphysiker überraschende, unerklärliche Effekte beobachtet, die sich vielleicht sogar einige Male reproduzieren ließen, um schließlich spurlos zu verschwinden; aber er spricht in solchen Fällen noch nicht von einer wissenschaftlichen Entdeckung (obwohl er sich vielleicht darum bemühen wird, Reproduktionsanordnungen für den Effekt aufzustellen). Der wissenschaftlich belangvolle *Effekt* kann je gerade dadurch definiert werden, daß er sich regelmäßig und von jedem reproduzieren läßt, der die Versuchsanordnung nach Vorschrift aufbaut. Kein ernster Physiker wird jene „okkulten Effekte“ zu deren Reproduktion er keine Anweisung geben kann, der wissenschaftlichen Öffentlichkeit als Entdeckung unterbreiten, denn nur zu bald würde man auf Grund des negativen Resultats der Nachprüfung die „Entdeckung“ als ein Hirngespinnst ablehnen.

K. R. Popper, Logik der Forschung

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass, ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Weiterhin erkläre ich hiermit, dass, ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Aus dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen

i J. Wichmann, C. Lupulescu, L. Wöste, and A. Lindinger

Matrix assisted laser desorption/ionization of potassium adapted angiotensine II using femtosecond laser pulses

European Physics Journal D **52**: 151-154, (2009)

ii J. M. Wichmann, C. Lupulescu, L. Wöste, and A. Lindinger

Matrix-assisted laser desorption/ionization by using femtosecond laser pulses in the near-infrared wavelength regime

Rapid Communications in Mass Spectrometry **23**: 1105-1108 (2009)

iii J. M. Wichmann, F. Schwaneberg, C. Lupulescu, and A. Lindinger

Chirp dependent matrix-assisted laser desorption/ionization measurements of alkali metal adapted angiotensine II by using ultrashort laser pulses in the near IR regime

International Journal of Mass Spectrometry 296, 30-35 (2010)

iv J. M. Wichmann, R. Mitric, C. Weise, M. Holz, and A. Lindinger

Modification of the secondary structure by caesium-adaption of angiotensin II: an experimental and theoretical study

(in preparation)

v J. M. Wichmann, R. Mitric M. Holz, and A. Lindinger, *Phthalocyanines*

in Gas-Phase: An MALDI and LDI approach of photooxidation

(in preparation)

Beiträge zu Konferenzen

i J. M. Wichmann, F. Schwaneberg, C. Lupulescu, and A. Lindinger

Posterbeitrag: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization using ultrashort Laserpulses*

ACU (IV)-Workshop, 2009, Berlin

ii J. Wichmann, C. Lupulescu, L. Wöste, and A. Lindinger

Posterbeitrag: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization using fs-Laserpulses*

ISSPIC 14, Valladolid, (2008) Spanien

Kurzfassung

Seit seiner ersten Beschreibung ist MALDI (von Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) in Kombination mit Massenspektrometrie eine der wichtigsten Analysemethoden im Bereich der Biochemie, der Physiologie und der Polymerforschung geworden. Mittels MALDI ist es möglich, große fragile Moleküle unbeschadet in die Gasphase zu bringen und dabei einen kleinen Teil durch Protonierung mit einer positiven Ladung zu versehen. Trotz der weiten Verbreitung ist der Ionisation während MALDI noch nicht vollständig verstanden. MALDI setzt sich aus mehreren Prozessen wie Absorption des Laserpulses, Desorption/Ablation der MALDI-Probe und Ionisation zusammen. Die meisten Studien über MALDI werden mit ns-Laserpulsen durchgeführt. So können Prozesse in kürzeren Zeitspannen (wie die Absorption) nur ungenau untersucht werden. Mit (geformten) ultrakurzen Laserpulsen ist es jedoch möglich, schnelle chemische und physikalische Prozesse zu untersuchen. Daher soll in dieser Arbeit MALDI durch eine Bestrahlung der MALDI-Probe mit Femtosekunden-Laserpulsen im UV und nahen IR untersucht werden. MALDI kann mittels ultrakurzen Laserpulsen der Zentralwellenlängen $\lambda_c=400\text{nm}$ (UV) und ($\lambda_c=800\text{nm}$) (nahes IR) beobachtet werden. Dies ist insofern überraschend, da die verwendeten Matrixsubstanzen nahezu keine Absorption im nahen IR zeigen. Durch MALDI-Experimente mit verschiedenen Pulsdauern wird dieser Effekt als zweiphotonische Absorption der $\lambda_c=800\text{nm}$ -Laserpulse durch die Matrix erklärt. Weitere Experimente untersuchen die Kationisierung von Angiotensin II für verschiedenen Laserpulseenergien und Pulsdauern für die Wellenlängen $\lambda=337\text{nm}$ (ns-Laserpulse) und für fs-Laserpulse der Zentralwellenlängen $\lambda_c=400\text{nm}$ und $\lambda_c=800\text{nm}$. Steigende Pulsenergien führen demnach zu höheren Kationisierungstendenzen (das ist der Quotient des Ionensignals von kationisiertem und protoniertem Angiotensin II). Für ultrakurze Laserpulse der Zentralwellenlänge $\lambda_c=800\text{nm}$ kann für die Kationisierungstendenz die Abhängigkeit: $[\text{Ang}+\text{K}]/[\text{Ang}+\text{H}] \propto E^{2\pm 0,2}/\tau^{0,47\pm 0,1}$ ermittelt werden. Trotz der hohen Schwankung des Ionensignals bei MALDI ist es möglich, die Methode der

kohärenten Kontrolle zur Untersuchung der Kationisierung von Angiotensin II zu realisieren, um die Ergebnisse vorangehender Untersuchungen zu bestätigen. Um die Bindungsstellen der Kationen an Angiotensin II in der Gasphase zu ermitteln, werden PSD-Massenspektren (von Post Source Decay) gezeigt und die Ergebnisse mit Moleküldynamik-Simulationen verglichen. Eine Stabilisierung der sekundären Struktur durch z.B. ein oder mehrere Cäsium-Kationen begründet eine geringere Fragmentierung der Alkalimetall-adaptiertem Angiotensin II in der Gasphase. In einem weiteren Kapitel wird der Matrix-Suppression-Effekt (MSE) mit Hilfe von geringen Konzentrationen von Tetraalkylammoniumhalogeniden (TAAH) in der MALDI-Probe untersucht. Durch eine Bestrahlung der MALDI-Probe mit ns- und fs-Laserpulsen können weitere Hinweise auf die Konzentration der TAAH an der Oberfläche gefunden werden. Untersuchungen von Phthalocyanin (PcH₂) und Eisen(II)-Phthalocyanin (PcFe) bilden das Thema des letzten Kapitels. Diese Substanzen lassen sich sowohl durch MALDI als auch ohne die Verwendung einer Matrixsubstanz, durch Laser Desorption/Ionization (LDI) in die Gasphase überführen. Es kann die Adaption von Sauerstoff an PcFe durch das Auftreten eines [PcFe^(IV)=O]⁺-Komplexes, sowie die Dimerbildung [PcFe^(III)-O-Fe^(III)Pc]⁺ beobachtet werden. Die Dimerbildung ist bei MALDI deutlich stärker als bei LDI ausgeprägt. Dies veranschaulicht direkt die Puffer-Wirkung durch die Matrixsubstanz für einen schonenden Übergang der Analytmoleküle in die Gasphase bei MALDI. Im letzten Teil wird die Fragmentierung von PcH₂ und PcFe durch Bestrahlung mit fs-Laserpulsen der Zentralwellenlänge $\lambda_c=800\text{nm}$ beschrieben.

Summary

MALDI (von Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) in combination with mass spectrometry is an important method for mass analysis in biochemistry, physiology, and polymer research. With MALDI, large and fragile molecules can be brought into the gas-phase. The protonated analyte molecules can be detected after MALDI. Despite its wide application, the underlying MALDI processes is still not fully understood. MALDI contains absorption, desorption/ablation, and ionization. Most studies about MALDI have been done with nanosecond (ns) laser pulses. By irradiating the MALDI sample with ns-laserpulses, fast processes could only be examined unprecisely.

By using (shaped) femtosecond (fs) laser pulses, it is possible to examine ultrafast chemical and physical processes. Therefore MALDI is examined by using ultrashort laser pulses. MALDI mass spectra could be obtained by ultrashort laser pulses in the UV ($\lambda_c=400\text{nm}$) and in the near IR ($\lambda_c=800\text{nm}$). MALDI in the near IR is unexpected, because the used matrix substances show almost no absorption in this wavelength regime. By using different pulse durations, this phenomenon can be explained by two photon absorption of the laser pulses.

Further experiments examine the cationization process (the adaption of a cation to the analyte molecule during MALDI) of angiotensine II as a function of the pulse duration and pulse energy for the (central) wavelengths $\lambda=337\text{nm}$ ($\tau=3\text{ns}$), $\lambda_c=400\text{nm}$ ($\tau=60\text{fs}$), and $\lambda_c=800\text{nm}$ (various pulse durations), respectively. For ultrashort laser pulses in the near IR, the cationization tendency has figured out to $[\text{Ang}+\text{K}]/[\text{Ang}+\text{H}] \propto E^{2\pm 0,2}/\tau^{0,47\pm 0,1}$. MALDI has a low signal-to-noise level. However, it was possible to verify these results by using the coherent control method. With a combination of Post Source Decay (PSD) measurements and geometry optimizations on the semi-empirical level of theory, the positions of cations at the angiotensin II molecule have been clarified. Electrostatic interaction between the Cs^+ cation(s) and the heterocyclic amino acids stabilize the secondary structure of angiotensine II. This seems to be the reason for less fragmentation of catio-

nized in comparison to protonated angiotensine II in gas phase.

The Matrix Suppression Effect (MSE) and the Alyte Suppression Effect have been examined by addition of a low concentration of quaternary ammonium salts to the MALDI sample. By irradiating the MALDI sample with ns- and fs laser pulses, further arguments for the concentration of the quaternary ammonium cations near the surface of the MALDI sample have been found.

MALDI and LDI (von Laser Desorption/Ionization) studies of phthalocyanin (PcH_2) and iron(II)-phthalocyanin (PcFe) are described in the last chapter. The obtained mass spectra show an adaption of oxygen to PcFe . Mass spectra show the formation of $[\text{PcFe}^{(IV)}=\text{O}]^+$ and the formation of a dimer structure $[\text{PcFe}^{(III)}-\text{O}-\text{Fe}^{(III)}\text{Pc}]^+$. In MALDI mass spectra, the dimer signal is much more intensive than in LDI mass spectra. This shows the buffering effect of matrix substance during desorption/ablation. The fragmentation of PcH_2 and PcFe has been examined in the last part of this chapter by irradiating the LDI sample with fs laser pulses.

Inhaltsverzeichnis

I	Theoretische Grundlagen	17
1	Einleitung	18
2	Theoretische Grundlagen von MALDI	24
2.1	Der Desorptionsprozess	25
2.1.1	Die MALDI-Probe	26
2.1.2	Der Einfluss der Laserpulse auf die Desorption/Ablation	26
2.1.3	Der Einfluss der Wellenlänge	28
2.1.4	MALDI-Studien mit Laserpulsen im IR	28
2.1.5	MALDI-Studien mit Laserpulsen im UV	28
2.1.6	Die Laserpulsdauer	29
2.1.7	Die Laserpuls-Energie	32
2.2	Die MALDI-Wolke	33
2.2.1	Fragmentierung in der MALDI-Wolke	35
2.3	Der Ionisierungsprozess	36
2.4	Das Pooling-Modell	38
2.4.1	Primäre Ionisation	38
2.4.2	Die sekundäre Ionisation	41
2.5	Das Lucky-Survivors-Modell	42
2.6	Vergleich der vorgestellten Modellvorstellungen	49
3	Quantenchemische Methoden	51
3.1	Kraftfeldmethoden zur Berechnung der molekularen Struktur .	52
3.2	Hartee-Fock Approximation	54
3.3	Semi-empirische Näherung	57

3.3.1	Das Austin Modell (AM1-Methode)	58
3.3.2	Grenzen der AM-1 Methode	59
3.4	Moleküldynamik-Simulation	60
3.4.1	Motivation	60
3.4.2	Die Durchführung der MD-Simulationen	60
3.5	Dichtefunktionaltheorie	61
4	Erzeugung und Formung von Femtosekunden-Laserpuls	63
4.1	Erzeugung von fs-Laserpuls	63
4.2	Die Formung ultrakurzer Laserpulse	64
4.3	Bestimmung der Pulsdauer ultrakurzer Laserpulse	65
5	Kohärente Kontrolle und Evolutionäre Algorithmen	69
5.1	Evolutionäre Algorithmen	70
5.2	Experimentelle Realisierung	71
II	Experimenteller Aufbau	74
6	Das MALDI TOF	76
6.1	Die Regulierung des Drucks in den Kammern	77
6.2	Die Proben-Kammer	77
6.3	Das Massenspektrometer	79
6.4	Die Steuerung des MALDI-TOF	79
6.5	Die Datenaquisition	80
6.6	Der modifizierte optische Aufbau des MALDI-TOF	80
7	Erzeugung und Formung von ultrakurzen Laserpuls	83
7.1	Das fs-Lasersystem	83
7.2	Die Formung der Laserpulse	84
8	Durchführung der MALDI-TOF-Analyse	85
8.1	Probenpräparation	85
8.2	Durchführung der MALDI-MS	87

9	Berechnung der molekularen Struktur	89
9.1	Moleküldynamik-Simulation	89
9.2	Dichtefunktionaltheorie	90
III	Ergebnisse	92
10	Fragestellung der Experimente	93
11	MALDI mit ultrakurzen Laserpulsen	94
11.1	Stand der Forschung	95
11.2	MALDI-Massenspektren von Angiotensin II	96
11.3	MALDI-Massenspektren für UV-Laserpulse	98
11.4	Der Einfluss der Pulsdauer	99
11.5	Der Einfluss der Wellenlänge (im UV)	101
11.6	Fazit	102
11.7	Einfluss der Pulsdauer auf die Desorption/Ablation	104
11.8	MALDI mit fs-Laserpulsen im nahen IR	106
11.8.1	Zweiphotonische Anregung der Matrixmoleküle	106
11.8.2	Erwärmung des Probenhalters	107
11.9	Zwei-Photonen-Absorption	108
11.10	[Ang+H] ⁺ als Funktion der Pulsdauer im nahen IR	109
11.11	Interpretation von MALDI mit fs-Laserpulsen im nahen IR	111
12	Abhängigkeit des Analytsignals von der Pulsenergie	115
12.1	Energieabhängigkeit bei Laserpulsen im UV	116
12.2	Energieabhängigkeit bei Laserpulsen im nahen IR	116
12.3	Interpretation	117
12.4	Fazit	119
13	Kationisierung von Angiotensin II	120
13.1	Stand der Forschung	120
13.2	Kationisierung als Funktion der Pulsenergie	122
13.3	Ergebnisse und Diskussion	126

13.3.1	Kationisierung bei ns-Laserpulsen	126
13.3.2	Kationisierung bei fs-Laserpulsen im UV	127
13.3.3	Kationisierung bei fs-Laserpulsen im nahen IR	127
13.4	Quantitative Analyse der Kationisierung	127
13.5	Fazit	132
14	Kohärente Kontrolle der Kationisierung	134
14.1	Stand der Forschung	134
14.2	Schwankung des Analyt-Ionensignals	135
14.3	Die Anwendung auf die Kationisierung	139
14.4	Der experimentelle Aufbau der Optimierungsschleife	139
14.5	Durchführung der kohärenten Kontrolle	140
14.6	Deutung und Ausblick	143
15	Die Bindungspositionen der Kationen an Angiotensin II	145
15.1	Stand der Forschung	145
15.2	Durchführung der PSD-Analyse von Cäsium-adaptiertem Angiotensin II	148
15.3	Durchführung der MD-Simulationen zur Berechnung der sekundären Struktur	149
15.4	Ergebnisse	151
15.4.1	Protoniertes Angiotensin II	151
15.4.2	Einfach Cs-adaptiertes Angiotensin II	154
15.4.3	Zweifach Cäsium-adaptiertes Angiotensin II	155
15.4.4	Dreifach Cs ⁺ -adaptiertes Angiotensin II	158
15.5	Interpretation der Ergebnisse	161
16	Der Matrix-Suppression-Effekt bei MALDI	164
16.1	MSE bei MALDI mit ns-Laserpulsen	169
16.2	MSE bei MALDI mit fs-Laserpulsen im UV	171
16.3	MSE bei MALDI mit fs-Laserpulsen im nahen IR	173
16.4	ASE durch TAAH in der MALDI-Probe	173
16.5	Zusammenfassung der experimentellen Resultate	177

16.6 Interpretation	178
17 Phthalocyanine in der Gasphase	181
17.1 Stand der Forschung	181
17.2 Beschreibung der Experimente	182
17.3 MALDI- und LDI-Massenspektren von Eisen(II)-Phthalocyanin	185
17.4 Bindung von Sauerstoff an Eisen(II)-Phthalocyanin	186
17.5 Bindung von Sauerstoff an Phthalocyanin	188
17.6 Die Dimer-Bindung bei MALDI am Beispiel von Eisen(II)- Phthalocyanin	188
17.7 Die molekulare Struktur von $[\text{PcFe}^{(IV)}\text{-O-Fe}^{(IV)}\text{Pc}]^+$	190
17.8 Die Fragmentierung von Phthalocyaninen bei LDI-MS	193
17.8.1 Fragmentierung von Phthalocyanin (PcH_2)	195
17.8.2 Fragmentierung von Eisen(II)-Phthalocyanin (PcFe) . .	195
17.9 Interpretation der Ergebnisse	197
18 Zusammenfassung und Ausblick	200

Teil I

Theoretische Grundlagen

Kapitel 1

Einleitung

Seit der Entdeckung von Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, (MALDI) durch Karas und Hillenkamp im Jahre 1986 können große und fragile Moleküle unbeschadet in die Gasphase gebracht werden [1, 2, 3, 4]. In Kombination mit Massenspektrometrie (MS) ist MALDI in Biochemie [5, 6, 7], der Analyse von Metallorganischen Verbindungen [8] der Polymerforschung [9, 10, 11] und weiteren Forschungsbereichen als Analysemethode fragiler Makromoleküle unverzichtbar geworden. Eine MALDI-MS-Analyse ist einfach und schnell durchführbar. Eine MALDI-Probe, bestehend aus einer Mischung der zu analysierenden Substanz und einer Matrixsubstanz wird durch einen Laserpuls desorbiert/ablatiert. Dabei wird ein kleiner Teil der Analytmoleküle (A) protoniert ($[A+H]^+$) und somit positiv geladen. Dieser kleine Teil kann anschließend mit einem Massenspektrometer analysiert werden. Da die molekularen Massen der untersuchten Substanzen sehr große Werte (bis zu einigen hundert Kilo-Dalton) annehmen können, wird meist ein TOF-Massenspektrometer (von Time-of-Flight) für die Analyse verwendet. Das Prinzip einer MALDI-Massenspektrometrie ist in Abb. 1.1 dargestellt.

Als Laser werden typischerweise gepulste Laser im UV verwendet (z.B. Stickstofflaser ($\lambda=337\text{nm}$) oder frequenzverdreifachte Nd:YAG-Laser ($\lambda=355\text{nm}$)). Als Matrixsubstanzen eignen sich Derivate der Zimtsäure und der Benzoesäure, da sie Laserpulse im UV absorbieren und leicht deprotonierbar sind. Abb. 1.2 zeigt die Strukturen einiger gebräuchlicher Matrixsubstan-

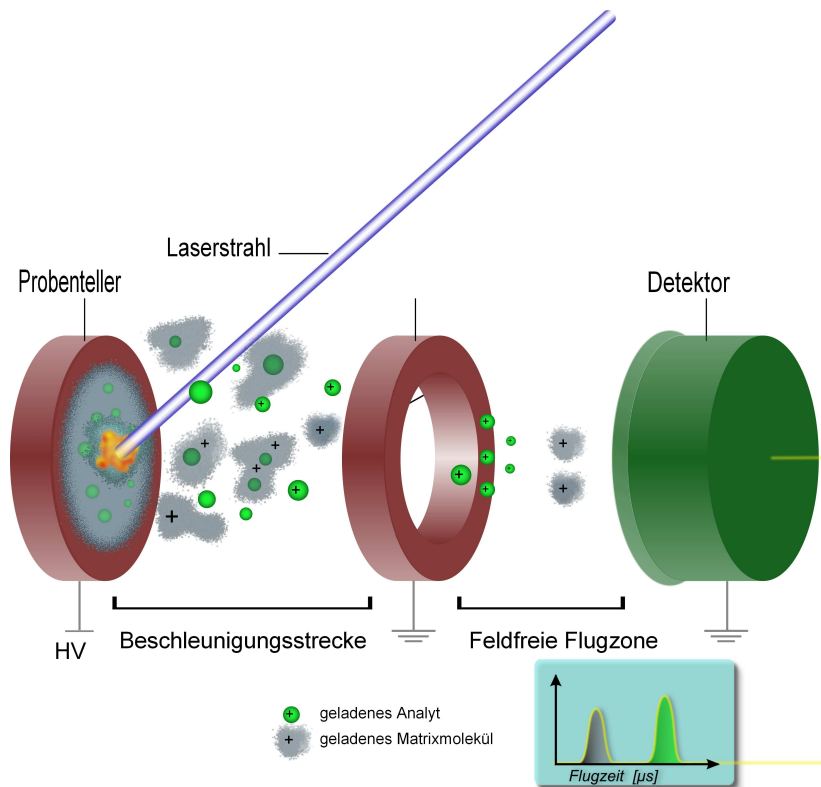


Abbildung 1.1: **Funktionsweise eines MALDI-Massenspektrometers.** Eine kristalline Probe, bestehend aus einer Matrixsubstanz und dem Analyten wird mit einem Laserpuls desorbiert/ablatiert. Die dabei entstehenden Matrix- und Analytionen (z.B. $[A+H]^+$) werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und danach mittels eines TOF-Massenspektrometers analysiert.

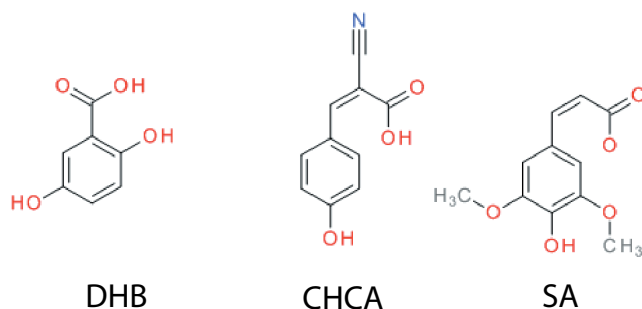


Abbildung 1.2: **Molekulare Struktur von gebräuchlichen MALDI-Matrixsubstanzen.** 2,5-DHB steht für 2,5-Dihydroxybenzoesäure, CHCA steht für α -Cyano-4-Hydroxycinnamsäure und SA steht für Sinapinsäure. MALDI-Matrixsubstanzen für UV-Laserpulse bestehen aus einem konjugierten π -System zur Absorption der Laserpulse sowie einer leicht deprotonierbaren funktionellen Gruppe (z.B. -COOH).

zen. Die durch die Bestrahlung absorbierte Energie dient zum großen Teil zur Desorption/Ablation der MALDI-Probe. Nur ein kleiner Teil der absorbierten Energie wird für die Ionisierung der Matrixmoleküle und darauf folgend, für die Protonierung der Analytmoleküle verwendet. Neben der Absorption der Laserpulse reguliert die Matrix den Energie- und Ladungstransfer zu den Analytmolekülen. Zudem wirkt die Matrixsubstanz einer Akkumulation der Analytmoleküle in der Probe entgegen.

MALDI erzeugt positive und negativ geladene Teilchen. Während im positiven Ionenmodus die positive Ladung aus einer Protonierung des Analytmoleküls $[A+H]^+$ resultiert, wird im negativen Ionenmodus meist das Analytmolekül deprotoniert $[A-H]^-$. Als Protonenquelle dient hierbei die Matrix. Bei der überwiegenden Mehrheit der MALDI-MS Analysen (wie auch in dieser Arbeit) werden die positiv-geladenen Ionen nachgewiesen.

Eine massenspektrometrische Analyse mittels MALDI hat gegenüber anderen Methoden wie FAB (von Fast-Atom-Bombardement) [12], LSIMS (von Liquid Secundary Ion Mass Spectrometry) [13], ESI (von Elektrospray-

Ionization) [14, 15, 16] oder LDI (von Laser-Desorption/Ionization) [17] eine Reihe von Vorteilen:

Leichte Handhabung MALDI-MS ist heute durch den Einsatz kommerzieller Geräte schnell und einfach durchzuführen. Eine spezielle Expertise ist hierfür nicht notwendig. Die Probenpräparation stellt in der überwiegenden Mehrheit der Fälle keine Schwierigkeit dar. Überdies ist Wahl einer geeigneten Matrixsubstanz für den Nachweis eines Analyt-Typs ausreichend (z.B. CHCA für kleine Peptide, DHD für Proteine).

Toleranz gegenüber Verunreinigungen Eine MALDI-MS Analyse zeigt eine hohe Toleranz gegenüber Puffer, Salzen oder pH-Werten der Probe. Problematisch sind lediglich Lösungsmittel mit einem hohen Siedepunkt (z.B. Dimethylsulfoxyd). Einige Verunreinigungen in der MALDI-Probe erzeugen zwar zusätzliche Massenpeaks im MALDI-Massenspektrum (wie z.B. Alkali-Kationen), welche aber meist keine Schwierigkeiten bei der Interpretation der MALDI-Massenspektren verursachen.

Breite Anwendbarkeit Mit einer kleinen Auswahl von etwa zehn verschiedenen Matrixsubstanzen kann eine Vielzahl von Substanzen (Proteine, DNA, Polymere, Komplex-Verbindungen, fragile metallorganische Verbindungen oder Lipide) nachgewiesen werden. Selbst völlig unlösliche Substanzen können in den meisten Fällen mittels lösungsmittelfreier Probenpräparationen analysiert werden. Heute sind in vielen kommerziellen MALDI-Massenspektrometern die Analysen von positiv- und negativ geladenen Ionen möglich, was das Spektrum der analysierbaren Substanzen zusätzlich erhöht.

Hohe Genauigkeit MALDI-MS eignet sich zur Analyse kleinster Stoffmengen (bis zu wenigen hundert Atto-Mol [18]). Im Regelfall werden einige Femto-Mol benötigt, falls die zu analysierende Substanz in einem gängigen Lösungsmittel (z.B. Wasser, Ethanol, Aceton) löslich ist. Lösungsmittelfreie Ansätze, wie sie gelegentlich in der Analyse von synthetischen Polymeren angewandt werden, benötigen etwas mehr Analytsubstanz (etwa 1-10 μ g) [19].

MALDI ist eine besonders schonende Methode, um Moleküle in die Gasphase zu bringen Mittels MALDI können Makromoleküle bis zu einer molekularen Masse von einigen hundert Kilodalton (kDa) analysiert werden. Dies umfasst z.B. ein Grippevirus der Masse von ca. 500kDa [20] oder lange Polymerstränge.

MALDI-MS ist universell einsetzbar Neuste Entwicklungen wie z.B. MALDI-Imaging kann biologisch relevante Substanzen innerhalb von biologischen Zellen nachweisen [21, 22]. Eine weitere wichtige Entwicklung ist die PSD-Analyse (Post-Source-Decay). Mit dieser Methode kann die Primärstruktur von z.B. Peptiden und kleinen Proteinen sehr schnell und sicher bestimmt werden [23, 24, 25].

Trotz dieser vielen Vorteile ist der MALDI-Prozess, insbesondere die Ionisation der Matrixmoleküle und der Analytmoleküle, noch heute ein Gebiet intensiver Forschung. Ein besseres Verständnis von MALDI könnte dazu beitragen, mittels gezielter Entwicklung von Matrixsubstanzen und MALDI-MS Geräten diese Analysemethode weiter zu verbessern. Während die Desorption durch experimentelle und theoretische Studien weitgehend aufgeklärt ist, sind die Vorgänge der Ionisierung von Matrix- und Analytmoleküle noch nicht vollständig verstanden. Trotz intensiver Bemühung werden momentan nur zwei Modelle zur Ionisation ausführlich diskutiert [26]. Zum einen die Photoionisation einiger Matrixmoleküle durch das sogenannte Pooling und ein anschließender Ladungstransfer zu den Analytmolekülen und zum anderen wird im Cluster- oder Lucky-Survivors-Modell die Ionisation durch in der MALDI-Probe vorhandene protonierte Analytmoleküle erklärt. Beide Modelle werden im Kapitel 2 ausführlich behandelt.

Diese Arbeit schließt an die bisherige Forschung an, indem der MALDI-Prozess mit ultrakurzen Laserpulsen untersucht wird. Mit Hilfe von Laserpulsen mit Pulslängen im Femtosekunden-Bereich können, chemische Reaktionen zeitaufgelöst untersucht werden. Bisherige Studien wurden meist mit Laser-

pulsen der Pulsdauer von einigen Nanosekunden durchgeführt. Chemische Reaktionen, welche in kürzeren Zeitbereichen ablaufen, können mit diesen Laserpulsen nicht direkt analysiert werden. Methoden wie die Variation von Pulsdauer, Wellenlänge und Pulsenergie, hochaufgelöste Zweipuls-Messungen oder die Kohärente Kontrolle sollen daher im Rahmen dieser Arbeit offene Fragen zum MALDI-Prozess klären.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen von MALDI

In diesem Kapitel sollen die bisherigen Forschungsergebnisse über den MALDI-Prozess dargestellt werden. Der MALDI-Prozess ist seit seiner Entdeckung ein Gegenstand intensiver Forschung, da viele Zusammenhänge bis heute nicht vollständig verstanden sind. Da in dieser Arbeit der MALDI-Prozess mit verschiedenen Laserpuls-Typen untersucht wird, werden die Einflüsse der Laserpuls-Parameter besonders berücksichtigt.

Bei der Bestrahlung einer kristallinen MALDI-Probe mit einem Laserpuls (der Pulsdauer von einigen Nanosekunden) wird die Energie des Laserpulses durch die Matrixmoleküle absorbiert. Die Anregungsenergie wird zum überwiegenden Teil in thermische Energie umgewandelt. Dies führt zur Emission von Teilchen aus der MALDI-Probe in die nähere Umgebung. Die Freisetzung von Teilchen durch die Bestrahlung der MALDI-Probe wird als Desorption/Ablation bezeichnet. Durch die Desorption/Ablation der MALDI-Probe werden die Analytmoleküle unbeschadet in die Gasphase gebracht. Die Beschreibung der Desorption bildet den ersten Teil dieses Kapitels.

Die Matrixmoleküle können nicht direkt ionisiert werden, da die Ionisationspotentiale der gängigen Matrixsubstanzen erheblich höher als die Energie eines Photons der entsprechenden Wellenlänge ist. Die Beschreibung der Ionisierung bildet den zweiten Teil dieses Kapitels. Ionisierte Matrixmoleküle

bilden die Grundlage für den Protonen-Transfer von der ionisierten Matrix zum Analytmolekül. Dieser findet nach heutiger Erkenntnis zum großen Teil in der Gasphase, der sog. MALDI-Wolke, statt. Die Peptide oder Polymere werden in der Regel nicht angeregt, da sie die Laserpulse nicht absorbieren. Durch Bestrahlung der Probe bei MALDI-typischen Bedingungen (siehe Kap. 2) werden sowohl Matrix-Analyt-Aggregate (Cluster) sowie einzelne Moleküle emittiert.

Die Ionisation eines Matrixmoleküls unter Abgabe eines Elektrons erfordert für gebräuchliche Matrixsubstanzen eine Energie von etwa 8eV [27]. Die Absorption eines Photons im UV liefert jedoch nur etwa ein Drittel der für eine Ionisierung notwendigen Energie. Da bei einer Bestrahlung mit ns-Laserpulsen die Laserpulsintensität (Höhe der elektrischen Feldstärke) für eine mehrphotonische photoresonante Anregung zu gering ist, ist die Wahrscheinlichkeit für eine photoinduzierte Ionisierung äußerst gering. So kann die Bildung von Ionen nicht erklärt werden. Daher wurden einige Modelle für die Ionisation von Matrixmolekülen entwickelt, wovon die beiden wichtigsten in Kap. 2.4 und 2.5 ausführlich beschrieben werden.

2.1 Der Desorptionsprozess

Unter Desorption versteht man die Emission von Molekülen aus einem Festkörper, z.B. nach der Einwirkung eines Laserpulses. Der Begriff der Desorption für MALDI ist streng genommen missverständlich verwendet, da bei Desorption nur einzelne Moleküle emittiert werden. Daher wird in dieser Arbeit zusätzlich der Begriff der Ablation verwendet werden, weil für die Laserfluenzen (Pulsenergiewerte), welche für MALDI geeignet sind, neben Molekülen auch Cluster von Matrix- und Matrix-Analyt-Molekülen emittiert werden. Der Prozess der Desorption/Ablation wurde in einer Reihe von theoretischen [28, 29, 30] und experimentellen Studien untersucht [31, 32] und in z.B. [33] zusammengefasst. Die wichtigsten Aspekte/Einflüsse auf die Desorption/Ablation soll in folgendem eingegangen werden.

2.1.1 Die MALDI-Probe

Eine MALDI-Probe besteht aus einer polykristallinen Schicht aus Matrixsubstanz, in welcher die Analyt-Substanz durch Kokristallisation in die Kristallgefüge miteingegliedert ist. Die einzelnen dicht aneinander liegenden Kristalle besitzen eine Kantenlänge von 1-100 μm [34, 35]. Das molare Verhältnis von Analyt zu Matrix variiert von einem $\frac{\text{Analyt}}{\text{Matrix}}$ Verhältnis von 10^{-2} (für Oligopeptide) bis zu 10^{-4} (für größere Proteine). Je nach Matrixsubstanz und verwendetem Analyt ist die Homogenität der Verteilung des Analyten über die gesamte Probe unterschiedlich. Größere Peptide und Proteine konzentrieren sich bei der Matrixsubstanz 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in den Rändern der einzelnen Kristalle. Kleine Peptide sind dagegen gleichmäßig in α -Cyano-4-hydroxylzimtsäure (CHCA) oder Sinapinsäure (SA) über die gesamte Oberfläche der MALDI-Probe verteilt [34, 36]. Eine möglichst gleichmäßige und polykristalline MALDI-Probe mit einer glatten Oberfläche ist das Ziel einer jeden Präparationsmethode. Eine ganze Reihe von Studien (z.B. [37, 38]), wie auch die vorliegende Arbeit geben Vorschläge für die Präparation. Neben der Wahl der Matrixsubstanz kann die Oberfläche des Probenhalters (meist eine polierten Stahlplatte), das verwendete Lösungsmittel, die Probenkonzentration, der pH-Wert oder die Analyt-Konzentration in der MALDI-Probe für verschiedene Anwendungen optimiert werden.

2.1.2 Der Einfluss der Laserpulse auf die Desorption/Ablation

Ein wichtiger Faktor bei MALDI ist der zur Bestrahlung verwendete Laserpuls. Die Auswirkung der Bestrahlung auf die MALDI-Probe durch die Parameter des Laserpulses und dessen Einfluss auf das Ionensignal wurden in einer Vielzahl von Studien untersucht (z.B. in [39, 40, 41]). Hierbei wurde der Einfluss der Wellenlänge, der Pulsdauer und der Pulsenergie (Laserfluenz) betrachtet. Die Resultate lieferten wichtige Erkenntnis über die zugrunde liegenden Prozesse während MALDI. Nachfolgend sollen diese Resultate zusammengefasst werden.

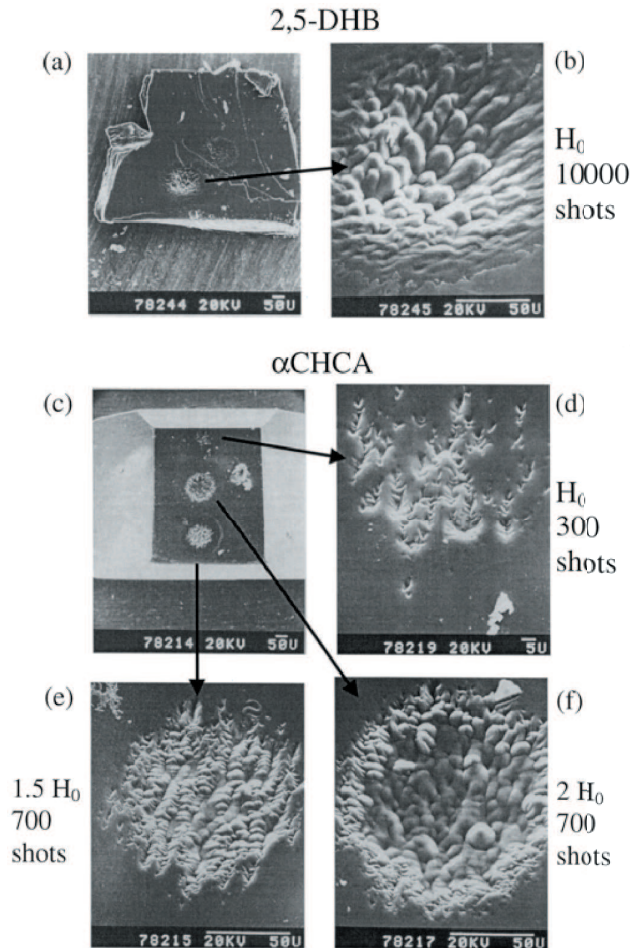


Abbildung 2.1: **Probenabnutzung durch Bestrahlung der MALDI-Probe.** Die oberen zwei Bilder zeigen Desorptions/Ablations-Spuren durch eine Bestrahlung mit 10.000 Laserpulsen in einer DHB MALDI-Probe. Die Probe wurde mit der Minimal-Laserfluenz (H_0) bestrahlt, bei welcher sich Ionen bilden. Die unteren vier Bilder zeigen den Einfluss einer erhöhten Laserpulsfluenz auf eine MALDI-Probe, bestehend aus CHCA. Alle Bilder zeigen Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von bestrahlten MALDI-Proben. Die Bestrahlung erfolgte mit 3ns-Laserpulsen der Wellenlänge $\lambda=337\text{nm}$. Die Tiefe der Krater ist im Nanometerbereich. (Quelle: [33])

2.1.3 Der Einfluss der Wellenlänge

Für MALDI sind sowohl Laserpulse der Wellenlängen im IR ($\lambda > 2\mu\text{m}$) als auch im UV ($\lambda < 400\text{nm}$) geeignet. Für beide Wellenlängenbereiche gibt es jeweils geeignete Matrixsubstanzen. Die überwiegende Zahl der MALDI-Massenspektren wird mit Hilfe von UV-Laserpulsen aufgezeichnet. MALDI-Untersuchungen mit Laserpulsen im IR sind jedoch besonders schonend und können daher große Moleküle unbeschadet in die Gasphase bringen [41].

2.1.4 MALDI-Studien mit Laserpulsen im IR

Studien mit Laserpulsen mit Wellenlängen im IR wurden mittels Er:YAG-Lasern ($\lambda = 2,94\mu\text{m}$), Er:YSGG-Lasern ($\lambda = 2,97\mu\text{m}$) sowie CO_2 -Lasern ($\lambda = 10,2\mu\text{m}$) [42] durchgeführt. Als Matrixsubstanz eignet sich beispielsweise Glycerol. Um den Einfluss der Wellenlänge im IR zu untersuchen, wurden zusätzlich Optisch-Parametrischen Oszillatoren (OPO) [41] und Freie Elektronen-Laser (FEL) für den Wellenlängenbereich zwischen 3 und 10 μm durchgeführt [40]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch die Absorption der Laserpulse Schwingungen von -N-H oder -O-H Bindungen der Matrixmoleküle im Bereich von 3 μm - sowie -O-H und -C-H Bindungen der Matrixmoleküle im Bereich von 10 μm angeregt werden. Zusätzlich ist es im Bereich von 5,5 μm -6,5 μm möglich, Schwingungen von -C=O Bindungen anzuregen. Für weitere Besonderheiten zu MALDI mit Wellenlängen im IR sei der interessierte Leser auf die reichhaltige Literatur (beispielsweise von S. Berkenkamp) verwiesen.

2.1.5 MALDI-Studien mit Laserpulsen im UV

Einfluss der Wellenlänge

Die überwiegende Mehrheit der MALDI-Massenspektren wird mit den Wellenlängen $\lambda = 337\text{nm}$ (N_2 -Laser) oder $\lambda = 355\text{nm}$ (frequenzverdreifender Nd:YAG-Laser) aufgenommen. Mittels einer Vielzahl von Lasertypen konnte der Einfluss der Wellenlänge in einem Bereich von $\lambda = 193\text{nm}$ bis zu $\lambda = 450\text{nm}$

untersucht werden. Am unteren Bereich wurden MALDI-Untersuchungen mittels Excimer-Laser ($\lambda=193\text{nm}$ für Ar:F), ($\lambda=307\text{nm}$ für Xe:C) und frequenzvervierfachtem Nd:YAG-Laser ($\lambda=266\text{nm}$) vorgenommen [43]. Mit einem frequenzverdoppelten Ti^{3+} :Saphir-Laser (Wellenlänge von $\lambda=360\text{nm}$ bis 450nm einstellbar) konnte gezeigt werden, dass die Matrixsubstanz CHCA bis zu $\lambda_{max}=430\text{nm}$ für MALDI geeignet ist [44]. Als globaler Indikator für die Eignung diente in den meisten Studien die Höhe des Analyt- und das Matrix-Ionensignals. Mit verschiedenen DHB-Derivaten unterschiedlicher Absorptionsspektren wurde eine Proportionalität zwischen Absorptionskoeffizient für die verwendete Wellenlänge und dem detektierten Analyt-Ionensignal festgestellt [35]. Eine Bestrahlung der MALDI-Probe mit Laserpulsen verschiedener Wellenlängen liefert weitgehend gleiche MALDI-Massenspektren, solange die Laserpulse durch die Matrix absorbiert werden können [44, 40]. Falls die MALDI-Probe die Laserpulse nicht absorbiert, so wird in der Regel kein Ionensignal detektiert.

Zusätzlich wurden MALDI-Massenspektren durch Bestrahlung mit Laserpulsen im sichtbaren Wellenlängenbereich aufgenommen. Für diese Studien dienten z.B. frequenzverdoppelte Nd-YAG-Laser ($\lambda=532\text{nm}$). Als Matrix-Substanzen eigneten sich zum Beispiel Farbstoffe (wie Cumarin in 3-Nitrobenzylalkohol oder 2-Animo-3-Nitrophenol) gelöst wurden [45, 46], oder Meso-tetrakis(pentafluorphenyl)porphyrin [47, 48]. Bis auf wenige vorgeschlagene Spezialanwendungen blieben diese Studien jedoch ohne weiteren Einfluss.

2.1.6 Die Laserpulsdauer

Sowohl Nd:YAG-Laser als auch N_2 -Laser emittieren Laserpulse einer Pulsdauer von einigen Nanosekunden. Eine Bestrahlung mit Laserpulsen einer Pulsdauern von $\tau=3\text{ns}$ bis $\tau=10\text{ns}$ erzeugt das höchste Analyt-Ionensignal. Aus einem hohen Analyt-Ionensignal resultieren meist qualitativ hochwertige MALDI-Massenspektren mit hohem Signal-zu-Rausch-Verhältnis und guter Massenauflösung. Für zunehmende Pulsdauern ($\tau>25\text{ns}$) nimmt das Analyt-Ionensignal leicht ab. Als Begründung dient thermische Relaxation der An-

regung (thermal confinement) im Bereich der bestrahlten Fläche. So wird die Desorption/Ablation verlangsamt [49]. Gelegentlich spricht man von einer schwachen Phasen-Explosion. Durch die schwächere Desorption/Ablation werden weniger Ionen erzeugt. Dagegen konnte bei einer Bestrahlung mit ps-Laserpulsen kein höheres Ionensignal detektiert werden [50]. R. Knochenmuss schließt aus diesem Ergebnis, dass eine photoresonante mehrphotonische-Absorptionen durch die Matrix keinen relevanten Beitrag zur Ionisation derselben beiträgt und Veränderungen bei der Desorption/Ablation keinen unmittelbaren Einfluss auf das Ionensignal haben. Überdies konnten für unterschiedliche Pulsdauern im UV keine signifikanten Unterschiede im MALDI-Massenspektrum beobachtet werden (s.u.).

MALDI-Experimente mittels Femtosekunden-Laserpulsen wurden bisher nur wenige beschrieben. So soll in diesem Rahmen auf zwei Studien gesondert eingegangen werden.

Die Studie von Demirev et al. Demirev und seine Mitarbeiter untersuchten in die Abhängigkeit des Analyt-Ionensignals von der Laserpulsdauer [39]. Dafür wurden MALDI-Massenspektren mit einem N₂-Laser (3ns, 337nm) und einen Farbstoff-Laser (560fs, 496nm oder frequenzverdoppelt: 248nm) erzeugt. Für alle drei Laserpuls-Typen wurde als Analytsubstanz Insulin (Matrixsubstanz: Ferulasäure) verwendet. Für 560fs-Laserpulse der Zentralwellenlänge von $\lambda_c=496\text{nm}$ war das Analyt-Ionensignal mit geringer Intensität im Massenspektrum sichtbar - bei ansonsten ähnlichem Matrix-Ionensignal. Da die Matrixsubstanz Laserpulse der Wellenlängen oberhalb von $\lambda=450\text{nm}$ nicht absorbiert, wurde dieses Ergebnis als zwei-photonische Absorption interpretiert, aber nicht weitergehend untersucht. Demirev et al. zeigten, dass für MALDI die Laserpuls-Fluenz (Pulsenergie/Bestrahlungsfläche) und nicht die Laserpuls-Intensität (Pulsleistung/Bestrahlungsfläche) das Ionensignal beeinflusst. Die Zeit, in welcher die MALDI-Probe bestrahlt wird, erscheint demnach zweitrangig. Das Analyt-Ionensignal ist bei Verwendung von fs-Laserpulsen ($\lambda=248\text{ nm}$) deutlich geringer als bei ns-Laserpulsen, jedoch ist die Minimalenergie (Threshold-

Energie) für die Erzeugung von Ionen für fs-Laserpulse im UV nur unwesentlich höher als bei ns-Laserpulsen der Wellenlänge $\lambda=337\text{nm}$. Deutlichere Unterschiede ergeben sich für andere Proteine. Bei einigen Analyt-Substanzen (z.B. Trypsin) lässt sich mit Bestrahlung mittels fs-Laserpulsen kein Analyt-Ionensignal detektieren.

Die Studie von Papantonakis et al. Diese Studie verglich die MALDI-Massenspektren von verschiedenen Laserpulsen im UV (und IR) bei verschiedenen Wellenlängen und Pulslängen: $\tau=2\text{ns}$ bei einer Wellenlänge von $\lambda=266\text{nm}$ (Nd:YAG, frequenzvervierfacht), $\tau=3\text{ns}$ bei $\lambda=337\text{nm}$ (N_2 -Laser) und $\tau\approx 120\text{fs}$ bei Zentralwellenlängen $\lambda_c=400\text{nm}$ und $\lambda_c=266\text{nm}$ (Ti:Saphir) [40]. Zum Vergleich wurden zusätzlich MALDI-Spektren mit einem Freien Elektronen-Laser (FEL). Die Wellenlänge konnte dabei von $\lambda=2\mu\text{m}$ bis $\lambda=10\mu\text{m}$ eingestellt werden. Die Pulsdauer betrug ca. $\tau=100\text{ns}$, aufgeteilt in Subpulse von $\tau_s=1\text{ps}$ ($E=0,6\text{mJ}$ pro Pulseinheit). Das experimentelle Resultat sind ähnliche MALDI-Massenspektren für alle Typen von Laserpulsen (IR und UV) bei Verwendung der gleichen Matrixsubstanz. Dieses Resultat ist laut der Autoren ein Indikator für die These, dass MALDI ein - für eine Reihe von Laserpuls-Parametern gleich ablaufender Prozess ist. Durch die Bestrahlung der verschiedenen Laserpulse resultiert eine starke Änderung während der Desorption/Ablation. Diese unterschiedliche Desorption wirkt sich aber nur minimal auf das Analyt-Ionensignal aus, da der Einfluss der Wellenlänge auf die (primäre) Ionisation minimal erscheint, argumentieren Papantonakis et al. für die Ionisation (Protonierung) der Analyt-Moleküle in der MALDI-Wolke. Auch diese Studie kommt zu dem Ergebnis, dass eine Pulsdauer von $\tau=3\text{-}5\text{ns}$, wie sie von N_2 - oder frequenzverdreifachten Nd:YAG Laser emittiert werden, das höchste Analyt-Ionensignal bei Verwendung von gebräuchlichen Matrixsubstanzen erzeugte. Für Laserpulse im UV spielt die Pulsdauer im ns-Bereich nur eine geringe Rolle.

2.1.7 Die Laserpuls-Energie

Für MALDI werden die Laserpulse mittels eines Linsensystems meist auf eine Fläche des Durchmessers von 50-200 μm fokussiert. Für MALDI-Analysen werden im UV Laserpulsenergien von 0,2-10 μJ (abhängig von der Größe der bestrahlten Fläche) verwendet. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die maßgebliche Größe für MALDI bei konstanter Bestrahlungsfläche die Laserpuls-Fluenz (Pulsenergie) und nicht die Laserpuls-Intensität (Pulsenergie/Pulsdauer) (für UV) ist. Je größer die bestrahlte Fläche ist, desto höher muss die Pulsenergie eingestellt sein, um ein gleich hohes Ionensignal zu erhalten. Insbesondere die Höhe des Analyt-Ionensignal ist stark von der Laserpuls-Fluenz abhängig. Die Größe der bestrahlten Fläche ist bei nahezu allen MALDI-Massenspektrometern auf einen festen (minimalen) Wert fixiert. Daher wird in dieser Arbeit die Laserpulsenergie anstatt der Laserpuls-Fluenz als relevanter Faktor für das Ionensignal verwendet. Die Pulsenergie ist wesentlich einfacher zu bestimmen. In einer Reihe von Studien konnte eine minimale Pulsenergie angegeben werden, unterhalb derer nur sehr wenige Ionen gebildet werden. Diese Minimalenergie des Laserpulses ist für eine gewöhnliche Spotgröße (Durchmesser 200 μm) mit etwa 0,1-0,3 μJ ($\approx 10^6\text{W}/\text{cm}^2$) für die meisten Matrixsubstanzen und Lasertypen ähnlich. Hinweise für eine physikalische Mindestfluenz (minimale Pulsenergie) wurde zwar sowohl experimentell gefunden [51, 52] als auch mittels MD-Simulationen (von Molecular Dynamic) vorhergesagt [53, 54], ist dennoch kontrovers diskutiert [55].

Oberhalb dieser Minimalenergie steigt das Ionensignal (sowohl Analyt- als auch Matrix-Ionensignal) stark an [56, 55, 57, 58]. Experimentelle Studien ermitteln den Anstieg des Ionensignals als Funktion der Pulsenergie zu:

$$[\text{Ionensignal}] \propto E^n, n = 5 \dots 10.$$

Für sehr hohe Laserpulsenergien (oberhalb etwa 3-10 μJ je nach Analyt) nimmt das Analyt-Ionensignal wieder ab. Fragmentierung der Analytmoleküle könnte ein Grund für diesen Rückgang sein.

An dieser Stelle sollen nochmals die Einflüsse des Laserpuls-Parameter

auf das MALDI-Massenspektrum zusammengefasst werden.

(i) Eine Bestrahlung der MALDI-Probe mit Laserpulsen einer Pulsdauer von 3-5 ns, wie sie von N₂-Lasern oder Nd:YAG-Lasern emittiert werden, erzeugen das höchste Analyt-Ionensignal.

(ii) Die Laserpulsdauer besitzt im Bereich von einigen Picosekunden bis etwa zehn Nanosekunden keinen entscheidenden Einfluss auf das MALDI-Massenspektrum.

(iii) Das Ionensignal ist etwa proportional zum Absorptionskoeffizienten der verwendeten Matrixsubstanz für die Wellenlänge der Laserpulse.

(iv) Für MALDI-typische Pulsenergien steigt das Analyt-Ionensignal direkt oberhalb der Minimalenergie mit der fünften bis zehnten Potenz mit der Laserfluenz/Pulsenergie an.

(v) Die minimale Pulsenergie für MALDI ist, unabhängig von Wellenlänge und Pulsdauer, etwa 0,1-0,3 μ J.

2.2 Die MALDI-Wolke

Nach der Desorption/Ablation der MALDI-Probe entsteht direkt oberhalb der bestrahlten Fläche eine Gaswolke, welche mit der Zeit an Volumen zunimmt. Diese Wolke, bestehend aus Matrixmolekülen und deren Aggregationen, Analytmolekülen und einer Reihe von weiteren geladenen und ungeladenen Teilchen, wird in der Literatur als MALDI-Wolke (MALDI-plume) bezeichnet und ist Gegenstand einer großen Anzahl von Untersuchungen. Photographien der MALDI-Wolke wurden beispielsweise von Fournier et al. aufgenommen [60] (siehe auch Abb. 2.2).

Die MALDI-Wolke besteht aus einem dichten Gas aus geladenen und ungeladenen Teilchen. Die physikalischen Eigenschaften (Druck, Tempera-

tur) und die chemischen Eigenschaften (Zusammensetzung, Reaktionskinetik) der MALDI-Wolke hängen wesentlich von der absorbierten Pulsenergie des Laserpulses ab. Mehrheitlich besteht die MALDI-Wolke aus ungeladenen Matrixmolekülen und Aggregaten derselben. Ein kleiner Teil (etwa 10^{-4} bis 10^{-3}) der desorbierten/ablatierten Moleküle/Cluster ist geladen [59, 52]. Darüber hinaus wurden Protonen, Kationen (z.B. Na^+) oder freie Elektronen in der MALDI-Wolke prognostiziert/nachgewiesen. Nach MD-Simulationen und experimentellen Studien kann die MALDI-Wolke als ein expandierendes Gasvolumen mit einer Anfangstemperatur zwischen 500K bis 1000K angesehen werden. Die Vorgänge in der MALDI-Wolke wurden intensiv untersucht, weil dort sowohl der Protonen-Transfer von Matrixmolekülen zu Analytmolekülen als auch die Kationisierung der Matrix- und Analytmoleküle vermutet werden. Falls die Laserpulsenergie unterhalb der Minimalenergie für MALDI liegt, besteht die MALDI-Wolke ausschließlich aus ungeladenen Molekülen. Erst oberhalb dieser Mindestfluenz werden größere Cluster aus der MALDI-Probe ablatiert. Gleichzeitig können Matrix- und Analytionen detektiert werden. Dieser Zusammenhang wurde durch MD-Simulationen modelliert [53] und experimentell nachgewiesen. Dieser quantitative Zusammenhang zwischen Clusterbildung und Ionisation bildet die Grundlage des Lucky-Survivors- oder Cluster-Modells (siehe Kap. 2.5).

Etwa 100ns nach der Bestrahlung ist die Desorption/Ablation weitgehend abgeschlossen. Danach herrscht in der MALDI-Wolke eine hohe Temperatur (bis zu 1.000 K) und eine hohe Teilchendichte. Die Dichte hängt von der verwendeten Matrixsubstanz und den Pulsparametern ab [60, 61, 62]. Die Bestimmung der Geschwindigkeiten der einzelnen Teilchen wurde eingehend untersucht. Die experimentell ermittelte durchschnittliche Geschwindigkeit der Matrixionen reicht von 200 m/s bis etwa 1.000 m/s [63, 64]. Die axiale Geschwindigkeit der neutralen Moleküle wird mit etwa 600 m/s bis 800 m/s (je nach Laserpuls-Parameter) angegeben [65]. Dabei konnten keine unterschiedlichen Geschwindigkeiten bei geladenen und ungeladenen Teilchen festgestellt werden. Abb. 2.2 zeigt die unterschiedliche Richtungen der Geschwindigkeiten der Matrixmoleküle (oben) und der Analytmoleküle (unten)

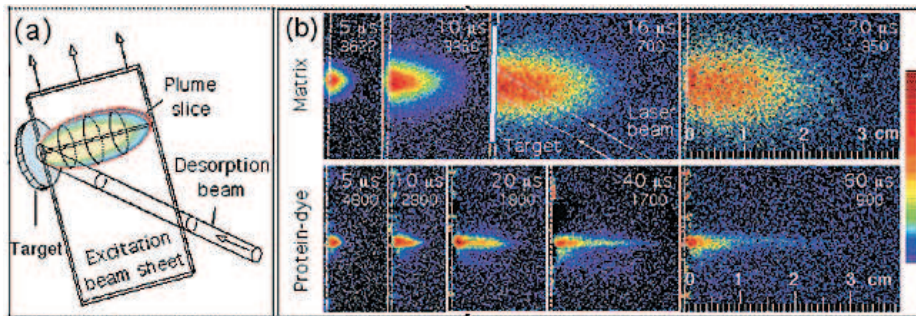


Abbildung 2.2: **Die MALDI-Wolke für verschiedene Zeitabstände nach der Bestrahlung.** Die Belichtung für die Photographie wurde mit verschiedenen Wellenlängen durchgeführt, so dass die Matrix und der Analyt einzeln aufgenommen werden kann. Deutlich zu erkennen ist die unterschiedliche Geschwindigkeitsverteilung von Matrix- und Analytionen. Während die Matrix (oben) eine breite Verteilung besitzt, bewegen sich die Analytmoleküle verstärkt senkrecht entlang der Probenoberfläche. Der Laserpuls wird für diese Messung schräg eingestrahlt, wie im linken Teil der Abbildung sichtbar ist. (Quelle: [60])

gezeigt. Aufgrund der unterschiedlichen Werte und Richtungen der Geschwindigkeiten von Matrixteilchen und Analytmolekülen finden eine hohe Anzahl von Stößen statt. Diese Stöße zwischen (neutralen und geladenen) Matrixmolekülen und Analytmolekülen bilden die Grundlage für die (sekundäre) Ionisierung der Analytmoleküle durch Übertragung von Protonen.

Die Dynamik in der MALDI-Wolke kann als Überschall-Expansion [66], ähnlich einem Molekularstrahl beschrieben werden [67]. Die Dichte nimmt mit der Zeit aufgrund der Ausdehnung der MALDI-Wolke schnell ab.

