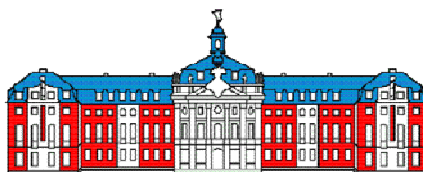


Jörg Möller

**Analysen kryopräparierter nicht-dehydrierter
Probensysteme mit Hilfe eines neu entwickelten
ToF-SIMS-Instruments mit integrierter
Hochvakuumkryoschnittapparatur**

2008



Experimentelle Physik

**Analysen kryopräparierter nicht-dehydrierter
Probensysteme mit Hilfe eines neu entwickelten
ToF-SIMS-Instruments mit integrierter
Hochvakuumkryoschnittapparatur**

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

vorgelegt von
Jörg Möller
aus Detmold

2008

Dekan:	Prof. Dr. J. P. Wessels
Erster Gutachter:	Prof. Dr. H. F. Arlinghaus
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. L. Chi
Tag der mündlichen Prüfung:	22.04.2008 und 25.04.2008
Tag der Promotion:	25.04.2008

**Für meinen Vater
und meinen Großvater**

1	Einleitung.....	1
2	Theoretische Grundlagen.....	4
2.1	Grundlagen der Sekundärteilchenmassenspektrometrie.....	5
2.1.1	Erzeugung von Sekundärteilchen.....	5
2.1.2	Massenanalyse zerstäubter Sekundärteilchen.....	8
2.1.3	Quantitative Beschreibung des Sekundärionenflusses.....	10
2.1.4	Betriebsmodi einer SIMS-Analyse.....	10
2.1.4.1	Registrierung eines integralen Oberflächenspektrums.....	11
2.1.4.2	Tiefenprofilanalyse.....	11
2.1.4.3	Lateralverteilungsanalyse.....	12
2.1.5	Statistische Verfahren zur Auswertung von SIMS-Analysen.....	12
2.2	Analyse von wasserhaltigen biologischen Proben.....	14
2.2.1	Zustandsformen von Wasser.....	15
2.2.1.1	Unterkühltes Wasser.....	15
2.2.1.2	Eis.....	16
2.2.1.3	Wasser in biologischen Proben.....	17
2.2.2	Prozesse beim Einfrieren.....	17
2.2.2.1	Einfrieren von reinem Wasser und Lösungen.....	17
2.2.2.2	Einfrieren von biologischen Proben.....	18
2.2.3	Methoden zur Gewährleistung optimaler Fixierungsergebnisse.....	19
2.2.3.1	Eintauch- und Jetgefrieren.....	21
2.2.3.2	Metallspiegelgefrieren.....	22
2.2.3.3	Hochdruckgefrieren.....	23
2.2.4	Limitierung bei der Probengröße.....	24
2.2.5	Präparation gefrorener Proben für die SIMS-Analyse.....	24
2.2.5.1	Bruch- und Schnitttechniken.....	25
2.2.5.2	Vakuumtaugliche Präparation.....	26
2.2.6	Adsorption und Desorption bei wasserhaltigen Oberflächen im Vakuum.....	28
3	Entwicklung und Realisierung der Analyseapparatur.....	33
3.1	Entwicklungsziel.....	33
3.2	Realisierung.....	35
3.2.1	ToF-SIMS-Instrument.....	35
3.2.2	Spezielle Modifikationen für die Analyse kryopräparierter Probensysteme.....	38
3.2.2.1	Die Kryoschnitt- und Kryobruchapparatur.....	38
3.2.2.2	Probenhalter.....	42
3.2.2.3	Kühlbare Probenhalteraufnahme.....	45
3.2.2.4	Modifikationen am Vakuumsystem.....	49
4	Prozedur zur Minimierung von Wasseradsorption.....	52
4.1	Entwicklung einer Prozedur an einem Testsystem.....	52
4.2	Übertragung der Prozedur auf biologische Proben.....	63

5	Einsatzmöglichkeiten der Kryoanalyseapparatur.....	68
5.1	Analysen an Biofilmen.....	68
5.2	Analysen an biologischem Gewebe	80
5.3	3D-Analysen an einem Organismus des Zooplanktons	88
6	Zusammenfassung und Ausblick	96
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	102
8	Literaturverzeichnis.....	104
	Tabellarischer Lebenslauf	113
	Danksagung.....	114

1 Einleitung

Die Untersuchung von Zellkulturen, biologischen Geweben beziehungsweise ganz allgemein biologischen Probensystemen hinsichtlich ihrer lokalen elementaren und molekularen Zusammensetzung ist in vielen Bereichen der biologischen und biomedizinischen Grundlagenforschung von stetig steigendem Interesse. Auch in der Pharmakologie und Toxikologie, wo es Ziel ist die Verteilung und Wirkungsweise von Medikamenten oder Schadstoffen besser verstehen zu können, besteht nach wie vor hoher Bedarf an leistungsfähigen Analysemethoden. Durch die Vorzüge der Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS), wie zum Beispiel die hohe Empfindlichkeit und die geringen Nachweisgrenzen, ist diese prinzipiell ein geeignetes Verfahren, mit dem sich bei diesen Probensystemen viele neue Erkenntnisse erzielen ließen. Auch die hohe Lateral- und Tiefenauflösung sowie die prinzipielle Möglichkeit des gleichzeitigen Nachweises von Elementen und Molekülen sind Eigenschaften, die für einen Einsatz bei diesen Probensystemen sprechen. Allerdings wird die ToF-SIMS hier nur relativ eingeschränkt genutzt, da aufgrund des hohen Wasseranteils in diesen Probensystemen und der Notwendigkeit die Proben für eine ToF-SIMS-Analyse in ein Vakuumsystem einzubringen, in vivo Analysen ausgeschlossen sind. Geeignete Methoden zur Probenpräparation, die die chemische sowie strukturelle Integrität der Probe konservieren und gleichzeitig die Probe vakuumtauglich präparieren, sind bisher nur unzureichend entwickelt. Die für andere Analyseverfahren häufig verwendete Methode der chemischen Fixierung wäre zwar prinzipiell auch für eine ToF-SIMS-Analyse möglich, schränkt aber den Informationsgehalt der Analyse enorm ein, da je nach Fixierungsmittel immer nur bestimmte Arten von Molekülen, zum Beispiel nur das Membrangerüst, im eigentlichen Zustand fixiert würden und darüber hinaus Informationen über die lokale Verteilung anderer Elemente oder Moleküle verloren gingen.

Ein Verfahren, das das Potenzial besitzt beim Präparationsvorgang sowohl die chemische als auch die strukturelle Integrität eines biologischen Probensystems zu bewahren und gleichzeitig den gesamten chemischen Informationsgehalt unbeeinflusst zu lassen, ist das Verfahren der Kryofixierung. Hierbei wird die nicht weiter vorbehandelte – am besten noch vitale – Probe rasch auf Temperaturen unter -130 °C abgekühlt und damit eingefroren. Zwar liefert dieses Präparationsverfahren aus Sicht

der analytischen Fragestellungen die am besten geeigneten Proben, doch bereitet der Wassergehalt der tief gefrorenen Proben im Vakuumsystem handelsüblicher ToF-SIMS-Apparaturen, die meist nur eine Analyse trockener Proben bei Raumtemperatur erlauben, erhebliche Probleme.

Um die mit dem Wasser verbundenen Probleme umgehen zu können, wird vielfach den kryofixierten Proben mit Hilfe der Gefriertrocknung oder der Tripelpunktrocknung das Wasser schonend entzogen, so dass die Proben schließlich auf Raumtemperatur gebracht und dann analysiert werden können [1,2]. Dieses Verfahren schränkt aber wieder die Bandbreite zu analysierender Proben ein, da eine Entfernung von 60% bis 90% des Probenmaterials immer ein immenser Eingriff in die Probenzusammensetzung ist und es darüber hinaus auch zu Schrumpfungartefakten wie Ablösen von Oberflächen, Bildung von Rissen und ähnlichem führen kann. Auch für Probensysteme, die durch Wasser gestützt werden und ohne dieses zusammenfallen würden, ist eine Gefriertrocknung nicht geeignet. Darüber hinaus ist nach einer Gefriertrocknung für viele im Wasser gelöste Stoffe eine Bestimmung ihrer ursprünglichen Konzentration nicht mehr sinnvoll möglich, da diese beim Sublimieren des Wassers auf dem verbleibenden Material beliebig aufkonzentriert werden.

Diese Einschränkungen können nur dadurch umgangen werden, wenn auf die Gefriertrocknung komplett verzichtet wird. Allerdings ist es dann zwingend notwendig die Proben für alle Prozessschritte von der Präparation bis zur Analyse auf Temperaturen gekühlt zu halten, die eine Gefriertrocknung ausschließen. Erschwerend kommt noch hinzu, dass sich die analytischen Fragestellungen vielfach auch auf Bereiche im Inneren kryofixierter Proben beziehen, so dass diese der ToF-SIMS-Analyse nachträglich noch über geeignete Bruch- beziehungsweise Schnitttechniken zugänglich gemacht werden müssen. Eine nachträgliche Integration der mit diesen Voraussetzungen verbundenen instrumentellen Veränderungen lässt sich an bestehenden ToF-SIMS-Analysegeräten kaum realisieren.

Unter der Randbedingung, dass die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten bei der ToF-SIMS-Analyse ungekühlter Probensysteme nicht allzu sehr eingeschränkt werden, war es das Ziel dieser Arbeit, die Entwicklung und den Aufbau einer neuen Analyseapparatur vorzunehmen, die speziell darauf ausgelegt ist, massenspektrometrische Analysen an kryofixierten, nicht gefriergetrockneten biologischen Probensystemen zu ermöglichen. Auch eine nachträgliche Integration von Lasersystemen an die Apparatur zur Nachionisierung zerstäubter Neutralteilchen für die Sekundärneutralteilchenmassenspektrometrie (Laser-SNMS) sollte möglich bleiben. Die vorgenommenen Maßnahmen umfassten umfangreichen Veränderungen im Vergleich zu anderen Apparaturen im Aufbau des Vakuumsystems und die Integration einer kühlbaren, mit einer Temperaturregelung versehenen Probenhalteraufnahme in der

Analysekammer. Ein Kernstück des neuen Analyseinstrumentes war die direkte Ankopplung einer Hochvakuum-Kryobruch- beziehungsweise -Kryoschnitteinrichtung. Damit können unter Vakuumbedingungen die an den gefrorenen biologischen Proben interessierenden Probenstellen freigelegt und analysiert werden, ohne dass die Probe zwischenzeitlich der Umgebungsluft ausgesetzt beziehungsweise gefriergetrocknet werden muss.

Nach einer Beschreibung der für die Konstruktion der neuen Kombinationsapparatur zu berücksichtigenden Grundlagen werden die erfolgreiche Realisierung, die große Einsatzvariabilität und die sich daraus ergebenden analytischen Möglichkeiten anhand von ToF-SIMS-Analysen an wässrigen Hefepilzkulturen, pflanzlichem Gewebe sowie einer 3D-Analyse an einem Organismus des Zooplanktons dargestellt.

2 Theoretische Grundlagen

Eine ideale Methode für die Analyse der chemischen Zusammensetzung eines biologischen Probensystems wäre diejenige, die umfassende Informationen orts aufgelöst, sowohl qualitativ als auch quantitativ, über die elementare und molekulare Zusammensetzung der Probe liefert. Am besten wäre es dabei, wenn die jeweiligen Proben nicht aufwendig präpariert und chemisch oder physikalisch beeinflusst werden müssten. Eine solche umfassende Analysemethode existiert allerdings nicht. Daher sind die in diesem Bereich angewendeten Verfahren ebenso vielfältig wie die Anzahl der Fragestellungen. So gibt es Verfahren, die die Struktur der Proben wiedergeben, wie zum Beispiel die Rasterelektronenmikroskopie. Andere Verfahren, wie zum Beispiel EDX¹, XPS² oder MALDI³, können die chemische Zusammensetzung, zum Teil lateral aufgelöst, in einem gewissen Volumen wiedergeben, wobei die einzelnen Techniken teils nur die elementare Zusammensetzung teils nur die molekulare Zusammensetzung analysieren können. Andere Techniken, wie zum Beispiel die Fluoreszenzmikroskopie, benötigen in den meisten Fällen einen chemischen Eingriff in das Probensystem, um den Farbstoff an die jeweils interessierenden Bestandteile zu binden. Ausnahme bilden hier nur wenige Proben, bei denen die interessierenden Bestandteile ohnehin Fluoreszenzeigenschaften besitzen.

Auch die Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS) kann die Eigenschaften einer optimalen Analysemethode nicht vollständig erfüllen. Trotzdem eröffnen die Eigenschaften der SIMS bei einer Analyse solcher Proben die Möglichkeit gleichzeitig umfassendere Erkenntnisse gewinnen zu können. So bringt die hohe Empfindlichkeit und Dynamik der SIMS Vorteile gegenüber anderen Verfahren, da viele Bestandteile oder Wirkstoffe häufig nur in äußerst geringen Konzentrationen in solchen Proben vorliegen. Auch die in der SIMS prinzipiell gegebene Möglichkeit des gleichzeitigen Nachweises von Elementen und Molekülen kann Vorteile bei der Analyse biologischer Proben mit sich bringen. Auch die Möglichkeit, eine Analyse orts aufgelöst mit hoher Lateralauflösung durchzuführen, ist mit der SIMS gegeben. Hierbei bedarf es prinzipbedingt keinerlei Marker, Matrizen, Beschichtungen oder ähnliche die Probe

¹ Energy Dispersive X-ray Spectroscopy

² X-ray Photoelectron Spectroscopy

³ Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation

beeinflussende Präparationsschritte. Trotz dieser Möglichkeiten ist die Anwendung der SIMS bei der Analyse von biologischen Probensystemen nach wie vor nicht weit verbreitet. Dies liegt insbesondere daran, dass die Präparationstechniken und -protokolle für Proben dieser Art relativ aufwendig und in vielen Fällen auch nur unzureichend entwickelt sind.

Ziel dieser Arbeit war es, biologische Proben einer SIMS-Analyse zugänglich zu machen. Daher soll nach einem Überblick über die Prinzipien der SIMS, eine Vorstellung einiger theoretischer Grundlagen zur Präparation biologischer Proben für die massenspektrometrische Analyse und die sich daraus ergebenden Herausforderungen erfolgen.

2.1 Grundlagen der Sekundärteilchenmassenspektrometrie

2.1.1 Erzeugung von Sekundärteilchen

Die massenspektrometrische Analyse einer Probenoberfläche mit dem Verfahren der Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS) beruht auf drei grundlegenden Prozessschritten:

- die Ionenbeschussinduzierte Zerstäubung der Oberfläche
- die Bildung von Sekundärteilchen
- die Massenanalyse

Zur Zerstäubung der Festkörperoberfläche der zu analysierenden Probe werden Primärionen auf diese beschleunigt. Hier stoßen sie mit Atomen an der Oberfläche, was wiederum eine Kaskade weiterer Stöße mit ihren Nachbarpartikeln auslöst. Eine so durch den Beschuss in der Region des Auftreffortes ausgelöste Stoßkaskade kann Elementen und Molekülen an der Oberfläche auch einen Impuls in Richtung der Oberflächennormalen übertragen [3,4]. Reicht die auf die Oberflächenteilchen übertragene Energie aus, ihre jeweilige Bindungsenergie zu überwinden, können sie sich von der Oberfläche lösen. Da dieser Ablöseprozess abhängig von der Stoßrichtung und der übertragenden Energie auf die letzten beteiligten Stoßpartnern ist, ergeben sich für die zerstäubten Elemente und Moleküle Verteilungen hinsichtlich ihrer Emissionsenergien und -winkel. Bei festem Emissionswinkel wird die Energieverteilung zerstäubter Atome durch eine Verteilung nach Thompson mit N als der Anzahl der Teilchen, E als der Energie der Teilchen und E_B als Bindungsenergie des zerstäubten Teilchens beschrieben [5]:

$$\frac{dN}{dE} \propto 2E_B \frac{E}{(E + E_B)^3}$$

Das Maximum dieser Verteilung liegt bei der halben Bindungsenergie E_B und beträgt für Elemente 1,2 eV bis 8 eV [6].

Für zerstäubte Moleküle wird die Energieverteilung exakter von einer Maxwell-Boltzmann Verteilung mit E_M als ein Parameter der Verteilung mit der Dimension einer Energie wiedergegeben [7]:

$$\frac{dN}{dE} = \sqrt{\frac{4E}{\pi E_m^3}} e^{-\frac{E}{E_m}}$$

Die Verteilung hat ihr Maximum bei zirka 1-2 eV und damit bei einer geringeren Energie als bei atomaren Teilchen und ist wesentlich schmaler.

Für die räumliche Verteilung gilt, dass die durch senkrechten Primärionenbeschuss entstehende Sekundärteilchenwolke einer Kosinusverteilung folgt, wobei φ den Emissionswinkel zur Oberflächennormalen und Ω den Raumwinkel darstellt [8]:

$$\frac{dN}{d\Omega} \propto \frac{1}{\pi} \cos(\varphi)$$

Bei schrägem Einfallswinkel der Primärionen kann sich der Schwerpunkt der Verteilung abhängig vom Einfallswinkel verschieben und ein Anisotropiefaktor muss eingeführt werden [9].

Da die Massenspektrometrie zerstäubter Sekundärteilchen auf Elementarprozessen beruht, bei denen nur Teilchen aus den obersten Monolagen der Festkörperoberfläche gelöst werden [10], ist dieses Verfahren extrem oberflächensensitiv. Informationen über tiefer liegende Schichten lassen sich nur durch zusätzliche Prozessschritte erhalten, die diese Schichten frei legen und damit eine neue Probenoberfläche erzeugen.

Durch den Primärionenbeschuss werden neben neutralen Sekundärteilchen auch geladene Atome und Moleküle, die Sekundärionen, aus der Probenoberfläche emittiert. Auf deren Massenanalyse beruht das Verfahren der SIMS.

Eine einheitliche Theorie, die für alle Arten von Festkörperoberflächen die Zerstäubung und die Ionisation emittierter Probenbestandteile und damit genaue Vorhersagen über die resultierende Teilchenflusszusammensetzung möglich macht, existiert bisher nicht. Dies soll an einigen Beispielen verdeutlicht werden.

Mit dem Classical Dynamics-Modell [11], bei dem die Struktur des Festkörpers durch einen endlichen Mikrokristalliten genähert wird und die Hamiltonschen Bewegungsgleichungen für alle Targetatome gelöst werden, lassen sich Zerstäubungsausbeuten, das heißt die im Mittel pro Primärion emittierte Zahl der Sekundärteilchen sowie ihre Energie- und Winkelverteilungen berechnen. Die so erhaltenen Werte stimmen insbesondere für Halbleiterkristalle gut mit den experimentellen Daten überein. Für viele andere Oberflächen können sie aber nicht die Realität widerspiegeln und eine Aussage über den Ladungszustand der emittierten Teilchen ist mit diesem Modell gar nicht möglich.

Das Bond Breaking-Modell [12,13] ist ein Beispiel für eine Modell zur intrinsischen Ionisierung. In diesem wird davon ausgegangen, dass in einem polar aufgebauten Festkörper der Form K^+A^- die Energie, die aufgebracht werden muss, um ein neutrales Atom zu emittieren, größer als diejenige ist, die zur Bildung freier Ionen in der Gasphase erforderlich ist. Das Modell ist in der Lage die Ionenemission aus ionischen Kristallen qualitativ zu erklären, versagt aber bei quantitativer Betrachtung.

Das Surface Excitation-Modell [14] hingegen, in welchem von einem thermodynamischen Gleichgewicht für das Elektronensystem des Festkörpers im Bereich der Emission ausgegangen wird, kann die starke Abhängigkeit der Ionisationswahrscheinlichkeit von der chemischen Umgebung, den so genannten Matrixeffekt, erklären.

Weitere Modelle liefern zum Beispiel semi-empirische (Benninghoven) [15], thermodynamische (Cooks) [16] und quantenmechanische (Kim und Tsong) [17] Ansätze zur Beschreibung der Ausbildung von Molekülionen. An dieser Stelle muss allerdings für Details und für einen Überblick über weitere Modelle auf Spezialliteratur verwiesen werden [18].

Wie schon mit diesen wenigen Beispielen angedeutet gibt es eine Vielzahl von Zerstäubungs- und Ionisierungsmodellen, die jeweilige Teilaspekte befriedigend beschreiben andere Effekte hingegen nicht.

Um alternativ die zerstäubten Neutralteilchen hinsichtlich ihrer Masse analysieren zu können, müssen diese zunächst nachionisiert werden. Neben Methoden wie der Elektronenstoßionisierung [19] oder Plasmaionisierung [20] hat sich insbesondere die Nachionisierung mittels Photonen [21] etabliert. Hier wird mittels Laserstrahlung die primärionenbeschussinduzierte Neutralteilchenwolke über der Probenoberfläche nachionisiert. Dieses Analyseverfahren wird Laser-Sekundärneutralteilchenmassenspektrometrie (Laser-SNMS) genannt.

2.1.2 Massenanalyse zerstäubter Sekundärteilchen

Für die anschließende Massenanalyse intrinsisch oder extrinsisch ionisierter Sekundärteilchen existieren verschiedenste apparative Realisierungen, wie zum Beispiel die weit verbreitete Gruppe der Quadrupolanalysatoren [22] und der magnetischen Sektorfeldanalysatoren [23]. Durch geeignete Wahl des elektrischen respektive des magnetischen Feldes existiert bei ihnen jeweils für nur ein, beziehungsweise einige wenige Verhältnisse von Masse-zu-Ladung, eine stabile Bahn durch den Analysator. Mithilfe eines kontinuierlichen Durchfahrens der Spektrometereinstellungen ist mit diesen Gerätetypen zwar prinzipiell ein komplettes Massenspektrum registrierbar, der größte Teil des Sekundärionenflusses geht damit für die Analyse verloren, so dass die Empfindlichkeit dadurch bei gegebener Stoffmenge eingeschränkt ist.

Für einen besonders empfindlichen Massennachweis ist es notwendig, möglichst viele der desorbierten Sekundärionen zu erfassen. Diese Möglichkeit bietet das Verfahren der Flugzeitanalyse (Time-of-Flight- oder ToF-Analyse), bei dem im Prinzip in einer Messung ein im Massenbereich unbeschränktes Spektrum erzeugt werden kann. Hierfür werden die geladenen Sekundärteilchen in einem so genannten Extraktionsfeld auf eine einheitliche Energie beschleunigt bevor sie eine feldfreie Driftstrecke durchfliegen und flugzeitabhängig detektiert werden. Da alle Teilchen über die fest vorgegebene Beschleunigungsspannung U_{Extr} die gleiche kinetische Energie U_{Kin} pro Ladung besitzen, durchfliegen sie den Analysator auf gleichen Flugbahnen und es besteht mit

$$qU_{Extr} = E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2$$

und

$$T = \frac{L}{v}$$

mit der kinetischen Energie E_{Kin} , der Masse m und der Geschwindigkeit der Sekundärteilchen v sowie T als Flugzeit und L als effektive Flugstrecke der Teilchen im Analysator, ein direkter Zusammenhang zwischen Flugzeit und dem Verhältnis von Masse zu Ladung q gemäß

$$T = L \sqrt{\frac{1}{2U_{Extr}} \frac{m}{q}} \quad \text{bzw.} \quad T \propto \sqrt{\frac{m}{q}}.$$

Aus den für die jeweiligen Teilchen ermittelten Flugzeiten lässt sich somit ein Massenspektrum errechnen und grafisch darstellen.

Eine wichtige Größe zur eindeutigen Identifizierung der Sekundärteilchenspezies ist die Massenauflösung R , definiert als

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad \text{bzw.} \quad R = \frac{t}{2\Delta t}.$$

Die Unbestimmtheit der Flugzeit Δt ergibt sich hierbei aus einer Faltung von apparativ bedingten Streuungen wie der Entstehungsdauer der Sekundärteilchen, der Ansprechzeit des Detektors oder der Kanalbreite der Registrierung sowie den systematisch bedingten Streuungen, wie zum Beispiel den Flugzeitunterschieden im Analysator aufgrund der Energieverteilung der ionisierten Sekundärteilchen.

Neben den durch den Aufbau vorgegebenen Bedingungen ist es unerlässlich, möglichst kurze Primärionenpulse zu generieren, da diese direkt mit der Entstehungsdauer der Sekundärionen korreliert sind.

Neben diesen apparativ beziehungsweise systematisch bedingten Effekten, können zusätzliche massenauflösungsbegrenzende Einflüsse, zum Beispiel durch die Topographie der Probe verursacht werden. Auf sehr rauen Oberflächen oder entlang von Kanten kann es zu Flugstrecken- und somit Flugzeitunterschieden kommen. Darüber hinaus kann an solchen Stellen nicht unbedingt ein homogenes Extraktionsfeld angenommen werden. Auch bei elektrisch isolierenden Proben kann es aufgrund eines gegebenenfalls nicht konstanten Probenoberflächenpotenzials und des dadurch nicht mehr konstanten effektiven Extraktionspotenzials zu einer Reduzierung der Massenauflösung kommen.

Da es für die ToF-SIMS notwendig ist, Primärionen auf eine Probenoberfläche zu beschleunigen und anschließend Sekundärionen in einem Massenanalysator die Driftstrecke durchfliegen zu lassen, ist es unerlässlich, dass diese Teilchen die jeweiligen Wegstrecken unbeeinflusst durch Stöße mit weiteren Gasteilchen zurücklegen können. Darüber hinaus muss aufgrund der hohen Oberflächenempfindlichkeit gewährleistet bleiben, dass es nicht während der Oberflächenanalyse zu unspezifischen Veränderungen der Probenoberfläche durch Adsorptionen kommt. Beide Bedingungen lassen sich nur realisieren, wenn eine ToF-SIMS-Analyse unter Vakuumbedingungen durchgeführt wird. Dies schränkt die Variabilität in den möglichen Probensystemen ein.

2.1.3 Quantitative Beschreibung des Sekundärionenflusses

Für das Spektrum, welches mit einem solchen Flugzeitmassenspektrometer ermittelt wird, gilt für die Anzahl der detektierten Teilchen einer jeden Ionenspezies $I(x)^\pm$

$$I(x)^\pm = I_p c(x) S(x) R^\pm(x) T(x) D(x)$$

Hierbei bezeichnet I_p die Anzahl der Primärionen, die auf die analysierte Fläche treffen, $c(x)$ die Anzahl der Teilchen beziehungsweise Konzentration der Spezies an der Oberfläche, $S(x)$ die Zerstäubungsausbeute und $R^\pm(x)$ die Ionisierungswahrscheinlichkeit, die diese Spezies in der chemischen und topographischen Umgebung besitzt, sowie $T(x)$ die Transmissions- und $D(x)$ die Detektionswahrscheinlichkeit von Analysator und Detektor für die Ionenspezies [24]. Die Gleichung wird als SIMS-Grundgleichung bezeichnet und umfasst sowohl Geräte- wie auch Probenparameter.

Da das Herauslösen von Oberflächenteilchen aus dem Festkörper mittels Ionenbeschuss eine nicht zerstörungsfreie Methode darstellt, verändert sich die Probenoberfläche durch diesen Prozess. So werden mit steigenden Primärionendosisdichten zunehmend weitere Monolagen abgetragen und dabei ausgedehnte Moleküle zerstört, wobei das Abbauverhalten von Molekülen an der Oberfläche extrem abhängig von Proben- und Primärionenparametern ist. Für die Analyse von molekularen Oberflächen bedeutet dies, dass die chemische Zusammensetzung an der Oberfläche bereits mit dem ersten auftreffenden Primärion verändert wird. Aus diesem Grund wird zwischen der so genannten dynamischen und der statischen oder molekularen SIMS unterschieden. Wird weniger als ein Prozent der Oberfläche einer Probe während der Analyse durch die Primärionen abgetragen, spricht man von statischer SIMS, da unter diesen Bedingungen davon ausgegangen werden kann, dass jedes einzelne Primärion einen unbeschädigten Oberflächenbereich trifft. Die dafür verwendeten Primärionendosisdichten liegen dann unter dem so genannten statischen Limit. Ist der Probenabtrag um Größenordnungen über den beschriebenen Grenzen, spricht man von dynamischer SIMS [25].

2.1.4 Betriebsmodi einer SIMS-Analyse

Eine ToF-SIMS- beziehungsweise Laser-SNMS-Analyse lässt sich in den folgenden drei verschiedenen Betriebsmodi durchführen:

- Registrierung eines integralen Oberflächenspektrums
- Registrierung eines Profils der Tiefenverteilung (Tiefenprofilanalyse)

- Registrierung der atomaren und molekularen Lateralverteilung auf der Oberfläche (Lateralverteilungsanalyse)

2.1.4.1 Registrierung eines integralen Oberflächenspektrums

Für den hochempfindlichen Nachweis von Bestandteilen auf der Oberfläche mit höchster erreichbarer Massenauflösung wird der Betriebsmodus der Registrierung eines integralen Oberflächenspektrums verwendet. Hier wird das aufintegrierte Spektrum der chemischen Zusammensetzung auf einem definierten Teil der Oberfläche der Probe ermittelt und anschließend grafisch dargestellt. In diesem Modus sind die höchsten Massenaufösungen zu erreichen, da hier die Primärionenpulslänge mittels eines elektrodynamischen Bunchers verkürzt werden kann, ohne den Primärionenstrom zu verkleinern. Die bei der Verwendung eines elektrodynamischen Bunchers auftretende chromatische Abberation und die sich daraus ergebende Vergrößerung des Fokusbereichs des Primärionenstrahls ist bei der Registrierung eines integralen Oberflächenspektrums nicht von Bedeutung, weil die laterale Information nicht mit ausgewertet wird.

Da jeder Zyklus der Messung zu dem integralen Spektrum beiträgt, sind solche Analysen zum einen mit relativ kurzen Messzeiten zu realisieren, zum anderen können die Primärionendosisdichten in der Regel unter dem statischen Limit gehalten werden, was insbesondere bei der Analyse von molekularen Oberflächen von Bedeutung ist.

2.1.4.2 Tiefenprofilanalyse

Von einer Tiefenprofilanalyse spricht man, wenn die zu analysierende Probe während der Analyse Monolage für Monolage abgetragen wird und die den ausgewählten Elementen oder Molekülen zugeordnete Signalintensität, in Abhängigkeit von der abgetragenen Menge der Probe und damit in Abhängigkeit von der Tiefe aufgetragen wird. Dabei ist es in der SIMS üblich auch das Erodieren der Probe durch einen Ionenstrahl zu realisieren. Zwar erreicht man auf diese Weise Tiefenaufösungen im Nanometerbereich [26], doch bringt diese Methode aufgrund der hohen Primärionendosisdichten, die für ein effektives Abtragen der Probe nötig sind, häufig erhebliche Einschränkungen bei der Analyse von Molekülen mit sich, da das statische Limit gezielt überschritten wird. Auch Ansätze polyatomaren Primärionenbeschuss zu nutzen, können dieses Problem häufig nicht lösen. Ein Abtragen durch andere Methoden, wie zum Beispiel durch ein wiederholtes Schneiden oder Brechen der Proben kann das Problem der Molekülzerstörung umgehen, ist aber nicht etabliert.

2.1.4.3 Lateralverteilungsanalyse

Bei einer Lateralverteilungsanalyse wird der fokussierte Primärionenstrahl Punkt für Punkt über die Probenoberfläche gerastert und die den ausgewählten Elementen oder Molekülen zugeordneten Signalintensitäten maßstabsgetreu, den abgetasteten Punkten entsprechend, in einem farbkodierten Bild aufgetragen. Die untere Grenze der Lateralauflösung einer solchen Analyse ist somit durch die Rasterpunktdichte und den minimalen Fokusbereich des Primärionenstrahls gegeben. Allerdings können auch hier Probeneigenschaften auflösungsbegrenzend sein. Bei sehr rauen Proben ist zum einen der Fokusbereich des Primärionenstrahls aufgrund mangelnder Tiefenschärfe nicht konstant, zum anderen kann es zu Abschattungseffekten kommen. Darüber hinaus kann die Sekundärionenausbeute einer interessierenden Spezies bei einer vorgegebenen Analysezeit beziehungsweise Primärionendosisdichte derart gering sein, dass Signale über größere Flächen integriert werden müssen, um ein ausreichend großes Signal zu Rausch-Verhältnis zu erhalten.

Da eine optimale Fokussierung des Primärionenstrahls den Einsatz eines elektrodynamischen Bunchers ausschließt, können die Primärionenpulslängen nicht so kurz wie in den anderen Betriebsmodi gewählt werden, wodurch bei Lateralverteilungsanalysen häufig die Massenauflösung beschränkt ist.

Neben der Möglichkeit, den Primärionenstrahl über die Probenoberfläche zu rastern, ist es auch möglich, die Probe unter dem Ionenstrahl zu verfahren. Dieses mechanische Verschieben der Probe ist in der Regel ungenauer als das Rastern mittels Ionenstrahl. Auf diese Weise lassen sich allerdings deutlich größere Flächen abfahren, weswegen man bei diesem Betriebsmodus auch von einer Makrorasteranalyse spricht.

Kombiniert man Tiefenprofil- und Lateralverteilungsanalyse, so sind auch dreidimensionale Verteilungsanalysen möglich. Da in der üblichen Darstellung jeweils zweidimensionale Lateralverteilungsbilder in ausgewählten Probentiefen gezeigt werden, ist diese Methode nicht explizit als vierte eigenständige Methode aufgezählt.

2.1.5 Statistische Verfahren zur Auswertung von SIMS-Analysen

Die große Datenmenge und der hohe Informationsgehalt einer SIMS-Analyse können eine direkte Auswertung erschweren. Von einem einzelnen Molekül kann eine Reihe von Fragmenten in dem Spektrum erscheinen, die sich nicht immer eindeutig einem bestimmten Muttermolekül zuordnen lassen.

Die Analyse der in diesen Datenmengen enthaltenen Informationen kann durch die Verwendung statistischer Auswerteverfahren erheblich verbessert werden. So ist bei der Auswertung von Spektren die Hauptkomponentenanalyse erfolgreich angewendet worden [27]. Diese zwar per se nicht datenreduzierende Methode fasst die Hauptinformationen von mehreren Spektren aber üblicherweise in wenigen und damit oftmals leichter interpretierbaren Hauptkomponenten zusammen.

Bei der Auswertung von Lateralverteilungsbildern hat sich die aus der Hauptkomponentenanalyse abgeleitete Analyse der „Maximum Autocorrelation Factors“ (MAF) bewährt [28]. Hier wird nicht nur jeweils ein Massenintervall in einem farbkodierten Bild ausgewertet beziehungsweise dargestellt, sondern Unterschiede in mehreren ausgewählten Intervallen oder sogar Unterschiede in jedem Massenintervall des kompletten Spektrums. So ist es mit der MAF möglich, Bereiche der Probenoberfläche, deren Spektren – und nicht nur einzelne Massenintervalle – sich gleichen beziehungsweise ähneln, in einem farbkodiertem Bild auch gleich darzustellen. Bereiche, deren Spektren die größte Abweichung von diesen zeigen, werden mit maximalem Farbkontrast dargestellt. Sind auf diese Weise erst einmal Strukturen identifiziert, die sich ähneln beziehungsweise deutlich unterscheiden, ist es wieder möglich gezielt aus diesen Bereichen Integralspektren zu erstellen. Anhand derer kann schließlich analysiert werden worin der Unterschied im Massenspektrum besteht.

Für eine ausführliche Beschreibung von statistischen Methoden zur Spektrenanalyse insbesondere auch der MAF, die sich als besonders geeignet für die Auswertung von Lateralverteilungsanalysen in der SIMS gezeigt hat [29], sowie die mathematischen Hintergründe der jeweiligen Methoden, sei an dieser Stelle auf Spezialliteratur verwiesen [30].

2.2 Analyse von wasserhaltigen biologischen Proben

Aufgrund der im vorherigen Abschnitt dargestellten besonderen Möglichkeiten und Vorteile einer SIMS-Analyse, war es Ziel dieser Arbeit, eine Apparatur dahingehend zu entwickeln und aufzubauen, dass eine SIMS-Analyse an biologischen Probensystemen ermöglicht wird. Zusätzlich musste ein auf diese Apparatur angepasstes Protokoll zur Präparation dieser Systeme aufgestellt werden. Hierzu sollen einige spezifische Probleme im Zusammenhang mit der Analyse dieser Probensysteme im Folgenden kurz dargestellt werden.

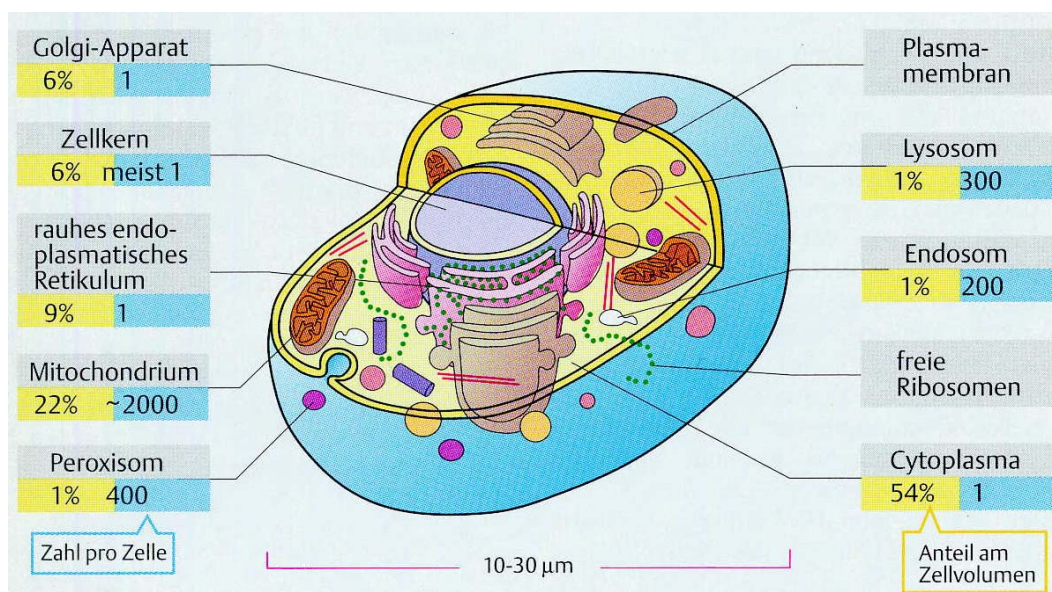


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus einer tierischen Zelle mit Angaben zu den Volumenanteilen der jeweiligen Organellen beziehungsweise Bestandteile [31]

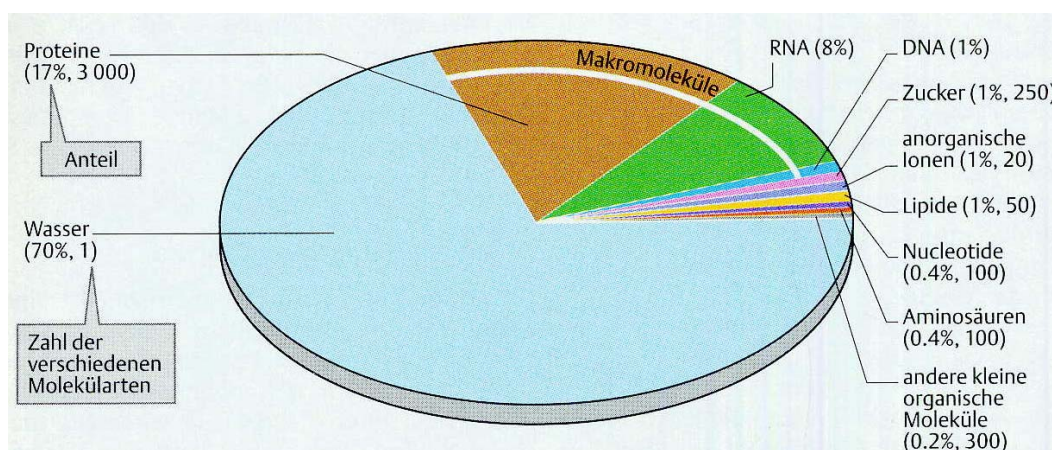


Abbildung 2: Darstellung der chemischen Zusammensetzung einer tierischen Zelle [32]

Anhand der schematischen Darstellung einer einzelnen Zelle in Abbildung 1 und den dazugehörigen Volumenanteilen der einzelnen Zellkomponenten in Abbildung 2 ist zu erkennen, dass das Cytoplasma, welches im Wesentlichen aus Wasser besteht, ein

Hauptbestandteil der Zelle ist. Darüber hinaus können auch die anderen Bestandteile der Zelle zusätzlich Wasser enthalten, so dass zirka 70 % einer Zelle aus Wasser besteht.