2.2.1 Fragmentierung in der MALDI-Wolke

Die innere Energie der Analytmoleküle in der MALDI-Wolke führt zur Fragmentierung von etwa 10-20% der protonierten Analytmoleküle (meist) im Massenspektrometer aufgrund ihrer hohen inneren Energie. Diese Fragmentierung wird als PSD (von Post-Source-Decay) bezeichnet. Dagegen zerfällt nur ein sehr geringer Teil (ca. 1%) der Analytmoleküle während oder kurz nach der Desorption/Ablation. Diese Zerfälle werden unter dem Begriff ISD

(von In-Source-Decay) zusammengefaßt. Im Unterschied zum PSD findet dieser innerhalb der ersten hundert Nanosekunden statt. Eine Genauere Betrachtung kommt dem PSD zu, da der Anteil der zerfallenden (Analyt-) Moleküle erheblich höher ist

PSD-Massenspektren können Aufschluss über die primäre Struktur von Peptiden geben. Eine wichtige Einflussgröße für die Fragmentierung des Analyten ist die Matrixsubstanz, während die Pulsenergie nur einen geringen Einfluss ausübt. Unterschiedliche Matrixsubstanzen induzieren unterschiedliche Raten der Fragmentierung von Analytmolekülen. Je heißer (*hotter*) die Matrixsubstanz, desto stärker fragmentiert die Analytsubstanz im nach der MALDI-Wolke (im Massenspektrometer). Die genauen Ursachen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden [68, 69, 25]. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die unterschiedlich exothermen Protonen-Transfer-Reaktionen und die anfänglichen Geschwindigkeiten einen wichtigen Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten der Analytmoleküle besitzt.

2.3 Der Ionisierungsprozess

Bei der MALDI-Massenspektrometrie werden neben Matrixionen (im unteren m/z -Bereich) einfach protonierte Analytmoleküle $[A+H]^+$ detektiert. Abhängig von den Laserpuls-Parametern werden bei MALDI zwischen 10^{-4} und 10^{-3} der Moleküle ionisiert. Ein Problem bei der Erklärung von MALDI ist die (primäre) Ionisation der Matrixmoleküle. Die Ionisation der Matrixmoleküle wird durch die absorbierte Energie des Laserpulses ausgelöst. Ein Photon der Wellenlänge $\lambda=337\text{nm}$, besitzt eine Energie von etwa $E=3,7\text{eV}$. Das Ionisierungs-Potential (IP) der gängigen Matrixsubstanzen liegt jedoch bei etwa $E=8\text{eV}$ [27]. Um ein Matrixmolekül zu ionisieren, müsste dieses somit mindestens zwei bis drei Photonen gleichzeitig absorbieren (je nach Wellenlänge). Dieser Prozess ist für die eingesetzten Pulsenergien bei Pulsdauern in ns-Bereich sehr unwahrscheinlich, da die elektrische Feldstärke zu gering ist, um eine ausreichende simultane mehrphotonische Anregung des Matrixmoleküls zu erreichen. Darüber hinaus besitzt die Pulsdauer des zur

Bestrahlung eingesetzten Laserpulses keinen nennenswerten Einfluss auf die Ionisierung der Matrixmoleküle [40, 50].

Daher wurden Modelle entwickelt, um die auftretenden Ionen bei MALDI zu erklären. Diskutiert werden zwei Modelle. Das Pooling-Modell geht von einer Photoanregung vieler Matrixmoleküle aus. Durch Energieaustausch können so einige Matrixmoleküle ionisiert werden. Dieses wird intensiv diskutiert [26]. Das Cluster-Modell oder Lucky-Survivors-Modell prognostiziert (vorgeformte) Ionen (pre-formed ions) in der MALDI-Probe, welche durch die Desorption/Ablation aus der MALDI-Probe durch die Bestrahlung mit dem Laserpuls freigesetzt werden [70, 71]. Bevor beide Modelle vorgestellt werden, sollen die für die Ionisation relevanten experimentellen Befunde zu MALDI noch einmal zusammengefasst werden.

(i) Die MALDI-Massenspektren besitzen eine sehr ähnliche Gestalt für alle geeigneten Pulsenergien und Wellenlängen (UV und IR).

(ii) In einem MALDI-Massenspektrum sind vorwiegend einfach protonierte Analyt-Moleküle $[A+H]^+$ zu finden. Mehrfach geladene Teilchen (wie z.B. $[A+2H]^{2+}$) werden erheblich seltener nachgewiesen. Neben positiv geladenen Teilchen werden bei MALDI auch negativ geladene Teilchen in geringerem Umfang (wie z.B. $[A-H]^-$) erzeugt.

(iii) Geeignete Matrixmoleküle besitzen eine leicht deprotonierbare funktionelle Gruppe wie $-COOH$ oder $-NH$.

(iv) Für hohe Analytkonzentrationen in der MALDI-Probe und einer Bestrahlung derselben mit Laserpulsen einer niedrigen Laserpulsenergie sind die Matrix-Massenpeaks (qualitativ und quantitativ) deutlich reduziert. Dieses Phänomen wird als Matrix Suppression Effect (MSE) bezeichnet (siehe auch Kap. 16).

(v) Zeitpunkt und Rate der Fragmentierung des Analyten ist stärker von der verwendeten Matrixsubstanz als von der Energie des zur Bestrahlung

genutzten Laserpulses abhängig.

(vi) Falls das Analytmolekül ein mehrwertiges Metall-Kation (z.B. Cu^{2+}) oder mehrere Kationen adaptiert, spalten sich gleichzeitig so viele Protonen vom Analytmolekül ab, dass zum Schluss wieder eine Elementarladung erhalten bleibt (z.B. $[\text{A}+\text{Cu}-\text{H}]^+$)

Um diese und einige weitere experimentelle Resultate zu erklären, wurden die beiden nachfolgende Modelle zur Ionisation entwickelt.

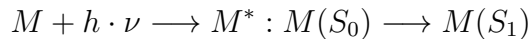
2.4 Das Pooling-Modell

In der Arbeit von Ehring et al. [72] wurde die Photoionisation der Matrixmoleküle durch den Transport von Anregungen vorgeschlagen. Dieses Modell wurde insbesondere von R. Knochenmuss weiterentwickelt [67, 73]. Man unterscheidet in diesem Modell zwischen primärer- und sekundärer Ionisation. Die primäre Ionisation umfasst die Ionisierung der Matrixmoleküle nach der Absorption des Laserpulses. Die primäre Ionisation findet nach der Absorption des Laserpulses statt und dauert nur wenige Nanosekunden. Die Protonierung der Analytmoleküle und andere Ladungstransfer-Reaktion in der MALDI-Wolke werden unter dem Begriff der sekundären Ionisierung zusammengefasst.

2.4.1 Primäre Ionisation

Um die Energiedifferenz zwischen der Photonenenergie ($E_{h\nu}=3,7\text{eV}$) und der Energie für die Ionisierung eines einzelnen Matrixmoleküls ($E_{ion} \approx 8\text{eV}$) zu überbrücken, werden Anregungen von Matrixmolekülen durch Excitonenübergang zu anderen Matrixmolekülen übertragen. Eine Vielzahl von angeregten Matrixmolekülen bildet einen „Pool“ von Anregungen. Der gesamte Vorgang der Übertragung von Anregungsenergie wird als Pooling bezeichnet. Die Übertragung der Anregungsenergie findet in der MALDI-Probe statt. Der Anregungsprozess des Matrixmoleküls M , $S_0 \rightarrow S_1$ wird durch die Absorption

jeweils eines Photons durch ein Matrixmolekül realisiert.



$M(S_0)$ bezeichnet hier den Grundzustand des Matrixmoleküls, $M(S_1)$ (oder M^*) seinen ersten angeregten Zustand. Kern des Pooling ist die Übertragung von Anregungsenergie zwischen zwei angeregten Matrixmolekülen. Dabei geht eines in den zweifach angeregten Zustand und das andere in seinen Grundzustand über (siehe Abb. 2.3 (B)).



Falls ein angeregtes Matrixmolekül seine Anregung an ein benachbartes (angeregtes) Matrixmolekül überträgt, so geht das empfangende Molekül in den zweifach angeregten Zustand S_n über, während andere Matrixmolekül wieder in den Grundzustand S_0 übergeht. Ein Matrixmolekül im Zustand S_n kann durch die Aufnahme einer weiteren Anregung ionisiert werden. Das beschriebene Pooling-Schema ist in Abb. 2.3 dargestellt.

Die Übertragung von Anregungsenergien durch die MALDI-Probe setzt nicht voraus, dass die Matrix-Moleküle an direkt benachbarten Plätzen im Kristallverbund der MALDI-Probe positioniert sein müssen. Durch Hopping können Anregungen durch den Festkörper wandern. Eine Energieübertragung mittels Excitonen wurde für 2,5-DHB von Ehring und Sundquist [74, 75] prognostiziert und durch Messungen der Lebensdauern angeregter Zustände bestätigt [76, 77]. Der Energiepool besitzt eine Lebensdauer von wenigen Nanosekunden, wie experimentell ermittelt wurde [50].

Dieses Pooling-Modell wurde von Knochenmuss et al. in einer quantitativ erfolgreichen MD-Simulation zur Erklärung des MALDI-Prozesses eingesetzt. Zusätzlich wurden die experimentellen Übertragungsraten von Anregungen bei dieser Simulation berücksichtigt. Der Anteil der resultierenden Matrixionen ist in guter Übereinstimmung mit den experimentell gewonnenen Daten (siehe z.B. [73]). Die primäre Ionisation findet dieser Studie zufolge während und kurze Zeit nach der Bestrahlung der MALDI-Probe statt. Nach der Desorption/Ablation werden die Abstände zwischen den Matrix-

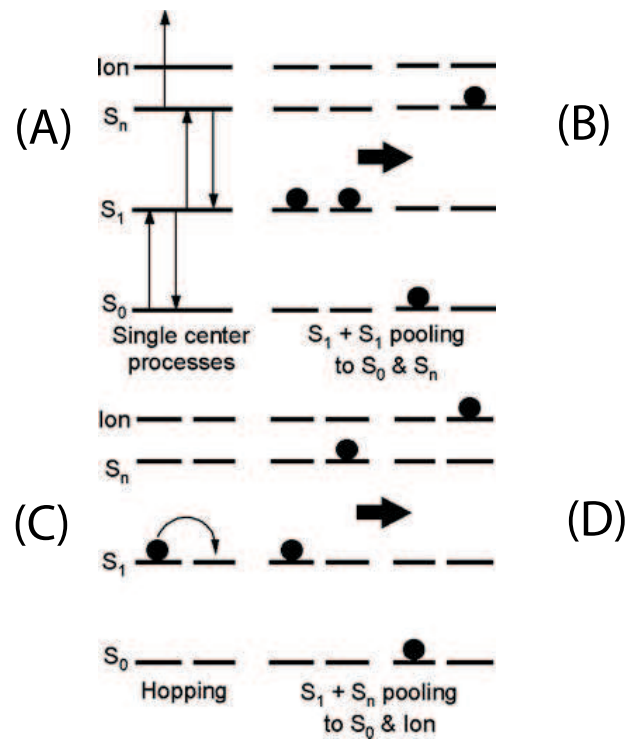


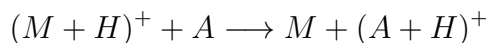
Abbildung 2.3: **Der Pooling-Mechanismus.** Hier werden die einzelnen Schritte des Pooling-Mechanismus illustriert. **(A)** zeigt das Anregungsschema eines Matrixmoleküls. S_0 bezeichnet den Grundzustand, S_1 den angeregten Zustand nach der Absorption eines Photons und S_n bezeichnet den Energiezustand nach Aufnahme einer zweiten Anregung. **(B)** zeigt den Pooling-Prozess, bei welchem zwei Anregungen auf ein Matrixmolekül übertragen werden. **(C)** Die Übertragung der Anregung zwischen (benachbarten) Molekülen wird als Hopping bezeichnet. **(D)** Zeigt die Ionisation eines Matrixmoleküls im S_n -Zustand durch die Aufnahme einer weiteren Anregung. Quelle: [26]

molekülen zu groß, so dass kein Excitonen transfer zwischen den Matrixmolekülen (Hopping) mehr stattfinden kann. Nach den angegebenen Studien wird je nach Anfangsbedingungen ein Anteil von 10^{-4} bis 10^{-3} der Matrixmoleküle ionisiert. Die Analytmoleküle werden durch Ladungstransport von ionisierten Matrixmolekülen während und nach der Desorption/Ablation protoniert. Dieser Vorgang ist Thema des nächsten Kapitels.

2.4.2 Die sekundäre Ionisation

Die sekundäre Ionisation beschreibt den Ladungstransfer zwischen ionisierter Matrix und den Analytmolekülen. Bei MALDI wird das einfach protonierte Analytmolekül $[A+H]^+$ sowie die kationisierten Spezies $[A+X]^+$ ($X=Na,K$) detektiert. Die Kationen sind meist Verunreinigung in der MALDI-Probe. Protonen werden dagegen von den Matrixmolekülen abgespalten oder liegen schon vor der Desorption/Ablation schwach gebunden in der MALDI-Probe vor. Bei gängigen Matrixsubstanzen (org. Säuren) wird das Proton von der $-COOH$ -Gruppe abgespalten [78, 79] oder von einem anderen $-YH$ -Rest (Y für O, N oder S). Experimentelle Hinweise, dass die Ladungstransfer-Reaktionen in der MALDI-Wolke stattfinden, lieferten u. a. Untersuchungen von Stevenson et al. [80]. Untersuchungen von Kinsel et al. zum Protonentransfer von CHCA zu einigen Aminosäuren geben weitere Belege dafür, dass der Ladungstransfer vorwiegend in der MALDI-Wolke durch Stöße initiiert wird [81]. Neutrale Peptide und Aminosäuren besitzen in der Regel hohe Protonen-Affinitäten (PA) ($>900\text{kJ/Mol}$) [82, 83, 84, 85, 86]. Diese sind deutlich höher als PAs von gängigen Matrixmolekülen (zwischen 850kJ/Mol und 900kJ/Mol) [87, 88, 89, 90]. Dies hat zur Folge, dass ein Protonentransfer von der Matrix zum Analyt eine exotherme Reaktion ist und bei Stößen stattfindet. Ein Modell von Chou et al. bestätigt diese Vermutung auch für den umgekehrten Fall (Protonentransfer von Aminosäuren zu Matrixmolekülen) [91]. Nach Stevenson et al. besteht ein linearer Zusammenhang zwischen PA-Differenzen und den Signalintensitäten im MALDI-Massenspektrum. Das ist ein starker Indikator für lokale thermische Gleichgewichtsreaktionen in der MALDI-Wolke.

Folgender Prozess findet demnach in der MALDI-Wolke statt:



wobei A das Analytmolekül und H das Proton symbolisiert ist. Für Alkalimetall-Kationen (z.B. Na^+ , K^+ ; hier als X bezeichnet):



Falls ein Analytmolekül mehrfach geladene Kationen (z.B. Cu^{2+}) oder mehrere Kationen ($2 \cdot Na^+$) adaptiert, wird es entsprechend deprotoniert bis das Molekül wieder einfach positiv geladen ist [92]. Für eine geringe Laserpulsenergie (thermisches Gleichgewicht in der MALDI-Wolke) lässt sich die Wahrscheinlichkeit einer sekundären Ionisation bei einem Stoß mit dem Arrhenius-Ansatz beschreiben [73].

$$\frac{[A + H]^+}{[M + H]^+} = K \cdot e^{\frac{GB[M] - GB[A]}{k_B \cdot T}}$$

Hierbei bezeichnet GB die Gasphasen-Basizität der Matrix (M) oder des Analyten (A), k_B die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur in der MALDI-Wolke (zwischen 500 und 1.000 K).

Das Pooling-Modell ist aufgrund seiner guten Übereinstimmung mit den experimentellen Resultaten sehr gut geeignet, die Ionisation bei MALDI zu beschreiben. Bei einer Bestrahlung der MALDI-Probe mit Laserpulsen im IR versagt das Modell, da die Photonenenergie (ca. $E \approx 0,1 \text{ eV}$) so gering ist und deshalb ein Matrixmolekül viele Anregungen auf sich vereinigen müsste, um ionisiert zu werden. Dies erscheint auch nach dem Pooling-Schema nicht hinreichend wahrscheinlich.

2.5 Das Lucky-Survivors-Modell

M. Karas und Mitarbeiter schlagen ein anderes Modell vor, welches eine Vielzahl der auftretenden Phänomene bei MALDI erklären kann [70, 71]. Analytmoleküle liegen in der Lösung zum Teil protoniert vor, wie auch ein Teil der Matrixmoleküle deprotoniert ist. Dies gilt insbesondere in der Mischung mit

MALDI-Matrixlösung auf dem Probeneller. Grundlegend für das Modell von Karas et al. ist daher die Vorstellung, dass die im gelösten Zustand teilweise protonierten Analytmoleküle und die deprotonierten Matrixmoleküle ihre Ladung während der Kristallisation nicht verlieren und so auch in der festen MALDI-Probe behalten. Dies bedeutet, dass ein Teil der Analyt-Moleküle schon protoniert in der MALDI-Probe vorliegen. Das Lucky-Survivors-Modell stützt sich auf folgende experimentellen Resultate:

(i) Nach Untersuchungen von Krüger et al. verbleibt ein Teil der in Lösung vorliegenden protonierten Analytmoleküle als protonierte oder kationisierte Spezies im kristallinen Zustand der MALDI-Probe erhalten [93].

(ii) Wie L. V. Zigilei mittels einer MD-Simulation gezeigt hat [30, 94, 95, 53], ist für die Bildung von Ionen eine Laserpulsenergie oberhalb einer Minimalenergie notwendig. Dies ist in Übereinstimmung mit experimentellen Studien. Ab genau dieser Minimalenergie setzt die Bildung von Clustern (Ablation) ein. Die Ablation scheint somit als Voraussetzung für die Ionisation der Matrix- und Analytmoleküle [71].

(iii) Eine Bestrahlung der MALDI-Probe mit UV-Laserpulsen als auch mit IR-Laserpulsen ergibt ein nahezu identisches MALDI-Massenspektrum (dies gilt solange die Laserpulse von der Matrix absorbiert werden) [40].

Karas und seine Mitarbeiter entwarfen aus diesen Phänomenen ein Modell, welches MALDI sowohl durch die Bestrahlung mit UV-Laserpulsen als auch mit IR-Laserpulsen erklärt. Dieses Modell der Ionisation der Matrix- und Analyt-Moleküle geht von großen Cluster aus, welche durch Stöße in der MALDI-Wolke zerfallen, so dass einzelne geladene Moleküle übrig bleiben. Die aus der Bestrahlung resultierenden Cluster enthalten einige Analytmoleküle (A), Kationen (H^+ , Na^+ , K^+) und Anionen (z.B. Cl^- , CF_3COO^- , M^-) sowie eine Vielzahl von Matrixmolekülen (M oder m). Diese Cluster sind schwach gebundene Systeme und können durch Stöße in der MALDI-Wolke zerfallen. Eine Erhöhung des Drucks um die MALDI-Wolke konserviert/stabilisiert diese Cluster, so dass diese direkt nachgewiesen werden

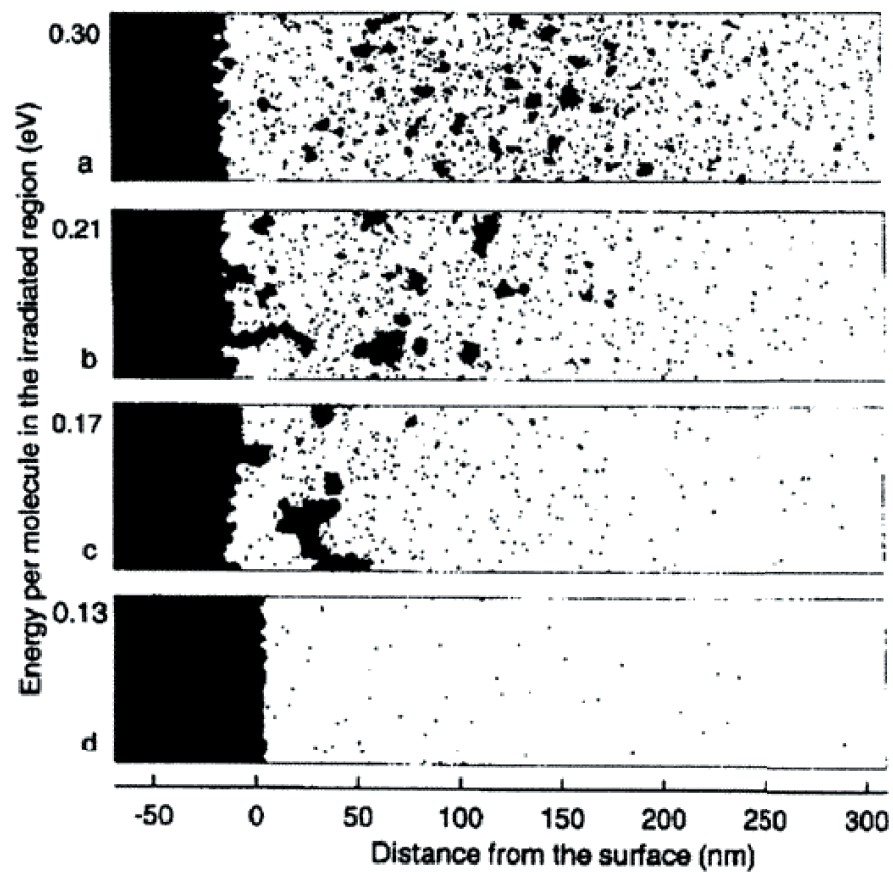


Abbildung 2.4: MD-Simulation der Desorption/Ablation von Teilchen nach der Bestrahlung der MALDI-Probe mit Laserpulsen verschiedener Pulsenergie. Im untersten Bild (d) tritt nur die Desorption von einzelnen Molekülen auf. Erst in den drei oberen Bildern (a)-(c) werden zusätzlich Cluster ablatiert. Am oberen linken Rand ist die Anregungsenergie in eV pro Molekül angezeigt. (Quelle: [30])

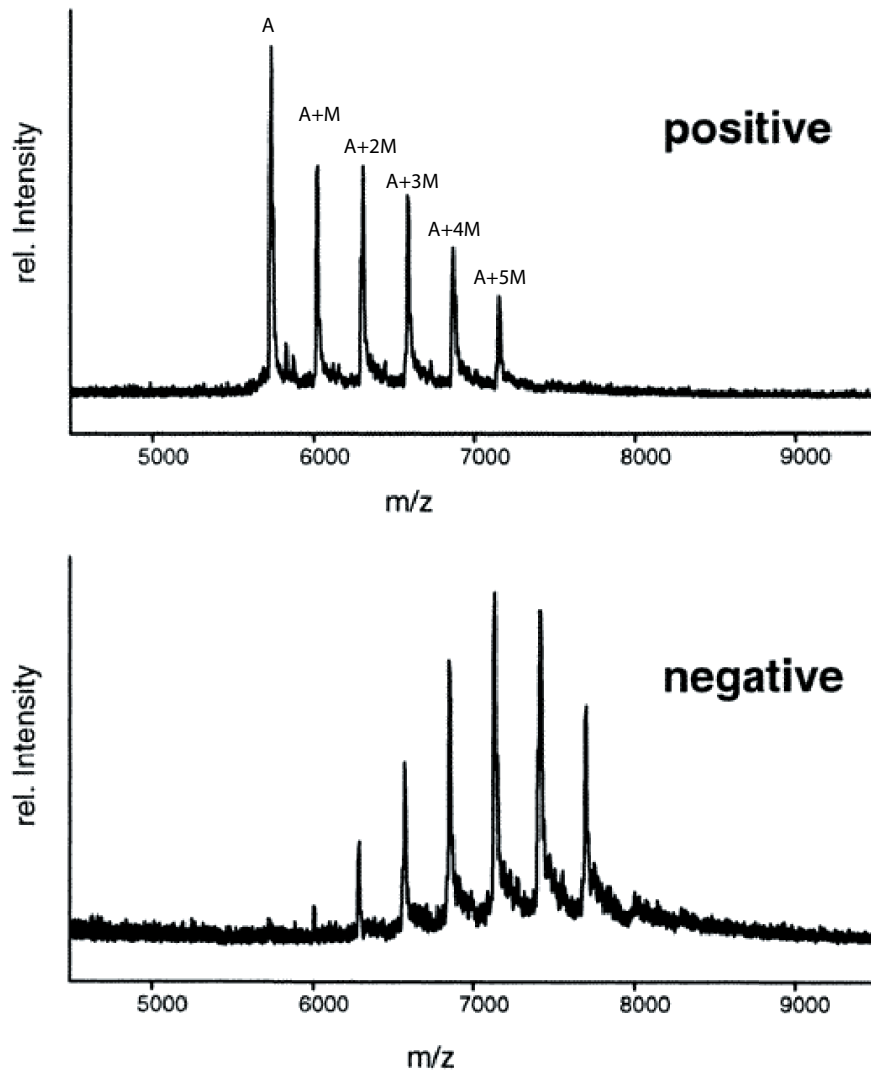


Abbildung 2.5: Massenspektrum der MALDI-Wolke kurz nach der **Desorption**. Bei Detektion positiver Teilchen (oben) befindet sich der Analyt A in einer Aggregationen mit einigen Matrixmolekülen M. Im unteren Massenspektrum wird gezeigt, dass auch negativ geladene Cluster entstehen. Dieses Massenspektrum zeigt das Auftreten von Clustern kurze Zeit nach der Desorption. Diese können anschließend in der MALDI-Wolke zerfallen. (Quelle: [71])

können [96]. Durch MD-Simulationen konnte die Massen der auftretenden Cluster bestimmt werden: Analythaltige Cluster besitzen (einige ns) nach der Desorption/Ablation einen m/z -Wert von 10.000 bis 40.000, während reine Matrixcluster ein m/z -Wert von etwa 3000 aufweisen [97, 71]. Ein Massenspektrum von Analytmolekülen mit einigen Rest-Matrixmolekülen ist in Abb. 2.5 gezeigt.

Für die Ionisierung ergeben sich nach M. Karas zwei Möglichkeiten: Eine Möglichkeit geht davon aus, dass sowohl zum Teil positiv geladene - wie negativ geladene Cluster entstehen. Die Ionisation wird so durch „mechanische“ Ladungstrennung von bereits vorhandenen geladenen Teilchen während der Desorption/Ablation realisiert. Ein Teil der negativ geladenen Cluster emittiert beim Zerfall ein (oder mehrere) Elektron(en) und ist danach nicht mehr geladen. Da Elektronen einen Cluster schneller als Protonen/Kationen verlassen können, könnte dies die die Asymmetrie der positiv/negativ geladenen Ionen erklären. Die Bildung positiv geladener Produkte ist in Abb. 2.6 demonstriert. Cluster, welche ein protoniertes Analytmolekül beinhalten, zerfallen durch Abspaltung neutraler Matrixmoleküle (Desolvation). Eine weitere Möglichkeit ist der Protonentransfer innerhalb des Clusters (intra-cluster charge transfer).

Der Ladungstransfer (Protonenübertragung von der Matrix zum Analytmolekül) im Cluster selbst wird durch die unterschiedlichen Protonenaffinitäten von Matrixmolekülen und Analytmolekülen hervorgerufen. Viele Analytmoleküle besitzen aufgrund von basischen funktionellen Gruppen (z.B. $-NH_2$ oder $-OH$) eine höhere Protonenaffinität als (meist sauren) Matrixmoleküle. Matrixmoleküle fungieren daher als Protonen-Donatoren innerhalb des Clusterverbundes.

Eine reine Ladungstrennung durch den Cluster-Mechanismus würde die Rolle der Matrixsubstanz auf ein Absorptionsmedium und einen Protonenlieferanten reduzieren. Dies widerspricht den Beobachtungen, dass nur wenige nach diesem Muster mögliche Matrixsubstanzen für MALDI geeignet sind. Daher schlagen Karas und seine Mitarbeiter einen weiteren Beitrag zur Ionisation vor: die Photoionisation der Matrixmoleküle innerhalb des Clusters,

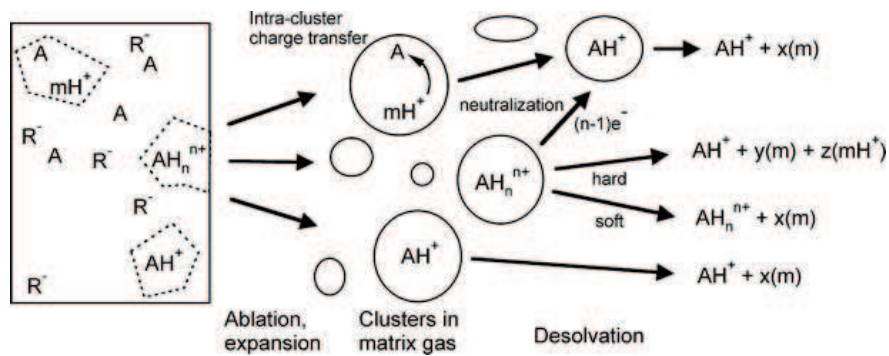
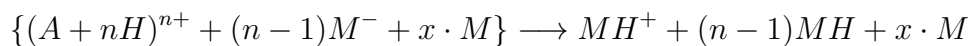


Abbildung 2.6: **Der Mechanismus des Lucky Survivors-Modells.** Die MALDI-Probe besteht aus ungeladenen sowie einem kleinen Anteil von ein- oder mehrfach geladenen Molekülen wie einfach protonierte Matrixmoleküle (mH^+) oder einfach und/oder mehrfach protonierte Analytmoleküle (AH_n^{n+}). Durch die Desorption/Ablation entstehen einfach und mehrfach geladene Cluster. Im inneren dieser Cluster findet z.B. ein Protonen-Transfer von der Matrix zum Analyten statt (*intra-cluster charge transfer*). Durch Stöße werden die ungeladenen Matrix-Moleküle abgespalten (Desolvation), da deren Haftung am Analytmolekül gering zu sein scheint. Zwischen mehrfach geladenen Clustern findet ein Ladungsausgleich statt. (Quelle: [71])

da hier das Ionisierungs-Potential etwas geringer als im Kristallverbund sein soll ($IP_{Cluster} \approx 7\text{eV}$). Sowohl in der kristallinen MALDI-Probe, wie auch im Cluster könnten durch den in Kap. 2.4 erklärten Pooling-Prozess einige zusätzliche Matrixmoleküle ionisiert werden. Entgegen des Pooling-Modells von R. Knochenmuss findet die Photoionisation der Matrixmoleküle jedoch vorwiegend in den gebildeten Clustern nach der Desorption/Ablation statt. Der Prozess von Photoionisation von Clustern in der Gasphase ist Gegenstand einer Vielzahl von Untersuchungen [98, 99, 100, 101, 102]. Sowohl die Ionisation durch Ladungstrennung als auch die Photoionisation der Matrixmoleküle bilden demnach einen Beitrag zum detektierten Ionensignal. Innerhalb des Clusters (nachfolgend durch geschweifte Klammern gekennzeichnet) wird von Karas et al. unter anderem folgende Reaktion vorgeschlagen (siehe auch Abb. 2.6):



Dabei wird die Desolvation der unbeteiligten Matrixmoleküle und der Ladungsausgleich mehrfach protonierter Analytmoleküle durch negativ geladene (deprotonierte) Matrixmoleküle beschrieben.

Das wesentliche Argument, so Karas, lautet, dass die detektierten Ionen, die Lucky-Survivors (glücklichen Überlebenden) eines wahrscheinlich äußerst effizienten Ionisationsprozesses sind. Neben den von vornherein einfach geladenen Clustern können lediglich die einfach geladenen Cluster die Neutralisation in der MALDI-Wolke *überleben*.

Das Lucky-Survivors-Modell erlaubt die Erklärung einer Vielzahl von experimentellen Resultaten, wobei zum Teil die strittige Frage nach der primären Ionisierung der Matrix-Moleküle elegant umgangen wird. Im Vergleich zum Pooling-Modell von Knochenmuss et al. gibt es jedoch deutlich mehr Unklarheiten, einzelne Prozesse und deren Zusammenspiel betreffend. Weiterhin wurde (nach bestem Wissen des Autors) noch keine vollständige theoretische Studie publiziert, die den gesamten MALDI-Prozess nach dem Cluster-Modell simuliert. Dagegen erklärt dieses Modell die Ionisierung sowohl nach einer Bestrahlung der MALDI-Probe mit UV- als auch mit IR-Laserpulsen. Die Kationisierung des Analyten kann dieser Ansatz sowohl durch Aufnahme von

freien Kationen in der MALDI-Wolke (oder innerhalb der Clusterverbunds Aggregation von Kationen) sowie als pre-cationized Moleküle in der Probe erklären.

2.6 Vergleich der vorgestellten Modellvorstellungen

Die grundsätzliche Fähigkeit, die bei MALDI auftretenden positiven und negativen Ionen qualitativ zu erklären, besitzen beide Modelle.

Mittels des Pooling-Modells oder der Photoionisation ist es möglich, durch MD-Simulationen die während MALDI auftretenden Prozesse quantitativ zu modellieren. Die Unterdrückung von Matrix-Peaks im MALDI-Massenspektrum bei hohen Analytkonzentrationen (MSE) ist durch die Hemmung des Hopping der Excitonen zu erklären. Threshold-Laserpulsenergien (Minimalenergien) für die Erzeugung von Ionen sagt dieses Modell ebenso voraus wie die experimentell ermittelten Anstiege des Ionensignals als Funktion der Laserpulsenergie. Der Übertrag von Protonen/Kationen zum Analytmolekül findet nach dem Pooling-Modell ausschließlich in der Gasphase (durch Stöße induziert) statt. Nachteilig ist die starke Voraussetzung des Pooling. Die Erzeugung von Ionen mittels einer Bestrahlung mit Laserpulsen im IR vermag dieses Modell nicht zu erklären aufgrund der niedrigen Energiewerte eines Photons im IR. So müssten eine große Anzahl von Photonen auf ein Matrixmolekül vereinigt werden, was sehr unwahrscheinlich ist.

Das Lucky-Survivors- oder Cluster-Modell von Karas et al. dagegen ist intuitiv und kann sowohl IR- als auch UV-MALDI, wie auch die Ähnlichkeiten beider MALDI-Massenspektren mit einem Ansatz erklären. Neben der Erzeugung von lediglich einfach geladenen Analyt-Ionen kann auch das Phänomen des In-Source-Decay (ISD) erklärt werden [103].

Protonierte Analyt- und Matrixmoleküle (pre-formed Ions) in der MALDI-Probe vor der Bestrahlung werden nur vom Lucky-Survivors-Modell als Quelle von Ionen berücksichtigt. Im Pooling-Modell wird diese Quelle von Ionen nicht berücksichtigt.

Gegen das Lucky-Survivors-Modell spricht die vage Formulierung und das Fehlen von tragfähigen Simulationen. Insbesondere die Reduktion der Matrix als Protonen-Donor, die Wirkung entgegen der Kumulation der Analytmoleküle, sowie die unklaren Beiträge von Photoionisation und Ladungstrennung durch Clusterbildung sind problematisch zu werten und verlangen nach weiteren experimentellen und theoretischen Studien.

Kapitel 3

Quantenchemische Methoden

Um die in dieser Arbeit auftretenden experimentellen Befunde besser interpretieren zu können, ist es hilfreich, die geometrische Struktur der beteiligten oder gebildeten Moleküle zu kennen. Molekülstrukturen minimaler potentieller Energie können mit einer Reihe von Methoden berechnet werden. Zum einen durch klassische Methoden (Kraftfeldmethoden, welche an die Methoden der Newtonschen Mechanik anlehnen) und zum anderen durch quantenchemische Methoden (z.B. Hartree-Fock-Näherung (HF) oder Dichtefunktionaltherorie (DFT)). Beide Ansätze ermöglichen durch Variation der Orte der Atomkerne und/oder der elektronischen Struktur die Bestimmung einer molekularen Struktur minimaler potentieller Energie. In dieser Arbeit werden mittels Kraftfeld-Methoden und semi-empirischen Methoden molekulare Strukturen bestimmt. An Einzelfällen werden diese Strukturen durch genauere Rechnungen mit DFT überprüft und/oder verbessert.

In diesem Kapitel werden zunächst Kraftfeld-Methoden vorgestellt. Anschließend wird die Hartree-Fock-Näherung erklärt. Die semi-empirischen AM1-Methode ist eine Näherung der HF-Methode und wird im Anschluss erklärt. Für die genaue Berechnung der elektronischen Struktur kann DFT eingesetzt werden. Diese Methode wird im letzten Teil des Kapitels kurz angesprochen.

3.1 Kraftfeldmethoden zur Berechnung der molekularen Struktur

Mit Kraftfeldmethoden (engl. Force-Field (FF)) können mit geringem rechnerischem Aufwand Strukturen und potentielle Energien von großen Molekülen (Proteine, DNA-Stränge) mit zum Teil hoher Genauigkeit berechnet werden. Kraftfeldmethoden berechnen die potentielle Energie eines Moleküls durch die Betrachtung der Atome (mit a,b,...bezeichnet) als Massen an Orten R_a und den molekularen Bindungen als Federn (mit Federkonstanten k_{ab}). Für eine Kraftfeld-Berechnung sind die Typen der Bindungen der beteiligten Atome vor dem Start der Berechnung anzugeben. Die Bindungen bleiben während der gesamten Rechnung erhalten.

Die jeweiligen Bindungsstärken (Federkonstanten) werden entweder durch quantenchemische Rechnungen hoher Genauigkeit (z.B. DFT) oder experimentell ermittelt. Je nach Parametrisierung der einzelnen Bindungen erhält man mit verschiedenen Kraftfeld-Methoden unterschiedliche Molekülgeometrien. Daher gibt für unterschiedliche Molekül-Typen (Kohlenwasserstoffe, Peptide, Komplex-Verbindungen) unterschiedlich geeignete Kraft-Feld-Programme. Für viele Moleküle eignet sich das UFF-Kraftfeld (von Universal Force-Field) [104, 105, 106].

Die potentielle Energie des Moleküls berechnet sich bei vorgegebenen Orten R_a der Atomkerne aus zwei Anteilen.

(i) Der Anteil einander verbundener Atome E_{bond} : Dieser setzt sich zusammen aus der Bindungssteckung $R_{ab}=|R_a-R_b|$, der Veränderung von Bindungswinkeln θ_{abc} zwischen drei Atomen a, b und c, sowie der Ebenen zueinander, welche von jeweils drei Atomen (z.B. a,b,c und c,d,e) aufgespannt werden. Hierbei sind k_{ab} die Federkonstanten zur Auslenkung des Atoms am Ort R_a und R_b , k_{abc} die Widerstände gegen eine Drehung der Bindungswinkel zwischen den Atompaaren (a,b) und (b,c) und ϕ_{abcd} gibt den Widerstand gegen die Veränderung des Winkels zwischen zweier Ebenen an, welche von den Atompaaren (b,c) und (b,c) sowie (b,c) und (c,d) aufgespannt werden. Ge-

gegebenfalls werden noch weitere Terme (z.B. höherer Ordnung oder Torsion) addiert.

$$E_{bond} = \sum_{ab} k_{ab}(R_{ab} - R_{ab}^0)^2 + \sum_{abc} k_{abc}(\theta_{abc} - \theta_{abc}^0)^2 + \sum_{abcd} \phi_{abcd}(\xi_{abcd} - \xi_{abcd}^0)^2 + \dots$$

(ii) Der Anteil ungebundener Atome E_{elec} : Dieser Anteil berücksichtigt die elektrostatischen- und van-der-Waals Wechselwirkungen von ungebundenen Atomen. Dabei sind ϵ_{ab} die Konstanten der Van-der-Waals Wechselwirkung, und q_a bezeichnet die ggf. vorhandenen Ladungen einzelner Atome.

$$E_{elec}(r_{ab}) = \sum_{a,b=1}^N 4\epsilon_{ab} \cdot \left(\left(\frac{\sigma_{ab}}{R_{ab}} \right)^6 - \left(\frac{\sigma_{ab}}{R_{ab}} \right)^{12} \right) + \sum_{a,b=1}^N \frac{q_a \cdot q_b}{R_{ab}}$$

Die gesamte potentielle Energie eines Moleküls ist die Summe beider Beiträge.

$$E_{pot} = E_{bond}(R_1, \dots, R_N) + E_{elec}(R_1, \dots, R_N)$$

E_{pot} repräsentiert für ein Molekül mit N Atomen eine (3N-1)-dimensionale Hyperfläche in einem 3N-dimensionalen Raum. Mittels eines Minimierungsalgorithmus wird nun der Punkt gesucht, bei welchem $E_{pot}(x_1, y_1, z_1, \dots, x_N, y_N, z_N)$ (wobei gilt: $R=(x,y,z)$) einen minimalen Wert annimmt. So kann eine Struktur minimaler Energie ermittelt werden. Mittels der potentiellen Energie kann die wirkende Kraft auf jedes einzelne Atom bestimmt werden.

$$\vec{F}(R_i) = \left(\frac{dE_{pot}}{dx_i}, \frac{dE_{pot}}{dy_i}, \frac{dE_{pot}}{dz_i} \right)$$

In einem weiteren Schritt werden die Atome nach dem zweiten Newtonschen Axiom in die Richtung der Kräfte bewegt und für die neue Struktur die potentielle Energie $E_{pot}^{(2)}$ berechnet. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis die Differenz der potentiellen Energie kleiner als ein gewählter Wert $|E_{pot}^{(n-1)} - E_{pot}^{(n)}| \leq \Delta E$ ist.

Der Vorteil von Kraftfeld-Methoden ist die Anwendbarkeit auf große Moleküle und die kurze Zeit, in welcher man eine Molekülstruktur ermitteln

kann. Nachteilig ist die strikte Vorgabe der einzelnen Bindungen. Da sich im Laufe von chemischen Reaktionen die elektronische Struktur laufend verändert und daher bestehende Bindungen aufgespalten und neue Bindungen gebildet werden, ist die Anwendbarkeit von Kraftfeld-Methoden auf chemische Reaktionen nur in Ausnahmefällen möglich. Daher werden im nächsten Abschnitt quantenmechanische Methoden vorgestellt, welche explizit die elektronische Struktur des Moleküls berechnen.

3.2 Hartee-Fock Approximation

Zum Verständnis einer chemischen Reaktion ist es notwendig, die elektronische Struktur eines Moleküls und ggf. deren Veränderung mit der Zeit zu kennen. Mit Entwicklung der Quantenmechanik am Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts durch E. Schrödinger, P.A.M. Dirac und W. Heisenberg entstieg die Hoffnung nach einem lückenlosen Verständnis chemischer Reaktionen. Diese Hoffnung erfüllte sich jedoch wegen der Komplexität der elektronischen Struktur nicht. Erst mit der Entwicklung von Näherungsmethoden zur Lösung der Schrödingergleichung und moderner Computertechnologie konnten eine Vielzahl von chemischen Prozessen besser verstanden werden. Eine weit verbreitete Näherungsmethode ist die Hartree-Fock (HF) Methode. Die Berechnung der Grundzustandswellenfunktion Ψ und der Grundzustandsenergie $E_{n=0}$ ist für Moleküle (mit mehr als einem Elektron) nicht analytisch mit der Schrödingergleichung möglich.

$$\hat{H}|\Psi\rangle = E_n|\Psi\rangle$$

Der Hamilton-Operator für ein Atom mit M Atomkernen (am Ort R_a mit Ladung Z_a) und N Elektronen (am Ort r_i) besitzt in der Born-Oppenheimer-Näherung folgende Gestalt.

$$\hat{H} = \sum_{a=1}^M -\frac{1}{2M_a}\Delta_a + \sum_{i=1}^N -\frac{1}{2}\Delta_i + \sum_{i=1}^N \sum_{a=1}^M \frac{Z_a}{r_{ia}} + \frac{1}{2} \cdot \sum_{i=1}^N \sum_{j \neq i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{a=1}^M \frac{1}{2} \sum_{b \neq a}^M \frac{Z_a Z_b}{R_{ab}}$$

Hier wurden atomare Einheiten verwendet, Δ_i ist die zweite Ableitung nach den Ortskoordinaten r des Elektrons i , Δ_a ist die zweite Ableitung nach

den Koordinaten R_a der Atomkerne und r_{ij} sowie R_{ab} die Abstände der entsprechenden Elektronen (i,j) respektive der entsprechenden Atomkerne (a,b). Mittels der HF-Näherung ist es möglich, die elektronische Struktur und damit die Grundzustandsenergie $E_{min} \approx E_0$ eines Moleküls zu berechnen. Diese HF-Näherung soll im Folgenden kurz vorgestellt werden. Für eine ausführliche Herleitung sei auf die Literatur verwiesen (z.B. [107]).

Seien die Gesamtwellenfunktion $\Psi(R_1, \dots, R_M, r_1, \dots, r_N)$ aus den Basisfunktionen χ (durch Slaterproduktbildung) gewählt. Dann gilt für den elektronische Hamilton-Operator

$$\hat{h}(i) = \sum_{i=a}^N -\frac{1}{2}\Delta_i + \sum_{i=1}^N \sum_{a=1}^M \frac{Z_a}{r_{ia}} + \frac{1}{2} \cdot \sum_{i=1}^N \sum_{j \neq i}^N \frac{1}{r_{ij}}$$

Der letzte Term im elektronischen Hamilton-Operator r_{ij}^{-1} beschreibt die Wechselwirkung des betrachteten Elektrons i mit dem j-ten Elektronen. Für die gegebene Matrix ergibt dieser Term das sogenannte Coulomb-Integral \hat{J} und die Austausch-Korrelation \hat{K} .

$$\hat{J}_{ij} = \langle \chi_i(r_1)\chi_i(r_2) | \frac{1}{r_{12}} | \chi_j(r_1)\chi_j(r_2) \rangle$$

$$\hat{K}_{ij} = \langle \chi_i(r_1)\chi_j(r_2) | \frac{1}{r_{12}} | \chi_i(r_2)\chi_j(r_1) \rangle$$

Die χ_i sind die (Spin-) Wellenfunktionen des i-ten Elektrons. So kann man den Fock-Operator $\hat{F}(r_i)$ als:

$$\hat{F} = \sum_i \hat{h}(i) + \sum_i \sum_{j=1}^N 2\hat{J}_{ij} - \hat{K}_{ij}$$

definieren.

Für die numerische Berechnung sind Gauß-artige Orbitalfunktionen (Gauß-Type Orbitals, GTO) gut geeignet. In Anlehnung an die Eigenfunktionen des Wasserstoffatoms besitzen sie folgende Struktur:

$$\phi = \sigma \cdot x^k y^l z^m e^{-\alpha|r-r_0|^2}$$

Wobei σ ein Normierungsfaktor ist und k,l,m natürliche Zahlen sind, welche die verschiedenen Orbitalformen (s,p,d-Orbitale) definieren. Diese bilden die

(orthonormale) Basis für die zur Berechnung benutzen Wellenfunktionen χ_i . Für die Berechnung der Einzelnen Beiträge wird nun die Matrix \hat{C} definiert.

$$\chi_i = \sum_{\mu=1}^N C_{i\mu} \phi_{\mu}$$

Die SCF-Routine (von Self-Consistent Field) verändert nun fortwährend die Matrix $C_{i\mu}$ und so die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen i in den einzelnen Atomorbitalen ϕ_{μ} . Die Roothaan-Gleichungen fasst die Berechnung in einer Matrix-Gleichung zusammen.

$$\hat{F}\hat{C} = \hat{S}\hat{C}\hat{\epsilon}$$

mit

$$\hat{F} = \sum_{i=1}^N \hat{f}(i)$$

Die Überlapp-Matrix $\hat{S}=S_{ij}$ sorgt hierbei für die Orthonormalität der Basis und besitzt folgende Gestalt:

$$\hat{S}_{\mu\nu} = \int d\vec{r} \chi_{\mu}^* \chi_{\nu}$$

Die Energieeigenwerte ϵ gehen als Diagonalmatrix $\hat{\epsilon} = \text{diag}(\epsilon_1, \dots, \epsilon_N)$ in die Roothaan-Gleichung ein.

Anschaulich teilt sich das N-Elektronenproblem durch die Roothaan-Gleichungen in N ein-Elektronenprobleme auf, wobei das i -te Elektron sich im Feld aller (N-1) anderen Elektronen und allen M Atomkernen bewegt. Durch die SCF-Prozedur wird die anfangs eingegebene Aufenthaltswahrscheinlichkeit jedes einzelnen Elektrons im zug. Atomorbital immer besser an die Verteilung der anderen Elektronen und Kerne angepasst. Man erhält schließlich die HF-Grundzustandsenergie $\epsilon = \min(\epsilon_i)$ und die Elektronenverteilung, welche durch die Matrix $\hat{C}_{i\mu}$ und die gewählten Basisfunktionen beschrieben ist. So kann ermittelt werden, welche Atomorbitale mit welcher Wahrscheinlichkeit mit Elektronen besetzt sind.

Eine Geometrieoptimierung kann durch eine Verschiebung der Atomkerne entlang der auftretenden Kräfte und wiederum einer Energieberechnung

erfolgen, bis die Energie des Gesamtsystems minimal ist. Das Verfahren ist gleich der Vorgehensweise bei Kraftfeldberechnungen. Der Anteil der Atomkerne zur potentiellen Energie lautet hierbei:

$$E = \frac{1}{2} \sum_{a \neq b}^M \frac{Z_a \cdot Z_b}{R_{ab}}.$$

Durch die Berechnung der elektronischen Struktur ist es möglich, die im Molekül auftretenden intramolekularen Kräfte zu berechnen und jeden Atomkern in eine kurze Strecke in Richtung dieser Kräfte zu bewegen. Für die erhaltene Geometrie wird anschließend wieder die elektronische Struktur berechnet. Dieses Verfahren wird so lange wiederholt, bis die gesamte Energie, bestehend aus der potentiellen Energie der Atomkerne und der Elektronen einen Minimalwert erreicht hat.

3.3 Semi-empirische Näherung

Für die Berechnung der elektronischen Struktur größerer Moleküle ist die HF-Näherung nur bedingt geeignet, da die Berechnungszeit stark mit der Anzahl der verwendeten Basisfunktionen ansteigt. Mittels semi-empirischer Näherungsmethoden lässt sich der Aufwand einer Berechnung der elektronischen Struktur erheblich reduzieren, so können auch elektronische Strukturen großer Moleküle mit einer respektablen Genauigkeit bestimmt werden. Semi-empirische Methoden enthalten in der Regel folgende Näherungen:

(i) Die Elektronen der inneren Atomorbitale (die sogenannten core electrons), welche nicht an der chemischen Bindung beteiligt sind, werden nicht in die Berechnung der elektronischen Struktur miteinbezogen. So lässt sich ein Großteil des Rechenaufwands vermeiden, da die Elektronen lediglich das Kernpotential abschirmen und zur Bindung nur einen sehr geringen Beitrag haben. Resultat ist ein core-Potential (Z_A), in welchem sich die an der Bindung beteiligten Elektronen befinden.

(ii) Als Basis dient eine minimale Konfiguration (split valence (SV) Basis). Hierbei wird jedes Atomorbital mit einer einzigen Basisfunktion beschrieben

(iii) Parametrisierung von Mehrelektronen-Integralen. Anstatt der numerisch aufwendigen Berechnung werden in modernen semi-empirischen Methoden diese parametrisiert. So wird beispielsweise der MNDO-Ansatz (Modified Neglection of Differential Overlap) angewandt. Das MNDO-Potential besitzt folgendes Aussehen:

$$V_{MNDO} = Z_a \cdot Z_b \langle \psi_A \psi_B | \psi_A \psi_B \rangle (1 + e^{-\alpha_A R_{AB}} + e^{-\alpha_B R_{AB}})$$

Mit dieser Ersetzung wird der aufwendigste Teil der HF-Rechnung, nämlich die Berechnung von Mehrelektronen-Integralen, umgangen.

Der MNDO-Ansatz wurde von M. Dewar und W. Thiel entwickelt [108]. Dabei werden die auftretenden Integrale abhängig von ihrem Beitrag zur Bindung zweier Atome durch (theoretisch oder experimentell ermittelte) Werte ersetzt.

3.3.1 Das Austin Modell (AM1-Methode)

Diese Methode ist eine Weiterentwicklung der MNDO-Methode von M. J. S. Dewar et al. [109]. Die Näherung der Zwei-Elektronen-Integrale ist der MNDO-Methode entlehnt, jedoch ist die Wechselwirkung der Core-Elektronen untereinander modifiziert um van der Waals Wechselwirkungen zu simulieren. Des weiteren werden Ein-Elektronen-Integrale zu:

$$\langle \chi_\mu | \hat{h}(i) | \chi_\nu \rangle = \frac{(\beta_A + \beta_B) S_{\mu\nu}}{2}.$$

mit

$$\hat{S}_{\mu\nu} = \langle \chi_\mu | \chi_\nu \rangle$$

Dabei bezeichnet $\hat{h}(i)$ den Hamilton-Operator des i-ten Elektrons im Feld aller anderen Teilchen. und als Kern-Kern Wechselwirkungspotential wird angesetzt:

$$V_{ab} = V_{MNDO} + \frac{Z(A) \cdot Z(B)}{R_{AB}} \cdot \left(\sum_i \zeta_{iA} e^{-\xi_{iA}(R_{AB}-c_{iA})^2} + e^{-\xi_{iB}(R_{AB}-c_{iB})^2} \right)$$

wobei die A und B die benachbarten Atome bezeichnen und die Parameter ξ, ζ, c für die verschiedenen Atome parametrisiert sind. Die Indices i, A, B , durchlaufen alle beteiligten Elektronen i und beteiligten Atompaare (A,B).

3.3.2 Grenzen der AM-1 Methode

Trotz der Parametrisierung, welche die Berechnung der elektronischen Struktur wesentlich erleichtert, hat die AM-1 Methode einige Nachteile:

(i) Die Abstoßung der Core-Potentiale werden oft überschätzt, daher sind die Abstände für nahe aneinander liegende Atome etwas zu groß.

(ii) Wasserstoff-Brückenbindungen werden zwar in der korrekten Stärke angegeben, jedoch muss die Geometrie geprüft werden.

(iii) Chemische Bindungen, an welchen ein Stickstoffatom beteiligt ist werden instabiler angegeben als diese in Wirklichkeit sind, dagegen sind Alkylbindungen ($-H_2C - CH_2-$) oftmals zu stark berechnet.

(iv) Metallbindungen von vielen Übergangsmetallen werden oftmals fehlerhaft wiedergegeben.

Trotz all diesen Einschränkungen ist das AM1-Modell für eine erste Näherung der elektronischen Struktur geeignet. Der Energiebeitrag der elektronischen Bindung ist deutlich geringer als die elektrostatischen Wechselwirkungen der Atomkerne. Daher ist der Einfluss dieser Ungenauigkeiten auf die sekundäre Struktur eines Peptides relativ gering. Für eine genaue Berechnung der (elektronischen) Struktur kann eine semi-empirische Näherung Ausgangspunkt einer Optimierung mit aufwendigeren Methoden (z.B. DFT) sein.

3.4 Moleküldynamik-Simulation

3.4.1 Motivation

Durch MD-Simulationen können chemische Vorgänge, an denen viele Moleküle beteiligt sind, untersucht werden; zum Beispiel die Vorgänge in einer Gas-Wolke. In dieser Arbeit wird die geometrische Struktur von protoniertem und Cs⁺-adaptiertem Angiotensin II mittels einer MD-Simulation bestimmt.

Große Moleküle besitzen oft eine Vielzahl von unterschiedlichen molekularen Strukturen, bei denen sich die potentielle Energie in einem lokalen Minimum befindet. Als anschauliches Beispiel kann Cyclohexan dienen, dessen Struktur minimaler Energie in zwei unterschiedlichen Sessel-Formationen realisiert ist. Beide Energieminima (Sesselformen) sind über eine energetische Barriere voneinander getrennt. Oligopeptide besitzen aufgrund ihrer molekularen Größe viele unterschiedliche (lokale) Energie-Minima.

3.4.2 Die Durchführung der MD-Simulationen

Für eine Geometrie-Optimierung durch MD kann folgendes Schema durchgeführt werden:

Für die Bestimmung der molekularen Struktur wird die zu optimierende Struktur auf eine festgelegte Temperatur „aufgeheizt“. Dazu wird jedes Atom ($i=1,..M$) mit einem zufällige Geschwindigkeitsvektor versehen. Die gesamte kinetische Energie ist dabei proportional der Temperatur des Systems.

$$\sum_i^M \langle m_i \cdot |v_i|^2 \rangle \propto k_B \cdot T$$

Nach der Bewegung in die betreffende Richtung für eine definierte Zeit Δt ($\Delta t=t_{j+1}-t_j$ z.B. 1fs) sind die Atome an neuen Orten $r_i^{t=1}$. Mittels $\vec{F}_i^t = -\vec{\nabla} E(r_1^{t=1}, \dots, r_N^{t=1})$ können nun die auftretenden Kräfte berechnet zu jedem Zeitpunkt t_j werden. Für den nächsten Schritt wird die Temperatur (z.B. exponentiell) abgesenkt.

$$T(t_{n+1}) = T(t_n) \cdot e^{-A}$$

Dabei parametrisierte $A > 0$ die Abkühlung. Aus den auftretenden Kräften $F_i^{t=j}$ und dem aktuell angepassten Geschwindigkeitsvektor $\vec{v}_i^{t=j}$, der von der aktuellen Temperatur $T(t_j)$ abhängt, werden den einzelnen Atome zu den neuen Orten $r_i^{t=n+1}$ bewegt. Dieser Vorgang wiederholt sich bis die Temperatur nahezu den absoluten Nullpunkt erreicht hat. Die vorliegende Struktur ist nun in einem Zustand minimaler potentieller Energie, die auftretenden Kräfte sind minimal. Dieses Verfahren ist oftmals für eine grobe Optimierung der Geometrie ausreichend. Die Genauigkeit der wirkenden Kräfte hängt von der Berechnungsmethode der potentiellen Energie ab.

3.5 Dichtefunktionaltheorie

Die überwiegende Mehrheit der quantenchemischen Arbeiten wird in heutiger Zeit mittels DFT-Methoden durchgeführt. Vorteilhaft ist unter anderem die breite Anwendbarkeit auch chemische Moleküle. Eine DFT-Rechnung benötigt erheblich weniger Rechenzeit als die meisten Post-HF-Methoden (wie Coupled-Cluster, Störungstheorie oder Configuration-Interaction-Methoden). Während bei HF-Methoden Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der Elektronen in vorgegebenen Orbitalen variiert werden, wird bei DFT-Methoden die Elektronenverteilung durch eine Dichte $\rho(r_1, \dots, r_N)$ angegeben. Die Entwicklung der Methode für Moleküle geht auf Kohn und Sham [110, 111] zurück, welche zeigten, dass die Elektronendichte eines Moleküls mit DFT theoretisch exakt berechnen lässt. Für die Berechnung einer Elektronendichte ρ wird das aus dem Hamilton-Operator angelehnte Dichtefunktionale aufgeteilt.

$$E[\rho] = T[\rho] + J[\rho] + E_{XC}$$

Hierbei bezeichnet $T[\rho]$ das Funktional der kinetischen Energie, $J[\rho]$ faßt die Coulombwechselwirkung zusammen und $E_{XC}[\rho]$ alle übrigen Beiträge, einschließlich der Austausch-Korrelation. Da die Form des letzten Terms unbekannt ist, wird eine Näherung von E_{XC} in die Berechnung eingefügt. Es gibt eine Reihe von Näherungen von E_{XC} , wobei sich für Berechnungen elek-

tronischer Strukturen für Moleküle die Generalized Gradient Approximation (GGA)-Näherung zur Berechnung von elektronischen Strukturen chemischer Verbindungen bewährt hat. Hier hängt die Austauschkorrelation von der Dichte ρ und vom Gradienten der Dichte $d\rho/dr$ ab. Die Berechnung von Elektronendichtefunktionen ist der HF-Methode sehr ähnlich. Im Unterschied zur HF-Methode werden keine Aufenthaltswahrscheinlichkeiten in festen Orbitalen $C_{i\mu}$ sondern die Elektronendichte $\rho(r_1, \dots, r_n)$ als Funktion der Orte der einzelnen Elektronen (r_i) selbst optimiert. Die Elektronendichte ist hierbei wie folgt definiert:

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^N \lambda_i |\chi_i(r)|^2$$

Um die elektronische Struktur eines Moleküls zu berechnen, wird ein geeignetes Funktional für $E_{XC}[\rho]$ gewählt (z.B. *BP86*). Dieses besteht aus einem Austauschanteil (z.B. *B* von Becke-Austauschfunktional) [112] und einem Korrelationsfunktional (z.B. *P86* von Pedrew) [113]. Danach wird wieder in einer SCF-Iteration die Elektronendichte so lange optimiert, bis die Energie $E[\rho]$ minimal ist.