Fast alle Prozesse in einer Zelle sind auf die Anwesenheit von flüssigem Wasser angewiesen. Da die Proben für eine ToF-SIMS Analyse in ein Vakuumsystem gebracht werden müssen, in dem Wasser bei Raumtemperatur sofort verdampfen beziehungsweise sublimieren würde, ist es zwingend notwendig, das Wasser zu entfernen oder in eine vakuumkompatible Form zu überführen. Somit ist eine „in vivo“ Analyse ausgeschlossen. Um mit der SIMS aber trotzdem Informationen über die lebende Zelle zu erhalten, ist es notwendig, die Proben zum einen vakuumtauglich zu präparieren zum anderen aber auch den vitalen Zustand auf eine Art zu fixieren, so dass die chemische und strukturelle Integrität der lebenden Zelle möglichst wenig verändert wird. Darüber hinaus muss die Probe nach der Fixierung derart bearbeitbar beziehungsweise präparierbar sein, dass die interessierenden Schichten der Probe in für die SIMS-Analyse adäquater Weise freigelegt werden können. Um die Komplexität dieses Ziels darzustellen, sollen in den folgenden Kapiteln einige Grundlagen über Wasser, Eis und Fixierungsverfahren von Zellkulturen oder Geweben, wie sie ausführlich zum Beispiel bei Echlin [33] dargestellt sind, skizziert werden.

2.2.1 Zustandsformen von Wasser

Wasser, ein vermeintlich simples Molekül, zeigt in Hinsicht vieler Eigenschaften Besonderheiten auf. Während Hydrate von anderen Elementen, welche im Periodensystem nahe am Sauerstoff stehen, zum Beispiel HF, H₂S, NH₃ oder CH₄, bei Atmosphärendruck und Raumtemperatur alle gasförmig sind, ist Wasser flüssig. Im Gegensatz zu den meisten anderen Substanzen hat es seine höchste Dichte im flüssigen Zustand. Diese offensichtlichen Anomalien des flüssigen Zustandes des Wassers hatten und haben entscheidenden Einfluss auf die biologische Entwicklungsgeschichte auf unserem Planeten. Zwar ist vieles des ungewöhnlichen Verhaltens des Wassers durch die Wasserstoffbrückenbindungen und durch die ausgeprägte Eigenschaft ein polares Molekül zu sein zu erklären, umfassend sind aber nach wie vor nicht alle Effekte erklärt.

2.2.1.1 Unterkühltes Wasser

Als eine besondere Form des flüssigen Wassers und gewissermaßen als metastabile Zwischenform zwischen flüssigem Wasser und Eis, existiert das so genannte unterkühlte Wasser oder auch superkaltes Wasser. Dies ist flüssiges Wasser, welches unter den Gefrierpunkt gekühlt wurde, ohne dass Keimbildung oder sogar

Kristallisation auftritt. Flüssiges unterkühltes Wasser kann bei Atmosphärendruck bis hinunter zu -40 °C vorliegen, bei höherem Druck sogar bei noch tieferen Temperaturen.

2.2.1.2 Eis

Die feste Form des Wassers wird Eis genannt. Es sind neun stabile Kristallisationsformen von Eis bekannt, von denen die meisten aber nur bei hohem Druck existieren und auf der Erde nicht natürlich vorkommen. Diese sind damit für die Kryopräparationstechnik nicht relevant. Bei Normaldruck und darunter existieren drei verschiedene Formen festen Wassers, nämlich hexagonales Eis, kubisches Eis und amorphes Eis.

Hexagonales Eis

Bis auf wenige Ausnahmen bei atmosphärischen Eiskristallen ist hexagonales Eis die einzige Form, die natürlich auf der Erde vorkommt. Es entsteht, wenn Wasser im thermodynamischen Gleichgewicht abkühlt oder wenn Eis der beiden anderen Kristallformen über jeweils kritische Temperaturen hinaus erwärmt wird. Liegt hexagonales Eis vor, kann es allein mittels Temperaturänderung nicht mehr in eine andere Eiskristallform überführt werden. Somit stellt hexagonales Eis die energetisch günstigste Form dar, um Wassermoleküle anzuordnen. Am deutlichsten wird die hexagonale Struktur von natürlichem Eis an Schneeflocken, bei der die hexagonale Symmetrie deutlich zu erkennen ist.

Kubisches Eis

Kubisches Eis ist eine metastabile Kristallisationsform von Wasser, die in einem Temperaturintervall zwischen -150 °C und -80 °C existiert. Es entsteht wenn Wasserdampf auf sauberen Oberflächen bei Temperaturen unter -130 °C ausfriert oder wenn amorphes Eis oder auch Kristallisationsformen, die nur unter hohem Druck existieren, erwärmt wird.

Amorphes Eis

Neben den kristallinen Formen kann Wasser auch in nichtkristalliner Form vorkommen. Eine Form solchen Eises, amorphes Eis genannt, entsteht wenn Wasserdampf auf sauberen Oberflächen bei einer Temperatur von unter -150 °C auskondensiert. Eine weitere Form entsteht, wenn sehr kleine Volumina extrem schnell abgekühlt werden. Bei dieser Entstehung spricht man von gläsernem Eis, da hier die Probe beim Einfrieren im flüssigen, unterkühlten Zustand bleibt, bevor die Glasübergangstemperatur erreicht ist. Analog zu den Molekülen in Gläsern liegt das Wasser unterhalb dieser

Glasübergangstemperatur als eine hochgradig viskose unterkühlte Flüssigkeit vor. Die Unterscheidung von amorphem und gläsernem Eis bezieht sich nur auf seine Entstehung, in der Struktur unterscheiden sich diese beiden Formen nicht. Sobald amorphes Eis über die Glasübergangstemperatur erwärmt wird, kommt es zu einer Ausbildung von Kristallen. Für reines Wasser liegt diese Temperatur bei etwa -138 °C , kann aber aufgrund von gelösten Substanzen deutlich variieren und somit für reale Proben nur schwer abgeschätzt werden [34].

2.2.1.3 Wasser in biologischen Proben

In biologischen Proben ist Wasser in drei verschiedenen Arten eingebaut. Als erste Gruppe ist reines Wasser zu nennen. Hier liegen nur Interaktionen zwischen einzelnen Wassermolekülen vor. Bindungen zwischen den einzelnen Molekülen bilden sich und brechen wieder im Picosekundenbereich, die Wassermoleküle sind somit sehr beweglich. Als zweite Gruppe kann Wasser angesehen werden, welches an Oberflächen von gelösten Substanzen oder von eingebrachten Festkörpern zur Interaktion kommt. Dieses interagiert auf der einen Seite zwar mit andersartigen Molekülen, kann aber schnell den Platz mit Molekülen aus der ersten Gruppe tauschen, sofern größere Mengen reinen Wassers die entsprechende Oberfläche umgeben. Im Vergleich zur erstgenannten Gruppe können sich viele Eigenschaften des Wassers der Gruppe zwei deutlich ändern. So ist zum Beispiel die mittlere Beweglichkeit von Wassermolekülen auf Pflanzenzellwänden im Vergleich zu reinem Wasser um das zwanzigfache heruntersetzt, allerdings noch um Größenordnungen höher als die Beweglichkeit im Festkörper oder im Eis. Eine dritte Gruppe stellen Wassermoleküle dar, die ein Bestandteil in Festkörpern der Zelle sind. Diese sind relativ unbeweglich, können daher kaum ausgetauscht werden und interagieren zum Teil mit keinem anderen Wassermolekül, liegen aber noch als H_2O -Molekül vor. Für die Präparation biologischer Probensysteme bedeutet dies, dass Proben mit nominell gleichem Wassergehalt ein völlig unterschiedliches Verhalten bezüglich einzelner Probenpräparationsbeziehungsweise Behandlungsschritte zeigen können.

2.2.2 Prozesse beim Einfrieren

2.2.2.1 Einfrieren von reinem Wasser und Lösungen

Friert man Wasser langsam im thermodynamischen Gleichgewicht ein, kommt es nach einer höchstens geringfügigen Unterkühlung der Flüssigkeit zu einer Anreicherung von Clustern aus Wassermolekülen, die dann als Kristallisationskeime dienen und um die herum die Eiskristalle wachsen. Dabei ist die Bildung großer Kristalle energetisch

günstiger, so dass sich mehrere kleine Kristalle zu großen vereinigen. Da um den Gefrierpunkt des Wassers herum Eis und flüssiges Wasser im Gleichgewicht vorkommen können, ist in der flüssigen Phase eine hohe Beweglichkeit der Moleküle gewährleistet, was die Bildung größerer Kristalle ermöglicht. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass je schneller eine Probe eingefroren werden kann, und somit die flüssige Phase nur kurzzeitig vorliegt, desto kleiner sind die resultierenden Eiskristalle. Die Beweglichkeit der Moleküle in der festen Phase sind derart eingeschränkt ist, dass es nicht mehr zur Bildung großer Kristalle kommen kann.

Friert man wässrige Lösungen ein, so bilden sich üblicherweise zunächst Eiskristalle aus reinem Wasser. Die gelösten Substanzen werden in der flüssigen Phase aufkonzentriert und somit durch das Einfrieren in teilweise erheblichem Maße lateral verschoben. Dies geschieht so lange bis schließlich die eutektische Temperatur erreicht ist, bei der auch die in dem Wasser gelösten Substanzen neben den Wasserkristallen ausfrieren.

Diese Kristallisations-, Umverteilungs- und Aufkonzentrationseffekte lassen sich verhindern wenn es gelänge, Wasser gläsern beziehungsweise amorph einzufrieren. Hierbei erstarren die Moleküle des Wassers und der gelösten Substanzen an der Stelle an der sie sich gerade befinden und eine Umverteilung findet nicht statt. Schon aus diesen Tatsachen zeigt sich, dass nur ein extrem schnelles Einfrieren von wasserhaltigen Proben gewährleistet, dass die Verteilung der Moleküle in der gefrorenen Probe derjenigen in der flüssigen Probe entspricht, sei es, weil es gelungen ist amorphes Eis herzustellen oder weil die Umverteilungs- und Aufkonzentrationseffekte nur in geringer räumlicher Ausdehnung stattfanden.

2.2.2.2 Einfrieren von biologischen Proben

Beim Einfrieren biologischer Proben sollte es das Ziel sein möglichst große Bereiche amorph beziehungsweise gläsern einzufrieren, da nur dann alle Bestandteile an ihrem jeweiligen Ort erstarren und keine ungewollte Umstrukturierung innerhalb der Probe stattfindet. Hierfür müsste maximale Unterkühlung erreicht werden. Die Bedingungen dafür sind aber nur schwer zu realisieren. Neben einer Reihe von Bedingungen sollte insbesondere die Probengröße möglichst klein, der Wassergehalt der Probe möglichst gering, intrazellulär sollten keine Kristallisationskeime vorhanden und Keimbildung unterdrückende Substanzen sollten gegenwärtig sein. In natürlicher Umgebung sind diese Bedingungen fast ausschließlich in Zellen von Organismen zu finden, die an eine extrem kalte Umwelt angepasst sind. In allen anderen Systemen ist das Ausmaß, in welchem unterkühltes Wasser realisiert werden kann, kaum abzuschätzen, so dass das

Eis kryopräparierter biologischer Proben üblicherweise zum größten Teil aus hexagonalem Eis besteht.

Auch das Auftreten von kubischem Eis hat eine gewisse Relevanz bei kryopräparierten Proben. Ist die Existenz dieser Form des Eises doch ein Hinweis darauf, dass es zwar geglückt ist die Probe amorph einzufrieren, doch dann die Kühlung nicht ausreichte und es zur Umkristallisation oder aber zu einer deutlichen Wasseradsorption an der Oberfläche der gekühlten Probe kam. Beides sind in der Regel unerwünschte Effekte, so dass das Auftreten von kubischem Eis meist ein Warnhinweis ist (sofern man ein Analyseverfahren besitzt, das kristallformsensitiv ist).

Beim Einfrieren biologischer Proben kommen neben den beschriebenen Kristallisations- und Aufkonzentrationseffekten noch weitere, die Probenzusammensetzung verändernde Effekte hinzu. Bei diesen Proben handelt es sich nicht um eine reine Flüssigkeit, in der Substanzen gelöst sind. Vielmehr liegt hier eine Mischung, bestehend aus Festkörpern, die die Struktur von Zellen vorgeben, und Lösungen vor. Kristallisieren nun die flüssigen Bestandteile in einer solchen Probe aus, können die wachsenden Kristalle die festen Strukturen der Zellen beziehungsweise des Gewebes beeinflussen und sogar schlimmstenfalls zerstören. Darüber hinaus sind die Konzentrationen von gelösten Substanzen in einzelnen Regionen der Probe, zum Beispiel in extra- und intrazellulären Bereichen, stark unterschiedlich. Dies kann dazu führen, dass außerhalb der Zellen bereits ein Einfrieren einsetzt, was den Zellen aufgrund unterschiedlichen Dampfdrucks und des osmotischen Druckes das in diesen Bereichen noch flüssige Wasser entzieht.

Auch bei diesen Effekten gilt, dass sie quasi nicht auftreten, falls es gelingt die Proben amorph einzufrieren oder dass die Schäden, die sie hervorrufen umso geringer sind, desto schneller die Probe eingefroren wird.

2.2.3 Methoden zur Gewährleistung optimaler Fixierungsergebnisse

Bei der Kryopräparation von biologischen Proben, mit dem Ziel auch kleinere Bereiche einer Probe, also zum Beispiel nur einzelne Zellen, im vitalen Zustand zu fixieren, ist wie im Kapitel zuvor skizziert, Eiskristallisation beziehungsweise deren Auswirkung zu vermeiden oder auf ein Mindestmaß zu begrenzen. Ein Weg dieses Ziel zu erreichen ist die chemische Vorbehandlung der Probe. Hierzu werden in der Literatur zwei unterschiedliche Ansätze diskutiert. Zum einen kann die Probe chemisch gestärkt werden und zum anderen können so genannte Cryoprotectants, also Frostschutzmittel, hinzugefügt werden.

Chemische Fixiermittel sind in der Lage gewisse Makromoleküle, also zum Beispiel das Membrangerüst, zu stabilisieren und zu stärken. Beim anschließenden Gefrierprozess verhindern sie damit nicht die Bildung von Eiskristallen sondern stärken die Strukturen derart, dass wachsende Kristalle nicht in der Lage sind diese zu zerstören [35].

Im Gegensatz zur chemischen Stärkung ist bei der Vorbehandlung der Probe mit Frostschutzmitteln hingegen das Ziel, die Kristallisation zu minimieren. Durch Zugabe von Stoffen wie Glycerin, Zuckern, Methanol, Ethanol und anderen wird zum einen der Gefrierpunkt von Wasser herabgesetzt, Keimbildungs- und Kristallisationsverhalten werden verändert und bei manchen Frostschutzmitteln (zum Beispiel Glycerin) die Beweglichkeit der Moleküle in der Flüssigkeit so weit eingeschränkt, dass, sollte Kristallisation nicht verhindert werden können, die entstehenden Kristalle klein bleiben.

Massenspektrometrische Analysen sollen nun aber gerade Aufschlüsse über die chemische Zusammensetzung der Zellproben liefern, damit ist die Verwendung von chemischen Verfahren ein derartiger Eingriff in die chemische Zusammensetzung der Zellbestandteile, dass diese Verfahren für die chemische Analyse nur bei ganz eingeschränkten Fragestellungen verwendbar ist. Selbst bei Untersuchungen der Struktur ist umstritten, ob auf diese Weise wirklich der vitale Zustand frei von Präparationsartefakten konserviert wird [36].

Bei der Zugabe von Frostschutzmitteln oder anderen chemischen Substanzen wird sogar noch in den Stoffwechsel der lebenden Zellen eingegriffen und die Probenzusammensetzung somit verändert. Manche der Frostschutzmittel sind sogar giftig für die meisten Zellen, so dass es fraglich ist, ob der vitale Zustand der Probe präpariert werden kann. Daher ist diese Methode auch nur sehr eingeschränkt, zum Beispiel für die Analyse von sehr großen Proben, die sonst nicht sinnvoll eingefroren werden können, einsetzbar. Weil nicht auszuschließen ist, dass die verwendeten chemischen Substanzen oder Verfahren, die für die jeweilige Fragestellung relevanten Bedingungen stark verändern, ist bei der Präparation von Proben für die Massenspektrometrie im Allgemeinen eine chemische Vorbehandlung eher nachteilig. Die chemische und strukturelle Integrität der Probe muss also alleine durch den Einfrierprozess gewährleistet werden.

Um möglichst die volle chemische Information und die strukturelle Integrität der Probe zu erhalten, muss die Probe, verzichtet man auf chemische Vorbehandlung, möglichst schnell eingefroren werden. Ziel der Präparation ist es, die Probe, vor der Kristallisation der wasserhaltigen Bestandteile, so weit zu unterkühlen und so viskos zu machen, dass die Moleküle und Elemente an ihrem Ort erstarren, und so die Probe zu vitrifizieren. Da hierfür eine hohe thermische Leitfähigkeit notwendig ist, wird dies in der Realität, insbesondere bei ausgedehnteren Proben, geradezu unmöglich. Hier sind die Kühlraten

im Inneren der Probe durch die thermische Leitfähigkeit des Probenmaterials beschränkt.

Aber auch wenn es nicht gelingt die Proben vollständig amorph einzufrieren, so können bei schnellem Kühlen, durch die deutliche Unterkühlung der Flüssigkeit und durch die gestiegene Viskosität, die entstehenden Eiskristallgrößen begrenzt werden. Sind die daraus entstehenden räumlichen Konzentrationsverschiebungen und Strukturschäden in der Probe unter der lateralen Auflösungsgrenze der Massenspektrometrie, können sie nicht detektiert werden und beeinflussen eine Analyse nur wenig. Um eine möglichst schnelles Abkühlen zu gewährleisten, haben sich mehrere Kühlverfahren etabliert, von denen die wichtigsten im Folgenden kurz skizziert werden sollen⁴.

2.2.3.1 Eintauch- und Jetgefrieren

Bei diesen Gefriertechniken wird das Kühlmittel, Kryogen genannt, mit möglichst hoher Geschwindigkeit an der zu kühlenden Probe vorbeitransportiert. Wird die Probe in das Kryogen hinein- und hindurchbewegt spricht man vom Eintauchgefrieren (Plunge-Freezing), wird hingegen das Kryogen an der Probe vorbeitransportiert, wird dies meist als Jetgefrieren bezeichnet, da üblicherweise das Kryogen durch eine kleine Düse mit hohem Druck auf die Probe geschossen wird. Ein optimales Kryogen für diese beiden Techniken sollte

- einen niedrigen Schmelzpunkt und einen hohen Siedepunkt besitzen, um auch bei der Zieltemperatur noch flüssig und wenig viskos zu sein und um Gasfilme um die zu kühlenden Proben herum, hervorgerufen durch verdampfendes Kryogen, zu vermeiden.
- eine hohe thermische Leitfähigkeit besitzen und insbesondere eine hohe Wärmekapazität, womit eine Verwendung von Gasen ausgeschlossen ist.
- sicher, preiswert und leicht zu bekommen sein und darüber hinaus die Proben nicht angreifen

Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Daten von gängigen Substanzen, die zur Probenkühlung verwendet werden. Wie an den in der Tabelle dargestellten Daten zu erkennen ist, gibt es keine Substanz, die alle Bedingungen erfüllt. Flüssiges Helium und flüssiger Stickstoff haben zu niedrige Siedepunkte, so dass es beim Einfrieren einer Probe zu

⁴ Kommentierend soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass in der Literatur zum Teil von Kühltechniken (cooling techniques) und zum Teil von Gefriertechniken (freezing techniques) gesprochen wird. Diese beschreiben aber üblicherweise beide dasselbe. Da aber im allgemeinen Sprachgebrauch mit Einfrieren das Einfrieren im thermodynamischen Gleichgewicht also das Kristallisieren von Wasser gemeint ist, vermeiden einige Autoren diesen Begriff, weil es gerade Ziel ist keine oder zumindest nur kleine Kristalle durch den Gefrierprozess zu generieren.

einer isolierenden Gasschicht um die Probe kommt, was auch als „Leidenfrost Phänomen“ bekannt ist. Hauptsächlich wird die Probe hier also von gasförmigen Kryogenen gekühlt. Die thermische Leitfähigkeit der jeweiligen Gasphasen ist allerdings deutlich geringer als die der flüssigen Substanzen.

Kryogen	Schmelzpunkt in °C	Siedepunkt in °C	Thermische Leitfähigkeit in J/(m s K)	Spezifische Wärmekapazität in J/(g·K)	Relative Kühleffektivität norm auf Propan (nach Sitte [37])
fl. Helium	-270	-269	0,02	0,02	0,01
fl. Stickstoff	-210	-196	0,13	0,13	0,1
Freon 22	-160	-41	0,14	0,14	0,7
Isopentan	-160	-28	0,18	0,18	0,8
Propan	-189	-42	0,22	1,92	1,0
Ethan	-183	-89	0,24	2,27	1,3

Tabelle 1: Kenndaten einiger gängiger Kryogene [38]

Bei Freon und Isopentan sind die Wärmekapazitäten zu gering. Das vorbeiströmende Kryogen kann nicht ausreichend thermische Energie aufnehmen, hinzu kommt beim Freon die ökologische Bedenklichkeit, da dieses die Ozonschicht schädigt.

In der Praxis haben sich Ethan und Propan etabliert. Abgesehen von der erheblichen Brand- und Explosionsgefahr und der Tatsache, dass es sich um organische Lösungsmittel handelt und somit diese die Probenzusammensetzung beeinflussen können, haben sie die besten Eigenschaften für ein Kryogen. Mittlere Abkühlraten von $10\text{--}13 \times 10^3 \text{ K s}^{-1}$ beim Eintauchgefrieren und von $25\text{--}35 \times 10^3 \text{ K s}^{-1}$ [33] beim Jetgefrieren können mit diesen Materialien realisiert werden. Dies bedeutet, dass je nach thermischer Leitfähigkeit und Größe der einzufrierenden Probe einige Mikrometer an der Oberfläche gläsern eingefroren werden und weite Bereiche der Probe mikrokristallin, in dem Sinne, dass die entstehenden Kristalle in ihrer Größe unter der lateralen Auflösungsgrenze der verwendeten Analyseverfahren liegen.

2.2.3.2 Metallspiegelgefrieren

Physikalisch beruht dieses Verfahren auf den gleichen Prinzipien wie das Eintauchgefrieren, mit dem Unterschied, dass das Kryogen hier ein Festkörper ist. Zwar haben Metalle eine vergleichbare Wärmekapazität aber eine deutlich höhere Wärmeleitfähigkeit. So ist zum Beispiel die Wärmeleitfähigkeit von Kupfer etwa 10000-mal größer als die des Propan. Dieser Unterschied kann auch nicht durch die Konvektion des flüssigen Kryogens ausgeglichen werden.

Bei dem so genannten Metallspiegelgefrieren [39,40] wird die Probe mit hoher Geschwindigkeit auf eine tiefkalte Oberfläche beschleunigt. Treffen beide aufeinander wird die thermische Energie der Probe auf die Metalloberfläche übertragen. Um maximalen Kontakt an der Oberfläche zu gewährleisten und beste Wärmeleitfähigkeit sicher zu stellen, verwendet man üblicherweise polierte Oberflächen aus reinem Kupfer, Silber, Aluminium oder auch Saphir (auch wenn man es dann nicht mehr Metallspiegel nennt), wobei die größten Kühlraten, größenordnungsmäßig bis zu $80\text{--}100 \times 10^3 \text{ K s}^{-1}$, bei dieser Methode mit Kupfer erreicht werden können.

Diese Methode kann somit zwar höhere Kühlraten als bei der Verwendung von flüssigen Kryogenen erreichen, bringt aber für die Form der Proben Einschränkungen mit sich. Nur relativ plane Proben können optimalen thermischen Kontakt gewährleisten. Problematisch ist auch die Anwendung bei ausgedehnten Proben, da das Kryogen nur von einer Seite auf die Probenoberfläche wirken kann. Da für optimale Ergebnisse mit dieser Methode die Probe möglichst deformationsarm mit hoher Geschwindigkeit ohne zurückzufedern auf den Metallspiegel auftreffen muss, ist diese Methode apparativ aufwendiger als das Eintauchgefrieren [41].

2.2.3.3 Hochdruckgefrieren

Wasser hat die Eigenschaft sich beim Einfrieren auszudehnen. Hoher Druck kann also ein Einfrieren und Kristallisieren verhindern, so hat Wasser bei zirka 2100 bar mit -22 °C seinen niedrigsten Gefrierpunkt. Diese Eigenschaft wird beim Hochdruckgefrieren ausgenutzt [42]. Kühlt man eine Probe bei diesem Druck schnell ab, so kann man diese deutlich weiter unterkühlen und die Chance auf glasartiges Einfrieren der Probe wird erhöht. Die Einfriergeschwindigkeit bei der es nicht zur Kristallisation kommt, ist erheblich geringer als bei Normaldruck.

Eine Hochdruckgefrierapparatur ist prinzipiell wie ein Jet-Freezer aufgebaut, der bei hohem Druck arbeiten kann, wobei der hohe Druck hier quasi als physikalisches Frostschutzmittel dient. Als Kryogen wird üblicherweise flüssiger Stickstoff verwendet.

Auf diese Art werden Kühlraten von einigen 10^3 K s^{-1} [43] erreicht. Diese Methode stellt üblicherweise großvolumigsten amorph eingefrorenen Proben zur Verfügung, ist aber apparativ enorm aufwendig und in der Anschaffung sehr teuer. Zusätzlich kann bei der Fixierung sehr schneller dynamischer Prozesse in biologischen Proben oder auch bei der Fixierung von Diffusionsprozessen, aufgrund der im Vergleich zu den anderen dargestellten Methoden relativ geringen Kühlraten, sogar schlechter geeignet sein als diese.

2.2.4 Limitierung bei der Probengröße

Unabhängig davon welche Einfriertechnik genutzt wird, ist die Form der Proben bei der Kryopräparation ein ganz entscheidender Punkt. So gelten die angegebenen erreichbaren Kühlraten nur für sehr kleine Proben (einige μl) und bei optimalem Kontakt zum Kühlmedium. Bei größeren Proben sind die Kühlraten im Inneren nicht mehr durch Art und Weise des Kühlmediums limitiert sondern durch die Wärmeleitfähigkeit der Probe selbst. Grundsätzlich sollte bei der Kryopräparation von biologischen Proben folgendes eingehalten werden:

- Die Probengröße ist auf ein Minimum zu reduzieren. Dies kann allerdings anderen Randbedingungen bei der Präparation von Proben widersprechen. So ist es zum Beispiel bei der Präparation von Gewebe häufig von Vorteil, nicht zu kleine Stücke zu präparieren um mechanischen Stress von den später zu analysierenden Zellen möglichst fern zu halten, da der Zellchemismus durch diesen Stress bereits stark verändert werden kann.
- Probenaufnahme, Probenklemmen, gegebenenfalls notwendige Substrate sind als Teile der Probe zu betrachten, die ebenfalls zu kühlen sind oder einer effektiven Kühlung aufgrund sehr hoher Wärmekapazitäten entgegenwirken. Auch diese sind somit so klein wie möglich zu halten und aus Material zu fertigen, das eine hohe thermische Leitfähigkeit besitzt.
- Das Verhältnis von Oberfläche der Probe, an der das Kryogen Kontakt hat, zum Volumen der Probe sollte so groß wie möglich sein, um maximale Kühlwirkung zu erzielen.

2.2.5 Präparation gefrorener Proben für die SIMS-Analyse

Da die ToF-SIMS eine oberflächensensitive Analysemethode ist, reicht es häufig nicht aus, die Probe nur zu fixieren und vakuumtauglich zu präparieren, sondern die, für die Analyse interessierende Schicht der Probe, muss noch zugänglich gemacht werden. Des Weiteren kann es für die ToF-SIMS Analyse sinnvoll sein eine möglichst glatte Probenoberfläche zu generieren, was zum Beispiel bei eingefrorenen Tropfen von Zellsuspension in Nährmedium beziehungsweise in einem Puffermedium nicht per se realisierbar ist. Ist die Probe also bereits fixiert, die interessierende Schicht der Probe aber noch nicht an der Oberfläche, so kann die Probe entweder mechanisch bearbeitet werden, hierzu zählen die Methoden des Brechens oder des Schneidens, oder aber im

Rahmen der SIMS durch Zerstäuben der nicht interessierenden Schichten freigelegt werden.⁵

Beim Abtragen mittels Ionenstrahl werden allerdings sehr große Ionendosisdichten benötigt, was die molekulare Struktur der Probe zerstören kann, so dass Informationen über diese Moleküle nicht mehr zugänglich sind. Bei sehr heterogenen Proben können unterschiedliche Zerstäubungsausbeuten unterschiedlicher Substrukturen der Probe zusätzlich zu sehr unebenen Oberflächen führen. Darüber hinaus ist in vielen Fällen derart viel Material – Tiefen von mehreren 10 µm sind nicht unüblich – abzutragen bis die interessierende Probenschicht freigelegt ist, dass dies mittels Ionenstrahl im Rahmen üblicher Analysezeiten gar nicht zu erreichen ist. Diese Nachteile bestehen bei den mechanischen Bruch- und Schnittverfahren nicht.

2.2.5.1 Bruch- und Schnitttechniken

Beim Bruchverfahren existieren je nach Probentyp unterschiedliche Methoden. Bei Zellkulturen auf Substraten oder auch relativ ebenen Proben, die auf Substraten oder Trägern fixiert werden konnten, können die Proben vor dem Einfrieren mit einer Art Deckelplatte versehen werden [44]. Diese friert auf den Proben mit fest. Wird diese Platte im gefrorenen Zustand wieder abgerissen, werden Teile der Probe mitgerissen und im Inneren liegende Schichten freigelegt. Aufgrund des Einklemmens der eigentlichen Probe zwischen zwei Haltern spricht man auch von einer „Sandwichmethode“ [45].

Bei ausgedehnteren Proben oder Proben, die nicht auf einem Substrat aufgebracht sind, kann die Probe auch ohne Deckeln entweder durch Aufhebeln oder durch Ansetzen eines Keils gebrochen werden. In beiden Fällen verlaufen die Bruchkanten dabei weitestgehend zufällig, sind aber häufig durch möglicherweise vorhandene größere Eiskristalle oder durch die Membranen in den Zellen vorgegeben [46]. Letzteres gewährleistet, dass ein großer Anteil der Zellen auch geöffnet werden kann. Das Freilegen einer Schicht in einer definierten Tiefe ist auf diese Weise aber nur schwer zu erreichen und häufig ist die Variabilität bei den verschiedenen Probenformen eingeschränkt.

Wesentlich definiertere Oberflächen, bei einer größeren Variabilität in den Probenformen, kann mit dem Verfahren des Schneidens erreicht werden. Hierbei wird die Probe mittels eines geführten Messers durchtrennt. Das Wort „schneiden“ ist in diesem Zusammenhang allerdings nicht eindeutig festgelegt. Wird in dieser Arbeit von

⁵ Ein Abtragen mit anderen Methoden, zum Beispiel durch Laserablation, ist selbstverständlich auch möglich, soll im Rahmen dieser Arbeit aber nicht näher beschrieben werden

Schneiden gesprochen, so ist damit der Prozess der Auftrennung der Probe mittels eines auf einer Ebene geführten Messers beziehungsweise einer Klinge gemeint. Bei dieser Methode können auf mikroskopischer Ebene aber je nach Anwendung, Klinge oder Probenmaterial mehrere unterschiedliche Effekte auftreten. Bestenfalls entstehen auf diese Art wirklich mikroskopisch glatte Oberflächen. Auf größeren Flächen gelingt dies aber in aller Regel nicht [47]. Hier gibt es zwischen kleineren Bereichen, die optimal geschnitten werden, auch Bereichen aus denen Probenteile heraus gebrochen werden. Für diese Bereiche bedeutet dies aber, dass ähnliche Bedingungen wie beim oben beschriebenen Kryobruch vorliegen. Die Bruchkante kann entlang einer durch die Probe vorgegebenen Sollbruchstelle verlaufen. Häufig sind dies die Membranen oder aber auch größeren Eiskristalle. Damit ist es möglich, dass auch Material aus minimal tiefer liegenden Schichten mit aus der Probe herausgelöst wird. Gegebenenfalls ist also der größte Teil der geschnittenen Oberfläche im engeren Sinne durch Kryobrüche entstanden. Dennoch ist auf diese Weise, im Gegensatz zum rein statistischen Brechen, eine deutlich definiertere Schnitt- beziehungsweise Bruchtiefe und Ebene zu erreichen. Aufgrund der dargestellten Eigenschaften wird diese Methode auch als „präferenzielles Brechen“ oder „Cryo-Planing“ [47] bezeichnet.

Einige Autoren verwenden den Begriff des Schneidens nur, wenn die resultierende Fläche mikroskopisch glatt ist. Bei kryopräparierten Proben, die nicht weiter chemisch behandelt wurden, also zum Beispiel in Harz eingebettet sind, gelingt dies aber nur sehr schwer. Die verwendeten Klingen, üblicherweise aus Glas oder Diamant, müssen extrem scharf [48] und die Proben sehr homogen eingefroren sein. Auch eine relativ hohe Probentemperatur während des Schnittprozesses (zirka -30 °C) kann eine glatte Schnittoberfläche begünstigen [49], da die Probe etwas flexibler wird und somit nicht so schnell bricht und es darüber hinaus zu einem lokalen Antauen an der Klingenspitze kommen kann, was die Proben an der Schnittfläche zusätzlich beweglicher macht und gegebenenfalls entstehende Rauigkeiten kompensiert. Dieser Temperaturbereich steht aber im klaren Gegensatz dazu, die Proben möglichst amorph einzufrieren und eingefroren zu lassen.

2.2.5.2 Vakuumtaugliche Präparation

Nachdem die biologischen Proben fixiert und die für die Analyse relevanten Schichten freigelegt sind, ist noch die Vakuumtauglichkeit herzustellen. Um dieses zu erreichen, haben sich im Wesentlichen drei Techniken etabliert. Zum einen kann durch eine chemische Behandlung (freeze-substitution) in der kalten Probe das Wasser ausgetauscht werden, was prinzipiell auf ähnliche Prozesse, wie bei der chemischen Fixierung, aufbaut. Hier können aber je nach eingesetztem Substitutionsmaterial wieder nur ganz spezielle Eigenschaften der Probe erhalten bleiben. Informationen über

Ionenverteilungen oder im Wasser gelöste Substanzen gehen verloren. Deshalb wird es in der Probenpräparation für die SIMS eher selten eingesetzt.

Die zweite Methode ist die Gefriertrocknung. Hier wird der Probe das Wasser langsam durch Sublimation entzogen. Diese wahrscheinlich verbreitetste Form der Probenpräparation biologischer Proben für die SIMS stellt Proben zur Verfügung, die mit Ausnahme des Wassers sehr weit reichend die chemische und strukturelle Integrität von Zellen und Gewebe erhält. Allerdings entstehen durch die Entfernung des Wassers zum Teil erhebliche Schrumpfungartefakte, was zu Strukturschäden führen kann und durch Wasser gestützte Proben völlig zerstört. Im Wasser gelöste Substanzen werden auf den verbleibenden Oberflächen aufkonzentriert, wodurch eine sinnvolle Konzentrationsbestimmung dieser Substanzen unmöglich gemacht wird.

Die Methode, die die Probe im Anschluss an die vorangegangenen Präparationsschritte am wenigsten verändert und damit das Potenzial besitzt, das realistischste Abbild der lebenden Zelle zu liefern, besteht in einem Verzicht auf weitere Behandlung der gefrorenen Proben. Allerdings muss in diesem Falle eine durchgängige Kühlkette während aller zu einer SIMS-Analyse gehörenden Verfahrensschritte gewährleistet sein, was einen deutlich gesteigerten apparativen Aufwand bedingt.

Die verschiedenen Präparationsschritte sind in der Abbildung 3 noch einmal schematisch dargestellt. Ziel dieser Arbeit war es den gelb hinterlegten Weg der Kryopräparation und Kryoanalyse zu gehen. Dafür wurde eine auf diese Anforderungen optimierte SIMS-Apparatur komplett neu aufgebaut und die notwendigen Präparations- und Analyseprotokolle erstellt.

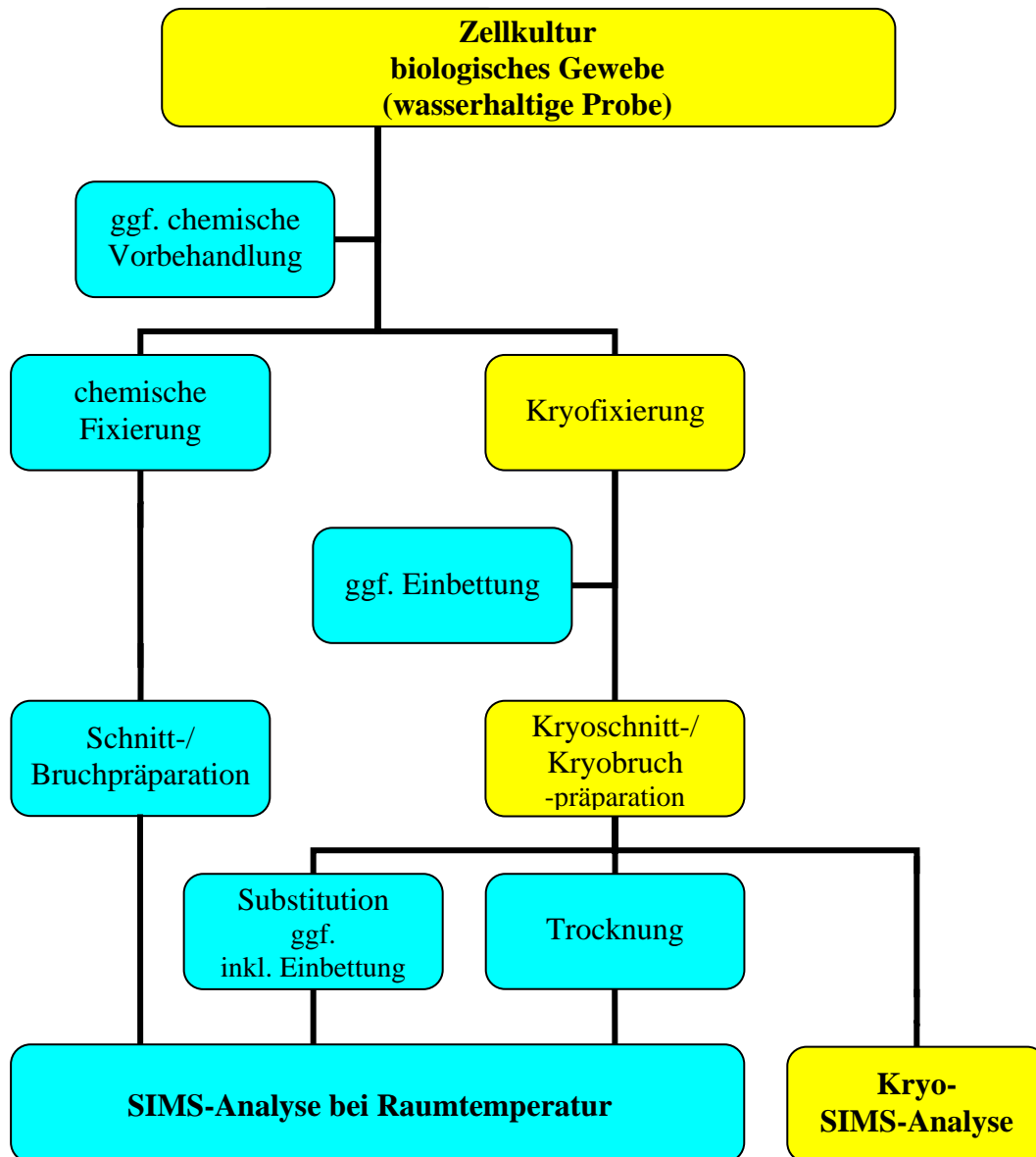


Abbildung 3: Schematische Darstellung möglicher Präparationsschritte für die Präparation biologischer Proben für die massenspektrometrische Analyse. Gelb hinterlegt ist der Weg, der mit der in dieser Arbeit beschriebenen Apparatur ermöglicht werden soll.

2.2.6 Adsorption und Desorption bei wasserhaltigen Oberflächen im Vakuum

In den vorherigen Kapiteln wurden die Möglichkeiten und Schwierigkeiten aufgezeigt wasserhaltige biologische Proben mit Hilfe von Kryopräparationstechniken derart zu fixieren, dass die chemische und strukturelle Integrität der Probe weitestgehend erhalten bleibt. Es bleibt aber noch zu diskutieren welche Eigenschaften eine auf die beschriebene Art und Weise fixierte und präparierte Probe in einem Vakuumssystem besitzt, die eine massenspektrometrische Oberflächenanalyse zusätzlich beeinflussen.

Da die statische SIMS extrem oberflächensensitiv ist, sind hier besonders Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche von Interesse. Diese können einerseits durch die Desorption von Probenmaterial und andererseits durch Adsorption von Material aus der umgebenen Restgasphase geschehen. Als wichtigstes und in diesem Zusammenhang kritischstes Probenmaterial ist an dieser Stelle das Wasser zu betrachten.

Das Sublimations- beziehungsweise das Verdampfungsverhalten von Wasser im Vakuum in Abhängigkeit von der Proben temperatur wird beschrieben durch die Sublimations- beziehungsweise Dampfdruckkurve.

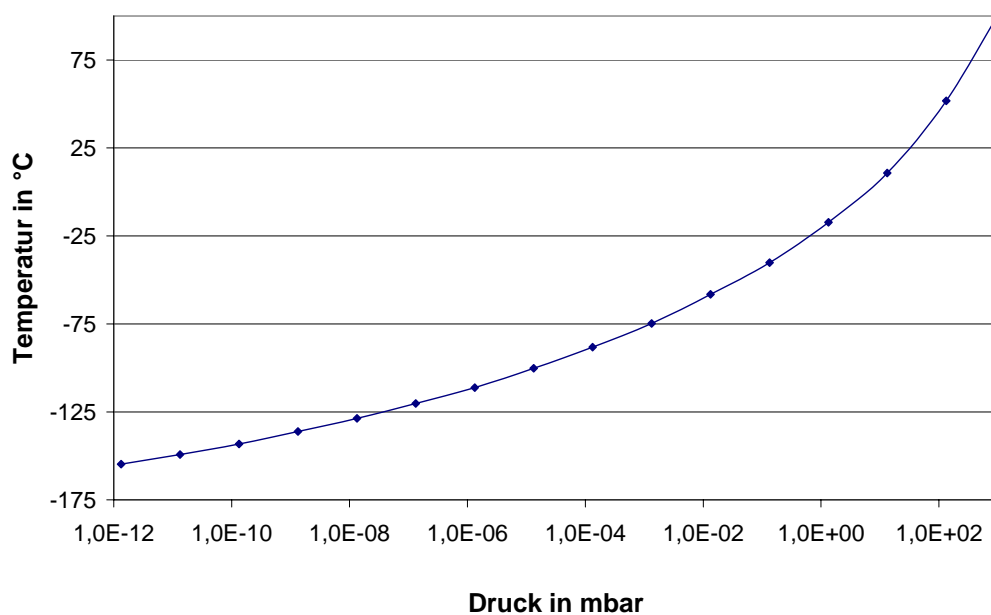


Abbildung 4: Dampfdruck- beziehungsweise Sublimationskurve von Wasser

In Abbildung 4 ist die Dampfdruckkurve von reinem Wasser beziehungsweise von hexagonalem Eis dargestellt, wobei die Werte im Bereich niedrigster Drücke extrapoliert wurden [50]. Der Kurve ist zu entnehmen, dass bei einem Druck von unter 10^{-8} mbar, wie sie in der Vakuumkammer vorliegen, eine Proben temperatur von unter -125 °C gewährleistet bleiben muss, um intensivere Gefriertrocknung zu unterbinden. Bei deutlich höheren Temperaturen sublimiert reines Wasser; eine flüssige Phase existiert bei diesen Druckbereichen nicht.

Es bleiben zwei Dinge zu beachten. Zum einen, dass solche Dampfdruckkurven immer Gleichgewichtszustände zwischen der festen und der gasförmigen Phase in abgeschlossenen Systemen beschreiben, was in einer ToF-SIMS Vakuum Apparatur ganz gezielt nicht vorliegt. Um eine Desorption von H_2O zu minimieren, müssten also noch deutlich geringere Temperaturen gewählt werden. Zum anderen gilt diese Kurve

nur für reines Wasser. Bei realen biologischen Proben insbesondere bei Zellkulturen und Geweben ist allerdings eine Vielzahl von Stoffen im Wasser gelöst, die im Allgemeinen zu einer deutlichen aber im Ausmaß nicht vorhersagbaren Dampfdruckerniedrigung führen. Darüber hinaus sind Teile des Wassers an feste Strukturen gebunden. Eine genaue Vorhersage über das Sublimationsverhalten von H₂O aus biologischen Proben in Vakuumsystemen ist somit unmöglich. Trotzdem sollte zur Vermeidung einer Veränderung der Probenoberfläche durch Desorption von Wasser die Probenoberfläche immer so kalt wie möglich gewählt werden.

Als zweiter die Probenoberfläche beeinflussender Prozess ist die Adsorption von nicht probeneigenem Material auf der Probenoberfläche zu betrachten. Trifft ein Teilchen auf eine Oberfläche so besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass dieses an die Oberfläche gebunden wird. Grundsätzlich kann man zwischen zwei unterschiedlichen Arten der Adsorption unterscheiden

- Bei der Physisorption wird ein auf die Oberfläche treffendes Teilchen an eines oder mehrere Teilchen der Unterlage schwach gebunden, zum Beispiel durch Van-der-Waals Wechselwirkungen. Die Oberfläche wird also nur bedeckt, nicht aber die grundsätzliche chemische Zusammensetzung der ursprünglichen Probenoberfläche verändert.
- Bei der Chemisorption kommt es zu einer chemischen Bindung zwischen dem auftreffenden Teilchen und einem oder mehreren Oberflächenteilchen. Es entstehen dadurch neue chemische Verbindungen, deren Bindungen deutlich stärker als bei der Physisorption sind.

Die Zahl der auf eine Oberfläche auftreffenden Teilchen R_{ads} ist nach der kinetischen Gastheorie abhängig vom Druck und der Masse des auftreffenden Teilchens gegeben durch [51]:

$$R_{ads} = \frac{p}{\sqrt{2\pi \cdot mkT}}$$

Mit: p : Druck über der Oberfläche
 m : Masse des Gasteilchens
 k : Boltzmannkonstante
 T : Temperatur des Gases

Damit ist im Vakuumsystem die Anzahl der auf eine Probenoberfläche auftreffenden Teilchen ausschließlich von dem über der Probe vorliegenden Druck bestimmt, da für die Temperatur der auftreffenden Teilchen im Allgemeinen Raumtemperatur

angenommen werden kann. Genauso wie sich der Gesamtdruck additiv aus den Partialdrücken aller vorhandenen Gasmoleküle zusammensetzt, ergibt sich auch die Anzahl der auftreffenden Teilchen einer Spezies direkt proportional zu ihrem Partialdruck.

Ob das auftreffende Gasmolekül die Oberfläche wieder verlässt, hängt dann von mehreren Bedingungen ab. Die Desorptionswahrscheinlichkeit W_{des} eines Teilchens aus einer Flächeneinheit pro Sekunde lässt sich abschätzen mit [52]:

$$W_{des} = \nu_0 \cdot e^{-\frac{E_b}{kT}}$$

Mit: ν_0 : Schwingungsfrequenz des Teilchens im Bindungspotenzial
 E_b : Bindungsenergie an der Oberfläche
 k : Boltzmannkonstante
 T : Temperatur auf der Oberfläche

Daraus ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

- Die Oberflächentemperatur beeinflusst ganz entscheidend die Haftungswahrscheinlichkeit.
- Die Haftwahrscheinlichkeit ist stark von der Bindungsenergie abhängig, variiert material- und wechselwirkungsabhängig; auf heterogenen Flächen ist somit auch eine Ortsabhängigkeit gegeben.
- Die auftreffenden Teilchen besitzen kinetische Energie. Zusätzlich wird bei der Adsorption Wärme frei. Deshalb wird es nur dann zur Adsorption kommen, wenn die Energie hinreichend schnell abgeführt werden kann. Andernfalls desorbieren die Teilchen sofort wieder.

Generell gilt somit, dass es zur Minimierung der Adsorption einerseits notwendig ist, den Partialdruck, insbesondere solcher Gase, die, wenn sie erst einmal auf die Oberfläche gelangt sind, eine hohe Bindungsenergie mit dieser haben, im Vakuumsystem zu minimieren. Andererseits sollte die Proben temperatur zur Minimierung der Adsorption möglichst hoch gewählt werden.

So ist bei der Präparation und Analyse von tiefkalten, wasserhaltigen Proben, erneut besonderes Augenmerk auf das Wasser zu lenken. Wie gezeigt, ist es zum einen für die Analyse von wasserhaltigen Proben zur Vermeidung umfangreicher Gefriertrocknung zwingend notwendig die Proben temperatur so niedrig zu wählen, dass der Dampfdruck des Eises geringer ist als der umgebende Druck in der Vakuumkammer. Andererseits führt dies dazu, dass Wassermoleküle aus dem Restgas der Vakuumkammern auf der

Probenoberfläche nicht nur adsorbieren sondern sogar auskondensieren können, da die Wahrscheinlichkeit, dass diese Moleküle die Oberfläche wieder verlassen bei abnehmenden Temperaturen immer weiter abnimmt.

Bei einer sich gegebenenfalls aus dem Wasseranteil im Restgas bildenden Adsorbatschicht auf der Probenoberfläche, handelt es sich weitestgehend um reines Wasser, welches, sollte die Temperatur niedrig genug sein, sogar kubisch oder amorph ausgefroren sein kann. Bei dem aus dem probeneigenen Wasser gebildeten Eis liegt dagegen die Situation vor, dass in diesem viele Stoffe gelöst sind und dass dieses zusätzlich von festen Strukturen umgeben ist. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass das probeneigene Wasser beziehungsweise Eis ein anderes Sublimationsverhalten zeigt als das auf der Probenoberfläche adsorbierte, also nach der Präparation aufgebrauchte Wasser. Es ist also möglich, dass eine Probenoberfläche oder einen Temperaturbereich existiert, in dem adsorbiertes Wasser bereits einen höheren Dampfdruck als den Umgebungsdruck in der Vakuumkammer aufweist, also intensiv sublimiert, das probeneigene Wasser hingegen nicht.

Unabhängig davon muss als ein weiterer, eine Analyse beeinflussender Effekt, beachtet werden, dass bei den meisten Proben, das probeneigene Wasser nicht homogen verteilt auf der Oberfläche vorliegt. Dies bedeutet, dass selbst wenn es möglich ist, ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Desorption und Adsorption herzustellen, dies immer die originäre Zusammensetzung der Probenoberfläche verändert, da das Maß der Desorption von der lokalen Oberflächenkonzentration abhängt, das Maß der Adsorption hingegen, von gegebenenfalls unterschiedlichen Haftkoeffizienten mal abgesehen, nicht.

3 Entwicklung und Realisierung der Analyseapparatur

3.1 Entwicklungsziel

Wie die Zusammenfassung der theoretischen Grundlagen darlegt, sind die Verfahren der Kryofixierung, ohne chemische Vorbehandlung der Proben jene, die es ermöglichen, eine Probe nahe am vitalen Zustand zu fixieren und vakuumkompatibel zu machen. Ziel dieser Arbeit war es, eine Apparatur und eine dazu gehörige Prozedur zur Präparation kryofixierter biologischer Proben zu entwickeln, die es ermöglichen, diese Proben mittels der SIMS und zukünftig mittels Laser-SNMS zu analysieren. Andere Präparationsmethoden, wie zum Beispiel die Gefriertrocknung, sollten dabei aber nicht apparativ ausgeschlossen werden.

Bei den Kryofixierungsverfahren und der anschließenden Schnitt- und Bruchpräparation, welche für die Elektronenmikroskopie entwickelt und verbessert worden sind, kann auf die etablierten Verfahren zurückgegriffen werden. Diese sind nicht prinzipiell für die SIMS beschränkend und haben schon mehrfach, insbesondere in Kombination mit anschließender Gefriertrocknung, zu erfolgreichen Analyseergebnissen geführt [53]. Um aber für eine SIMS-Analyse den Präparationsschritt der Gefriertrocknung überflüssig zu machen, ist beim Verzicht auf chemische Hilfsmittel eine durchgängige Kühlung der Probe zu gewährleisten. Gängige ToF-SIMS Apparaturen sind dafür zunächst nicht geeignet.

Zwar lässt sich noch relativ leicht eine Probenkühlung in einer solchen Apparatur realisieren. Es hat sich aber gezeigt, dass die schlichte Integration eines kühlbaren und in der Temperatur kontrollierbaren Probenhalters in eine ToF-SIMS Apparatur nur sehr eingeschränkt zu erfolgreichen Ergebnissen geführt hat, da während des Einschleusprozesses häufig derart viel Material auf der Probenoberfläche adsorbiert, dass eine sinnvolle Interpretation der Analyseergebnisse nicht mehr möglich ist. Dieses Problem kann minimiert, gegebenenfalls sogar ausgeschlossen werden, wenn die Freilegung der zu analysierenden Oberfläche erst im Vakuum stattfindet und die Probe das Vakuumsystem bis zur endgültigen Analyse nicht mehr verlässt. Zwar kann damit eine Adsorption aus dem Restgas des Vakuumsystems nicht verhindert werden, diese sollte aber aufgrund der herrschenden Druckverhältnisse um Größenordnungen weniger

ausgeprägt sein, als wenn die Probenoberfläche noch außerhalb des Vakuumsystems generiert wird.

Genau dieser Ansatz ist in dieser Arbeit verfolgt und verwirklicht worden. Hierfür mussten bei der Konstruktion folgende Bedingungen berücksichtigt werden:

- a. Der Schleusvorgang der gekühlten Probe sollte in möglichst trockener Atmosphäre und so schnell wie möglich stattfinden, um möglichst wenig Wasser in das Restgas der Vakuumkammer einzubringen.
- b. Kryoschnitt- oder Kryobruchpräparation sollten im Vakuum möglich sein.
- c. Die Kühlung, beziehungsweise ganz allgemein die Temperaturkontrolle der Probe, sollte zu jedem Zeitpunkt gewährleistet sein.
- d. In der Vakuumkammer sollte insbesondere der Partialdruck von Wasser gering gehalten werden.
- e. Alle Transportwege, insbesondere zwischen Schnitt- und Analyseposition, sollten kurz gehalten werden, um zum einen kurze Transferzeiten zu ermöglichen und zum anderen, die aktive Kühlung und die Temperaturkontrolle nicht zu lange zu unterbrechen.
- f. Um Adsorbate abdampfen oder gegebenenfalls die Probe komplett gefrier-trocknen zu können, sollte die Probentemperatur sowohl in der Schnittposition, als auch in der Analyseposition wählbar beziehungsweise einstellbar sein.
- g. Die Probenkühlung darf nicht zu Vibrationen führen, die eine hochaufgelöste Lateralverteilungsanalyse unmöglich machen würden.
- h. Die Makrorasterfunktion sollte weiterhin zur Verfügung stehen, damit auch größere Flächen analysierbar bleiben.
- i. Viele gängige Probenformen von Zellkulturen und biologischen Gewebe sollten analysierbar sein

Zusätzlich war noch zu beachten:

- j. Die Funktionalität der SIMS-Apparatur sollte bei nicht zu kühlenden Proben nicht durch die zusätzlichen Einbauten eingeschränkt werden.
- k. Eine spätere Integration von Lasern für die Nachionisierung zerstäubter Neutralteilchen sollte möglich bleiben.

In den folgenden Abschnitten soll nun Bezug nehmend auf diese Aufzählung der realisierte Apparaturaufbau beschrieben werden.

3.2 Realisierung

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute Apparatur, welche insbesondere auf die Analyse nicht dehydrierter biologischer Proben optimiert wurde, basiert auf einer in Details modifizierten Apparatur, wie sie bereits mehrfach in der Uni-Münster gebaut wurden [54,55], sowie einer direkt daran angebrachten Kryoschnittpräparationskammer. Im Folgenden sollen zunächst die einzelnen Komponenten der Apparatur vorgestellt und beschrieben werden und anschließend auf die Besonderheiten der aufgebauten Apparatur sowie Modifikationen im Vergleich zu anderen ToF-SIMS Instrumenten eingegangen werden.

3.2.1 ToF-SIMS-Instrument

Bedingung für das Vakuumsystem der Apparatur war, dass es einerseits einen möglichst großen Probendurchsatz ermöglicht und andererseits den Betrieb einer mit unterschiedlichen Gasarten betriebenen Elektronenstoß-Ionenquelle erlaubt. Darüber hinaus sollten Optionen, wie ein gezieltes Einlassen von Gasen, zum Beispiel von Sauerstoff zur Erhöhung der Ionisierungswahrscheinlichkeit positiver Sekundärionen, erhalten bleiben. Um genau dieses zu erreichen wurde auf ein gasförderndes zweistufiges Turbomolekularpumpensystem zurückgegriffen. Für die zusätzlich notwendige Vorvakuumpumpe wurde eine ölfreie Membranvorpumpe gewählt. Diese evakuiert in regelmäßigen Abständen ein Puffervolumen, so dass sie während einer Analyse ausgeschaltet bleiben kann. Auf diese Weise lassen sich Vibrationen vermeiden, welche die laterale Auflösung begrenzen. Eine an dieses Puffervolumen angeschlossene Turbomolekulardrumpumpe generiert dann das Vorvakuum für die magnetgelagerte und schwingungsgedämpfte Turbomolekularpumpe, die direkt an der Analysechamber angeschlossen ist.

Um das Ultrahochvakuum nicht bei jedem Probenwechsel brechen zu müssen, ist an die Analysechamber ein Probenschleusensystem inklusive Probenparkposition angeschlossen, welches es ermöglicht, Proben schnell in das Vakuumsystem ein- beziehungsweise auszuschleusen sowie Proben im Vakuum zu lagern. Die dafür benötigten Vakuumkammern werden jeweils von Turbomolekularpumpen evakuiert, welche an das Vorvakuumsystem der Apparatur angeschlossen sind.

Mit diesem Vakuumsystem ist es möglich den Druck in der Apparatur bis auf 1×10^{-9} mbar zu minimieren und selbst bei häufigem Probenwechsel unter 1×10^{-8} mbar bis 3×10^{-8} mbar zu halten.

Zur Primärionenerzeugung ist die Apparatur mit drei verschiedenen Ionenquellsystemen ausgestattet. Es sind zwei Flüssigmetall-Ionenquellen installiert, mit denen hauptsächlich integrale Massenspektren sowie die Lateralverteilungsanalysen mit hoher Ortsauflösung durchgeführt werden können. Zum einen handelt es sich um eine dreilinsige Bismuth-Flüssigmetallionenquelle⁶ (LMIG)⁷, bei der neben Bi^+ verschiedene Bismuthcluster (Bi_2^+ bis Bi_7^+) sowie mehrfach geladene Cluster als Primärion ausgewählt werden können. Die Bismuthquelle wurde gewählt, da diese insbesondere bei der Analyse molekularer Oberflächen maximale Sekundärionenausbeuten gewährleistet [56,57]. Bei der weiteren Flüssigmetallionenquelle handelt es sich um eine zweilinsige Gallium-Flüssigmetallionenquelle [58], die im Wesentlichen als Vergleichsquelle für grundlegende Untersuchungen zum Einfluss der Primärionenspezies auf die Sekundärionenausbeute dient. Als drittes Primärionensystem ist eine Elektronenstoß-Ionenquelle installiert, welche ebenfalls zur Aufnahme integraler Massenspektren eingesetzt wird. Diese bietet die Möglichkeit, durch die Wahl verschiedener Beschussteilchen deren jeweiligen spezifischen Vorteile zu nutzen. So kann zum Beispiel ein Edelgas gewählt werden, um die Oberflächenchemie der Probe möglichst wenig zu beeinflussen. Aber auch eine gezielte Beeinflussung der Oberfläche, zum Beispiel durch Sauerstoff, um die Sekundärionenausbeute zu erhöhen, kann ausgewählt werden. Molekularer Beschuss, zum Beispiel mit SF_5^+ , ist mit diesem Quellentyp ebenfalls möglich. Zusätzlich kann diese Quelle auch als Sputterquelle für die Tiefenprofilanalyse eingesetzt werden.

Eine Übersicht einiger der Kenn- beziehungsweise Leistungsdaten ist in Tabelle 2 dargestellt.

	LMIG (Bi)	LMIG (Ga)	Elektronenstoß
PI-Spezies	Bi^+ , Bi_2^+ , Bi_3^+ , Bi_4^+ , Bi_5^+ , Bi_3^{++} , Bi_5^{++} , Bi_7^{++}	Ga^+	Ne^+ , Ar^+ , Kr^+ , Xe^+ , O_2^+ , SF_3^+ , SF_5^+
Beschleunigungsspannung	10–25 kV	10–25 kV	1–10 kV
Min. Fokussdurchmesser	<100 nm (Collimated Mode) <5 μm (High Current Mode)	<100 nm (Collimated Mode) <1 μm (Burst Alignment Mode)	30–50 μm
Min. Pulslänge (bunched)	800–1200 ps	< 800 ps	900–1000 ps
Einfallswinkel	45°	45°	45°

Tabelle 2: Ausgewählte Kenn- und Leistungsdaten der verwendeten Primärionenquellen

⁶ Fa. Ion-Tof GmbH, Münster

⁷ Liquid Metal Ion Gun

Beim eigentlichen Flugzeitmassenspektrometer handelt es sich um ein System bestehend aus einer Extraktionsoptik, einer feldfreien Driftstrecke, einem Reflektron nach Bergmann [59,60] und einem Detektorsystem [61]. Die Extraktionsoptik extrahiert und beschleunigt, die durch den Zerstäubungsprozess generierten Sekundärionen in das Massenspektrometer und fokussiert diesen Sekundärionenstrahl auf den Detektor. Das Reflektron nach Bergmann wirkt energiefokussierend in höheren Ordnungen, so dass die Massenauflösung gegenüber einstufigen Reflektorsystemen noch einmal verbessert wird. Der Reflektortyp wurde ausgewählt, um insbesondere die breitere Energieverteilung der extrahierten Sekundärteilchen bei der Laser-SNMS besser als zum Beispiel mit einem linearen Reflektron kompensieren zu können [62] (vgl. Bedingung k).

Die Apparatur ist mit einem computergesteuerten Manipulator⁸ zur Positionierung der interessierenden Probenstelle unter dem Massenspektrometer ausgestattet, welcher ein Verfahren der Probenhalteraufnahme in den drei Raumrichtungen, sowie ein Kippen (Tilt) und Rotieren ermöglicht. Darüber hinaus gestattet der Manipulator ein Wiederanfahren gespeicherter Positionen mit einer Genauigkeit von wenigen Mikrometern. Die Steuerungssoftware des Manipulators ist mit der Datenakquisitionsoftware gekoppelt, so dass Makrorasteranalysen, bei denen im Gegensatz zur sonst üblichen Rasterung des Primärionenstrahls über die Probenoberfläche, die Probe unter dem Primärionenstrahl und der Extraktionsoptik des Massenspektrometers bewegt wird, ermöglicht werden. Hierbei ist die Positionsgenauigkeit zwar geringer als in dem Modus, in dem der Ionenstrahl über die Probenoberfläche gerastert wird, aber auf diese Weise lassen sich Flächen bis über $8 \times 8 \text{ cm}^2$ analysieren.

Um einen möglichst großen Probendurchsatz bei nicht gekühlten Proben zu gewährleisten (vgl. Bedingung j), kann ein Probenhalter mit einer Größe von $8 \times 10 \text{ cm}^2$ mit den zu untersuchenden Proben bestückt und in die Analysekammer eingebracht werden. Bei diesem Probenhaltersystem stehen einem alle Freiheitsgrade des Manipulators also insbesondere auch die Rotation zur Verfügung. Damit bringt die später beschriebene Kühloption für den nicht gekühlten Betrieb der SIMS-Apparatur keinerlei Einschränkungen mit sich und die volle Kompatibilität in Bezug auf die Probenhalteraufnahme zu anderen SIMS-Apparaturen konnte bewahrt bleiben.

Zur Schwingungsdämpfung ist der Anlagentisch durch zwei Dämpfersysteme von Bodenvibrationen entkoppelt und alle Vakuumpumpen sind mit schwingungsdämpfenden Zwischenstücken an den jeweiligen Vakuumkammern installiert.

⁸ Fa. Raith GmbH, Dortmund

Des Weiteren ist die Apparatur mit einer Reihe von weiteren Komponenten ausgestattet, die im Folgenden nur kurz aufgezählt aber nicht detailliert beschrieben werden sollen:

- Eine Niederenergie-Elektronenquelle zur Ladungskompensation bei der Analyse elektrisch isolierender Proben.
- Ein Kamerasystem, bestehend aus Mikroskopobjektiv und Übersichts-zoomobjektiv, mit der die Probe visuell kontrolliert und die interessierende Probenstelle unter dem Massenspektrometer ausgerichtet werden kann.
- Ein Sekundärelektronendetektor zur Aufnahme von Ioneninduzierten Sekundärelektronenbildern. Anhand derer können, durch die materialabhängige Sekundärelektronenausbeute, auch über eine Massenanalyse der Sekundärionen hinausgehende, Information über die Probenoberfläche oder über die interessierenden Bereiche erschlossen werden. Darüber hinaus können die Betriebsparameter der Ionenquellen, insbesondere deren Fokusbereich, hiermit optimiert werden.

Der gesamte Aufbau der Anlage ist darauf ausgelegt Laser-SNMS Analysen zu ermöglichen. Neben der Wahl des Spektrometers nach Bergmann betrifft dies die Einplanung von Raum für die hierfür notwendige Einkopplung der Laserstrahlen und die Konfiguration des Detektors und des Registrierungssystems (vgl. Bedingung k). In der Zwischenzeit sind bereits zwei Lasersysteme installiert, die auf die nichtresonante Zweiphotonennachionisierung beziehungsweise die Einphotonennachionisierung optimiert sind. Auf diese Analyseoption soll aber im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden.

Wurde bisher die ToF-SIMS-Apparatur beschrieben, wie sie für nicht zu kühlende Proben eingesetzt werden kann, sind für die Kryopräparation und Kryoanalyse einige Komponenten modifiziert beziehungsweise zusätzliche Komponenten in der Anlage integriert, die im Folgenden beschrieben werden sollen.

3.2.2 Spezielle Modifikationen für die Analyse kryopräparierter Probensysteme

3.2.2.1 Die Kryoschnitt- und Kryobruchapparatur

Um Proben nicht nur gekühlt untersuchen sondern sie auch im Vakuum schneiden zu können, um somit eine Oberfläche zu schaffen, die nicht an Atmosphärendruck gelangt ist, mussten folgende Aspekte bedacht werden:

- I. Ein leicht zu bedienender Schneidemechanismus musste in das Vakuumsystem integriert werden und die einzelnen Schritte der Schnittpräparation sollten optisch kontrolliert werden können.
- II. Da es sich für die ToF-SIMS-Analyse bewährt hatte, die nach einem Schnitt freigelegte Oberfläche der Probe, also die so genannten „Block Faces“ [63], zu analysieren [64], sollte das von der ursprünglichen Probenoberfläche abgetrennte Material derart abtransportiert werden, dass es weder auf die Probenoberfläche zurückgelangen kann, noch dass es durch nicht ausreichende Kühlung gefriertrocknet und somit den Partialdruck von Wasser deutlich erhöht.
- III. Die Temperatur der Probe sollte in jeder Position und in jedem Schritt der Präparation und Analyse kontrollierbar und regulierbar sein.
- IV. Um unspezifische Adsorption von Wasser auf der Probenoberfläche während des Schnittprozesses auf ein Minimum zu begrenzen, sollten in unmittelbarer Nähe zur Schnittposition Kaltschilde integriert werden.
- V. Um auch Tiefenprofil oder 3D-Analysen zu ermöglichen, bei denen der Materialabtrag durch Schneiden realisiert wird, sollten möglichst kurze Wege beziehungsweise kurze Transferzeiten zwischen Schnittposition und Analyseposition gewahrt bleiben.
- VI. Das Vakuum in der Hauptkammer sollte durch die Präparationsschritte sowie durch gegebenenfalls nachträglich durchgeführte Temperaturbehandlungen bis hin zur kompletten Gefriertrocknung der Proben nicht beeinträchtigt werden.
- VII. Ein Schleusensystem sollte integriert werden, welches erlaubt, Proben in möglichst trockener Atmosphäre und möglichst schnell in das Vakuumsystem zu transferieren.

Um diese Rahmenbedingungen zu realisieren, wurde direkt an die Analysekammer der Apparatur eine weitere Vakuumkammer angebracht, in der die komplette Schnittpräparation⁹ stattfinden kann (vgl. Bedingung I und b). Dadurch kann diese Präparation keinen Einfluss auf das Ultrahochvakuum in der Analysekammer nehmen (vgl. Bedingung VI), es bleiben aber trotzdem kurze Transferzeiten zwischen Präparationsposition und Analyseposition möglich (vgl. Bedingung V). Zur Veranschaulichung der Position der Schnittkammer an dem Gerät ist in Abbildung 5 eine Übersichtszeichnung der Schnittapparatur und in Abbildung 6 eine Fotografie im endgültigen Einbauzustand dargestellt.

⁹ Fa. Bal-Tec AG, Liechtenstein

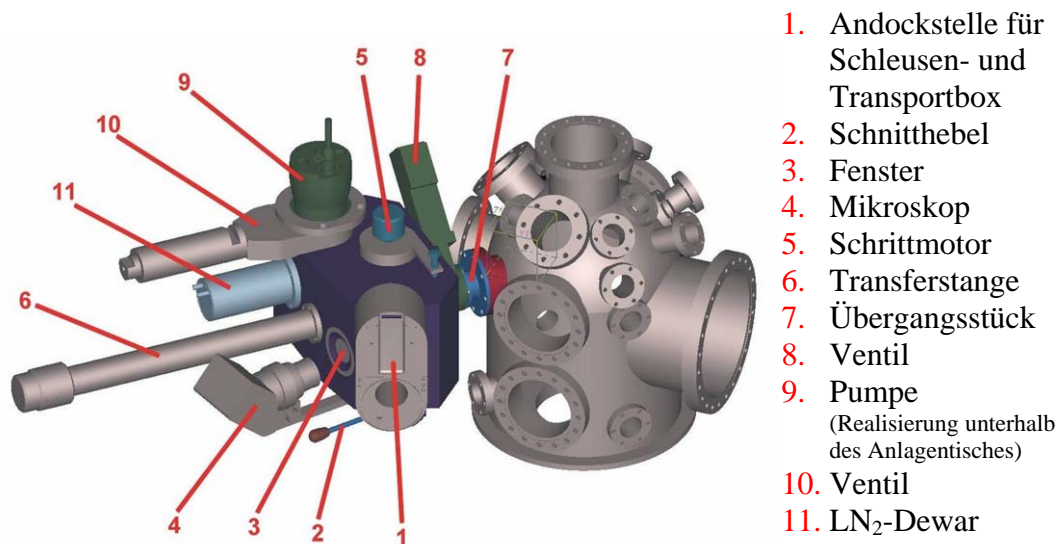


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Schnittapparatur sowie deren Position an der Analysekammer

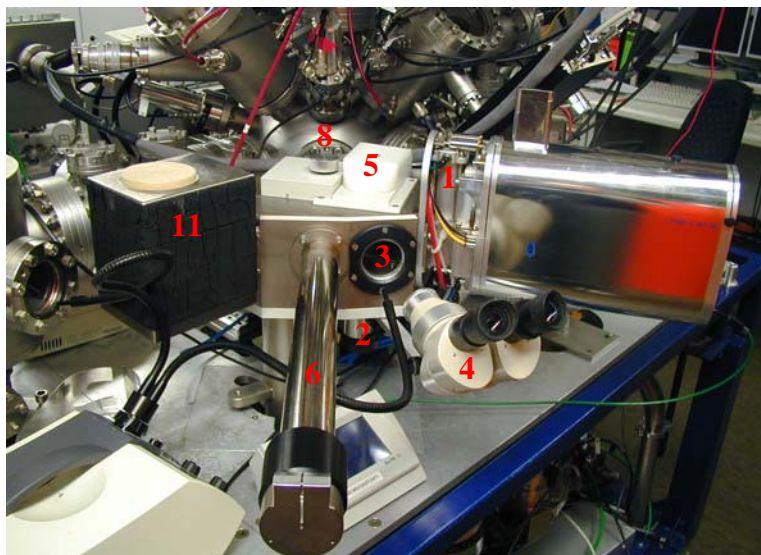


Abbildung 6: Foto der Schnittapparatur im eingebauten Zustand. Markiert sind die gleichen Komponenten der Apparatur wie in Abbildung 5, sofern sie sichtbar sind.

In den Abbildungen ist die direkt an die Analysekammer angeschlossene Schnittapparatur mit den dazu gehörenden Komponenten, die in den jeweiligen Bildern markiert sind, zu erkennen. In Abbildung 6 ist die an die Andockstelle eingehakte kombinierte Schleusen und Transportbox zu erkennen, mit der ein schnelles und unkompliziertes Einschleusen in das separate Vakuumsystem der Schnittapparatur realisiert wird (vgl. Bedingung VII). Um Adsorption vor und während des Einschleusprozesses aus der Umgebungsluft auf ein Minimum zu begrenzen, ist die Schleusenbox derart konzipiert, dass die Proben, welche in flüssigem Stickstoff auf dem Probenhalter montiert werden, unter trockener Stickstoffatmosphäre direkt aus flüssigem Stickstoff in die Schleusen- und Transportbox gebracht und von dort in weniger als 20 s in das Vakuumsystem der Schnittapparatur transferiert werden können. In Abbildung 7 ist die Schleusen- und Transportbox in der Position in dem Probenübergabewerkzeug gezeigt,

in der diese unter trockener Stickstoffatmosphäre mit dem Probenhalter beladen werden kann.

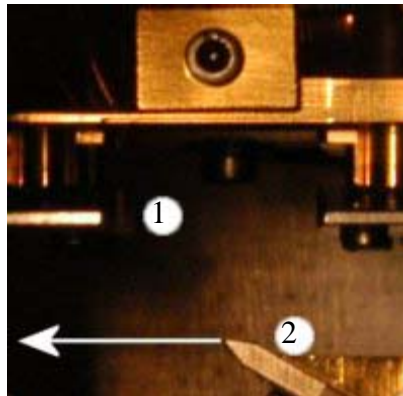


Abbildung 7: Schleusen- und Transportbox in Probenübergabewerkzeug. Im linken Bild von der Seite, im rechten von oben abgebildet.