Für die DFT-Geometrieoptimierungen in dieser Arbeit wurde meist das BP86-Funktional verwendet. Bei Anwendung von DFT-Methoden werden meist zusätzliche Näherungsmethoden wie die RI-Näherung (Resolution of the Identity) [114, 115] eingesetzt.

Kapitel 4

Erzeugung und Formung von Femtosekunden-Laserpulsen

Dieser Teil beschreibt die Erzeugung von fs-Laserpulsen, die Verstärkung ihrer Amplitude und deren Formung in Phase und Amplitude.

4.1 Erzeugung von fs-Laserpulsen

Ultrakurze Laserpulse entstehen durch kohärente Überlagerung einer Vielzahl von einzelnen Lasermoden unterschiedlicher Frequenz. Um fs-Laserpulse erzeugen zu können, bedarf es eines aktiven Elements zwischen zwei Spiegeln (Cavity), das ein breites Emissionsspektrum besitzt. Hierfür eignen sich neben Farbstofflasern, welche heute nur noch selten für diesen Zweck verwendet werden, Ti:Saphir-Laser. Die Überlagerung der Moden erfolgt z.B. über das *Kerr-Lens-Modelocking* [116] wobei die entstehenden Moden unterschiedlicher Wellenlängen überlagert werden. Die Dispersion des Kristalls wird mit Hilfe von Puls-Kompressoren ausgeglichen. Ein solcher Aufbau wird als Oszillator bezeichnet. Die so erzeugten Laserpulse besitzen für kommerzielle Oszillatoren eine Pulsdauer von 20-80fs und eine Puls-Repetitionsrate von 50-100 MHz (je nach Länge der Cavity). Die Pulsenergie ist gewöhnlich im nJ-Bereich. Für viele Anwendungen werden diese Laserpulse nachträglich (bis in den mJ-Bereich) verstärkt und die Repetitionsrate (auf einige kHz) redu-

ziert. Dafür werden die Laserpulse zeitlich gestreckt, verstärkt, und anschließend wieder auf die gewünschte Pulsdauer komprimiert. Die Verstärkung der fs-Laserpulse wird entweder durch einen Multi-Pass Verstärker oder durch einen regenerativen Verstärker realisiert.

4.2 Die Formung ultrakurzer Laserpulse

In diesem Kapitel soll die Variation der Laserpulse mittels einer Modulation der Phase beschrieben werden. Durch die Veränderung der quadratischen Phase des Laserpulses ist es möglich, den Laserpuls in seiner Pulsdauer zu verändern. Die elektrische Feldkomponente eines ultrakurzen Laserpulses kann wie folgt dargestellt werden:

$$E(x, t) = E_0 \cdot e^{ikx} \cdot e^{-i\phi(t)} \cdot F(t)$$

Hierbei stellt $F(t)$ die zeitliche Einhüllende des Laserpulses dar. $\phi(t)$ bezeichnet die Phase als Funktion der Zeit und kann in einer Taylor-Reihe entwickelt werden.

$$\phi(t) = \phi_0 + \frac{d\phi(t)}{dt}(t - t_0) + \frac{d^2\phi(t)}{dt^2}(t - t_0)^2 + \dots$$

Die zweite Ableitung der Phase nach der Zeit wird als linearer Chirp bezeichnet.

$$C = \frac{d^2\phi(t)}{dt^2}$$

Der lineare Chirp C gibt die lineare Änderung der Frequenz $\omega(t) = \omega_0 - C(t - t_0)$ bezüglich des Zeitpunktes t_0 an. Die minimale Pulsdauer ist durch die Anzahl der überlagerten Lasermoden (Wellenlängenbereich) begrenzt (transformlimitiert). Falls diese Laser-Moden zueinander verschoben werden, führt dies zu einer raumzeitlichen Ausdehnung des Laserpulses.

Um mittels eines linearen Chirps den Laserpuls in seiner Pulsdauer zu verändern, wird der Laserpuls durch Fourier-Transformation (\hat{F}) in die einzelnen Frequenzen aufgeteilt.

$$\tilde{E}(\omega, t) = \frac{1}{2\pi} \int_0^\infty E(x, t) \cdot e^{i\omega t} dt = \hat{F}[E(x, t)]$$

Um diese Übertragung in den Frequenzraum zu realisieren, wird der Laserpuls durch ein Gitter in die einzelnen Frequenzen aufgespalten. Anschließend wird der divergente Strahl durch eine Sammellinse (oder einen gekrümmten Spiegel) der Brennweite f wieder parallelisiert. Im Abstand der Brennweite dieser Linse ist die Fourier-Ebene, in welcher sämtliche Frequenzen örtlich in einer Richtung separiert vorliegen. Dies entspricht der Fouriertransformation \hat{F} . Durch eine weitere Linse im Abstand f und ein weiteres Gitter wird der Strahl anschließend wieder in den Ortsraum zurücktransformiert. Dieser Aufbau wird als Null-Dispersions-Aufbau oder als 4f-Aufbau bezeichnet und ist schematisch nach [117] in Abb. 4.1 dargestellt.

In der Fourier-Ebene kann ein Flüssigkristallmodulator (SLM von Spatial Light Modulator) platziert werden. Um mittels eines linearen Chirps die Pulsdauer zu verändern, kann analog der Taylor-Entwicklung der Phase $\phi(t)$ die Frequenzfunktion $\psi(\omega)$ entwickelt werden.

$$\psi(\omega) = \omega_0 + \frac{d\psi(\omega)}{d\omega}(\omega - \omega_0) + \frac{d^2\psi(\omega)}{d\omega^2}(\omega - \omega_0)^2 + \dots$$

Wird $\tilde{E}(\omega)$ wieder rücktransformiert so kann durch die Veränderung der Frequenzfunktion $\psi(\omega)$ der lineare Chirp des Laserpulses und damit die Pulslänge verändert werden. Die Modulation des Laserpulses in der Fourier-Ebene wird durch eine quadratische Phasenmodulation im Modulator realisiert, wie in Abb. 4.2 dargestellt.

4.3 Bestimmung der Pulsdauer ultrakurzer Laserpulse

Die Bestimmung der Pulsdauer im Zeitbereich von Femtosekunden kann nicht elektronisch realisiert werden, da es keine Detektoren/Bauelemente mit einer vergleichbaren zeitlichen Auflösung gibt. So wird der Laserstrahl durch die sog. Kreuzkorrelation mit einem anderen fs-Laserpuls vermessen. Den Aufbau illustriert Abb. 4.3 für die Kreuzkorrelation. Eine Kreuzkorrelation mit einem ungeformeten Laserpuls wird als Autokorrelation bezeichnet.

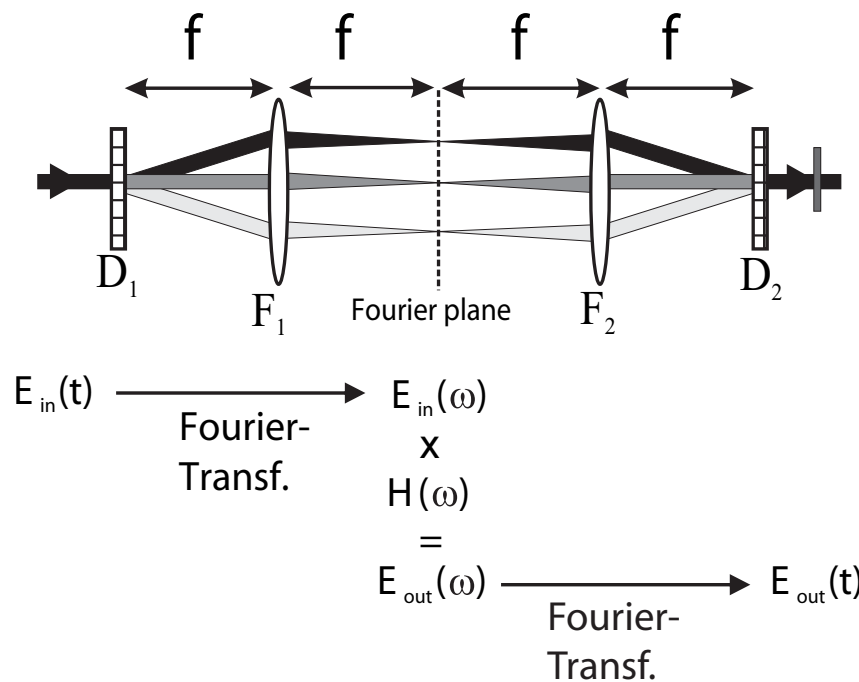


Abbildung 4.1: **Schematischer Aufbau und Funktionsweise der Pulsformung.** Oben ist der 4f-Aufbau (Null-Dispersions-Kompressor) schematisch dargestellt. Der Laserpuls wird im Gitter (D_1) in seine spektralen Komponenten zerlegt und mit einer Linse (F_1 mit Brennweite f) werden diese spektralen Komponenten in die Fourier-Ebene fokussiert. Dort können sie moduliert werden. Anschließend werden die parallel verlaufenden spektralen Komponenten mit einer weiteren Linse (F_2) auf das Gitter D_2 fokussiert und dort wieder zusammengeführt. Im unteren Teil ist die Pulsformung schematisch dargestellt. Durch das Gitter und die in Brennweite stehende Linse wird eine Fourier-Transformation des Laserpulses $E_{in}(t)$ realisiert. Der Modulator in der Fourier-Ebene ist durch die Multiplikation von E_{in} mit $H(\omega)$ symbolisiert. Durch das zweite Linsen-Gitter-Paar wird der geformte Laserpuls $E_{out}(\omega)$ wieder in den Ortsraum $E_{out}(t)$ zurück transformiert.

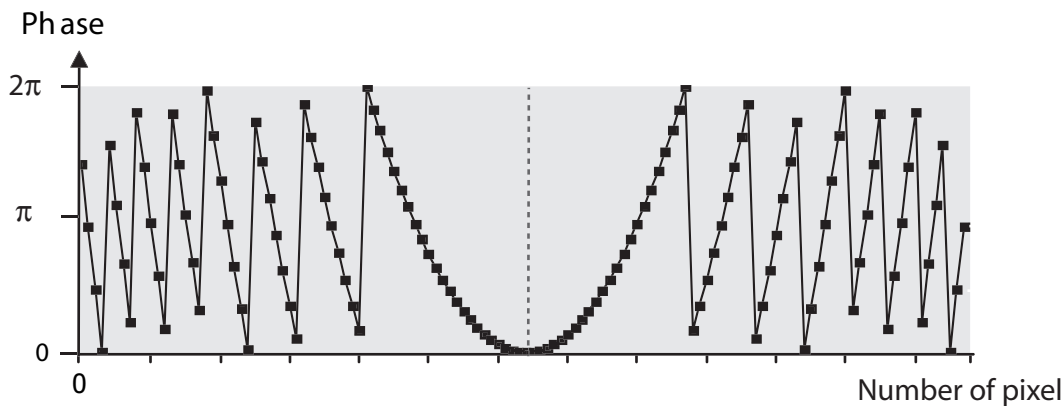


Abbildung 4.2: **Quadratische Phasenmodulation des Flüssigkristall-Modulators.** Durch eine quadratische Modulation der quadratischen Phase kann die Laserpulsdauer verlängert werden. Die Höhe der Punkte soll die Polarisation der Flüssigkristalle symbolisieren, welche durch eine Spannung an den oberen Rändern der Pixeln generiert wird. Daher ist die Höhe der Punkte auch ein Maß der angelegten Spannung.

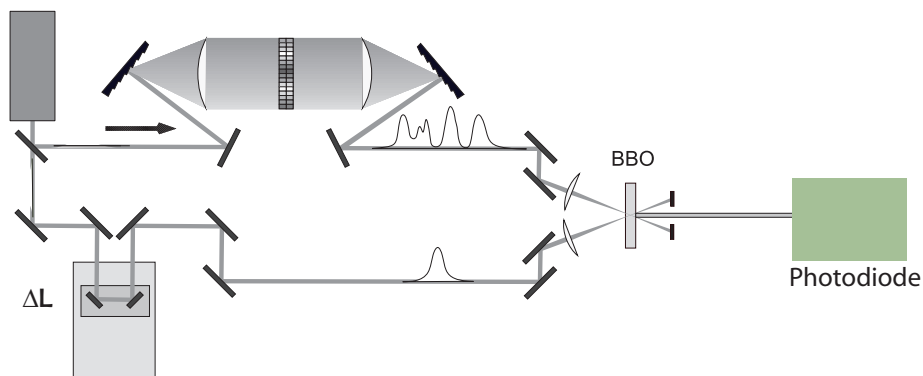


Abbildung 4.3: **Messung der Pulslänge durch Kreuzkorrelation.** Der Laserpuls wird aufgeteilt und durchläuft auf der einen Seite einen Pulsformeraufbau und auf der anderen Seite eine variable Verzögerungsstrecke ΔL . Beide Pulse werden auf einen Punkt im nichtlinearen BBO-Kristall fokussiert. Bei einer zeitlichen Überlappung beider Pulse entsteht durch SHG ein dritter Puls, welcher durch die Photodiode (grün) nachgewiesen wird. Die Pulslänge kann aus der Intensität des erzeugten Pulses ermittelt werden.

Der Laserpuls wird durch einen Strahlteiler in zwei Pulse aufgeteilt. Ein Puls durchläuft eine konstante Wegstrecke der Länge L und wird ggf. in seiner Form verändert, während der andere Laserpuls einen Lichtweg (in der Länge variabel $L \pm \Delta L$) eingestellt werden kann. Beide Laserpulse werden unter einem Winkel von etwa 25° in einem BBO-Kristall räumlich überlagert. Falls die Laserpulse zudem zeitlich überlappen, entsteht durch Wechselwirkung der Laserpulse im (nichtlinearen) BBO-Kristall (von Beta Bariumoxid ein dritter Laserstrahl der doppelten Frequenz und einer Amplitude I . Falls der Laserpuls auf der konstanten Wegstrecke nicht verändert wird, spricht man von Autokorrelation. Dann wird die gemessene Größe I als Intensitäts-Autokorrelation bezeichnet.

$$I(\tau) \propto \int_{-\infty}^{\infty} E(x, t) \cdot \tilde{E}(t - \tau) dt$$

Dabei gilt $\tau = \frac{\Delta L}{c}$. Die Amplitude des erzeugten Laserpulses als Funktion der eingestellten zeitlichen Verzögerung τ wird mit einer Photodiode aufgezeichnet und die Pulsdauer des Laserpulses ermittelt. Zur Berechnung der Pulsdauer muss ein Pulsprofil (Pulsform) vorgegeben werden, z.B. eine Gauß-Funktion oder ein quadrierter Secans Hyperbolicus [118, 119]. Da mittels Autokorrelation nur die Pulsdauer und nicht die Pulsform bestimmt werden kann, wurden weitere Methoden entwickelt, um weitere Pulsparameter zu bestimmen. Um ein visuelles Bild eines Laserpuls in der Zeit-Frequenz-Domäne zu bestimmen, wird gleichzeitig die Amplitude und die Wellenlänge λ für verschiedene Wegstreckendifferenzen mit einem Spektrometer gemessen. Diese Erweiterung wird als Kreuzkorrelationsspur bezeichnet. Eine Anwendung dieses Verfahrens ist z.B. der FROG (=F**R**equency **R**esolved **O**ptical **G**ating) [120] bezeichnet.

Kapitel 5

Kohärente Kontrolle und Evolutionäre Algorithmen

Seit der Arbeit von R. S. Judson und H. Rabitz [121] werden molekulare Systeme mittels adaptiven Rückkopplungsschleifen untersucht. Diese Methode wird auch als „Kohärente Kontrolle“ bezeichnet.

Für die Methode der Kohärenten Kontrolle wird ein molekulares System (z.B. ein Molekülensemble in der Gasphase) mit einem Laserpuls (irgendeiner Pulsform) bestrahlt. Die Auswirkung dieses Laserpulses auf das molekulare System (z.B. die Bildung von Ionen oder Fragmentierung) wird detektiert. Ein evolutionärer Algorithmus [122, 123, 124, 125] generiert mit Hilfe des Lasersystems anschließend einen weiteren, verschiedenen Laserpuls, dessen Einfluss auf das molekulare System ebenfalls detektiert wird, und mit dem Signal des ersten Pulses verglichen. Ist das detektierte Signal höher, so hat der evolutionäre Algorithmus einen Anhaltspunkt, in welche Richtung der Puls geformt werden muss, so dass er dieser Methode (nach einer Vielzahl von Durchläufen (Pulsform-Anpassung)) einen optimalen Laserpuls gefunden werden kann, für diesen das „beste“ Signal detektiert wird. Aus der Analyse der resultierenden (optimalen) Pulsform kann auf die Eigenschaften des untersuchten molekularen Systems geschlossen werden.

In diesem Kapitel werden zuerst die Funktionsweise der Evolutionären Algorithmen erklärt und dann die experimentelle Anwendung beschrieben.

5.1 Evolutionäre Algorithmen

Evolutionäre Algorithmen (EA) sind nichtdeterministische Algorithmen, welche sich an das Darwinistische Prinzip (Survival of the fittest = Überleben der am besten angepassten Spezies) anlehnen. EA haben sich als sehr robust bezüglich einer leichten Veränderung der Ausgangsbedingungen (Rauschen der Messergebnisse) erwiesen. Daher sind EA für die Durchführung von Kohärenten Kontroll-Experimenten gut geeignet, in welchen eine Ungenauigkeit (Signal-zu-Rausch-Verhältnis) von bis zu etwa 10-15% auftritt [126].

Problemstellung

Sei $\Omega \cong \mathbb{R}^n$ ein hochdimensionaler Raum (auch als *Suchraum* bezeichnet) und ω seien ξ -meßbare Elemente von Ω . Gesucht wird ein ω mit extremaler Norm ξ . O.B.d.A. sei ω ein N-Tupel reeller Zahlen und das Maß ξ eine Abbildung

$$\xi : \omega \rightarrow \mathbb{R}_+$$

Gesucht ist also das N-Tupel ω^* , für welches ξ extremal wird.

Die Lösung des Minimierungsproblems

Um dieses Minimierungsproblem zu lösen, werden λ N-Tupel $\omega = (x_1, \dots, x_N)$ (als Individuen), bestehend aus Zufallszahlen x_i generiert. Die x_i werden als Gene bezeichnet. Diese λ N-Tupel stellen die Ausgangspopulation dar.

Im ersten Schritt werden aus dieser Ausgangspopulation durch Kombination (cross-over) (s.u.) einzelner Individuen Nachkommen erzeugt. So erhöht sich die Anzahl der Individuen auf $k' = k-1$. Anschließend werden diese Nachkommen verändert, dies wird als Mutation (s.u.) bezeichnet. Ein Individuum überspringt diese Prozedur, es überlebt diese Veränderung unverändert. Zusammen mit dem Überlebenden ist die Population (Zahl der Individuen) auf $k > \mu$ angestiegen. In der Bewertung der Individuen den *Survival of the Fittest*-Schritt werden diese k Individuen anhand der Fitness (dem Maß ξ) bewertet. Dabei überleben die μ Individuen mit der größten/kleinsten Fitness. Diese stellen im zweiten Durchlauf des Algorithmus die Ausgangspopulation

dar. Ein Durchlauf dieses Algorithmus wird als Generation bezeichnet. Ein graphisches Schema dieses Algorithmus ist in Abb. 5.1 gezeigt.

Kombination oder cross-over Gemeint sind hier zwei Prozesse: Entweder werden Duplikate der Ausgangspopulation zusammengefügt, indem die Elemente von einzelnen N-Tupeln zufällig mit Elementen aus anderen N-Tupeln ausgetauscht werden. Oder es wird ein Mittelwert von den Elementen verschiedener ω 's gebildet. Durch diese Prozeduren werden nun $k' > \mu$ N-Tupel erzeugt.

Mutation Bei der Mutation werden zu einigen Elementen der N-Tupel Zufallszahlen addiert oder subtrahiert. Diese Zufallszahlen sind um Null normalverteilt mit der Verteilungsbreite σ . Die Verteilungsbreite σ bestimmt die Stärke der Mutation. Falls Sigma nahe bei Null ist, ist die Mutation schwach, die Individuen werden nur wenig verändert. Ist σ dagegen höher eingestellt, so wird die Mutation stärker. Intuitiv sind so die Schritte (proportional σ) durch den Suchraum Ω größer. Die Verteilungsbreite σ wird für jede Generation neu bestimmt, zum Beispiel mit der $\frac{1}{5}$ -Regel. Nach dieser Regel wird die Verteilungsbreite σ um $\frac{1}{5}$ größer, falls die Fitness im Vergleich zur letzten Generation ansteigt.

5.2 Experimentelle Realisierung

Um mit diesem Algorithmus eine physikalische Größe an ein physikalisches System anzupassen, werden folgende Zuordnungen gemacht: Die Fitness entspricht der Eigenschaft (Meßwert), die optimiert werden soll. Die Einzelnen N-Tupel (ω) entsprechen der Wahl der Einflussgrößen (z.B. der Pulsdauer eines Laserpulses)

Konvergenz des Algorithmus

Um eine schnelle Konvergenz ($\xi(\omega) \rightarrow \text{Extremum}$), d.h. einen starken Anstieg der Fitness-Funktion nach wenigen Generationen (Durchläufen) zu gewähr-

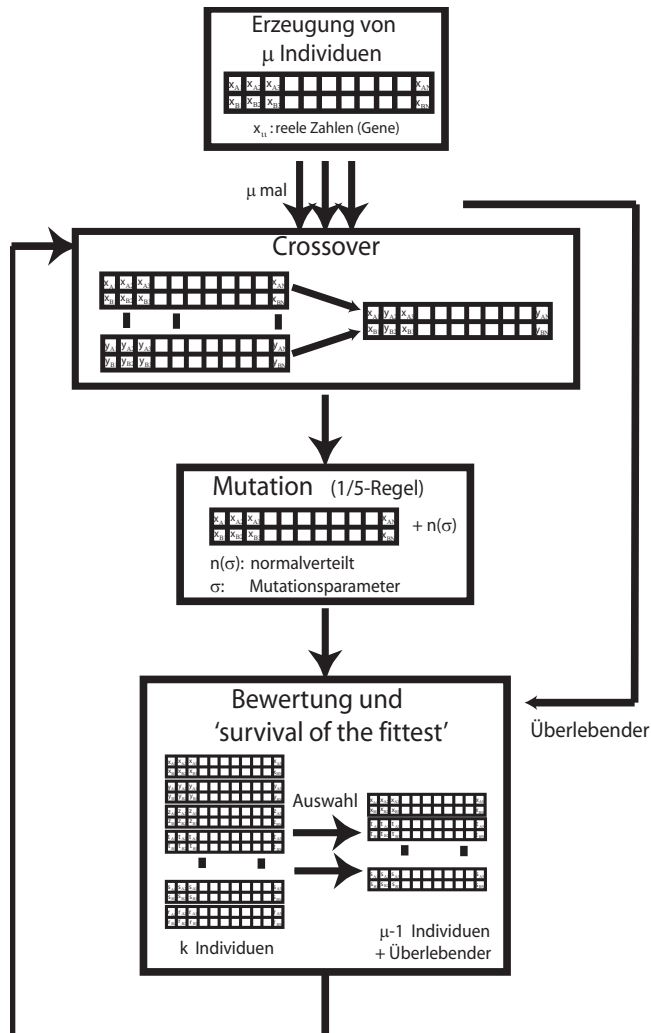


Abbildung 5.1: **Funktionsweise des angewandten Evolutionären Algorithmus.** Zuerst wird eine Anfangspopulation von μ Individuen ω erzeugt. Die Elemente der N-Tupel (Individuen) entsprechen zweimal den Polarisationswerten einzelner Pixel des Flüssigkristallmodulators. Ein Individuum wird nicht verändert. Dieses wird als Überlebender bezeichnet. Durch Crossover werden jeweils zwei (zufällig gewählte) Individuen miteinander kombiniert und dabei neue Individuen (Nachkommen) erzeugt. In einem weiteren Schritt wird durch die Addition von normalverteilten reellen Zahlen eine Mutation generiert. Mit einer Bewertung nach einer Fitness werden aus $k > \mu$ die μ -besten Individuen ausgewählt und die Prozedur mit dem Crossover beginnt von neuem, bis der Algorithmus konvergiert.

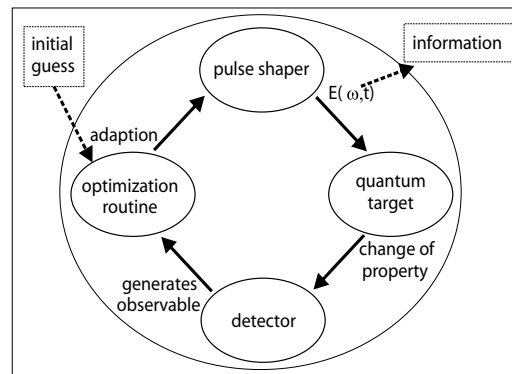


Abbildung 5.2: **Schematische Darstellung der Kohärenten Kontrolle.** Vor der Optimierung wirkt ein willkürlich geformter Laserpuls (initial guess) aus dem (pulse shaper) auf ein molekulares System (quantum target). Der entstehende Effekt wird mit einem (detektor) aufgenommen und speist anschließend in Form einer Fitness den evolutionären Algorithmus (optimization routine). Dieser erzeugt mit Hilfe des pulse shaper einen veränderten Laserpuls und der Prozess beginnt von Neuem. Nach der Konvergenz wird die (information) über das quantum target interpretiert.

leisten, wird die Mutation der Optimierung angepasst. Der Erfolg einer Optimierung einer physikalischen Größe durch die Methode der Kohärenten Kontrolle ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Zum einen ist ein geringes Rauschen der gemessenen physikalischen Größe (Fitness) von hoher Bedeutung. Das Rauschen des Messwertes sollte nicht mehr als 10% betragen [126]. Je nach Anzahl der zu optimierenden Größen (Dimension der N-Tupel) dauert die Optimierung unterschiedlich lange.

Teil II

Experimenteller Aufbau

In diesem Kapitel sollen zunächst das MALDI-TOF und die Modifikationen beschrieben werden. Das MALDI-TOF (Typ: Reflex, Bruker Daltonics, Bremen) wurde aus dem Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin ausgemustert und am Anfang der Promotionszeit wieder in Betrieb genommen. Anschließend wird im zweiten Abschnitt der Aufbau des fs-Lasersystems und die Pulsformung beschrieben. Der beschriebene fs-Laser befindet sich in einem Laserlabor neben dem Raum, in welchem das MALDI-TOF platziert ist. Durch diese Aufteilung konnten die empfindlichen optischen Komponenten von den Einflüssen der Messung des MALDI-TOFs (z.B. Abwärme und Vibrationen der Vakuumpumpen) abgeschirmt werden. Der dritte Abschnitt widmet sich der Proben-Präparation und der Routine der Messung. Zum Schluss wird die Durchführung der Molekular-Dynamik-Simulation beschrieben, womit die gezeigten molekularen Strukturen berechnet wurden.

Kapitel 6

Das MALDI TOF

Das MALDI-TOF besteht aus zwei, durch ein Ventil getrennte Vakuumkammern. Eine der beiden Kammern stellt das Reflektron-TOF dar, in der anderen Kammer (Proben-Kammer) werden Ionen durch Bestrahlung der MALDI-Probe mittels eines von außen eingeführten Laserpulses erzeugt und mittels eines elektrischen Feldes beschleunigt. Um den freien Flug der Ionen und die Stabilität der elektrischen Potentiale der Elektroden zu gewährleisten, herrscht in beiden Kammern ein Druck von $p < 10^{-7}$ mbar. Die Proben-Kammer ist mit einem automatischen Probenhalter-Wechselsystem ausgestattet. Dies erlaubt einen einfachen Wechsel einer MALDI-Probe, ohne dass der Druck in der Kammer wesentlich ansteigt. Nach Durchlauf der Ionen durch das Reflektron-TOF werden die Ionen mit Hilfe eines MCP-Detektor (von Multi-Channel-Plate) detektiert. Das ausgehende Signal wird mit einem Oszilloskop digitalisiert, auf eine Workstation (SparcStation 5, SUN-Microsystems) übertragen, dort angezeigt und bei Bedarf gespeichert. Mittels dieser Workstation und einem Mikrocontroller wird zudem das gesamte MALDI-TOF gesteuert. Nachfolgend werden die einzelnen Teile des MALDI-TOF beschrieben. Der schematische Aufbau des MALDI-TOF in Kombination mit dem Laser ist in Abb. 6.2 dargestellt.

6.1 Die Regulierung des Drucks in den Kammern

Für die Aufrechterhaltung des Druckes innerhalb beider Kammern ist jede Kammer für sich mit einer Turbomolekularpumpe (Typ: TPU240, Balzers) ausgestattet. In Verbindung mit je einer Drehschieber-Pumpe (Typ: Duo008, Pfeiffer) wird so ein Druck unterhalb von $p=10^{-7}$ mbar erreicht. Beide Kammern sind durch ein Ventil getrennt, so dass der Druck im TOF durch die zeitweilig leichte Druckerhöhung während des Wechsels des Probenhalters in der anderen Kammer nicht beeinflusst wird. Jeweils ein Druckmessgerät ist an Drehschieberpumpe angeschlossen und misst den Vordruck im Bereich von 10^{-3} mbar. Ein weiteres Paar von Pirani-Elementen (Typ: IKR 020, Balzers) misst den Druck direkt in der jeweiligen Kammer. Zur Anzeige des Druckes dient ein Steuergerät (Typ TPG300, Balzers), welches zugleich die Turbomolekularpumpen steuert. Die Drehzahl der Turbomolekularpumpen wird mittels jeweils einer Ansteuerung (Typ: TCP-121, Pfeiffer/Balzers) geregelt.

6.2 Die Proben-Kammer

Die Proben-Kammer besteht aus dem automatischen Probenhalter-Wechselsystem, den Elektroden für das elektrische Feld zur Beschleunigung der erzeugten Ionen, einem optischen System zur Positionierung des Lasers auf die Oberfläche der MALDI-Probe und einer Kamera, um die Position und Fokussierung der Laserpulse auf der MALDI-Probe zu bestimmen. Der Laserpuls wird durch ein Quarzglasfenster, welches gleichzeitig eine Linse darstellt, in die Vakuum-Kammer eingeführt und durch zwei Spiegel in der Kammer durch ein Loch in der Elektrode vor dem Probenhalter auf die Probe fokussiert (siehe Abb. 6.1). Diese Elektrode ist während der Messung negativ geladen und dient zur Beschleunigung der erzeugten Ionen, wobei das elektrische Feld zwischen dem (metallischen) Probenhalter und dieser Elektrode durch eine Potentialdifferenz in z-Richtung erzeugt wird. Um verschiedene Positionen auf dem Probenhalter zu bestrahlen, kann die Position des Pro-

benhalters durch zwei Motor-gesteuerte Stellschrauben in der x-y-Ebene verändert werden. Die Position des Probenhalters und der Probe kann durch eine CCTV-Kamera (Typ: WV-CL352, Panasonic) angeschlossen an einen Monitor (Typ: PVM-1450QM, Sony) überwacht werden. Auf dem Weg der Ionen zum Detektor sorgt eine elektrische Linse für eine Bündelung der Ionen.

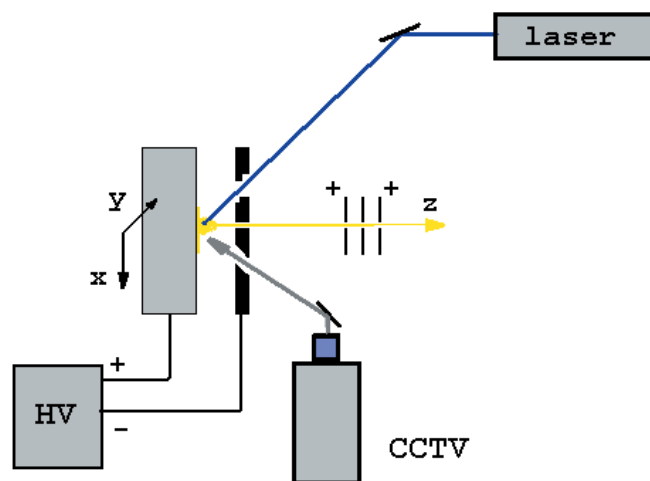


Abbildung 6.1: **Der Ausbau der MALDI-Quelle.** Die MALDI-Probe (gelb) wird mit dem Laserstrahl bestrahlt. Die auftretenden Ionen werden durch das elektrische Feld in z-Richtung beschleunigt, dabei durchlaufen sie eine kleine Öffnung der negativ geladenen Elektrode, welche einige Millimeter vor dem Probenhalter positioniert ist. Die Potentialdifferenz zwischen Probenhalter und Elektrode wird durch eine Hochspannungsquelle (HV) aufrecht erhalten. Der Probenhalter kann in x- und y-Richtung bewegt werden, so dass eine Bestrahlung der gesamten Oberfläche des Probenhalters möglich ist. Durch eine Kamera (CCTV) kann die Position der Bestrahlung überwacht werden. Die während MALDI gebildeten Ionen werden nach der Erzeugung noch in einer elektrostatischen Linse gebündelt und erreichen danach das Massenspektrometer (nicht gezeigt).

6.3 Das Massenspektrometer

Das Massenspektrometer ist ein Reflektor-TOF. Die Ionen, welche aus der Proben-Kammer austreten, fliegen etwa 80cm bis zu einer Elektrode (Reflektor), welche (während der Messung) positiv geladen ist. Das elektrische Potential der Reflektor-Elektrode beträgt $U_{RefI}=28\text{kV}$. Durch diese Elektrode fliegen die Ionen unter einem Winkel von etwa 5° wieder frei bis zum MCP-Detektor auf der anderen Seite. Ein weiterer MCP-Detektor ist hinter der Reflektor-Elektrode positioniert, so dass dieses Massenspektrometer auch als lineares TOF genutzt werden kann. Messungen im Linear-Modus wurden nicht durchgeführt. Durch die Variation der Potentiale an den einzelnen Elektroden ist es möglich, eine Auflösung von bis zu $m/\Delta m \approx 3000$ im gewünschten m/z -Bereich zu erhalten.

6.4 Die Steuerung des MALDI-TOF

Das MALDI-TOF wird über eine Kombination aus der Workstation und einem Mikrocontroller (Steuereinheit, auch als TADT-Box bezeichnet) gesteuert. Auf der Workstation können die Parameter wie Spannungen, Position des Probenhalters, usw. durch das Softwarepaket XACQ 4.01 (Bruker Daltonics) eingestellt werden. Die Anzeige der MALDI-Massenspektren und die Speicherung auf der Festplatte wird ebenfalls mit diesem Programm durchgeführt. Der Mikrocontroller kommuniziert mit der Workstation über die RS232-Schnittstelle. Die Steuereinheit ist mit sämtlichen elektronischen Geräten des MALDI-TOFs verbunden: über eine Motorsteuerung werden die Gleichstrom-Motoren für das Proben-Wechselsystem wie auch der Position des Probenhalters - sowie des Laserfokus und das variable Teleskop eingestellt. Die elektrischen Potentiale auf den Elektroden werden durch 4 HV-Netzteile (Typ: HC35-35000, FUG) erzeugt. Die jeweilig vorgegebenen Potentiale auf den Elektroden werden auch durch die Steuereinheit eingestellt. Die Triggerung des MALDI-TOF-eigenen N_2 -Lasers erfolgt ebenfalls durch die Steuerungseinheit. Das Trigger-Signal für den Oszillographen stammt von einer Photodiode aufgrund des Jitters des N_2 -Lasers (Typ VSL-337, Laser

Science Inc.). Mittels dieser Photodiode kann kontrolliert werden, ob der Laserpuls emittiert wurde.

6.5 Die Datenaquisition

Jedes detektierte Ion erzeugt zum Zeitpunkt der Detektion durch den MCP-Detektor einen Spannungspuls. Diese Spannungspulse werden durch ein 1GHz-Oszilloskop (LSA-1000, LeCroy) digitalisiert und über eine Netzwerkverbindung zur Workstation übertragen. Als Funktion der Zeit aufgezeichnet ergibt dieser Spannungsverlauf das MALDI-Massenspektrum für einen Laserpuls. Die Einzel-Massenspektren eines jeden Laserpulses werden zu einem Gesamt-Massenspektrum addiert (meist 100 bis 200 Einzel-Massenspektren). Die Daten werden nach der Aufnahme auf der Workstation abgespeichert und anschließend auf einem weiteren Personal Computer mit dem Programm FlexAnalysis (Version 2.0, Bruker Daltonics) weiter verarbeitet. Im Regelfall werden fünf bis zehn einzelne MALDI-Massenspektren (mit jeweils 100-200 Laserpulse) aufgenommen, um die Schwankungen des Ionen-Signals einzelner Messungen auszugleichen.

6.6 Der modifizierte optische Aufbau des MALDI-TOF

Zur Bestrahlung der MALDI-Probe dient im originalen Zustand ein N_2 -Laser. Die Pulsdauer beträgt etwa $\tau=3\text{ns}$ bei einer Wellenlänge von $\lambda=337\text{nm}$. Diese Laserpulse gelangen durch ein einstellbares Teleskop und einen Spiegel zum Fenster der Proben-Kammer. Dieses Fenster besitzt eine konvex geformte Oberfläche. Die Kombination des einstellbaren Teleskops und dieser Linse ermöglicht eine Fokussierung der Laserpulse auf die Oberfläche der MALDI-Probe. Um die exakte Position und den Einfallswinkel korrigieren zu können, sind vor und hinter dem Teleskop je eine Iris-Blende. Die Position des Laserstrahls auf der Probe kann mit der CCTV-Kamera kontrolliert werden. Die Position und der Winkel sind für das Ionensignal von entscheidender

Bedeutung. Vor der ersten Irisblende ist unter einem Winkel von 45° ein dielektrischer Spiegel (durchlässig für Laserpulse der Wellenlänge $\lambda=337\text{nm}$, reflektierend für $\lambda=400\text{nm}$ und $\lambda=800\text{nm}$) dergestalt montiert, dass durch beide Iris-Blenden hindurch auch die fs-Laserpulse auf die Probe fokussiert werden können. Zwischen dem dielektrischen Spiegel und der Irisblende befindet sich ein Strahlteiler, der etwa 1% der ns- und fs-Laserpulse zur Photodiode umlenkt. Diese Photodiode dient als Triggerung des Oszilloskops.

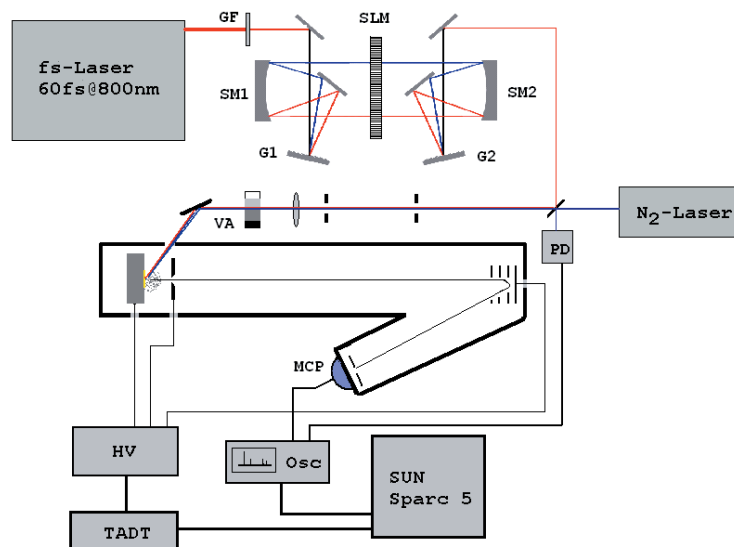


Abbildung 6.2: **Schematischer Aufbau der Apparatur.** Der fs-Laser emittiert 60fs Laserpulse einer Zentralwellenlänge $\lambda_c=800\text{nm}$. Die Energie der Laserpulse wird durch einen Filter (GF) auf einen Maximalwert von $250\mu\text{J}$ reduziert um eine Zerstörung des Flüssigkristall-Modulators (SLM) zu verhindern. Die Laserpulse können durch einen SLM in einem 4f-Aufbau (bestehend aus zwei Gittern G1 und G2 und sphärisch geformte Spiegel SM1 und SM2) geformt/moduliert werden und danach auf die MALDI-Probe fokussiert werden. Eine andere Möglichkeit ist die Erzeugung von fs-Laserpulsen der Zentralwellenlänge $\lambda_c=400\text{nm}$ durch SHG mittels eines BBO-Kristalls (nicht gezeigt). Es besteht weiterhin die Möglichkeit der Bestrahlung mit einem Stickstoff-Laser (N_2 -Laser). Die Laserpulsenergie kann durch den variablen Attenuator (VA) eingestellt werden. Die Steuerung des gesamten MALDI-TOF wird durch einen Mikrocontroller (TADT) mit einer SUN-Workstation realisiert. Die Datenaufnahme mit Hilfe eines Oszilloskops (Osc) wird durch eine Photodiode (PD) getriggert.

Kapitel 7

Erzeugung und Formung von ultrakurzen Laserpulsen

7.1 Das fs-Lasersystem

Das fs-Lasersystem besteht aus einem Oszillator (Kapteyn-Murmane Design) und einem Multipass-Verstärker (Odin, Quantronix Inc., Darmstadt). Der Oszillator wird von einem frequenzverdoppelten Nd:YAG Laser (Millenia 5, Spectra-Physics) mit einer Ausgangsleistung von max. $P=5\text{W}$ (cw) gepumpt. Dieser Oszillator liefert ca. 60fs-Laserpulse einer Repetitionsrate von ca. $f=85\text{MHz}$. Die Ausgangsleistung beträgt etwa $P_{Osc}=450\text{mW}$ bei einer Zentralwellenlänge von $\lambda_c=790\text{nm}$ und einer spektralen Breite von etwa $\Delta\lambda=20\text{nm}$. Diese Laserpulse sind die Seed-Pulse für den kommerziellen Multi-Pass Verstärker. Der Verstärker wird durch einem Nd:YLF-Laser ($P=16\text{W}$, $\tau=100\text{ns}$) (ebenfalls Quantronix Inc.) gepumpt. Diese Kombination liefert Laserpulse einer Pulsdauer von $\tau \approx 60\text{fs}$, und einer Energie von $E_p=1,2\text{mJ}$ bei einer Zentralwellenlänge von $\lambda_c \approx 800\text{nm}$. Laserpulse der Wellenlänge $\lambda_c=400\text{nm}$ werden durch SHG (von Second Harmonic Generation) mittels eines BBO-Kristalls erzeugt. Eventuelle Pulsanteile im nahen IR werden durch dielektrische (reflektiv für $\lambda=400\text{nm}$ und durchsichtig für $\lambda=800\text{nm}$) Spiegel eliminiert. Über ein Periskop werden die fs-Laserpulse in den Nebenraum zum MALDI-TOF geführt. Die Repetitionsrate der Laser-

pulse bei der MALDI-Massenspektrometrie beträgt $f=10\text{Hz}$.

7.2 Die Formung der Laserpulse

Für Untersuchungen mit verschiedenen Laserpulsdauern und für die Anwendung der kohärenten Kontrolle werden die Laserpulse in ihrer quadratischen Phase (linearer Chirp) verändert. Wie in der Einleitung erklärt, lässt sich die Phase eines Laserpulses durch einen Flüssigkristall-Modulator (SLM für *S*patial *L*ight *M*odulator) (SLM-640, CRI Inc.) modifizieren. Hierfür werden die Laserpulse nach dem Verstärker durch einen Grau-Filter auf eine maximale Pulsenergie von $E_{max}=250\mu\text{J}$ reduziert, um die Zerstörung der Flüssigkristalle zu vermeiden. Die Laserpulse durchlaufen den sogenannten 4f-Aufbau, wie in Abb. 4.1 skizziert. Die Steuerung der Polarisation beider Flüssigkristall-Reihen (mit je 640 Pixel) übernimmt ein LabView Programm auf einem PC, welcher über USB mit dem Modulator verbunden ist. Die Einstellung der Pulsenergie erfolgt durch einen variablen Abschwächer (Attenuator). Da auch die gesamte Polarisation des Laserpulses mit dem SLM verändert werden kann, ist mit dem beschriebenen 4f-Aufbau zudem eine Modulation der Amplitude (Pulsenergie) möglich, falls die Laserpulse nach dem 4f-Aufbau einen Polarisator durchlaufen. Für die beschriebenen Experimente ist die Pulsenergie mit Hilfe des variablen Abschwächers (Attenuator) eingestellt worden. Die Dauer der Laserpulse kann entweder mit einem selbstgebauten FROG oder einem Autokorrelator (Pulse-Check, APE, Berlin) bestimmt werden. Eine direkte Formung von Laserpulsen der Wellenlänge von $\lambda_c=400\text{nm}$ ist nicht möglich, da die verwendeten Flüssigkristalle die Laserpulse unterhalb einer Wellenlänge von ca. $\lambda=450\text{nm}$ absorbieren würden. Dies könnte den SLM zerstören.

Kapitel 8

Durchführung der MALDI-TOF-Analyse

8.1 Probenpräparation

Die Probenpräparation ist ein aktives Forschungsgebiet der MALDI-Massenspektrometrie [37, 38, 6]. Für Oligopeptide eignen sich z.B. 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), Sinapinsäure (SA), 3-Aminoquinon, Nikotinsäure, α -Cyano-4-hydroxylzimtsäure (CHCA) oder 2-Amino-4-Methyl-5-Nitropyridin. Alle diese Matrixsubstanzen, sowie Kombinationen derselben wurden mit der Analytsubstanz Angiotensin II (Ang) getestet. Für alle Wellenlängenbereiche (UV und nahes IR) hat sich eine Kombination von CHCA und SA als beste Wahl erwiesen. Diese Matrixsubstanz bildet eine besonders gleichmäßige Probenoberfläche. So kann ein rauscharmes Ionensignal von $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ bei der Bestrahlung verschiedener Bereiche der MALDI-Probe erreicht werden. Die Schwankung der Peakintensität von $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ beträgt bei einer Addition von 100 bis 200 Laserpulsen (pro MALDI-Massenspektrum) etwa 10-30%, je nach Wellenlänge. Während der Messung wird der bestrahlte Bereich kontinuierlich verändert. So können sogenannte „Hot-Spots“ auf der MALDI-Probe ausgeglichen werden. Die kontinuierliche Bewegung der MALDI-Probe ist insbesondere bei einer Bestrahlung mit fs-Laserpulsen wichtig, da das Analyt-Ionensignal schon nach einer Bestrahlung mit wenigen

Laserpulsen auf den selben Punkt deutlich abnimmt.

Um ein gleichmäßiges Ionensignal zu erzeugen, ist für die Verwendung von ns-Laserpulse im UV eine Flüssigkristall-Matrix vorgeschlagen [127, 128] worden. Diese besteht aus einer äquimolaren Mischung von Anilin ($C_6H_6NH_2$) und CHCA. Alle Versuche, eine solche Methode für alle verwendeten Laserpulse zu nutzen, schlugen fehl. Darüber hinaus konnte keine wesentliche Reduktion der Schwankung des Analyt-Ionensignals für ns-Laserpulse erreicht werden (siehe auch [129]).

Die Matrixlösung besteht aus jeweils ca. 12 mg/ml CHCA und derselben Menge SA, welche in Acetonitril (ACN)/dest. Wasser (3:2 v:v) gelöst werden. Der pH-Wert der Lösung ist durch Zugabe von 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in den niedrigen Bereich fixiert. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von CHCA in ACN oder Wasser, wird die Matrixlösung für ein bis zwei Stunden gerührt. Diese Lösung kann einige Tage lang benutzt werden. Angiotensin II ist in destilliertem Wasser gelöst. Die Konzentration beträgt etwa $50 \mu\text{g/ml}$. Diese Lösung wird in kleinen Portionen eingefroren und vor jeder Probenpräparation einzeln aufgetaut. Die verwendeten Alkalimetall-Chloride (KCl, CsCl) sind ebenfalls in dest. Wasser (etwa $50 \mu\text{g/ml}$) gelöst. Die Konzentrationen der einzelnen Lösungen sind experimentell ermittelt.

Wie geschildert, gibt eine große Zahl von Proben-Präparationsmethoden. Die drei in dieser Arbeit angewandten sollen nachfolgend vorgestellt werden.

Die Dried-Dropled-Präparationsmethode Für die meisten Anwendungen hat sich die Dried-Droplet-Methode zur Probenpräparation als geeignet erwiesen. Hierfür wurden jeweils 1,2-1,5 μl Matrixlösung und die gleiche Menge Analytlösung (und dazu ggf. die gleiche Menge Alkalichlorid-Lösung) auf einem Probenteller (SCOUT26, Bruker Daltonics) aufgebracht. Anschließend wird die Probe etwa zwei Stunden im Abzug getrocknet und ohne weitere Modifikationen in das MALDI-TOF eingebracht.

Die Seed-Layer-Methode Die Seed-Layer-Methode wurde in dieser Arbeit im Rahmen der MALDI-Experimente zu Untersuchungen unterschiedlicher Pulsdauern mit Laserpulsen im nahen IR eingesetzt. Für eine besonders

gleichmäßige Probenoberfläche wird der Probenhalter zuerst mit Matrixlösung (einer 10%-tigen CHCA/SA-Konzentration) auf den für die Probe vorgesehenen Stellen des Probenhalters aufgebracht und im warmen Luftstrom getrocknet. Auf diese dünne Matrixschicht wird nach dem Trocknen und Abkühlen des Probenhalters etwa $1,5 \mu\text{l}$ Matrixlösung und die gleiche Menge Analytlösung sowie KCl-Lösung aufgebracht. Diese Probe wird anschließend etwa zwei Stunden im Abzug getrocknet. Für diese Methode kann eine besonders gleichmäßige MALDI-Probe präpariert werden. Der Einfluss auf die Signalschwankungen ist jedoch gering.

Die modifizierte Double-Layer-Methode Diese Präparationsmethode ist eine Kombination aus der Seed-Layer-Methode und der Double-Layer Methode. Zuerst wird eine MALDI-Probe mit der Seed-Layer-Methode hergestellt. Nach dem Abkühlen wird auf die Probe nochmals dieselbe Menge (jeweils etwa $1,5 \mu\text{l}$) Matrixlösung und Analytlösung pipettiert. Danach wird die Probe durch einen warmen Luftstrom getrocknet und auf Raumtemperatur abgekühlt. So können dickere Proben hergestellt werden. Diese Präparationsmethode findet aufgrund des erhöhten Aufwandes lediglich für die Experimente der Kohärenten Kontrolle Anwendung. Bei längeren Messungen erweist sich diese Methode als vorteilhaft, da das Analyt-Ionensignal bei der Bestrahlung mit fs-Laserpulsen etwas länger anhält. Gelegentlich zeigt diese Probenpräparation auch eine leichte Abnahme des Analyt-Ionensignals. Eine verifizierbare, deutliche Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses kann jedoch auch mit dieser Präparation nicht erlangt werden.

8.2 Durchführung der MALDI-MS

Nachdem die Probe in die Proben-Kammer eingebracht und der Druck wieder unterhalb von $p=1 \cdot 10^{-7}$ mbar gesunken ist, wurde das Ventil zwischen Proben-Kammer und Massenspektrometer geöffnet. Die Beschleunigungsspannungen werden auf (IS/1 = 24,175 kV, IS/2=18,25) eingestellt. Die Reflektorspannung beträgt während der Messung $U_{Ref1}=28$ kV. Zur Fokussie-

rung der Ionen diene eine elektrostatische Linse ($U_{Lens}=8,7$ kV). Die Pulsenergie der Laserpulse wurde mit einem variablen Attenuator eingestellt und vor dem Eintritt in die Probenkammer mit einem Pulsleistungsmeßgerät (Lasermate, Coherent Inc.) bestimmt. Pulsenergie-Werte unterhalb von $E=2\mu\text{J}$ sind graphisch extrapoliert, da die Genauigkeit des Messgerätes im niedrigen Leistungsbereich nicht ausreichend ist. Die gesamte Messung wird durch das Programm (XACQ) gesteuert. Die Kallibrierung des Massenspektrometers erfolgt durch die Massenpeaks $[\text{Cs}]^+$ bei $m/z=133$, $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ bei $m/z=1047,2$ und $[\text{Ang}+\text{Cs}]^+$ bei $m/z=1179,2$.

Während der Messung wurde der Ort der Bestrahlung auf der MALDI-Probe kontinuierlich verändert. Dafür wird die Probe in der x-y-Ebene hin und her bewegt und mittels der Kamera kontrolliert, dass der Laserpuls ausschließlich die kristalline MALDI-Probe und nicht die Metalloberfläche des Probenhalters bestrahlt. Die Vorgehensweise der ständigen Spotveränderung stellte ein möglichst konstantes Ionensignal für den gesamten Verlauf der Messung sicher. Die weitere Auswertung der gespeicherten Massenspektren erfolgte auf einem weiteren PC mit FlexAnalysis (Version 2.0).

Kapitel 9

Berechnung der molekularen Struktur

Um die molekulare Struktur eines Moleküls in der Gasphase zu ermitteln, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Molekularstrukturen mittels der Avogadro-Software erstellt. Anschließend wurde eine grobe Geometrieoptimierung mittels des Kraftfeldes UFF [104, 105, 106] durchgeführt. Dies geschah ebenfalls mittels des Programmes Avogadro. Diese Struktur wurde als xyz-Datei gespeichert und durch eine MD-Simulation, die im folgenden beschrieben wird, weiter optimiert. Bei der MD-Simulation kommt die semi-empirische AM1-Methode zum Einsatz. Diese ermöglicht eine Spaltung und Bildung von molekularen Bindungen im Molekül. Teilweise werden die erhaltenen geometrische Struktur mittels DFT-Methoden genauer bestimmt.

9.1 Moleküldynamik-Simulation

Durch MD-Simulationen können zwei Moleküleigenschaften untersucht werden: zum einen können geometrische Strukturen minimaler Energie gefunden werden. Diese können danach mit genaueren (aber auch rechenaufwendigeren) Methoden weiter in der Energie reduziert werden, um schließlich eine genauere molekulare und elektronische Struktur zu ermitteln. Eine weitere Möglichkeit von MD-Simulationen bei Verwendung semi-empirischer Metho-

den ist die Untersuchung der molekularen Stabilität gegen Fragmentierung. Diese Methode ist zwar ungenau, jedoch oftmals für eine erste Näherung ausreichend. Für eine Überprüfung der Stabilität eines Moleküls können einige geometrioptimierte Strukturen auf eine erhöhte Temperatur (z.B. 2.000K) geheizt und eine MD-Simulation bei konstanter Temperatur über einen Zeit von beispielsweise 5ps auf Stabilität hin untersucht werden. So konnte zum Beispiel festgestellt werden, das Alkalimetall-adaptiertes Angiotensin II wesentlich stabiler als protoniertes Angiotensin II ist. Die MD-Simulationen in dieser Arbeit wurden auf semi-empirischen Level durchgeführt. Die elektronische Struktur wird mit dem Programm-Paket MOPAC (AM1-Methode, Gesamtladung des Moleküls $q=1e$) berechnet. Als freie Parameter konnte die Anfangstemperatur (meist 1000K), die Dauer eines Zeit-Schrittes ($t=1fs$), die Simulationsdauer (meist $t_{ges}=10ps$) und der Abkühlungsparameter (Annealing $A=5000$) eingestellt werden (siehe Kap. 3.4) Die Programme für die MD-Simulation wurden von Roland Mitric bereitgestellt. Eine solche Näherung ist ausreichend, um eine molekulare Struktur des betreffenden Moleküls zu erhalten. Verlässliche Aussagen über einzelne Bindungsabstände oder genaue Angaben zur elektronischen Struktur sind nur mit rechenintensiveren Methoden (z.B. DFT) möglich.

9.2 Dichtefunktionaltheorie

Für kleine Moleküle (Phthalocyanin oder Matrixmoleküle) kann die molekulare und die elektronische Struktur durch eine DFT-Optimierung verbessert werden. Durch einen Vergleich der potentiellen Energie des Moleküls kann zudem eine Auswahl zwischen verschiedenen Strukturen getroffen werden. Dabei wird angenommen, dass die Struktur mit der niedrigsten Energie der wahren Struktur am nächsten kommt. Zudem können auch Strukturen als weniger wahrscheinlich betrachtet werden, falls die Berechnung der elektronischen Struktur mit DFT unter keinen Umständen gelingt (d.h. die SCF-Routine nicht konvergiert). Die Berechnung der elektronischen Struktur wurde mit dem Programm-Paket ORCA (Version 2.7) durchgeführt. Für die Be-

stimmung der Struktur der Phthalocyanin-Moleküle wurde das Funktional BP86 [112, 113] mit dem SVP-Basissatz [115, 130] verwendet. Für die Berechnung der Struktur im Kap. 16 wurde das B3LYP-Funktional [131, 112] mit dem Basissatz 6-31++G** [132, 133, 134, 135] verwendet. Für alle DFT-Berechnungen wurde die RI-Näherung [114, 115] verwendet.

Teil III

Ergebnisse

Kapitel 10

Fragestellung der Experimente

In diesem Teil werden die Ergebnisse der Experimente und Simulationen dargestellt, welche im Rahmen der vorliegenden Dissertation angefertigt worden sind. Zunächst werden MALDI-Massenspektren für Nanosekunden- und Femtosekunden-Laserpulse gezeigt. Die Kapitel 13 bis 15 behandeln die Kationisierung von Angiotensin II mit unterschiedlichen Laserpuls-Parametern. In Kap. 14 wird mit Hilfe von PSD-Analysen von kationisiertem Angiotensin II und der molekularen Struktur ein Teil der Ergebnisse aus den vorangehenden Kapiteln erklärt. Eine Untersuchung des Matrix-Suppression-Effekt (MSE) wird in Kap. 16 mit verschiedenen Laserpulsen dargestellt, um eine gegenwärtige Erklärung zu überprüfen.

Das letzte Kapitel dieser Arbeit widmet sich den Phthalocyaninen. Diese können sowohl mit MALDI-MS als auch mit LDI-MS untersucht werden. Dabei werden Hinweise auf eine Adaption von Sauerstoff von Phthalocyanin und Eisen(II)-Phthalocyanin nachgegangen. Mit einer Untersuchung der Fragmentierung von Phthalocyanin und Eisen(II)-Phthalocyanin schließt dieses Kapitel ab.

Kapitel 11

MALDI mit ultrakurzen Laserpulsen

Nahezu alle kommerziell erhältlichen MALDI-TOF Geräte sind entweder mit einem Stickstoff-Laser (Wellenlänge $\lambda=337$ nm) oder einem gepulsten frequenzverdreifachten Nd:YAG Laser (Wellenlänge $\lambda=335$ nm) ausgestattet. Beide Lasertypen emittieren Laserpulse einer Pulsdauer von einigen Nanosekunden. Aufgrund der Wellenlänge und der Pulsdauer stellen diese beiden Lasertypen die beste Wahl für die MALDI-Massenspektrometrie dar. In dieser Arbeit soll MALDI zusätzlich mit fs-Laserpulsen untersucht werden. Dabei wird die Abhängigkeit des Analyt-Signals auf verschiedene Pulsdauern und Wellenlängen untersucht. Nahezu alle Studien über den MALDI-Prozess werden mit ns-Laserpulsen im UV für Wellenlängen kleiner als $\lambda \leq 355$ nm durchgeführt. Ein Vergleich von MALDI-Massenspektren, welche mit fs-Laserpulsen und ns-Laserpulsen aufgenommen wurden, soll dazu beitragen, offene Fragen über den MALDI-Prozess zu beantworten. So soll mit den vorgestellten Ergebnissen eine Lücke im Verständnis von MALDI geschlossen werden.

11.1 Stand der Forschung

Viele Studien beschreiben einen starken Einfluss der Laserpuls-Parameter auf die Desorption/Absorption der MALDI-Probe und der Ionisation. Eine Zusammenfassung findet sich beispielsweise in [33]. Im UV-Bereich sind MALDI-Massenspektren mit Laserpulsen eines breiten Spektrums von Wellenlängen (193-430nm) und mit Pulsdauern von $\tau \approx 120$ fs bis etwa $\tau = 100$ ns beschrieben. Mit speziellen Matrixsubstanzen, welche im sichtbaren Wellenlängenbereich absorbieren, ist MALDI auch für ns-Laserpulse im sichtbaren Wellenlängenbereich (z.B. $\lambda = 532$ nm) möglich [45, 46, 47, 48].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MALDI Experimente mit ns- und fs-Laserpulsen durchgeführt. Für diese Experimente wird ein MALDI-TOF dergestalt erweitert, dass neben den ns-Laserpulsen des eingebauten Stickstoff-Lasers (337nm, 3ns) auch 60fs-Laserpulse der Zentralwellenlängen $\lambda_c = 400$ nm und $\lambda_c = 800$ nm zur Bestrahlung der MALDI-Probe dienen können. Die Pulsdauer der frequenzverdoppelten Laserpulse ($\lambda_c = 400$ nm) ändert sich durch SHG nur unwesentlich. Als Testsubstanz diente das Oligopeptid Angiotensin II (Primärstruktur: H_2N -Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-COOH). Dieses Peptid besitzt eine Masse von 1046,2 Da und ist noch in kleinsten Spuren mittels MALDI-MS nachzuweisen. Im Vergleich zu anderen untersuchten Peptiden (wie Insulin, Gramicidin, Mellitin) zeigt Angiotensin II bei den getesteten Matrixsubstanzen das höchste Analyt-Ionensignal. Dies gilt für alle verwendeten Arten von Laserpulsen. Wie in Kap. 8 erwähnt, hat sich eine Mischung aus CHCA und SA als geeignete Matrixsubstanz für alle verwendeten Laserpulse (im UV und nahen IR) erwiesen. Diese zeigt das höchste Analyt-Ionensignal für alle eingesetzten Laserpuls-Typen.

11.2 MALDI-Massenspektren von Angiotensin II

In Abb. 11.1 sind MALDI-Massenspektren von Angiotensin II für Laserpulse einer Pulslänge von 3ns ($\lambda=337\text{nm}$ (A)), ($\approx 60\text{ fs}$, $\lambda_c=400\text{nm}$ (B), $\lambda_c=800\text{nm}$ (C)) gezeigt. Die Pulsenergie wurde jeweils so gewählt, dass das Analyt-Ionensignal $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ maximal war. Für Wellenlängen im UV wurde für $\lambda=337\text{nm}$ $E\approx 2\mu\text{J}$ und für $\lambda_c=400\text{ nm}$ ebenfalls $E\approx 2\mu\text{J}$ gewählt. Im nahen IR ($\lambda_c=800\text{nm}$) betrug die Pulsenergie $E\approx 20\mu\text{J}$. Überraschenderweise kann ein deutliches Analyt-Ionensignal in MALDI-Massenspektren beobachtet werden, welche mittels fs-Laserpulsen der Zentralwellenlänge $\lambda_c=800\text{nm}$ erzeugt worden sind. MALDI mit fs-Laserpulsen im nahen IR wurden bisher noch nicht beschrieben. Dieses Ergebnis ist insofern bemerkenswert, da die verwendete Matrixsubstanz nur eine äußerst geringe Absorption im nahen IR zeigt. Für die gezeigten Massenspektren ist das Ionensignal von 200 Laserpulsen addiert. Die gezeigten Massenspektren sind geglättet. Die gezeigten MALDI-Massenspektren lassen sich in zwei Bereiche unterteilen.

Im unteren Massenbereich ($m/z < 600$) ist das vorwiegend Matrix-Ionensignal sichtbar. Zusätzlich befinden sich neben ionisierten Matrixmolekülen kleinere Aggregate derselben sowie einige weitere Massenpeaks unbekanntem Ursprungs. Letztere könnten von Verunreinigungen in der MALDI-Probe - oder von Analyt-Fragmenten stammen.

Im oberen Massenbereich ($m/z > 1000$) befinden sich die Massenpeaks des protonierten Angiotensin II $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ bei $m/z=1047,2$ sowie kationisiertes Angiotensin II: $[\text{Ang}+\text{Na}]^+$ bei $m/z=1069,2$; $[\text{Ang}+\text{K}]^+$ bei $m/z=1085,2$ und, mit erheblich geringerer Intensität, mehrfach kationisierte Spezies. Die Kationisierung des Analyten oder der Matrix weisen auf eine Verunreinigung der MALDI-Probe hin. Die Adaption von Alkalimetall-Kationen an das Analytmolekül wird in den nachfolgenden Kapiteln 13 bis 15 ausführlicher behandelt.

Das maximale Analyt-Ionensignal ist für MALDI-MS mit ns-Laserpulsen etwa zweimal höher als für fs-Laserpulse, die qualitative Zusammensetzung

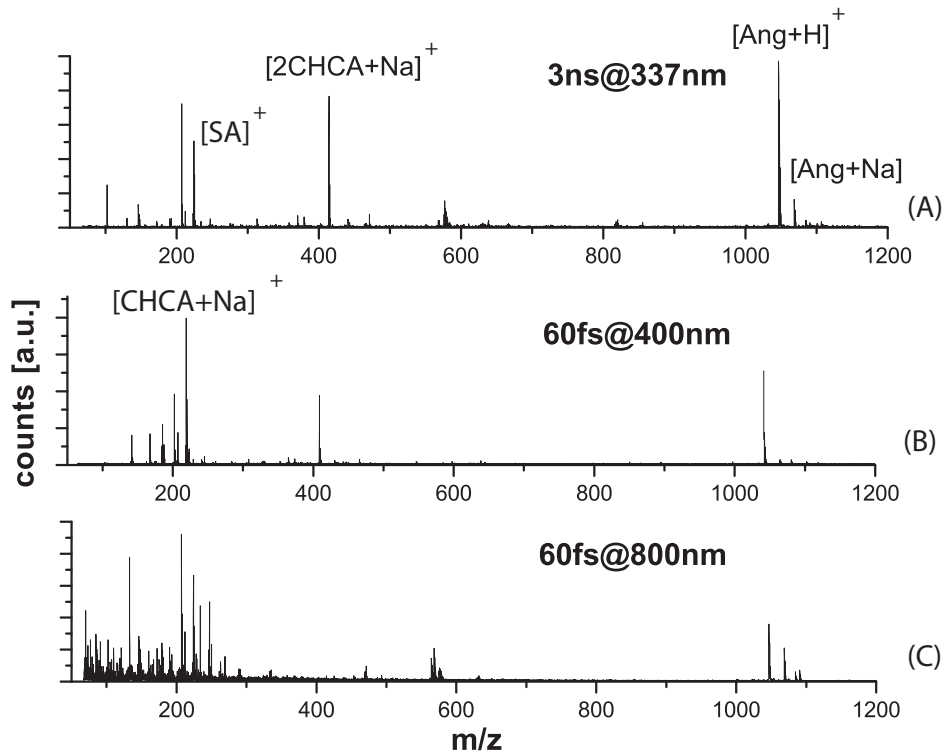


Abbildung 11.1: **MALDI-Massenspektren von Angiotensin II.** Für diese MALDI-Massenspektren wurden (A) ns-Laserpulse der Wellenlänge 337nm ($\approx 2\mu\text{J}$), (B) 60fs-Laserpulse der Wellenlänge 400 nm ($\approx 2\mu\text{J}$) und (C) 60fs-Laserpulse der Wellenlänge 800nm ($20\mu\text{J}$) verwendet. Als Matrix diente eine Kombination aus CHCA und SA. Die kationisierten Massenpeaks sind auf Verunreinigungen der MALDI-Probe zurückzuführen. Für Laserpulse im UV-Bereich sind nur wenige Massenpeaks im unteren m/z -Bereich sichtbar. Für 800nm-Laserpulse treten insbesondere unterhalb von $m/z=300$ eine Vielzahl von Matrix- und/oder Fragmentpeaks auf. Die unterschiedliche Höhe des $[Ang+Na]^+$ -Peaks für die verschiedenen Laserpulse ist zufällig und nicht reproduzierbar.

ist jedoch für alle gezeigten MALDI-Massenspektren ähnlich. Geringe Unterschiede in der Höhe der einzelnen Massenpeaks sind stark abhängig von der Position der Bestrahlung auf der MALDI-Probe. Qualitative Unterschiede für verschiedene Laserpulse ergeben sich vor allem im niedrigen m/z -Bereich. Für sehr geringe Laserpulsenergien ($<0,5\mu\text{J}$ bei Wellenlängen im UV-Bereich, nicht gezeigt) befinden sich für ns-Laserpulse jedoch deutlich weniger Massenpeaks unterhalb von $m/z=500$ im Massenspektrum als bei fs-Laserpulsen. Insbesondere bei einer Bestrahlung der MALDI-Probe mit fs-Laserpulse im nahen IR ($\lambda_c=800\text{nm}$) sind im unteren m/z -Bereich eine Vielzahl von Massenpeaks sichtbar. Zudem ist das Matrix-Ionensignal (Peakintensitäten) über den gesamten, für MALDI geeigneten Bereich der Laserpulsenergie (von $E_{min}=5\mu\text{J}$ bis etwa $E_{max}=80\mu\text{J}$), höher als das Analyt-Ionensignal.

11.3 MALDI-Massenspektren für UV-Laserpulse

In diesem Kapitel sollen die MALDI-Massenspektren interpretiert werden, welche aus der Bestrahlung der MALDI-Probe mit fs-Laserpulsen der Zentralwellenlänge $\lambda_c=400\text{nm}$ und ns-Laserpulsen ($\lambda=337\text{nm}$) entstehen.

Der Analyt-Bereich ($m/z>1000$) Die MALDI-Massenspektren sind im Analytbereich qualitativ sehr ähnlich. Es sind sowohl einfach protonierte, als auch kationisierte Analyt-Massenpeaks im MALDI-Spektrum sichtbar. Lediglich die einzelnen Höhen der Massenpeaks (Signalintensitäten) sind unterschiedlich, was jedoch für MALDI-Massenspektren nicht ungewöhnlich ist. Die m/z -Werte der Analyt-Ionensignale sind für alle verwendeten Laserpuls-Typen gleich. Dies deutet auf einen gemeinsamen MALDI-Mechanismus für ns- und fs-Laserpulse hin, falls man annimmt, dass Ionisierung der Analytmoleküle in der MALDI-Wolke stattfindet. Es ist jedoch erkennbar dass die Höhe der Analytpeaks bei der Bestrahlung durch fs-Laserpulse deutlich geringer ist als bei ns-Laserpulsen.

Der Matrix-Bereich ($m/z < 600$) Ungeachtet des verwendeten Laserpulses treten im niedrigen m/z -Bereich des MALDI-Massenspektrums einige Massenpeaks in allen MALDI-Massenspektren gleichermaßen auf. Das gemeinsame Auftreten einiger Massenpeaks an denselben m/z -Werten deutet auf Gemeinsamkeiten während MALDI hin, da ausschließlich protonierte/kationisierte Matrixmoleküle mit einer positiven Ladung detektiert werden. Im niedrigen m/z -Bereich sind bei einer Bestrahlung der Probe mit fs-Laserpuls erheblich mehr Massenpeaks sichtbar als bei einer Bestrahlung mit ns-Laserpuls. Dieser Anstieg des Ionensignals könnte ein Hinweis auf eine stärkere Desorption/Ablation der MALDI-Probe sein. Hier sind jedoch der Einfluss von einer gleichzeitigen Veränderung der Pulsdauer ($\tau=3\text{ns}$ versus $\tau=60\text{fs}$) und der Wellenlänge ($\lambda=337\text{nm}$ versus $\lambda_c=400\text{nm}$) zu beachten. Nachfolgend sollen diese Resultate gesondert auf den Einfluss der Pulsdauer τ und der Wellenlänge λ hin interpretiert werden.

11.4 Der Einfluss der Pulsdauer

Die während des Desorptionsprozesses eingebrachte Energie kann bei ns-Laserpuls über die gesamte Zeitdauer der Bestrahlung absorbiert werden, da die Energieaufnahme durch Absorption der Laserpulse durch die Matrix im niedrigen m/z -Bereich stattfindet. Die Ableitung von Wärmeenergie durch die MALDI-Probe kann nicht durch gewöhnliche Wärmeleitung in die MALDI-Probe erfolgen, da Bestrahlungszeiten im ns-Bereich zu kurz sind. Bei einer Bestrahlung mit ns-Laserpuls erfolgt der Energie-Transport durch Schock-Wellen (durch den hohen und kurzfristig eintretenden Temperaturgradienten) in tiefere Bereiche der MALDI-Probe. Bei einer Bestrahlung der MALDI-Probe mit fs-Laserpuls kommt nach einer Studie von R. E. Johnson photoakustische Stoßwellen hinzu [136]. Diese könnten die Desorption/Ablation nachhaltig verändern.

Während der Bestrahlung (typisch einige ns) dieser Zeit kann fortwährend Energie durch die Matrixmoleküle während der Desorption oder innerhalb eines entstehenden Clusters absorbiert werden. Durch diese längere Bestrah-

lung können zudem später auftretende Prozesse, z.B. die primäre Ionisation von Matrixmolekülen durch fortwährenden Energieaufnahme begünstigt werden. Dies ist für ultrakurze Laserpulse nicht der Fall, da die Clusterbildung erst nach der Bestrahlung gebildet werden. Die Feststellung, dass bei der Bestrahlung weniger Analyt-Ionen detektiert werden, könnte nach dem Modell von Karas darauf zurückzuführen sein, dass die Photoionisation in den Clustern (welche in den ersten Nanosekunden entstanden sind) nicht mehr möglich ist. Studien für Laserpulse unterschiedlicher Pulsdauern beschreiben eine Veränderung der Desorption/Ablation nach der Bestrahlung der MALDI-Probe für raumzeitlich kürzere Laserpulse und ferner eine stärkere *Phasen-Explosionen*. Diese Veränderung muss sich jedoch nicht zwangsläufig in einer Veränderung der Ionisation äußern [28]. Insbesondere ist die qualitative Zusammensetzung im Analyt-Bereich des MALDI-Massenspektrum ein starker Hinweis für einen gleichartigen Ionisationsmechanismus. Für ns-Laserpulse erscheint der Übergang der MALDI-Probe in die Gasphase deutlich sanfter, was zu weniger Fragmentierung der Matrix und des Analyten führen sollte, da die Innere Energie gleichmäßiger verteilt sein könnte. Ob dies dennoch die Fragmentierung der Analytmoleküle herabsetzt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die wesentlich höheren Feldstärken von ultrakurzen Laserpulsen im Vergleich zu ns-Laserpuls können durch mehrphotonische Absorption der Analytmoleküle einen zusätzlichen Beitrag zur Fragmentierung derselben bilden. Somit wäre das Analytsignal niedriger und gleichzeitig entstehen mehr Massenpeaks im unteren m/z -Bereich.

Die schnelle Bildung der MALDI-Wolke nach der Bestrahlung durch fs-Laserpuls kann so zu einer Zunahme von Fragmentation der Matrixmoleküle führen. Die angeführten MD-Simulationen in Verbindung mit Ladungstransfer führt jedoch unabhängig der Pulsdauer zu keiner Veränderung der Ionisation von Matrix und Analytmolekülen. Die ist in Einklang mit der qualitativen Ähnlichkeit der in Abb. 11.1 gezeigten Massenspektren. Unterschiedlichen Zeitbereichen der Absorption führt zu einer Veränderung der Desorption/Ablation. Die quantitativen Unterschiede im MALDI-Massenspektrum, welche aus den unterschiedlichen Bestrahlungsdauern resultieren können mit

dem Pooling-Modell nur eingeschränkt erklärt werden, da die (primäre) Ionisierung der Matrixmoleküle nicht von der Pulsdauer abhängig sein sollte. Weitere Schlüsse erlauben die vorliegenden MALDI-Massenspektren noch nicht. Das Lucky-Survivors Modell könnte eine Erklärungslösung bieten, da anzunehmen ist, dass aufgrund der unterschiedlichen Desorption/Ablation die gebildeten Cluster in ihren physikalischen Eigenschaften verändert sein könnten, was zu verschiedenartigen Vorgängen nach der Bestrahlung führen könnte.

Dies sind jedoch nur wagen Vermutungen und bedürfen einiger weiterer Experimente. Insbesondere wäre eine Variation der Pulsdauer von Laserpulsen einer einheitlichen Wellenlänge zur Klärung offener Fragen unabdingbar. Zudem könnte eine MD-Simulation von MALDI mit fs-Laserpulsen zur Erklärung der Vorgänge beitragen.

11.5 Der Einfluss der Wellenlänge (im UV)

Bei der Bestrahlung mittels fs-Laserpulsen ist das Analyt-Ionensignal bei gleichen Pulsenergien nur etwa halb so hoch wie bei ns-Laserpulsen der Wellenlänge von $\lambda=337\text{nm}$ (vgl. Abb. 11.1 sowie 12.1). Eine Erklärungsmöglichkeit ist der unterschiedliche Absorptionskoeffizient der verwendeten Matrix bei den Wellenlängen $\lambda=337\text{nm}$ und $\lambda=400\text{nm}$. Wie aus Abb. 11.2 ersichtlich, ist Absorptionskoeffizient bei $\lambda=337\text{nm}$ um ein Vielfaches höher als bei $\lambda=400\text{nm}$. (siehe auch [44]). Die Absorptionkoeffizienten der auf dem Probeneller befindlichen Matrixkristalle sollte sich im UV-Bereich von den gelösten Matrixsubstanzen nicht maßgeblich unterscheiden. Nach einer Studie von V. Horneffer [35] ist die Höhe des Analyt-Ionensignals proportional des Absorptionkoeffizienten der Matrixsubstanz für die Wellenlänge des Laserpulses. Dieses Verhalten zeigt sich auch in den vorgestellten MALDI-Massenspektren (vgl. auch Abb. 12.1). Eine Veränderung der Wellenlänge besitzt zwar nur einen geringen Einfluss auf die Geschwindigkeiten der Teilchen nach der Desorption/Ablation, kann aber einen starken Einfluss auf die Stärke der Phasen-Explosion besitzen, da die Laserpulse unterschiedlich stark

absorbiert werden. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz dringt ein Laserpuls der Zentralwellenlänge $\lambda_c=400\text{nm}$ tiefer in die MALDI-Probe ein als ein Laserpuls der Wellenlänge von $\lambda=337\text{nm}$ [1]. Dieses tiefere Eindringen führt höchstwahrscheinlich zu einer Veränderung in der Desorption/Ablation, was sich in unterschiedlichen MALDI-Massenspektren äußern könnte.

Eine Zunahme der Laserpulsenergie bei MALDI führt im Regelfall zu einer qualitativen und quantitativen Zunahme der Massenpeaks im unteren m/z -Bereich. Dies betrifft sowohl die Signalintensität der einzelnen Massenpeaks als auch ihre Anzahl. Das tiefere Eindringen der Laserpulse in die MALDI-Probe könnte die Emission größerer Cluster zur Folge haben. Eine Interpretation unter Berücksichtigung des Lucky-Survivors-Modells von Karas et al. wäre, dass die Art und Anzahl der gebildeten Ionen von der Größe und Art der gebildeten Cluster abhängig ist, da die Ionen zunächst durch eine mechanische Ladungstrennung freigesetzt werden. Ein tieferes Eindringen des Laserpulses in die MALDI-Probe (durch die geringere Absorption der Laserpulse) könnte so die erhöhte Anzahl der Massenpeaks im unteren m/z -Bereich des MALDI-Massenspektrums erklären.

11.6 Fazit

Die experimentelle Realisierung von MALDI-Massenspektren mit fs-Laserpulsen im UV-Bereich ist schon gezeigt worden. Neu ist in diesem Zusammenhang jedoch die Ausweitung der Pulslänge bis herunter zu $\tau \approx 60\text{fs}$. Bis dato betrug die geringste Pulsdauer für MALDI etwa 120fs . Die qualitativen Unterschiede im unteren m/z -Bereich des MALDI-Massenspektrums sind aufgrund der hohen Anzahl von nicht zuordnebaren Massenpeaks, insbesondere für hohe Pulsenergien, nur schwer interpretierbar, da ein Teil dieser auch von nicht bekannten chemischen REaktionen während des MALDI-Prozesses herrühren könnten. Ein Teil dieser Massenpeaks rührt mit hoher Wahrscheinlichkeit von Verunreinigungen der Matrixsubstanzen oder des Analyten her, da die NACHweisempfindlichkeit der MALDI-Massenspektrometrie für einige Substanzen äußerst hoch ist.

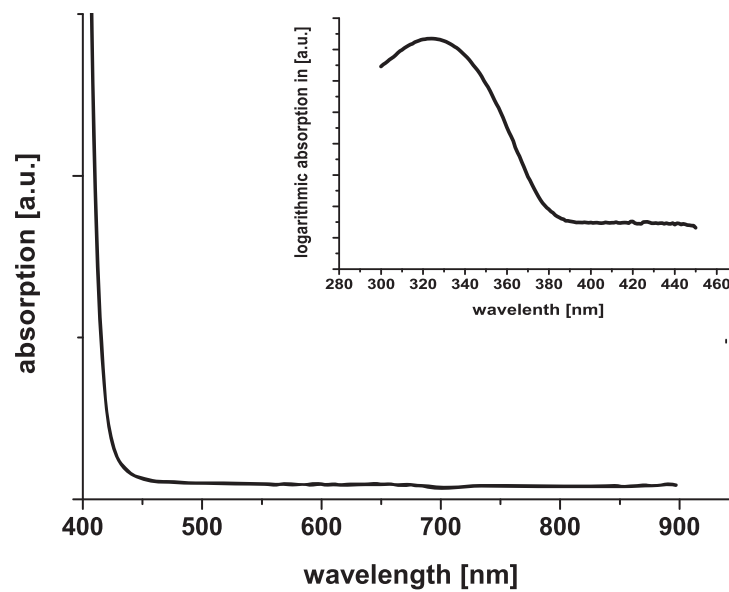


Abbildung 11.2: **Absorptionsspektrum einer Mischung von CHCA und SA.** Die Matrixsubstanz war in 3:2 ACN/H₂O gelöst und wurde mittels eines UV-Vis-Spektrometers aufgenommen. Man erkennt eine abnehmende Absorption der Matrix bis zu einer Wellenlänge von etwa $\lambda=450\text{nm}$. Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich ($\lambda>450\text{nm}$) und im nahen IR wird Licht dagegen nur minimal absorbiert.

11.7 Einfluss der Pulsdauer auf die Desorption/Ablation

In diesem Abschnitt werden MALDI-Experimente von reiner Matrixsubstanz (ohne Angiotensin II) untersucht auf die Clusterbildung einiger Matrixmoleküle hin untersucht. Im unteren m/z -Bereich des MALDI-Massenspektrums sind erhebliche Abweichungen zwischen ns-Laserpulsen und fs-Laserpulsen sichtbar. Dieses Phänomen ist für MALDI ohne Analytsubstanz noch deutlicher im Massenspektrum sichtbar. Im Falle von moderaten Laserpulsenergien (unterhalb von $1\mu\text{J}$) ist bei einer Bestrahlung der Matrixsubstanz (ohne Analytsubstanz) mit ns-Laserpulsen eine Aggregation von einigen Matrixmolekülen sichtbar. Mit zunehmender Pulsenergie nimmt der Effekt der Aggregation wieder ab. Bei der Bestrahlung der MALDI-Probe mit fs-Laserpulsen ist keine Clusterbildung im MALDI-Massenspektrum erkennbar. Die beschriebenen MALDI-Massenspektren sind in Abb. 11.3 gezeigt.

Das Ausbleiben der Aggregation der Matrix wie bei der Bestrahlung mit ns-Laserpulsen geringer Pulsenergie lässt sich durch eine stärkere Phasen-Explosion deuten. Eine erhöhte Beschleunigung der einzelnen Teilchen nach der Bestrahlung könnte einer Aggregation der Matrixmoleküle entgegenwirken und durch Stöße die gebildeten Cluster innerhalb kürzester Zeit fragmentieren. Für höhere Laserpulsenergien (ab etwa $10\mu\text{J}$) ist während der Bestrahlung der MALDI-Probe durch sichtbares Abtragen der Probensubstanz mit der Kamera sichtbar. Nach Experimenten mit fs-Laserpulsen hoher Energie sind die Spuren der Ablation mit bloßem Auge sichtbar. Dieser Effekt lässt sich für ns-Laserpulsen der gleichen Pulsenergie ($>10\mu\text{J}$) nur sehr eingeschränkt beobachten. Die angesprochenen MD-Simulationen zeigen überdies einen Rückgang der Clustergröße nach der Desorption/Ablation bzw. einen schnelleren Zerfall der Cluster mit steigender Pulsenergie. Das Auftreten der Massenpeaks im m/z -Bereich um 400 bei einer Bestrahlung der MALDI-Probe mit fs-Laserpulsen erhöhter Pulsenergie (siehe unteres Massenspektrum der Abb. 11.3) fügt sich jedoch nicht diese Überlegung ein.

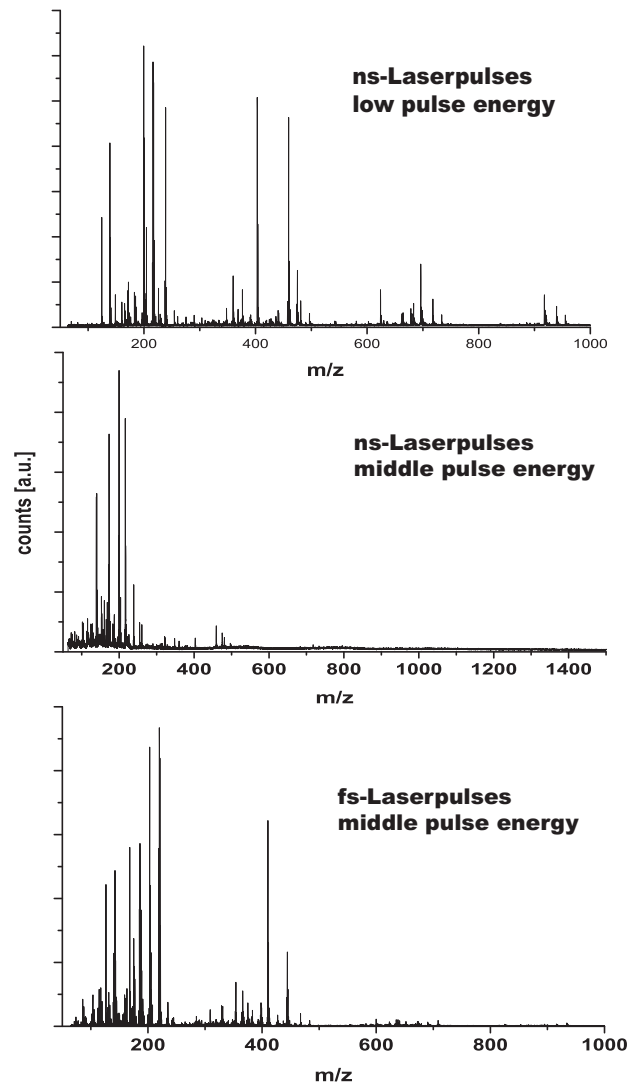


Abbildung 11.3: **Aggregation von Matrixmolekülen ohne Analytsubstanz in der MALDI-Probe.** Diese MALDI-Massenspektren wurden durch Bestrahlung der reinen Matrix (CHCA und SA) ohne Analyt aufgenommen. Die oberen beiden Massenspektren wurde mit ns-Laserpulses der Wellenlänge $\lambda=337\text{nm}$, das untere mit fs-Laserpulses der Zentralwellenlänge $\lambda_c=400\text{nm}$ aufgenommen. Im oberen Massenspektrum ist die Aggregation mit vier bis fünf Matrixmolekülen sichtbar. Die Pulsenergie betrug etwa $E_{low}=0,5\mu\text{J}$. Diese Aggregation nimmt für höhere Laserpulsenergien ab, wie das mittlere Massenspektrum zeigt. Für dieses Massenspektrum wurde die Matrix mit Laserpulses einer Pulsenergie von etwa $E_{middle}=2\mu\text{J}$ bestrahlt. Das unterste Massenspektrum wurde mit fs-Laserpulses der Zentralwellenlänge $\lambda_c=400\text{nm}$ aufgenommen. Die Pulsenergie betrug etwa $E_{middle}=5\mu\text{J}$.

11.8 MALDI mit fs-Laserpulsen im nahen IR

Bei Bestrahlung einer gewöhnlichen MALDI-Probe mit ns-Laserpulsen im sichtbaren Wellenlängenbereich und im nahen IR werden keine Ionen detektiert. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem Pooling-Modell, welches eine photoresonante Absorption der Laserpulse durch die Matrix zur Ionisierung voraussetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei einer Bestrahlung der MALDI-Probe mit 60fs-Laserpulsen einer Zentralwellenlänge von $\lambda_c=800\text{nm}$ sowohl Matrix- als auch Analyt-Ionensignal nachgewiesen werden kann. Das erhaltene MALDI-Massenspektrum ist qualitativ ähnlich einem Massenspektrum, welches durch Laserpulse im UV erstellt wurde. Zwei wesentliche Unterscheidungsmerkmale von MALDI-Massenspektren für Laserpulse im nahen IR und UV bestehen dennoch:

- (i) Die Pulsenergien für die Erzeugung eines MALDI-Massenspektrums sind im Falle von Laserpulsen im nahen IR-Bereich deutlich höher als für Laserpulse im UV. Ab etwa $5\text{-}8\mu\text{J}$ für 60fs-Laserpulse der Zentralwellenlänge $\lambda=800\text{nm}$ im Vergleich zu $0,2\text{-}0,5\mu\text{J}$ im UV ist ein deutliches Analyt-Ionensignal messbar.
- (ii) Im Vergleich zu MALDI mit Laserpulsen im UV ist die Schwankung des Analyt-Ionensignals deutlich stärker von der Position der bestrahlten Fläche auf der MALDI-Probe abhängig.

Der Absorptionskoeffizient der Matrix ist für Laserpulse im nahen IR sehr gering, wie Abb. 11.2 zeigt. Eine photoresonante (einphotonische) Absorption ist somit keine ausreichende Erklärung für die nachgewiesenen Matrix- und Analytionen. Zwei möglich Erklärungen werden daher diskutiert.

11.8.1 Zweiphotonische Anregung der Matrixmoleküle

Durch die gleichzeitige Absorption von zwei Photonen durch dasselbe Matrixmolekül kann eine Absorption von $\lambda_c=800\text{ nm}$ -Laserpulsen trotz des geringen Absorptionskoeffizienten der Matrix im nahen IR ermöglicht werden.

Eine mehrphotonische Anregung eines Moleküls ist ein nichtlinearer optischer Prozess. Dieser hängt im allgemeinen von der elektrischen Feldstärke des Laserpulses ab. Die elektrische Feldstärke von fs-Laserpulsen ist um einen Faktor von etwa 10^5 höher als die von ns-Laserpulsen gleicher Pulsenergie. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass mehrphotonische Absorption bei einer Bestrahlung der Matrixsubstanz durch ultrakurze Laserpulse einen ausreichenden Beitrag zu MALDI erbringen kann, erheblich.

Die Verifikation dieser Interpretation ist Gegenstand des nachfolgenden Abschnittes. Es gibt jedoch noch eine Möglichkeit, welcher zusätzlich zur Ionisation in der MALDI-Probe beitragen kann.

11.8.2 Erwärmung des Probenhalters

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz durchdringt ein Laserpuls in nahen IR die MALDI-Probe nahezu ungehindert, sieht man von etwaigen Mehrfachreflexionen innerhalb der polykristallinen MALDI-Probe ab. Dies bedeutet, dass nahezu die gesamte absorbierte Energie der Laserpulses zur Erwärmung des metallischen Probenhalters unterhalb der MALDI-Probe dient. Dies führt zu einer starken lokalen Erwärmung und zur Emission von Elektronen durch die MALDI-Probe. Die Kombination des starken Temperaturgradienten am Rand der bestrahlten Fläche und den freien Elektronen könnte sowohl zur Desorption/Ablation als auch zur Ionisation einiger Matrixmoleküle beitragen. Für geringe Laserpulsenergien (bis etwa $20\mu\text{J}$) scheint jedoch der thermische Einfluss auf MALDI gering. Um zu zeigen, dass dieser Vorschlag keinen nachweisbaren Einfluss zur Ionisation hat, ist ein Massenspektrum derjenigen positiv-geladenen Ionen aufgenommen worden, bei dem lediglich die metallische Oberfläche des Probenhalters bestrahlt wurden. Bei Laserpulsenergien von hoher Energie (etwa $50\mu\text{J}$) können Metall-Kationen und Cluster derselben (z.B. $[2\cdot\text{Fe}]^+$) nachgewiesen werden. Diese Metall-Kationen sind in einem MALDI-Massenspektrum nicht sichtbar. Ein weiteres Argument gegen diese Möglichkeit ist, dass bei einer Bestrahlung einer MALDI-Probe (mit gängigen Matrixsubstanzen wie CHCA oder SA) mit einem frequenzverdoppelten Nd:YAG Laser ($\lambda=532\text{nm}$) kein Ionensignal beobachtet wird [44].

Von diesen beiden möglichen Erklärungen scheint nur die zweiphotonische Absorption einen entscheidenden Beitrag für MALDI im nahen IR zu liefern. Wie im Folgenden gezeigt wird, ist die zwei-photonische photoresonante Anregung tatsächlich der entscheidende Effekt, um MALDI mit ultrakurzen Laserpulsen im nahen IR zu erklären.

11.9 Zwei-Photonen-Absorption

Um die These der zwei-photonischen Absorption ($2 \cdot h\nu + M \rightarrow M^*$) zu verifizieren, wurden fs-Laserpulse ($\lambda_c = 800\text{nm}$) unterschiedlicher Pulsdauer erzeugt. Hierzu wurde ein Flüssigkristall-Modulator in die Fourier-Ebene eines 4f-Kompressors platziert. Durch eine quadratische Verschiebung der Phasen in der Fourier-Ebene konnte ein linearer Chirp generiert werden (siehe Kap. 4.2). Mittels dieses linearen Chirps wurden Laserpulse bis zu einer Pulsdauer von $\tau \approx 6\text{ps}$ erzeugt. Der Zusammenhang zwischen linearem Chirp C und der resultierenden Pulsdauer lässt sich mit nachfolgender Formel beschreiben, wobei τ_0 die minimale Laserpulsdauer nach dem 4f-Aufbau ist. Für τ_0 wurden etwa 120fs gemessen. Die Erhöhung der Pulslänge von 60fs auf $\tau_0 = 120\text{fs}$ nach dem 4f-Aufbau ist ein Resultat von Ungenauigkeiten bei der Justage des optischen Aufbaus. Die Pulsdauern τ und τ_0 wurden mittels Autokorrelation bestimmt.

$$\tau = \tau_0 \cdot \sqrt{1 + \frac{16 \cdot (2 \cdot \ln 2)^2 \cdot C^2}{\tau_0^4}}$$

Die experimentell bestimmten Pulsdauern τ lieferten eine sehr gute Übereinstimmung mit den theoretischen Werten, wie Abb. 11.5 zeigt. Die MALDI-Probe wird mit Laserpulsen unterschiedlicher Pulsdauer bestrahlt und das resultierende Massenspektrum ausgewertet. Für diese Messung wurde die Höhe des $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ -Ionensignals als ein Maß für die Absorption herangezogen. Diese Wahl erscheint gerechtfertigt, da für moderate ($0,5\text{-}2\mu\text{J}$ im UV, $10\text{-}20\mu\text{J}$ im nahen IR) Laserpulsenergien des $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ -Signal mit der Pulsenergie (proportional zur absorbierten Energie) stetig ansteigt (siehe auch

Abb. 12.1).

Die Laserpulsenergie wurde für diese Messung auf $E=30\mu\text{J}$ eingestellt. Somit war für die meisten eingestellten Chirp-Werte die Fragmentierung des Analyt-Moleküls kein relevanter Faktor, da insbesondere mit zunehmender Pulsdauer die Absorption der Laserpulse abnimmt. Für geringere Werte der Pulsenergie wäre das Analyt-Ionensignal für stark *gechirpte* Laserpulse (hohe Pulsdauer) sehr gering und nicht mehr vom Rauschen zu unterscheiden. In Abb. 11.4 sind MALDI-Massenspektren von Angiotensin II für verschiedene Pulsdauern gezeigt. Für höhere Pulsdauern ist bei konstanter Pulsenergie ein Rückgang des gesamten Ionensignals zu beobachten. Dies ist ein deutlicher Hinweis für die zweiphotonische Absorption der Laserpulse durch die Matrix bei Verwendung ultrakurzer Laserpulse im nahen IR. Dieses Verhalten wurde für positive und negative Chirp-Werte untersucht. In Abb. 11.5 ist die Abhängigkeit des Analyt-Ionensignals vom eingestellten Chirp sichtbar. Das Vorzeichen des linearen Chirps scheint keinen Einfluss auf die Höhe des Analyt-Ionensignals zu haben. Lediglich die Pulsdauer bei Laserpulsen im nahen IR (und so die Absorption) besitzt einen Einfluss auf das Ionensignal.

Im folgenden soll die These der zweiphotonischen Absorption der Laserpulse im nahen IR quantitativ anhand der Abhängigkeit des Analyt-Ionensignals von der Pulsdauer beschrieben werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Absorption der Laserpulse proportional zum Analyt-Ionensignals ist.

11.10 $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ als Funktion der Pulsdauer im nahen IR

Zwei-Photon-Absorption (ZPA) der Matrix als eine Funktion der Pulsdauer lässt sich wie folgt beschreiben: Sei I die Intensität des Laserpulses, τ die Pulsdauer und E die konstante Energie eines Laserpulses, dann gilt für einen

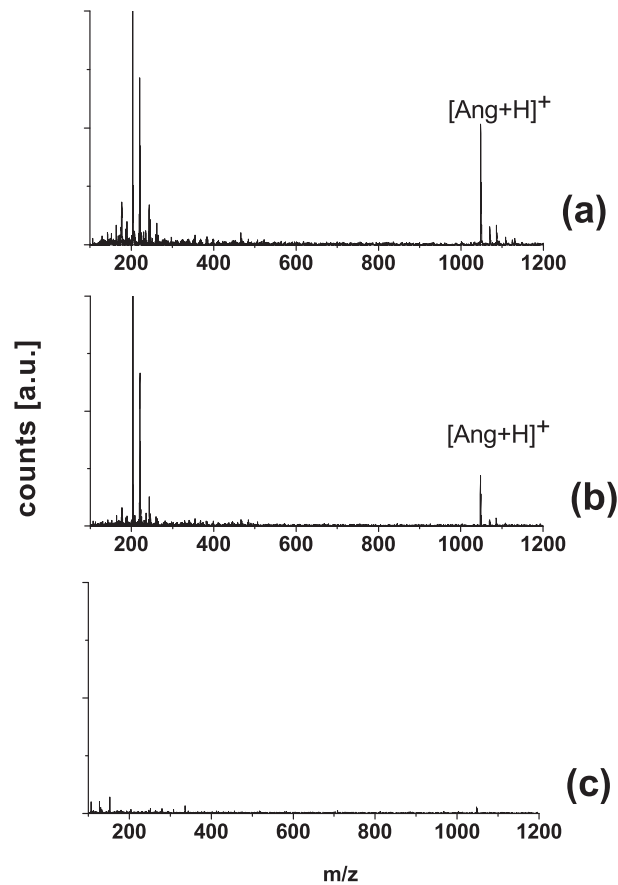


Abbildung 11.4: MALDI-Massenspektren von Angiotensin II mit unterschiedlicher Pulsdauer im nahen IR Die MALDI-Massenspektren wurden mit ultrakurzen Laserpulsen einer Zentralwellenlänge $\lambda_c=800\text{nm}$ aufgenommen. Die Pulsenergie betrug konstant $E=30\mu\text{J}$. Für (A) war die Pulsdauer $\tau\approx 120\text{fs}$ (kein Chirp), für (B) betrug die Pulsdauer $\tau\approx 600\text{fs}$ ($C=30.000\text{fs}^2$) und für (C) wurde die Pulsdauer durch einen linearen Chirp von 100.000fs^2 auf $\tau\approx 6\text{ps}$ eingestellt. Für höhere Pulsdauern ist eine deutliche Abnahme des Ionensignals im MALDI-Massenspektrum sichtbar.

nichtlinearen optischen Prozess zweiter Ordnung:

$$ZPA \propto \int_0^{\tau} dt \cdot I^2$$

Da die Intensität nicht von der Zeit t abhängig ist, gilt

$$ZPA \propto I^2 \cdot \tau$$

Die Definition der Laserpulsintensität ($I \propto E/(\tau \cdot A)$) eingesetzt ergibt für eine konstante Bestrahlungsfläche A :

$$ZPA \propto \frac{E^2}{\tau}$$

Für eine konstante Pulsenergie wird ein Parameter β angenommen. β ist der Proportionalitätsfaktor zwischen $[Ang+H]^+$ und der Absorption. So gilt:

$$[Ang + H]^+ = \frac{\beta}{\tau}$$

Nun kann eine χ^2 -Minimierung die zu erwartende Kurve an das gemessene Ionensignal anpassen. Hierbei wird nur der Parameter β variiert. Eine gute Übereinstimmung zeigt Abb. 11.6. Die gute Übereinstimmung der gemessenen Werte mit den theoretischen Werten spricht für die zweiphotonische Absorption der Laserpulse durch die Matrixmoleküle.

11.11 Interpretation von MALDI mit fs-Laserpulsen im nahen IR

Die Vermutung, dass MALDI mit ultrakurzen Laserpulsen auf einer mehrphotonischen Absorption möglich scheint, wurde schon von Demirev et al. vorgeschlagen [39]. Im Rahmen dieser Experimente konnte ein direkter Zusammenhang der Absorption der Laserpulse durch die Matrix-Moleküle und der Bildung von Ionen nachgewiesen werden. Dies ist ein starkes Argument für die zweiphotonische Absorption der Laserpulse im nahen IR durch die Matrix. Die These, dass im Falle einer Bestrahlung der MALDI-Probe mit

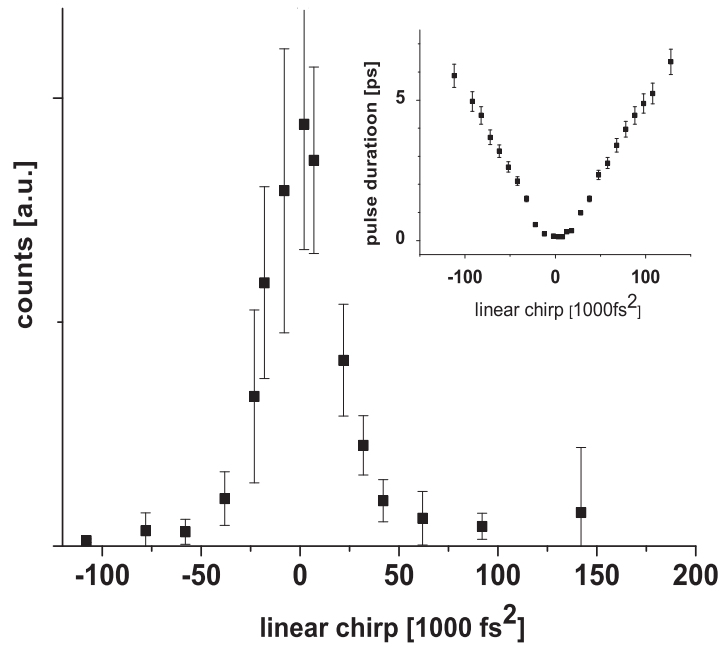


Abbildung 11.5: **Abhängigkeit von $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ vom linearen Chirp.** Die Höhe des $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ -Massenpeaks als Funktion des linearen Chirps. Das Vorzeichen des Chirps ist ohne Einfluss, das Ionensignal ist somit nur von der Pulslänge des Laserpulses (der Zentralwellenlänge $\lambda_c=800\text{nm}$) abhängig. Die gezeigten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweils fünf Messungen. Oben rechts ist die gemessene Pulsdauer als Funktion des eingestellten linearen Chirps gezeigt.

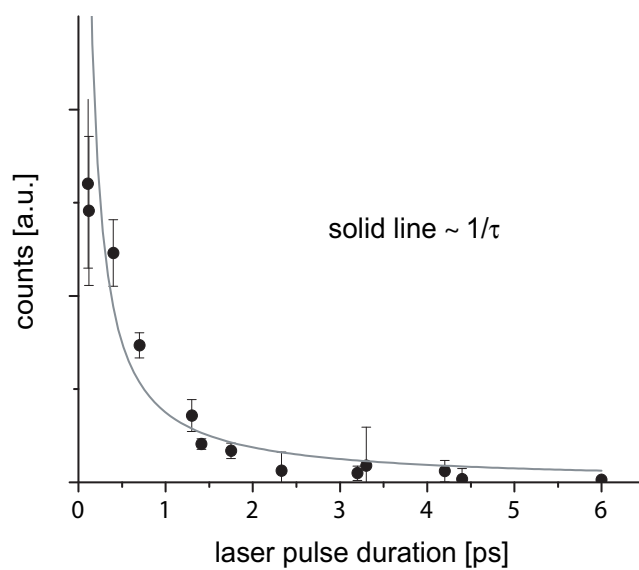


Abbildung 11.6: **Abhängigkeit von $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ von der Pulsdauer.** Die Peakintensitäten nehmen für höhere Pulsdauern im nahen IR deutlich ab. Die durchgezogene Linie entspricht dem der Fit-Funktion $\frac{\beta}{\tau}$. Die Übereinstimmung der theoretischen Kurve mit den experimentell ermittelten Werten ist sehr gut. Diese Übereinstimmung ist ein starkes Indiz für die zweiphotonische Absorption der Laserpulse durch die Matrixmoleküle.

ns-Laserpulsen eine mehrphotonische Absorption einen Beitrag zur Ionisierung bei MALDI liefert, konnte so als sehr unwahrscheinlich angesehen werden. Auch die von Karas et al. vorgeschlagene mechanische Ionisation während MALDI durch die Teilung einer heterogenen Ladungsverteilung in der MALDI-Probe durch Desorption/Ablation von Clustern durch die Bestrahlung kann so nur einen sehr geringen Beitrag zur Erzeugung von Ionen beitragen. Da die Desorption/Ablation nach einigen Picosekunden noch nicht eintritt, ist bei einer Bestrahlung der MALDI-Probe mit ultrakurzen Laserpulsen auch eine Ionisierung der Cluster durch Photoionisation nicht möglich. Die Photoionisation innerhalb der entstehenden Cluster als einen Beitrag zur Ionisation kann demnach ausgeschlossen werden. Eine Untersuchung der Clusterbildung während der Desorption/Ablation durch die Bestrahlung von ps-Laserpulsen und fs-Laserpulsen steht noch aus. Die vorliegenden Experimente zeigen in Übereinstimmung zu früheren Studien, dass eine photoresonante Absorption der Laserpulse durch die Matrixmoleküle eine notwendige Bedingung für die Erzeugung von Ionen darstellt.

Es lässt sich jedoch mit Sicherheit sagen, dass die Energie zur Ionisierung während MALDI zu einem überwiegenden Teil aus der photoresonanten Absorption der Laserpulse erbracht wird.

Kapitel 12

Abhängigkeit des Analytsignals von der Pulsenergie

Das detektierte Ionensignal, insbesondere das Analyt-Ionensignal hängt stark von der Pulsenergie des zur Bestrahlung der MALDI-Probe eingesetzten Laserpulses ab. Dies wurde, wie in der Einleitung geschildert, mehrfach in der Literatur beschrieben. Für ns-Laserpulse im UV wurde ein starker Anstieg des Analyt- und Matrix-Ionensignals für zunehmende Werte der Pulsenergie beschrieben.

In diesem Kapitel werden die Abhängigkeiten der Analyt-Ionensignale als Funktion der Pulsenergie für ns- und fs-Laserpulse erweitert. Für diese Versuche wurde die MALDI-Probe mit Laserpulsen unterschiedlicher Pulsenergie bestrahlt. Die Pulsenergie ist dabei direkt vor dem Eingang in die Vakuumkammer bestimmt worden. Als Analyt diente Angiotensin II, und als Matrixsubstanz eine Mischung von CHCA und SA. Zu jedem Wert der Pulsenergie sind mindestens fünf MALDI-Massenspektren aufgenommen und der Mittelwert der $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ -Ionensignale gebildet worden. Das Ergebnis für ns- und fs-Laserpulse im UV und nahen IR) ist in Abb. 12.1 gezeigt.

12.1 Energieabhängigkeit bei Laserpulsen im UV

Für Laserpulse der Wellenlängen im UV (337nm und 400nm) ist der $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ -Massenpeak ab einer Laserpulsenergie von etwa $E_{\min}=0,2\mu\text{J}$ im Massenspektrum vom Rauschen deutlich unterscheidbar. Das Analyt-Ionensignal steigt danach bis zu einer Pulsenergie von $E=2-3\mu\text{J}$ an und geht für höhere Pulsenergien wieder zurück. Mit einer Erhöhung der Pulsenergie nehmen die Massenpeaks im m/z -Bereich unterhalb von 500 an Höhe und Anzahl zu. Der qualitative und quantitative Anstieg des Matrix-Ionensignals sowie eine für hohe Pulsenergien (ab etwa $5\mu\text{J}$) erkennbare Verschiebung der Massenpeaks im unteren m/z -Bereich zu niederen m/z -Werten deutet auf eine verstärkte Fragmentierung der Matrix- und Analytenmoleküle hin. Analyt-Ionensignal ist bis zu einer Pulsenergie von $E_{\max}\approx 15\mu\text{J}$ (für ns-Laserpulse) oder $E_{\max}\approx 20\mu\text{J}$ (für fs-Laserpulse der Zentralwellenlänge $\lambda_c=400\text{nm}$) im MALDI-Massenspektrum sichtbar. Matrix-Ionensignal ist jedoch auch oberhalb dieser Pulsenergiewerte im MALDI-Massenspektrum sichtbar.

12.2 Energieabhängigkeit bei Laserpulsen im nahen IR

Bei der Bestrahlung der MALDI-Probe mit 60fs-Laserpulsen der Zentralwellenlänge von $\lambda_c=800\text{nm}$ zeigt sich ein (dem UV) analoges Verhalten, jedoch für einen anderen Bereich der Pulsenergie. Das Analyt-Ionensignal $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ ist ab einer Pulsenergie von $E_{\min}=5-7\mu\text{J}$ im MALDI-Massenspektrum deutlich sichtbar. Die Peakintensität von $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ steigt bis zu einer Pulsenergie von ca. $E=20\mu\text{J}$ an und sinkt für höhere Pulsenergie wieder bis unterhalb des Raus-Levels. $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ ist bis zu einer Pulsenergie von $E_{\max}\approx 90\mu\text{J}$ im MALDI-Massenspektrum sichtbar. Die maximale Intensität des Analyt-Ionensignals ist für ns-Laserpulse der Wellenlänge $\lambda=337\text{nm}$ etwa doppelt so hoch wie für fs-Laserpulse der Zentralwellenlängen $\lambda_c=400\text{nm}$ und $\lambda_c=800\text{nm}$. Das maximale Analyt-Ionensignal, welches aus der Bestrahlung

mit fs-Laserpulsen im UV und IR resultiert, ist dagegen etwa gleich hoch. Falls man eine zweiphotonische Absorption der 800nm-Laserpulse annimmt, so werden in beiden Fällen die Matrixmoleküle auf Potentialstufen entsprechend eines 400nm-Photons angeregt, was die gleiche maximale Höhe des Analyt-Ionensignals erklären würde. Das Absorptionsspektrum der Matrix (siehe Abb. 11.2) zeigt für $\lambda=337\text{nm}$ einen deutlich höheren Absorptionskoeffizienten als für $\lambda=400\text{nm}$.

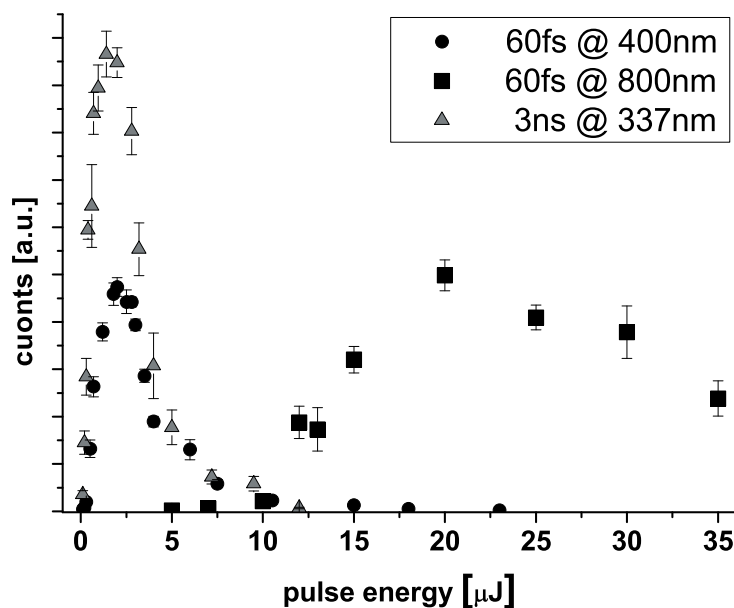


Abbildung 12.1: **Abhängigkeit des Analyt-Signales von der Pulsenergie.** Die Peakintensität von $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ als eine Funktion von der Energie des Laserpulses ist hier für 3ns-Laserpulse der Wellenlänge 337nm (\blacktriangle), für 60fs-Laserpulse der Zentralwellenlängen $\lambda_c=400\text{nm}$ (\bullet) und $\lambda_c=800\text{nm}$ (\blacksquare) gezeigt. Die Punkte sind die gemittelten Peakintensitäten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Als Matrix wurde eine Kombination von CHCA und SA verwendet.

12.3 Interpretation

Die qualitative Energie-Abhängigkeit von $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ lässt sich unabhängig vom Laserpuls-Typus in drei Bereiche einteilen. Unterhalb einer Minimal-Pulsenergie (E_{min} auch als *MALDI-Threshold* bezeichnet) ist das Analyt-

Ionensignal sehr gering. Für höhere Laserpulsenergien steigt das Signal erst stark an und erreicht danach ein Maximum. Für noch höhere Pulsenergien sinkt das Analyt-Ionensignal bis es unterhalb des Rauschlevels fällt. Dieses Verhalten findet für Laserpulse im UV ($\lambda=337\text{nm}$ und $\lambda_c=400\text{nm}$) im etwa selben Pulsenergie-Bereich statt. MALDI durch eine Bestrahlung mit Laserpulsen im nahen IR bedarf deutlich höherer Pulsenergien. Zudem ist der Energiebereich, in welchem Analyt-Ionen detektiert werden können deutlich größer: von $E_{min}=0,2\mu\text{J}$ bis etwa $E_{max}20\mu\text{J}$ im UV und von $E_{min}=5\mu\text{J}$ bis etwa $E_{max}=80\mu\text{J}$ im nahen IR. Diese Verschiebung und Ausweitung der für MALDI geeigneten Laserpulsenergien ist im Einklang mit der These der zweiphotonischen Absorption der 800nm-Photonen durch die Matrix. Nachfolgend sollen diese Resultate nach beiden Modellvorstellungen interpretiert werden.

Das Lucky-Survivors-Modell erklärt die Erzeugung von Clustern während der Desorption/Ablation für die Ionisierung als essentiell [71]. Unterhalb einer Minimalenergie werden laut MD-Simulationen keine Cluster durch die Bestrahlung der MALDI-Probe emittiert. Dies scheint auch bei der Bestrahlung der MALDI-Probe mit fs-Laserpulsen der Fall zu sein, da auch hier ein E_{min} -Wert existiert. Eine höhere Laserpulsenergie führt dann zu einer Zunahme der Cluster-Emission während der Desorption/Ablation. Die Stärke der Desorption/Ablation ist von dem Grad der Absorption des Laserpulses durch die Matrix abhängig. Die Absorption von ultrakurzen Laserpulsen im IR scheint erheblich geringer aufgrund des höheren Energiebereiches. Dieser lässt sich aufgrund der nichtlinearen Absorption erklären. So bedarf es in diesem Falle auch einer höheren Pulsenergie für die gleiche Stärke der Desorption/Ablation. Eine stärkere Desorption/Ablation könnte zu einer größeren Anzahl von Clustern führen und somit zu einem höheren Analyt-Ionensignal (mehr Lucky Survivors). Falls die Energie der Laserpulse weiter zunimmt, könnten die Cluster an Größe und kinetischer Energie zunehmen. Die Teilchendichte in der MALDI-Wolke würde zurückgehen und die Wahrscheinlichkeit der Freisetzung protonierter Analytmoleküle könnte so gehemmt werden,

da die Cluster nicht mehr durch Stöße zerfallen.