Die blaue Styrodurwanne kann so hoch mit flüssigem Stickstoff befüllt werden, dass der komplette Probenhalter vollständig von flüssigem Stickstoff bedeckt ist. Verdampfender Stickstoff steigt permanent nach oben, so dass sich die komplette Wanne und die Schleusen- und Transportbox mit trockener Stickstoffatmosphäre füllen. Durch dieses Verfahren kann die Adsorption von Wasser auf den Oberflächen des Probenhalters bereits während des Schleusprozesses auf ein Minimum begrenzt werden. Obwohl die Proben üblicherweise noch einmal im Vakuum geschnitten werden, so dass die später zu analysierende Oberfläche nie der Umgebungsluft ausgesetzt gewesen sein wird, ist dies wichtig, um eine Erhöhung des Anteils von Wasser im Restgas der Schnittapparatur zu begrenzen. In der eingehängten Position kann die Schleusenstange der Schleusen- und Transportbox in den Probenhalter gefahren werden und dieser schließlich direkt aus dem Stickstoffbad in die Box hineingezogen werden.

In der Schnittapparatur wird der Probenhalter samt der Probe kopfüber in eine in einer Richtung manipulierbare Probenhalteraufnahme gebracht, deren Temperatur mit einer Genauigkeit von 1 °C zwischen -150 °C und -20 °C regel- und kontrollierbar ist. Wie in Abbildung 8 zu erkennen befindet sich unterhalb der Probe das Messer, welches mittels eines außerhalb der Vakuumkammer angebrachten Hebels vor und zurück bewegt werden kann. Nach einer zunächst groben Höhenanpassung zwischen Messer und Probenoberfläche kann die Probenhalterung mit einem fein zu steuernden Schrittmotor die Probe zum Messer hinbewegen. Dieses geschieht in wählbaren Schritten von 5 µm, 10 µm, 20 µm beziehungsweise 40 µm. Nach einem Schnitt zieht der Probenhalter automatisch die Probe zirka 200 µm wieder vom Messer weg, um eine Beschädigung der Probenoberfläche oder erneutes Verteilen von abgetragenen Probenmaterial auf der Oberfläche durch das Zurückfahren des Messers auszuschließen. Durch die Kopfüberanordnung wird vermieden, dass Teile auf der neu präparierten Probenoberfläche verbleiben und eine Analyse behindern. Abgeschnittene Teile der

Proben fallen auf ein Kälteschild, damit diese nicht durch ein Aufwärmen und eine daraus resultierende Gefriertrocknung, das Vakuum beeinträchtigen (vgl. Bedingung II). Für das Messer stehen mehrere Ausführungen zur Verfügung. Es können sowohl Hartmetallmesser als auch diamantbeschichtete Messer in die Apparatur eingebaut und benutzt werden. In der ersten hier gezeigten Ausbaustufe ist ein Hartmetallmesser eingebaut, mit dem alle Proben in den später dargestellten Beispielen geschnitten wurden.



- 1 Probenhalter
aufnahmeschienen
- 2 Hartmetallmesser

Abbildung 8: Foto der Probenhalteraufnahme in der Schnittposition, aufgenommen aus Richtung der Andockstelle für die Schleusen- und Transportbox. Die Bewegungsrichtung des Messeres ist durch den weißen Pfeil angedeutet.

Der gesamte Schnittprozess kann über ein optisches Mikroskop von außerhalb der Vakuumkammer beobachtet und kontrolliert werden. Der komplette Bereich unterhalb der Probe ist mit einem Kälteschild versehen, der zum einen den ohnehin vorhandenen Anteil von Wasser im Restgas minimieren soll, zum anderen aber den beim Schneiden oder Brechen von wasserhaltigen Proben auftretenden so genannten Outburst [65] von gasförmigen Wasser ins Restgas möglichst schnell binden soll, damit dieser nicht unspezifisch auf der Probenoberfläche reabsorbieren kann.

Schließlich ist an der Schnittkammer noch eine Transferstange installiert, mit der die Probe durch ein Ventil zwischen Hauptkammer und Schnittkammer in die Analysekommer transferiert werden kann.

3.2.2.2 Probenhalter

Der Basiskörper des Probenhalters für die Kryoschnittpräparation und die SIMS-Analyse gekühlter Proben basiert auf einem Entwurf der Firma BalTec, dessen eigentliche Probenaufnahme spezifisch auf das jeweilige zu analysierende biologische Probensystem angepasst wurde. Die im wesentlichen aus Kupfer bestehenden Basiskörper mit einer Grundfläche von $18 \times 18 \text{ mm}^2$, können mittels eines Exzentermechanismus, der durch die Schleusenstange bedient wird, durch Federkraft

fest auf die jeweiligen Probenhalteraufnahmen in der Kryopräparationskammer und in der Analysekommer aufgeklemmt werden, um maximalen thermischen Kontakt zu gewährleisten. Der Probenhalter ist mit seiner Grundfläche von $18 \times 18 \text{ mm}^2$ so groß gestaltet, dass er die maximale Probengröße nicht zu sehr einschränkt. Trotzdem können bei einer Probenhalterhöhe von 5-10 mm Zeiten ohne aktive Kühlung, zum Beispiel beim Schleusen in das Vakuum hinein oder zwischen den Kammern, aufgrund genügend Masse überbrückt werden, ohne dass dies einen nennenswerten Einfluss auf die Proben temperatur hat (vgl. Bedingung c bzw. III). Gleichzeitig ist der Probenhalter aber nicht zu groß, so dass die Kühlleistung der Probenhalteraufnahmen ausreicht, diesen auch definiert auf einer Temperatur zu halten oder zu bringen. Darüber hinaus konnte die Schleusen- und Transportbox derart klein dimensioniert werden, dass sie in unter 20 s evakuiert werden kann (vgl. Bedingung a bzw. VII).

In Abbildung 9 sind vier verschiedene Ausführungen dieses Probenhalters dargestellt. Zu erkennen ist der Grundblock aus Kupfer aus dem seitlich zwei Klemmen herausragen. Diese Klemmen werden mittels Federkraft nach oben gedrückt. In die Probenhalteraufnahme eingeführt und entspannt, drücken sie den Probenhalter fest nach unten. Entspannt werden die beiden Klemmen durch drehen der in den Probenhalter hineingefahrenen Schleusenstange, deren Endstück auf diese Probenhalter und diesen Klemmemechanismus ausgelegt ist.

Die Probenaufnahmen auf den Probenhaltern, die die eigentlichen Proben halten und den thermischen Kontakt zu diesen ermöglichen, sind jeweils individuell auf die einzelnen Proben hin konzipiert und realisiert worden.

So kann für die Analyse von ursprünglich flüssigen Proben, beziehungsweise von Proben in Suspensionen, eine spezielle Klemme auf dem Probenhalter montiert werden. Diese Klemme ermöglicht Probenteller, auf denen die Proben aufgetropft und kryofixiert wurden, leicht bei Kühlung durch flüssigen Stickstoff auf den Probenhalter zu klemmen und wieder zu lösen. Dabei wurde die Klemme derart auf die Probenteller angepasst, dass die sie an keiner Stelle über den oberen Rand des Probentellers hinausragt, damit ein Schneiden in der Vakuumkammer möglich bleibt. Eine solche Probenaufnahme ist in Abbildung 9A dargestellt.

Für die Analyse von Zellkulturen, die auf Substraten kultiviert wurden, beziehungsweise von Gewebeteilen, die auf Substrate aufgebracht wurden, können die Substrate entweder direkt auf den Probenhalter geschraubt werden, wenn das Substrat, wie zum Beispiel Titan, ein Schrauben zulässt. Ein solches Beispiel ist in Abbildung 9B dargestellt. Wird spröderes Substratmaterial verwendet, zum Beispiel Silizium, kann in einem solchen Fall auf ein Klemmen zurückgegriffen werden. Hier kann aber die Bedingung, dass die zu schneidende und zu analysierende Probenoberfläche der höchste

Punkt auf dem Probenhalter sein muss, Einschränkungen mit sich bringen. Proben auf flexiblen Substraten, zum Beispiel Filter aus Teflon, können wiederum bereits beim Einfrieren in einen Rahmen gespannt werden, der zum einen später leicht auf dem Probenhalter montiert werden kann und zum anderen die zu schneidenden Flächen der Probe gegenüber dem Rahmen exponiert. Das Beispiel für eine Halterung für diese Proben ist in Abbildung 9C dargestellt.

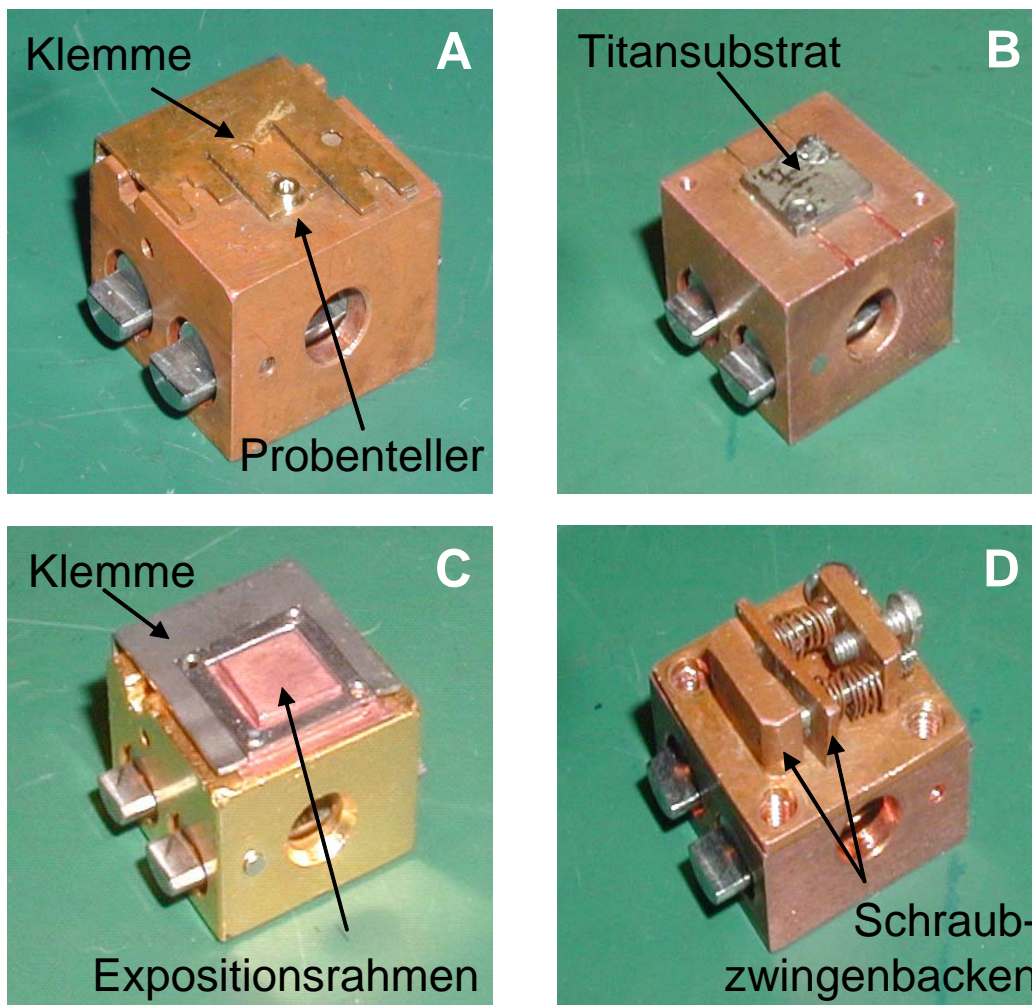


Abbildung 9: Verschiedene an unterschiedliche Probensysteme angepasste Probenhalteraufbauten

Für Proben, die als Block eingefroren wurden, wurde eine Probenaufnahme nach Art einer kleinen Schraubzwinde konstruiert, in die die Proben, entweder direkt oder in einer Hülse fixiert, eingespannt werden können. Bei sehr spröden Proben können die Backen der Zwinde noch mit einigen Schichten Indium versehen werden, welches auch bei tiefkalten Temperaturen relativ weich bleibt und somit die Gefahr des Brechens der Probe minimiert. In Abbildung 9D ist ein solcher Halter dargestellt.

Alle Halteraufbauten beziehungsweise Klemmmechanismen können auf dem Grundprobenhalter angebracht werden. Für viele weitere Spezialanwendungen wurden

Probenhalteraufbauten realisiert, die hier nicht im Einzelnen dargelegt werden. Auf die Art wie die Proben auf den Probenhaltern fixiert wurden, um die in dieser Arbeit gezeigten Beispielmessungen durchzuführen, wird in den jeweiligen Kapiteln noch kurz eingegangen.

Neben der Installation dieses Schnittinstruments direkt an die Analysechamber der Apparatur, sind auch Modifikationen an dem ToF-SIMS-Instrument gegenüber Standardapparaturen durchgeführt worden, die im Folgenden beschrieben werden sollen.

3.2.2.3 Kühlbare Probenhalteraufnahme

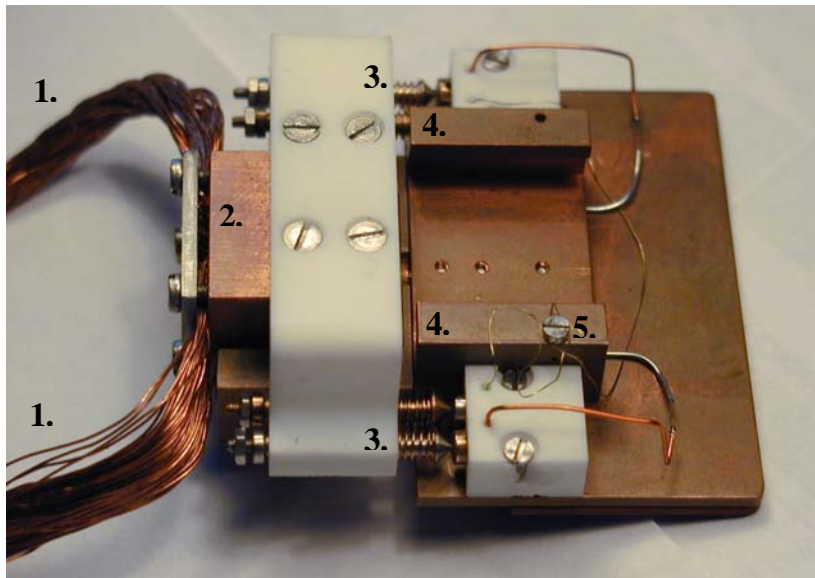
Gegenüber dem Standardbetrieb bei nicht zu kühlenden Proben musste für den Manipulator in der Analysechamber bei Verwendung der modifizierten Probenhaltersysteme für zu kühlende Proben, die Probenhalteraufnahme ebenfalls speziell angepasst werden.

Mit einem Aufbau, bei dem die Probenhalteraufnahme mittels fest installierten Zuleitungen direkt von flüssigem Stickstoff durchspült wurde, konnten zwar Temperaturen von deutlich unter -175 °C realisiert werden, allerdings waren aufgrund der Stickstoffzuleitungen die Verfahrensmöglichkeiten des Manipulators stark eingeschränkt, wodurch ein Anfahren der interessierenden Probenstelle und damit auch die Variabilität bezüglich Größe oder Höhe der Proben und der Probenhalter enorm eingeschränkt waren. Auch die Makrorasterfunktion hätte bei einem solchen Aufbau nicht zur Verfügung gestanden und auch bei nicht zu kühlenden Proben wäre es zu Einschränkungen im Messbetrieb gekommen. Darüber hinaus konnte nicht sicher ausgeschlossen werden, dass durch den verdampfenden Stickstoff Probenvibrationen hervorgerufen werden, die die laterale Auflösung einer Analyse verschlechtert hätte.

Daher wurde ein anderer Aufbau entwickelt, bei dem die zusätzliche kühlbare Probenhalteraufnahme auf dem Manipulator mit einem auf- und wieder abschiebbaren Kühlblock verbunden wird. Dieser ist mit flexiblen Kupferlitzen versehen, die an einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten Oberfläche fixiert sind. Der Kühlblock drückt sich mittels Federkraft fest auf den zu kühlenden Teil der Probenhalteraufnahme auf und gewährleistet so einen maximalen Wärmekontakt. Durch die flexiblen Litzen bleibt eine Translation im Rahmen der Probenhaltergröße unter dem Massenspektrometer uneingeschränkt möglich, was eine Makrorasteranalyse auch gekühlter Proben erlaubt (vgl. Bedingung h). Eine vollständige Rotation der Probe hingegen ist mit diesem System nicht mehr realisierbar. Darüber hinaus konnte eine Dämpfung, der durch verdampfenden Stickstoff entstehenden Vibrationen, so gewährleistet werden (vgl.

Bedingung g). Die Verwendung des über die Kupferlitzen gekühlten Blocks stellt einen Kompromiss zwischen hohen Kühlleistungen, möglichst umfangreicher Verfahrensmöglichkeit des Manipulators und der Vermeidung der Übertragung von Vibrationen auf den Probenhalter dar.

Um eine definierte Temperatur halten zu können oder um Temperaturrampen zu fahren, ist ein Gegenheizen mittels in die Probenhalteraufnahme integrierter Heizdrähte kontrolliert möglich (vgl. Bedingung c und f). Die minimale Temperatur auf der Probenhalteraufnahme, die erreicht wird beträgt -135 °C die maximale mögliche Temperatur liegt bei zirka $+250\text{ °C}$. In diesem Intervall kann in 1 °C Schritten die Temperatur gewählt werden. Auf diese Probenhalteraufnahme kann der Probenhalter mittels Federkraft geklemmt werden, um optimalen Wärmekontakt zu gewährleisten. In Abbildung 10 ist diese kühlbare Probenhalteraufnahme mit aufgeklemmten Kühlblock (2) als Einzelteil, also ohne den Manipulator, dargestellt.



1. **Kupferlitzen**
2. **Kühlblock**
3. **Kontakt-
übergabe**
4. **Klemm-
schienen**
5. **Thermo-
element**

Abbildung 10: Kühlbare Probenhalteraufnahme als Einzelteil mit aufgestecktem Kühlblock

Zu erkennen sind in der Mitte des Bildes die Klemmschienen (4) auf die beziehungsweise unter die die Probenhalter geklemmt werden können. Auf der linken Seite ist der Kühlblock (2) mit den Kupferlitzen (1) zu erkennen. Auf diesem ist noch ein aus elektrisch und thermisch isolierendem Marcor gefertigter Block angebracht, über den die elektrischen Kontakte (3) zum Heizen und zur Temperaturmessung übergeben werden. Unter der Schraube (5), die auf der vorderen Probenhalterschiene zu erkennen ist, befindet sich ein Thermoelement. Mit diesen Komponenten kann die Temperatur auf der Probenhalteraufnahme kontrolliert und geregelt werden, bevor ein Probenhalter aufgeschoben ist. Dies ist notwendig, da die Probenhalter selbst nicht aktiv gekühlt werden und deren Temperatur von den Probenhalteraufnahmen in der Schnittposition beziehungsweise auf dem Manipulator vorgegeben wird.

Für eine Kryoanalyse ist die Kontrolle der Proben­temperatur unerlässlich. Nur so kann sichergestellt werden, dass es nicht ungewollt zu einer weit reichenden Gerfrier­troch­nung kommt. Die direkte Probenoberfläche ist für die Temperaturmessung prinzipiell der beste und repräsentativste Ort. Allerdings ist eine Temperaturmessung an diesem Ort bei den zu untersuchenden Proben nicht möglich. Zum einen müsste ein Thermo­element direkt bei der Probenfixierung mit eingefroren werden, zum anderen darf, soll die Probe noch geschnitten werden, der Schnittprozess nicht behindert werden.

Da es weniger das Entwicklungsziel war mit den zu analysierenden Proben schnelle Temperaturrampen zu fahren, sondern gleichmäßige quasistatische Bedingungen für die Analyse zu gewährleisten, ist eine Temperaturmessung direkt an der Probenoberfläche nicht zwingend notwendig, sofern die Messung an einem anderen Ort, wie zum Beispiel der Probenhalteraufnahme ausreichend repräsentative Messergebnisse liefert.

Obwohl alle Komponenten derart konstruiert wurden, den thermischen Widerstand zu minimieren, beziehungsweise den thermischen Kontakt zwischen Aufnahme und Halter trotz der vielfältigen Manipulationsmöglichkeiten größtmöglich zu halten, bleibt noch zu verifizieren, ob die gemessene Temperatur auf der Probenhalteraufnahme auch der Temperatur der Probe entspricht.

Zur Durchführung dieses Experimentes wurde ein Thermo­element in einem Tropfen Wasser eingefroren und auf dem Probenhalter angebracht, in die Anlage eingeschleust und in der Analyseposition auf die auf -130 °C geregelte Probenhalteraufnahme fixiert. Der erste Vergleich der gemessenen Temperaturen zeigte bei beiden Thermo­elementen im Rahmen der Messgenauigkeit übereinstimmende Werte. Um die Reaktion auf Temperaturänderungen zu überprüfen wurde in drei Schritten über die elektronische Temperaturregelung die Temperatur zunächst auf -120 °C , danach auf -110 °C und schließlich auf -80 °C erhöht. Es wurden gleichzeitig die Temperatur der Probenhalteraufnahme¹⁰ sowie die Temperatur in dem Wasser- beziehungsweise Eistropfen gemessen.

In Abbildung 11 sind die gemessenen zeitlichen Temperaturverläufe auf der Probenhalteraufnahme und in dem Eistropfen direkt nach Einstellen der jeweiligen Zieltemperatur¹¹ dargestellt.

¹⁰ „Ist-Wert“ der Temperaturregelung

¹¹ „Soll-Wert“ der Temperaturregelung

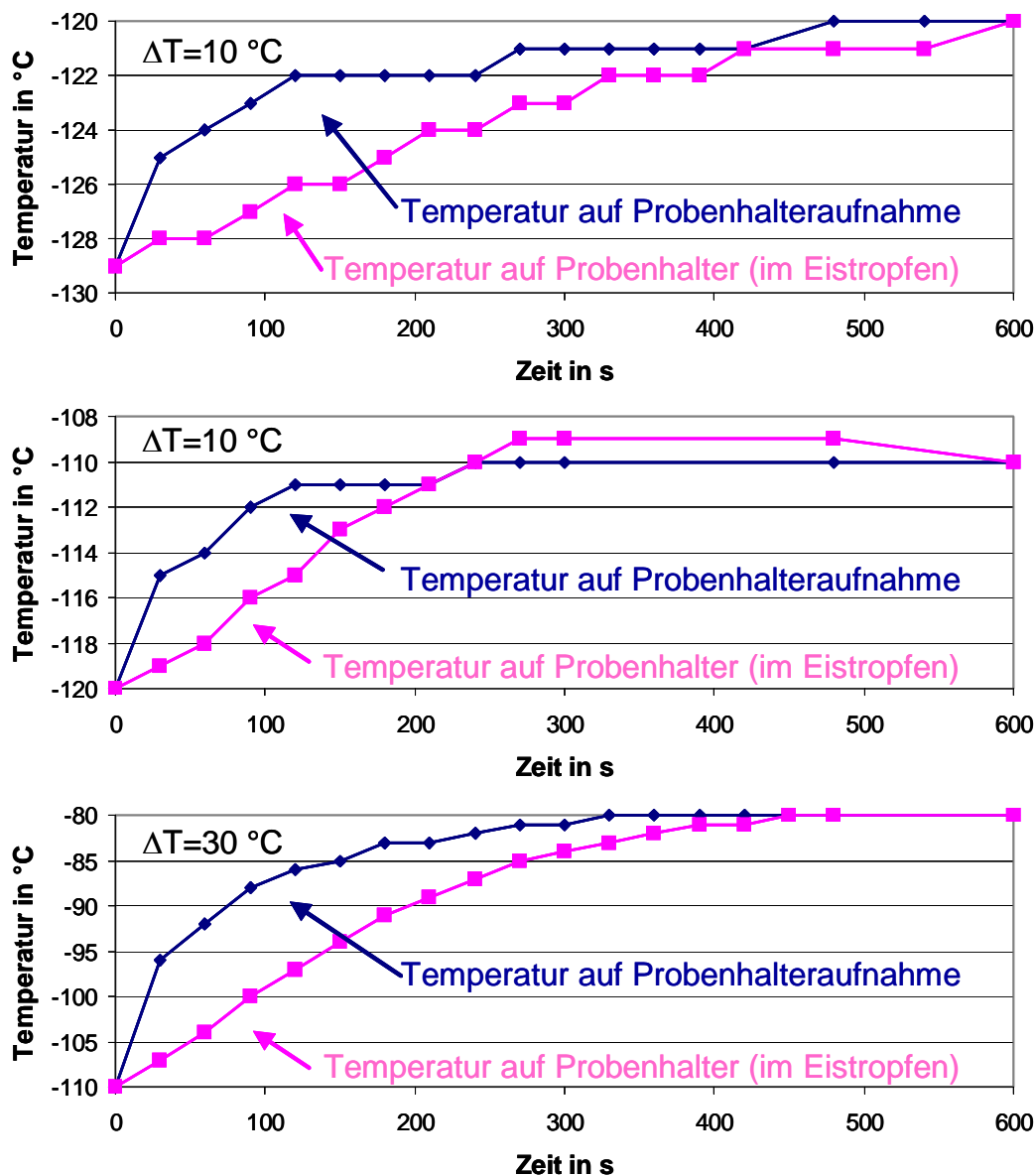


Abbildung 11: Zeitliche Verläufe der Temperatur auf der Probenhalteraufnahme und in einem Eistropfen auf dem Probenhalter, nach Einstellen der Zieltemperatur von -120 °C, -110 °C beziehungsweise -80 °C

Die Temperaturverläufe zeigen zum einen, dass im Rahmen der Messgenauigkeit der Instrumente die Proben­temperatur, ist diese erst einmal ins thermische Gleichgewicht gelangt, gleich der Temperatur der Probenhalteraufnahme ist. Des Weiteren ist zu erkennen, dass zum einen die Zieltemperatur auf der Probenhalteraufnahme bei den gewählten Temperatursprüngen immer in unter 10 min erreicht wird und dass die Regelparameter derart eingestellt sind, dass ein deutliches Überschwingen vermieden wird. Zum anderen ist die Temperaturdifferenz zwischen den beiden Messpositionen nach spätestens 3 min ausgeglichen. Aufgrund der Zunahme der effektiven Kühlleistung bei höheren Temperaturen werden die Zeiten für das Einregeln der Temperatur kleiner als bei niedrigeren Temperaturen.

Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt, dass die Werte der Temperaturmessung für den Betrieb konstanter geregelter Temperatur oder für langsame Temperaturrampen ($\Delta T/\Delta t < 1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$) ausreichend übereinstimmen, so dass die auf der Probenhalteraufnahme gemessene Temperatur gleich der Probenoberflächentemperatur gesetzt werden darf. Bei schnellen Temperaturrampen ist allerdings eine Temperaturmessung direkt an der Probenoberfläche oder zumindest in unmittelbarer Nähe zu dieser zwingend notwendig.

Mit diesen Ergänzungen beziehungsweise Modifikationen an der ToF-SIMS-Apparatur sind prinzipiell die Voraussetzungen für eine Kryoschnittpräparation im Vakuum sowie eine Kryo-SIMS-Analyse geschaffen. Da aber bei tiefkalten Proben Adsorption auf der Probenoberfläche, insbesondere von Wasser, im Gegensatz zu Raumtemperatur ein deutlich gesteigertes Problem darstellen kann, sind noch weitere Modifikationen an dem Vakuumsystem vorgenommen worden, die im Folgenden kurz dargelegt werden sollen.

3.2.2.4 Modifikationen am Vakuumsystem

Aufgrund der geplanten häufigen Probenwechsel, des Betriebes von Gasquellen und der Möglichkeit eines gezielten Gaseinlasses ist für das Vakuumsystem eine Kombination von gasfördernden Turbomolekularpumpen gewählt worden. Da diese Pumpen aber für leichte Gase, also auch Wasser, vergleichsweise geringe Saugleistungen aufweisen, sind zusätzlich in der Analysechamber noch großflächig, mit flüssigem Stickstoff gekühlte Kaltschilde angebracht, die insbesondere den Partialdruck von Wasser zusätzlich stark reduzieren. Bei der Platzierung dieser Schilde musste ein Kompromiss eingegangen werden. Der geeignetste Ort für die Kaltschilde wäre der Halbraum über der Probe. Hier installierte Kaltschilde würden dazu führen, dass alle Flugbahnen von Restgasteilchen, die auf der Probenoberfläche enden können, von tiefkalten Flächen ausgingen. Der Restgasdruck direkt über der Probenoberfläche könnte somit besonders effektiv minimiert werden. Dies war allerdings nicht zu realisieren, da eine Vielzahl von Komponenten, wie Massenanalysator, Ionenquellen, Ladungskompensationselektronenquelle und Probenbeobachtungssysteme von oben auf die Probenoberfläche gerichtet sind, deren Oberflächen nicht gekühlt werden können. Somit mussten die Kaltschilde unterhalb der Probe angebracht werden. Des Weiteren ist zusätzlich noch eine Titansublimationspumpe installiert, die ihrerseits ebenfalls mit durch flüssigen Stickstoff gekühlten Absorberflächen ausgestattet ist. Die Stickstoffreservoirs beider Systeme werden in einstellbaren Intervallen regelmäßig mit flüssigem Stickstoff aufgefüllt. Nach einer Befüllung wird in der Titansublimationspumpe neues Titan auf die dafür vorgesehenen Oberflächen sublimiert, um somit stets maximale Pumpleistung zu gewährleisten.

Obwohl diese beiden nicht gasfördernden Pumpen weder an den optimalen Stellen im Vakuumsystem angebracht werden konnten, noch der Druckbereich, in dem später gearbeitet werden soll beziehungsweise kann (vgl. Dampfdruckkurve des Wassers), für ihren Einsatz besonders geeignet ist, sind sie in der Lage, den Druck, insbesondere den Partialdruck von Wasser, auch direkt über der Probenoberfläche zu senken. Dies zeigte eine Restgasanalyse exakt über der Probenoberfläche, bei der die zeitliche Entwicklung der Zusammensetzung des Restgases während der Befüllung der, die Kaltschilde versorgenden, Stickstoffreservoirs bestimmt wurde. Hierfür wurden die Restgasteilchen mit Hilfe der für die Laser-SNMS vorgesehenen Laserstrahlung ionisiert und anschließend mit dem ToF-Massenspektrometer ein Spektrum aufgenommen.

Die Überprüfung mittels eines Restgasanalysators, der an einem seitlichen Flansch der Apparatur angebracht ist, war hierfür nicht geeignet, da dieser zu weit entfernt von der Probenoberfläche ist. In Abbildung 12 sind die zeitlichen Verläufe der Signalintensitäten von C^+ , CH^+ und C_2^+ als unterschiedliche Fragmente kohlenwasserstoffhaltiger Restgasbestandteile und die Signalverläufe von OH^+ und H_2O^+ als Signale, die den Wassergehalt des Restgases über der Probenoberfläche repräsentieren, dargestellt. Alle Signale sind auf ihren Anfangswert normiert und die Signalverläufe sind aufgrund der starken Streuung bei kurzen Analysezeiten geglättet. Mit dem Beginn der Messung wurde die Befüllung der Stickstoffreservoirs gestartet. Der Absolutdruck in der Analysechamber lag am Beginn der Messung bei 1×10^{-8} mbar.

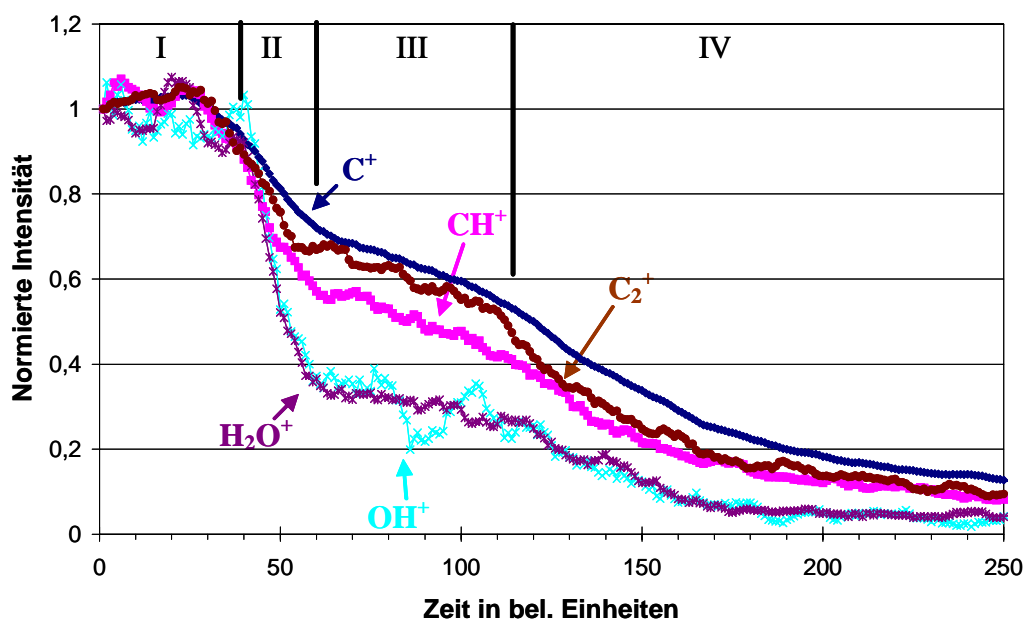


Abbildung 12: Zeitlicher Intensitätsverlauf ausgewählter unimolekularer Restgasteilchen nach Beginn der Befüllung der Kaltschildreservoirs mit flüssigem Stickstoff

Am Anfang der Messung, in Bereich I, bleiben die Signalverhältnisse der dargestellten Ionen abgesehen von Schwankungen weitestgehend gleich. Dieses deckt sich mit dem

Zeitraum, bis zu dem alle Zuleitungen des flüssigen Stickstoffs zu den Kältschildreservoirs abgekühlt sind, und es erst danach zu einer effektiven Kühlung der Kältschilde kommt. Das Einsetzen der Kühlwirkung ist im Bereich II zu sehen. Die Signale aller dargestellten Ionen nehmen deutlich ab, insbesondere fällt der rasche Abfall der Wasser repräsentierenden Signale auf zirka 30% ihres jeweiligen Anfangswertes auf. Mit Beginn des Bereiches III nimmt die Steilheit des Abfalls der Signalintensitäten wieder ab, was mit dem Erreichen der Endtemperatur der Kältschilde zu erklären ist. Mit dem Beginn des Bereiches IV nimmt die Steigung des Signalintensitätenabfalls noch einmal zu. Dies ist auf die zu diesem Zeitpunkt frisch sublimierte aktive Titanoberfläche in der Titansublimationspumpe zurückzuführen. Der Absolutdruck ist am Ende der Messung auf etwa 3×10^{-9} mbar gefallen.

Es zeigt sich somit, dass gegenüber einem Vakuumsystem, welches ausschließlich mit fördernden Turbomolekularpumpen evakuiert wird, durch den Einbau von Kältschilden und einer Titansublimationspumpe sowohl der Gesamtdruck, als auch insbesondere der Partialdruck von Wasser deutlich gesenkt werden kann, auch wenn diese Pumpen nicht an den optimalen Einbauorten installiert werden konnten.

4 Prozedur zur Minimierung von Wasseradsorption

4.1 Entwicklung einer Prozedur an einem Testsystem

Die durchgängige Kryopräparation und -analyse sowie das Schneiden beziehungsweise Brechen mit der Vakuum-Schnittapparatur eröffnet weitere Möglichkeiten des Einsatzes einer ToF-SIMS Analyse für biologische Proben. Zwar ist eines der Hauptprobleme der gewöhnlichen Kryoanalyse, nämlich Adsorption auf der zu analysierenden Oberfläche während des Einschleusens der kalten Probe in das Vakuumsystem, bei der aufgebauten Anlage bereits umgangen. Allerdings kann es auch bei dieser Präparationsprozedur zu Artefakten kommen, die eine quantitative aber auch eine qualitative SIMS-Analyse beeinflussen gegebenenfalls sogar unmöglich machen können.

So kann der Schnittprozess prinzipiell zu einer Umverteilung von oberflächennahen Atomen und Molekülen führen, wobei Material mechanisch verschoben oder durch das Messer verteilt wird. Darüber hinaus ist zu klären, inwieweit die endgültig freigelegte Probenoberfläche frei von unerwünschten Bedeckungen ist, da gerade kalte Oberflächen Material aus dem Restgas im Vakuumsystem auf ihre Oberfläche adsorbieren können. Ein besonderes Problem stellt dabei der aus der Literatur bekannte „Outburst“ [65] beim Brechen oder Schneiden wasserhaltiger Proben dar, bei welchem gasförmiges Wasser freigesetzt wird und lokal dessen Partialdruck erheblich ansteigen lässt. Eine potenzielle Rückadsorption auf die zu analysierende Probenoberfläche fände völlig unspezifisch statt und würde somit, obwohl es sich um probeneigenes Wasser handelt, die Interpretation der Analyse erschweren, im Extremfall sogar unmöglich machen.

Es muss also geklärt werden, inwieweit die Schnittpräparation im Vakuum eine Oberfläche freilegt, die der realen Probenzusammensetzung entspricht oder ob es zu Präparationsartefakten kommt.

Um beide möglichen Effekte sinnvoll zu untersuchen, wurde ein Probensystem gewählt, dass sowohl aus wasserhaltigen als auch aus nicht wasserhaltigen Bereichen aufgebaut ist. Dieses Zwei-Phasensystem besteht aus einem PVC-Schlauch, der mit einer wässrigen Kaliumchloridlösung (KCl) gefüllt wurde. Die Probe besteht somit in der Mitte aus einem wasserhaltigen Teil, der Kaliumchloridlösung, sowie am Rand aus

einem nicht wasserhaltigen Bereich, dem Schlauchmaterial [66]. Eine solche Probe wurde nun genauso wie die biologischen Proben in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Propan schockgefroren, in flüssigem Stickstoff gelagert und unter Stickstoffatmosphäre in das Vakuumsystem transferiert. Hier wurde die Probe bei der minimalen möglichen Temperatur von zirka -150 °C mehrfach geschnitten bis eine glatte Oberfläche über die komplette Probe realisiert war. Anschließend wurde die Probe in die Analysekammer transferiert und hier bei -130 °C eine Lateralverteilungsanalyse der Sekundärionen durchgeführt. Bei artefaktfreier Präparation sollten beide Bereiche der Probenoberfläche in den Verteilungsbildern der Elemente und Moleküle zu unterscheiden sein.