Das Pooling-Modell erklärt ebenfalls den Anstieg des Analyt-Ionensignals mit zunehmender Pulsenergie. Für Pulsenergien, für welche das Analyt-Ionensignal ansteigt, kann eine stärkere Desorption/Ablation angenommen werden, welche mit einer Zunahme der primären Ionisierung der Matrix einhergeht. Das Ionensignal ist im UV nicht von der Pulsdauer abhängig. Daher kann angenommen werden, dass bei einer Bestrahlung der MALDI-Probe mit ns- und fs-Laserpulsen die selben Vorgänge ablaufen. Für Laserpulsenergien oberhalb von $E_{UV} \approx 3\mu\text{J}$ für Wellenlängen im UV und $E_{IR} \approx 20\mu\text{J}$ für eine Zentralwellenlänge von $\lambda_c=800\text{nm}$ nimmt das Analyt-Ionensignal wieder ab. Eine geringeren Dichte in der MALDI-Wolke würde diese Abnahme der Stoß-Rate, was einen Rückgang der sekundären Ionisation erklärt. Hierbei wird jedoch davon ausgegangen, dass die Anzahl der Teilchen unverändert bleibt. Eine weitere Erklärung ist die thermisch induzierte Fragmentierung des Analyten in der Gasphase (z.B. im TOF). Obgleich die Ionisation der Matrix zunimmt, können somit Veränderungen in der MALDI-Wolke dergestalt zu einem niedrigeren Analyt-Ionensignal führen.

12.4 Fazit

Die qualitative Übereinstimmung der Energieabhängigkeit des Analyt-Ionensignals bei Laserpulsen im UV als auch im nahen IR gibt Hinweise auf das Vorhandensein eines MALDI-Mechanismus nach der primären Ionisation (Pooling-Modell) beziehungsweise der Bildung von Clustern (Lucky-Survivors-Modell). Einphotonsiche- und zweiphotonische Absorption der Laserpulse durch die Matrix erzeugt (bei unterschiedlichen Pulsenergien) ein Analyt-Ionensignal gleicher Maximal-Intensität. Eine höhere Absorption von Laserpulsen der Wellenlänge $\lambda=337\text{nm}$ durch die Matrix führt zu einer höheren Ionisation. So scheint für die Intensität des Analyt-Ionensignales für MALDI-typische Pulsenergien lediglich der Absorptionskoeffizient der Matrixsubstanz relevant.

Kapitel 13

Kationisierung von Angiotensin II

13.1 Stand der Forschung

Im MALDI-Massenspektrum wird fast immer der einfach protonierte Analyt-Massenpeak ($[A+H]^+$) detektiert. Bei Vorhandensein von z.B. Alkali-Kationen (z.B. Na^+ , K^+) in der MALDI-Probe werden neben dem protonierten Analyt auch die entsprechenden kationisierten Analytpeaks $[A+Na]^+$ oder $[A+K]^+$ detektiert. Hierbei bedeutet der Terminus Kationisierung die Aggregation von Kationen (anstatt eines Protons) an das Analytmolekül. Die Quelle dieser zusätzlichen Kationen sind meist Verunreinigungen der MALDI-Probe. Diese zusätzlichen Ionensignale können nur in wenigen Fällen vollständig unterdrückt werden, und sind zuweilen in der Lage, die Analyse eines MALDI-Massenspektrums deutlich zu erschweren. Kompliziert sind beispielsweise MALDI-TOF-Analysen von DNA-Molekülen (jede der Phosphat-Gruppe kann kationisiert werden, was zu einer Schar von Massenpeaks führt) oder einer Analyse mehrerer Analytsubstanzen (ähnlicher Masse) in einer MALDI-Probe. Ein aktives Forschungsgebiet ist die Reduktion dieser zusätzlichen Massenpeaks (siehe z.B. [137]). Trotz intensiver Bemühungen ist es jedoch noch nicht gelungen, den Prozess der Kationisierung vollständig aufzuklären. Nach den gegenwärtigen Erkenntnissen findet die Kationisierung in

der MALDI-Wolke durch Stöße (von freien Kationen oder kationisierten Matrixmolekülen mit Analytmolekülen) statt [138, 139, 140]. Das Verständnis der Kationisierung könnte zum einen zur Aufklärung des MALDI-Prozesses beitragen - wie auch Wege aufzeigen, um die Intensität zusätzlicher Massenpeaks wie $[A+Na]^+$ oder $[A+K]^+$ zu minimieren.

In diesem Kapitel wird der Prozess der Kationisierung von Angiotensin II mittels unterschiedlicher Lasertypen untersucht. Für diese Untersuchungen wird der MALDI-Probe eine kleine Menge Kaliumchlorid beigemischt (siehe Kap. 8 für Einzelheiten). Kalium-Kationen eignen sich für diese Experimente aus zwei Gründen:

(i) MALDI-Proben sind oft mit geringen Mengen von Natriumsalzen verunreinigt. Kalium-Kationen „verdrängen“ das $[A+Na]^+$ -Ionensignal aus dem Massenspektrum, falls die Konzentration von K^+ in der Probe wesentlich höher als die Verunreinigung durch Na^+ ist. Dieser Effekt ist für Rubidium oder Cäsium noch stärker ausgeprägt. Darüber hinaus scheinen sich K^+ -Kationen stärker an Angiotensin II als Natrium- oder Lithium-Kationen zu binden.

(ii) Die Schwankung der Analyt-Ionensignale und die Verhältnisse der einzelnen Ionensignale wie $[A+K]^+$ zu $[A+H]^+$ hat sich als die geringste von allen getesteten Alkalimetall-Kationen (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) herausgestellt. Daher werden hier die Resultate von Kalium-adaptiertem Angiotensin II gezeigt. Diese geringe Schwankung wurde auch bei Experimenten zur Kohärenten Kontrolle (siehe Kap. 14) ausgenutzt und in diesem Rahmen noch einmal (indirekt) bestätigt.

Für diese Untersuchungen wurden der MALDI-Probe zusätzlich etwa 1,5 μ l KCl-Lösung (etwa 50 μ g/ml) zugegeben. Die exakte Konzentration der Kalium-Kationen in der MALDI-Probe besitzt bei diesen Experimenten nur geringen qualitativen Einfluss, wie experimentell überprüft wurde. Der Grund könnte die deutlich höheren molaren Konzentration der K^+ -Kationen im Vergleich zum Analyten sein. Einen erheblich höheren Einfluss könnte hierbei der verwendeten Matrixsubstanz zukommen. Als Matrix für die vorgestellten

Experimente diente die beschriebene Kombination aus CHCA und SA. Die Pulsenergie wurde direkt vor dem Eingang in die Vakuum-Kammer gemessen. Unterschiedliche Pulsdauern wurden durch eine Phasen-Modulation (linearer Chirp) mit einem Flüssigkristall-Modulator (zentral in einem 4f-Aufbau) erzeugt. Die Pulsdauern wurden mit einem Autokorrelator gemessen. Alle Messungen wurden einige Male wiederholt, um die auftretenden Schwankungen auszugleichen.

13.2 Kationisierung als Funktion der Pulsenergie

Zunächst wird der Einfluss der Pulsenergie auf die Intensität der protonierten und kationisierten Massenpeaks untersucht. Hierzu wurde die MALDI-Probe mit Laserpulsen unterschiedlicher Pulsenergie bestrahlt und die resultierenden MALDI-Massenspektren ausgewertet. Als Probenpräparation wurde die Dried-Droplet-Methode (siehe Kap. 8) angewandt. Die Laserpulsenergie wurde mit dem variablen Attenuator eingestellt.

In den Abb. 13.1 bis 13.3 sind die Analyt-Ionensignale von protoniertem Angiotensin II ($[\text{Ang}+\text{H}]^+$) und die drei Kationisierungsstufen ($[\text{Ang}+\text{K}]^+$, $[\text{Ang}+2\text{K}-\text{H}]^+$, $[\text{Ang}+3\text{K}-2\text{H}]^+$) als Funktion der Laserpulsenergie für ns-Laserpulse und fs-Laserpulse der Zentralwellenlänge von $\lambda_c=400\text{nm}$ und $\lambda_c=800\text{nm}$ gezeigt. Die Abbildungen zeigen außerdem die jeweiligen Kationisierungstendenzen $\frac{[\text{Ang}+\text{K}]^+}{[\text{Ang}+\text{H}]^+}$, $\frac{[\text{Ang}+2\text{K}-\text{H}]^+}{[\text{Ang}+\text{H}]^+}$ und $\frac{[\text{Ang}+3\text{K}-2\text{H}]^+}{[\text{Ang}+\text{H}]^+}$. Diese Quotienten dienen als Indikator für die Rate der Kationisierung.

Sowohl für ns- als auch für fs-Laserpulse ist das qualitative Verhalten der Kationisierung gleich: Alle vier Massenpeaks steigen nach Überschreitung einer Minimal-Energie (E_{min}) zunächst stark an. Bei zunehmender Pulsenergie verlangsamt sich die Anstiegsgeschwindigkeit bis zu einer maximalen Peakhöhe, welche für protonierte und die jeweiligen Kalium-adaptierten Analyt-Massenpeak teilweise unterschiedlich ausfällt. Für hohe Pulsenergien ($6-10\mu\text{J}$ bei ns-Laserpulsen, $5-6\mu\text{J}$ bei fs-Laserpulsen im UV und bei etwa $30\mu\text{J}$ für fs-Laserpulse im nahen IR) erreicht die Kationisierungstendenz nach einem

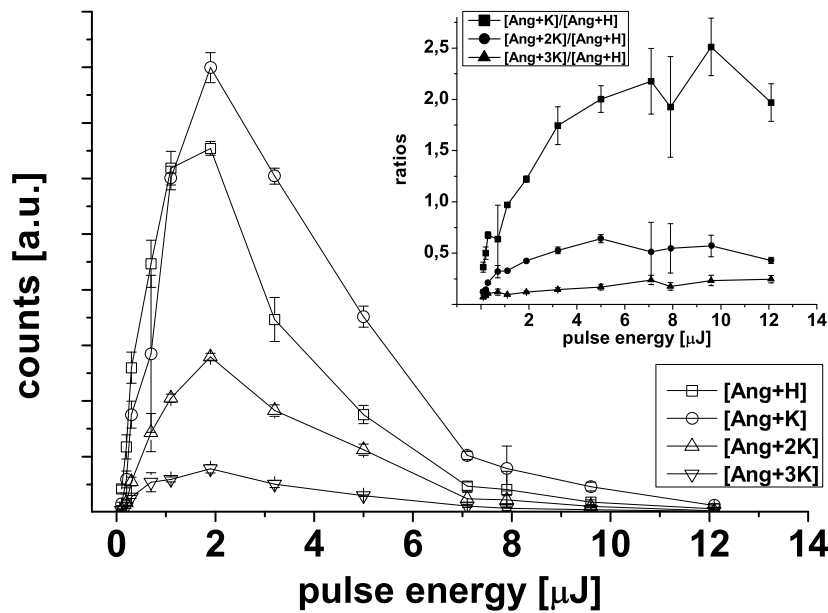


Abbildung 13.1: Die Höhe der protonierten und kationisierten Analytpeaks als Funktion der Laserpulsenergie von ns-Laserpulsen der Wellenlänge $\lambda=337$ nm. Nach einem starken Anstieg im Bereich von $0,2\mu\text{J}$ bis zu ca. $2\mu\text{J}$ nimmt die Höhe eines jeden Analyt-Massenpeaks wieder ab und ist für Pulsenergien oberhalb von $15\mu\text{J}$ nicht mehr im MALDI-Massenspektrum sichtbar. Oben rechts werden die einzelnen Kationisierungstendenzen $[\text{Ang}+n\text{K}-(n-1)\text{H}]/[\text{Ang}+\text{H}]$ ($n=1\dots 3$) für einfach-, zweifach-, und dreifach kationisiertes Angiotensin II gezeigt. Die Adaption von zwei und drei Kalium-Kationen ist deutlich geringer als die einfache Kationisierung von Angiotensin II. In der Abbildung werden die abgespaltenen Protonen in den Bezeichnungen nicht gesondert angegeben.

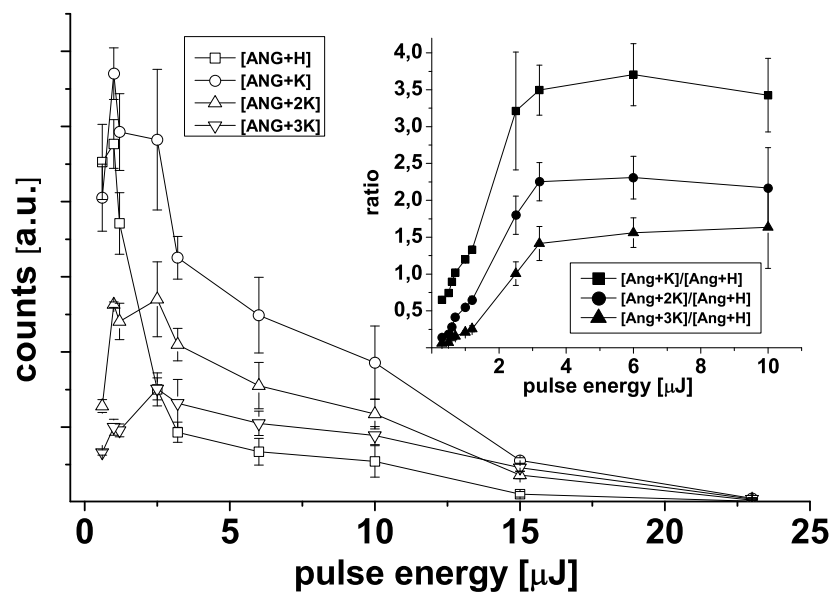


Abbildung 13.2: Die Höhe der protonierten und kationisierten Analyt-peaks als Funktion der Laserpulsenergie von fs-Laserpuls der Zentralwellenlänge $\lambda_c=400$ nm. Nach einem starken Anstieg im Bereich von $0,2\mu\text{J}$ bis zu ca. $2\mu\text{J}$ nimmt die Höhe eines jeden Analyt-Massenpeaks wieder ab und ist für Pulsenergien über $25\mu\text{J}$ nicht mehr im Massenspektrum sichtbar. Oben rechts sind die einzelnen Kationisierungstendenzen $[\text{Ang}+n\text{K}-(n-1)\text{H}]/[\text{Ang}+\text{H}]$ für einfach ($n=1$), zweifach ($n=2$), und dreifach ($n=3$) kationisiertes Angiotensin II gezeigt. Die Kationisierungstendenz steigt für alle $n=1\dots 3$ erst etwa linear mit der Pulsenergie an. Ab etwa $3-4\mu\text{J}$ sind die Verhältnisse der protonierten- und kationisierten Analyt-Ionensignale nahezu konstant. In den Bezeichnungen werden die abgespaltenen Protonen nicht gesondert angegeben.

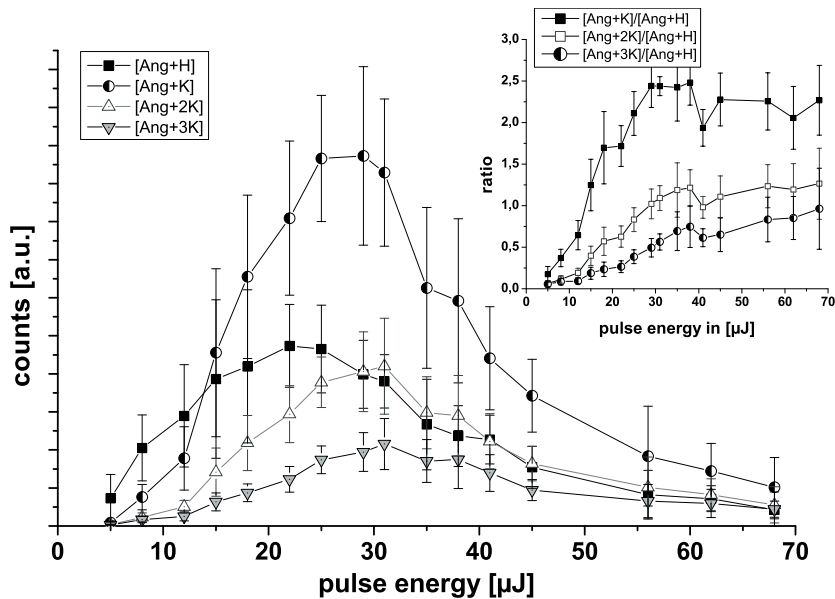


Abbildung 13.3: Die Höhe der protonierten und kationisierten Analytpeaks als Funktion der Laserpulsenergie von fs-Laserpuls der Zentralwellenlänge $\lambda_c=800$ nm. Nach einem starken Anstieg des Analyt-Ionensignals im Bereich von $5\mu\text{J}$ bis zu etwa $25\mu\text{J}$ nimmt die Höhe eines jeden Analyt-Massenpeaks wieder ab und ist für Pulsenergien über $90\mu\text{J}$ nicht mehr im Massenspektrum sichtbar. Oben rechts zeigt die einzelnen Kationisierungstendenzen für einfach-, zweifach-, und dreifach kationisiertes Angiotensin II. Im Falle von fs-Laserpulsen im IR steigen die Analytpeak-Verhältnisse langsam an und sind für Laserpulsenergien oberhalb einer Laserpulsenergie von $30\text{-}35\mu\text{J}$ etwa konstant. In den Bezeichnungen werden die abgespaltenen Protonen nicht gesondert angegeben.

deutlichen Anstieg ein Plateau. Dieses Plateau folgt aus dem gemeinsamen Rückgang der Analyt-Peakintensitäten für hohe Laserpulsenergien (ab ca. $3\mu\text{J}$ im UV und ab etwa $25\mu\text{J}$ im nahen IR). Für sehr hohe Laserpulsenergien (oberhalb $80\mu\text{J}$ im nahen IR) werden nahezu nur noch kationisierte Analyt-Moleküle detektiert, während das $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ -Ionensignal nicht mehr im MALDI-Massenspektrum zu sehen ist. Diese erhöhte Stabilität von kationisiertem Angiotensin II wird in Kap. 15 interpretiert.

13.3 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Abschnitt werden die in Abb. 13.1 bis 13.3 dargestellten Ergebnisse diskutiert und interpretiert. Maßgebliche Studien zur Kationisierung kommen zu dem Ergebnis, dass die Kationisierung in der MALDI-Wolke stattfindet, wie in der Einleitung geschildert. Dieser Ansatz soll auch in der nachfolgenden Diskussion zum Ausgangspunkt genommen werden.

13.3.1 Kationisierung bei ns-Laserpulsen

In Abb. 13.1 ist gezeigt, dass die doppelt und dreifach kationisierten Massenpeaks erheblich niedriger sind als diejenigen Massenpeaks, bei denen kein Proton vom Analyten durch Kationisierung abgespalten wird. Dieses Verhalten ist auch in der Kationisierungstendenz sichtbar. Während die einfache Kationisierung $\frac{[\text{Ang}+\text{K}]^+}{[\text{Ang}+\text{H}]^+}$ ein Verhältnis von etwa 2 erreicht, bleiben die höheren Kationisierungstendenzen deutlich darunter: Die Tendenz zur zweifachen Kationisierung bei Abspaltung eines Protons erreicht etwa 0,5 und die dreifache Kationisierungstendenz einen Wert von 0,2. Die deutlich niedrigere Tendenz des Analyten, mehrfach kationisiert zu werden, ist mit der dafür notwendigen Abgabe eines (oder zwei) H^+ vom Analytmolekül zu erklären. Diese verminderte Tendenz, mehrere Kationen gleichzeitig zu adaptieren, spricht für die These, dass die Kationisierung in der Gasphase (MALDI-Wolke durch Stöße) induziert stattfindet, da mehrfache Stoßprozesse von Analytmolekülen mit kationisierten Matrixmolekülen oder freien Kationen unwahrscheinlicher ist.

13.3.2 Kationisierung bei fs-Laserpulsen im UV

Bei der Bestrahlung der Probe durch 60fs-Laserpulse ist die Kationisierungstendenz für einfache und mehrfache Adaption deutlich höher. Die Tendenz zur mehrfachen Adaption von Kationen bei gleichzeitiger Abgabe von einem (oder zwei) Proton(en) ist auch bei der Bestrahlung mit ultrakurzen Laserpulsen deutlich sichtbar (vgl. Abb. 13.2). Die einfache Kationisierung erreicht im Vergleich zu ns-Laserpulsen ein Verhältnis von über 3,5. Auch die mehrfache Kationisierung erreicht ein deutlich höheres Niveau bei gleichen Laserpulsenergien. Im Falle der zweifachen Kationisierung erreicht $\frac{[Ang+2K-H]^+}{[Ang+H]^+}$ einen Wert von etwa 2. Die Tendenz zur dreifachen Kationisierung erreicht etwa 1,5. Als Begründung könnte eine Änderung physikalischer Eigenschaften der MALDI-Wolke dienen.

13.3.3 Kationisierung bei fs-Laserpulsen im nahen IR

Bei einer Bestrahlung mit Laserpulsen einer Zentralwellenlänge von $\lambda_c=800\text{nm}$ ist die Peakintensität von $[Ang+H]^+$ nur bis etwa $E=12\mu\text{J}$ am höchsten. Für Pulsenergien oberhalb von $E=12\mu\text{J}$ ist das $[Ang+K]^+$ -Ionensignal am höchsten. Die Kationisierungstendenz für die einfache Kationisierung ($\frac{[Ang+K]^+}{[Ang+H]^+}$) beträgt maximal 2,5. Mehrfach-Kationisierung ist auch für Laserpulse im nahen IR deutlich schwächer ausgeprägt. $\frac{[Ang+2K-H]^+}{[Ang+H]^+}$ ist maximal 1,2 und die Tendenz zur dreifachen Kationisierung steigt bis auf 0,8 an. Im Vergleich zu Laserpulsen im UV ist die Plateaubildung für hohe Pulsenergien nicht so deutlich ausgeprägt. Insbesondere für Laserpulse im nahen IR ist zu beobachten, dass Alkali-adaptiertes Angiotensin II erheblich stabiler gegenüber Fragmentierung in der Gasphase erscheint.

13.4 Quantitative Analyse der Kationisierung

Hier soll eine quantitative Beschreibung der Kationisierung (Adaption eines K^+ -Kation an Angiotensin II) als Funktion der Laserpulsenergie und der La-

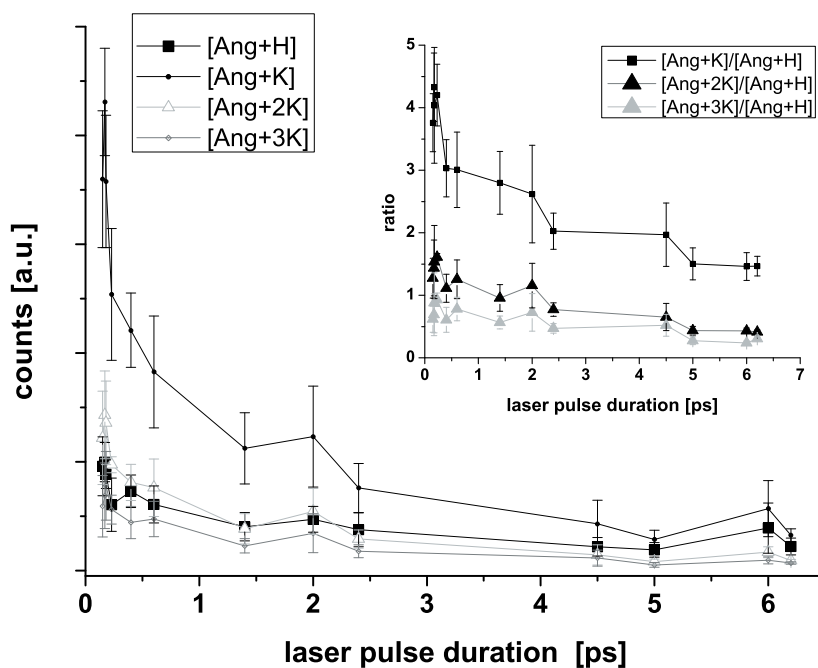


Abbildung 13.4: Die Abhängigkeit der Analyt-Ionensignale als Funktion der Pulsdauer für Laserpulse im nahen IR. Die Laserpulsenergie war konstant bei $E=55\mu\text{J}$. Das Ionensignal nimmt für höhere Werte der Pulsdauer ab. Die Signalintensität der kationisierten Spezies bleiben über den gesamten Bereich unterhalb der des protonierten Angiotensin II. Oben rechts ist die Kationisierungstendenz dargestellt, worin sich dieses Verhältnis auch wieder spiegelt. In den Bezeichnungen werden die abgespaltenen Protonen nicht gesondert angegeben.

serpulsdauer für ultrakurze Laserpulse im nahen IR durchgeführt werden. Da viele einzelne Faktoren in die Kationisierung mit einspielen, wird ein Potenzansatz gewählt, um der Unkenntnis der ablaufenden Prozesse Rechnung zu tragen. Für diese Beschreibung wird daher die Pulsenergieabhängigkeit und Pulsdauerabhängigkeit betrachtet. Das Analyt-Ionensignal steigt mit der Pulsenergie stark an. Für ultrakurze Laserpulse im nahen IR nimmt das Analyt-Ionensignal mit zunehmender Pulsdauer ab. Die zweiphotonische Absorption des 800nm-Laserpulses durch die Matrix scheint einen großen Einfluss auf das Analyt-Ionensignal und somit indirekt auf die Kationisierungstendenz zu besitzen. Es wird daher $[\text{Ang}+\text{X}]^+ \propto E^{a_X}$ und $[\text{Ang}+\text{X}]^+ \propto \tau^{b_X}$ ($X=\text{K},\text{H}$) angenommen. Das Analyt-Ionensignal steigt mit der Pulsenergie stark an. Die Exponenten werden hierbei durch eine χ^2 -Minimierung bestimmt. Dieser Ansatz wird gewählt, da es bislang noch keine Modellvorstellung für die Kationisierung während MALDI gibt. Außerdem sind die vorhandenen Studien über den Anstieg des Analyt-Ionensignals als Funktion der Pulsenergie von dieser Form publiziert worden (siehe Kap. 2).

Um die Abhängigkeit der Kationisierung von den Laserpulsparametern darzustellen, wird für den protonierten und den kationisierten Angiotensin II-Massenpeak eine Abhängigkeit der Form:

$$[\text{Ang} + \text{X}]^+ \propto I^n \cdot \tau^m, X = \text{H}^+, \text{K}^+$$

angenommen, wobei X für H oder K steht. Da die Intensität des Laserpulses $I=E/(\tau \cdot A)$ definiert ist, ergibt sich für eine konstante bestrahlte Fläche A:

$$[\text{Ang} + \text{X}]^+ \propto E^n \cdot \tau^{m-n}, X = \text{H}^+, \text{K}^+$$

Um die einzelnen Fit-Parameter den Prozessen zuordnen zu können, wird für die gemessenen Analyt-Peakintensitäten definiert:

$$m := a_X$$

$$m - n := b_X$$

und für die Kationisierungstendenz $\frac{[\text{Ang}+\text{K}]^+}{[\text{Ang}+\text{H}]^+}$

$$m := A$$

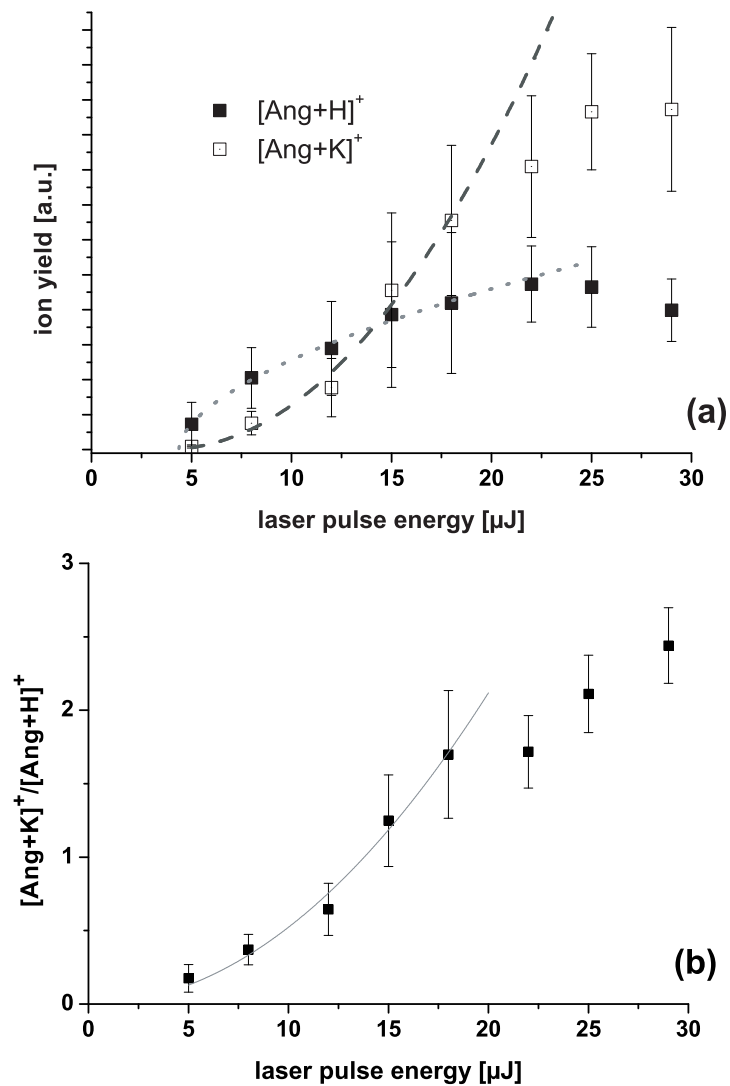


Abbildung 13.5: **Die Kationisierung als Funktion der Pulsenergie.** Im oberen Teil (a) sind die Peak-Intensitäten des protonierten (■) und des einfach K⁺-adaptierten Angiotensin II (□) gezeigt. Die Fit-Kurve beachtet Pulsenergien unterhalb von $E=20\mu\text{J}$. So wird der Einfluss der Fragmentierung minimiert. Die Fit-Kurven zeigen $[\text{Ang}+\text{X}]^+ \propto E^a$. (b) Im unteren Teil ist die gemessene und simulierte Kationisierungstendenz $[\text{Ang}+\text{K}]^+ / [\text{Ang}+\text{H}]^+$ zu sehen. Die Fit-Kurve für die Kationisierungstendenz besitzt die Form $[\text{Ang}+\text{K}]^+ / [\text{Ang}+\text{H}]^+ \propto E^A$, wie im Text beschrieben. Die Pulsdauer betrug konstant etwa $\tau=60\text{fs}$.

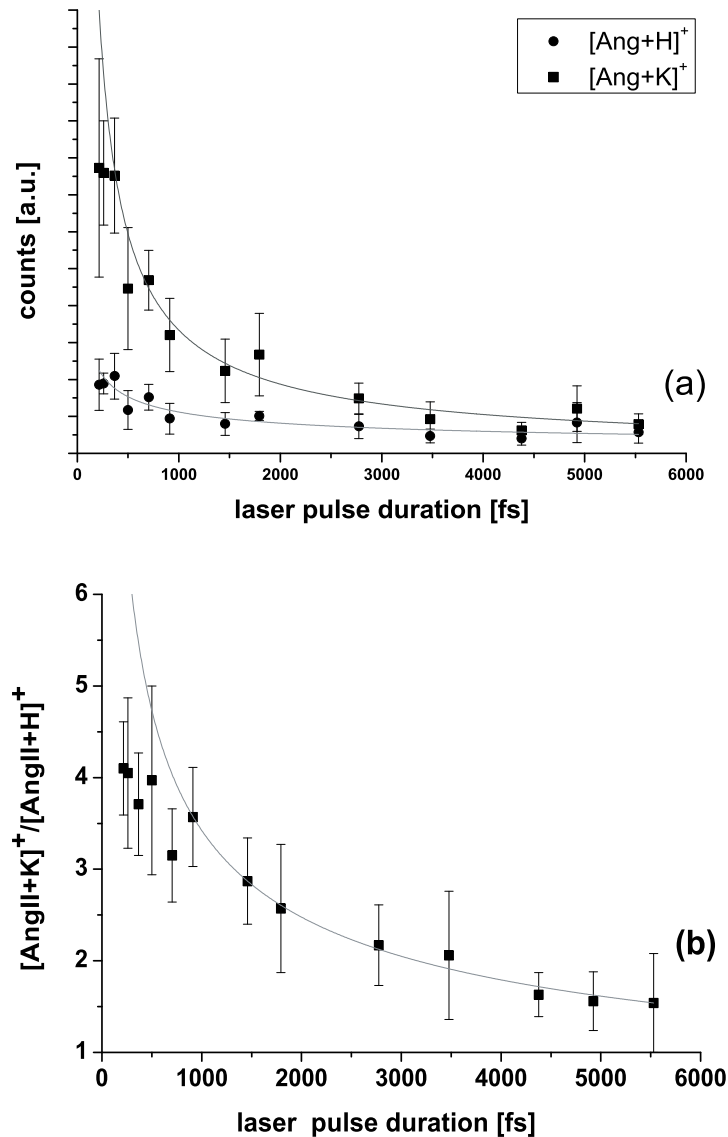


Abbildung 13.6: **Die Kationisierung als Funktion der Pulsdauer.** Im oberen Teil werden die Peakintensitäten als Funktion der Pulsdauer gezeigt. Die durchgezogenen Linien zeigen die Fit-Kurven für $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ und $[\text{Ang}+\text{K}]^+$. Die Pulsennergie war konstant bei $E=55\mu\text{J}$. Der untere Teil zeigt die gemessenen Kationisierungstendenzen und die Fit-Kurve. Unterhalb von $\tau=1\text{ps}$ ist das Verhältnis nahezu konstant. Dies deutet auf eine stärkere Fragmentierung von $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ hin. Für höhere Pulsdauern scheint die Fragmentierung kein relevanter Faktor mehr zu sein. Die durchgezogenen Linien repräsentieren $[\text{Ang}+\text{X}]^+ \propto \tau^a$ und $[\text{Ang}+\text{K}]^+ / [\text{Ang}+\text{H}]^+ \propto \tau^B$, wie im Text beschrieben

$$m - n := B$$

Ein Vergleich mit den experimentellen Resultaten ergibt eine Abhängigkeit der Signalintensität $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ von der Pulsenergie: $a_H=0,57\pm0,2$ und die von $[\text{Ang}+\text{K}]^+$: $a_K=2,05\pm0,9$. Diese Werte gelten für eine Pulsdauer von etwa $\tau=60\dots70\text{fs}$. Die Fit-Kurven sind in Abb. 13.5 gezeigt. Für eine konstante Pulsenergie von $E=55\mu\text{J}$ gilt dann: $b_H=-0,45\pm0,17$ und $b_K=-0,85\pm0,1$. Dies führt zu einem Parameter $m_H=0,12\pm0,25$ und $m_K=1,2\pm0,9$ (siehe Abb. 13.6). Die Fit-Angleichung der Kationisierungstendenz liefert $A=2\pm0,2$ und $B=0,47\pm0,1$. Dies gilt für Pulsdauern $\tau>1\text{ps}$ und einer Pulsenergie $E<20\mu\text{J}$. Diese Ergebnisse lassen sich zusammenfassen, als:

$$\frac{[\text{Ang} + \text{K}]^+}{[\text{Ang} + \text{H}]^+} \propto \frac{E^{2\pm0,2}}{\tau^{0,47\pm0,1}}$$

13.5 Fazit

Die Kationisierung von Angiotensin II ist von der Pulsenergie abhängig. Bei der Bestrahlung der MALDI-Probe mit ultrakurzen Laserpulsen im nahen IR ist die Kationisierung zudem von der Pulsenergie abhängig. Für Kalium steigt die Kationisierungstendenz steigt etwa quadratisch mit der Pulsenergie an und nimmt für ansteigende Pulsdauern mit $\approx 1/\sqrt{\tau}$ ab. Dieses Verhalten gilt nur für moderate Pulsintensitäten. Für hohe Pulsintensitäten verändern weitere Einflüsse wie Fragmentierung den ermittelten Zusammenhang.

Die Abhängigkeit widerspricht der These von *pre-formed ions* in der MALDI-Probe, welches im Lucky-Survivors-Modell vorgeschlagen wird. Die anteilige Freisetzung von protonierten und kationisierten Angiotensin II Molekülen sollte in diesem Modell nicht in diesem starken Maße von der Parametern des Laserpulses abhängen. Dagegen wird These unterstützt, dass die Kationisierung der Analytmoleküle in der MALDI-Wolke nach der Desorption/Ablation erfolgt. Die Einflüsse der Pulsenergie/Pulsenergie auf die Zustände in der MALDI-Wolke scheinen die Kationisierung der Analytmoleküle stark zu beeinflussen. Zudem steigt durch die Adaption von Kalium-Kationen an das Angiotensin II die Stabilität des Moleküls. Für höhere Laserpulsenergien verändert diese Steigerung der Stabilität zusätzlich die Abhängigkeit

der Kationisierung von den Laserpuls-Parametern. Die gemessenen Resultate können zur Überprüfung einer theoretischen Untersuchung der Kationisierung herangezogen werden.

Kapitel 14

Kohärente Kontrolle der Kationisierung

14.1 Stand der Forschung

Die Untersuchung von quantenmechanischen Systemen mit der Methode der kohärenten Kontrolle konnte insbesondere für molekulare Systeme in der Gasphase Erfolge vorweisen. Beispielsweise konnten Fragmentierungen und Ionisierungen mit Hilfe optimaler Laserpuls-Formen erklärt werden (siehe z.B. [141]). Anwendungen auf Systeme in kondensierter Phase und einige viel versprechende Anwendungen auf biologisch relevante Systeme werden in [142] zusammengefasst. In dieser Arbeit wird die Methode der kohärenten Kontrolle erstmalig auf den MALDI-Prozess angewandt.

Dieser Arbeit ist das Ziel gesetzt, Fortschritte im Verständnis des MALDI-Prozesses zu erreichen. Der MALDI-Prozess besteht aus mehreren, zum Teil zeitlich überlappenden Prozessen. Bis heute sind zwar einzelne Teilaspekte experimentell weitgehend untersucht, das Zusammenspiel der einzelnen Prozesse zur Ionisation des Analyten ist dagegen noch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen über die Desorption/Ablation durch Variation verschiedener Laserpuls-Parameter wie Pulsenergie (Fluenz), Pulslänge oder Wellenlänge wurden beschrieben. Die Ionisierung der Matrixmoleküle nach der Absorption der Laserpulse kann sehr gut durch das Pooling-Modell beschrieben

werden (siehe Kap. 2 und Kap 11).

Bei einer Bestrahlung der MALDI-Probe mit Laserpulsen im UV einer konstanten Pulsenergie hängt die Höhe des Analyt-Ionensignals nicht nachweisbar von der Pulsdauer der Laserpulse ab. Eine Veränderung der Wellenlänge der Laserpulse führt jedoch zu unterschiedlichen Analyt-Ionensignalen für die gleiche Matrix. Falls die Matrix für die bestrahlte Wellenlänge eine hohe Absorption zeigt, resultiert ein hohes Analyt-Ionensignal [35, 44] und umgekehrt.

In diesem Kapitel soll die Anwendung der kohärenten Kontrolle auf den MALDI-Prozess beschrieben werden. Experimentell wurde die Kationisierung von Angiotensin II optimiert. Für diese Optimierung wurden fs-Laserpulse der Zentralwellenlänge von $\lambda_c=800\text{nm}$ in ihrer Phase geformt. MALDI mit Laserpulsen im UV konnte dagegen nicht untersucht werden, da eine Formung von ultrakurzen Laserpulsen mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nur oberhalb etwa $\lambda_{min}\approx 450\text{nm}$ möglich ist. Sonst würde der Modulator (SLM) (durch Absorption der Laserpulse durch die Flüssigkristalle) beschädigt. Dieses Kapitel beginnt mit einer Analyse der Schwankung des Analyt-Ionensignals. Danach wird der experimentelle Aufbau und die Durchführung der Optimierungen beschrieben. Mit der Darstellung der Ergebnisse und einer Diskussion schießt das Kapitel ab.

14.2 Schwankung des Analyt-Ionensignals

Im Rahmen der kohärenten Kontrolle ist eine Bestrahlung der MALDI-Probe mit einer großen Zahl von Laserpulsen unerlässlich. Eine MALDI-Probe emittiert, abhängig vom Ort der Bestrahlung ein unterschiedlich hohes Analyt-Ionensignal. Um diese Schwankung auszugleichen wird das Ionensignal für ein MALDI-Massenspektrum über mehrere Laserpulse summiert. Je höher die Zahl der Laserpulse pro Massenspektrum, desto geringer ist die Schwankung des Analyt-Ionensignals. Eine MALDI-Probe besitzt jedoch nur eine endliche Fläche und kann während der Optimierung nur schwer gewechselt werden. Daher wird zunächst untersucht, von wie vielen Laserpulsen das

Analyt-Ionensignal addiert werden muss, um ein möglichst konstantes Ionensignal zu erhalten. Daher wurde die Schwankung des Ionensignals zuerst in Abhängigkeit von der Anzahl der addierten Einzelmassenspektren (MALDI-Massenspektrum eines Laserpulses) analysiert. Für diese Messungen wurde die MALDI-Probe mit der modifizierten Double-Layer-Methode präpariert. Für ns-Laserpulse ist in Abb. 14.1 die relative Schwankung des $[\text{Ang-H}]^+$ -Ionensignals (Standardabweichung/Ionensignal) als Funktion der Anzahl der zur Bestrahlung verwendeten Laserpulsen gezeigt. Die relative Schwankung des Analyt-Ionensignals nimmt bei einer Addition von bis zu 30 Laserpulsen stark ab. Danach ist die Schwankung nahezu konstant (bei etwa 18%) und hängt vor allem von der verwendeten MALDI-Probe ab.

Bei der Bestrahlung der MALDI-Probe durch fs-Laserpulsen ist die Schwankung des Analyt-Ionensignals von Messung zu Messung erheblich höher. Zudem nimmt die Schwankung des Analyt-Ionensignals nur langsam mit der Anzahl der addierten Einzel-Massenspektren (Laserpulse) ab. So ergibt die Schwankung des Analyt-Ionensignals ($[\text{Ang+H}]^+$) nach einer Addition des Ionensignals für etwa 20-40 Laserpulse etwa 50%. Eine direkte Optimierung des Analyt-Ionensignals erscheint somit nicht durchführbar. Daher wird die Kationisierungstendenz ($\frac{[\text{Ang+K}]^+}{[\text{Ang+H}]^+}$) optimiert. Die Schwankung der Kationisierung ist etwas geringer, weil sich Schwankungen durch „Hot-Spots“ durch die Verhältnisbildung teilweise ausgleichen. So konnte für einige MALDI-Proben die Optimierung durchgeführt werden. Abb. 14.1 (und Abb. 14.2) zeigt, dass eine Addition von 20-40 Laserpulsen zur Berechnung der Fitness am sinnvollsten erscheint. Für diese Anzahl wird eine relative Schwankung von ca. 35% (und zum Teil darunter) erreicht. Der leichte Anstieg entsteht durch die Bedienung des MALDI-TOF und tritt während der Optimierung nicht auf. Ungeachtet dieser Untersuchungen ist die Höhe der Schwankung stark von der jeweiligen Probe abhängig. Die Schwankung ist der entscheidende Faktor für die Konvergenz der Optimierung.

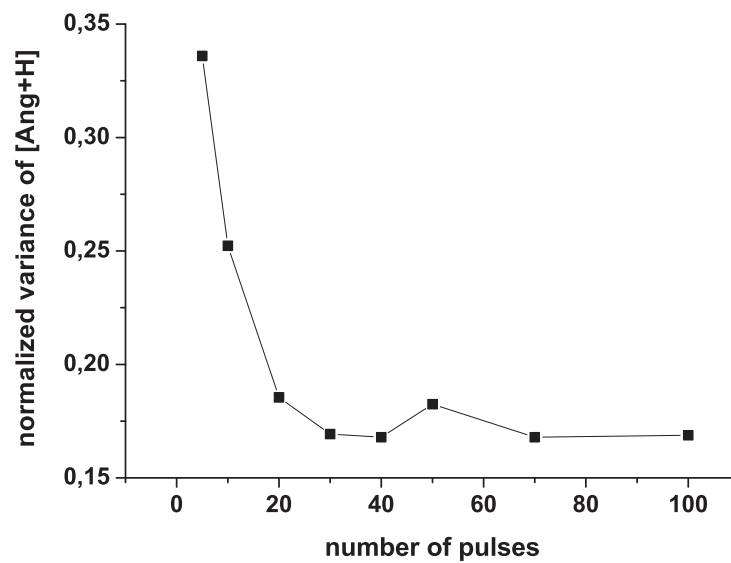


Abbildung 14.1: Normierte Standardabweichung von $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ als Funktion der Anzahl der addierten Laserpulse pro Massenspektrum. Für ns-Laserpulse ist eine kontinuierliche Verringerung des Rauschens mit zunehmender Anzahl der addierten Ionesignale pro Laserpuls zu beobachten. Die weitere Reduktion des $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ -Signals für eine lange Bestrahlungsdauer ist bei einem kontinuierlichen Wechsel des bestrahlten Punktes gering.

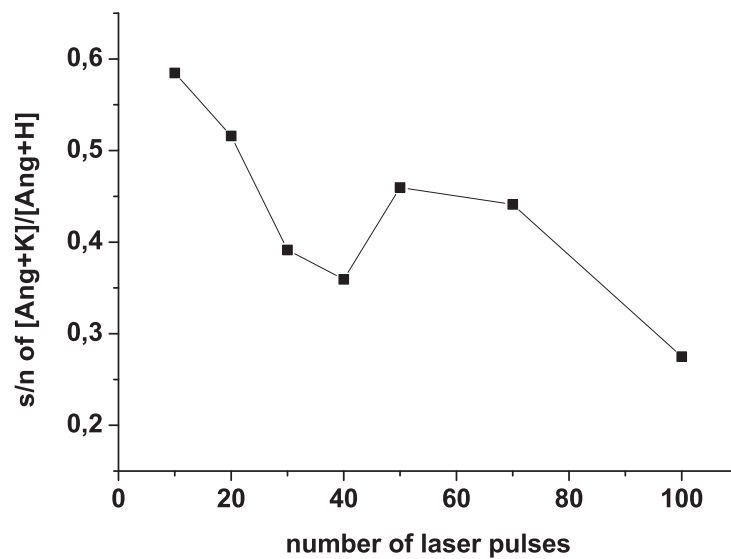


Abbildung 14.2: **Standardabweichung des Verhältnisses $[\text{Ang}+\text{K}]^+ / [\text{Ang}+\text{H}]^+$ als Funktion der Laserpulse pro Massenspektrum.** Diese Messung wurde mit 60fs-Laserpulsen der Pulsenergie von ca. $30\mu\text{J}$ durchgeführt. Deutlich ist ein leichter Rückgang der Signal- Ungenauigkeiten bei Massenspektren zu sehen, bei denen das Ionensignal von 30 oder 40 Laserpulsen addiert wurde. Der Anstieg der Schwankung nach 40 Laserpulsen ist ein technisches Problem der Bedienung und tritt nur für Messungen mit wenigen Laserpulsen auf.

14.3 Die Anwendung auf die Kationisierung

In diesem Abschnitt wird die experimentelle Realisierung der Optimierungsschleife (vergl. Abb. 14.3) dargestellt. Dabei wird zunächst die Modifikationen in der Datenaquisition beschrieben. Anschließend wird der Vorgang der Optimierung selbst beschrieben.

14.4 Der experimentelle Aufbau der Optimierungsschleife

Die detektierten Ionen werden im MCP-Detektor in Spannungssignale umgewandelt und durch ein Oszilloskop digitalisiert. Die Übertragung der Messdaten vom Oszilloskop zur SUN-Workstation (WS) erfolgt über eine Ethernet-Verbindung (RJ45). Durch einen Hub konnte das Netzwerksignal zusätzlich auf einen weiteren Personalcomputer (PC) übertragen werden. Ein LabView-Programm analysiert den Datenfluss zwischen dem Oszilloskop und der Workstation. Die Meßdaten werden dabei zusätzlich auf den PC kopiert. So ist es möglich, die Daten gleichzeitig von dem Programm-Paket XACQ (auf der WS) und auf dem PC zu analysieren. Auf dem PC werden die Ionensignale gleichzeitig über mehrere m/z -Bereiche (z.B. $m/z \in [1045, 1050]$ für $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ oder $m/z \in [1084, 1090]$ für $[\text{Ang}+\text{K}]^+$) integriert. Diese Integration wird über das Ionensignal von 20-40 Laserpulsen durchgeführt. So kann die Kationisierung als Fitness aus dem Verhältnis beider Analyt-Ionensignale ermittelt werden. Diese Fitness-Funktion dient dem Evolutionären Algorithmus als Eingangssignal zur Bewertung der Laserpulse (Individuen). Der PC steuert via USB den Modulator (SLM). Dieser verändert die quadratische Phase der Laserpulse. Diese geformten Laserpulse bestrahlen die MALDI-Probe und erzeugen das Ionensignal. So ist die Schleife für die kohärente Kontrolle geschlossen, wie Abb. 14.3 illustriert.

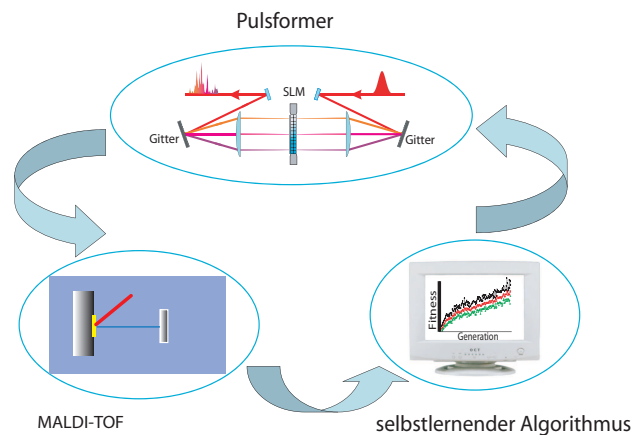


Abbildung 14.3: **Schematische Darstellung der Rückkopplungsschleife.** Die Schleife bestehend aus dem SLM, zentriert im Pulsformer (oben), der den Laserpuls formt. Dieser Laserpuls bestrahlt die MALDI-Probe (links). Aus dem Massenspektrum wird die Fitness berechnet. Diese Fitness bildet den Eingang des Evolutionären (selbstlernenden) Algorithmus (rechts). Dieser Algorithmus erzeugt eine Pulsform und sendet diese Information zum SLM. Somit ist die Schleife geschlossen.

14.5 Durchführung der kohärenten Kontrolle

Als Probe wurde Angiotensin II zusammen mit Kaliumchlorid verwendet. Die Proben werden mit der modifizierten Double-Layer-Methode (siehe Kap. 8) vorbereitet. Ein Vorteil dieser aufwendigen Probenpräparation ist die höhere Dicke der Probenschicht. Diese erhöhte Schichtdicke erlaubt eine längere Bestrahlung der MALDI-Probe ohne die Probe zu wechseln und so die Durchführung von mehr Generationen. Da die Schwankung und das absolute Ionensignal für eine längere Bestrahlung von Probe zu Probe unterschiedlich war, wurde eine Vielzahl von Optimierungen durchgeführt. Viele Optimierungsversuche scheiterten aufgrund einer zu starken Schwankung des Analyt-Ionensignals.

Das in einem LabView-Programm implementierte EA steuerte via USB-Schnittstelle den Optischen Modulator (SLM). Der SLM formte die Laserpulse (Individuen). Mit diesen geformten Laserpulsen wurde die MALDI-Probe bestrahlt und die entstehenden Ionen nach dem Durchlaufen des TOF detek-

tiert. Nach einer Addition von 20 - 50 Einzelspektren wird über die vorher manuell gewählten Massenpeaks (hier $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ und $[\text{Ang}+\text{K}]^+$) integriert. Danach wird die Fitness F ausgerechnet.

$$F = \frac{[\text{Ang} + \text{K}]^+}{[\text{Ang} + \text{H}]^+}$$

Diese Fitness bewertet nun die einzelnen Individuen (Pulsformen) bezüglich Ihrer Fähigkeit, eine möglichst hohe Kationisierung zu erreichen. Mit Hilfe des Pulsformers werden die Individuen (Laserpulse) geformt, bestrahlen die MALDI-Probe und erzeugten ein neues MALDI Massenspektrum - der Vorgang geht von Neuem los. Zur Anpassung des Mutationsparameters σ hat sich die $\frac{1}{5}$ -Regel als geeignet erwiesen. Die größte Schwierigkeit bei der kohärenten Kontrolle ist die Ionensignal-Stabilität während der Messung. Für eine Optimierung sollte das Signal-zu-Rausch Verhältnis von max. 10-15 Prozent nicht überschritten werden. Wie gezeigt, sind die Signal-zu-Rausch Verhältnisse vieler MALDI-Proben deutlich darüber. Diese erhöhte Ungenauigkeit hat zur Folge, dass die kohärente Kontrolle nur in eingeschränktem Maße zur Untersuchung angewendet werden kann. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass die Probe pro Messung begrenzt ist - so dass die Summen des Ionensignals von 40 Laserpulsen pro Individuum erlaubt, maximal 25 Generationen lang zu optimieren.

Eine gleichzeitige Optimierung der Phase und Amplitude scheiterte in der Regel an den hohen Schwankungen des Analyt-Ionensignals. Zudem ist das Ionensignal sowie die Kationisierungstendenz deutlich stärker von der Pulsenergie (Amplitude) als von der Phase (Pulsdauer) abhängig. Eine parametrische Optimierung des linearen Chirps bei konstanter Laserpulsenergie ergab einen schnellen Anstieg in der Fitness innerhalb 10-15 Generationen und ist daher für die Optimierung am besten geeignet.

Es wurden eine Vielzahl von parametrischen Optimierungen des linearen Chirps durchgeführt. Dabei konnte der lineare Chirp Werte zwischen $C_{min}=-120.000\text{fs}^2$ und $C_{max}=120.000\text{fs}^2$ annehmen. Die Pulsenergie betrug während der gesamten Messung etwa $E=50\mu\text{J}$. Aufgrund des (dimensional) eingeschränkten Such-Raumes Ω konnten einige Optimierungen der Kationi-

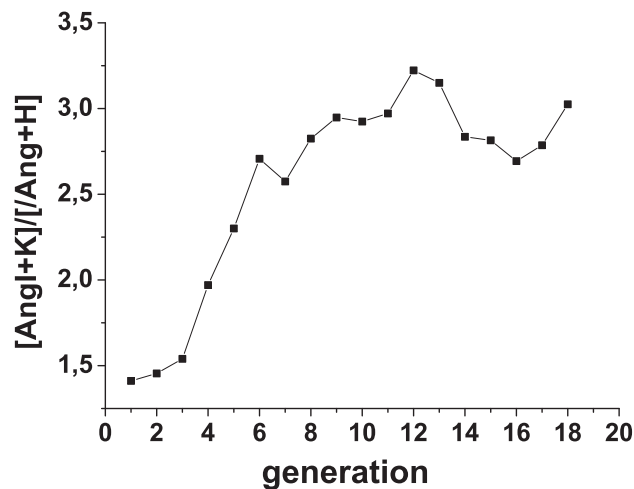


Abbildung 14.4: **Optimierungskurve der Kationisierung.** Verlauf der Kationisierungstendenz (Fitness) $F=[\text{Angl}+\text{K}]/[\text{Ang}+\text{H}]$ als Funktion der Generationen. Die anfängliche Pulsdauer betrug etwa $\tau_{anf}=3,5\text{ps}$, nach der Optimierung etwa $\tau_{end}=300\text{fs}$. Gezeigt wird eine parametrische Optimierung des linearen Chirps. Die Laserpulsenergie betrug konstant $E=50\mu\text{J}$.

sierung trotz der hohen Schwankung des Analyt-Signals durchgeführt werden. Ein gelungener Optimierungsverlauf ist in Abb. 14.4 dargestellt. Mittels der parametrischen Optimierung konnte gezeigt werden, dass nur der lineare Chirp (die Pulsdauer) und die Amplitude (Pulsenergie) einen Einfluss auf die Kationisierungstendenz besitzen. Komplexere Pulsformen zeigten keine Erhöhung der Kationisierung. Vor und nach den Optimierungen wurde die Repetitionsrate des fs-Lasers auf 1kHz eingestellt und die resultierende Pulslänge mit einem Autokorrelator bestimmt. Die Pulslänge vor den meisten Optimierungen war zwischen $\tau_{anf}=2\text{ps}$ und $\tau_{anf}=4\text{ps}$ und betrug nach dem Ende der Optimierung zwischen $\tau_{end}=200\text{fs}$ und $\tau_{end}=300\text{fs}$. Während der Optimierung konnte die Kationisierungstendenz um einen Faktor von zwei bis drei gesteigert werden.

14.6 Deutung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kohärente Kontrolle erstmalig auf die Kationisierung von Angiotensin II während MALDI direkt angewandt. Obgleich das Ergebnis schon in Kap. 13 dargestellt wurde, ist die Installation des experimentellen Aufbaus als Erfolg zu werten. Da bei MALDI mehrere Vorgänge zum Teil gleichzeitig ablaufen und sich einander beeinflussen, ist die Optimierung eines isolierten Vorganges mit erheblichen Schwierigkeiten behaftet. Die hohe Schwankung des Ionensignales erschwert die Durchführung zusätzlich. Durch weitere Optimierung der Phase wurde gezeigt, dass nur die Pulsdauer bei Laserpulsen (gemäß der hier durchgeführten Messungen) im nahen IR einen Einfluss auf die Kationisierung besitzt. Eine komplexere Pulsform erzeugte keine höhere Kationisierungstendenz. Eine freie Optimierung der Phase tendiert dazu, einen kurzen Puls zu finden. Dies kann als Indikator gewertet werden, dass die Kationisierung tatsächlich in der MALDI-Wolke stattfindet und nur von der absorbierten Pulsenergie abhängt.

Neuartige Modulatoren für Laserpulse im UV könnten genauere Kenntnisse über das Verhältnis von der Absorption und dem Analyt-Ionensignal erbringen. Zudem könnte die Methode der Kohärenten Kontrolle, angewandt z.B. auf Matrixcluster in der Gasphase, den Vorgang des Pooling erfolgreicher untersuchen. Entgegen dieser Hoffnung muss jedoch angeführt werden, dass MALDI-Messungen mit zwei fs-Laserpulsen der Zentralwellenlänge $\lambda_c=400\text{nm}$ bis zu einem zeitlichen Abstand von $\Delta t=2\text{ps}$ keine Veränderung des Analyt-Ionensignals zur Folge haben, wie in Abb. 14.5 gezeigt. Somit erscheint auch ein Pump-Probe ähnliches Schema für eine Untersuchung des MALDI-Prozesses nicht geeignet. Zweipuls-Messungen mit zeitlichen Abständen bis zu einigen Nanosekunden könnten zur Erklärung des MALDI-Prozesses beitragen. Die bis jetzt durchgeführten Zweipulsmessungen mit zeitlichen Abständen bis zu einigen Nanosekunden zeigten noch kein verlässliche und interpretierbares Ergebnis.

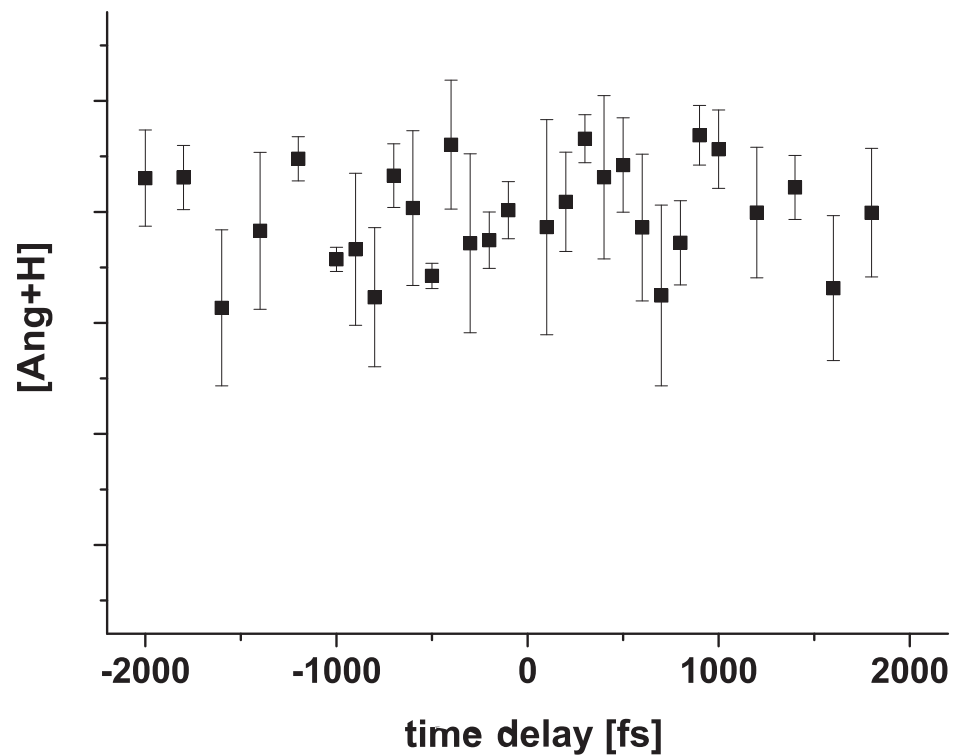


Abbildung 14.5: Das Analyt-Ionsensignal $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ als Funktion des zeitlichen Abstandes zweier fs-Laserpulse Die Pulsdauer beider Laserpulse betrug jeweils 60fs bei $\lambda_c=400\text{nm}$ und beide hatten etwa die gleiche Pulsenergie ($\approx 2\mu\text{J}$). Neben der starken Schwankung waren keine Veränderung des Analytsignals als Funktion der Zeit zwischen den Laserpulsen festzustellen. Bei dieser Messung durchlief einer der Laserpulse eine einstellbare Verzögerungsstrecke. Die Fehlerbalken entsprechen der Standard-Abweichung der fünf Messungen.

Kapitel 15

Die Bindungspositionen der Kationen an Angiotensin II

15.1 Stand der Forschung

Obgleich MALDI eine schonende Methode ist, Moleküle in die Gasphase zu transportieren, zerfallen bis zu 20% der (protonierten) Analytmoleküle auf dem Weg von der MALDI-Quelle zum Detektor. Diese Zerfälle werden als PSD (Post Source Decay) bezeichnet und wurden von Spengler et al. zum ersten Mal 1992 beschrieben [23, 24, 25]. Einfach protonierte Peptide zerfallen durch PSD unter Abgabe eines Elektrons in einfach geladene Bruchstücke. Die Fragmentierung kann nach dem sogenannten Roepstorff-Fohlmann-Schema beschrieben werden [143]. Der Anteil der zerfallenden Analytmoleküle ist wesentlich von der Wahl der Matrixsubstanz bestimmt. MALDI mit oder *cold matrices*, wie z.B. 2,5-DHB ergibt wenig Fragmentierung, während *hot matrices* wie CHCA die Fragmentierung des Analyten stärker fördern. Eine Faustregel besagt, dass in PSD-Massenspektren vorwiegend b- und y-Fragmente auftreten (siehe Abb. 15.1 für das Zerfallschema). Dabei wird die C-N-Bindung zwischen der -C=O und der -N-H Einheit der Peptidkette (Rückgrad) auf dem Weg zum Detektor gespalten. Die auftretenden Fragmente sind einfach positiv geladen. Es wurden schon ähnliche Studien publiziert, welche die Fragmentierung von Alkalimetall-adaptierten

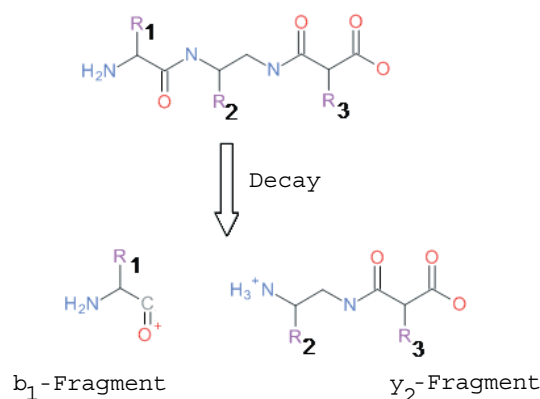


Abbildung 15.1: **Das Nomenklatur der Fragmentation von Peptiden nach Roepstorff und Fohlmann.** Hier wird ein Tripeptid ($\text{H}_2\text{N}-\text{R}_1-\text{R}_2-\text{R}_3-\text{COOH}$) zwischen $=\text{C}=\text{O}$ und $=\text{N}-\text{H}$ im Rückgrad des Peptides (zwischen R_1 und R_2) gespalten. Gezeigt ist das y_2 - und b_1 -Fragment. Nach der Spaltung ist eines der Fragmente (oder beide Fragmente) positiv geladen. Diese Fragmente treten vor allem in PSD-Massenspektren auf.

biologisch relevanten Moleküle untersuchen (z.B. [144]), aber die Kombination von PSD-Analyse und einer theoretischen Analyse der molekularen Geometrien wurde, nach Wissen des Autors noch nicht publiziert.

Durch eine PSD-Analyse mit einem MALDI-TOF ist es möglich, die primäre Struktur eines Peptids aufzuklären. Diese Methode ist gegenüber dem chemischen Verfahrens des Ednam-Abbaus [145] erheblich schneller und einfacher durchzuführen. Eine PSD-Analyse lässt sich auf verschiedene Arten durchführen. Bei der von B. Spengler eingeführten Methode wird das Reflektor-Potential im Reflektron-TOF schrittweise nach unten (z.B. von $U_{max} = 30\text{kV}$ bis $U_{min} = 1\text{kV}$ in 15%-Schritten) verändert. Für jede Potentialstufe wird ein MALDI-Massenspektrum aufgenommen und das Ensemble vom MALDI-Massenspektren danach zusammengefügt. Dabei werden vorwiegend die Fragmente einer zuvor eingestellten Muttermasse (*parents mass*) (in der Regel $[\text{A}+\text{H}]^+$) im PSD-Spektrum angezeigt. In heutiger Zeit werden für PSD-Analysen sogenannte Tandem-Massenspektrometer (TOF-TOF-MS) verwendet. Diese Methode wurde auch im Rahmen dieser Ar-

beit angewandt und wird daher im nachfolgenden Teil explizit beschrieben. Durch einen Vergleich der m/z -Differenzen der einzelnen Massenpeaks mit den Massen der Aminosäuren kann ein PSD-Spektrum durch Anwendung des Roepstorff-Fohlmann-Schemas analysiert werden und die Primärstruktur des Peptides ermittelt werden.

Nach Sullards und Reiter [146] gibt es verschiedene Möglichkeiten, welche Stellen des Angiotensin II protoniert werden können: 1. Der Arginin-Rest, 2. der N-Terminus des Peptides, oder 3. der Histidin-Rest. Für die einfache Protonierung von Angiotensin II wird der Arginin-Rest präferiert (siehe Abb. 15.2).

In diesem Kapitel wird die Kationisierung von Angiotensin II während MALDI dahingehend untersucht, an welcher Stelle des Moleküls die Kationen gebunden werden. Dazu wurden PSD-Analysen von protoniertem und einfach- sowie mehrfach kationisiertem-Angiotensin II durchgeführt. Als Muttermasse diente hierbei jeweils $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ ($m/z=1046,2$), $[\text{Ang}+\text{Cs}]^+$ (bei $m/z=1179,2$), $[\text{Ang}+2\text{Cs}-\text{H}]^+$ (bei $m/z=1312,2$) und $[\text{Ang}+3\text{Cs}-2\text{H}]^+$ (bei $m/z=1445,2$). Durch einen Vergleich, welche Peaks in den PSD-Spektren um die Masse des/der Cäsium-Kation(en) verschoben war, sollte Rückschluss auf die Bindungsposition(en) des Cs^+ -Kations beim Angiotensin II-Moleküls geben. Da jedoch nur y -Fragmente als kationisierte Spezies in den PSD-Massenspektren nachgewiesen wurden und ansonsten kaum Fragmente, ist die experimentelle Zuordnung nur indirekt möglich. Die Interpretation der PSD-Massenspektren wurden durch eine Berechnung der Molekülstrukturen von protoniertem und kationisiertem Angiotensin II unterstützt. Obgleich nur Ergebnisse semi-empirischer MD-Simulationen gezeigt werden, ist die Genauigkeit der Struktur ausreichend, um die auftretenden Ergebnisse zu interpretieren.

Die experimentelle und theoretische Untersuchung der Kationisierung von Angiotensin II ergab für die Alkalimetalle Natrium, Kalium, Rubidium und Cäsium ähnliche Ergebnisse. Hier werden die Ergebnisse von Cäsium-adaptiertem Angiotensin II vorgestellt, weil die Wechselwirkung von Cs^+ -Ionen und Angiotensin II am stärksten ausgeprägt war und Schwankungen

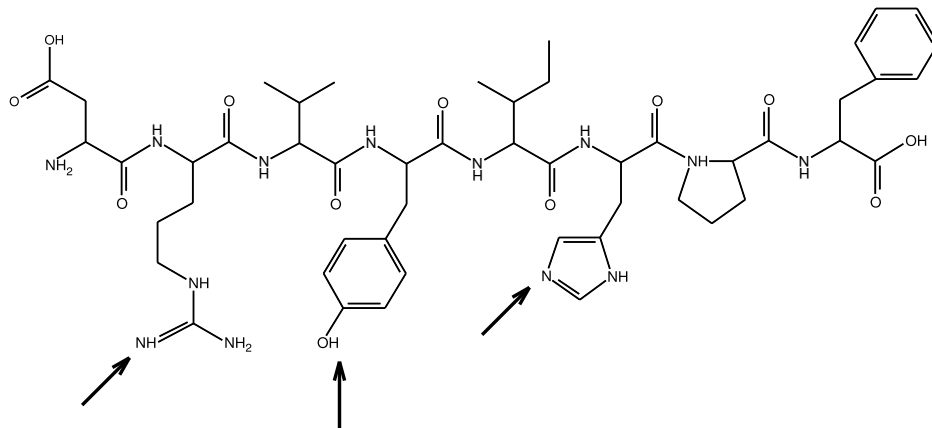


Abbildung 15.2: **Molekulare Struktur von Angiotensin II** ($\text{H}_2\text{N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-COOH}$, $m=1046$ Da). Das linke Ende ($-\text{NH}_2$ -Gruppe) wird als N-Terminus und das rechte Ende ($-\text{COOH}$ -Gruppe) als C-Terminus bezeichnet. Die Pfeile deuten auf Stellen, welche in der Gasphase protoniert/kationisiert werden könnten.

des Ionensignals keine Rolle spielten.

15.2 Durchführung der PSD-Analyse von Cäsium-adaptiertem Angiotensin II

Die PSD-Analysen wurden mit einem MALDI-TOF-TOF (Ultraflex II, Bruker Daltonics) im Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin durchgeführt. Als Matrix diente eine Kombination von CHCA und SA. Die MALDI-Probe wurde mit der Dried-Droplet-Methode präpariert. Außer $1,5\mu\text{l}$ Angiotensin II Lösung wurde der MALDI-Probe etwa dieselbe Menge CsCl (jeweils etwa $1,5\mu\text{l}$ einer etwa $50\mu\text{g/ml}$ -Lösung) zugegeben. Die Bestrahlung der Probe erfolgte durch einen frequenzverdreiften Nd:YAG-Laser ($\lambda=355\text{nm}$). Die Repetitionsrate betrug 100Hz . Die Laserpulsenergie konnte während dieser Messung nicht bestimmt werden. Die PSD-Analyse wird

bei diesem MALDI-Tandem-Massenspektrometr (MALDI-TOF-TOF) mit der LIFT-Methode durchgeführt und anschließend mit FlexAnalysis (Version 2.4) analysiert [147]. Die LIFT-Methode zur PSD-Analyse ist nachfolgend beschrieben:

Wie in Abb. 15.3 angedeutet, durchlaufen die in der MALDI-Quelle erzeugten Ionen zunächst eine Kollisionszelle. In dieser Kollisionszelle ist der Druck leicht erhöht, was die Innere Energie der Ionen durch Stöße mit den Gasmolekülen erhöht und führt anschließend zu einer stärkeren Fragmentierung. Vor dem ersten TOF befindet sich zusätzlich die sogenannte LIFT-Zelle. In dieser Zelle wird die kinetische Energie der Ionen nochmal durch ein elektrisches Feld erhöht. Danach erreichen die angeregten Ionen das erste (lineare) TOF-Massenspektrometer. Mittels einer *Timed Ion Selector* werden nur Ionen eines eingestellten m/z -Wertes zum zweiten TOF durchgelassen. So kann gezielt die Fragmentierung von Ionen eines m/z -Wertes untersucht werden. Im Refletron-TOF-MS zerfallen nun ein großer Teil der metastabilen Anlytionen auf dem Weg zum Detektor. Somit ist es möglich, dass nur die Ionen einer (einstellbaren) Muttermasse im zweiten TOF analysiert werden. Durch diese Methode kann ein gesamtes PSD-Massenpektrum in einer Messung generiert werden.

15.3 Durchführung der MD-Simulationen zur Berechnung der sekundären Struktur

Zuerst wurden jeweils zehn verschiedene Strukturen von Angiotensin II mit dem Programmpaket *Avogadro* erstellt und die einzelnen Bindungsabstände mit einer Kraftfeld-Optimierung (UFF) ausgeglichen. Dies sind die Ausgangsstrukturen für die MD-Simulation. Die eigentliche MD-Simulation wurde mit einem Fortran-Programm durchgeführt, welches die Bewegung der Atome durch die auftretenden Kräfte ausführt. Die elektronische Struktur des Moleküls und die auftretenden intramolekularen Kräfte wurden aus der elektro-

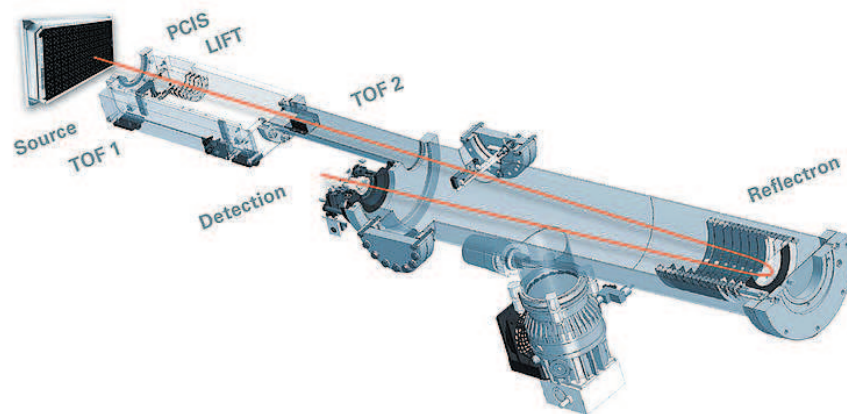


Abbildung 15.3: **Prinzip des MALDI-Tandem-Massenspektrometers** Gezeigt ist die Konstruktion eines MALDI-TOF-ROF vom Typ *ultraflex I* (Bruker Daltonics). Die in der Quelle erzeugten Ionen durchlaufen zunächst (in metastabilem Zustand) das TOF(1). Ein kleiner Teil wird detektiert und die anderen Ionen durchlaufen anschließend das (Reflektron)-TOF(2). Im zweiten Bereich zerfallen die metastabilen Analyt-Ionen und werden anschließend durch die Reflektor-Elektrode zum Detektor beschleunigt. Bei gleicher Geschwindigkeit haben diese Fragmente jedoch eine unterschiedliche kinetische Energie - werden also unterschiedlich stark durch die Reflektor-Kathode zurück beschleunigt und legen daher unterschiedliche Wegstrecken zurück. (Quelle: www.bdal.de)

nischen Struktur mit dem Programm-Paket *MOPAC* (AM1-Methode) berechnet. Im Rahmen dieser MD-Simulation wurden 10.000 Zeit-Schritte von jeweils einer Femtosekunde ausgeführt. Die Start-Temperatur (Anfangswert: 1000K) sinkt während der 10.000 Schritte exponentiell bis auf etwa Null Kelvin. Als Abkühlungskonstante wurde ein Wert von $A=500$ eingestellt (Siehe Kap. 3.4). Der Verlauf der molekularen Struktur konnte mit dem Visualisierungsprogramm *Molden* (Version 4.7) dargestellt und analysiert werden. Sämtliche Simulationen betrachten das Molekül in der Gasphase.

15.4 Ergebnisse

Im ersten Teil der Ergebnisse werden die PSD-Spektren von protoniertem und Cäsium-adaptierten Angiotensin II gezeigt und diskutiert.

15.4.1 Protoniertes Angiotensin II

Abb. 15.4 zeigt das PSD-Massenspektrum von protoniertem Angiotensin $[\text{Ang}+\text{H}]^+$. Deutlich zu erkennen sind die Massenpeaks der y - und einige b -Fragmente, als y_i und b_i ($i=1\dots 7$) bezeichnet. Die Erniedrigung einiger Massenpeaks um $m/z=18$ deutet auf eine Abspaltung von H_2O hin. Weitere Fragmente (wie a -, c -, z - oder x -Fragmente) besitzen ein deutlich geringeres Ionensignal. Die Höhe der Massenpeaks der Fragmente sind meist in der gleichen Größenordnung wie $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ (bei $m/z=1046,2$).

Aus der MD-Simulation ergibt sich eine lineare sekundäre Struktur von Angiotensin II mit jeweils einem „*Knick*“ (=Richtungsänderung des Peptid-Rückgrades) bei den Aminosäuren Prolin und Valin. Ein zusätzliche Abweichung von der linearen Struktur könnte sich aus einer elektrostatischen Wechselwirkung der protonierten Ininogruppe und dem His-Rest ergeben. Das zusätzliche Proton ist für die meisten der erhaltenen Strukturen am Arginin-Rest lokalisiert (siehe Abb. 15.5). Durch die weitgehend lineare Struktur ist Angiotensin II leicht zu fragmentieren, da es für Stöße mit anderen Molekülen einen großen Wirkungsquerschnitt besitzt.

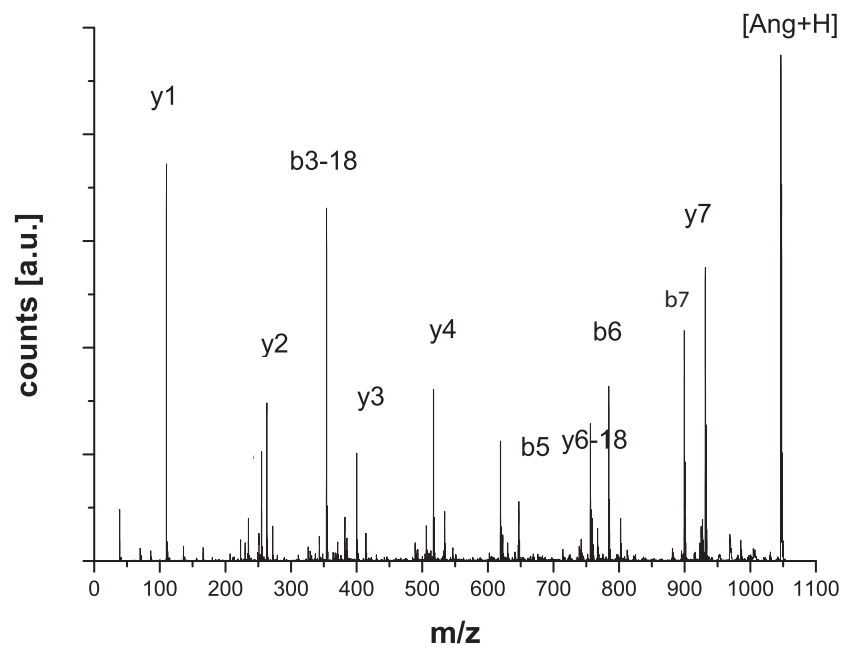


Abbildung 15.4: **PSD-Massenspektrum von protoniertem Angiotensin II.** Die Muttermasse (m/z) von $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ ist 1047.2. Die y_i - und b_i -Fragmente sind oberhalb der entsprechenden Massenpeaks angezeigt. Die Peakintensitäten der Fragmente sind leicht niedriger als $[\text{Ang}+\text{H}]^+$. y_i - und b_i -Fragmente werden mit dem höchsten Ionensignal detektiert.

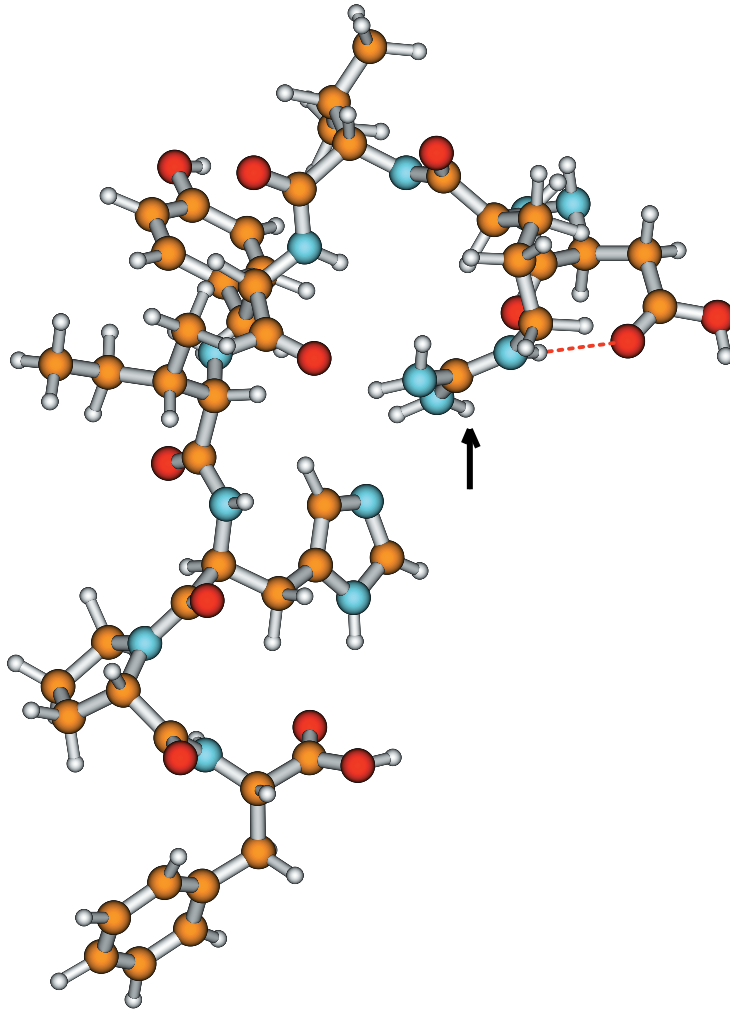


Abbildung 15.5: **Dreidimensionale Darstellung von protoniertem Angiotensin** $[\text{Ang}+\text{H}]^+$. Diese Struktur wurde durch eine semi-empirische MD-Simulation (AM1) berechnet. Die sekundäre Struktur ist weitgehend linear. Das zusätzliche Proton ist am Arginin-Rest lokalisiert.

15.4.2 Einfach Cs-adaptiertes Angiotensin II

Das PSD-Massenspektrum von $[\text{Ang}+\text{Cs}]^+$ zeigt deutliche Unterschiede zum PSD-Massenspektrum von $[\text{Ang}+\text{H}]^+$. In Abb. 15.6 ist ersichtlich, dass die Intensität der Massenpeaks der Fragmente deutlich geringer ist als die Peakintensität der Muttermasse $[\text{Ang}+\text{Cs}]^+$. Im unteren Teil der Abbildung ist daher der Bereich von $m/z=150$ bis $m/z=1000$ vergrößert hervorgehoben. Die auftretenden Massenpeaks (meist y -Fragmente) sind nahezu alle um $m/z=132$ (der Masse von Cs-H) verschoben. Jedoch sind die Massenpeaks von $[y_1+\text{Cs}]$ (-Phe-COOH) und $[y_2+\text{Cs}]$ (-Pro-Phe-COOH) nicht im PSD-Massenspektrum sichtbar. Die niedrigere Rate der Fragmentierung von $[\text{Ang}+\text{Cs}]^+$ bei ansonsten gleichen Bedingungen ist ein deutlicher Hinweis für die höhere Stabilität von $[\text{Ang}+\text{Cs}]^+$ im Vergleich zum protonierten Analyten. Diese These ist auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Kapitel 13, wo gezeigt wurde, dass bei der Bestrahlung der MALDI-Probe mit Laserpulsen einer hohen Laserpulsenergie vorwiegend Kalium-adaptiertes Angiotensin II im Massenspektrum sichtbar ist. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde die molekulare Struktur von $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ und $[\text{Ang}+\text{Cs}]^+$ verglichen. Siehe Abb. 15.4 (für $[\text{Ang}+\text{H}]^+$) sowie Abb. 15.7 (für $[\text{Ang}+\text{Cs}]^+$).

Im Vergleich zur linearen Struktur von protoniertem Angiotensin II wird durch die Adaption eines Cs^+ -Kations die Struktur deutlich um das Cs^+ -Kation orientiert. Die Orientierung findet durch die Wechselwirkung der π -Systeme mit den zyklischen Aminosäure-Resten (Tyrosin und Histidin) und der Kationen statt. Durch diese Wechselwirkung ist das Cs^+ -Kation in der Lage, die Peptidstruktur zu stabilisieren. Der Wirkungsquerschnitt für Stöße mit anderen Molekülen sinkt durch die konzentrierte Struktur erheblich. Beides könnte die höhere Stabilität von Cs-adaptiertem - im Vergleich zu protoniertem Angiotensin II bei MALDI-Massenspektrometrie, speziell für höhere Laserpulsenergien, erklären.

Während der MD-Simulation bleibt zudem der Arginin-Rest protoniert, während nach der Simulation der Tyrosin-Rest deprotoniert vorliegt. Dieser, zum Teil in den Simulationen auftretende Protonentransport könnte die Ursache für eine weitere Wechselwirkung zwischen dem Tyrosin-Rest und dem

Arginin-Rest sein. Die Position der Protonen sind jedoch für die sekundäre Struktur des Angiotensins II von geringere Bedeutung als das Vorhandensein eines Alkalikations. Genauere Rechnungen der molekularen Struktur, beispielsweise mit DFT- oder störungstheoretischen Methoden können hier Aufschluss geben.

Das Fehlen der beiden ersten y -Fragmente $[y_1+Cs]^+$ und $[y_2+Cs]^+$, sowie $[y_1+H]^+$ (Phe-COOH) und $[y_2+H]^+$ (Pro-Phe-COOH) deutet darauf hin, dass das Cs^+ -Kation nur eine schwache Wechselwirkung mit den Aminosäureresten Phenylalanin und Prolin ausbildet. Aus der molekularen Struktur geht hervor, dass das Cäsium-Kation nahe des N-Terminus fixiert ist. Eine ionische Wechselwirkung des Cs^+ -Kations mit dem zyklischen Aminosäureresten ist auch in Einklang mit der These, dass d -Elektronen von Metallen mit aromatischen Strukturen wechselwirken [148]. Eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen dem -COOH-Gruppe und der C-Terminus könnte die gezeigte Struktur zusätzlich stabilisieren.

15.4.3 Zweifach Cäsium-adaptiertes Angiotensin II

Beim zweifach kationisierten Angiotensin II ist die Fragmentierung im Vergleich zum einfach Cs^+ -adaptierten Angiotensin II etwas stärker ausgeprägt. Das PSD-Massenspektrum von $[Ang+2Cs-H]^+$ ist in Abb. 15.8 gezeigt. Im PSD-Massenspektrum sind alle y_i -Massenpeaks im Vergleich zum PSD-Massenspektrum um jeweils einen Wert von $m/z=265$ verschoben. Dies entspricht einer Adaption von $(2 \cdot Cs)$ (bei gleichzeitiger Deprotonierung) zu jedem y -Fragment. Ein Ergebnis für die molekulare Struktur des zweifach Cs^+ -adaptierten Angiotensin II ist in Abb. 15.9 gezeigt. Deutlich ist auch hier die Wechselwirkung zwischen dem Kation und den zyklischen Aminosäureresten erkennbar. Ein Cs^+ -Kation wird vom (protonierten) Arginin-Rest und dem (deprotonierten) Tyrosin-Rest eingeschlossen. Das zweite Cs^+ -Kation wird von dem Tyrosin-Rest und dem (ebenfalls deprotonierten) Histidin-Rest eingeschlossen. Die Abspaltung eines Protons im Austausch für das zweite Cs^+ -Kation kann an verschiedenen Stellen am Angiotensin II stattfinden, ohne dass sie Struktur davon maßgeblich beeinflusst wäre. Im MALDI-

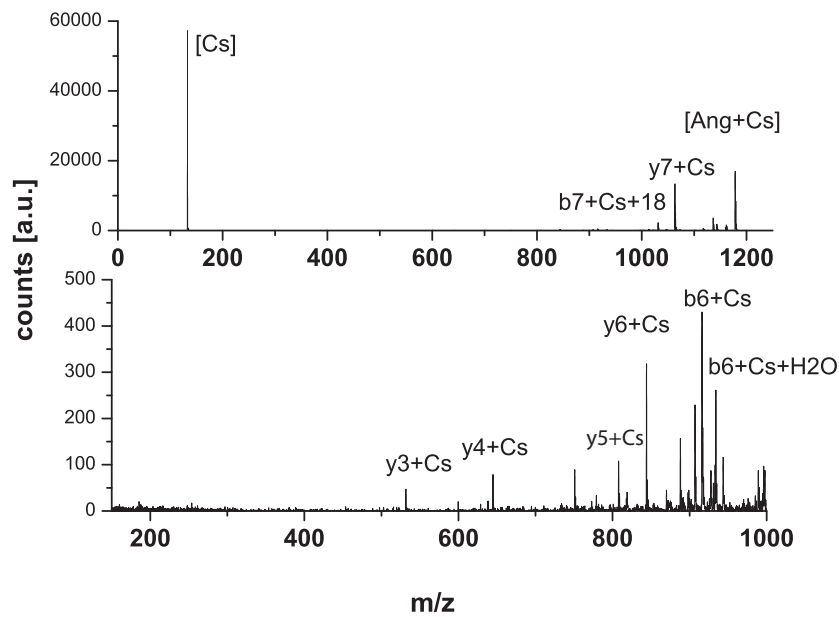


Abbildung 15.6: **PSD-Massenspektrum von $[\text{Ang}+\text{Cs}]^+$** . (Zur besseren Übersicht ist ein gesamtes Massenspektrum und ein stark vergrößerter Ausschnitt (unteren) abgebildet.) Die Cs^+ -adaptierte Struktur erscheint deutlich stabiler, da eine deutlich schwächere Neigung zur Fragmentierung erkennbar ist. Während bei der Fragmentierung von protoniertem Angiotensin II sowohl y- als auch b-Fragmente auftreten, sind bei $[\text{Ang}+\text{Cs}]^+$ vor allem y-Fragmente sichtbar. Die Fragmente y_1 und y_2 erscheinen nicht im Massenspektrum. Die restlichen y-Fragmente sind immer mit Cs^+ -adaptiert.

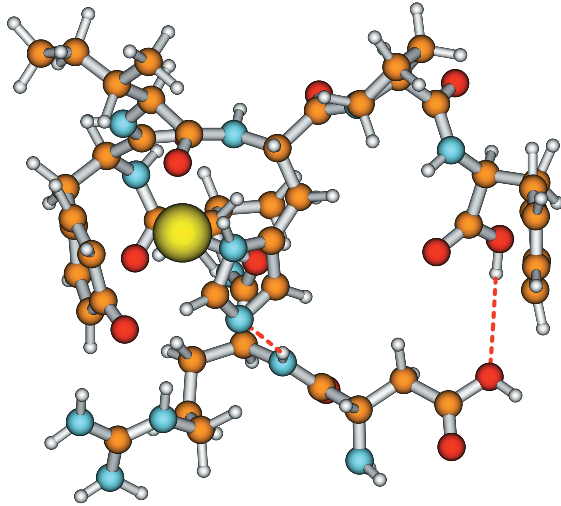


Abbildung 15.7: **Molekulare Struktur von Cäsium-adaptiertem Angiotensin [Ang+Cs]⁺**. Diese Struktur wurde mit einer semi-empirischen MD-Simulation (AM1) berechnet. Im Vergleich zur protonierten Angiotensin II Struktur ist das Cäsium-adaptierte Angiotensin II um das Cs⁺-Kation (gelb) konzentriert. Die Strukturänderung durch das Cs-Kation trägt dergestalt zur Stabilisierung der molekularen Struktur des Cs⁺-adaptierten Angiotensin II bei. Die gestrichelte Bindung symbolisiert eine Wasserstoff-Brückenbindung.

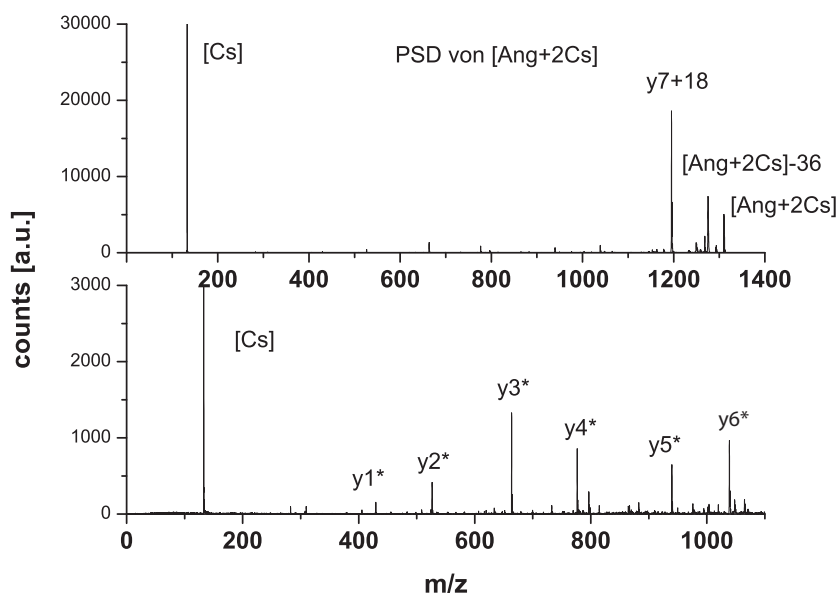


Abbildung 15.8: **PSD-Massenspektren von zweifach kationisiertem Angiotensin II** $[\text{Ang}+2\text{Cs}-\text{H}]^+$. Das unteren Massenspektrum zeigt einen vergrößerten Ausschnitt zur besseren Visualisierung. Als Fragmente treten ausschließlich y-Fragmente auf, welche um $m/z=265$ gegenüber dem protonierten Angiotensin II verschoben sind. Die y_i^* stehen für $[y_i+2\text{Cs}-\text{H}]^+$.

Massenspektrum wirkt eine Abspaltung eines Protons gehemmt. Dies zeigt sich am niedrigeren $[\text{Ang}+2\text{Cs}-\text{H}]$ -Signal im Vergleich zum protonierten oder einfach kationisierten Analyt-Ionensignal. Demgegenüber könnte es sein, dass die Energiebilanz (Änderung der Bindungsenthalpie ΔH) der Deprotonierung und gleichzeitiger Cs^+ -Adaption an $[\text{Ang}+\text{Cs}]^+$ bei gleichzeitiger Abspaltung eines Protons ungefähr ausgeglichen ist. Diese These könnte weiter mit quantenchemischen Rechnungen, z.B. DFT-Methoden überprüft werden.

15.4.4 Dreifach Cs^+ -adaptiertes Angiotensin II

Die gleichzeitige Adaption von drei Cs^+ -Kationen ist mit einer Abgabe von zwei Protonen verbunden. Die mehrfache Kationisierung tritt seltener auf als die einfache (und zweifache) Kationisierung. Dies äußert sich in einem geringen $[\text{Ang}+3\text{Cs}-2\text{H}]^+$ -Ionensignal im MALDI-Massenspektrum, da der betrachtete Massenpeak nur etwa ein Zehntel des protonierten Ionensignals

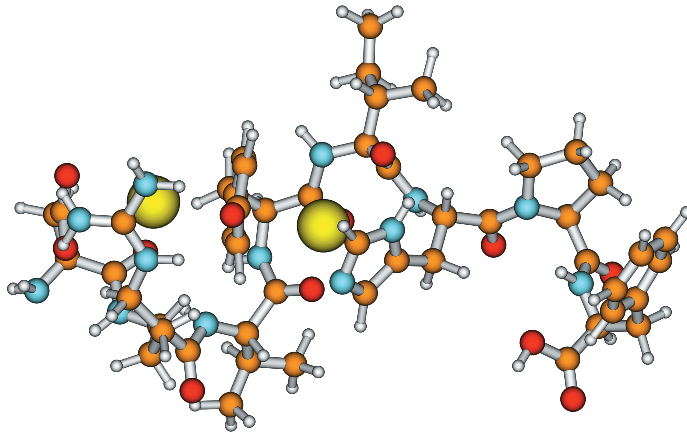


Abbildung 15.9: **Molekulare Struktur von zweifach Cs-adaptiertem Angiotensin II [Ang+2Cs-H]**. Die Struktur wurde mit einer MD-Simulation (AM1-basiert) berechnet. Die Bindung des linken Cäsium-Kationen (gelb) erfolgt durch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem (protonierten) Arginin-Rest und dem (deprotonierten) Tyrosin-Rest. Das rechte Cs⁺-Kation bindet durch π -Kation-Wechselwirkung mit den Aminosäuren Tyrosin und (deprotoniertem) Histidin. Die Cs⁺-Kationen tragen so zur Stabilisierung der molekularen Struktur bei. Prolin und Phenylalanin sind an dieser Strukturmodifikation nicht wesentlich beteiligt.

zeigt. Das PSD-Massenspektrum von $[\text{Ang}+3\text{Cs}-2\text{H}]^+$ ist in Abb. 15.10 dargestellt. Die Fragmentierung von dreifach Cs-adaptiertem Angiotensin II ist deutlich stärker als bei der einfach und zweifach kationisierten Spezies. Analog der vorangehenden Ergebnissen ist in diesem Fall einige y-Fragmente um den $(3\text{Cs}-2\text{H})$ -entsprechenden Wert im PSD-Massenspektrum verschoben. Es können aber nur $[\text{y}_1+3\text{Cs}-2\text{H}]^+$ bis $[\text{y}_4+3\text{Cs}-2\text{H}]^+$ identifiziert werden. Zudem existieren eine Reihe weiterer, nicht eindeutig zu identifizierende Massenpeaks im Massenspektrum.

Ein Ergebnis der MD-Simulation für eine molekulare Struktur von dreifach Cs-adaptiertem Angiotensin II ist in Abb. 15.11 gezeigt. Auch in diesem Bild werden die Cs^+ -Ionen von den zyklischen Aminosäure-Resten (Tyrosin, Histidin und Phenylalanin) eingeschlossen. Umgekehrt nimmt die Struktur von Angiotensin II teilweise ihre lineare Form wieder an. Das linke Cs-Kation wirkt dabei auf den C-Terminus ($-\text{COOH}$) wie auf den (deprotonierten) Tyrosin-Rest anziehend. Dagegen ist der (neutrale) Arginin-Rest des linken Cs-Kation und des mittleren Cs-Kation abgewandt. Das mittlere Cs^+ ist zwischen den zyklischen Resten von Tyrosin und Histidin (beide deprotoniert) eingeschlossen. Das Cs^+ -Ion auf der rechten Seite ist durch den Histidin-Rest und die Phenyl-Gruppe des Phenylalanin eingeschlossen.

Der Rückgang zur linearen Struktur hat eine stärkere Angriffsfläche für andere Moleküle während Stößen, z.B. in der MALDI-Wolke, zur Folge. Der im Vergleich zum einfach und zweifach kationisierten Angiotensin II erhöhte Wirkungsquerschnitt könnte als Erklärung für die höhere Fragmentierung dienen.

Die sekundäre Struktur erscheint durch die drei Cs^+ -Kationen in ihrer Struktur stabilisiert, wie MD-Simulationen mit hoher Temperaturen suggerieren. Entgegen der Stabilisierung wirken die elektrostatischen Abstoßungen der drei (nicht vollständig abgeschirmten Ladungen) Cs^+ -Kationen. Diese Abstoßung der Cs^+ -Kationen untereinander könnte der Grund für die vermehrte Fragmentierung von $[\text{Ang}+\text{Cs}-2\text{H}]^+$ in der Gasphase (im Vergleich zu ein- und zweifach kationisiertem Angiotensin II) sein. Diese Abstoßung könnte die Fragmentierung nachhaltig verändern und somit die Vielzahl der

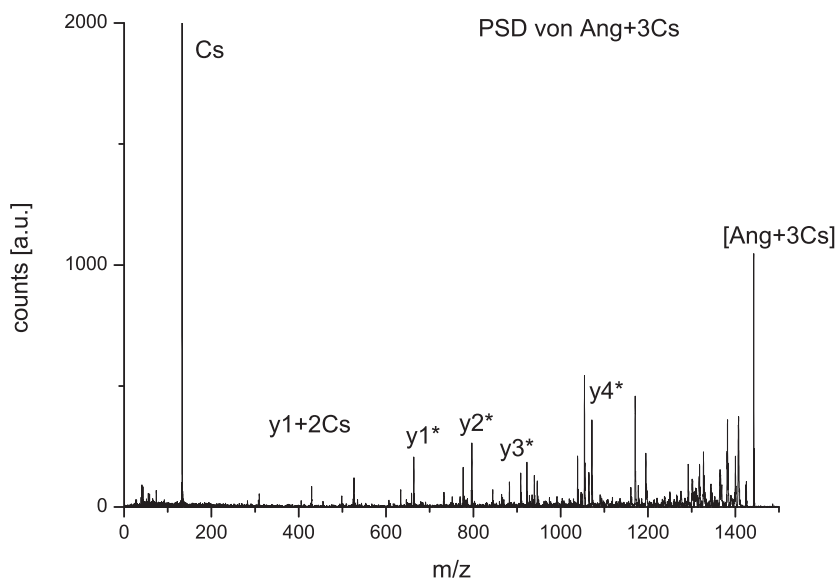


Abbildung 15.10: **PSD-Massenspektrum des dreifach Cäsium-adaptierten Angiotensin II.** Besonders im Vergleich mit den PSD-Spektren des zweifach kationisierten Angiotensin II wird die stärkere Fragmentierung des $[\text{Ang}+3\text{Cs}-2\text{H}]^+$ deutlich. Die Bezeichnung der Massenpeaks y_i^* steht für $[y_i+3\text{Cs}-2\text{H}]^+$. Das gesamte Ionensignal ist erheblich geringer als bei den anderen PSD-Massenspektren.

aufretende Fragmenten erklären.

15.5 Interpretation der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden die Positionen von Cs^+ -Kationen an Angiotensin II während MALDI untersucht. Die berechneten Strukturen zeigen eine Wechselwirkung zwischen den Kationen und den (zum Teil deprotonierten) Aminosäureresten Arginin, Tyrosin und Histidin. Die Cs^+ -Kationen üben einen starken Einfluss auf die sekundäre Struktur des Peptids aus. Die mehrheitliche Verschiebung der Fragmente um die jeweiligen Massen von Cs ($m/z=133$), $[2\text{Cs}-\text{H}]^+$ ($m/z=265$) oder $[3\text{Cs}-2\text{H}]^+$ ($m/z=397$) sind ein starkes Indiz dafür, dass die Bindung der Cs-Kationen an das Angiotensin II-Molekül zu großen Teilen durch eine elektrostatische Wechselwirkung von (hetero)zyklischen (oder geladenen) Aminosäure-Resten realisiert ist. Durch diese elektrostatische Wechselwirkung ist die sekundäre Struktur des Angio-

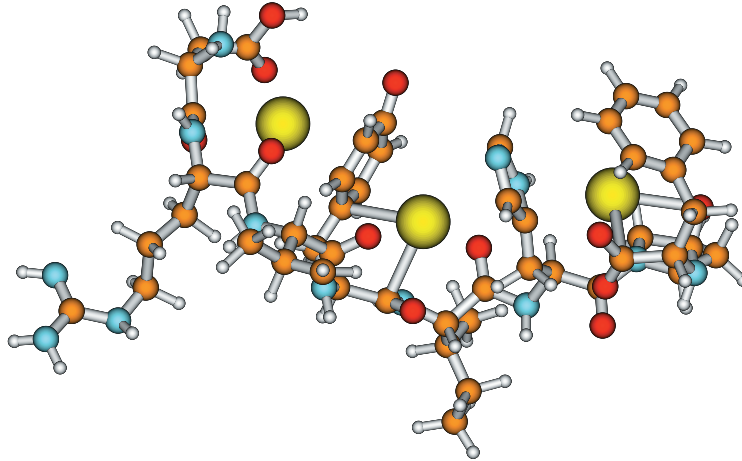


Abbildung 15.11: **Molekulare Struktur von dreifach Cs-adaptiertem Angiotensin $[\text{Ang}+3\text{Cs}-2\text{H}]^+$** . Die Berechnung der gezeigten Struktur erfolgte mit der MD-Simulation (AM1-basierend). Die Bindung der Cs^+ -Kationen (gelb) mit dem Angiotensin II Molekül erfolgt hier durch die Wechselwirkung des Kations mit den Ringstrukturen der Aminosäuren Tyrosin, Histidin oder Phenylalanin. Die Cs^+ -Kationen tragen so zur Stabilisierung der molekularen Struktur bei. Die Bindungen zwischen dem mittleren und rechten Cs^+ -Kation und dem Angiotensin II soll nur die Nähe der Atome zueinander verdeutlichen und entspricht keiner ausgebildeten kovalenten Bindung.

tensin II in der Gasphase wesentlich verändert. Aus der in Abb. 15.7 (und Abb. 15.7 sowie Abb. 15.9) illustrierten Käfig-Bildung um das Cs⁺-Kation könnte die höhere Stabilität gegen Fragmentierung begründet liegen. Diese erhöhte Stabilität konnte schon in Kap. 13 für Kalium-adaptiertes Angiotensin beobachtet werden. Zum einen bewirkt die Änderung der sekundären Struktur einen geringeren Wirkungsquerschnitt bei Stößen in der MALDI-Wolke und zum anderen könnte die elektrostatische Anziehung der π -Systeme des Angiotensins II eine Absenkung der potentiellen Energie zur Folge haben. Eine lokalisierte Bindung der Cäsium-Kationen an einen bestimmten Rest ist somit weniger wahrscheinlich, wie sich auch aus den PSD-Messungen von einfach und zweifach Cs-aggregierten Angiotensin II ersehen lässt. Ansonsten sollten ein Teil der auftretenden Fragmente ohne m/z-Verschiebung detektierbar sein.

Kapitel 16

Der Matrix-Suppression-Effekt bei MALDI

In einem MALDI-Massenspektrum sind neben dem protonierten und ggf. Kationen-aggregierten Analyt-Ionensignal noch weitere Massenpeaks im unteren Massenbereich (für $m/z < 500$) sichtbar (vergleiche z.B. Abb. 16.2). Diese Massenpeaks rühren von ionisierten Matrixmolekülen, Aggregaten und Fragmenten derselben und des Analyten, sowie Verunreinigungen her. Durch diese Vielzahl von Matrix-Peaks wird eine MALDI-MS-Analyse von Stoffen einer geringen molekularen Masse (z.B. Zucker, Di- oder Tripeptide) erschwert. Eine stark erhöhte Analyt-Konzentration in der MALDI-Probe ist in der Lage, einen Großteil dieser Massenpeaks zu unterdrücken, solange die Laserpulsenergie leicht oberhalb der Mindestpulsenergie für MALDI gewählt wird. Dieser Effekt wird als Matrix-Suppression-Effect (MSE) bezeichnet und wurde zunächst von Chan et al. [149] für Nikotinsäure (als Matrixsubstanz) und Insulin ($m \approx 5807$ Da), Lysozym ($m \approx 14.300$ Da) und Myoglobin ($m \approx 18.000$ Da) als Analytsubstanz beschrieben. Er tritt darüberhinaus für eine Vielzahl von Matrixsubstanzen und Analytsubstanzen auf [150, 151]. Neben dem MSE wird oft auch ein Rückgang des Analyt-Ionensignals bei einer hohen Analyt-Konzentration in der MALDI-Probe beobachtet. Dieses verminderte Analyt-Ionensignal wird als Alyte Suppression Effect (ASE) bezeichnet.

Aufgrund dieser Phänomene schlägt R. Knochenmuss ein Schema für den Energietransport zwischen angeregten Matrixmolekülen während des MALDI-Prozesses vor. Dieser Ansatz der primären Ionisation ist das (in Kap. 2.4 genauer vorgestellte) Pooling-Modell, bei welchem die Anregungsenergie von vielen benachbarten Matrix-Molekülen gemeinsam für die Ionisation weniger Matrixmoleküle dienen. R. Knochenmuss argumentiert, dass eine Erhöhung der Analytkonzentration die Übertragung der Anregungen zwischen den angeregten Matrixmolekülen stören kann. Diese Störung führe zu einer Verminderung der Ionisation von Matrixmolekülen. Ebenso sei auch die sekundäre Ionisation in der MALDI-Wolke durch die erhöhte Analytkonzentration gehemmt. Dort wird der Übertrag von Protonen oder Kationen auf das Analytmolekül vermutet. Beide Effekte führen zu einem Rückgang des Analyt-Ionensignals im MALDI-Massenspektrum.

Neben einer erhöhten Analyt-Konzentration in der MALDI-Probe können organische Ionenverbindungen in der MALDI-Probe den MSE und ASE auslösen. Beispielsweise Tetraalkylammoniumhalogenide (TAAH) mit der Summenformel $[\text{NR}_4^+ \cdot \text{X}^-]$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{R} = (\text{CH}_2)_n\text{-CH}_3$). Diese Substanzen unterdrücken in geringer Konzentration (molares Verhältnis von TAAH zu Matrix 1:1000) sowohl wirksam die Kationisierung des Analytmoleküls - als auch die meisten Matrix-Massenpeaks im MALDI-Massenspektrum [152]. TAAH-haltige MALDI-Proben ergeben auch ein schwächeres Analyt-Ionensignal. Durch Einsatz dieser TAAH können auch Moleküle mit kleinen molekularen Massen wie Drogen oder Arzneimittel mit MALDI-MS untersucht werden. (siehe z.B. [153]). Als besonders geeignet hat sich hierbei CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) (siehe Abb. 16.1) in Kombination mit den Matrixsubstanzen DHB oder CHCA erwiesen.

X. Lou et al. folgert aus dem Auftreten von MSE und ASE durch Zugabe von geringen Mengen TAAH zur MALDI-Probe, dass der Ladungstransport (insbesondere in der MALDI-Wolke) ein Resultat beider Erklärungsansätze, dem Pooling-Modell und dem Lucky-Survivors Modell sei, da die geringe Konzentration der TAAH in der MALDI-Probe die Kristallstruktur (und damit den Energie-Transport durch die MALDI-Probe) und die daraus re-

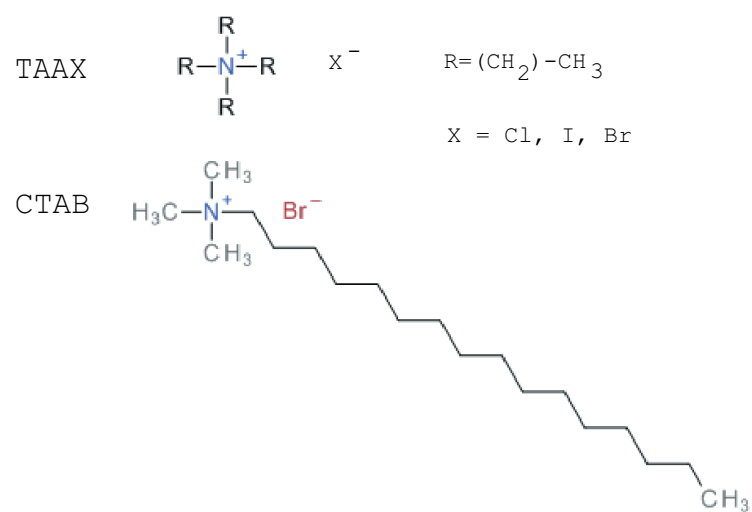


Abbildung 16.1: **Molekülstrukturen von zwei TAAH.** Diese Salze eignen sich zur Verringerung des Matrix-Signals im MALDI-Massenspektrum. TAAX zeigt die generelle Struktur der Tetraalkylammoniumhalogenide. X bezeichnet hierbei das Halogen-Ion. Dabei sind R die entsprechenden Alkyl-Reste $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$. Die untere Struktur zeigt CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid), die sich für eine Analyse von Medikamenten mittels MALDI-MS als geeignet erwiesen hat.

sultierenden starken Veränderungen im MALDI-Massenspektrum bewirken [152].

Weitere Überlegung, wie MSE (und ASE) durch die Zugabe von TAAH zur MALDI-Probe gedeutet werden kann, stellen Kosevich et al. [154] an. Dieser Beitrag weist zunächst auf den oft vernachlässigten Einfluss von chemischen Reaktionen der Matrix und TAAH in Lösung während der Probenpräparation („wet chemistry“-Einflüsse) hin. Diese chemischen Reaktionen könnten selbst für geringe Konzentrationen der TAAH die kristalline Struktur der MALDI-Probe verändern. Ausgehende Beobachtung ist, dass 2,5-DHB mit Ammoniumhydroxyd (in Lösung) unter Bildung von roten Kristallen reagiert. Diese bestehen aus $[\text{NH}_4^+ \cdot (\text{DHB-H})^-]$ -Kristallen [155]. Hieraus resultiere eine Veränderung der Kokristallisation in der MALDI-Probe. Die starke Wirkung einer geringen Konzentration von TAAH in der MALDI-Probe wird damit begründet, dass sich diese gebildeten Kristalle oder die TAA^+ -Kationen an der Probenoberfläche konzentrieren. Bei der Bestrahlung einer MALDI-Probe mit ns-Laserpulsen (moderater Pulsenergie: ca 1-2 μJ) werden nur die obersten molekularen Schichten ablatiert/desorbiert. [33, 156] (visuell auch in Abb. 2.1 gezeigt). Daraus resultiert eine deutlich erhöhte Konzentration der TAAH in den desorbierten/ablatierten Teilen der MALDI-Probe. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Experimenten von Grant et al. [157], der eine TAAH-haltige MALDI-Probe auf einem konstanten Punkt bestrahlte und die entstehenden Ionen nach jedem Laserpuls analysierte. Dabei konnte festgestellt werden, dass der MSE und ASE mit zunehmender Anzahl von Laserpulsen abnahm. Ein direkter Beweis für die Konzentration der TAAH an der Oberfläche der MALDI-Probe, etwa eine kristallographische Studie über eine unterschiedliche Zusammensetzungen verschiedener Bereiche der MALDI-Probe, liegt nach Wissen des Autors jedoch noch nicht vor.

Ein analoges Phänomen lässt sich bei Fast-Atom-Bombardement (FAB)/Liquid Secundary Ion Mass Spectrometry (LSIMS)-Experimenten [12, 13] beobachten. Nach Zugabe kleiner Mengen Decamethoxium ist die Glycerol-Matrix (und deren Aggregationen) nicht mehr im Massenspektrum sichtbar (im positive Ionen-Modus) [158, 159]. Als Begründung wird vermu-

tet, dass sich die Decamethoxium-Moleküle an der Glyceroloberfläche konzentrieren und deren hydrophobe Reste aus der Oberfläche herausragen. Daher werden diese Moleküle bevorzugt durch den Laserpuls desorbiert/ablatiert und beeinflussen das resultierende Massenspektrum nachhaltig. Dieses Analogon ist insofern ein interessantes Resultat, da MALDI und FAB/LSI-MS unterschiedliche Ionisationsmechanismen zugeschrieben werden (siehe z.B. [160]). Die These von der Konzentration der Tetraalkylammonium-Kationen erscheint jedoch für MALDI Proben als Erklärung nicht ausreichend, da die Unterdrückung des Matrix-Ionensignals in einigen Fällen auch nach einer längeren Bestrahlung mit erhöhter Laserpulsenergie unverändert vorliegt, obgleich die oberste Schicht der MALDI-Probe schon desorbiert/ablatiert sein sollte. Zudem ist keine Begründung für das verminderte Analyt-Ionensignal und die Unterdrückung der Kationisierung der Analyt-Moleküle angegeben.

Im Rahmen dieser Arbeit soll an die beschriebenen Untersuchungen angeschlossen werden, indem MALDI-Proben mit verschiedenen TAAH präpariert werden um deren Einfluss auf die MALDI-Massenspektren zu untersuchen. Es werden alle Untersuchungen sowohl mit fs-Laserpulsen der Zentralwellenlängen $\lambda_c=400\text{nm}$ und $\lambda_c=800\text{nm}$ - und zum Vergleich mit ns-Laserpulsen ($\lambda=337\text{nm}$) durchgeführt. Für die Präparation der MALDI-Probe wird die Dried-Droplet-Methode mit einer Mischung von CHCA und SA verwendet. Als Analyt wird Angiotensin II verwendet. Dieser Analyt besitzt ist zur Untersuchung von ASE gut geeignet, da es leicht nachweisbar ist und die Kationisierung eingehend untersucht wurde. Falls nicht gesondert angegeben, wurde ein molares Verhältnis $\frac{TAAH}{Matrix}$ von etwa 1/500 verwendet. Als TAAH wurde Tetramethylammoniumchlorid [N-Me₄Cl], Tetraethylammoniumbromid [N-Et₄Br], Tetrapropylammoniumiodid [N-Prop₄I] und Tetrabutylammoniumiodid [N-But₄I] verwendet. Die Wahl der Anionen (-bromid, -chlorid oder -iodid) scheint bei diesen Messungen keinen sichtbaren Einfluss auf die MALDI-Massenspektren zu haben, wie für das Tetramethylammonium-Kation experimentell geprüft worden ist.

16.1 MSE bei MALDI mit ns-Laserpulsen

Die MALDI-Massenspektren, welche durch Bestrahlung der MALDI-Probe mit ns-Laserpulsen aufgenommen wurden, zeigen neben der hohen Signalintensität des beigegebenen Kations $[TAA]^+$ eine deutliche Reduktion der Matrixpeaks. $[TAA]^+$ ist für alle Pulsenergie-Werte der höchste Massenpeak im MALDI-Massenspektrum (siehe Abb. 16.2).