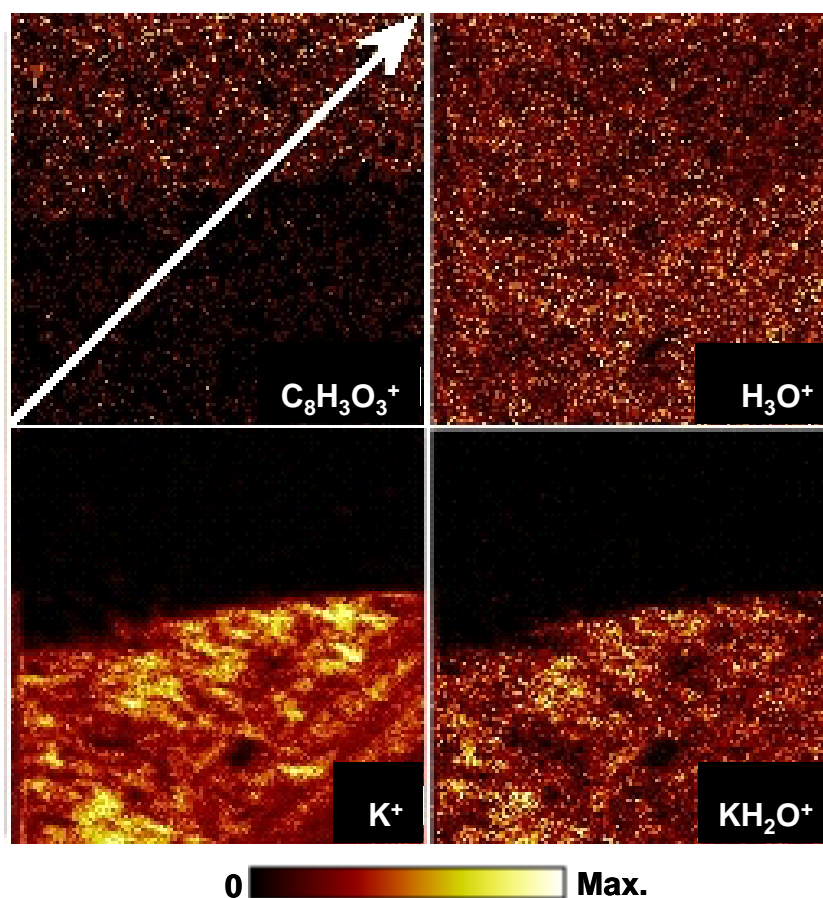


Abbildung 13: Ausgewählte Verteilungsbilder positiver Sekundärionen, nach einer Schnittpräparation eines mit wässriger KCl-Lösung gefüllten PVC-Schlauches, aufgenommen bei einer Proben temperatur von -130 °C

In Abbildung 13 ist das Ergebnis einer SIMS-Analyse an dieser Probe dargestellt. Der weiße Pfeil markiert die Schnittrichtung, in der das Messer bei der Schnittpräparation geführt wurde. Aufgetragen sind die lateralen Verteilungen einiger Ionen auf einer Fläche von $300\text{ }\mu\text{m} \times 300\text{ }\mu\text{m}$. Das $\text{C}_8\text{H}_3\text{O}_3^+$ Signal auf Masse 149 u ist ein Fragment eines im PVC-Schlauch enthaltenem Weichmachers und repräsentiert damit den

Bereich des Schlauches. Die Signale von K^+ und KH_2O^+ repräsentieren hingegen den Bereich der Kaliumchloridlösung.

Eine Trennlinie zwischen beiden Phasen ist in diesen Bildern klar zu erkennen, so dass ein deutliches mechanisches Verschieben von Probenbestandteilen um mehrere Mikrometer ausgeschlossen werden kann. Auffällig ist bei dieser Messung hingegen das Verteilungsbild des H_3O^+ . Es ist über der kompletten analysierten Fläche nachweisbar und zeigt eine weitestgehend homogene Verteilung. Da es im Bereich des Schlauchmaterials aufgrund dessen chemischen Zusammensetzung nicht zu erwarten ist, muss es also während oder nach der Schnittpräparation auf die Probenoberfläche aufgebracht worden sein. Da K^+ und KH_2O^+ auf dem Bereich des Schlauches nicht nachgewiesen werden, muss das Wasser aus der Gasphase adsorbieren und kann nicht aus einem „Verschmieren“ von während des Schneidens verflüssigtem Wasser stammen.

Hierfür sind zwei Mechanismen möglich. Wie dargelegt kann der Ursprung des Wassers in dem ohnehin in den Vakuumkammern vorhandenen Wasseranteil im Restgas oder aber in dem kurzzeitigen starken Anstieg des Wasserrestgaspartialdruckes während des Schnittprozesses - dem Outburst - liegen.

Ein erster Hinweis ist bereits dadurch gegeben, dass auf Proben, die kein Wasser enthalten, aber unter gleichen Bedingungen behandelt wurden, also kalt eingeschleust, kalt geschnitten und kalt analysiert wurden, immer Wasser auf der Probenoberfläche nachgewiesen werden kann. Die Intensität der Wasser repräsentierenden Signale auf solchen Proben liegt allerdings nicht in der Größenordnung, wie dies nach einem Schnitt wasserhaltiger Proben häufig beobachtet wird [67]. Maßgebliche Ursache einer so deutlichen Bedeckung der Oberfläche, wie in Abbildung 14, scheint also in dem Outburst, der bei nicht-wasserhaltigen Proben nicht vorkommen kann, zu liegen.

Um zu unterscheiden, ob bei wasserhaltigen Proben das auf der Probenoberfläche adsorbierte Wasser aus der Probe selbst oder aus dem Restgas stammt, wurden auf genau die gleiche Art zwei unterschiedliche Schlauchproben präpariert. In der ersten Probe wurde Wasser verwendet, das nicht dem natürlichen Isotopenverhältnis entsprechend zu 99% aus $H_2^{16}O$ sondern zu 97% aus $H_2^{18}O$ besteht. Die andere Probe wurde mit Wasser präpariert dessen Wasseranteil zu 99% aus 2H_2O beziehungsweise D_2O , also dem so genannten schweren Wasser, besteht.

Es kann angenommen werden, dass durch das bloße Einschleusen dieser Proben die allgemeine Restgaszusammensetzung in der Analysekommer sich nicht ändert und somit der Wasseranteil im Restgas in der natürlichen Isotopieverteilung vorliegt und

dadurch der Anteil von D_2O beziehungsweise $H_2^{18}O$ unter einem Prozent des Gesamtanteils liegt.

Anders sieht dies beim Schnittprozess aus. Kommt es hier zu einem intensiven Outburst, steigt der Partialdruck in unmittelbarer Nähe zu der Probenoberfläche der jeweils in den Proben verwendeten Wasserarten stark an. In wie weit und wie schnell dieser von den Kaltschilden in der Schnittkammer absorbiert werden kann ist kaum abzuschätzen.

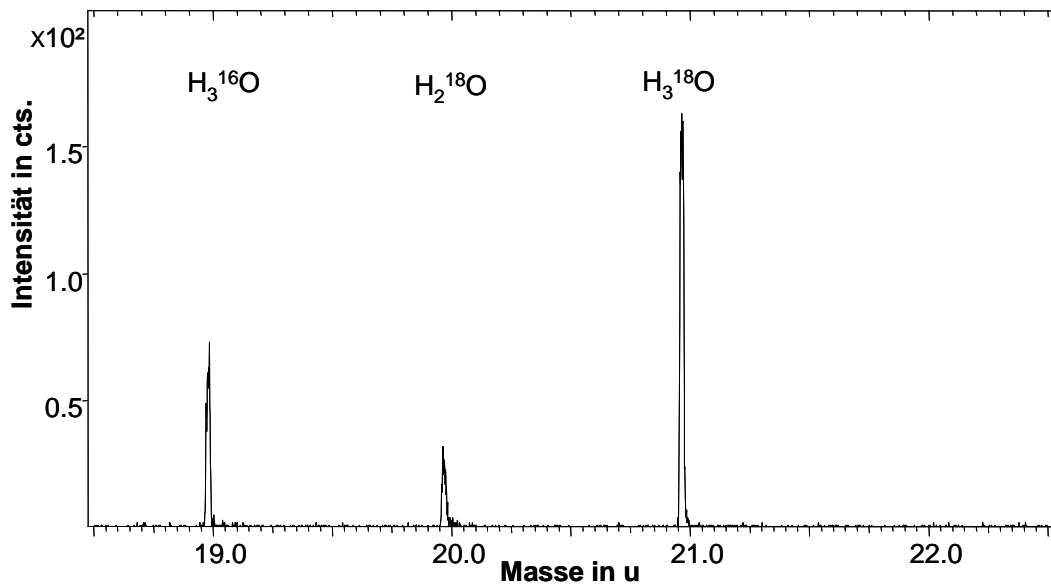


Abbildung 14: Ausschnitt aus einem SIMS-Spektrum positiver Sekundärionen, aufgenommen auf dem Schlauchbereich einer Probe, die mit einer Lösung aus $H_2^{18}O$ und KCl gefüllt war.

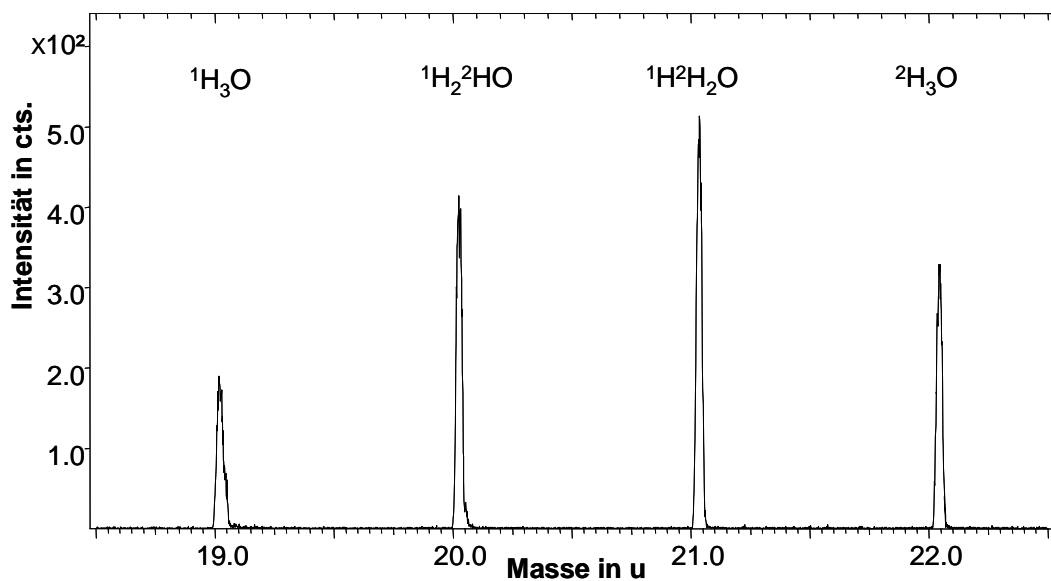


Abbildung 15: Ausschnitt aus einem SIMS-Spektrum positiver Sekundärionen, aufgenommen auf dem Schlauchbereich einer Probe, die mit einer Lösung aus D_2O und KCl gefüllt war.

In Abbildung 14 und in Abbildung 15 sind jeweils Ausschnitte von Spektren einer SIMS-Analyse auf dem Schlauchmaterial der jeweiligen Proben, nach einer zuvor erfolgten Schnittpräparation, dargestellt. Die Proben temperatur betrug $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$.

In beiden Abbildungen ist jeweils der Massenbereich von 19 u bis 22 u dargestellt und die Moleküle angegeben, denen die Hauptintensitäten zugeordnet werden konnten. Es ist deutlich zu erkennen, dass es auf der Schlauchoberfläche zu einer Adsorption von Wasser kommt, die sich aus zwei Anteilen zusammensetzt. Der größte Anteil der Wasseradsorbatschicht besteht in beiden gezeigten Beispielen aus Wassermolekülen, die aus dem jeweiligen isoto penmarkierten Wasser aufgebaut sind, welches aus dem Outburst stammen muss. Dem gegenüber kann das Signal auf der Masse 19 u, also im wesentlichen $^1\text{H}_3\text{}^{16}\text{O}^+$ aufgrund der beobachteten Intensitätsverhältnisse nicht aus der Probe stammen, da das Verhältnis von H_3O zu den jeweiligen Signalen der schwereren Isotope weit über dem Verhältnis der in den isoto penmarkierten Testsystemen verwendeten Substanzen liegt. Es kommt also zusätzlich auch zu einer Bedeckung der Oberfläche durch Wasser aus dem Restgas der Vakuumkammern, welches irgendwann in dem Zeitraum zwischen Schnitt und Analyse auf der Probenoberfläche adsorbierte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es sowohl durch die Schnittpräparation als auch aus dem ursprünglichen Restgas zu einer Adsorption von Wasser auf der Probenoberfläche kommt, wobei das Ausmaß insbesondere des Anteils aus dem Outbursts nur schwer vorhersagbar ist, üblicherweise allerdings den deutlich größeren Anteil der Bedeckung ausmacht.

Ganz gleich woher das unspezifisch adsorbierte Wasser stammt, für eine SIMS-Analyse der ursprünglichen Probenoberfläche muss es entfernt werden. Wie im Grundlagenteil dargelegt, unterscheidet sich bei biologischen Proben das darin enthaltende Wasser erheblich von dem Wasser der Adsorbatschicht. Während letzteres als reines Wasser vorliegt, liegen in dem probeneigenen Wasser eine Vielzahl von gelösten Substanzen vor, gegebenenfalls sogar Festkörper die das Wasser umgeben.

Um ein Temperaturintervall zu finden, in dem die Wasseradsorbatschicht auf der Probenoberfläche bereits intensiv sublimiert, das probeneigene Wasser hingegen noch nicht, wurde zunächst an dem Testsystem, des mit H_2O gefüllten PVC-Schlauches, während einer SIMS-Analyse der frisch geschnittenen Probenoberfläche die Proben temperatur stetig von $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $-105\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhöht. Die Geschwindigkeit der Temperaturerhöhung wurde derart langsam gewählt, dass sichergestellt ist, dass die gemessene Temperatur auch der Temperatur auf der Probe entspricht (vgl. Kapitel 3.2.2.3). Während des Temperaturanstiegs wurden alle 2 Minuten die Signalintensitäten von Wasser, repräsentiert von H_3O^+ und H_5O_2^+ , und dem Weichmacher aus dem Schlauchmaterial, repräsentiert durch $\text{C}_8\text{H}_3\text{O}_3^+$, aufgenommen. Dabei wurde die SIMS-

Analyse im Lateralverteilungsanalysemodus auf einer Fläche durchgeführt, die sowohl Teile der Wasserphase abdeckte als auch Teile des Schlauches. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass gleiche Analyse- und Temperaturbedingungen in den verschiedenen Bereichen vorlagen.

Der zeitliche, beziehungsweise temperaturabhängige Verlauf der Signalintensitäten, aufgenommen auf dem Bereich des Schlauches, ist in Abbildung 16 dargestellt.

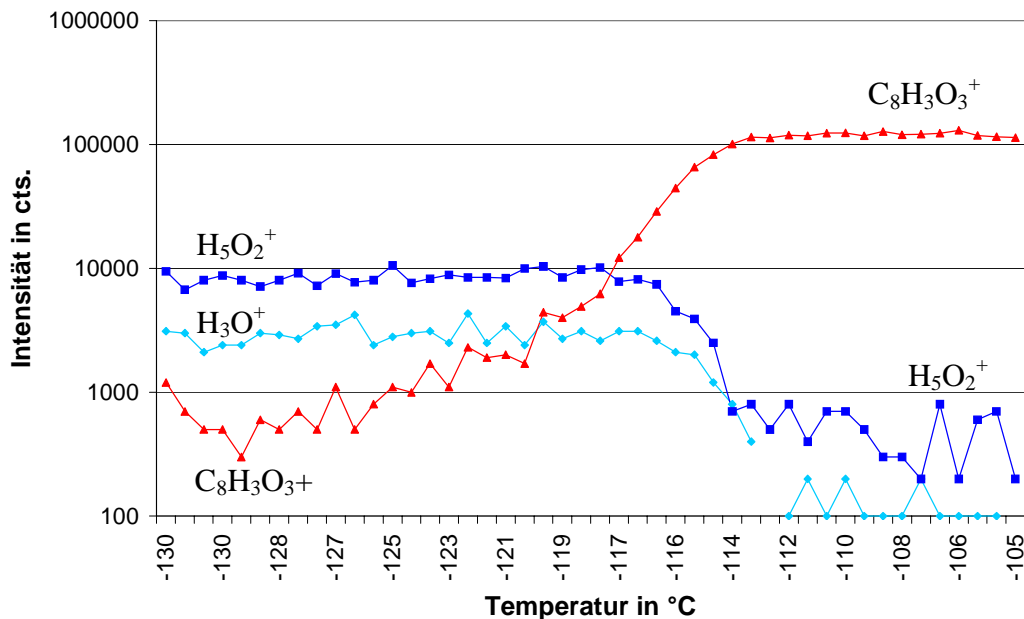


Abbildung 16: Verlauf der Signalintensitäten ausgewählter Sekundärionen während einer Proben-temperaturerhöhung von -130 °C auf -105 °C , ermittelt auf dem Schlauchbereich des Testsystems

Analog wie in der in Abbildung 13 dargestellten Lateralverteilungsanalyse ist auch hier zu Beginn der Messung bei einer Proben-temperatur von -130 °C Wasser auf dem Schlauchmaterial nachweisbar. Die Signalintensitäten von H_3O^+ und $H_5O_2^+$ sind sogar größer als die des Weichmacherfragmentes $C_8H_3O_3^+$. Es kam also zu einer starken Adsorption von Wasser, die anscheinend die Oberfläche dicht belegt.

Ab einer Temperatur von zirka -125 °C beginnt die Intensität des Weichmacher-fragmentesignals zu steigen. In dem Temperaturbereich von -118 °C bis -113 °C nimmt die Steigerung noch einmal zu. Bei etwa -112 °C hat die Signalintensität ihr Maximum erreicht, das um fast zwei Größenordnungen über dem Ausgangswert liegt, und danach weitestgehend konstant bleibt. In dem gleichen Intervall, in dem die Intensität des Weichmacherfragmentesignals stark ansteigt, fallen die Signalintensitäten der Wasser repräsentierenden Massenintervalle von dem bis dahin weitgehend konstanten Anfangsniveau auf das Rauschniveau – also faktisch Null – ab. Dies zeigt, dass erst in diesem

Temperaturbereich die originale Zusammensetzung des Schlauchmaterials der SIMS-Analyse zugänglich ist und nicht mehr von adsorbiertem Wasser verdeckt wird.

Stellt eine Erhöhung der Proben temperatur für den Schlauchbereich kein Problem dar, da dieser kein probeneigenes Wasser enthält und somit eine Sublimation probeneigenes Wassers, die die Stöchiometrie der ursprünglichen Probenoberfläche ändert, hier nicht stattfinden kann, ist anhand der SIMS-Analyse auf der Wasserphase dieses Probensystems noch zu klären, inwieweit probeneigenes Wasser unter diesen Bedingungen sublimiert.

In Abbildung 17 ist der zeitliche Verlauf der Signalintensitäten von K^+ , KH_2O^+ , H_3O^+ und $H_5O_2^+$ von der selben Messung wie in Abbildung 16, hier aber aufgenommen im Bereich der KCl-Lösung der Probe, dargestellt.

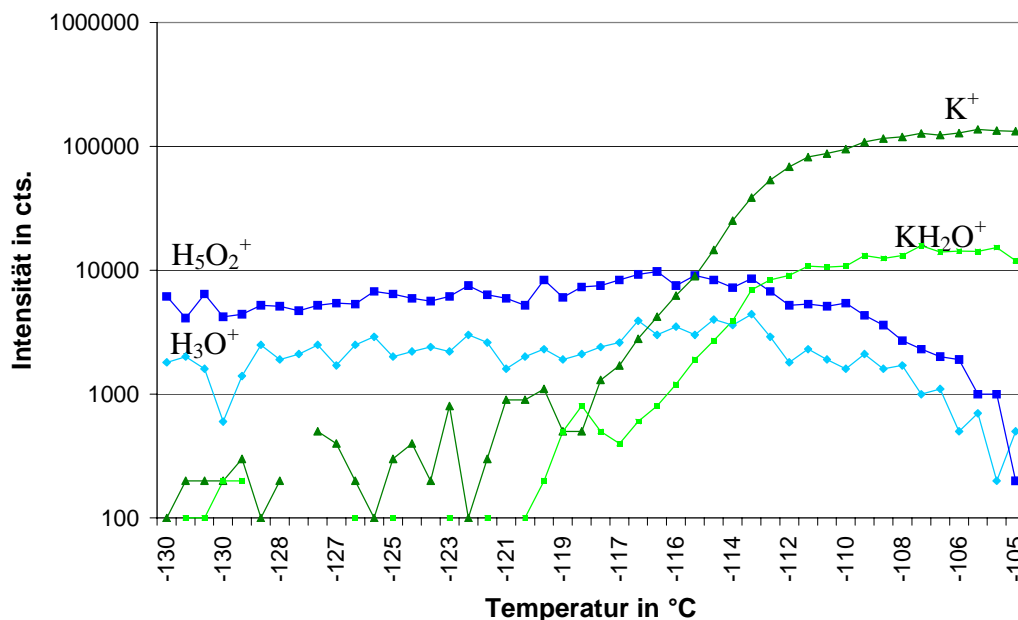


Abbildung 17: Verlauf der Signalintensitäten ausgewählter Sekundärionen während einer Proben-temperaturerhöhung von -130 °C auf -105 °C , ermittelt auf dem wässrigen Teil des Testsystems

Zu Beginn der Messung sind die Wasser repräsentierenden Signale deutlich größer als die Kalium enthaltenden Signale. Kalium und KH_2O^+ sind kaum zu detektieren, obwohl sie deutlich intensiver sein sollten als die Wasser repräsentierenden Signale. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die auf dem Schlauchbereich dieser Probe gemacht wurden. Die Bedeckung der Probenoberfläche mit Wasser aus der Gasphase scheint also über die komplette Probenoberfläche stattgefunden zu haben. Auch hier ist bei den eindeutig aus der originären Probe stammenden Signalintensitäten von K^+ und KH_2O^+ ein starker Anstieg erst im Bereich von -118 °C bis -112 °C zu erkennen. Die Signalintensitäten der Wasser repräsentierenden Massenintervalle zeigen aber im Gegensatz zu der Messung auf dem Bereich des Schlauches zunächst keine deutliche

Abnahme in diesem Temperaturbereich. Erst bei höheren Temperaturen von etwa -110 °C und mehr fallen die Signalintensitäten rasch ab, um schließlich im Rauschniveau zu verschwinden.

Der deutliche Anstieg der Probensignale deutet auch hier auf die Entfernung einer Adsorbatschicht von Wasser hin, welche aber in dem angegebenen Temperaturintervall entfernt werden kann. Dabei zeigt sich, dass es zu keiner signifikanten Absenkung der Intensitäten der Wassersignale kommt, was darauf hindeutet, dass in diesem Temperaturintervall nur schwach gebundenes adsorbiertes Wasser sublimiert, das probeneigene hingegen noch nicht.

Allerdings ist anhand der Signalintensitäten der Wasser repräsentierenden Moleküle in den Spektren nicht klar zu unterscheiden, ob diese noch die Adsorbatschicht der Probenoberfläche widerspiegeln oder bereits die eigentliche Probe.

Um dieses deutlicher unterscheiden zu können, ist auf die gleiche Weise wie zuvor eine Probe präpariert, deren Isotopenverhältnis im Wasseranteil nicht dem natürlichem entsprechend zu 99% aus H_2^{16}O besteht, sondern zu 97% aus H_2^{18}O ¹². Damit ist zumindest der Anteil der Bedeckung der Oberfläche, welche aus der Adsorption aus dem ohnehin vorhandenen Restgas der Vakuumkammer herrührt eindeutig vom probeneigenen Wasser zu unterscheiden. Der Anteil der Bedeckung aus dem Partialdruckanstieg durch den Outburst, hervorgerufen durch das Schneiden der Probe, ist nach wie vor nicht klar von dem probeneigenen Wasser zu unterscheiden, da dieser Anteil in der Gasphase wiederum direkt aus der Probe stammt und damit dasselbe Isotopenverhältnis besitzt.

In Abbildung 18 ist das Ergebnis einer Analyse auf der wässrigen Phase eines solchen Probensystems dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass zu Beginn der Messung die dargestellten Intensitäten des, das probeneigene Wasser repräsentierende $\text{H}_3^{18}\text{O}^+$, in der gleichen Größenordnung liegen, wie die Signalintensität des $\text{H}_3^{16}\text{O}^+$ und des $\text{H}_5^{16}\text{O}_2^+$. Aufgrund des spezifischen Isotopenverhältnisses des probeneigenen Wassers kann dies nur damit erklärt werden, dass es auch zu Adsorption aus dem Restgas der Vakuumkammern kam.

Die Signalintensitäten von $\text{H}_3^{16}\text{O}^+$ und $\text{H}_5^{16}\text{O}_2^+$ nehmen schon bei leichter Erhöhung der Proben temperatur ab. Die Signalintensitäten der beiden die Probenoberfläche repräsentierenden Teilchen K^+ und KH_2O^+ steigen ab dem Moment, ab dem die Proben temperatur steigt. Auffällig ist, dass die Signalintensität des $\text{H}_3^{18}\text{O}^+$ weitgehend konstant bleibt, mit Erhöhen der Temperatur sogar minimal zunimmt und sich somit ähnlich zum Kalium verhält. Erst ab einer Temperatur von über -110 °C fällt das Signal

¹² Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

von $\text{H}_3^{18}\text{O}^+$ deutlich ab. Dies entspricht dem Verhalten wie in der zuvor dargestellten Messung und weist auf eine intensive Sublimierung auch des probeneigenen Wassers hin.

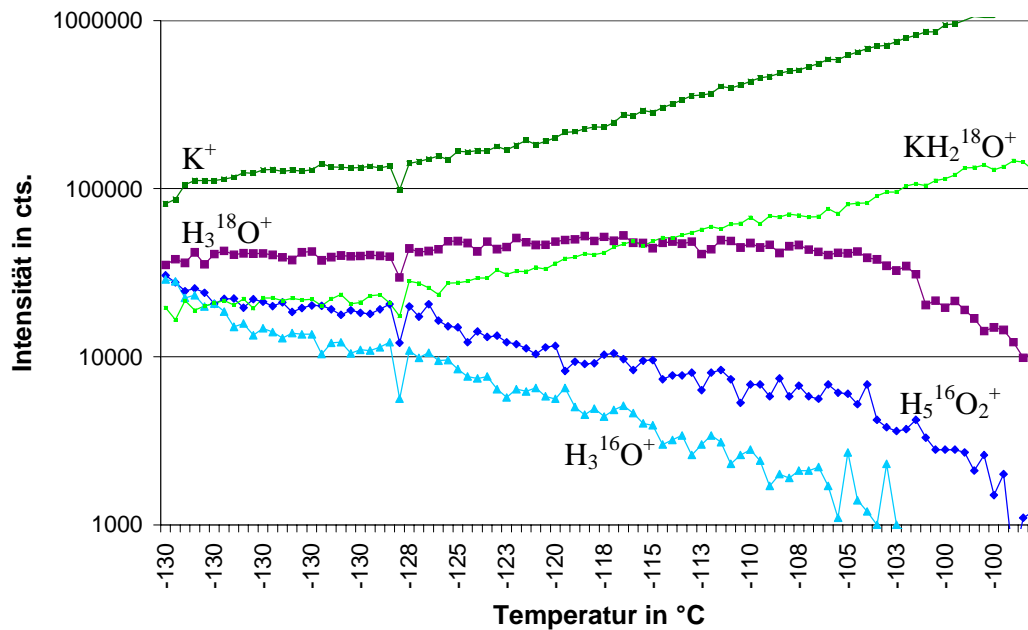


Abbildung 18: Verlauf der Signalintensitäten ausgewählter Sekundärionen während einer Proben-temperaturerhöhung von -130 °C auf -100 °C , ermittelt auf dem wässrigen Bereich des Testsystems mit H_2^{18}O

Ab einer Temperatur von etwa -115 °C bleibt das Intensitätsverhältnis von $\text{H}_3^{16}\text{O}^+$ und $\text{H}_3^{18}\text{O}^+$ konstant und entspricht der Isotopieverteilung des zur Präparation der Probe verwendeten Wassers. Damit liegt nur noch probeneigenes Wasser auf der Probenoberfläche vor. Das aus dem Restgas adsorbierte H_2^{16}O ist vollständig entfernt worden.

Mit diesen beiden Experimenten konnte somit gezeigt werden, dass es zwar durch oder nach der Schnittpräparation zu einer Bedeckung der frisch erzeugten Oberfläche durch Wasser kommen kann, dieses Wasser aber durch moderates Aufwärmen der Probe auf ein Temperaturintervall von -115 °C bis -110 °C wieder entfernt werden kann, ohne intensive Sublimation von probeneigenem Wasser zu initiieren. Sowohl das Wasser auf dem Schlauchmaterial in dem ersten Beispiel als auch das überschüssige H_2^{16}O in dem zweiten Beispiel waren bei diesen Temperaturen vollständig entfernt. Die Signalintensitäten von dem probeneigenen Wasser fielen erst bei Temperaturen von über -110 °C signifikant ab.

Wie am Anfang dieses Kapitels erwähnt, variiert das Ausmaß der Bedeckung stark. Eine derartige Bedeckung der Probe durch adsorbiertes Wasser wie in den Beispielen dargestellt wird nicht immer festgestellt und generell ist es schwierig über das Ausmaß

der Bedeckung Vorhersagen zu machen. Allerdings gilt, auch wenn keine erhebliche Bedeckung vorlag, dass eine erhebliche Sublimation von probeneigenem Wasser bei -115 °C bis -110 °C noch nicht eintritt. Zu beachten ist an dieser Stelle allerdings, dass diese Temperaturen dem Ziel widersprechen können, die Probe möglichst amorph einzufrieren und auch eingefroren zu lassen.

Da, wie gezeigt, der größere Anteil der Adsorbatschicht aus dem „Outburst“ stammt, kann prinzipiell die Probenoberfläche nach Entfernen dieser Schicht wieder abgesenkt werden, um weitere Veränderungen der Probe auch im Inneren zu reduzieren. Dabei ist aber zu beachten, dass die beobachtete Adsorption aus dem Restgas der Apparatur auf die Oberfläche bei langen Analysezeiten, wie zum Beispiel der Aufnahme einer Lateralverteilungsanalyse, das Analyseergebnis beeinflussen könnte.

Daher musste die Wiederbedeckung der Probenoberfläche bei wieder abgesenkter Probenoberfläche eingehender untersucht werden. Hierfür wurde eine SIMS-Analyse auf der Wasserphase des mit H_2^{18}O präparierten Testsystems durchgeführt. Die Probenoberfläche wurde in einem Zeitintervall von fünf Stunden während der Messung kontinuierlich von -105 °C bis -125 °C verringert. Die Starttemperatur von -105 °C wurde so hoch gewählt, dass mit den zuvor beschriebenen Kenntnissen sicher gestellt ist, dass eine adsorbatfreie Oberfläche von 97-prozentigem H_2^{18}O vorliegt.

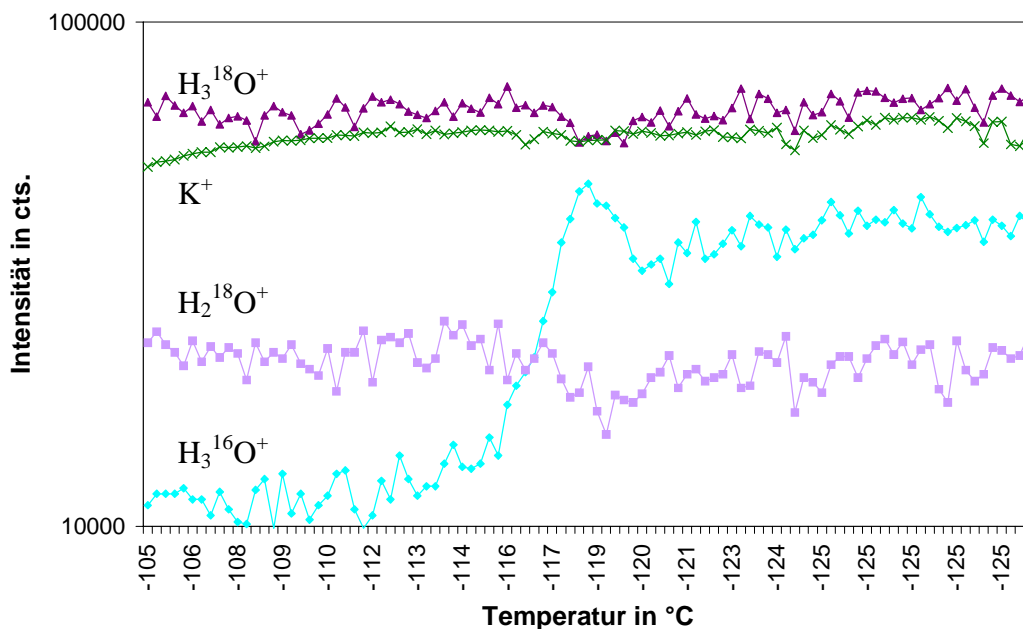


Abbildung 19: Verlauf der Signalintensitäten ausgewählter Sekundärionen während einer Absenkung der Probenoberfläche von -105 °C auf -125 °C , ermittelt auf dem wässrigen Bereich des Testsystems mit H_2^{18}O (die Intensität des Kaliums ist um den Faktor 1000 herunterskaliert)

In Abbildung 19 ist beispielhaft der an der Wasserphase des Testsystems ermittelte zeitliche Signalverlauf von $\text{H}_3^{16}\text{O}^+$, $\text{H}_2^{18}\text{O}^+$, $\text{H}_3^{18}\text{O}^+$ sowie von K^+ dargestellt. Dabei ist die Intensität des K^+ um den Faktor 1000 herunterskaliert.

In dem Diagramm ist zu erkennen, dass die Intensitäten der Wasser repräsentierenden Signale und die Intensitätsverhältnisse bis zu einer Temperatur von zirka -115 °C konstant bleiben. Ab einem Temperaturintervall von -115 °C bis -120 °C steigt die Intensität des H_3O^+ stark an während die Intensitäten der anderen beiden dargestellten Signale minimal abnehmen.

Dies heißt, dass es ab diesem Temperaturbereich erneut zu einer Bedeckung der Oberfläche durch Wasser aus dem Restgas kommen kann. Kühlt man die Probe wieder unter den Temperaturbereich, in dem die Adsorbate von der Oberfläche sublimierten, kann Wasser aus dem Restgas zurückkondensieren.

Beim Verlauf der Intensität des K^+ -Signals ist zu erkennen, dass es am Anfang noch leicht zunimmt, was auf eine nach wie vor stattfindende Gefriertrocknung und der sich daraus ergebene Aufkonzentration des Kaliums zurückzuführen ist. Ab einer Temperatur von etwa -110 °C bleibt die Intensität aber konstant, eine Gefriertrocknung scheint nicht mehr stattzufinden. Auch das durch die weitere Abkühlung aufgebrachte Wasser senkt die Intensität des Kaliumsignals nicht merklich. Das Maß der Bedeckung ist also deutlich geringer als die Bedeckung, die durch den „Outburst“ hervorgerufen wird. In dem dargestellten Beispiel nehmen die Intensitäten der ^{18}O enthaltenen Signale nur minimal und die des Kaliumsignals gar nicht ab. Es kommt also nicht zu einer flächendeckenden Adsorbatschicht, die eine sinnvolle Interpretation einer SIMS-Analyse erschwert. Auch an dieser Stelle ist das gezeigte Verhalten nur anhand eines Beispiels dargestellt, insbesondere abhängig von dem herrschenden Wasserpartialdruck in der Analyse kammer kann die Adsorption auch geringer aber auch deutlich stärker ausfallen.

Unabhängig von der lokalen Restgaszusammensetzung über der Probenoberfläche stellt somit eine Proben temperatur, die auch während der Analyse in dem Intervall von -115 °C bis -110 °C gehalten wird, einen guten Kompromiss zwischen Entfernen etwaiger Adsorbatschichten, Vermeidung weiterer Adsorption und der Vermeidung von intensiver Gefriertrocknung dar. Es muss aber einschränkend noch einmal darauf hingewiesen werden, dass dies bei Proben, bei denen es gelungen ist sie komplett amorph einzufrieren, zu ungewünschter Kristallisation führen kann.

4.2 Übertragung der Prozedur auf biologische Proben

Es konnte auf die dargestellte Weise eine Prozedur gefunden werden, die gewährleistet, dass die analysierte Probenoberfläche weitgehend frei von ungewollten Adsorbatschichten ist und während der Analyse auch bleibt, ohne die Probe intensiv zu gefriertrocknen. Die Übertragbarkeit auf biologische Probensysteme dieser an einem künstlichen System entwickelten Prozedur muss noch überprüft werden. Ein kritisches Beispiel hierfür ist eine Zellkultur in Suspension, da bei diesem Probensystem nicht nur das Wasser aus den Zellen sondern auch das die Zellen umgebende Wasser zu dem Outburst beitragen kann. Darüber hinaus ist an diesem System vorteilhaft, dass hier ein optimales Fixierungsergebnis unterstellt werden kann, da ein Probensystem gewählt wurde, bei dem es möglich ist, dies bis zu der Kryofixierung in einem Puffermedium und damit vital zu belassen. Auch die kompakten Ausmaße begünstigen einen optimalen Gefrierprozess, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die chemische und strukturelle Integrität der Zellen gewahrt blieb.

Basismolekül	Nachweisbares Fragmentsignal	Nominalmasse in u
Cholinkopfgruppe	$C_3H_8N^+$	58
	$C_5H_{15}PNO_4^+$	184
Glycin	CH_4N^+	30
Arginin	$CH_3N_2^+$	43
Alanin	$C_2H_6N^+$	44
Serin	$C_2H_6NO^+$	60
Prolin	$C_4H_6N^+$	68
Asparagin	$C_3H_4NO^+$	70
Prolin	$C_4H_8N^+$	70
Serin	$C_3H_3O_2^+$	71
Valin	$C_4H_{10}N^+$	72
Threonin	$C_3H_8NO^+$	74
Histidin	$C_4H_6N_2^+$	82
Glutamin	$C_4H_6NO^+$	84
Lysin	$C_5H_{10}N^+$	84
Leucin	$C_5H_{12}N^+$	86
Phenylalanin	$C_8H_{10}N^+$	120
Tryptophan	$C_9H_8N^+$	130
Tyrosin	$C_8H_{10}NO^+$	136

Tabelle 3: Übersicht über typische Molekülfragmente aus biologischen Proben

Als Bestätigung für die Übertragbarkeit müssen in dem Analyseergebnis des Experiments sich die einzelnen Zellen klar vom umgebenen Puffermedium unterscheiden und die Ergebnisse, die bereits durch SIMS-Analysen an Zellkulturen gewonnen wurden, die auf andere Art präpariert wurden, sollten sich bestätigen. Somit sollte im Inneren der Zellen für das Konzentrationsverhältnis von Kalium zu Natrium ein Wert von etwa 10 nachzuweisen sein, was dem physiologischen Verhältnis entspricht [68]. Des Weiteren sollten eine Reihe von charakteristischen Fragmenten von Molekülen zu detektieren sein [64], von denen einige in Tabelle 3 aufgezählt sind.

Die Signale $C_3H_8N^+$ und $C_5H_{15}PNO_4^+$, die unter anderem als charakteristische Fragmente des Phosphocholin gelten [69] und unter anderem aus Lipiden der Zelle stammen, können Hinweise auf äußere und innere Strukturen der Zellen geben. Die weiteren Signale sind unter anderen charakteristisch für Aminosäuren [70,71,72] und können aus zelleigenen Proteinen stammen.

Für das Experiment wurde eine Zellkultur von menschlichen Leberkrebszellen (HEPG2) gewählt, da diese in Zusammensetzung und Größe (\varnothing zirka 10 μm bis 20 μm) gut bekannt sind. Darüber hinaus sind sie relativ leicht erhältlich und leicht zu kultivieren. Die Zellen wurden zunächst auf einem Substrat kultiviert, anschließend von diesem abgelöst, in Pufferlösung gebracht und schließlich durch zentrifugieren aufkonzentriert. Diese in dem Puffermedium aufkonzentrierten Zellen wurden auf tellerartige Goldplättchen aufpipettiert und dann in flüssigem Propan schockgefroren. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass die Zellen bis unmittelbar vor der Fixierung in einer Umgebung sind, die es ermöglicht, dass die Zellen bis zu dem Zeitpunkt der Kryofixierung vital bleiben.

Die Probe wurde nach der Lagerung in einem Bad aus flüssigem Stickstoff auf den für die Probenteller angepassten Probenhalter (vgl. Abbildung 9A, Seite 44) fixiert, in die Schnittkammer transferiert und dort geschnitten. Welche und wie viele Zellen durch den Schnittprozess geöffnet werden, ist bei dieser Art der Präparation rein zufällig. Durch ausreichende Aufkonzentration ist allerdings sichergestellt, dass sich in jeder Schnittebene genügend Zellen befinden, die durch den Schnittprozess geöffnet werden können.

Anschließend wurde die Temperatur der Probe, gemäß den an dem Testsystem gewonnenen Kenntnissen auf $-110\text{ }^\circ\text{C}$ erhöht und während des ganzen Zeitraums der Analyse auf dieser Temperatur gehalten.

Die SIMS-Analyse wurde mit Ga^+ -Primärionen auf einer Fläche von $80 \times 80\ \mu\text{m}^2$ durchgeführt. In Abbildung 20 sind die ermittelten Lateralverteilungsbilder von H_3O^+ , Na^+ , K^+ , KH_2O^+ , $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}^+$ sowie $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{PNO}_4^+$ dargestellt.

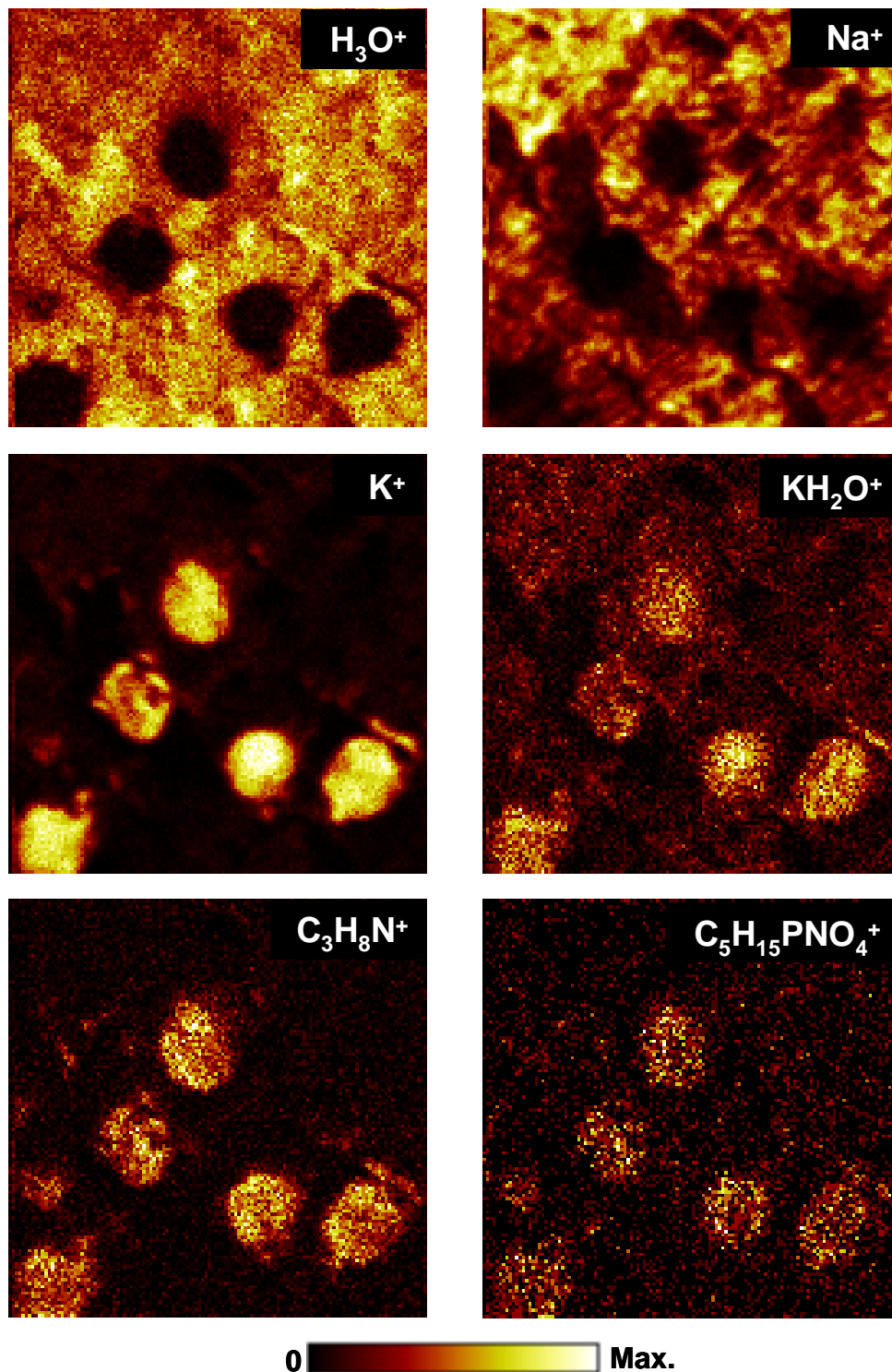


Abbildung 20: Sekundärionenverteilungsbilder ausgewählter Elemente und Moleküle, ermittelt auf einer kryofixierten und kryogeschnittenen Zellkultur in Suspension; die analysierte Fläche beträgt $80 \times 80 \mu\text{m}^2$ und die Proben temperatur während der Analyse $-110 \text{ }^\circ\text{C}$.

In allen Bildern sind großflächig nahezu homogene Strukturen zu erkennen, welche durch rundliche Bereiche mit inverser Signalintensität und einem Durchmesser von etwa $10 \mu\text{m}$ bis $20 \mu\text{m}$, was genau dem Durchmesser der Zellen entspricht, unter-

brochen wird. Die Verteilungsbilder des H_3O^+ und des Na^+ zeigen im Wesentlichen deutliche Intensitäten in den großflächigen, homogenen Bereichen und repräsentieren das Puffermedium. Die Verteilungsbilder von K^+ und des KH_2O^+ sowie die Verteilungsbilder der beiden Moleküle $\text{C}_5\text{H}_8\text{N}^+$ und $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{PNO}_4^+$ zeigen deutliche Intensitäten in den anderen Bereichen und repräsentieren den Bereich der Zellen.

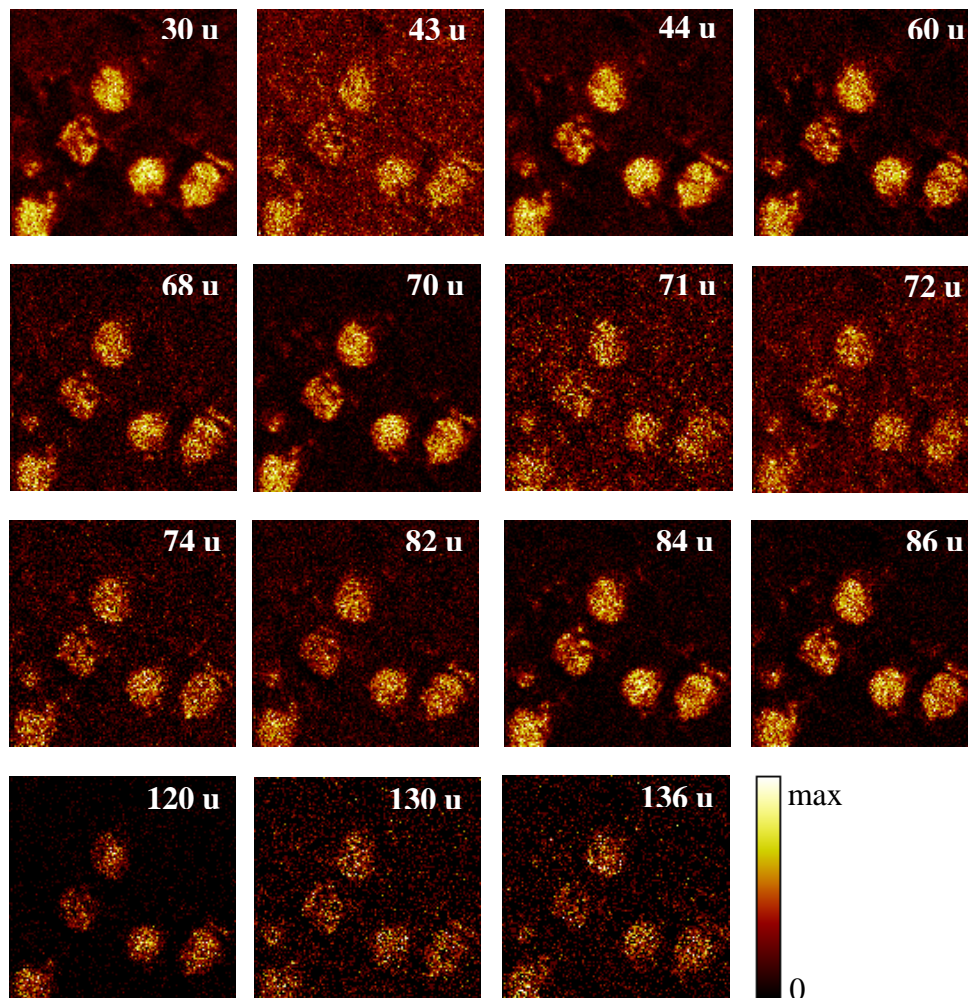


Abbildung 21: Sekundärionenverteilungsbilder ausgewählter organischer Molekülfragmente zugeordneter Massenintervalle; die analysierte Fläche beträgt $80 \times 80 \mu\text{m}^2$.

Die erwarteten Ergebnisse wurden also bestätigt, was zeigt, dass die Oberfläche nicht durch Adsorbatschichten verdeckt ist. Trotzdem enthält die Probe noch deutliche Anteile von Wasser, was an den Verteilungsbildern vom H_3O^+ und KH_2O^+ deutlich wird. Eine intensive Gefriertrocknung setzte also noch nicht ein und die an dem Testsystem entwickelte Prozedur zur Temperaturbehandlung führt auch hier zu dem angestrebten Ziel.

Da keine deutliche Adsorbatschicht die Probenoberfläche bedeckt, sollte das intrazelluläre Verhältnis von Kalium zu Natrium bestimmbar sein. Das ermittelte

Verhältnis der Signalintensitäten dieser beiden Ionen, welches innerhalb der Bereiche der Zellen bestimmt wurde, beträgt etwa acht. Korrigiert mit den relativen Empfindlichkeitsfaktoren [64] ergibt das ein Konzentrationsverhältnis von über neun, was sehr gut mit den Werten übereinstimmt, die aus physiologischer Sicht für Zellen, die im lebenden Zustand fixiert wurden, zu erwarten ist [64].

In Abbildung 21 sind die Verteilungsbilder der in Tabelle 3 aufgelisteten Molekülfragmente dargestellt. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Analysen mit hoch fokussiertem Primärionenstrahl und damit herabgesetzter Massenauflösung durchgeführt wurden, es also zu Masseninterferenzen auf den einzelnen Nominalmassen kommen kann, was zu einer relativ schlechten Dynamik führen kann, wie dies zum Beispiel in den Bildern der Masse 43 u oder 71 u zu erkennen ist.

Es konnten somit sowohl Konzentrationsverhältnisse bestimmt werden, als auch charakteristische Moleküle beziehungsweise Molekülfragmente in den Zellen nachgewiesen werden. Dadurch wird deutlich, dass das eingesetzte Präparations- und Analyseprotokoll und die nach der Schnittpräparation durchgeführte Temperaturerhöhung prinzipiell die Analyse von biologischen Proben im Vakuum ermöglicht und die Standardarbeitsanweisung auch bei biologischen Probensystemen anwendbar ist.

5 Einsatzmöglichkeiten der Kryoanalyseapparatur

In den folgenden Unterkapiteln soll nun anhand von drei Beispielen aufgezeigt werden, in welcher Weise eine SIMS-Analyse an kryofixierten, nicht gefriergetrockneten biologischen Proben eingesetzt werden kann. Dabei war es das Ziel dieser Arbeit für die jeweiligen Probensysteme und die in den Unterkapiteln angedeuteten Fragestellungen ein Präparations- und Analyseverfahren zur Verfügung zu stellen und zu etablieren. Abschließende Ergebnisse von Reihenanalysen der zum Teil erst beginnenden Forschungsprojekte können im Rahmen dieser Arbeit noch nicht präsentiert werden.

5.1 Analysen an Biofilmen

Als erstes Beispiel sollen hier erste Experimente zur Analyse von Hefepilzkulturen des Typs *Candida Albicans* vorgestellt werden.

Candida Albicans ist ein Pilz der Candidagruppe, die zu den Hefepilzen gehört. Bei etwa 75% aller Menschen kann er meistens in, beziehungsweise auf Schleimhäuten nachgewiesen werden. Der Pilz ist zwar Erreger einiger Erkrankungen beim Menschen, allerdings erkranken die allermeisten Menschen nicht. Anders kann es sich bei Menschen mit Implantaten, zum Beispiel künstlichen Gelenken aber auch implantiertem Zahnersatz, oder bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem darstellen. Hier stellt die Pilzerkrankung ein immer weiter wachsendes Problem dar.

Candida albicans ist ein polymorpher Pilz, das heißt er bildet unterschiedliche Wachstumsformen aus. Die einzelnen Pilzzellen sind rundlich oval und haben einen Durchmesser von 4–10 µm. Allerdings wächst die Pilzkultur üblicherweise als Biofilm und in diesem Film können sich auch andere Pilzformen bilden. Eine Mikroskopaufnahme eines solchen Biofilms ist Abbildung 22 dargestellt. Im rechten Teil der Abbildung 22 erkennt man die dicht gepackten rundlichen Hefezellen. In der Mitte und im linken Teil der Abbildung sind aber auch weitere Wachstumsformen des Hefepilzes, wie zum Beispiel die Pseudohyphen zu erkennen. Die Neigung zur Bildung eines Biofilms und die unterschiedliche Ausbildung von Zelltypen in einem solchen macht die Behandlung eines Befalls einer Oberfläche mit diesem Erreger schwierig, da die Stofftransportprozesse innerhalb des Biofilms im Vergleich zu einzelnen Zellen stark

unterschiedlich sein können. Zudem können die Stoffwechselprozesse der jeweiligen Zellausbildungstypen variieren. Die Untersuchung der Wechselwirkung von geeigneten Medikamenten zur Befreiung von dem Befall muss diese Eigenschaften berücksichtigen.

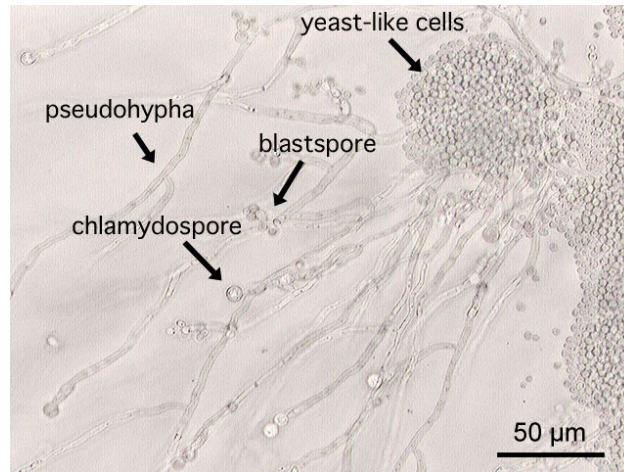


Abbildung 22: Mikroskopbild einer Kultur von *Candida Albicans* [73]

Ältere Untersuchungen an Zellkulturen, die nicht als Biofilm kultiviert wurden, führten zu falschen Behandlungsprotokollen. Diese führten zwar in der Anwendung zur Abtötung der oberen Schichten des Biofilms, ein komplettes Abtöten gelang aber nicht, so dass nach Absetzen des Antiseptikums die Krankheit wieder ausbrechen konnte und sich sogar Resistenzen ausbildeten.

Für eine den realen Bedingungen besser entsprechende Untersuchung mussten neue Methoden entwickelt werden. Ziel war es, die Kultur als Biofilm zu züchten, gleichzeitig aber für die massenspektrometrische Analyse Querschnitte zur Verfügung zu stellen, in denen es möglich ist, sowohl die zelluläre Struktur darzustellen sowie die Konzentration des Antiseptikums in Abhängigkeit von der Tiefe im Biofilm zu bestimmen. Dabei können nur Querschnitte diese Information liefern, da der Biofilm keine definierte Oberfläche hat und an unterschiedlichen Stellen auf dem Substrat unterschiedlich hoch und unterschiedlich dicht wächst. Des Weiteren sollten Informationen zur Verfügung stehen, die Aufschluss über den Zustand der Zellen und deren Stoffwechselaktivität mit sich bringen.

Mit diesen Forderungen sind Präparationsmethoden, die die Probe statistisch brechen und somit keine verlässliche Tiefeninformation über die analysierte Stelle im Biofilm liefern ausgeschlossen. Eine Gefriertrocknung kann ebenfalls nicht durchgeführt werden, da diese zum einen das Antiseptikum auf den verbleibenden Oberflächen aufkonzentrieren würde und zum anderen die durch das Wasser gestützte Pilzkultur zerstören könnte.

Diese Probleme umgehen und die geforderten Bedingungen erfüllen kann man hingegen mit einer SIMS-Analyse an einer gefrorenen, nicht-dehydrierten, kryofixierten und mittels Kryoschnitt präparierten Probe. Genau für diesen Präparations- und Analyseansatz wurde die im Rahmen dieser Arbeit präsentierte Apparatur konstruiert und aufgebaut.

Als Antiseptikum, welches die Pilzkultur abtöten kann und auch in der klinischen Praxis verwendet wird, wurde Chlorhexidin (CH) gewählt. Die Wirkung dieses Stoffes beruht insbesondere auf der Zerstörung von Zellmembranen. In Abbildung 23 ist die Struktur und Summenformel des Chlorhexidins angegeben.

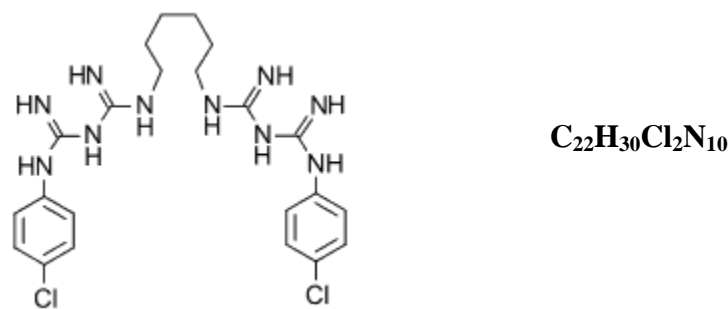


Abbildung 23: Struktur- und Summenformel des Chlorhexidins [74]

Zur Voruntersuchung, bei der die für das Chlorhexidin charakteristischen SIMS-Signale ermittelt werden sollten, wurde ein Tropfen von zirka 2 µl einprozentiger Chlorhexidinlösung auf einen Probenteller pipettiert. Alle weiteren Präparationsschritte wurden danach genauso durchgeführt, wie später bei den Zellkulturen. Die Proben wurden also in flüssigem Propan eingefroren, in Stickstoff gelagert und schließlich in der Schnittkammer geschnitten. Danach wurde die Probentemperatur nach der Standardarbeitsanweisung auf -110 °C erhöht und die Probe analysiert. In Abbildung 24 ist beispielhaft ein Spektrum positiver Sekundärionen im Massenbereich 50 u bis 510 u dargestellt. Dabei sind die Intensitäten ab Masse 190 u mit dem Faktor zwei, ab Masse 300 u mit dem Faktor 20 und ab Masse 400 u mit dem Faktor 50 multipliziert.

Das komplette Molekül plus eines Wasserstoffatoms ist im Bereich der Nominalmasse von 505 u mit der typischen insbesondere aus der Isotopie der beiden Chlor-Atome stammenden Isotopieverteilung nachweisbar. Darüber hinaus sind weitere charakteristische Fragmente zu erkennen. Besonders soll an dieser Stelle auf die Fragmente im Bereich der Masse 195 u hingewiesen werden, da ihre Signalintensitäten zum einen relativ intensiv sind und zum anderen in organischen Materialien nur geringe Masseninterferenzen mit anderen Probenbestandteilen bestehen. Ein weiteres deutlich erkennbares Fragment liegt auf der Nominalmasse von 85 u.

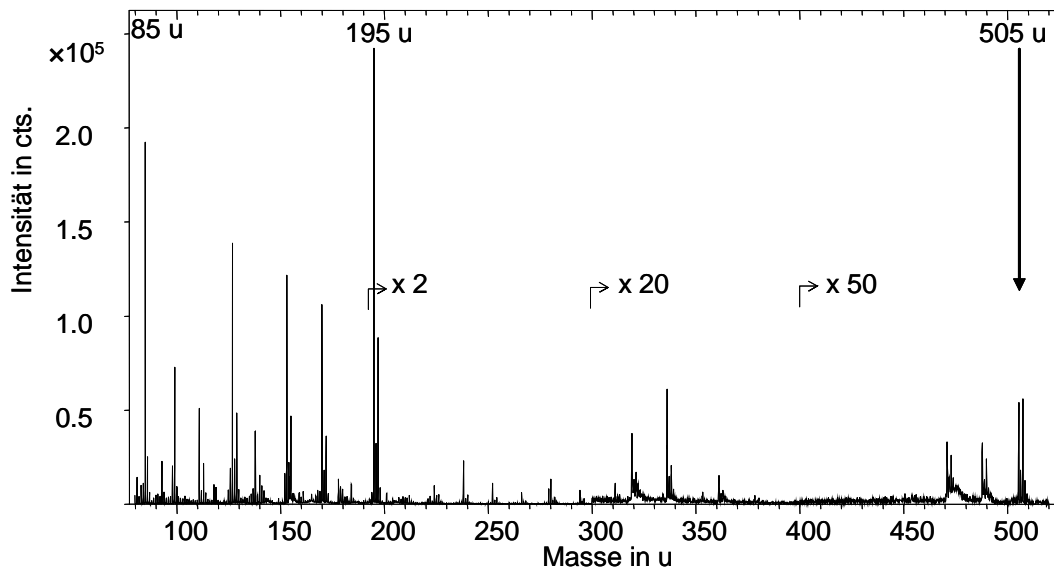


Abbildung 24: Auszug aus dem Spektrum positiver Sekundärionen, ermittelt auf einer Chlorhexidinprobe

Für die Kultivierung der Zellen im Biofilm wurde ein „Tubular Biofilm Flowcell“-System [75] verwendet, bei dem die Kultur auf der Innenseite eines Schlauches wuchs und ständig von Nährmedium umspült wurde, welches mittels einer Pumpe durch den Schlauch und ein im Vergleich zum Schlauchvolumen großes Reservoir gepumpt wurde. Dies hat den Vorteil, dass ständig frisches Nährmedium über die Kultur floss und somit das Laborexperiment näher an die Realität im Körper angepasst ist, als im Vergleich zu ruhenden Systemen, zum Beispiel einer Präparation in Petrischalen. Darüber hinaus kann aufgrund des großen Reservoirs davon ausgegangen werden, dass die Konzentration des Nährmediums konstant blieb. Damit keine Teile der Kultur in das Nährmediumreservoir strömen konnten, war in das System noch eine Strömungsbremse (Filter) eingebaut.

Die Schlauchstücke, in deren inneren Oberflächen die Zellen kultiviert wurden, wurden nach der Kultivierung in zirka 5 mm lange Stücke geschnitten, diese dann für eine definierte Zeit in Chlorhexidin getaucht und direkt danach in, mit flüssigem Stickstoff gekühltem, flüssigem Propan durch schnelles Eintauchen eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Dimensionen der Proben waren so gewählt, dass sie sich in einem speziell auf diese Proben hin entwickelten Probenhalter, der eine modifizierte Version des in Abbildung 9D auf Seite 44 dargestellten ist, fest einklemmen ließen, so dass die mechanische Stabilität, insbesondere während des Schnittprozesses, gewährleistet war. Darüber hinaus war sichergestellt, dass maximaler Wärmekontakt zwischen Probenhalter und Probe bestand. Somit konnten die Proben in der Schnittkammer geschnitten und schließlich analysiert werden. Für die Präparation einer zur massenspektrometrischen Analyse geeigneten Oberfläche sind die resultierenden Schnittebenen nicht wirklich

relevant, da sich auf dem ganzen Bereich des Substrates, also in diesem Fall des Schlauches, Zellmaterial befinden sollte. Die Schnittprozedur kann so häufig wiederholt werden bis eine zufrieden stellende, möglichst auf der kompletten Fläche glatte Probenoberfläche erreicht ist.

Die Abbildung 25 zeigt Bilder, die in der Analyseposition mit den Probenbeobachtungskameras von einer solchen Probe aufgenommen wurden.



Abbildung 25: Probenbeobachtungsbild (links) und Probenmikroskopbild (rechts) des im Schlauch kultivierten Biofilms

Im linken Bild ist das mit dem Makroobjektiv aufgenommene Probenübersichtsbild dargestellt und im rechten das Bild der Mikroskopkamera. Es sind in beiden Bildern jeweils deutlich die Bereiche des Schlauches und die Bereiche des Wassers mit der Chlorhexidinlösung zu erkennen. Der auf der Innenseite des Schlauches kultivierte Biofilm zeigt allerdings in den optischen Bildern keinen Kontrast und ist somit nicht zu erkennen.

An einer solchen Probe wurde mit Ga^+ -Primärionen auf einer Fläche von $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ eine SIMS-Analyse der elementaren beziehungsweise molekularen Lateralverteilung durchgeführt.

In Abbildung 26 ist das Ergebnis dieser Analyse an einem Biofilm, der für 30 s in einer einprozentigen Chlorhexidinlösung behandelt wurde dargestellt.

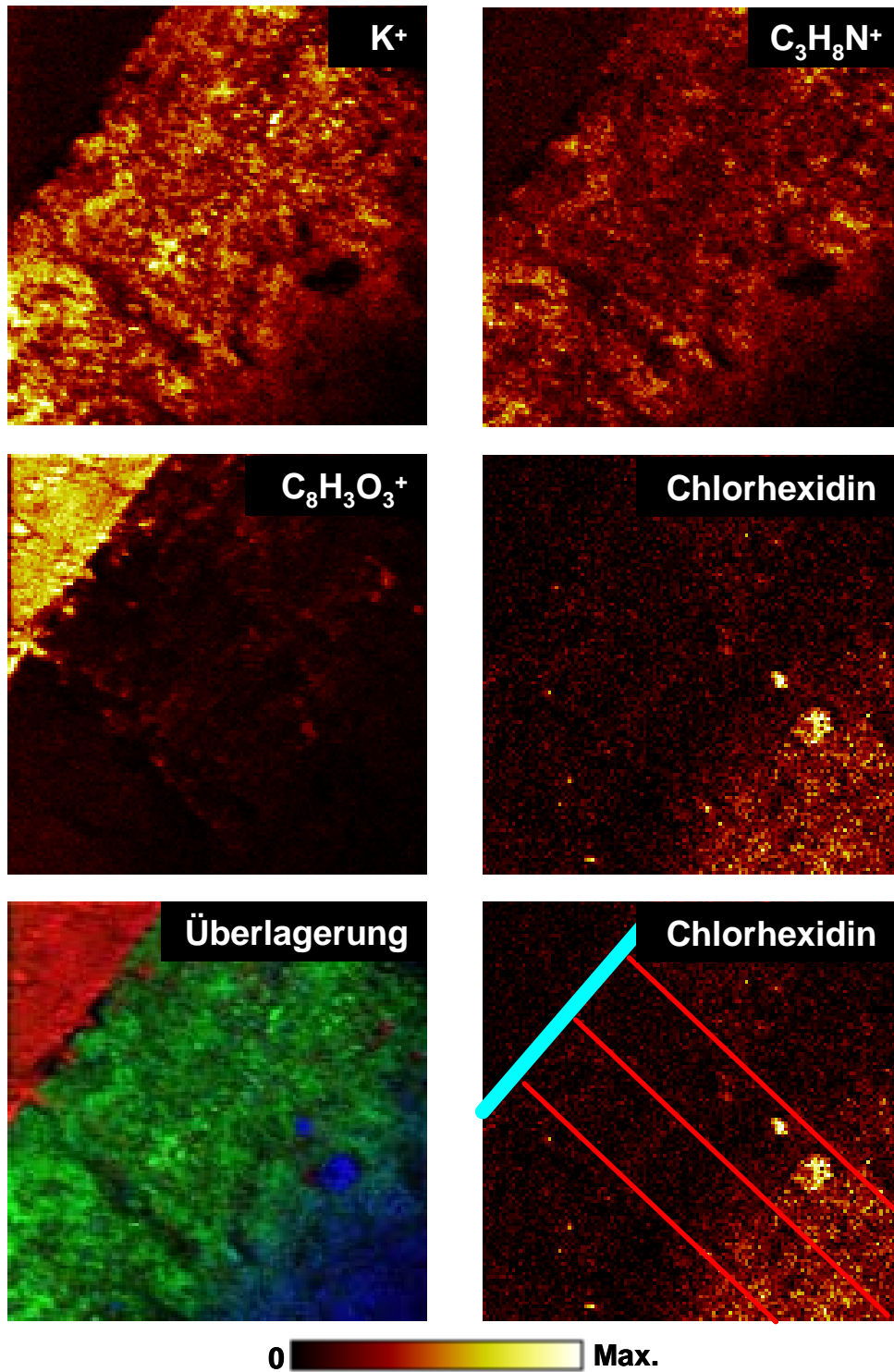


Abbildung 26: Bilder einer Lateralverteilungsanalyse ausgewählter positiver Sekundärionen, ermittelt an einem Biofilm, der in einem Schlauch kultiviert wurde. In den Bildern ist jeweils links oben der Bereich des Schlauchmaterials, rechts unterhalb davon der Biofilm und rechts unten das Lumen des Schlauches zu erkennen. Im zweiten Bild des Chlorhexidins sind die Linien, anhand derer ein Intensitätsprofil ermittelt wurde, in Rot, die Schlauchoberfläche in Blau angedeutet; die analysierte Fläche beträgt $400 \times 400 \mu m^2$.

Dargestellt sind die Verteilungsbilder des K^+ und $C_3H_8N^+$, welche in Anlehnung an die Bilder der Zellkultur in Suspension insbesondere charakteristisch für Zellen sind und

somit den Bereich des Biofilms repräsentieren. Das Verteilungsbild des $C_8H_3O_3^+$ auf der Masse 149 u, welches ein charakteristisches Fragment aus dem Weichmacher des Schlauchmaterials darstellt, repräsentiert somit den Schlauchbereich. Darüber hinaus ist das Verteilungsbild des Chlorhexidins dargestellt, das aus der Addition der Bilder aus den Massenintervallen 195 u, 505 u und 507 u erstellt wurde. Ergänzend ist ein Überlagerungsbild dargestellt, welches aus den Bildern vom $C_8H_3O_3^+$ (rot), vom K^+ (grün) und dem Bild des Chlorhexidins (blau) generiert wurde. Zur Veranschaulichung ist noch einmal das Bild des Chlorhexidins abgebildet, in dem hier die Linien angedeutet sind an denen später die Profilanalyse durchgeführt wurde.

In der linken oberen Ecke ist in dem Bild des $C_8H_3O_3^+$ der Schlauch zu erkennen. Auf diesem ist der in relativ dichter Konsistenz gewachsene Biofilm in den Bildern vom K^+ und $C_3H_8N^+$ deutlich zu erkennen. Invers zu der Abnahme der Intensitäten des K^+ und des $C_3H_8N^+$ hin zur Schlauchmitte nimmt in der Abbildung 26 die Intensität der Chlorhexidin repräsentierenden Signale zu. Besonders anschaulich ist dies im Überlagerungsbild zu erkennen. Anhand dieser Bilder wird deutlich, dass das Chlorhexidin innerhalb der Expositionszeit nicht in hoher Konzentration in den Biofilm eindringen konnte. Ein Intensitätsanstieg von der Oberfläche der Innenseite des Schlauches hin zur Mitte des Lumens des Schlauches (also im Bild von links oben nach rechts unten) ist zu erkennen.

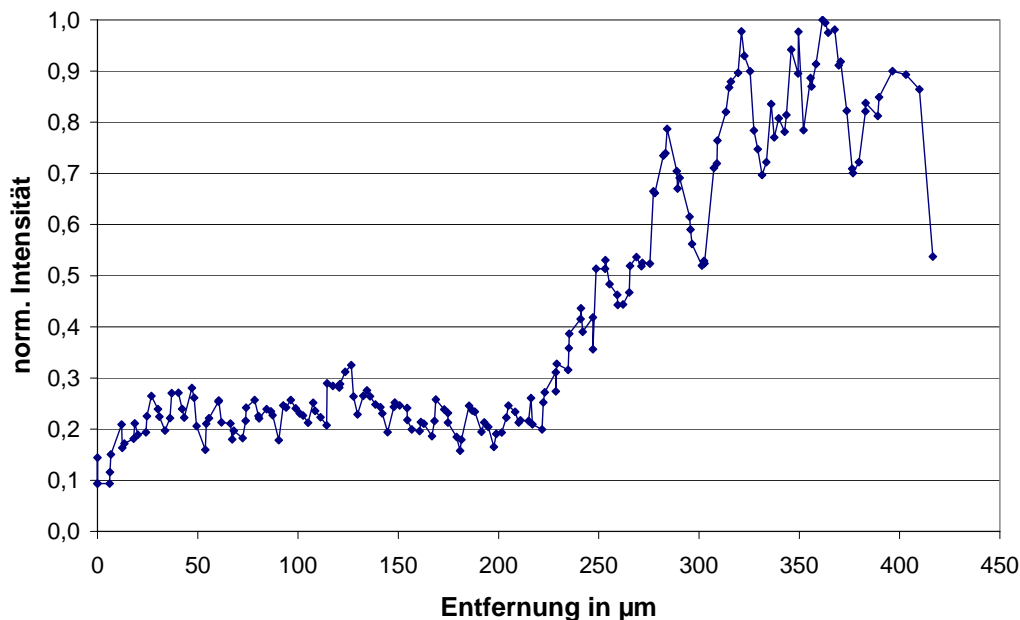


Abbildung 27: Intensitätsverlauf der Chlorhexidinsignale in Abhängigkeit von der Entfernung zur Oberfläche der Schlauchinnenseite

Verdeutlicht wird dies in Abbildung 27, wo der Intensitätsverlauf der Signale des Chlorhexidins in Abhängigkeit von der Entfernung zur Oberfläche der Schlauchinnenseite dargestellt ist. Hierfür wurde über drei verschiedene jeweils auf der Schlauchinnenseite beginnende Intensitätsprofile gemittelt. Die Linien, auf denen das

Intensitätsprofil ermittelt wurde, sind in Abbildung 26 im zweiten Verteilungsbild des Chlorhexidins in rot, die Schlauchoberfläche in hellblau eingezeichnet.

Anhand eines solchen Ergebnisses lässt sich das Eindringverhalten des Chlorhexidins in den Biofilm untersuchen. Daher sind weitere Analysen geplant, um Rückschlüsse über das Konvektions- und Diffusionsverhalten des Chlorhexidins im Biofilm und die Stoffwechselprozesse hierin zu erhalten.

Neben der Information über die Verteilung des Chlorhexidins im Biofilm ist auch die Kenntnis über den Zustand einzelner Zellen hierin von hoher Bedeutung. Um die chemischen Zusammensetzung einzelner Zellen in dem Biofilm zu ermitteln, müssen allerdings SIMS-Analysen mit höherer lateraler Auflösung bei Verkleinerung der analysierten Fläche durchgeführt werden, weil aufgrund der Lateralauflösung in Abbildung 26 einzelne Zellen nicht deutlich auszumachen sind und nur der Biofilm als ganzer zu sehen ist.