Einzelne Massenpeaks wie $[CHCA+H_2O+H]^+$ bei $m/z=208$, $[SA+H]^+$ bei $m/z=225$ und $[2(CHCA+H_2O)+H]^+$ bei $m/z=415$ sind dennoch beständig im MALDI-Massenspektrum zu finden. Diese sind von geringerer Intensität als die der jeweiligen Tetraalkylammoniumkationen $[NR_4]^+$, (R=Alkylrest). Bei einem großen Teil der untersuchten MALDI-Proben verschwindet das Matrix-Ionensignal bei einer Erhöhung der TAAH-Konzentration. Bei TAAH in der MALDI-Probe tritt auch eine starke Unterdrückung des Analyt-Ionensignals $[Ang+H]^+$ auf (in Übereinstimmung mit [152]). Kationisierte Analytmoleküle werden auch bei geringsten TAAH-Konzentrationen wirksam unterdrückt. Hierbei könnten die NR_4^+ -Kationen die anderen Kationen aus dem Umfeld der Analytmoleküle während der MALDI-Analyse verdrängen, wie einige Studien nahelegen (z.B. [161]). Bei einer Erhöhung der Laserpulsenergie nehmen sowohl ASE als auch MSE ab. Allerdings bleibt das $[TAA]^+$ -Signal im MALDI-Massenspektrum stets als höchster Peak erhalten. Mit zunehmender Alkyl-Kettenlänge der TAAH bei konstanter Laserpulsenergie verstärkt sich sowohl MSE als auch ASE (siehe Abb. 16.2). Die Höhe des Matrix- und Analyt-Ionensignals hängt stark von dem bestrahlten Punkt auf der MALDI-Probe ab. Unterschiedliche Konzentrationen des TAA-Kations an verschiedenen Positionen auf der MALDI-Probe scheinen die Ursache zu sein.

Die experimentellen Resultate unterstützen die These der Konzentration der TAAH an der Oberfläche der MALDI-Probe. Das Verhalten lässt sich nicht bei jeder MALDI-Probe beobachten. Quantitative Unterschiede beim Ionensignal in einem MALDI-Massenspektrum sind jedoch nicht ungewöhnlich (z.B. durch „hot-spots“ auf der MALDI-Probe).

Um dieses Problem der Verteilung von TAA^+ -Kationen in der MALDI-Probe genauer zu untersuchen, wurden zusätzlich MALDI-Massenspektren

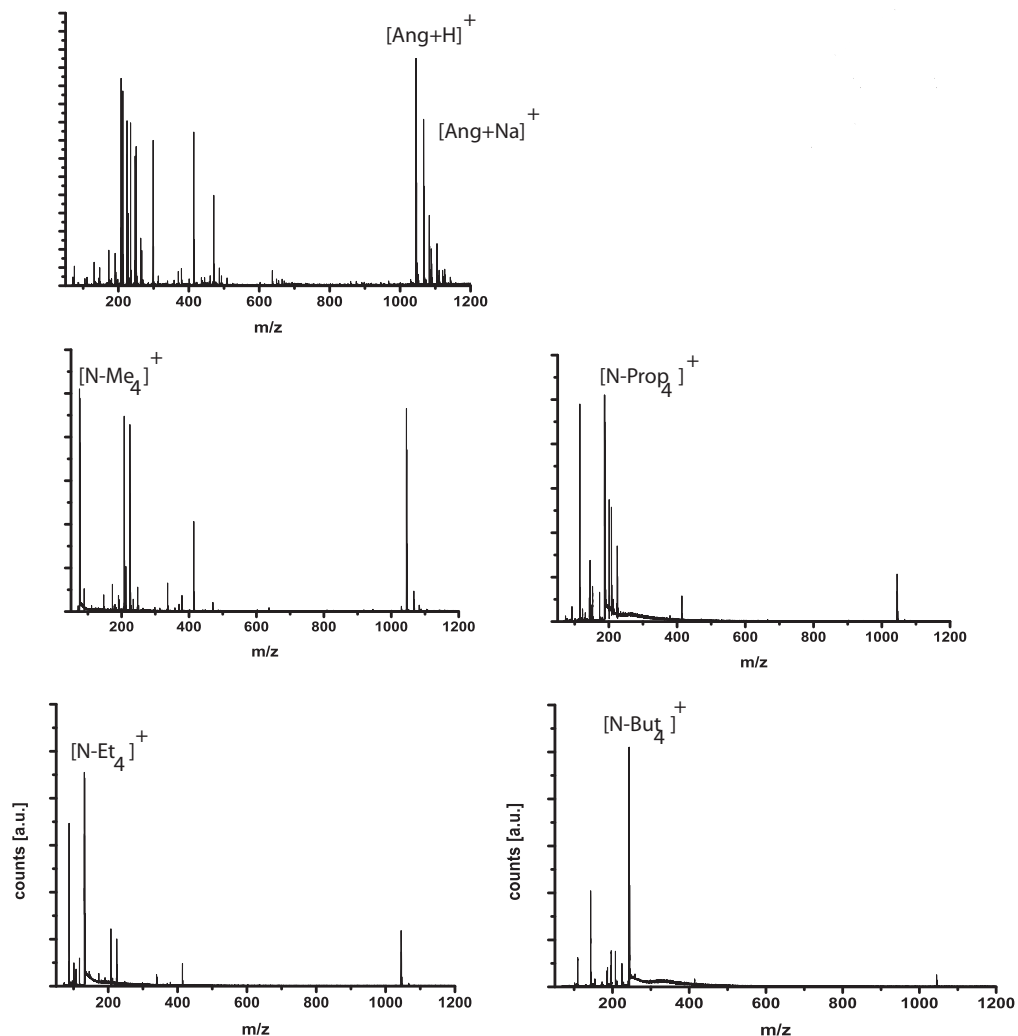


Abbildung 16.2: MSE mit Tetraalkylammonium-Kationen auf ein Angiotensin II MALDI-Massenspektrum. Für diese Messungen wurden ns-Laserpulse einer Pulsenergie von etwa $E=2\mu\text{J}$ (für ein maximales $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ -Signal ohne Zugabe von TAAH) verwendet. Das molare Verhältnis von TAAH/Matrix war etwa 1/500. Das oberste Massenspektrum wurde ohne Zugabe von TAAH zur MALDI-Probe aufgenommen. Die anderen MALDI-Massenspektren von Angiotensin II zeigen den Einfluss der angegebenen Tetraalkylammonium-Kationen. Sichtbar ist eine deutliche Reduktion der Matrix-Aggregation bei gleichzeitig vermindertem Analyt-Signal. Gleichzeitig wurden Auftreten der kationisierten Analytmoleküle wirksam gehemmt.

mit fs-Laserpulsen der Zentralwellenlängen $\lambda_c=400\text{nm}$ und $\lambda_c=800\text{nm}$ durchgeführt. Aufgrund des Lambert-Beerschen Gesetzes dringen die verwendeten fs-Laserpulse tiefer in die MALDI-Probe ein als ns-Laserpulse der Wellenlänge $\lambda=337\text{nm}$. Da insbesondere die Matrix für Laserpulse im nahen IR nahezu durchsichtig ist, wird ein größerer Bruchteil der Energie tiefer in die Probe absorbiert. Zudem ist die Desorption/Ablation der MALDI-Probe durch die ultrakurzen Laserpulse stärker ausgeprägt [28].

16.2 MSE bei MALDI mit fs-Laserpulsen im UV

Für diese Messung wurde die MALDI-Probe mit Laserpulsen einer Zentralwellenlänge von $\lambda_c=400\text{nm}$ bestrahlt und MALDI-Massenspektren von Angiotensin II (zusammen mit diversen TAAH) aufgenommen. Für diese Messungen wurde eine Laserpulsenergie von etwa $E=3\mu\text{J}$ gewählt, um ein maximales Analyt-Ionensignal zu erhalten. Die resultierenden MALDI-Massenspektren sind in Abb. 16.3 zu sehen. Der MSE ist bei der gewählten TAAH-Konzentration (1:500) deutlich schwächer ausgeprägt als bei der Bestrahlung mit ns-Laserpulsen. Zudem ist das $[\text{TAA}]^+$ -Signal nicht mehr der höchste Peak im Massenspektrum. Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass die Intensität des Matrix-Signals bei der Bestrahlung mit fs-Laserpulsen (im Vergleich zu ns-Laserpulsen) höher ausfällt. Der MSE tritt bei einer Erhöhung der TAAH-Konzentrationen (z.B. TAAH:Matrix 1:50) auch bei fs-Laserpulsen auf. Analog der Beobachtungen zu den Experimenten mit ns-Laserpulsen nimmt der MSE leicht mit der Kettenlänge der Alkylreste der TAAH zu. Diese Zunahme von ASE und MSE mit der Alkylkettenlänge ist bei höheren Konzentrationen der TAAH in der MALDI-Probe verstärkt.

Die ggf. unterschiedliche Desorption/Ablation der MALDI-Probe nach einer Bestrahlung mit ns- und fs-Laserpulsen wurde schon im Kap 11.7. beschrieben. Eine Veränderung der Desorption/Ablation durch eine Bestrahlung mit fs-Laserpulsen könnte die Zusammensetzung der MALDI-Wolke verändern, falls tiefere Schichten ebenfalls desorbiert/ablatiert werden. Falls die

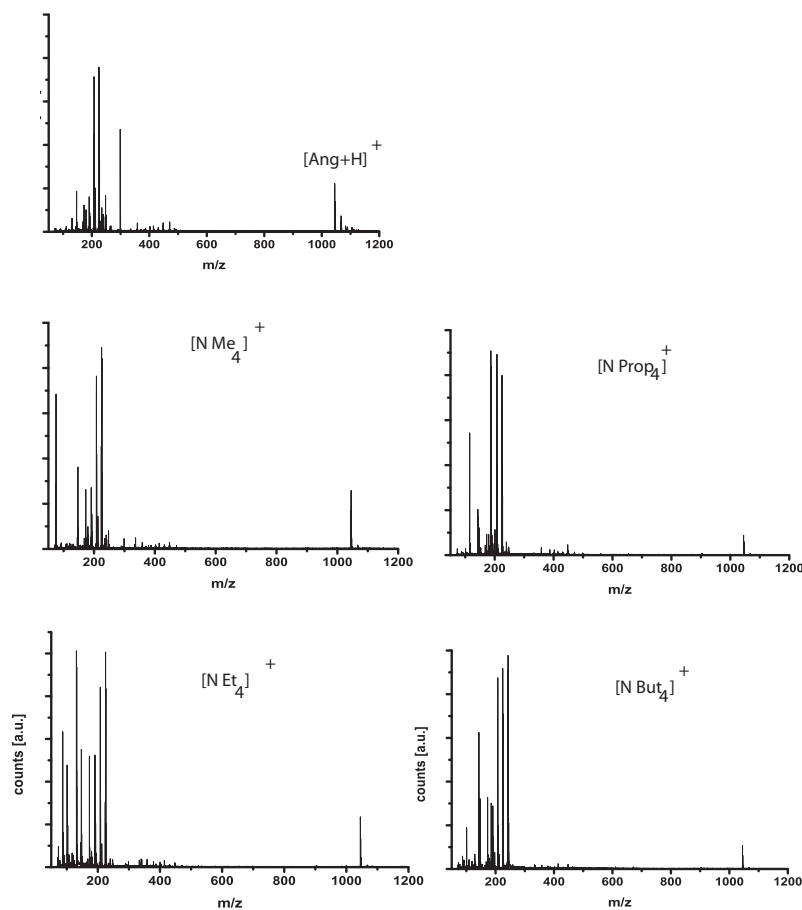


Abbildung 16.3: MSE für fs-Laserpulse der Wellenlänge von $\lambda_c=400\text{nm}$. Die Laserpulsenergie betrug etwa $3\mu\text{J}$, so dass das $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ -Ionensignal (ohne Beigabe von TAAH zur MALDI-Probe) im Massenspektrum am höchsten war. Trotz des gleichen molaren Verhältnisses von TAAH/Matrix (1:500) ist die Unterdrückung der Matrixsignale deutlich schwächer ausgeprägt als bei den Massenspektren, welche mit ns-Laserpulsen (337nm) aufgenommen wurden. Die TAA⁺-Ionensignale sind im Vergleich zur Bestrahlung mit ns-Laserpulsen nicht die höchsten Peaks im Massenspektrum. Dagegen ist die Verminderung des Analyt-Ionensignals mit zunehmender Länge der Seitenkette der Tetraalkylammonium-Kationen sichtbar. Analog einer Bestrahlung mit ns-Laserpulsen wird die Kationisierung des Analyten deutlich unterdrückt.

TAAH an der Oberfläche konzentriert vorliegen, so verringert sich deren Konzentration in der MALDI-Wolke bei der Bestrahlung mit fs-Laserpulsen im Vergleich zu einer Bestrahlung mit ns-Laserpulsen. So kann die geringere Ausprägung des MSE erklärt werden, falls die MALDI-Probe mit fs-Laserpulsen (im UV oder im nahen IR) oder mit ns-Laserpulsen hoher Pulsenergie ($>3\mu\text{J}$) anstatt mit ns-Laserpulsen geringer Energie ($<1\mu\text{J}$) bestrahlt wird. Um diese These zusätzlich zu verstärken, werden MALDI-Massenspektren (ohne Zugabe von TAAH) nacheinander auf dem selben Punkt der MALDI-Probe mit ns-Laserpulsen moderater Pulsenergie und mit fs-Laserpulsen aufgezeichnet.

Das Analyt-Ionensignal $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ war schon nach einer Bestrahlung von drei bis fünf einzelnen fs-Laserpulsen auf einen Punkt selbst bei geringer Pulsenergie nicht mehr im MALDI-Massenspektrum sichtbar. Dagegen ist bei einer Bestrahlung von einigen hundert ns-Laserpulsen noch ein deutliches Analyt-Ionensignal nachweisbar, wie in Abb. 16.4 gezeigt.

16.3 MSE bei MALDI mit fs-Laserpulsen im nahen IR

Der MSE ist bei einer Bestrahlung der TAAH-haltigen MALDI-Probe mit fs-Laserpulsen im nahen IR sehr gering, wie in Abb. 16.5 gezeigt. Für diese Messungen war eine Laserpulsenergie von $E=18\mu\text{J}$ eingestellt. Diese Pulsenergie lieferte das höchste Analyt-Ionensignal ohne Beigabe von TAAH zur MALDI-Probe. Die resultierenden MALDI-Massenspektren sind in Abb. 16.5 zu sehen. Ungeachtet des schwachen MSE ist das Analyt-Ionensignals leicht reduziert. Die Kationisierung scheint auch bei einer Bestrahlung mit fs-Laserpulsen der Zentralwellenlänge von $\lambda_c=800\text{nm}$ stark gehemmt.

16.4 ASE durch TAAH in der MALDI-Probe

Bei Zugabe von TAAH zur MALDI-Probe ist das Analyt-Ionensignal deutlich reduziert. Zusätzlich ist die Kationisierung des Analyten stark vermindert. Dieses Verhalten ist bei einer Bestrahlung mit ns-Laserpulsen und für

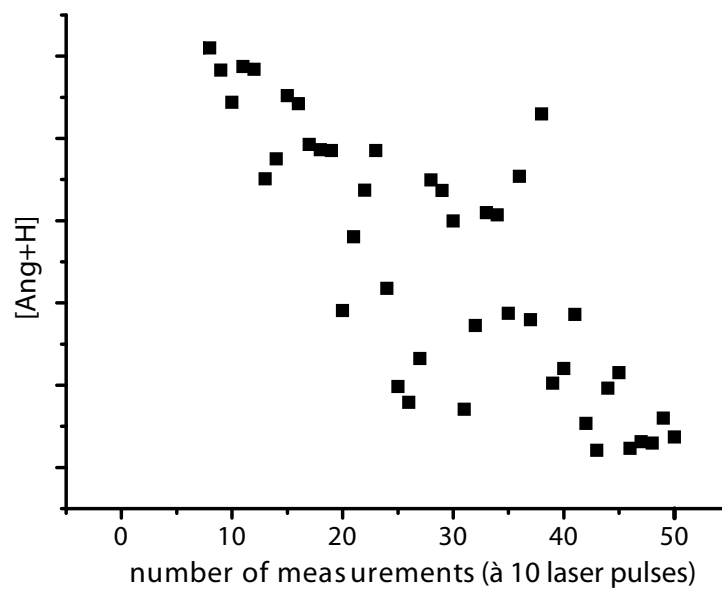


Abbildung 16.4: **Die Abnahme des Analyt-Signals bei Bestrahlung auf einer festen Position auf der MALDI-Probe.** Das $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ -Signal als Funktion der Bestrahlungsdauer mittels ns-Laserpulsen nimmt nur langsam ab. Für diese Messung war die Laserpulsenergie konstant $E=2\mu\text{J}$. Jede Messung stellt die Summe des Analyt-Ionensignals von zehn Laserpulsen dar. Im Falle einer Bestrahlung mit fs-Laserpulsen ist das Analyt-Signal bereits nach drei bis fünf einzelnen Laserpulsen nicht mehr im MALDI-Massenspektrum sichtbar.

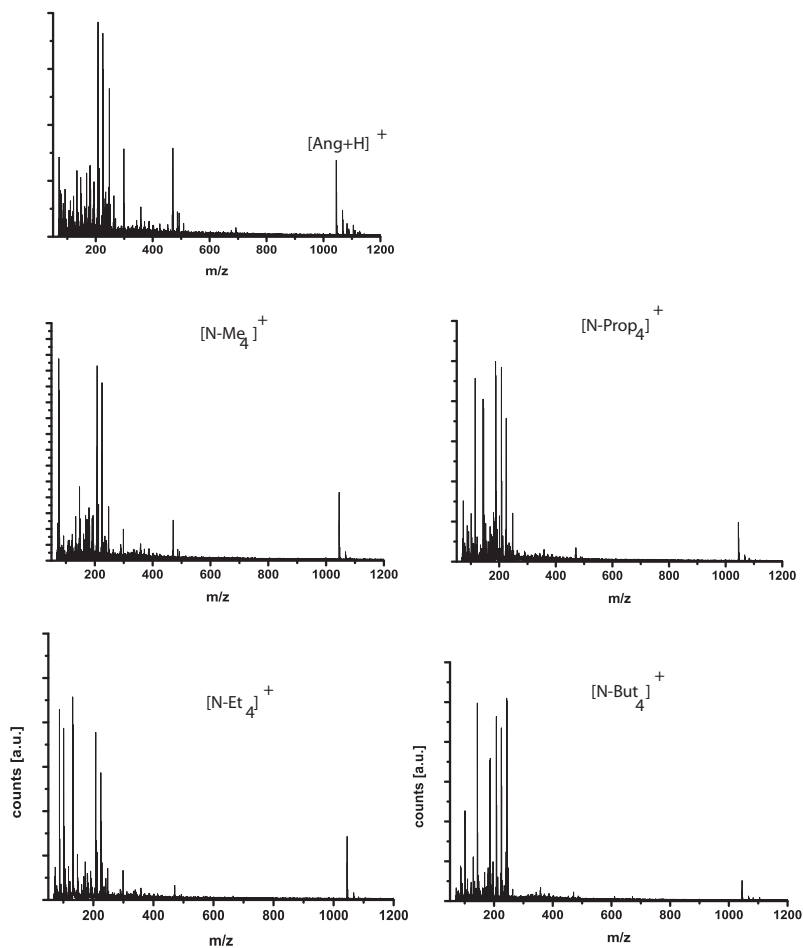


Abbildung 16.5: MSE für fs-Laserpulse der Wellenlänge von $\lambda_c=800\text{nm}$. Für diese Messungen betrug die Laserpulsenergie etwa $18\ \mu\text{J}$. Für ultrakurze Laserpulse im nahen IR ist nur eine sehr schwache Reduktion des Matrix-Ionensignals zu erkennen. Die Unterdrückung des Analyt-Ionensignals ist mit zunehmender Kettenlänge der Alkyl-Reste weiterhin zu beobachten. Zudem ist die Unterdrückung der kationisierten Analyt-Signale deutlich sichtbar, obgleich diese nicht so stark ausgeprägt ist, wie bei der Bestrahlung mit Laserpulsen im UV.

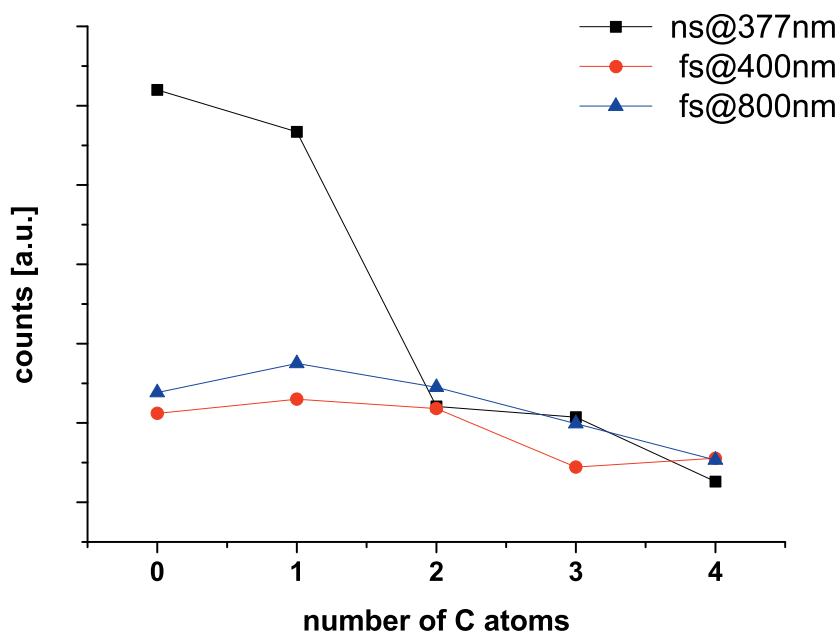


Abbildung 16.6: Das $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ -Signal als Funktion der Alkyl-Kettenlänge des TAA^+ -Kations. Auf der Ordinate ist das Analyt-Ionensignal $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ dargestellt. „0“ steht hierbei für das Ionensignal der Messung ohne Zugabe von TAAH. Die Punkte entsprechen den Mittelwerten von jeweils drei Messungen. Das Analyt-Ionensignal ist stark von der Konzentration der TAAH in der MALDI-Probe (hier TAAH/Matrix=1/500) abhängig. Jedoch gibt diese Kurve die experimentell erhalten Tendenzen richtig wieder.

fs-Laserpulse gleichermaßen zu beobachten. In Abb. 16.6 sind die Analyt-Ionensignale ($[\text{Ang}+\text{H}]^+$) für die verwendeten Tetraalkylammoniumhalogenide gezeigt. Bei einer Zugabe von Ammoniumchlorid (NH_4Cl) zur MALDI-Probe ist zwar die Kationisierung gehemmt, das Analyt-Ionensignal jedoch nur minimal reduziert. Mit zunehmender Kettenlänge der Alkyl-Reste nimmt das Analyt-Ionensignal im MALDI-Massenspektrum ab. Der Effekt des ASE ist stark vom molaren Verhältnis von TAAH zur Matrixsubstanz abhängig. Trotz des starken Einflusses der Konzentration konnte eine leichte Zunahme des ASE mit zunehmender Kettenlänge der TAAH in nahezu allen durchgeführten Messungen beobachten werden. Dieses Verhalten kann auch als Indikator für den Protonen/Kationen-Transfer von der Matrix zum Analyten in der Gasphase (MALDI-Wolke) dienen.

16.5 Zusammenfassung der experimentellen Resultate

Die experimentellen Ergebnisse zum MSE und ASE bei MALDI-MS von Angiotensin II durch verschiedene TAAH werden im Folgenden noch einmal zusammengefasst.

(i) Für geringe TAAH-Konzentrationen in der MALDI-Probe tritt der MSE nur bei einer Bestrahlung der MALDI-Probe mit ns-Laserpulsen auf. Bei einer Bestrahlung der MALDI-Probe mit fs-Laserpulsen (einer Zentralwellenlänge von $\lambda_c=400\text{nm}$ und $\lambda_c=800\text{ nm}$) ist der MSE deutlich schwächer ausgeprägt als bei der Bestrahlung mit ns-Laserpulsen der Wellenlänge von $\lambda=337\text{nm}$. Dieser Effekt tritt auch für höhere Konzentrationen der TAAH in der MALDI-Probe auf, obgleich für höhere TAAH-Konzentrationen in der MALDI-Probe auch bei einer Bestrahlung der MALDI-Probe mit fs-Laserpulsen (im UV und nahen IR) auftritt.

(ii) Für alle Typen von Laserpulsen ist ein intensives $[\text{TAA}]^+$ -Ionensignal im MALDI-Massenspektrum sichtbar. Bei der Verwendung von ns-Laserpulse ist $[\text{TAA}]^+$ der höchste Peak im Massenspektrum. Bei fs-Laserpulsen ist das $[\text{TAA}]^+$ -Ionensignal im Vergleich zum höheren Matrix-Ionensignal geringer. Eine erhöhte TAAH-Konzentration in der MALDI-Probe führt zur Zunahme des TAA^+ -Ionensignal für ns- und fs-Laserpulse

(iii) Bei Zugabe von TAAH zur MALDI-Probe wird das kationisierte Analyt-Signal von Angiotensin II aus dem MALDI-Massenspektrum stark unterdrückt und mit zunehmender Kettenlänge der TAAH geht sinkt auch das Analyt-Ionensignal ($[\text{Ang}+\text{H}]^+$) leicht. Diese Phänomene sind für alle verwendeten Typen von Laserpulsen mit unterschiedlicher Stärke zu beobachten (siehe Abb. 16.6).

(iv) Sowohl der MSE als auch der ASE steigen mit der Konzentration der TAAH in der MALDI-Probe für alle verwendeten Typen von Laserpulsen an.

Hierbei ist jedoch der Einfluss der Konzentration der TAAH in der MALDI-Probe für ASE wesentlich ausgeprägter als bei MSE.

16.6 Interpretation

Das Phänomen, dass der MSE bei Bestrahlung der Probe mit fs-Laserpulsen im UV deutlich geringer ausfällt als bei der Verwendung von ns-Laserpulsen kann in Übereinstimmung mit Kosevich et al. und Grant et al. dies dahingehend interpretiert werden, dass die TAA⁺-Kationen sich im oberen Teil der getrockneten MALDI-Probe anreichern. Im Rahmen dieser Interpretation wird davon ausgegangen, dass insbesondere fs-Laserpulse (aufgrund der veränderten Wellenlänge) in die MALDI-Probe eindringen und auch tiefer gelegene molekulare Schichten desorbieren/ablatieren und damit die chemischen und physikalischen Eigenschaften der MALDI-Wolke entscheidend verändern. Auch ein Analogon zu den FAB/SIMS Experimenten, dass die Alkylketten hydrophob wirken und sich mit zunehmender Kettenlänge stärker an die Oberfläche der Probe konzentrieren, ist möglich und würde mit der Proportionalität von Alkyl-Kettenlänge der TAAH und dem zunehmenden ASE harmonieren. Bei Betrachtung von *pre-formed ions* laut dem Lucky-Survivors-Modells wäre es denkbar, dass die zum Teil protoniert vorliegenden Analytmoleküle während der Kristallisation von der Oberfläche der Probe aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung in tiefere Schichten verdrängt werden. Der Rückgang der Kationisierung der Analytmoleküle könnte aus einer Verdrängung der Na⁺ oder K⁺-Kationen auf den oberen Schichten der MALDI-Probe resultieren. Diese Thesen müßten jedoch noch unersucht werden. Dagegen spricht allerdings das analoge Auftreten dieses Phänomens bei fs-Laserpulsen im nahen IR, da ASE auch bei einer Bestrahlung mit Laserpulsen im nahen IR auftritt. Die Unterdrückung des kationisierten Analyt-Ionensignals könnte durch eine Verdrängung der Alkalimetall-Kationen aus den oberen molekularen Schichten der MALDI-Probe erklärt werden. Diese Erklärung ist jedoch für fs-Laserpulse nicht hinreichend, da hier auch tiefer liegende Schichten desorbiert/ablatiert werden. Da die starke Vermin-

derung der Kationisierung der Analyt-Moleküle auch bei fs-Laserpulsen auftritt, kann dieses Phänomen als ein starker Hinweis für die Kationisierung der Analyt-Moleküle in der MALDI-Wolke betrachtet werden. Die in der MALDI-Wolke frei vorliegenden TAA⁺-Kationen könnten eine Kationisierung des Analyten durch elektrostatische Abstoßung wirksam unterdrücken. Über eine Verminderung der Kationisierung bei Stößen kann aber ohne weitere Experimente oder MD-Simulationen nur spekuliert werden.

Die Abnahme des gesamten Ionen-Signals durch die Beigabe von TAAH zur MALDI-Probe lässt sich zum Teil mit einer ionischen Bindung der Matrixsubstanz (SA und CHCA) und den Tetraalkylammonium-Kation erklären. Diese ionische Bindung könnte sich während der Kristallisation der MALDI-Probe ausbilden. Durch die Bildung von [(M-H)⁻·TAA⁺] läge die Matrix M schon deprotoniert vor. Damit wäre ein Teil der Matrix-Moleküle (insbesondere diejenigen, welche nahe der bestrahlten Oberfläche konzentriert sind) nicht mehr in der Lage, in der MALDI-Wolke als Protonen-Donor zu fungieren. Die molekulare Struktur eines solchen Komplex wurde mit DFT (B3LYP/6-31++G**) [131, 112, 133, 134, 135] in der Geometrie optimiert und ist in Abb. 16.7 gezeigt. Die Bindung eines deprotonierten CHCA mit einem Tetraethylammonium-Kation wurde durch die Berechnung der molekularen der Struktur gezeigt. Der Zusammenhalt beider Ionen erwies sich in MD-Simulationen als sehr stabil erwiesen. Der Abstand zwischen der COO⁻-Gruppe und der zentralen Stickstoffion ist dabei weitgehend unabhängig von der Länge des Alkylrestes.

In Übereinstimmung mit [154] ist die Bildung von [(TAA)⁺(M-H)⁻]-Kristallen möglich. Jedoch ist damit der Effekt nicht hinreichend geklärt. Weitere experimentelle und theoretische Untersuchungen werden notwendig sein, um den Einflüsse der TAAH auf MSE und ASE hinreichend zu erklären.

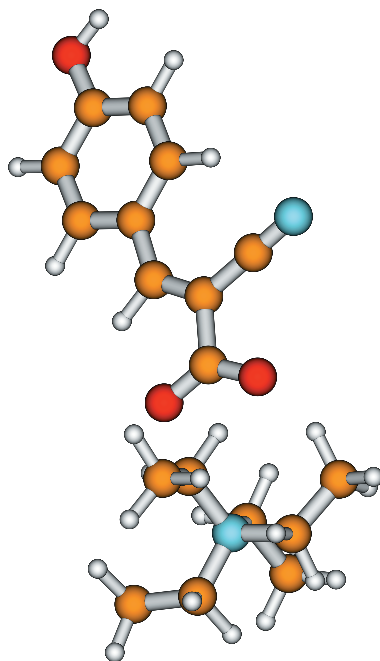


Abbildung 16.7: **Die molekulare Struktur von deprotoniertem CHCA und Tetraethylammonium-Kation** $[(\text{CHCA-H})^- \cdot \text{N-Et}_4^+]$. Diese molekulare Struktur wurde mit einer MD-Simulation und anschließender Geometrieoptimierung via DFT (B3LYP/6-31++G**) durchgeführt. Die Ausrichtung der COO^- -Gruppe ist zum positiv geladenen Stickstoff des Tetraethylammonim-Kation (unten) hin gerichtet. Die Struktur des deprotonierten Matrixmoleküls ist planar.

Kapitel 17

Phthalocyanine in der Gasphase

17.1 Stand der Forschung

Die Substanzklasse der Phthalocyanine (Pc) ist seit ihrer ersten expliziten Erwähnung im frühen 20. Jahrhundert ein intensives Forschungsfeld, wie eine fast unüberschaubare Anzahl von Publikationen bezeugt. Phthalocyanine sind aufgrund ihres ausgedehnten π -Elektronensystems (siehe Abb. 17.1) intensiv gefärbt. Daher sind Phthalocyanine als Pigmente und Farbstoffe weit in unserer Lebenswelt verbreitet. Zum Beispiel ist die bläuliche Farbe einer (beschreibbaren) DVD auf eine Phthalocyaninschicht auf einem Metallfilm zurückzuführen. Darüber hinaus haben sich in den letzten Jahren viele weitere Anwendungsbereiche von Phthalocyanin und deren Derivaten entwickelt. In vielen industriellen Erzeugnissen [162, 163], in der Tumorthherapie (Photodynamische Therapie) [164], als optische Schalter [165] und in der Katalyse (z.B. [166]); um nur eine kleine Auswahl zu nennen. Trotz ihres weitreichenden Anwendungsspektrums sind Phthalocyanine auch in jüngster Zeit Gegenstand intensiver Grundlagenforschung. Diese erstrecken sich über Untersuchungen zur Kristallisation (via Röntgenstrukturanalyse und quantenchemischen Methoden) [167], der Molekülgeometrie [168], der elektronischen Struktur des Zentralatoms und dessen Auswirkungen auch die chemischen und physikali-

schen Eigenschaften. Durch die Verbindung von mehreren (ggf. substituierten) PcX-Molekülen (X bedeutet hier ein zweifach in der Mitte gebundenes Zentralatom z.B. Fe^(II)) lassen sich eine Reihe neuartiger Materialien entwickeln, welche vielversprechende Eigenschaften aufweisen. In einem Großteil der Studien betrachtet man (substituierte) Phthalocyanine in Lösung oder als Feststoff. Die Untersuchung in der Gasphase, z.B. Massenspektrometrie mittels MALDI oder ESI sind auf eine geringe Anzahl von Arbeiten beschränkt, z.B. [169, 170, 171]. Da Phthalocyanine bis zu einer Temperatur von etwa T=500°C nicht zerfallen, können sie durch Erwärmung (z.B. mit Laserpulsen) leicht in die Gasphase gebracht werden. Das Absorptionsspektrum (in Abb. 17.2 gezeigt) der Phthalocyanine ist in Lösung (CH₂Cl₂) zwischen $\lambda=600\text{nm}$ und $\lambda=700\text{nm}$ beschränkt, als ein dünner Film erstreckt sich die Absorption jedoch auf das gesamte sichtbare Spektrum [162].

17.2 Beschreibung der Experimente

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Phthalocyanine mittels MALDI und Laser Desorption/Ionization (LDI) in die Gasphase gebracht werden um sie massenspektrometrisch zu analysieren. Im Vergleich zu vielen fragilen Substanzen (z.B. Peptiden) welche nur mittels MALDI untersucht werden, sind Phthalocyanine gegenüber thermischer Fragmentierung stabil, was es erlaubt, die Analytsubstanzen sowohl mit - als auch ohne zusätzliche Matrix zu untersuchen. Dies eröffnet zudem die Möglichkeit der Aufklärung von Fragmentierungswegen bei Bestrahlung mit fs-Laserpulsen hoher Pulsenergie im nahen IR. Da bei einer LDI-MS-Analyse keine Matrix-Peaks im unteren m/z-Bereich des Massenspektrums entstehen (siehe Abb. 17.3), ist eine einfache Analyse der entstehenden Fragmente der PcX (Phthalocyanene mit und ohne Zentralatom) möglich. Um einige experimentelle Ergebnisse besser interpretieren zu können, werden zusätzlich quantenchemische Rechnungen durchgeführt.

Da die Analyse von Phthalocyaninen sowohl durch MALDI-MS als auch durch LDI-MS erfolgen kann, werden nachfolgend beide Proben-

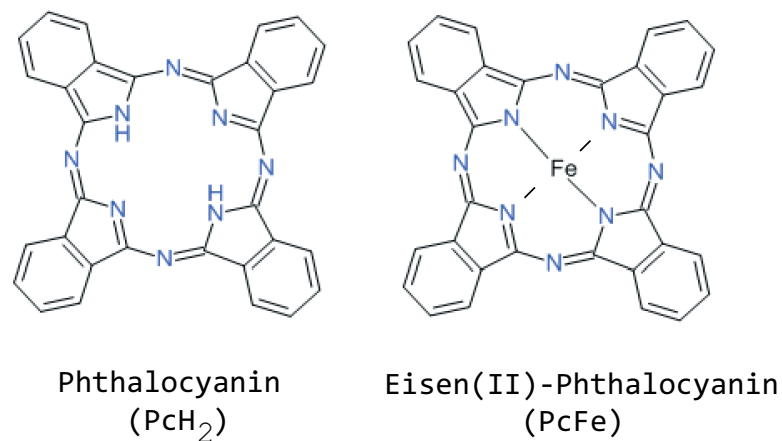


Abbildung 17.1: **Die molekulare Struktur von Phthalocyanin und Eisen(II)-Phthalocyanin.** Das ausgedehnte π -System erklärt die starke Färbung der Phthalocyanine. Bei Metallo-Phthalocyaninen sind die beiden nach innen gerichteten Protonen durch das zweifach gebundene Metallatom ersetzt. Als Beispiel wird auf der rechten Seite Eisen(II)-Phthalocyanin gezeigt. Die zwei zusätzlichen verkürzten (schwarzen) Bindungen zwischen dem Eisenatom und den benachbarten Stickstoffatomen sollen auf die Isomerie in der elektronischen Struktur des Phthalocyanins hinweisen.

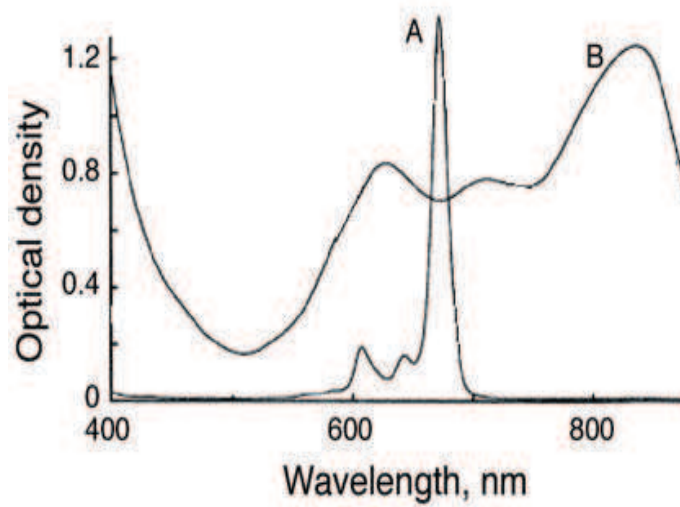


Abbildung 17.2: **Charakteristisches UV-Vis-Absorptionsspektrum eines typischen Metallo-Phthalocyanin.** (A) zeigt das Spektrum in Lösung und (B) als dünner Film. Während in der Lösung noch einzelne Absorptions-Peaks zwischen $\lambda=600\text{nm}$ und $\lambda=700\text{nm}$ sichtbar sind, zeigt Phthalocyanin als dünne Schicht ein breites Absorptionsspektrum über den gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich. Quelle: [162]

Präparationsmethoden vorgestellt.

LDI-MS Etwa 100 mg der jeweiligen Phthalocyanin-Substanz wurden in 5 ml ACN/H₂O (30:70 v:v) gelöst/emulgiert. Eine gleichmäßige Emulsion wurde durch eine Stunde langes, starkes Rühren gewährleistet. Danach wurden etwa 2 μ L dieser Emulsion auf einen Probensteller pipetiert und unter einem Föhn etwa 20 Minuten durch einen warmen Luftstrom getrocknet. Anschließend wurde die Probe im Abzug bei Raumtemperatur eine Stunde abgekühlt, bevor sie in die Vakuumkammer des MALDI-TOF eingebracht wurde.

MALDI-MS Für die MALDI-Messungen von Phthalocyanin wurde die in dieser Arbeit verwendete Mischung aus CHCA und SA verwendet. Die (20mg/ml) Phthalocyanin-Lösung/Emulsion wurde nochmal 1:500 (in 30% ACN in H₂O) verdünnt. Es wurde die Seed-Layer-Methode zur Probenpräparation angewandt. Nach dem Trocknen wurde diese Probe in die Vakuumkammer des MALDI-TOF eingebracht. Eine MALDI-Probe mit Phthalocyaninen besitzt eine starke Neigung zu „hot-spots“. Dies deutet darauf hin, dass die Phthalocyanine aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit während der Kristallisation der MALDI-Probe zur Akkumulation neigen, da die ungelösten Partikel als Kristallisationskeime fungieren.

17.3 MALDI- und LDI-Massenspektren von Eisen(II)-Phthalocyanin

Für einen Vergleich von LDI und MALDI-Massenspektren wurde Eisen(II)Phthalocyanin (PcFe) mit MALDI-MS und mit LDI-MS analysiert. Zur Bestrahlung wurden sowohl ns-Laserpulse als auch fs-Laserpulse der Zentralwellenlänge $\lambda_c=400\text{nm}$ verwendet. Im MALDI-Massenspektrum sind neben dem Phthalocyanin-Ionensignal viele Matrix-Peaks im niedrigen m/z-Bereich sichtbar. Für das in Abb. 17.3 gezeigte MALDI-Massenspektrum wurde eine niedrige Pulsenergie gewählt, so dass Fragmentierung von Phthalocyanin nur einen unbedeutenden Beitrag zum Ionensignal unterhalb von

$m/z=500$ beitragen sollte. Ungleich den anderen beschriebenen MALDI-MS Experimenten mit Peptiden tritt kein zusätzliches $[\text{PcFe}+\text{H}]^+$ -Ionensignal sondern nur ein $[\text{PcFe}]^+$ -Ionensignal im MALDI-Massenspektrum auf. Eine Zugabe von KCl oder CsCl zur MALDI-Probe erzeugt kein zusätzliches kationisiertes Analyt-Ionensignal wie $[\text{PcFe}+\text{K}]^+$ oder $[\text{PcFe}+\text{Cs}]^+$. Das Fehlen protonierter und kationisierter Phthalocyanin-Signale ist ein starker Hinweis, dass bei MALDI kein Ladungstransport von der Matrix zum Analyten stattfindet. Dieses Verhalten zeigt sich auch für viele Metallo-Phthalocyanine. Als eine weitere Besonderheit des MALDI-Massenspektrums ist eine starke PcFe-Dimer-Bildung zu beobachten (Massenpeak bei $m/z=1148$ und mit geringem Signal bei $m/z=1132$). Die Dimer-Bildung ist im LDI-Massenspektren wesentlich schwächer. Das Dimer-Ionensignal ist vom Zentralatom des Phthalocyanins abhängig. Bei Phthalocyanin (PcH_2) ist das Dimer-Signal deutlich schwächer z.B. als beim Eisen(II)-Phthalocyanin (PcFe). Die Dimerbildung bei PcFe erfolgt (meist) über ein Verbindungsglied, welches die Masse von $m=16$ Da besitzt. Weitere Untersuchungen sprechen für eine Sauerstoff-Brücke zwischen beiden Eisenatomen.

17.4 Bindung von Sauerstoff an Eisen(II)-Phthalocyanin

In gezeigten MALDI- und den LDI-Massenspektren tritt ein um $m/z=16$ verschobenes Signal $[\text{PcFe}+16]^+$ mit hoher Intensität neben dem $[\text{PcFe}]^+$ -Signal auf. Dieser zusätzliche Massenpeak wird als die Adaption eines Sauerstoff-Atoms durch das Eisen-Atom angenommen, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von V. N. Nemykin et al. [172]. Dabei wird angenommen, dass dabei das $\text{Fe}^{(II)}$ zu $\text{Fe}^{(IV)}=\text{O}$ oxidiert wird. Die Bindung von Sauerstoff an das Zentralatom tritt laut den durchgeführten Experimenten nur bei Eisen(II)-Phthalocyanin und nicht bei Zink(II)- oder Kupfer(II)-Phthalocyanin auf. Als Quelle für den Sauerstoff wird die Absorption des Sauerstoffs durch die Luft angenommen (Photooxidation). Die Bindung eines Sauerstoffatoms aus dem Lösungsmittel erscheint dagegen unwahrscheinlich, da der beschriebene

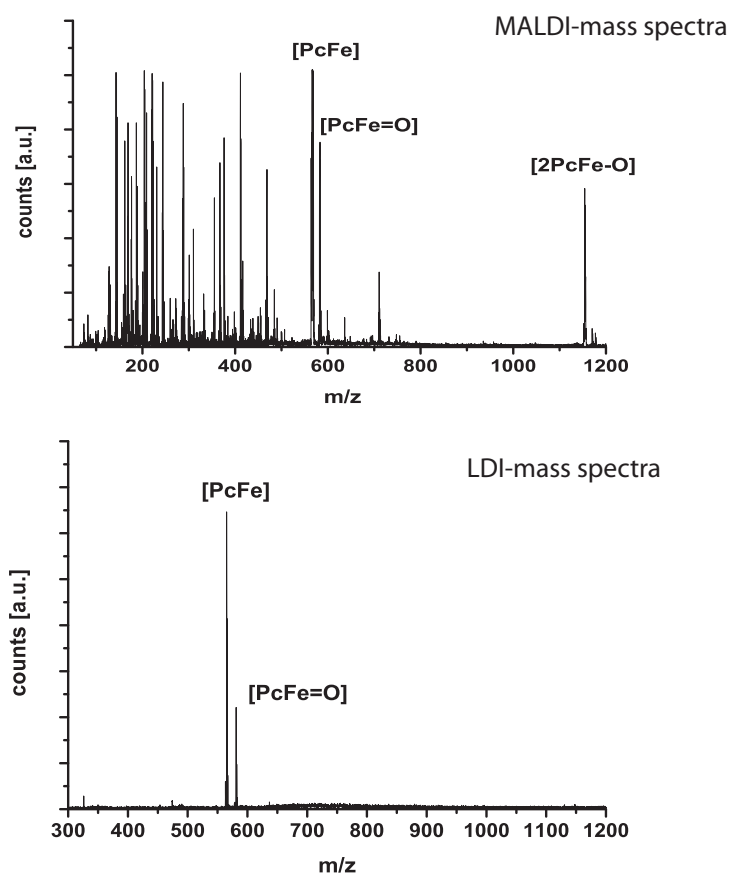


Abbildung 17.3: **Vergleich eines MALDI-Massenspektrum und eines LDI-Massenspektrums von PcFe.** Die Proben wurden mit ns-Laserpulsen einer Laserpulsenergie von $E=2\mu\text{J}$ bestrahlt. Beim MALDI-Massenspektrum ist im unteren m/z -Bereich eine Vielzahl von Massenpeaks zu erkennen, welche eine nachfolgende Analyse, beispielsweise der Fragmentierung, stark erschweren würde. Im LDI-Massenspektrum ist nur $[\text{PcFe}]^+$ bei $m/z=568$ und $[\text{PcFe}+\text{O}]^+$ bei $m/z=584$ sichtbar. Die Bildung von $[\text{PcFe}-\text{O}-\text{FePc}]^+$, im MALDI-Massenspektrum deutlich zu erkennen, ist bei der LDI-Messung nur sehr schwach ausgeprägt.

ne Effekt auch bei Verwendung von Toluol ($C_6H_5-CH_3$) als Lösungsmittel auftritt. In welchem Maße Sauerstoff aus der Luft absorbiert wird bleibt noch zu klären. Anstelle des Sauerstoffatoms könnte sich auch eine Amin-Gruppe ($-NH_2$) an das Eisen(II)-Zentralatom eines PcFe-Monomers binden und das Eisenatom von $Fe^{(II)}$ zu $Fe^{(III)}$ oxidieren. Eine Berechnung der elektronischen Struktur ließ sich mit der Methode der DFT (BP86/SVP) für die $-NH_2$ -Gruppe nicht zur (SCF-) Konvergenz bringen während die Struktur $[PcFe=O]^+$ ohne Schwierigkeiten konvergiert. Eine (mittels DFT) in ihrer Geometrie optimierte Molekülstruktur von $[PcFe=O]^+$ ist in Abb. 17.5 gezeigt.

17.5 Bindung von Sauerstoff an Phthalocyanin

Bei MALDI- und LDI-Massenspektren von Phthalocyanin (PcH_2) ist ein weiterer Massenpeak im Abstand von $(m/z)=32$ bei Phthalocyanin (siehe Abb. 17.3) zu sehen. Analog der Bildung von $[PcFe=O]^+$ könnte ein Sauerstoffmolekül (O_2 durch eine Wasserstoff-Brückenbindung an das Phthalocyanin-Molekül adaptiert sein. Eine stabile Struktur für PcH_2-O_2 konnte jedoch nicht ermittelt werden. Auch in diesem Falle scheint das vermeintliche Sauerstoff-Molekül aus der Luft aufgenommen worden zu sein. Die Adaption von Sauerstoff konnte nur mit PcFe und mit keinem anderen getesteten Metallophthalocyanin nachgewiesen werden.

17.6 Die Dimer-Bindung bei MALDI am Beispiel von Eisen(II)-Phthalocyanin

Eisen(II)-Phthalocyanine und andere Porphyrine/PcX-Derivate werden als Katalysatoren in vielen chemischen und biochemischen Reaktionen eingesetzt. Einige Studien schlagen in diesem Zusammenhang eine Adaption eines Sauerstoffatoms an das Eisen-Atom vor [173, 174]. In

MALDI-Massenspektren ist zusätzlich eine Dimerstruktur bei $m/z=1148$ $[2\cdot\text{PcFe}+16]^+$ und ein Massenpeak bei $m/z=1132$ $[2\cdot\text{PcFe}]^+$ mit erheblich geringerer Intensität zu erkennen. Der $[2\cdot\text{PcFe}]^+$ -Dimer könnte durch eine van der Waals-Bindung von einem geladenen und einem ungeladenen PcFe-Molekül entstehen. Der PcFe-Dimer bei $m/z=1148$ kann durch die Bildung einer μ -Oxo-Brücke zwischen den Zentralatomen beider Eisen(II)-Phthalocyanine erklärt werden. Dieser könnte z.B. durch die Bindung von $[\text{PcFe}=\text{O}]^+$ und einem (ungeladenen) PcFe-Molekül realisiert sein. Dabei entstehen aus einem $\text{PcFe}^{(VI)}=\text{O}$ und einem $\text{PcFe}^{(II)}$ ein $[\text{PcFe}^{(III)}-\text{O}-\text{Fe}^{(III)}\text{Pc}]^+$ -Komplex. Eine Reihe von Studien unterstützt diese Existenz von $[\text{PcFe}^{(III)}-\text{O}-\text{Fe}^{(III)}\text{Pc}]^+$ durch NMR oder Moessbauer-Spektroskopie z.B. [175, 172]. Das Dimer-Ionensignal ist bei MALDI deutlich höher. In LDI-Massenspektren tritt nur eine sehr schwache Dimer-Bildung ($[2\cdot\text{PcFe}]^+$ und $[2\cdot\text{PcFe}+16]^+$) auf. So könnte die Matrix eine Puffer-Wirkung ausüben, so dass auch instabile PcFe-Dimere unbeschadet in die Gasphase gelangen können.

In Abb. 17.4 ist die Bildung von $[\text{PcFe}]^+$ und $[\text{PcFe}-\text{O}-\text{PcFe}]^+$ bei MALDI-MS als Funktion der Pulsenergie dargestellt. Dabei steigt das $[\text{PcFe}]^+$ -Ionensignal kontinuierlich mit der Pulsenergie. Der Anstieg des Dimer-Ionensignals ist dagegen erheblich schwächer und einer Pulsenergie von $E \approx 20 \mu\text{J}$ nimmt die Höhe des Dimer-Ionensignals wieder ab. Die Dimerbildungstendenz ($[\text{PcFe}]^+ / [\text{PcFe}-\text{O}-\text{PcFe}]^+$) als Funktion der Pulsenergie ist in Abb. 17.6 dargestellt. Das Maximum der Dimer-Bildungstendenz ist bei der Bestrahlung der MALDI-Probe (PcFe) mit fs-Laserpulsen der Zentralwellenlänge von $\lambda_c=400\text{nm}$ bei $E_{max}=5\mu\text{J}$ und zeigt für höhere Pulsenergien einen stetigen Rückgang. Dieser Effekt tritt auch für andere Laserpulstypen auf. Die Stabilität ist die durch Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem zentralen Sauerstoffatom und der beiden $\text{Fe}^{(III)}$ -Atomen gegenüber einer van der Waals-Bindung (ohne die Adaption von Sauerstoff) deutlich erhöht, wie MD-Simulationen mit hohen Anfangsenergien (Temperatur-Einstellungen) ergaben. Da die Dimerbildung insbesondere bei MALDI auftritt und da sich die μ -Oxo-Brücke in MD-Simulationen als bis zu Temperatur-Werten

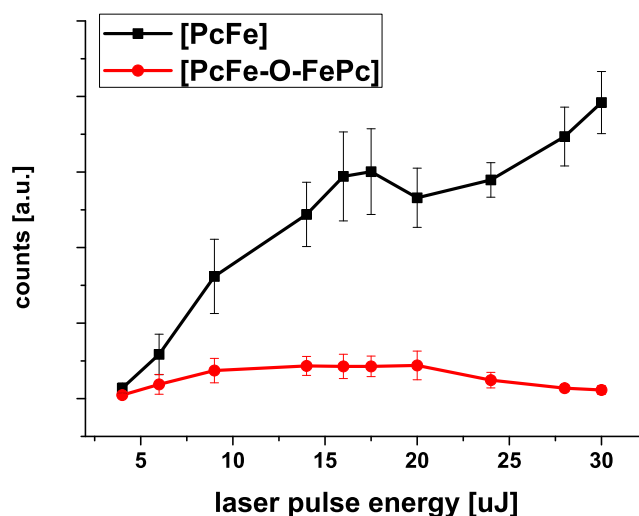


Abbildung 17.4: Das $[\text{PcFe}]^+$ und $[2\text{-PcFe-O}]^+$ -Ionensignal als Funktion der Pulsenergie. Für die gezeigten Signalintensitäten wurden MALDI-Spektren von PcFe analysiert. Die MALDI-Probe wurde mit fs-Laserpulsen bestrahlt. Deutlich zu erkennen ist der deutlich stärkere Anstieg des Ionensignals Monomers im Vergleich zum Ionensignal Dimer mit einem Anstieg der Pulsenergie.

von etwa 800K als stabil erweist, besteht die Möglichkeit, dass die Synthese von $[\text{PcFe-O-PcFe}]^+$ aus $[\text{PcFe}]$ und $[\text{PcFe=O}]^+$ während der Desorption/Ablation auftritt. Weitere Studien stehen dazu jedoch noch aus.

17.7 Die molekulare Struktur von $[\text{PcFe}^{(IV)}\text{-O-Fe}^{(IV)}\text{Pc}]^+$

Für die Berechnung der Struktur von $[\text{PcFe-O-FePc}]^+$, wurde eine MD-Simulation mit anschließender DFT-Geometrieoptimierung (BP68/SVP) durchgeführt. Die resultierende Struktur ist in Abb. 17.7 abgebildet. Durch die kovalente Bindung der beiden PcFe über das Sauerstoffatom ragen beide Fe-Atome aus der Ebene heraus. Die μ -Oxo-Brücke ist leicht gekrümmt. Weitere durchgeführten Rechnungen zeigen eine ähnliche Molekülstruktur. Die Sauerstoff-Bindung ist sehr stabil gegenüber thermischen Schwingungen, wie

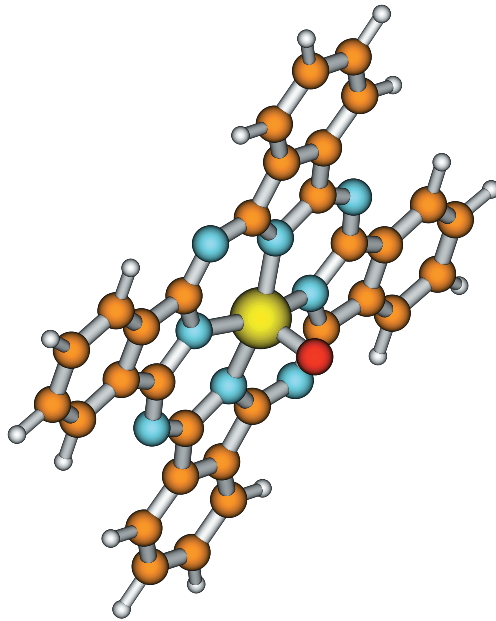


Abbildung 17.5: **Molekulare Struktur von Sauerstoff-adaptierem Eisen(II)-Phthalocyanin** Die Struktur wurden durch eine MD-Simulation mit anschließender Geometrieoptimierung via DFT (BP86/SVP) berechnet. Durch das Sauerstoff-Atom (rot) wird die planar berechnete Struktur des PcFe kaum verändert. Die Sauerstoff-Bindung steht orthogonal zur Ebene der PcFe-Struktur.

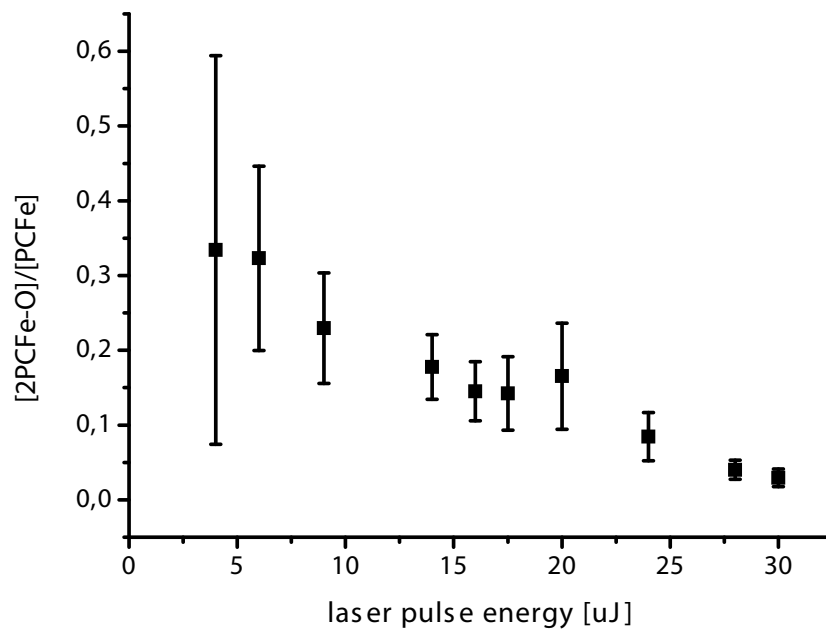


Abbildung 17.6: $[2\cdot\text{PcFe-O}]/[\text{PcFe}]$ als **Funktion der Laserpulsenergie**. Hier wurde eine MALDI-Probe mit PcFe mit fs-Laserpulsen der Zentralwellenlänge von $\lambda_c=400\text{nm}$ bestrahlt. Für höhere Pulsenergien sinkt die Neigung zur Dimer-Bildung, da die Dimerstrukturen ggf. zerfallen, oder während der Desorption/Ablation nicht gebildet werden.

MD-Simulationen mit Temperatur um die $T=1000\text{K}$ zeigen.