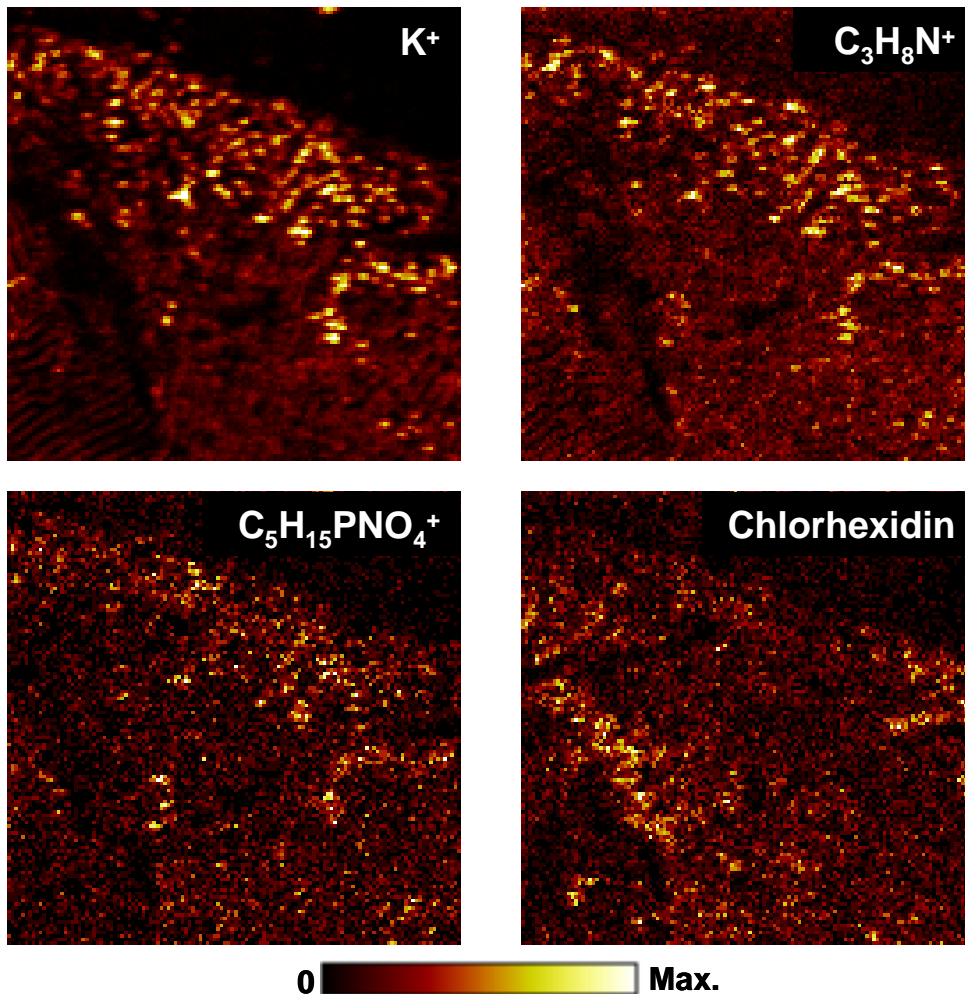


Abbildung 28: Bilder einer Lateralverteilungsanalyse ausgewählter positiver Sekundärionen, ermittelt an einem Biofilm, der in einem Schlauch kultiviert wurde. In den Bildern ist jeweils rechts oben der Bereich des Schlauchmaterials, links unterhalb davon der Biofilm und links unten das Lumen des Schlauches zu erkennen; die analysierte Fläche beträgt $190 \times 190 \mu m^2$.

Als Beispiel hierfür sind in Abbildung 28 die Lateralverteilungsbilder einer mit Ga^+ -Primärionen durchgeführten SIMS-Analyse an einer anderen aber auf gleiche Weise präparierten Probe dargestellt. Die analysierte Fläche beträgt $190 \times 190 \mu\text{m}^2$.

Dargestellt ist das Ionenverteilungsbild des K^+ , welches im Wesentlichen die Bereiche des Biofilms wiedergibt, und die Ionenverteilungsbilder der Molekülfragmente $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}^+$ und $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{PNO}_4^+$, welche in der SIMS als typische Fragmente aus Zellmembranen bekannt sind und somit ebenfalls Bereiche des Biofilms repräsentieren. Des Weiteren ist das Verteilungsbild vom Chlorhexidin dargestellt, für welches die Signalintensitäten der beiden Hauptpeaks des Gesamtmoleküls (505 u und 507 u) sowie die Intensität des Fragments auf der Masse 195 u aufaddiert wurden.

Bei Betrachtung der Verteilungsbilder der die Zellstrukturen repräsentierenden Signale K^+ , $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}^+$ und $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{PNO}_4^+$ ist ein unterschiedliches Verhalten feststellbar. Sind in allen Bildern in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche der Schlauchinnenseite noch deutlich zelluläre Strukturen in Form rundlicher und ovaler Flächen erhöhter Signalintensität zu erkennen, ändert sich dies mit zunehmendem Abstand von der Schlauchoberfläche. Während im Kaliumverteilungsbild zum Schlauchlumen hin noch deutlich auf Zellen hindeutende Strukturen zu erkennen sind, sind diese in den anderen beiden Verteilungsbildern zum Teil schon schwächer ausgeprägt und bei einigen Zellen schon gar nicht mehr zu erkennen. Die Intensität des Chlorhexidins ist zwar relativ schwach und auch noch von Untergrundsignalen sowie Rauschen überlagert, aber eine Strukturierung der Verteilung ist zu erkennen. Neben zwei Bereichen mit deutlich erhöhter Intensität in den ausgewählten Molekülen, ist auch ein Abnehmen der Signalintensität vom der Mitte des Schlauchlumens zur Oberfläche der Schlauchinnenseite hin zu erkennen.

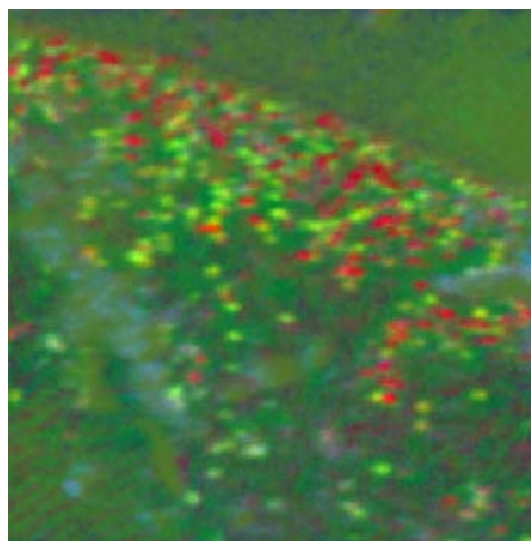


Abbildung 29: Überlagerungsbild erstellt aus drei MAF-Bildern

Um in diesem komplexen System Gemeinsamkeiten beziehungsweise Unterschiede besser erkennen zu können, bietet sich die Auswertung mit statistischen Methoden, bei Lateralverteilungsanalysen insbesondere MAF, an (vgl. Kap. 2.1.5, Seite 12). Von besonderem Interesse ist hier das Überlagerungsbild erstellt aus drei MAF-Bildern, gezeigt in Abbildung 29. Zu erkennen sind neben den dunkelgrün dargestellten Bereichen, die im Wesentlichen die Nährlösung, aber auch die Schlauchbereiche repräsentieren, auch noch blaue Bereiche, in denen das Chlorhexidin erhöhte Signalintensität zeigt. Auffallend sind insbesondere die Bereiche mit rot sowie hellgrün gefärbten Flächen, welche beide, was man im Vergleich zu den Verteilungsbildern in Abbildung 28 erkennen kann, Zellen darstellen. Offensichtlich handelt es sich aber um Bereiche mit signifikant unterschiedlichen Intensitätsverhältnissen. Eine genauere Analyse der genau in diesen Bereichen rekonstruierten Massenspektren zeigt deutliche Unterschiede in einigen Massenintervallen.

Beispielhaft sind in der Abbildung 30 Ausschnitte derjenigen Spektren dargestellt, die im Bereich dieser Zellen rekonstruiert wurden. Dabei ist in den jeweiligen Massenintervallen in Grün das Spektrum dargestellt, welches aus den Bereichen stammt, die in dem MAF-Bild hellgrün erscheinen. Analog dazu ist in Rot das Spektrum dargestellt, welches aus den Bereichen, die in dem MAF-Bild rot erscheinen, stammt.

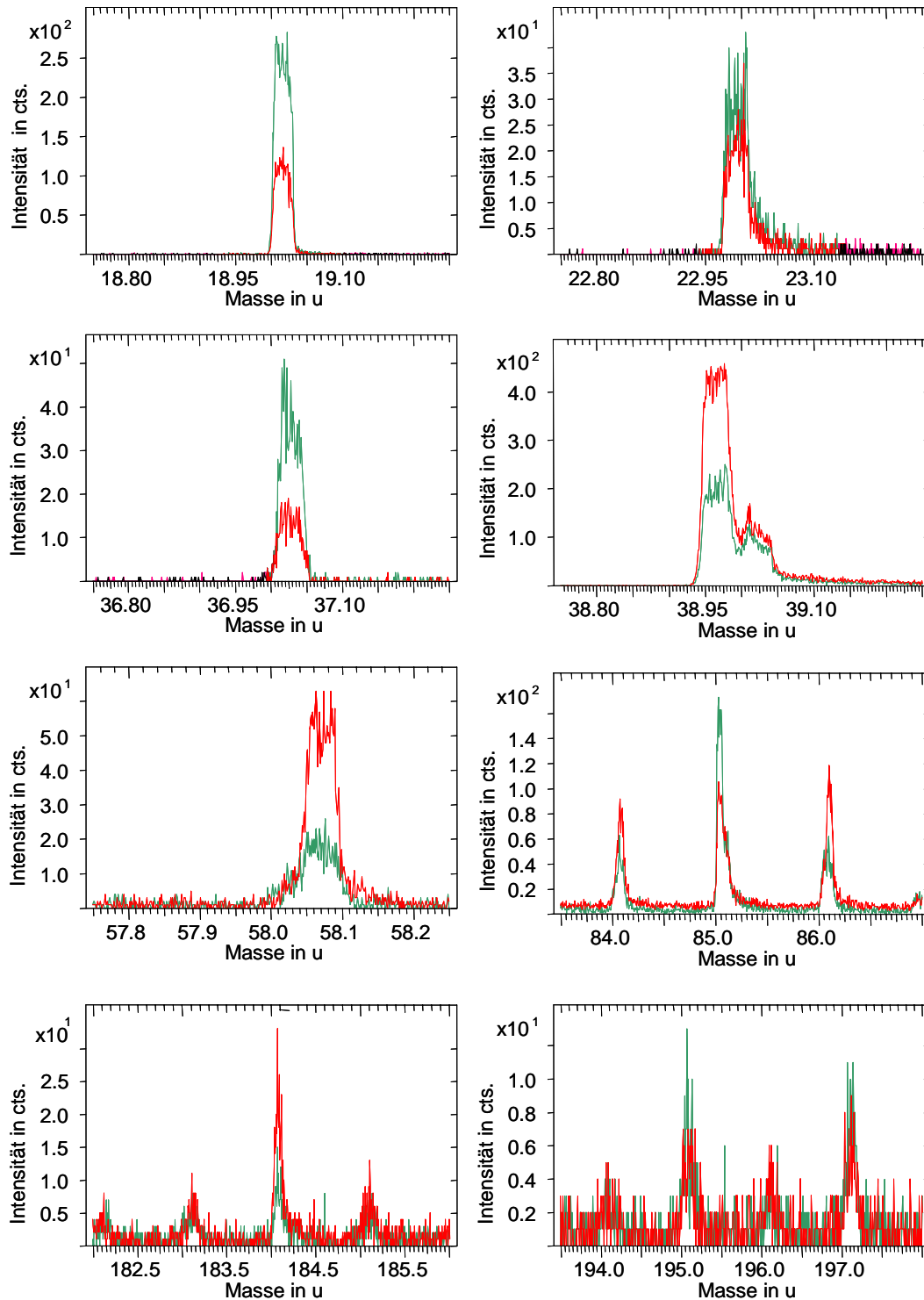


Abbildung 30: Auszüge aus den Spektren, die in verschiedenen Regionen der Biofilmkultur ermittelt wurden. Analog zu der Farbwahl im MAF-Bild sind die Spektren von den Flächen, die im MAF-Bild rot dargestellt sind, in Rot dargestellt, die Spektren, die auf den grünen Punkten im MAF-Bild ermittelt wurden, sind in Grün dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass in den grün dargestellten Auszügen aus dem Spektrum die Signalintensitäten auf den Massenintervallen um 19 u, 23 u, 37 u, 85 u und 195 u und 197 u im Vergleich zu den rot dargestellten erhöht sind. Umgekehrt sind die Signalintensitäten

auf den Massenintervallen 39 u, 58 u, 84 u, 86 u und 184 u in dem rot dargestellten Spektrum im Vergleich zum grünen erhöht.

Für die Interpretation der Ergebnisse bedeutet dies, dass in den im MAF-Bild hellgrün dargestellten Zellbereichen ein im Vergleich zu den rot dargestellten Bereichen von Zellen ein deutlich höherer Anteil von Wasser repräsentierenden Signalen zu detektieren ist, hier beispielhaft dargestellt an den Massen 19 u und 37 u für H_3O^+ und H_5O_2^+ . Auch die Intensität von Natrium auf Masse 23 u ist leicht erhöht gegenüber dem anderen Spektrum. Auffällig ist auch die erkennbare Steigerung der Intensität in den Massenintervallen 85 u, 195 u und 197 u, welche Hauptfragmente des Chlorhexidins darstellen. Zwar kommt es an diesen Stellen im Spektrum bei der hier erzielten Massenauflösung zu Masseninterferenzen mit unspezifischen Fragmenten von anderen Molekülen, doch zeigen die Unterschiede in den beiden Spektrum eine eindeutige Tendenz. Für eine quantitative Auswertung sind die Intensitäten allerdings zu gering.

In den anderen Massenintervallen hingegen kann man einen relativen Anstieg der Signale in dem rot dargestellten Spektrum erkennen. So ist die Intensität von Kalium auf Masse 39 u in diesem Spektrum deutlich gegenüber dem in Grün dargestellten Spektrum erhöht. In den Massenintervallen, die auch aus Membransignalen stammen können, wie zum Beispiel das $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}^+$ auf der Masse 58 u, das $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{PNO}_4^+$ auf der Masse 184 u sowie die Signale $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}^+$ auf der Masse 86 u und die überlagerten Signale von $\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}^+$ und $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}^+$ auf der Masse 84 u ist diese Tendenz ebenfalls deutlich zu erkennen.

Alleine die Auswertung dieser Signalintensitäten zeigt, dass es bei den Zellen, die in dem MAF-Bild hellgrün erscheinen gegenüber den Zellen, die in dem MAF-Bild rot erscheinen, zu einer deutlichen Verringerung des Kalium zu Natrium Verhältnisses gekommen ist. Auch der Anteil von Wasser ist deutlich erhöht. Offensichtlich kam es schon zu einer Störung des Stoffwechsels der hellgrün dargestellten Zellen. Bedenkt man, dass eine Wirkung des Chlorhexidins darauf beruht, dass dieses membranzerstörend ist, deutet die Abnahme der Membran repräsentierenden Signale auf eine bereits eingesetzte Wirkung des Chlorhexidins hin. Auch die Zunahme der Signalintensitäten bei Masse 85 u, 195 u und 197 u, die alle aus dem Chlorhexidin stammen können, sowie die Tatsache, dass die Anzahl, beziehungsweise Dichte der ungestörteren Zellen zur Schlauchoberfläche hin zunimmt, legen diese Interpretation nahe.

Damit lässt sich feststellen, dass die in dem MAF-Bild rot dargestellten Bereiche vor der Kryofixierung lebende, in ihrem Stoffwechsel weitgehend ungestörte Zellen repräsentieren. Die hellgrün dargestellten Bereiche repräsentieren hingegen Zellen, deren normaler Stoffwechsel schon stark gestört, gegebenenfalls sogar komplett zum Erliegen gekommen ist und deren Membrangerüste schon angegriffen wurden.

Dieses Beispiel zeigt das Potenzial der Kryo-ToF-SIMS-Analyse, bei der es möglich ist, mit nur einer Lateralverteilungsanalyse den Querschnitt über einen Biofilm abzubilden, zu klären inwieweit die Bereiche des Biofilms vital und intakt sind und eine Bestimmung der Konzentration des Antiseptikums in verschiedenen Bereichen des Biofilms und sogar innerhalb der einzelnen Zellen zu ermöglichen.

5.2 Analysen an biologischem Gewebe

Zeigt das erste Beispiel, dass die aufgebaute Apparatur in Verbindung mit dem entwickelten Präparationsprotokoll und Standardarbeitsanweisung erfolgreich zur Analyse einer Zellkultur eingesetzt werden kann, soll auch anhand einer Analyse an einem Pflanzenblatt ein Beispiel für die Einsatzmöglichkeiten bei biologischem Gewebe gezeigt werden.

Bei dem hier untersuchten Proben handelt es sich um Blätter der Pflanze *Alyssum Lesbiacum*. Diese Pflanzenart könnte eine besondere Bedeutung für die Sanierung mit Schwermetallen belasteter Böden spielen, da sie in der Lage ist, Schwermetalle, in diesem Fall Nickel, in außergewöhnlich hoher Konzentration zu akkumulieren. Einen Nickelanteil von bis zu drei Prozent der Trockenmasse der Pflanze kann diese Art einlagern, ohne Schaden zu nehmen [76].

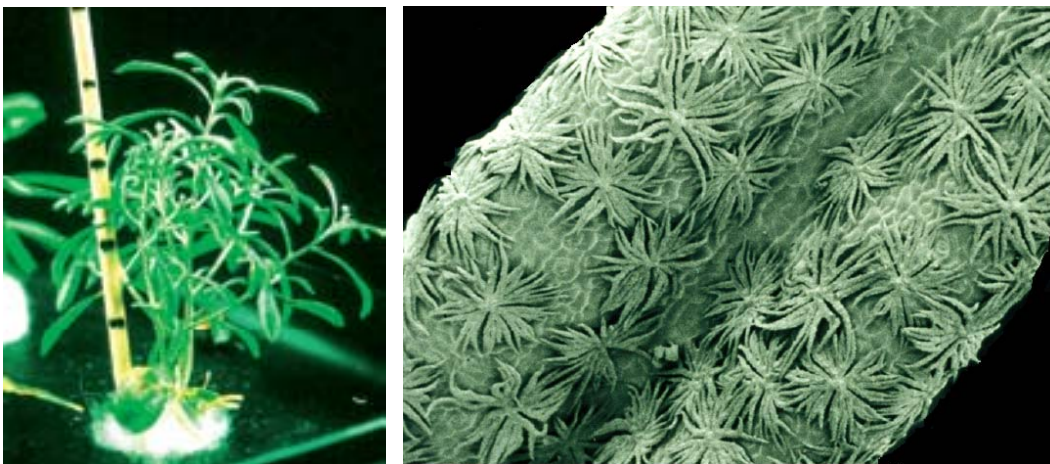


Abbildung 31: Nickelhyperakkumulator *Alyssum Lesbiacum*. Links ist ein Foto einer in Hydrokultur gezogenen Pflanze dargestellt, rechts ein Rasterelektronenbild der Oberfläche eines Blattes einer solchen Pflanze [77]

Ein Foto einer solchen Pflanze sowie ein Rasterelektronenmikroskopbild der Oberfläche eines Blattes einer solchen Pflanze ist in Abbildung 31 dargestellt.

Der Prozess der Akkumulation solch hoher Schwermetallkonzentration in den Zellen dieser Pflanze ist zurzeit noch nicht genau verstanden. Dies wäre jedoch eine Voraussetzung, um durch gezielte Züchtung oder gentechnische Modifikation diese Schwermetalleinlagerungsprozesse noch zu beschleunigen und so die Effizienz von Bodesanierungen steigern zu können. Ziel ist es somit nicht nur das Nickel in der Pflanze zu detektieren und die Bereiche zu lokalisieren, in denen das Nickel in der Pflanze angereichert wird, sondern es gilt zusätzlich auch diejenigen Substanzen zu identifizieren, die mit dem Prozess der Nickelakkumulation im Zusammenhang stehen.

Hierfür ist nur ein Analyseverfahren geeignet, das sowohl Elemente als auch Moleküle orts aufgelöst nachweisen kann. Dabei sollten in einem Querschnitt die unterschiedlichen Regionen des Blattes, bestenfalls sogar unterschiedliche Zelltypen identifizierbar sein. Wie an den zuvor gezeigten Beispielen demonstriert wurde, bieten sich die aufgebaute Apparatur und das Analyseprotokoll für diese Anforderungen an. Allerdings sind im Vergleich hierzu bei der Methodik der Präparation einige Modifikationen vorzunehmen.

Allein zum Fixieren des vitalen Zustandes des Zellgewebes und zur Herstellung der Vakuumkompatibilität wäre es ausreichend die Blätter ohne eine spezielle Einfassung einzufrieren. Dies hätte aber den erheblichen Nachteil, dass die durch die Kryofixierung spröde gewordene Blattprobe bei der verhältnismäßig festen Fixierung auf dem Probenhalter zur Kompensation der beim Schneiden aufgebrauchten Scherkräfte, zerstört werden könnte. Selbst bei erfolgreicher Probenmontage besteht zusätzlich noch die Gefahr, dass die beim Schneiden entstehenden Scherkräfte zu einem willkürlichen Brechen des Blattes führen, die die Erzeugung einer glatten Schnittfläche, wie sie durch die Verwendung eines geführten Messers erzeugt werden soll, verhindert wird. Beide Bedingungen zusammen konnten mit so dünnen Proben, wie dem Blatt, nicht ohne eine Einbettung beziehungsweise Fassung realisiert werden. Ein Einbetten oder Fassen in Harzen sollte jedoch bei einer massenspektrometrischen Analyse gezielt vermieden werden, um die chemische Zusammensetzung so wenig wie möglich zu verändern.

Wie an den bisherigen Beispielen demonstriert wurde, kann jedoch eine im Wesentlichen aus Wasser bestehende Probe problemlos präpariert und analysiert werden. Waren bei den gezeigten Beispielen die Zellen ohnehin von einem Puffermedium beziehungsweise von der Nährlösung umgeben, kann hier Wasser, da es normalerweise Pflanzenblätter nicht angreift oder deren Chemie verändert, bei der Präparation gezielt als Fassungsmedium hinzugegeben werden.

Für erste Untersuchung zur Nickelakkumulation wurden Pflanzensamen von *Alyssum Lesbiacum* auf der griechischen Insel Lesbos gesammelt. Nach der Keimung wurde eine Hälfte der Pflanzen auf einer eins zu eins Mischung von Perlit und Nickel enthaltendem

Mutterboden kultiviert, während die andere Hälfte zur Kontrolle auf nickelfreien Perlit und Mutterbodenmischungen aufgezogen wurde. Direkt nach der Ernte von jeweils zirka 3-5 mm langen Stücken der Blätter der Pflanze, wurden diese in einen Spezialprobenhalter gegeben. Dieser speziell für diese Anwendung gewählte Halter besteht aus einem Kupferröhrchen dessen Innendurchmesser von zirka 2 mm etwa dem doppelten des Blattdurchmessers entsprach und sich nach oben leicht trichterförmig öffnete. Das Blatt wurde lose derart in das Rohr gestellt, dass Teile über den Rand des Röhrchens überstanden. In dieses Röhrchen wurde Wasser gegeben, bis auch der überstehende Teil der Pflanze durch den entstehenden Tropfen bedeckt war, und schließlich alles zusammen in flüssigem Propan eingefroren. Der Wassertropfen diente dazu das Blatt in dem Röhrchen fest zu fassen und zu stützen, ohne es dabei einspannen oder quetschen zu müssen. Das Kupferröhrchen erfüllte den Zweck die gesamte Probe, also das in dem Eis gefasste Blatt, schließlich auf dem Probenhalter fest zu montieren. In Abbildung 9D auf Seite 44 ist der Probenhalteraufbau dargestellt, der für diese Analyse verwendet wurde.

Nach einer Zwischenlagerung in flüssigem Stickstoff wurden Proben, der nickelfreien Kontrollblätter und der nickelhaltigen Blätter in die Anlage transferiert. Hier wurden sie in der Schnittkammer geschnitten, die Proben temperatur auf $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ gebracht und die Proben schließlich analysiert.

Ergebnisse einer SIMS-Lateralverteilungsanalyse an einer nickelfreien Kontrollprobe sind in Abbildung 32 dargestellt. Die gewählte Primärionenspezies war Bi_3^+ und die analysierte Fläche beträgt $150 \times 150\text{ }\mu\text{m}^2$.

Die Abbildung zeigt die aus der SIMS-Analyse stammenden Lateralverteilungsbilder ausgewählter Elemente und Moleküle. Dargestellt sind die Verteilungen von Ca^+ , Mg^+ , K_2OH^+ , C_2H_5^+ , CHO^+ , H_5O_2^+ . Zu Übersichtszwecken ist noch ein Überlagerungsbild, erstellt aus den Verteilungsbildern des Ca^+ (rot), des K_2OH^+ (grün) und des CHO^+ (blau) sowie das Totalionenbild gezeigt.

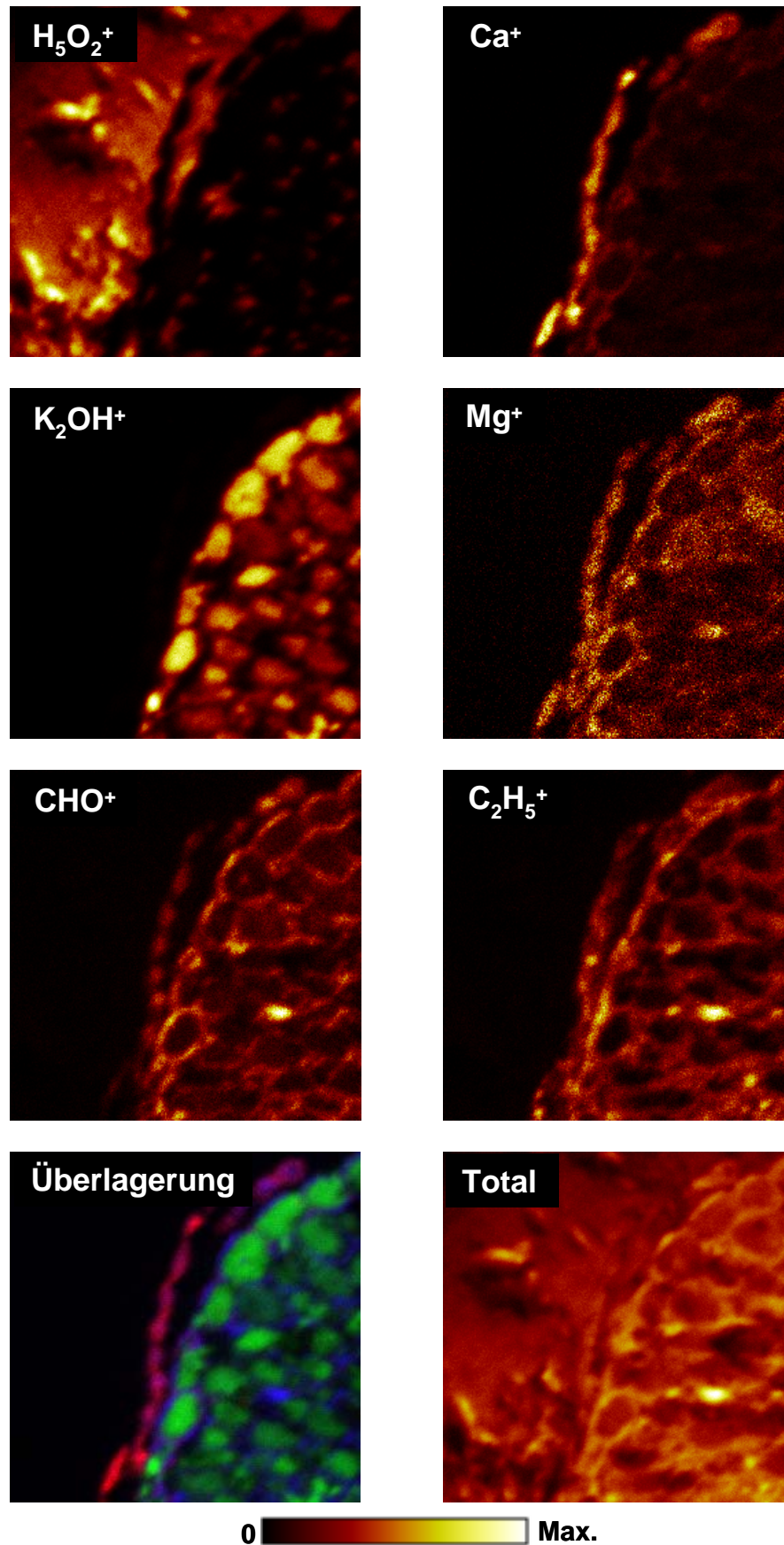


Abbildung 32: Bilder einer Lateralverteilungsanalyse ausgewählter positiver Sekundärionen eines Blattquerschnitts der nickelfreien Probe; die analysierte Fläche beträgt $150 \times 150 \mu\text{m}^2$.

Es zeigt sich, dass das beschriebene Präparations- und Analyseprotokoll einschließlich der Erhöhung der Proben temperatur auch für Gewebe, in diesem Fall für Pflanzen, einsetzbar ist. Auch hier ist die durch den Schnitt freigelegte Probenoberfläche nicht unspezifisch von Adsorbatschichten bedeckt. Wasser ist aber nach wie vor in der Pflanze sowie als das umgebende Fassungsmedium nachweisbar, wie anhand eines Vergleichs des Verteilungsbildes des Wassers (hier H_5O_2^+) mit denen der anderen Ionen zu erkennen ist. Man kann im linken Bildteil deutlich den Bereich des Wassers, welches der Fassung diene, erkennen. Im rechten Bildteil der Lateralverteilungsbilder ist der Querschnitt des Pflanzenblattes auszumachen.

Im Bereich der Pflanze sind verschiedene Zelltypen zu erkennen. Von außen nach innen erkennt man zunächst, insbesondere anhand des Verteilungsbildes des Kalziums, eine vom restlichen Pflanzenteil etwas abstehende Zellschicht. Hierbei handelt es sich um Trichomzellen, die, wie in dem Rasterelektronenmikroskopbild in Abbildung 31 auf Seite 80 bereits zu erkennen, von der Pflanzenoberfläche beziehungsweise dem dicht gepackten Bereich des Pflanzengewebes leicht abstehen und nur an wenigen Stellen mit dem Rest der Pflanze verbunden sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass Trichome und die äußeren Zellwände dieser Pflanze Kalziumverbindungen anreichern können [78], was sich mit den hier präsentierten Analyseergebnissen deckt.

Als nächste Zellschicht erkennt man an der Oberfläche des dicht gepackten Zellbereiches Epidermiszellen. Diese erscheinen im Vergleich etwas rundlicher als die etwas weiter im Inneren liegenden leicht oval beziehungsweise länglicher geformten Mesophylzellen. Die Epidermiszellen unterscheiden sich jedoch nicht nur in der Form und den Abmessungen von den Mesophylzellen. So ist in den Verteilungsbildern von Kalium enthaltenden Sekundärionen, hier anhand des Beispiels K_2OH^+ , und Magnesium zu erkennen, dass diese Elemente in diesen Zellen intensiver zu detektieren sind.

Aber nicht nur das Zellinnere sondern auch die jeweiligen Zellen begrenzende Strukturen sind deutlich anhand einiger molekularer Signale zu erkennen. So zeigen das Verteilungsbild von CHO^+ wie auch andere nicht dargestellte Verteilungsbilder von Molekülfragmenten der Art $\text{C}_x\text{H}_y\text{O}_z^+$ deutlich die Umrise einzelner Zellen. Als ein bedeutender Ursprung dieser Fragmente ist die Zellulose $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ zu nennen, welche insbesondere in den Zellwänden von Pflanzenzellen vorkommt. Dies erklärt die in den Verteilungsbildern sichtbaren scharfen Umrandungen um die Zellen.

In den Verteilungsbildern weniger spezifischer Fragmente der Form C_xH_y^+ , hier dargestellt anhand des Beispiels des C_2H_5^+ , sind ebenfalls die Umrise einzelner Zellen zu erkennen. Allerdings sind diese deutlich weniger scharf umrissen, da Sekundärionen dieses Typs weniger charakteristisch für spezifische Moleküle sind. Somit können sie

neben den Zellwänden auch aus anderen Bereichen des Gewebes stammen. Zu erkennen sind Unterschiede zum Beispiel an der äußeren Schicht der dicht gepackten Zellen des Blattes. Während diese in dem Verteilungsbild des $C_2H_5^+$ eine relativ glatte Blattoberfläche ergibt, ist sie in dem Bild des CHO^+ durch die Rundungen der einzelnen Zellen geprägt.

Im Verteilungsbild des Magnesiums ist zu erkennen, dass dies insbesondere in den äußeren Bereichen des Blattes nachzuweisen ist. Ein Ursprung des Magnesiums kann dabei Chlorophyll sein, welches ebenfalls eher in den äußeren Bereichen der Pflanze vorkommt.

Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 33 anhand ausgewählter Sekundärionenverteilungsbildern das Ergebnis einer Analyse, die an einem Blatt, einer auf nickelhaltigem Boden kultivierten Pflanze, durchgeführt wurde. Die analysierte Fläche beträgt $125 \times 125 \mu m^2$ und die Primärionenspezies war Bi_3^+ .

Wie bereits bei der nickelfreien Probe sind auch hier die Bereiche der Zelle und die Bereiche des Wassers, welches die Pflanze umgibt, sichtbar. Unterschiedliche Zelltypen sind ebenfalls in diesen Bildern zu erkennen. Außen steht eine Trichomzelle ab, am Rand des Blattes befinden sich die rundlicheren Epidermiszellen und im Inneren des Blattes die länglich-ovalen Mesophylzellen. Auffällig ist hier, dass im Gegensatz zu der Vergleichsprobe, bei der der analysierte Querschnitt durch die Randbereiche mehrerer Trichomzellen verlief, hier ein Querschnitt durch eine einzelne Trichomzelle gelungen ist. Wieder ist zu erkennen, dass in diesem Zelltyp Kalzium angereichert wird.

Magnesium ist mehr in den äußeren Bereichen der Pflanze auszumachen und kaliumhaltige Verbindungen sind eher in der Epidermisschicht zu detektieren. Die Ergebnisse stimmen bezüglich dieser Elemente und Molekülfragmente mit der Vergleichsprobe überein.

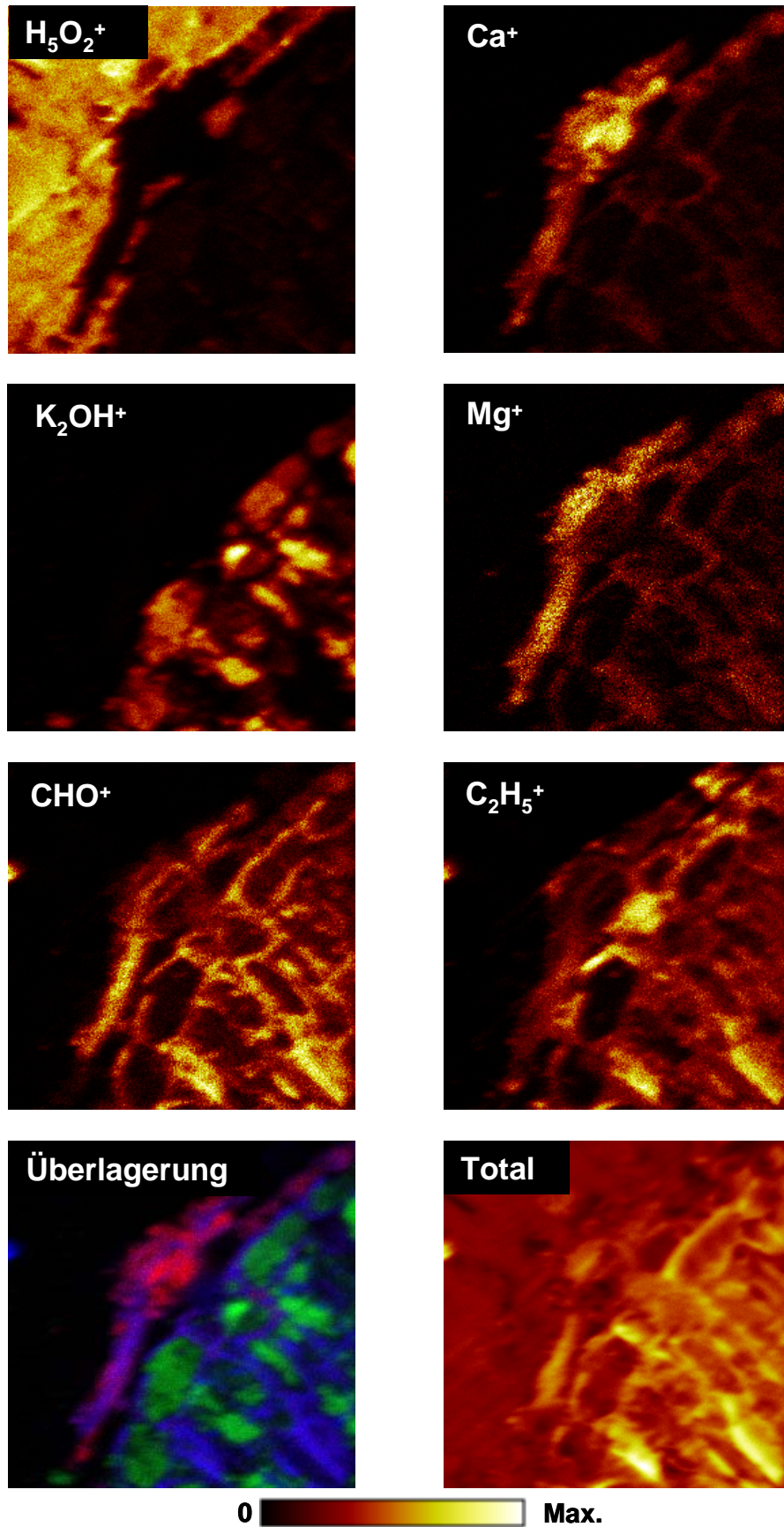


Abbildung 33: Bilder einer Lateralverteilungsanalyse ausgewählter positiver Sekundärionen eines Blattquerschnitts der nickelhaltigen Probe; die analysierte Fläche beträgt 125×125 μm².

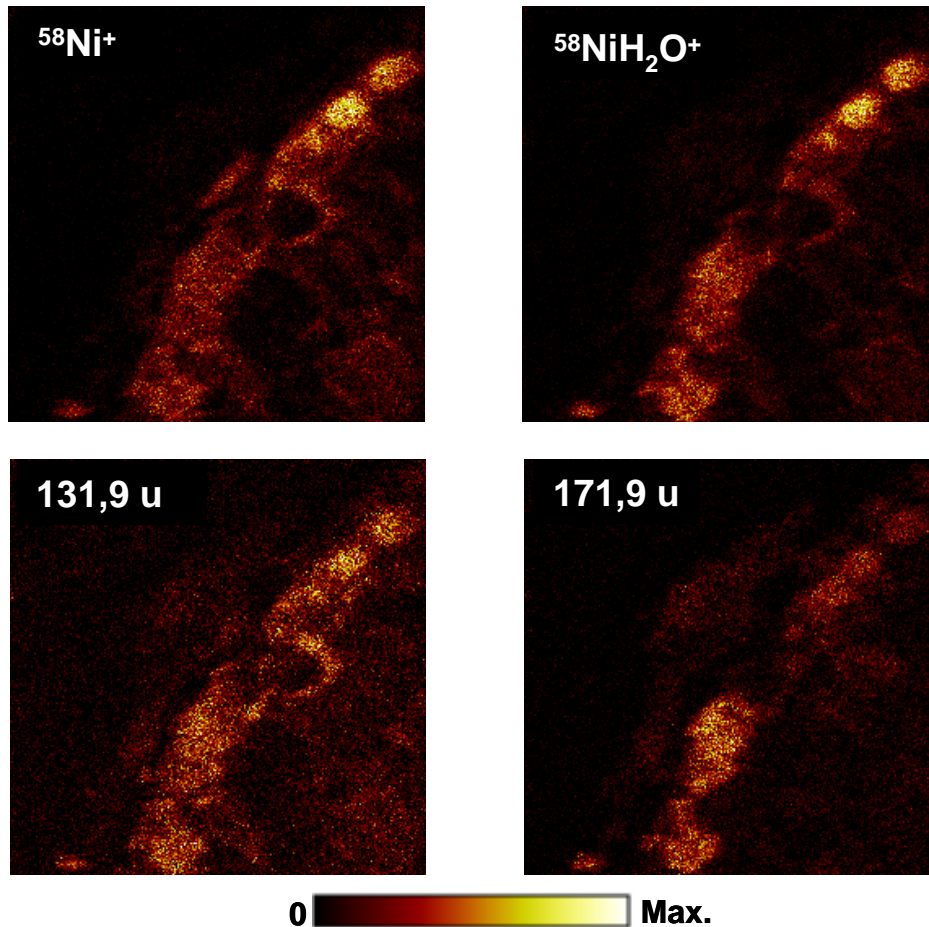


Abbildung 34: Bilder einer Lateralverteilungsanalyse positiver Nickel enthaltender oder mit der Nickelakkumulation korrelierter Sekundärionen eines Blattquerschnitts; die analysierte Fläche beträgt $125 \times 125 \mu\text{m}^2$.