17.8 Die Fragmentierung von Phthalocyaninen bei LDI-MS

Die Kenntnis der Fragmentierung von Phthalocyanin und deren Derivaten ist aufgrund der weiten Verbreitung dieser Substanzen als Farbstoffe von großem Interesse, da es auch bei langer Einwirkung von Sonnenlicht zu Photofragmentierung kommen kann. Die Prozesse aufzuklären kann ein Beitrag zur Entwicklung besonders beständiger Farbstoffe beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Fragmentierung anhand von Phthalocyanin und Eisen(II)-Phthalocyanin dargestellt werden. Für hohe Laserpulsenergien enthalten LDI-Massenspektren von (Metallo-) Phthalocyaninen (PcX) einige Massenpeaks unterhalb der PcX-Masse, die durch Fragmentierung von dem entsprechenden PcX oder eventuellen Verunreinigung entstehen. Dies erlaubt eine leichte Untersuchung der Fragmentierung ohne großen experimentellen Aufwand. Für die nachfolgend gezeigten LDI-Massenspektren wurde PcH_2 und PcFe mit fs-Laserpulsen einer Zentralwellenlänge von $\lambda_c=800\text{nm}$ bestrahlt und die entstehenden Ionen im Massenspektrometer analysiert. Die Pulsenergie betrug $E=20\mu\text{J}$. Laserpulse im nahen IR werden durch die LDI-Probe gut absorbiert, wie das hohe detektierte Ionensignal belegt.

Die Abbildungen 17.8 (PcH_2) und 17.9 (PcFe) zeigen im oberen Teil die jeweiligen LDI-Massenspektren. Im unteren Teil sind Vorschläge für die Fragmentierung aufgrund der Massen der detektierten Fragment-Ionen gezeigt. Dabei wird von einer einfachen positiven Ladung der Fragmente ausgegangen (molekulare Masse= m/z -Wert). Die m/z -Werte der auftretenden Fragmente sind je nach zentral gebundenem Metallatom unterschiedlich. Dies gilt nicht nur für PcFe sondern auch für andere untersuchte Metallo-Phthalocyanine mit einem Zentralatom wie Vanadium, Zink oder Kupfer.

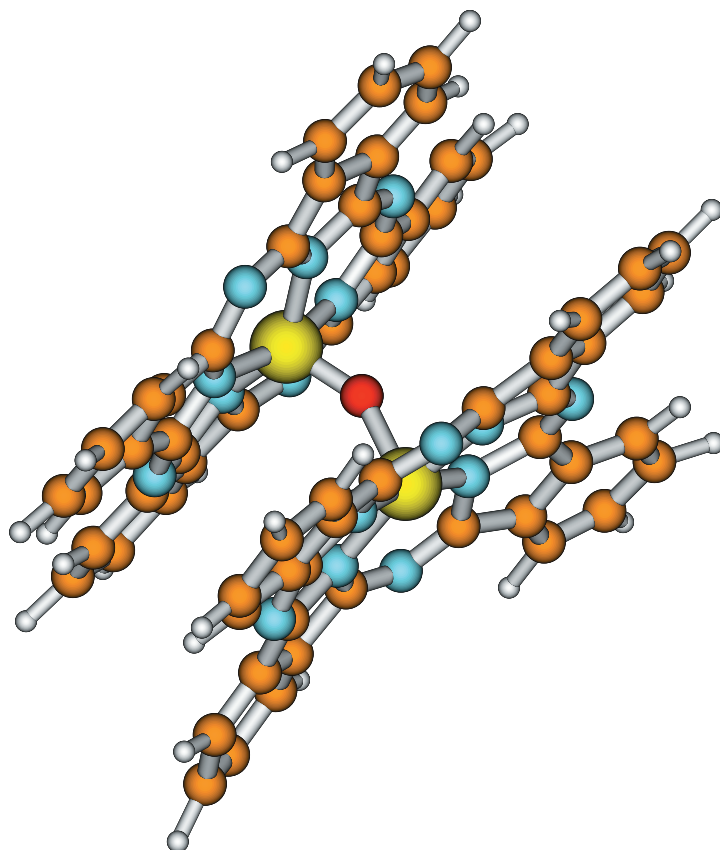


Abbildung 17.7: **Molekulare Struktur vom μ -Oxo-Dimer von Eisen-Phthalocyanin.** Die Struktur wurde durch eine DFT-Rechnung (BP86/SVP) optimiert. Die kovalenten Fe-O-Bindungen sind nicht auf einer Linie. Dies hat einen Einfluss auf die Molekülstruktur der PcFe-Moleküle. Diese Asymmetrie durch die gewinkelte μ -Oxo-Brücke tritt auch bei anderen Berechnungsmethoden (wie Kraftfeldmethoden, AM1) auf.

17.8.1 Fragmentierung von Phthalocyanin (PcH_2)

Im LDI-Massenspektrum von LDI treten neben dem $[\text{PcH}_2]^+$ -Massenspeak auch Signale bei $m/z=101$, bei $m/z=129$ auf. Abb. 17.8 zeigt die möglichen Fragmente Cyanobenzol und 1-Imino-Isoindol. Beide Fragmente konnten somit einer molekularen Struktur zugeordnet werden. Ob diese Fragmente durch Photoionisation oder durch Zerfall eines metastabilen Zustandes in der Gasphase resultieren, konnte mit der vorhandenen Apparatur nicht ermittelt werden.

17.8.2 Fragmentierung von Eisen(II)-Phthalocyanin (PcFe)

Anhand des Beispiels von PcFe soll die Fragmentierung von Metallo-Phthalocyaninen untersucht werden. In LDI-Massenspektren treten nur Fragmente mit anderen m/z -Werten als im LDI-Massenspektrum von PcH_2 auf. Die Fragmente im LDI-Spektrum sind bei $m/z=156$, bei $m/z=184$, bei $m/z=209$, bei $m/z=224$ und bei $m/z=328$ zu finden, wobei das Ionensignal bei $m/z=184$ am höchsten ist. Bei der Zuordnung der Massenpeaks zu Molekülstrukturen kann nicht zwischen Fragmenten von $[\text{PcFe}]^+$ und $[\text{PcFe=O}]^+$ unterschieden werden. In einem PSD-MALDI-Massenspektrum (mit der LIFT-Methode aufgenommen, siehe Kap. 14.4) konnten die Fragmente von $[\text{PcFe}]^+$ (Muttermasse 568) bei m/z -Werten von 184 und 312 und 552 bestimmt werden. So ist das Fragment 184 höchstwahrscheinlich aus einem metastabilen Zerfall von $[\text{PcFe}]^+$ entstanden. Die bei anderen Fragmenten kann keine Entscheidung getroffen werden, da die experimentellen Parameter zu unterschiedlich sind (LDI vs. MALDI, 355nm-ns-Laserpulse vs. 800nm-fs-Laserpuls). Beim Fragment bei $m/z=156$ könnte aus der Fragmentierung von $[\text{PcFe=O}]^+$ oder bei einer photoresonanten Fragmentierung während der Desorption/Ablation entstanden sein. In Abb. 17.9 wird ein Vorschlag für die photoresonante Fragmentierung von PcFe gezeigt. Molekulare Strukturen für die Fragmente bei $m/z=209$, $m/z=224$, $m/z=328$ (im LDI-Massenspektrum) oder bei $m/z=312$ (im PSD-MALDI-Massenspektrum)

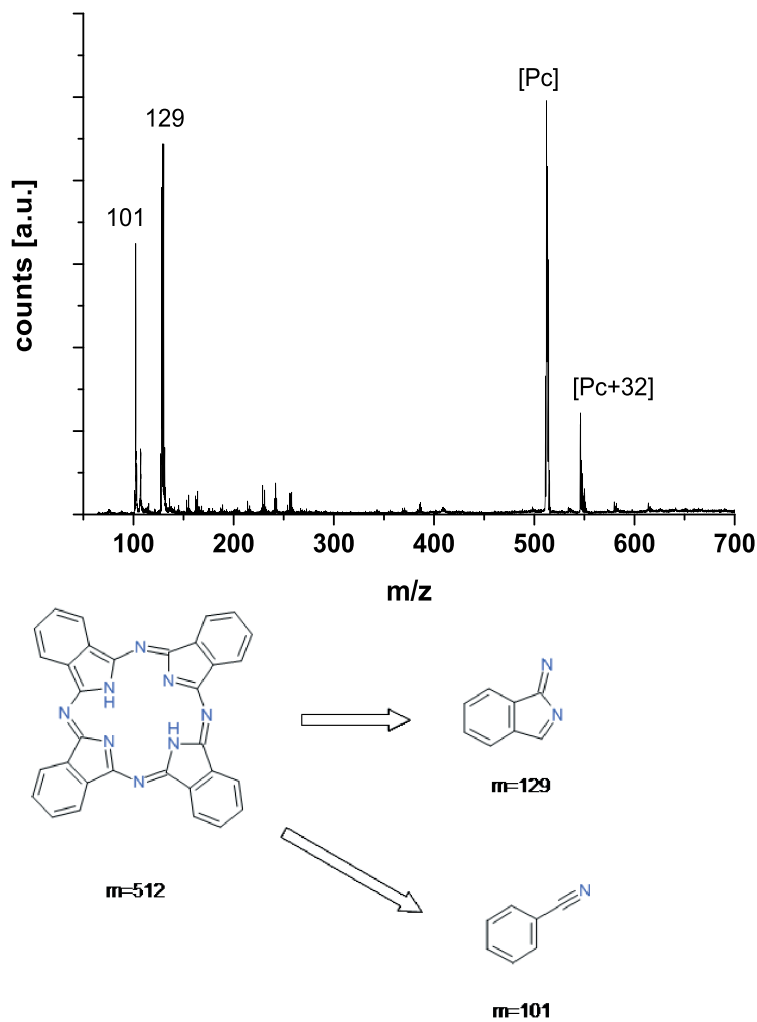


Abbildung 17.8: **Fragmentierung von Phthalocyanin.** Oben ist das LDI-Massenspektrum von PcH_2 gezeigt. Die Probe wurde mit fs-Laserpulsen der Zentralwellenlänge $\lambda_c=800\text{nm}$ und einer Pulsenergie von $E=20\mu\text{J}$ bestrahlt. Die Bestrahlung erzeugt zwei Fragmente bei $m/z=101$ (Cyanobenzol) und $m/z=129$ (1-Imino-Isoindol).

konnten nicht ermittelt werden.

17.9 Interpretation der Ergebnisse

Phthalocyanine können sowohl mittels MALDI als auch via LDI in die Gasphase gebracht werden. Die positiv geladenen Ionen werden höchstwahrscheinlich durch die Emission eines Elektrons aus dem ausgedehnten π -System erzeugt durch die Absorption eines Photons ausgelöst. Es ist anzunehmen, dass dieses Schema unabhängig vom Vorhandensein einer Matrixsubstanz (CHCA oder SA) ist. Durch die Einbettung von PcFe in eine MALDI-Matrixsubstanz ist eine verstärkte Dimer-Bildung zu beobachten. Diese Dimer-Bildung bei LDI-MS wesentlich schwächer, unabhängig der Laserpulsenergie. Dies ist ein starker Hinweis für die Pufferwirkung der Matrix während der Desorption/Ablation bei MALDI. Die Matrixsubstanz trägt wesentlich zum mechanischen Schutz der Analytmoleküle beim Übergang in die Gasphase bei. Zusätzliche Massenpeaks im Abstand von $m/z=16$ (für PcFe) und $m/z=32$ (bei PcH_2) deutet auf eine Adaption von Sauerstoff aus der Luft hin. Die Kombination von $[\text{PcFe}=\text{O}]^+$ mit einem (neutralen) PcFe-Molekül könnte zur Bildung einer Dimerstruktur $[\text{PcFe}^{(III)}-\text{O}-\text{Fe}^{(III)}\text{Pc}]^+$ beitragen. Dabei gehen die Fe-Zentralatome von zweiwertigen- und vierwertigen Oxidationszustand in den dreiwertigen Oxidationszustand über.

Die Fragmentierung mittels LDI (und PSD-MALDI) legt nahe, dass eine Anregung der Pc-Moleküle zu einem metastabilen Zustand führt und dieser im Massenspektrometer zerfällt. Die LDI-Analyse weiterer Metallo-Phthalocyanine gibt zusätzliche Hinweise darauf, dass ein Teil der Anregungsenergie auch auf das Zentralatom übertragen wird.

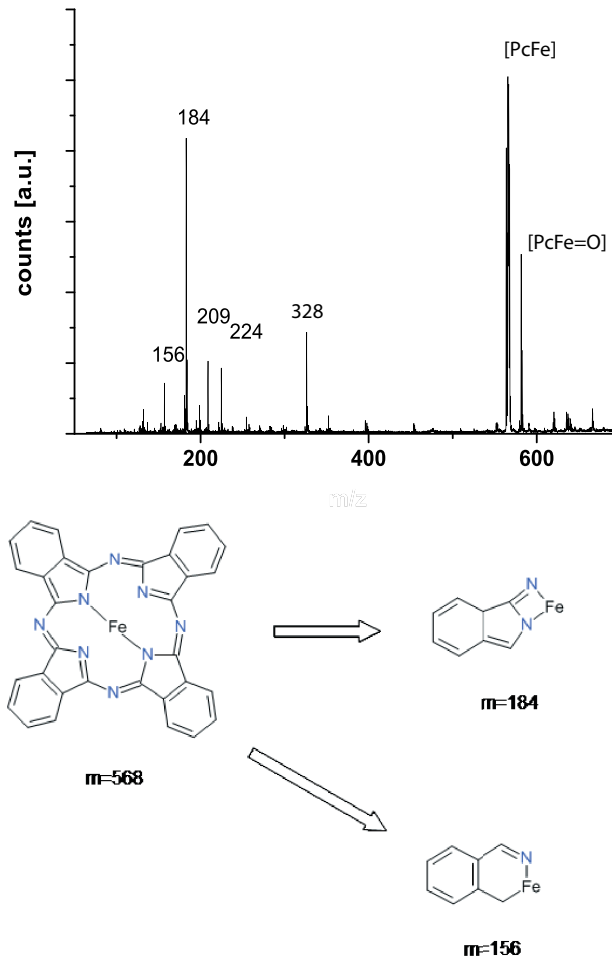


Abbildung 17.9: **Die Fragmentierung von Eisen(II)-Phthalocyanin.** Im oberen Teil der Abbildung ist das LDI-Massenspektrum von PcFe sichtbar. Die Probe wurde mit fs-Laserpulsen der Zentralwellenlänge $\lambda_c=800\text{nm}$ und einer Pulsenenergie von $E=20\mu\text{J}$ bestrahlt. Deutlich sind der $[\text{PcFe}]^+$ bei $m/z=568$ und das Sauerstoff-adaptierte Eisen(II)-Phthalocyanin bei $m/z=584$ sichtbar. Weitere Fragmente sind z.B. bei $m/z=184$, bei $m/z=209$, bei $m/z=224$ und bei $m/z=328$ sichtbar. Im unteren Teil sind Vorschläge für die Fragmentierung von $[\text{PcFe}]^+$ aufgeführt.

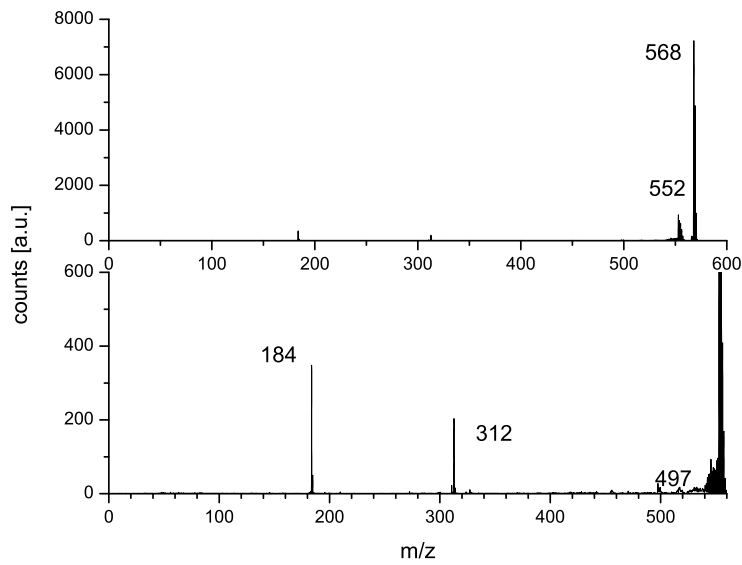


Abbildung 17.10: **Ein PSD-Massenspektrum von Eisen(II)-Phthalocyanin.** Dieses PSD-Massenspektrum wurde mit der LIFT-Methode erstellt (siehe Kap. 14.4). Hierfür wurde der Analyt (PcFe) in eine MALDI-Matrix eingebettet und mit ns-Laserpulsen der Wellenlänge $\lambda=355\text{nm}$ bestrahlt. Als Muttermasse diente $m/z=568$. Im unteren Teil ist der m/z -Bereich bis 500 vergrößert gezeigt. Beide Fragmente ($m/z=184$ und $m/z=323$) sind auch im LDI-Massenspektrum sichtbar.

Kapitel 18

Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden MALDI-Massenspektren durch Bestrahlung der MALDI-Probe mit ns-Laserpulsen ($\lambda=337\text{nm}$) und fs-Laserpulsen im UV ($\lambda_c=400\text{nm}$) und nahen IR ($\lambda_c=800\text{nm}$) erzeugt. Die resultierenden Massenspektren weisen die gleichen protonierten und kationisierten Analyt-Massenpeaks auf. Die Abhängigkeit des Analyt-Ionensignals von der Pulsenergie zeigt für alle eingesetzten Laserpulse ein analoges Verhalten. Der Nachweis von Ionensignal nach der Bestrahlung mit ultrakurzen Laserpulsen im nahen IR ist aufgrund der verschwindend geringen Absorption der verwendeten Matrix im nahen IR zunächst überraschend. Durch eine Variation der Pulsdauer von $\tau=120\text{fs}$ bis $\tau=6\text{ps}$ konnte jedoch das Auftreten von Analyt- und Matrix-Ionensignal durch zweiphotonische Absorption erklärt werden. Dies deutet auf einen gemeinsamen MALDI-Prozess nach einer Bestrahlung der Probe mit ns- und fs-Laserpulsen, ungeachtet der Wellenlänge und der Pulsdauer, hin. Durch Experimente mit ultrakurzen Laserpulsen konnten Studien bestätigt werden, welche eine direkte Abhängigkeit der Höhe des Ionensignals mit der Absorption der Laserpulse durch die Matrix suggerierten. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die (von M. Karas vorgeschlagene) Photoionisation der Matrixmoleküle (im Clusterverbund) durch die Absorption von Photonen nach der Desorption/Ablation nur einen sehr geringen Beitrag zum Ionensignal erbringt.

Die quantitative Untersuchung der Kalium-Adaption (Kationisierung) des

Analyten (Angiotensin II) als Funktion der Pulsenergie (und im Falle von ultrakurzen Laserpulsen im nahen IR mit unterschiedlichen Pulsdauern) zeigten einen starken Anstieg der Kationisierung mit Zunahme der Pulsenergie. Für ultrakurze Laserpulse einer Zentralwellenlänge von $\lambda_c=800\text{nm}$ wurde die Abhängigkeit von der Pulsenergie E und der Pulsdauer τ zu $\frac{[\text{Ang}+\text{K}]^+}{[\text{Ang}+\text{H}]^+} \propto \frac{E^{2\pm 0,2}}{\tau^{0,47\pm 0,1}}$ ermittelt. Für hohe Werte der Pulsenergie nimmt das Analyt-Ionensignal aufgrund von Fragmentierung der Analytmoleküle und ggf. weiteren Gründen wieder ab.

Für eine zusätzliche Untersuchung der Kationisierung wurde die Methode der Kohärenten Kontrolle erstmalig auf den MALDI-Prozess zur Optimierung der K^+ -Adaption des Analyten angewandt. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass nur die Pulsdauer und die Pulsenergie einen wesentlichen Einfluss auf die Kationisierung des Analyten während MALDI besitzen. Die starke Abhängigkeit der Kationisierung des Analyten von den Laserpulsparametern deutet auf eine Kationisierung der Analytmoleküle nach der Desorption/Ablation durch Stöße in der MALDI-Wolke hin. Nahezu alle Resultate stehen im Einklang mit dem Pooling-Modell der Ionisierung.

Weitere Untersuchungen galten der Position des zusätzlichen Protons und der Cs^+ -Kationen am Angiotensin II. Hierbei konnte eine Kombination von PSD-MALDI-Massenspektren und Geometrieoptimierungen von $[\text{Ang}+\text{H}]^+$, $[\text{Ang}+\text{Cs}]^+$, $[\text{Ang}+2\text{Cs}-\text{H}]^+$ und $[\text{Ang}+3\text{Cs}-2\text{H}]^+$ einige der Phänomene geklärt werden. Das zusätzliche Proton befindet sich meist am Arginin-Rest und verändert die Molekülgeometrie des Angiotensin II nur leicht. Eine Adaption von einem (oder mehreren) Cs^+ -Kation(en) verändert die Struktur von einer weitgehend linearen Struktur zu einer Käfig-artigen Struktur um das (die) Cs^+ -Kation(en) herum. Dabei scheint die Wechselwirkung des Kations mit den zyklischen Aminosäureresten die molekulare Struktur zu stabilisieren. Diese Stabilisierung zeigte sich zudem in MD-Simulationen, bei welchen sich Cs^+ -adaptiertes Angiotensin II erheblich stabiler gegenüber Fragmentierung erwies.

Durch die Zugabe von geringen Mengen Tetraalkylammoniumhalogeniden (TAAH) zur MALDI-Probe wurde der Matrix-Suppression-Effekt und

der Analyt-Suppression-Effekt mit verschiedenen Laserpulstypen untersucht. Laserpulse hoher Pulsenergie und niedriger Absorption zeigten eine wesentlich geringere Reduktion des Matrix-Ionensignals als gut absorbierte Laserpulse geringer Pulsenergie. Analog verhält sich die Reduktion des Analyt-Ionensignals, welches zusätzlich mit zunehmender Alkyl-Kettenlänge sinkt. Die These von Kosevich et al., dass die starke Wirkung der TAAH auf eine Konzentration der TAA^+ an der Oberfläche zurückzuführen sei, konnte bestätigt werden.

Im letzten Teil der Arbeit wurden Phthalocyanin (PcH_2) und Eisen(II)-Phthalocyanin (PcFe) mittels LDI und MALDI untersucht. Dabei konnte eine Adaption von Sauerstoff an das zentrale Fe-Atom beobachtet werden. Bei MALDI zeigte sich zusätzlich eine Dimer-Bildung, wobei der m/z -Wert des Dimers auf die Ausbildung einer Sauerstoff-Brücke hindeutet. Aus $[\text{PcFe}^{(II)}]$ und $[\text{PcFe}^{(IV)}=\text{O}]^+$ könnte sich eine solche μ -Oxo-Brücke formen. Das Ionensignal von $[\text{PcFe}^{(III)}-\text{O}-\text{Fe}^{(III)}\text{Pc}]^+$ ist bei MALDI deutlich stärker als bei LDI. Dies scheint auf die Pufferwirkung der Matrixsubstanz während der Desorption zurückzuführen zu sein, so dass die Dimere gegen Fragmentierung geschützt werden.

All diese Resultate über den MALDI-Prozess stehen in Einklang mit dem Pooling-Modell der primären und sekundären Ionisation, während das Lucky-Survivors-Modell in wesentlichen Teilen den experimentellen Resultaten schwerlich stand hält.

Trotz dieser Resultate bleiben eine Reihe von Möglichkeiten, um mit den vorhandenen Mitteln den MALDI-Prozess und das Verhalten von großen Molekülen in der Gasphase zu untersuchen.

Durch Anwendung der kohärenten Kontrolle könnten bei einer Reduktion der Signalschwankung noch eine Vielzahl von Fragen zur Absorption und zum Verhalten in der MALDI-Wolke beantwortet werden. Zudem könnte auch der Pooling-Mechanismus bei Matrix-Clustern in der Gasphase (z.B. in einem Molekularstrahl) untersucht werden.

Die Kationisierung anderer Analytmoleküle durch MALDI könnte in Verbindung mit den angewandten quantenchemischen Methoden die Bindung von Metallatomen an beispielsweise biologisch relevante Substanzen in der Gasphase experimentell zugänglich machen. Insbesondere die Konformationsänderung der Analytmoleküle könnte hier zu spannenden Resultaten führen.

Die Fragmentierung von Farbstoffen durch Absorption von Laserpulsen ist mit den zu Verfügung stehenden Mitteln effektiv und einfach durchführbar. Diese Untersuchungen könnten helfen, neuartige Farbstoffe zu entwickeln, welche beispielsweise nicht durch Lichteinwirkung verblassen.

Semi-empirische MD-Simulationen zu Vorgängen in der MALDI-Wolke könnte den Ladungstransfer in der Gasphase veranschaulichen. Ein besseres Verständnis der Protonierung/Kationisierung der Matrix- und Analytmoleküle könnte zur Entwicklung von neuartigen Matrixsubstanzen beitragen. Als ein Anwendungsgebiet wäre die MALDI-Analyse von DNS zu erwähnen, da die Adaption von Alkalimetall-Kationen eine Analyse von MALDI-Massenspektren wesentlich erschwert.

Die vorhandenen Mittel gestatten sicherlich darüber hinaus noch eine Vielzahl spannender Experimente.

Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

- [1] M. Karas, B. Bachmann, and F. Hillenkamp. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.*, 57:2934 – 2939, 1985.
- [2] M. Karas and U. Bahr. Laser desorption mass spectrometry. *Trends in Anal. Chem.*, 5:90 – 93, 1986.
- [3] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, and F. Hillenkamp. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. of Mass Spectrom. and Ion Proc.*, 78:53 – 68, 1987.
- [4] M. Karas and F. Hillenkamp. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.*, 60:2299 – 2301, 1988.
- [5] R. C. Beavis and B. T. Chait. Rapid, sensitive analysis of protein mixtures by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6873 – 6877, 1990.
- [6] J. Gobom, E. Nordhoff, E. Mirgorodskaya, R. Ekman, and P. Roepstorff. Sample purification and preparation technique based on nanoscale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 34:105 – 116, 1999.
- [7] K. Hjiermo and O. N. Jensen. *MALDI-MS in Protein Chemistry and Proteomics in MALDI-MS (A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, chapter 3, pages 83 – 108. Wiley VCH, 2007.

-
- [8] L. Hughes, M. F. Wyatt, B. K. Stein, and A. G. Brenton. Investigation of solvent-free maldi-tofms sample preparation methods for the analysis of organometallic and coordination compounds. *Anal. Chem.*, 81:543 – 550, 2009.
- [9] U. Bahr, A. Deppe, M. Karas, F. Hillenkamp, and U. Giessmann. Mass spectrometry of synthetic polymers by uv-matrix-assisted laser desorption/ionization. *Anal. Chem.*, 64:2866 – 2869, 1992.
- [10] S. D. Hanton. Mass spectrometry of polymers and polymer surfaces. *Chem. Rev.*, 101:527 – 589, 2001.
- [11] M. W. F. Nielen. Maldi time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers. *Mass Spectrom. Rev.*, 18:309 – 344, 1999.
- [12] M. Barber, R. S. Bardoli, R. D. Sedgwick, and A. H. Tyler. Fast atom bombardement quadrupol mass spectrometry. *J. Chem. Soc. (Chem Comm.)*, 7:325 – 326, 1981.
- [13] W. Aberth, K. M. Straub, and A. L. Burlingame. Secondary ion mass spectrometry with cesium ion primary beam and liquid target matrix for analysis of bioorganic compounds. *Anal. Chem.*, 54:2029 – 203, 1982.
- [14] M. Mann, C. K. Meng, and J. B. Fenn. Interpreting mass spectra of multiply charged ions. *Anal. Chem.*, 61:1702 – 1708, 1989.
- [15] J. B. Fenn, M. Mann, and C. K. Meng. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246:64 – 72, 1989.
- [16] J. F. de la Mora, G. J. van Berkel, and C. G. Enke. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 35:939 – 952, 2000.
- [17] R. J. Cotter. Laser mass spectrometry: an overview of techniques, instruments and applications. *Anal. Chim. Acta*, 195:45 – 59, 1987.

- [18] F. Berkenkamp, F. Kirpekar, and F. Hillenkamp. Infrared maldi mass spectrometry of large nucleic acids. *Science*, 281:260, 1998.
- [19] R. Skelton, F. Dubois, and R. Zenobi. A maldi sample preparation method suitable for insoluble polymers. *Anal. Chem.*, 72:1707 – 1710, 2000.
- [20] S. Berkenkamp, C. Menzel, M. Karas, and F. Hillenkamp. Performance of infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with lasers emitting in the 3 μm wavelength regime. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 11:1399 – 1406, 1997.
- [21] B. Spengler, M. Hubert, and R. Kaufmann. Maldi ion imaging and biological ion imaging with a new scanning uv-laser microscope. In *Proceedings of the 42nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, Illinois, May 29 - June 3, 1994*.
- [22] J. C. Jurchen, S. S. Rubakim, and J. V. Sweedler. Maldi-ms imaging of features smaller than the size of the laser beam. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16:1654 – 1659, 2005.
- [23] B. Spengler, D. Kirsch, and R. Kaufmann. Fundamental aspects of postsources decay in matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. 1. residual gas effects. *J. Chem. Phys.*, 96:9678 – 9864, 1992.
- [24] B. Spengler, D. Kirsch, and R. Kaufmann. Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 5:198 – 202, 1991.
- [25] B. Spengler. Post-source decay analysis in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules. *J. Mass Spectrom.*, 32:1019 – 1036, 1997.
- [26] R. Knochenmuss. Ion formation in uv-maldi. *The Analyst*, 131:966, 2006.

-
- [27] V. Karbach and R. Knochenmuss. Do single matrix molecules generate primary ions in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 12:968, 1998.
- [28] R. Knochenmuss and L. V. Zhigilei. Molecular dynamics simulations of maldi: laser fluence and pulse width dependence of plume characteristics and consequences for matrix and analyte ionization. *J. Mass Spectrom.*, 45:333–346, 2010.
- [29] R. Knochenmuss and L. V. Zhigilei. Molecular dynamics model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including ionization processes. *J. Phys. Chem. B*, 109:22947 – 22957, 2005.
- [30] E. W. Schlag, H. L. Selzle, P. Schanen, R. Weinkauff, and R. D. Levine. Dissociation kinetics of peptide ions. *J. Phys. Chem. A*, 110:8497–8500, 2006.
- [31] A. Vogel and V. Venugopalan. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chem. Rev.*, 103:577 – 644, 2003.
- [32] A. Rohlfiing, Ch. Menzel, L. L. Kukreja, F. Hillenkamp, and K. Dreisewerd. Photoacoustic analysis of matrix-assisted laser desorption/ionization processes with pulsed infrared lasers. *J. Phys. Chem. B*, 107:12275 – 12286, 2003.
- [33] K. Dreisewerd. The desorption process in maldi. *Chem. Rev.*, 103:395 – 425, 2003.
- [34] K. Strupat, M. Karas, and F. Hillenkamp. 2,5-dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *Int. J. of Mass Spectrom.*, 111:89 – 102, 1991.
- [35] V. Horneffer, K. Dreisewerd, H.-C. Luedemann, F. Hillenkamp, M. Laege, and K. Strukat. 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. of Mass Spectrom.*, 185/186/187:859 – 870, 1999.

- [36] R. C. Beavis and J. N. Bridson. Epitaxial protein inclusion in sinapic acid crystals. *Appl. Phys.*, 26:442 – 447, 1993.
- [37] S. Trimpin, S. Keune, H. J. Räder, and K. Müllen. 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.
- [38] F. Lotterspeich and H. Zorbas. *Bioanalytik*. Spektrum Verlag, 1998.
- [39] P. Demirev, A. Westmann, C. T. Reimann, P. Hakansson, D. Barofsky, and B. U. R. Sundquist. Matrix-assisted laser desorption with ultra-short laser pulses. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 6:187 – 191, 1992.
- [40] M. R. Papantonakis, J. Kim, W. P. Hess, and R. F. Haglund Jr. What do matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra reveal about ionization mechanisms. *J. of Mass Spectrom.*, 37:639 – 547, 2002.
- [41] K. Dreisewerd, S. Berkenkamp, A. Leisner, A. Rohlfing, and C. Menzel. Fundamentals of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with pulsed infrared lasers. *Int. J. of Mass Spectrom.*, 226:198 – 209, 2003.
- [42] A. Overberg, M. Karas, and F. Hillenkamp. Matrix-assisted laser desorption of large biomolecules with a tea-co₂-laser. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 5:128 – 132, 1991.
- [43] K. J. Wu, A. Steding, and C. H. Becker. Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 7:142–146, 1993.
- [44] X. Chen, J. A. Carroll, and R. C. Beavis. Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 9:885 – 891, 1998.

-
- [45] K. Tang, S. L. Allman, R. B. Jones, and C. H. Cheng. Comparison of rhodamine dyes as matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.*, 27:1389, 1992.
- [46] L. C. Chen, D. Asakawa, H. Hori, and K. Hiraoka. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using visible laser. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 21:4129 – 4134, 2007.
- [47] J. J. A. van Kampen, P. C. Burgers, R. de Groot, and M. Luiders. Qualitative and quantitative analysis of pharmaceutical compounds by maldi-tof. *Anal. Chem.*, 78:5403, 2006.
- [48] J. J. van Kampen, T. M. Luiders, P. J. A. Ruttink, and P. C. Burgers. Metal ion attachment to the matrix meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin, related matrices and analytes: an experimental and theoretical study. *J. Mass Spectrom.*, 2009.
- [49] A. Vertes, R. Gijbels, and R. D. Levine. Homogenous bottleneck model of matrix-assisted ultraviolet laser desorption of large molecules. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 4:228 – 234, 1990.
- [50] R. Knochenmuss and A. Vertes. Time-delayed 2-pulse studies of maldi matrix ionization mechanisms. *J. Phys. Chem. B*, 104:5406 – 5410, 2000.
- [51] A. Ingendoh, M. Karas, and F. Hillenkamp. Factors affecting the resolution in matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, 131:345, 1994.
- [52] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, and F. Hillenkamp. Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with uniform beam profile. *Int. J. of Mass Spectrom. and Ion Proc.*, 141:127 – 148, 1995.

- [53] L. V. Zhigilei and B. J. Garrison. Microscopic mechanisms of laser ablation of organics solids in the thermal and stress confinement irradiation regimes. *J. App. Phys.*, 88:1281 – 1298, 2000.
- [54] L. V. Zhigilei and B. J. Garrison. Mechanisms of laser ablation from molecular dynamics simulations: dependence on the initial temperature and pulse duration. *Appl. Phys. A*, 69:75 – 80, 1999.
- [55] G. Westmacott, W. Ens, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd, and M. Schürrenberg. The influence of the laser fluence on ion yield in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Int. J. of Mass Spectrom.*, 221:67 – 81, 2002.
- [56] P. Y. Yau, T. W. Dominic Chan, P. W. Cullis, A. W. Colburn, and P. J. Derrick. Threshold fluences for production of positive and negative ions in matrix-assisted laser desorption/ionization using liquid and solid matrices. *Chem. Phys. Lett.*, 202:93 – 100, 1993.
- [57] A. P. Quist, T. Huth-Fehre, and U. R. Bo. Total yield measurements in matrix-assisted laser assisted laser desorption using a quartz crystal microbalance. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 8:149 – 154, 1994.
- [58] K. Riahi, G. Bolbach, A. Brunot, F. Bereton, M. Spiron, and J.-C. Blais. Influence of laser focussing in matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 8:242 – 247, 1994.
- [59] C. D. Mowry and M. V. Johnston. Internal energy of neutral molecules ejected by matrix-assisted laser desorption. *J. Phys. Chem.*, 98:1904, 1994.
- [60] A. A. Puretzky, D. B. Geohegan, G. B. Hurst, M. V. Buchanan, and B. S. Luk'yackuk. Imaging of vapor plumes produced by matrix assisted laser desorption: A plume sharpening effect. *Phys. Rev. Lett.*, 83:444 – 448, 1999.
- [61] P. Juhasz, M. L. Vestal, and S. A. Martin. On the initial velocity of ions generated by matrix-assisted laser desorption ionization and its effect on

-
- the calibration of delayed extraction time-of-flight mass spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 8:209 – 217, 1997.
- [62] M. Glückmann and M. Karas. 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.
- [63] M. Glückmann and M. Karas. 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.
- [64] B. Spengler and V. Bökelmann. Angular and time resolved intensity distributions of laser-desorbed matrix ions. *Nucl. I. Meth. Phy. Res. B*, 82:379 – 385, 1993.
- [65] A. I. Gusev. Interfacing matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with column and planar separations. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366:691 – 700, 2000.
- [66] D. R. Miller. *Atomic and Molecular Beam Methods*. Oxford University Press, Oxford, 1988.
- [67] R. Knochenmuss. A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *J. of Mass Spectrom.*, 37:867 – 877, 2002.
- [68] E. Stevenson, K. Breuker, and R. Zenobi. Internal energies of analyte ions generated from different matrix-assisted laser desorption/ionization matrices. *J. Mass Spectrom.*, 35:1035 – 1041, 2000.
- [69] B. Spengler and D. Kirsch. 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. of Mass Spectrom.*, 226:71 – 83, 2003.

- [70] M. Karas, M. Glückmann, and J. Schäfer. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J. of Mass Spectrom.*, 35:1 – 12, 2000.
- [71] M. Karas and R. Krüger. Ion formation in maldi: The cluster ionization mechanism. *Chem. Rev.*, 103:427–439, 2003.
- [72] H. Ehring, M. Karas, and F. Hillenkamp. Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.*, 27:472 – 480, 1992.
- [73] R. Knochenmuss. A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including analyte ion generation. *Anal. Chem.*, 75:2199 – 2207, 2003.
- [74] H. Ehring and B. U. R. Sundquist. Studies of the maldi process by luminescence spectroscopy. *J. Mass Spectrom.*, 30:1303 – 1310, 1995.
- [75] H. Ehring and B. U. R. Sundquist. Excited state relaxation process of maldi-matrices studied by luminescence spectroscopy. *Appl. Surf. Sci.*, 96:577 – 580, 1996.
- [76] H.-C. Lüdemann, R. W. Redmond, and F. Hillenkamp. Singlet-singlet annihilation in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization studied by fluorescence spectroscopy. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 16:1287 – 1294, 2002.
- [77] P. Setz and R. Knochenmuss. Exciton mobility and trapping in a maldi matrix. *J. Phys. Chem. A*, 109:4030 – 4037, 2005.
- [78] D. Kuck. Half a century of scrambling in organic ions: complete, incomplete, progressive and composite atom interchange. *Int. J. of Mass Spectrom.*, 213:101 – 144, 2001.
- [79] F. L. Brancia, M. Stener, and A. Magistrato. A density functional theory (dft) study on gas-phase proton transfer reactions of derivized and

- underivatized peptide ions generated by matrix-assisted laser desorption ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 20:1327 – 1333, 2009.
- [80] E. Stevenson, K. Breuker, and R. Zenobi. Internal energies of analyte ions generated from different matrix-assisted laser desorption/ionization matrices. *J. Mass Spectrom.*, 25:1035 – 1041, 2000.
- [81] D. Yao, C. Jenkins, K. Prater, and G. R. Kinsel. International conference on laser probing, leuven, belgium. 2002.
- [82] S. C. Carr and C. J. Cassady. Gas-phase basicities of histidine and lysine and their selected di- and tripeptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 7:1203 – 1210, 1996.
- [83] S. R. Carr and C. J. Cassady. Reactivity and gas-phase acidity determinations of small peptide ions consisting of 11 to 14 amino acid residues. *J. Mass Spectrom.*, 32:959 – 967, 1997.
- [84] X. Zhang and C. J. Cassady. Apparent gas-phase acidities of multiply protonated peptide ions: Ubiquitin, insulin b and renin substrate. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 7:1211 – 1218, 1996.
- [85] D. S. Gross and E. R. Williams. Structure of gramicidin s ($m+h+x$)²⁺ ions ($x=li, na, k$) probed by proton transfer res. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:202 – 204, 1996.
- [86] A. G. Harrison. The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides. *Mass Spectrom. Rev.*, 16:201 – 217, 1997.
- [87] M. Mormann, S. Bashir, P. J. Derrick, and D. Kuck. Gas-phase basicities of the isomeric dihydroxybenzoic acids and gas-phase acidities of their readical cations. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 11:544 – 552, 2000.
- [88] R. D. Burton, C. H. Watson, J. R. Eyler, G. L. Lang, D. H. Powell, and M. Y. Avery. Proton affinities of eight matrices used for matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 11:443 – 446, 1997.

- [89] K. Breuer, R. Knochenmuss, and R. Zenobi. Gas-phase basicities of deprotonated matrix-assisted laser desorption/ionization matrix molecules. *Int. J. Mass Spectrom.*, 184:25 – 38, 1999.
- [90] R. J. J. M. Steenvoorden, K. Breuker, and R. Zenobi. The gas-phase basicities of matrix-assisted laser desorption/ionization matrices. *Europ. J. Mass Spectrom.*, 3:339 – 346, 1997.
- [91] C. W. P. Williams and P. A. Limbach. Matrix influence on the formation of positively charged oligonucleotides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, 193:15 – 27, 1999.
- [92] F. Dubois, R. Knochenmuss, R. J. J. M. Steenvoorden, K. Breuker, and R. Zenobi. On the mechanism and control of salt-induced resolution loss in matrix-assisted laser desorption/ionization. *Europ. J. Mass Spectrom.*, 2:167 – 172, 1996.
- [93] R. Krueger, A. Pfenninger, I. Fournier, M. Glueckmann, and M. Karas. analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes. *Anal. Chem.*, 73:5812 – 5821, 2001.
- [94] L. V. Zhigilei, P. B. S. Kodali, and B. J. Garrison. Molecular dynamics model for laser ablation and desorption of organic solids. *J. Phys. Chem. B*, 101:2028 – 2037, 1997.
- [95] L. V. Zhigilei and B. J. Garrison. Velocity distributions of analyte molecules in matrix-assisted laser desorption/ionization from computer simulations. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 12:1273 – 1277, 1998.
- [96] A. Verentchikov, I. Smirnov, and M. L. Vestal. In *Proceedings of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, Texas, June 13 - 17, 1997*.

-
- [97] M. Karas, U. Bahr, I. Fournier, M. Grückmann, and A. Pfenninger. The initial-ion velocity as a marker for different desorption-ionization mechanisms in maldi. *Int. J. Mass Spectrom.*, 226:239 – 248, 2003.
- [98] A. N. Krutshinsky, A. I. Dolguine, and M. A. Khodorkovski. Matrix-assisted laser desorption ionization of neutral clusters composed of matrix and analyte molecules. *Anal. Chem.*, 67:1963 – 1967, 1995.
- [99] A. Meffert and J. Grotemeyer. Reactions in molecular clusters: proton transfer to small amino. *Europ. J. Mass Spectrom.*, 1:594 – 598, 1995.
- [100] C. M. Land and G. R. Kinsel. Investigation of the mechanism of intracuster proton transfer from sinapic acid to biomolecular analytes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 9:1060 – 1067, 1998.
- [101] C. M. Land and G. R. Kinsel. The mechanism of matrix to analyte proton transfer in clusters of 2,5-dhb and the tripeptide vpl. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12:726 – 731, 2001.
- [102] A. Meffert and J. Grotemeyer. Dissociative proton transfer in cluster ions: clusters of aromatic carboxylic acids with amino acids. *Int. J. Mass Spectrom.*, 210:521 – 530, 2001.
- [103] R. S. Brown and J. J. Lennon. Sequence-specific fragmentation of matrix-assisted laser desorbed protein/peptide ions. *Anal. Chem.*, 67:3990 – 3999, 1997.
- [104] A. K. Rappe, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard, and M. W. Skiff. Uff, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:10024 – 10035, 1992.
- [105] C. J. Casewit, K. S. Colwell, and A. K. Rappe. Applications of a universal force field to organics molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:10035 – 10046, 1992.

- [106] C. J. Casewit, K. S. Colwell, and A. K. Rappe. Application of a universal force field to main group compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:10046 – 10053, 1992.
- [107] A. Szabo and N. S. Ostlund. *Modern Quantum Chemistry*. Dover Publications, Inc. Mineola, New York, 1989.
- [108] M. J. S. Dewar and W. Thiel. Ground states of molecules 38. the mndo method. approximations and parameters. *J. Am. Chem. Soc.*, page 4899, 1977.
- [109] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Helay, and J. J. P. Steward. Am1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.*, 107:3902 – 3909, 1985.
- [110] P. Hohenberg and W. Kohn. Inhomogenous electron gas. *Physical Review*, 136(3B):864 – 871, 1964.
- [111] W. Kohn and L. J. Sham. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review*, 140(4A):1133 – 1138, 1965.
- [112] A. D. Becke. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A*, 38(6):3098 – 3100, 1988.
- [113] J. P. Perdew. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev. B*, 33(12):8822 – 8824, 1986.
- [114] O. Vahtras, J. Almlöf, and M. W. Feyereisen. Integral approximations for lcao-scf calculations. *Chem. Phys. Lett.*, 213:514, 1993.
- [115] K. Eichkorn, O. Treutler, H. Öhm, M. Häser, and H. Ahlrichs. Auxiliary basic sets to approximate coulomb potentials. *Chem. Phys. Lett.*, 242:652, 1995.
- [116] A. Yariv and P. Yeh. *Optical Waves in Crystals: Propagation and Control of Laser Radiation*. Wiley-Interscience, New York, 1983.

-
- [117] A. M. Weiner, J. P. Heritage, and E. M. Kirschner. High-resolution femtosecond pulse shaping. *J. Opt. Soc. Am B*, 5:1563 – 1859, 1988.
- [118] J. C. Diels, J. Fontaine, I. McMichael, and S. Simoni. Controll and measurement of ultrashort pulse shapes (in amplitude and phase) with femtosecond accuracy. *Appl. Optics*, 24:1270, 1985.
- [119] J. C. Diels and W. Rudolphs. *Ultrashort Laser Pulse Phenomena*. Academic Press, San Diego, 1996.
- [120] K. W. DeLong and R. Trebino. Improved ultrashort pulse-retrieval algorithm for frequency-resolved optical grating gating. *J. Opt. Am. A*, 11:2429, 1994.
- [121] R. S. Judson and H. Rabitz. Teaching lasers to control molecules. *Phys. Rev. Lett.*, 68(10):1500 – 1503, 1992.
- [122] I. Rechenberg. *Evolutionstrategie*. Friedrich Frommann Verlag Stuttgart, 1973.
- [123] H. Schwefel. *Numerische Optimierung von Computer-Modellen mittels Evolutionstrategien*. Birkhäuser Verlag Basel/Stuttgart, 1977.
- [124] J. Holland. *Artificial Genetic Adaption in Computer Control Systems*. PhD thesis, University of Michigan, 1971.
- [125] D. Goldberg. *Genetic Algorithms in Search*. Adison Wesley, Reading, MA, 1989.
- [126] G. Toth, A. Lörincz, and H. Rabitz. The effect of control field and measurement imprecision on laboratory feedback-control of quantum systems. *J. Chem. Phys.*, 101:3715, 1994.
- [127] C. D. Calvano, S. Carulli, and F. Palmisano. Aniline/ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid is a highly versatile ionic liquid for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 23:1659 – 1668, 2009.

- [128] A. Tholey and E. Heinzle. Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry - applications and perspectives. *Anal. Bioanal. Chem*, 386:24–37, 2006.
- [129] Falko Schwaneberg. Zeitaufgelöste messungen an der matrixgestützten desorption und ionisation von angiotensin ii. Master's thesis, Freie Universität Berlin, 2009.
- [130] K. Eichkorn, F. Weigend, O. Treutler, and R. Ahlrichs. A auxiliary basis sets for main row atoms and transition metals and their use to approximate coulomb potentials. *Theor. Chem. Acc.*, 97:119, 1997.
- [131] C. Lee, W. Yang, and R. G. Parr. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, 37:785, 1988.
- [132] R. Krishnan, J. S. Binkley, R. Seeger, and J. A. Pople. Self-consistent molecular orbital methods. xx. a basis set for correlated wave functions. *J. Chem. Phys.*, 72:650 – 654, 1980.
- [133] A. D. McLean. Contracted gaussian basis sets for molecular calculations. i. second row atoms z=11-18. *J. Chem. Phys.*, 72:5639 – 5648, 1980.
- [134] L. A. Curtis, M. P. McGrath, J.-P. Blaudeau, N. E. Evans, R. C. Binning, and L. Randon. Extension of gaussian-2 theory to molecules containing third-row atoms ga-kr. *J. Chem. Phys.*, 103:6104 – 6113, 1995.
- [135] T. Clark, J. Chandrasekhar, and P. V. R. Schleyer. Efficient diffuse function-augmented basis sets for anion calculations. iii. the 3-21+g basis set for first-row elements li-f. *J. Comp. Chem.*, 4:294, 1983.
- [136] R. E. Johnson. Models for matrix-assisted desorption by a laser-pulse. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, 139:25, 1994.

-
- [137] J. F. Leite, M. R. Hajivandi, T. Diller, and R. M. Pope. Removal of sodium and potassium adducts using a matrix additive during matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of peptides. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 18:2953 – 2959, 2004.
- [138] H. Rashidezadeh and B. Guo. Investigation of metal attachment to polystyrenes in matrix-assisted laser desorption ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 9:724 – 730, 1998.
- [139] C. K. L. Wong and T. W. D. Chan. Cationization processes in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Attachment of divalent and trivalent metal ions. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 11:513 – 519, 1997.
- [140] K. B. Green-Church and P. A. Limbach. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of hydrophobic peptides. *Anal. Chem.*, 70:5322 – 5325, 1998.
- [141] M. Dantus and V. V. Lozovoy. Experimental coherent control of physicochemical processes. *Chem. Rev.*, 104:1813 – 1859, 2004.
- [142] T. Brixner and G. Gerber. Quantum control of gas-phase and liquid-phase femtochemistry. *ChemPhysChem*, 4:418 – 438, 2003.
- [143] P. Roepstorff. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.*, 11:601, 1984.
- [144] C. K. Barlow and R. A. J. O’Hair. Gas-phase peptide fragmentation: how to understanding the fundamentals provides a springboard to developing new chemistry and novel proteomic tools. *J. Mass Spectrom.*, 43:1301 – 1319, 2008.
- [145] P. Ednam. A method for determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.*, 22:475, 1949.

- [146] M. C. Sullards and J. A. Reiter. Primary and secondary locations of charge sites in angiotensin ii (m+2h) ions formed by electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 11:40 – 53, 1999.
- [147] D. Suckau, A. Resmann, M. Schuereberg, P. Hufnagel, J. Franzen, and A. Holle. A novel maldi lift-tof/tof mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376:925 – 965, 2003.
- [148] B. S. Freiser. *Organometallic Ion Chemistry, Seite 283ff*. Cluver, Dordrecht, 1996.
- [149] T.-W. D. Chan, A. W. Colburn, P. J. Derrick, D. J. Gardiner, and M. Bowden. Suppression of matrix ions in ultraviolet laser desorption: Scanning electron microscopy and raman spectroscopy of the solid samples. *Org. Mass Spectrom.*, 27:188, 1992.
- [150] R. Knochenmuss, F. Dubois, M. J. Dale, and R. Zenobi. The matrix suppression effect and ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 10:871 – 877, 1996.
- [151] R. Knochenmuss, V. Karbach, U. Wiesli, K. Breuker, and R. Zenobi. The matrix suppression effect in matrix-assisted laser desorption/ionization: Application to negative ions and further characteristics. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 12:529 – 534, 1998.
- [152] X. Lou, J. L. V. van Dongen, J. A. J. M. Vekemans, and E. W. Meijer. Matrix suppression and analyte suppression effects of quaternary ammonium salts in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: an investigation of suppression mechanism. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 23:3077 – 3028, 2009.
- [153] A.-K. Su, J.-T. Liu, and C.-H. Lin. Rapid drug-screening of clandestine tablets by maldi-tof mass spectrometry. *Talanta*, 67:718 – 724, 2005.
- [154] M. V. Kosevich, O. A. Boryak, V. V. Chagovets, V. A. Pashynska, V. V. Olrov, S. G. Stepanian, and V. S. Shelkovsky. 'wet chemistry' and

- crystallochemistry reasons for acidic matrix suppression by quaternary ammonium salts under matrix-assisted laser desorption/ionization conditions. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 21:1813 – 1819, 2007.
- [155] L. H. Wei. Ammonium 2,4-dihydroxybenzoate monohydrate. *Acta Cryst. E*, 62:5542 – 5543, 2006.
- [156] I. Fournier, R. C. Baeavis, J. C. Blais, J. C. Tabet, and G. Bolbach. Hysteresis effects observed in maldi using oriented, protein-doped matrix crystals. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, 169:19 – 29, 1997.
- [157] D. C. Grant and R. J. Helleur. Surfactant-mediated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of small molecules. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 21:837 – 845, 2007.
- [158] M. V. Kosevich, V. V. Chagovets, V. S. Shelkovsky, O. A. Boryak, V. V. Orlov, A. Gomory, and P. Vegh. Is there an 'matrix suppression effect' under fast-atom bombardment liquid secondary ion mass spectrometry of ionic surfactants in glycerol? *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 21:466 – 478, 2007.
- [159] W. V. Loigon and S. B. Dorn. Understanding the glycerol surface as it relates to the secondary ion mass spectrometry experiment. a review. *Int. J. of Mass Spectrom. and Ion Proc.*, 78:99 – 113, 1986.
- [160] B. J. Garrison, A. Delcorte, L. V. Zhigilei, T. E. Itina, K. D. Krantzman, Y. G. Yingling, C. M. McQuaw, C. M. Smiley, and N. Winograd. Big molecule ejection - sims vs. maldi. *Appl. Surf. Sci.*, 203:69 – 81, 2003.
- [161] Y. F. Zhu, N. I. Taranenko, S. L. Allman, S. A. Martin, L. Haff, and C. H. Chen. The effect of ammonium salt and matrix in the detection of dna by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 10:1591 – 1596, 1996.

- [162] D. Dini and H. Hanack. Phthalocyanines as materials for advanced technologies: some examples. *J. of Porphyrins and Phthalocyanines*, 8:915 – 933, 2004.
- [163] P. Gregory. Industrial applications of phthalocyanines. *J. of Porphyrins and Phthalocyanines*, 4:432 – 437, 2000.
- [164] C. M. Allen, W. M. Sharman, and J. E. Van Lier. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 5:161 – 169, 2001.
- [165] R. W. Wagner, J. S. Lindsey, J. Seth, V. Palaniappan, and D. F. Bocian. Molecular optoelectronic gates. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:3996 – 3997, 1996.
- [166] O. L. Kaliya, E. A. Luckyantes, and G. N. Vortzhor. Catalysis and photokatalysis by phthalocyanines for technology, ecology and medicine. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 3:592, 1999.
- [167] H. Moons, L. Lapok, S. Van Doorslaer, and S. M. Gorun. Synthesis, x-ray structure, magnetic resonance, and dft analysis of a soluble copper(ii) phthalocyanine lacking c-h bonds. *Inorg. Chem.*, 49:8779 – 8789, 2010.
- [168] P. N. Day, Z. Wang, and R. Pachter. Calculation of the structure and absorption spectra of phthalocyanines in the gas-phase and in solution. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 455:33 – 50, 1998.
- [169] A. Conneely, S. McClean, W. F. Smyth, and G. McMullan. Study of the mass spectrometric behaviour of phthalocyanine and azo dyes using electrospray ionisation and matrix-assisted laser desorption/ionisation. *Rapid Comm. in Mass Spectrom.*, 15:2076 – 2084, 2001.
- [170] M. J. Dale, A. C. Jones, and P. R. R. Langridge-Smith. Laser desorption laser photoionization time-of-flight mass spectrometry of dyes. *Anal. Chem.*, 65:793 – 801, 1993.

-
- [171] N. Srinivasan, C. A. Haney, J. S. Lindsey, W. Zhang, and B. T. Chait. Investigation of maldi-tof mass spectrometry of diverse synthetic metalloporphyrins, phthalocyanines and multiporphyrin arrays. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 3:283 – 291, 1999.
- [172] V. I. Nemykin, V. Y. Cherni, S. V. Volkov, N. I. Bundina, O. L. Kaliya, V. D. Li, and E. A. Luckyantes. Further studies on the oxidation state of iron in μ -oxo dimeric phthalocyanine complexes. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 3:87 – 98, 1999.
- [173] M. J. Chen, D. E. Fremgen, and J. W. Rathke. Oxygen atom transfer from μ -oxo bis[1,4,8,11,15,18,22,25-octakis(trifluoromethyl)phthalocyaninato]diiron(iii): Evidence for an Fe(IV)=O intermediate. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2:473 – 482, 1998.
- [174] K. Yamaguchi, Y. Watanabe, and I. Morishima. Direct observation of the push effect on the oxygen-oxygen bond cleavage of acylperoxyiron(iii) porphyrin complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 115:4058, 1993.
- [175] N. G. Mekhryakova, T. Y. Gulina, V. D. Li, N. I. Bundina, O. L. Kaliya, and E. A. Luk'yanets. Reaction of iron phthalocyanine with oxygen: Critical survey and new data on the structure of the forming $\text{Fe(II)} \mu$ -oxo dimer. *Russian J. of General Chem.*, 4:570 – 590, 2001.

Danksagung

Hiermit danke ich allen, welche an der Entstehung dieser Dissertation beteiligt waren. Hier sei zuerst Ludger Wöste genannt, der mich in seine Gruppe aufgenommen hat und durch seinen Optimismus, Rat und Tat wesentlich am Gelingen dieser Arbeit Teil hat. Für die direkte Betreuung dieser Arbeit danke ich zudem Albrecht Lindinger; nicht nur für die unzähligen Diskussionen und Ratschläge während dieser Zeit - sondern auch für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Die kleine Femtosekunden-MALDI-Community, bestehend aus Mathias, Falko und Cosmin; welche mit viel Phantasie und Eifer mit mir den MALDI-Prozess eingehend untersuchten. Der gesamten Arbeitsgruppe: Mathias Holz, Janusz Küttner, Falko Schwaneberg, Oliver Gause, Philipp Rohwetter, Fabian Weise, Frauke Eimer, Nona Rahmat, Monika Pawlowska, Cosmin Lupulescu, Alexander Patas, Torsten Siebert, Kamil Stelmaszczyk, Andrea Merli, Bruno Schmidt, Daniel Lockau, Frauke Eimer, Franz Hagemann, Georg Achazi, Cristina, Stanca-Kaposta und Mathhieu Lalanne danke ich für die schöne Zeit und all die Hilfe! Hervorheben möchte ich noch Albrecht, Falko, Mathias und Eva; die noch viele kleine und große Fehler in diesem Manuskript fanden.

Roland Mitric möchte ich für die Unterstützung bei der Berechnung der molekularen Strukturen danken. An dieser Stelle ist auch die ZEDV für viel Verständnis, Speicherplatz und Rechenkapazität erwähnt! Chris Weise aus dem Institut für Biochemie für eine tatkräftige Unterstützung und vielen nützlichen Informationen möchte ich ebenso dankend erwähnen wie der Arbeitsgruppe von Holger Dau für die gelegentliche Labor-Benutzungen.

Meinen Eltern und Geschwistern für die Unterstützung während des Studiums. An letzter Stelle möchte ich noch all meine Freunde außerhalb der Arbeitswelt erwähnen, da gute Freundschaften einen wesentlichen Teil der Promotion darstellt.