Zusätzlich zu den bisher präsentierten Verteilungsbildern sind in Abbildung 34 noch die Lateralverteilungsbilder von $^{58}\text{Ni}^+$, $^{58}\text{NiH}_2\text{O}^+$ sowie solche von Signalen aus den Massenintervallen um $131,9 \text{ u}$ und $171,9 \text{ u}$ dargestellt. Im Gegensatz zur nickelfreien Kontrollprobe ist in dieser Probe Nickel eindeutig nachzuweisen, was an den Verteilungsbildern von $^{58}\text{Ni}^+$ und $^{58}\text{NiH}_2\text{O}^+$ zu erkennen ist. Es zeigt, dass die Akkumulation dieses Metalls im Wesentlichen in der Epidermiszellschicht stattfindet.

Auch andere, bisher noch nicht identifizierte Verbindungen oder Fragmente zeigen in der Epidermisschicht gesteigerte Intensitäten, hier beispielhaft dargestellt anhand der Verteilungsbilder von $131,9 \text{ u}$ und $171,9 \text{ u}$. Diese haben eine Verteilung, die der des Nickels ähnelt. In weitergehenden Reihenuntersuchungen können somit Korrelationen zwischen der Nickelanreicherung und der Konzentration von weiteren Bestandteilen, insbesondere von Biomolekülen, untersucht werden.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass zur weitergehenden Untersuchung dieses Probensystems die dargestellte Präparations- und Analysetechnik verwendet werden kann. In den Bildern sind deutlich verschiedene Zellbereiche und Zelltypen zu

erkennen. Zellwände und Zellinneres sind klar voneinander zu trennen, Zellspezifische Anreicherungen von Elementen und Molekülen sind nachweisbar und Unterschiede auf molekularer Ebene in der Nickelanreicherung sind detektierbar.

5.3 3D-Analysen an einem Organismus des Zooplanktons

In den vorherigen Beispielen ist erfolgreich gezeigt worden, dass die Zusammensetzung von Oberflächen biologischer Proben mittels des beschriebenen Präparations- und Analyseverfahrens bestimmbar ist. Allerdings tritt bei biologischen Objekten auch häufig die Fragestellung nach der elementaren und molekularen Verteilung im Innern einer ausgedehnten Probe auf. Konzentrationsgradienten in der Zusammensetzung einer Probe erfordern eine dreidimensionale Analyse. Da die Methode der SIMS in der direkten Analyse auf die obersten atomaren beziehungsweise molekularen Monolagen der Probe beschränkt ist, ist es zwingend notwendig die Probe Schicht für Schicht abzutragen und dann in der jeweiligen Schicht Lateralverteilungsbilder aufzunehmen. Ziel sollte dabei sein, zum einen eine möglichst hohe Tiefenauflösung zu gewährleisten und zum anderen den maximalen Informationsgehalt der Probe zu bewahren.

Das für die Tiefenprofilierung in der SIMS gängige Verfahren des Offenlegens der interessierenden Schichten durch Zerstäubung mittels Ionenbeschuss bietet zwar, abhängig von Primärionenparametern und Probenbeschaffenheit, eine hohe Tiefenauflösung, zerstört aber zum großen Teil molekulare Informationen der Probe. Auch die Anwendung von Clusterionenquellen, wie zum Beispiel C_{60} -Ionenquellen, welche bei der Zerstäubung eine deutlich geringere Tendenz zur Zerstörung der molekularen Information zeigen, löst dieses Problem im Allgemeinen nicht. Darüber hinaus können unterschiedliche Zerstäubungsausbeuten von verschiedenen Bereichen der Probe, dazu führen, dass eine sehr raue Oberfläche entsteht und eine echte Tiefenkalibrierung gar nicht mehr möglich ist.

Einen Ausweg bietet eine schichtweise Abtragung der zu analysierenden Probe mittels Schneidens. Auch bei einem wiederholten Schneiden oder Brechen von Proben hat dies keinen negativen Einfluss auf die molekulare Information in der SIMS-Analyse. Eine 3D-Analyse, die darauf beruht, in mehreren Schichten eine Lateralverteilungsanalyse mittels SIMS durchzuführen, wobei die jeweiligen Schichten durch Schneiden oder Brechen erzeugt wurden, behält also maximale molekulare Information bezogen auf die SIMS-Analyse. Zusätzlich spielen Effekte wie unterschiedliche Zerstäubungsausbeuten, die dazu führen können, dass die Probenoberfläche sehr ungleichmäßig abgetragen wird, hier keine Rolle. Allerdings liegt die Tiefenauflösungsgrenze für ein solches Verfahren in der Größenordnung der einzelnen Schnitte, also in der aufgebauten Schnittapparatur bei minimal 5 μm . Dies ist zur 3D-Analyse einzelner Zellen im

Allgemeines viel zu groß, kann aber zur Auffindung von Strukturen, zum Beispiel in Geweben oder außergewöhnlich großen Zellen, bereits ausreichend sein.

Als ein Beispiel dafür, dass solche Analysen mit der aufgebauten Apparatur ermöglicht werden, soll im Folgenden eine 3D-SIMS-Analyse an einer Foraminifere des Typs *Ammonia Tepida* vorgestellt werden.

Foraminiferen sind einzellige, planktonische, tierische Lebewesen, die weitestgehend unverändert seit mehreren Millionen Jahren in fast allen Meeren auf unserem Planeten leben und die Eigenschaft besitzen, eine Kalzitschale um sich zu bilden. Die Kalzitschalen abgestorbener Foraminiferen findet man in vielen Sedimentschichten wieder. Es konnte gezeigt werden, dass sich die chemischen und zum Teil auch isotopischen Zusammensetzungen der Schalen bei der Bildung durch die Foraminifere beispielsweise in Abhängigkeit von Wassertemperatur, pH-Wert, Nahrungsmittelkonzentration oder ähnlichem unterscheiden [79]. Diese Umweltparameter werden ganz entscheidend durch das jeweilige Klima beeinflusst. Gelänge es also diese Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der Kalzitschale anhand von heute lebenden Foraminiferen oder durch in Laboratorien unter definierten Umgebungsbedingungen kultivierte Foraminiferen in Bezug auf die jeweiligen interessierenden Parameter zu qualifizieren und zu quantifizieren, bestünde die Möglichkeit diese Daten auf Kalzitschalen zu übertragen, die aus Bohrkernen aus Sedimentschichten gewonnen wurden. Somit könnten Aussagen über die Zusammensetzung der Ozeane oder das Klima über Zeiträume von mehreren zehntausend Jahren in die Vergangenheit hinein getätigt werden. Eine hierdurch möglich werdende bessere Kenntnis der Klimaentwicklung der verschiedenen erdgeschichtlichen Epochen, ist insbesondere unter Berücksichtigung der aktuellen Debatten über das Klima von hohem Interesse [80].

Die für eine 3D-Analyse gewählte Foraminiferenart, *Ammonia Tepida*, bildet eine schneckenhaus- beziehungsweise nautilusartige Kalzitschale, die sich aus mehreren Teilschalen zusammensetzt, und einen Durchmesser von 200 μm bis 500 μm hat. Beispielhaft ist in Abbildung 35 ein Rasterelektronenmikroskopbild der Kalzitschale einer solchen Zelle dargestellt. Die typische Struktur ist in dem Bild deutlich zu erkennen.

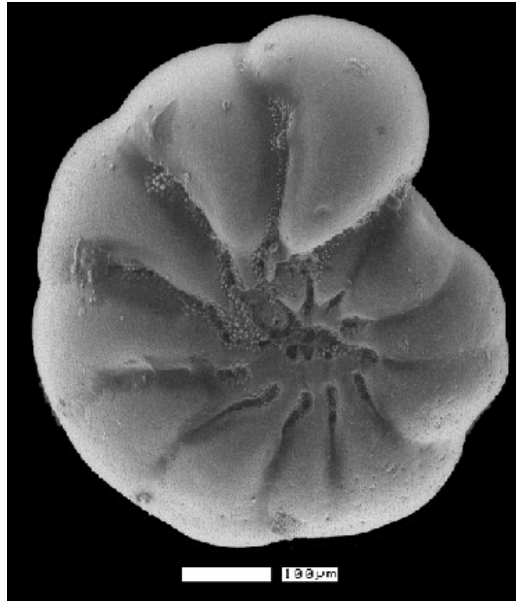


Abbildung 35: Rasterelektronenbild der Kalzitschale einer Foraminifere des Typs *Ammonia Tepida* [81]

In der Vorbereitung für die 3D-Analysen wurden einige Exemplare der Foraminiferen des Typs *Ammonia Tepida* im Wattenmeer an der deutschen Nordseeküste gesammelt. Diese wurden in Meerwasser, also ihrer normalen Umgebung, transportiert und gelagert. Zum Fixieren der Proben wurde ein Tropfen (zirka 1 µl bis 2 µl) des Salzwassers auf einen tellerartigen Probenhalter pipettiert. In diesen Tropfen wurde eine einzelne Foraminifere mittels eines Pinsels gegeben. Die kurze Zwischenzeit, die die Zelle der Luft ausgesetzt ist, schadet der Foraminifere nicht. Schließlich wurde der Probenteller mit dem die Foraminifere enthaltenden Tropfen in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Propan eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Vor der eigentlichen Analyse wurde die Probe in der Schnittkammer derart geschnitten, dass erste Teile der Foraminifere freigelegt wurden. Auf dieser Oberfläche wurde nun die erste Lateralverteilungsanalyse unter Verwendung von Bi_3^+ -Primärionen auf einer Analysefläche von $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ durchgeführt. Anschließend wurde die Probe wieder in die Schnittkammer transferiert und eine weitere Schicht mit einer Dicke von zirka 15 µm mittels Schnitt entfernt. An dieser neuen Oberfläche erfolgte dann die zweite Analyse. Dieser Vorgang des alternierenden Schneidens und Analysierens ist prinzipiell beliebig oft bis zum kompletten Aufbrauchen der Probe wiederholbar.

An der hier vorgestellten Foraminifere sind 18 Einzelmessungen der Lateralverteilung der Sekundärionen an 18 separaten Schnittebenen durchgeführt worden. Der Abstand zwischen den Ebenen betrug zirka 15 µm bis 25 µm. Abbildung 36 bis Abbildung 38 zeigen das Ergebnis dieser Analyse. Dargestellt sind die auf den 18 Ebenen ermittelten Verteilungsbilder von Ca^+ ($m=40$ u) und von K^+ ($m=39$ u), als Beispiel für

Elementverteilungen, sowie von $C_3H_8N^+$ ($m=58$ u) und $C_5H_{15}PNO_4^+$ ($m=184$ u), als Beispiele für die Verteilung organischer Verbindungen.

Die Abbildungen zeigen, dass aus den Bereichen der Kalzitschale im Wesentlichen kalziumhaltige Verbindungen detektiert wurden. Aus den Bereichen innerhalb der Kalzitschalen sind andere Elemente und Moleküle zu detektieren. Als Beispiele dafür sind K^+ und die beiden organischen Molekülfragmente $C_3H_8N^+$ und $C_5H_{15}PNO_4^+$ dargestellt.

Die erste Aufnahme zeigt, dass zunächst nur zwei geöffnete Kammern der Kalzitschale zu erkennen sind. Mit zunehmender Tiefe werden weitere Kammern geöffnet. Besonders gut ist die Entwicklung ab der dritten Einzelanalyse sichtbar. Hier ist im unteren Teil der Bilder das Erscheinen einer weiteren Kalzitteilschale zu erkennen. Diese Teilschale ist zunächst nicht sichtbar, wächst dann aber mit zunehmender Analysetiefe gleichmäßig an.

Eine Besonderheit stellt die ab der zweiten Analyse sichtbare oberste Kalzitteilschale dar. Diese ist im Kalziumbild deutlich zu erkennen, während sie in den Bildern, welche den organischen Teil der Zelle repräsentieren nicht sichtbar ist. Dies deutet darauf hin, dass sich die Foraminifere aus diesem Bereich bereits vor dem Fixieren zurückgezogen hatte.

Auch die dreidimensionale Struktur der innersten Kalzitteilschale ist ab Schnittebene 11 deutlich zu erkennen. Zunächst ist die Kalzitschale noch komplett geschlossen. Dies ist daran zu erkennen, dass Kalzium in diesem Bereich flächig detektiert wird, ohne dass die organischen Fragmente hier zu detektieren sind. In den nächsten Bildern wurde die Kalzitteilschale dann geöffnet bis sogar mehrere Teilschalen sichtbar werden. Jeweils aus dem Inneren der Schalen sind die organischen Fragmente detektierbar.

Es ist deutlich zu erkennen, dass auch noch im letzten Schnittbild die Molekülfragmente im organischen Bereich zu detektieren sind. Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber der Methode des Materialabtrags durch Zerstäuben, bei dem üblicherweise die molekulare Information aus der Probe zerstört wird.

An dieser Stelle muss aber einschränkend erwähnt werden, dass mit einem Materialabtrag von 15-25 μm pro Schnitt und einer minimalen Tiefenauflösung von 5-10 μm diese Art der Freilegung tieferer Schichten um Größenordnungen von den unteren Grenzen des Abtrages durch Ionenbeschuss entfernt ist.

Des Weiteren ist das erneute Anfahren der gleichen Probenstelle nach einem Schnitt nicht exakt, so dass von Bild zu Bild ein lateraler Versatz entstehen kann. Bei Proben,

die im optischen Bild der Probenbeobachtungskameras nicht derart charakteristisch wie die dargestellte sind, oder bei Analysen auf deutlich kleineren Flächen kann somit ein direktes Anfahren der gleichen Probenstelle erschwert werden. Hierfür ist zukünftig eine Methode zu entwickeln, die ein präziseres Wiederanfahren der gleichen Probenstelle ermöglicht. Dies könnte zum Beispiel mittels eines eindeutig auffindbaren Markers auf der Probe oder dem Probenhalter realisiert werden, von dem aus die zu analysierende Stelle auf der Probenoberfläche relativ angefahren werden kann.

Trotz dieser Einschränkung konnte hier erfolgreich gezeigt werden, dass Verteilungsanalysen auch molekularer Bestandteile im Volumen von größeren organischen Proben durch die aufgebaute Apparatur möglich sind.

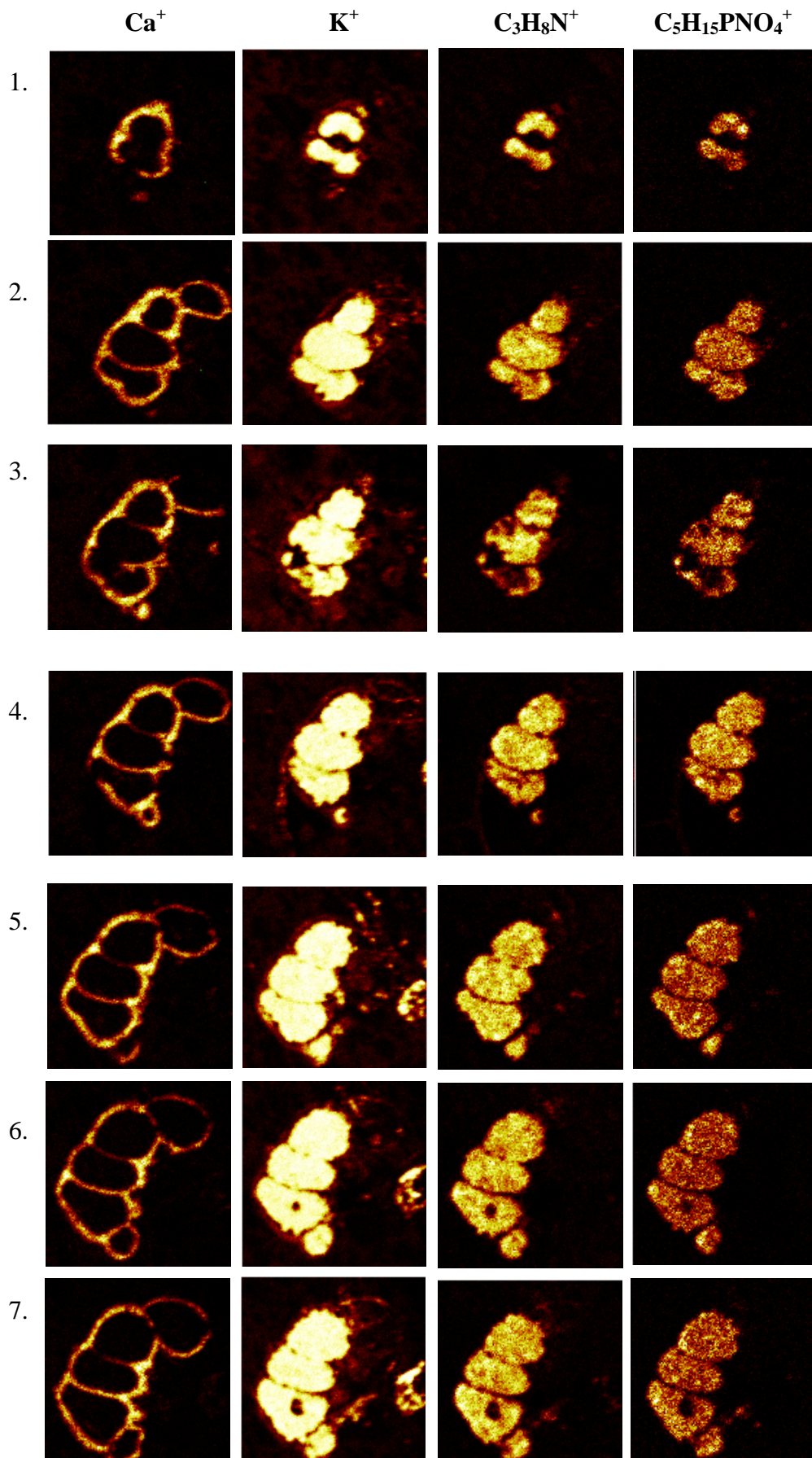


Abbildung 36: Sekundärionenverteilungsbilder einer 3D-Analyse von einer Foraminifere. Dargestellt sind die Schnittebenen von 1 bis 7; die analysierte Fläche beträgt $400 \times 400 \mu\text{m}^2$.

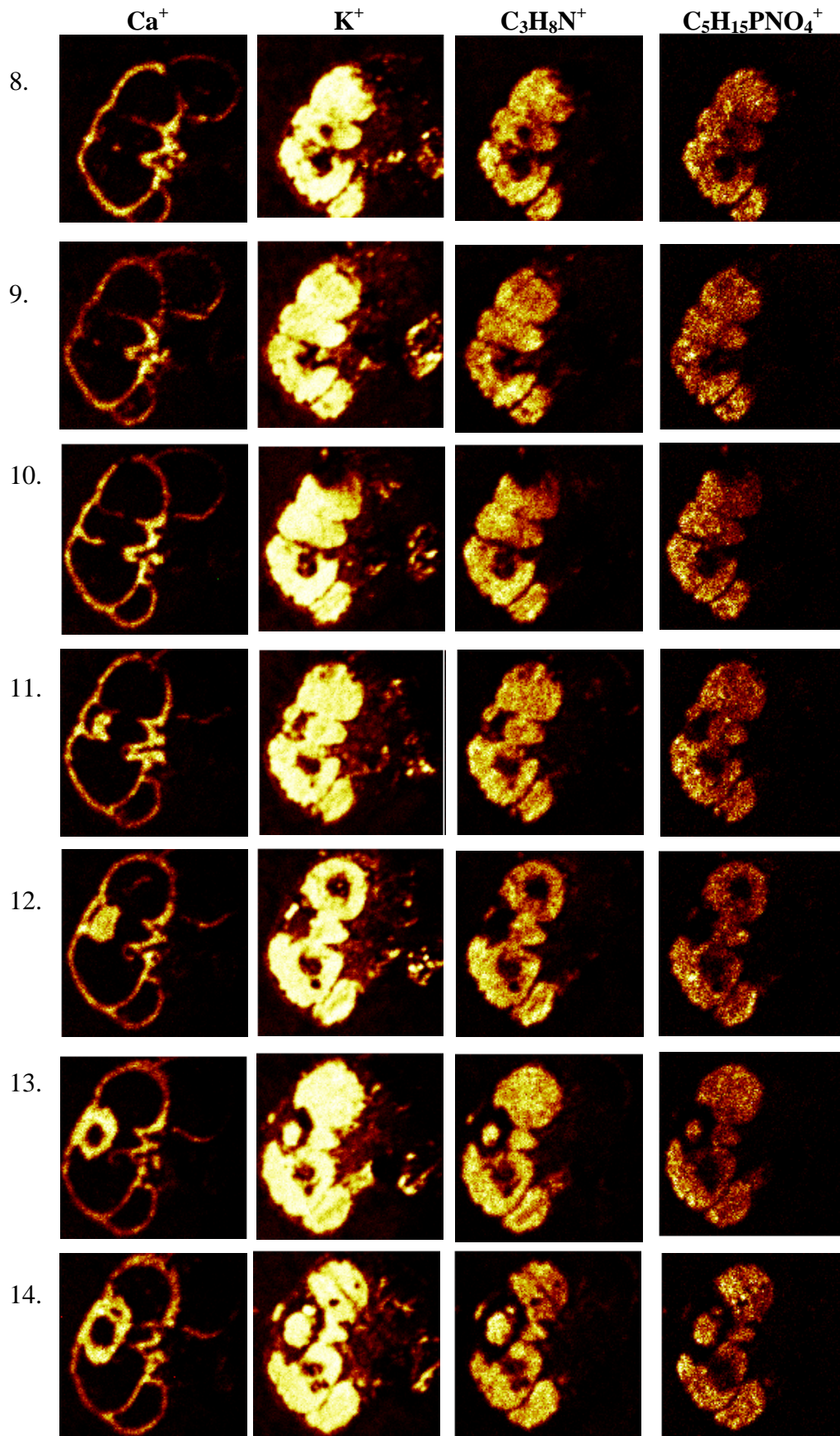


Abbildung 37: Sekundärionenverteilungsbilder einer 3D-Analyse von einer Foraminifere. Dargestellt sind die Schnittebenen von 8 bis 14; die analysierte Fläche beträgt $400 \times 400 \mu\text{m}^2$.

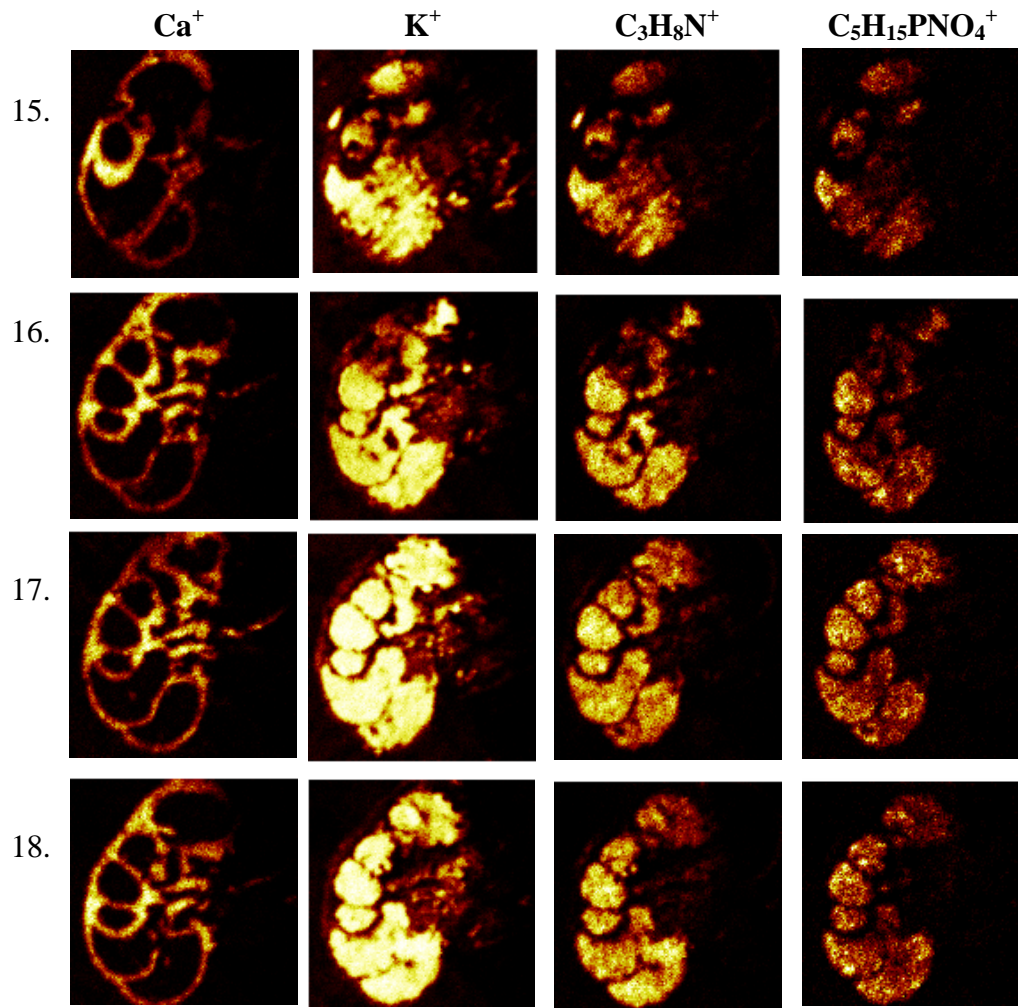


Abbildung 38: Sekundärionenverteilungsbilder einer 3D-Analyse von einer Foraminifere. Dargestellt sind die Schnittebenen von 15 bis 18; die analysierte Fläche beträgt $400 \times 400 \mu\text{m}^2$:

6 Zusammenfassung und Ausblick

Während die ToF-SIMS in vielen Bereichen etabliert und erfolgreich eingesetzt wird, wurde sie bisher in den Bereichen der Zell- und Gewebeanalysen nur relativ selten genutzt. Dies liegt letzten Endes daran, dass es für eine ToF-SIMS-Analyse unerlässlich ist, die zu analysierenden Proben in ein Vakuumsystem einzubringen. Hier führt der hohe Wasseranteil biologischer Proben zu erheblichen Problemen, solange keine Präparationsmethode genutzt wird, die eine ausreichende Vakuumtauglichkeit herstellt. Dabei darf jedoch die strukturelle und chemische Integrität der vormals lebenden Zellen nicht zerstört werden.

Mit dem Verfahren der Kryofixierung kann prinzipiell durch das schnelle Einfrieren eine Fixierung des lebenden Zustands erreicht werden. Doch für eine ToF-SIMS-Analyse ist zusätzlich, sollen keine weiteren Präparationsschritte zur Herstellung der Vakuumtauglichkeit erfolgen, eine durchgängige Kühlkette zu gewährleisten, um die Probe selbst unter Hochvakuumbedingungen im gefrorenen Zustand zu halten. Als weitere Randbedingung für eine erfolgreiche ToF-SIMS-Analyse müssen aufgrund der Oberflächenempfindlichkeit der SIMS noch die in der Probe interessierenden Analysestellen zugänglich gemacht werden. Hier stehen zwar mit den Methoden des Kryoschnitts beziehungsweise Kryobruchs prinzipiell etablierte Verfahren zur Verfügung, doch verursacht die Adsorption von Wasser auf den freigelegten kalten Probenoberflächen, insbesondere während des Transfers in das Vakuumsystem hinein, erhebliche Probleme, sofern die Wasseradsorption auf den zu analysierenden Probenoberflächen nicht dadurch minimiert wird, dass die endgültige Analyseoberfläche im Vakuum generiert wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher eine Analyseapparatur aufzubauen, die es ermöglicht, an kryofixierten Proben eine abschließende Kryoschnitt- beziehungsweise Kryobruchpräparation unter Vakuumbedingungen vorzunehmen und direkt im Anschluss daran eine ToF-SIMS-Analyse durchführen zu können. Dabei waren bei der Konstruktion als zusätzliche Forderungen zu berücksichtigen, dass die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten bei ToF-SIMS-Analysen ungekühlter Probensysteme nicht zu sehr eingeschränkt und die nachträgliche Integration von Lasersystemen für die Laser-SNMS nicht unmöglich gemacht werden durften.

Hierfür wurden bei der neu aufgebauten Apparatur, im Vergleich zu bestehenden, eine Reihe von Komponenten modifiziert beziehungsweise neu integriert. Dies betraf zum Beispiel das Vakuumpumpensystem der ToF-SIMS-Analysekammer, bei dem zusätzlich zu den gasfördernden Turbomolekularpumpen eine Reihe von Kaltschilden sowie eine Titan-Sublimationspumpe integriert wurden. Diese sollen für eine effektivere Entfernung insbesondere von Wasser aus dem Restgas des Vakuumsystems sorgen. Als wesentlichste Änderung gegenüber anderen ToF-SIMS-Instrumenten wurde eine kühl- und temperaturregelbare Probenhalteraufnahme auf den Probenmanipulator angepasst. Diese ermöglicht, ohne dabei die Möglichkeiten bei nicht zu kühlenden Proben einzuschränken, das Aufbringen eines, an die Spezifikationen einer Analyse kryofixierter und -präparierter biologischer Probensysteme angepassten Probenhalters.

Das Kernstück der apparativen Anpassungen besteht in der Integration einer Hochvakuum-Kryoschnitt- beziehungsweise Kryobruchvorrichtung direkt an die Analysekammer der ToF-SIMS-Apparatur. Diese ermöglicht bei gekühlten Proben diejenige Ebene freizulegen, die für die Analyse von Interesse ist, ohne dass diese frisch präparierte Oberfläche das Vakuumsystem bis zum Ende der Analyse noch einmal verlassen muss. Damit sollten die bisher auftretenden Probleme mit der Adsorption von Wasser auf den Proben, welches insbesondere während des Einschleusprozesses aufgebracht wurde, ausgeschlossen oder zumindest minimiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die hier skizzierten Änderungen beziehungsweise Ergänzungen, die an sie gestellten Spezifikationen erfüllten. Die Probentemperatur kann bei ausreichend tiefen Temperaturen gehalten und kontrolliert werden. Der Restgasdruck oberhalb der Probe in der Analyseposition, insbesondere der Anteil von Wasser, lässt sich effektiv reduzieren. Die gekühlten Proben sind unkompliziert in das Vakuumsystem einzuschleusen und ein Transfer zwischen der Schnittposition und der Analyseposition ist schnell durchzuführen.

Allerdings zeigte sich bei ersten ToF-SIMS-Analysen an kalt geschnittenen eishaltigen Testproben, dass es trotz der unter Vakuumbedingungen vorgenommenen Schnittpräparation zur Adsorption von Wasser auf die Probenoberfläche kommen kann, die teils zu derart ausgeprägten Adsorbatschichten führten, dass eine SIMS-Analyse an der eigentlichen Probe unmöglich gemacht wurde. Zur genaueren Klärung der Ursachen für diese Adsorptionen wurden Experimente mit einem künstlich hergestellten Zweikomponentensystem durchgeführt. Dieses bestand aus einem mit einer KCl-Lösung gefüllten PVC-Schlauch. Dabei war der Wasseranteil dieser Lösung mit verschiedenen Isotopen angereichert. Die Experimente zeigten, dass die Hauptursache für die Adsorbatschichten in dem durch die Schnittpräparation kurzfristig ausgelösten erheblichen Anstieg des Partialdruckes von Wasser direkt über der Probenoberfläche, dem so genannten Outburst, zu finden ist. Eine zusätzliche Adsorption aus dem im

Restgas des Vakuumsystems vorhandenen Wasser findet ebenfalls statt, liegt aber auf einem deutlich niedrigeren Niveau.

Durch weitere Experimente gelang es ein empirisches Präparationsprotokoll und -verfahren zu entwickeln, mit dem mittels einer Erhöhung der Probenoberfläche diese Adsorbatschicht von der Probenoberfläche entfernt werden kann, ohne dass es dabei zu einer intensiven Gefriertrocknung an der ursprünglichen Probenoberfläche kommt. Es zeigte sich, dass im Bereich von -115 °C bis -110 °C für die Probenoberfläche ein kleines Intervall zur Verfügung steht, in dem die Adsorbatschicht, welche aufgrund ihrer Entstehung nur aus reinem Wasser besteht und nur schwach an die Oberfläche gebunden ist, bereits intensiv sublimiert, das probeneigene Wasser, in welchem üblicherweise eine Vielzahl von Substanzen gelöst ist, hingegen noch nicht. In diesem Temperaturintervall können somit in angemessenen Zeiträumen, die bei der Schnittpräparation und anschließendem Probentransfer in die Analysechamber entstehenden Wasseradsorbatschichten entfernt werden.

Auch wenn eine erneute Absenkung der Probenoberfläche nach dem Entfernen etwaiger Adsorbatschichten wieder möglich ist, um unerwünschte Veränderungen der Probe zu vermeiden, ist dies insbesondere bei längeren Analysezeiten nur bedingt zu empfehlen. Auch aus dem Restgas des Ultrahochvakuumsystems kann es zu einer Adsorption von Wasser auf die Probenoberfläche kommen. Zwar ist diese in der Regel deutlich geringer als die Adsorption durch den Outburst, da aber in dem oben angegebenen Temperaturintervall keine intensive Gefriertrocknung beobachtet wurde, kann eine Beibehaltung der leicht erhöhten Temperatur trotz alledem eher Vor- als Nachteile bringen.

Generell bleibt aber festzuhalten, dass es sich hierbei grundsätzlich nur um einen Kompromiss handeln kann, der sinnvolle SIMS-Analysen ermöglicht. Ein statischer Oberflächenzustand ist auf diese Weise nicht zu realisieren, was aber ein generelles Problem für extrem oberflächenempfindliche Verfahren darstellt.

Anhand ausgewählter Beispiele konnte schließlich das Potenzial der neuen Apparatur und der Standardarbeitsanweisung aufgezeigt werden. Eine Analyse einer Zellkultur aus Einzelzellen in Suspension ist erfolgreich durchgeführt worden, wobei die Präparation der Probe, steht erst einmal das Instrumentarium zur Verfügung, leicht durchzuführen war. Auch deutlich komplexere Probensysteme konnten analysiert werden.

Im Beispiel zur Untersuchung der Reaktion einer Biofilmmkultur des Hefepilzes *Candida Albicans* auf die Anwendung eines Antiseptikums wurde ein Verfahren gefordert, mit dem es möglich ist, das Eindringverhalten dieses Antiseptikums in einen Biofilm zu analysieren. Darüber hinaus sollte auch die Reaktion der einzelnen im Biofilm

enthaltenen Zellen analysierbar bleiben, um zu beurteilen inwieweit das Antiseptikum bereits verstoffwechselt wurde und ob es bereits zelltötende Wirkung zeigte.

Mit den dargestellten SIMS-Analysen, die alle mit der in dieser Arbeit beschriebenen Apparatur und der Standardarbeitsanweisung durchgeführt wurden, konnten die beschriebenen Analyseziele erstmalig erreicht werden. So war sowohl der Aufbau des Biofilms als auch das Antiseptikum detektierbar. Damit steht ein Verfahren zur Verfügung, mit dem sich das Eindringverhalten des Chlorhexidins in den Biofilm untersuchen lässt. Darüber hinaus konnten anhand von Massenspektren, die aus Bereichen rekonstruiert wurden, welche mit Hilfe der MAF ausgewählt wurden, sogar Veränderungen einzelner Zellen, die durch die Behandlung mit dem Antiseptikum hervorgerufen wurden, aufgezeigt werden.

Mit dem zweiten Beispiel, der Gewebeuntersuchung an einem Pflanzenblatt, ist langfristig das Ziel verknüpft die Akkumulation und laterale Verteilung von Nickel innerhalb von pflanzlichem Gewebe zu analysieren. Dabei liegt besonderes Augenmerk auf der Identifizierung der an der Nickelakkumulation beteiligten Zelltypen, wozu sowohl eine Unterscheidung verschiedener Zelltypen wie auch von intra- und extrazellulären Bereichen notwendig ist. Zusätzlich ist die Analyse der an der Hyperakkumulation beteiligten Biomoleküle von großem Interesse.

Mit den durchgeführten SIMS-Analysen konnte erfolgreich gezeigt werden, dass mit der neuen Apparatur diese Forderungen erfüllt werden können. In dem Gewebe konnten verschiedene Zellbereiche beziehungsweise Zelltypen identifiziert werden und Unterschiede in der elementaren beziehungsweise molekularen Verteilung waren bis in subzelluläre Regionen hinein bestimmbar. Es konnten Zellen beziehungsweise Zelltypen detektiert werden, in denen sich das Nickel anreichert. Darüber hinaus konnten Unterschiede in den Verteilungen von Molekülen, die an der Nickelakkumulation beteiligt sind, aufgezeigt werden.

Das letzte Beispiel demonstriert welches Potenzial die Apparatur bietet, wenn das Analyseziel erfordert, nicht nur die laterale Verteilung der Elemente und Moleküle, sondern auch die dreidimensionale Verteilung in einer ausgedehnten Probe zu analysieren. Dies gilt insbesondere dann, wenn das Augenmerk auf dem Erhalt der molekularen Information auch in den tieferen Schichten liegt. Dieses kann durch den in der SIMS üblichen Abtrag durch Ionenbeschuss in der Regel nicht erreicht werden.

Anhand einer 3D-Analyse an einer Foraminifere konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die wiederholte Freilegung neuer zu analysierender Oberflächen an einer einzelnen Probe, aufgrund der direkten Installation der Schnittapparatur an die Analysekammer und der sich daraus ergebenden kurzen Transferwege und Transferzeiten, erfolgreich

durchgeführt werden kann. Prinzipbedingt hatte diese Art der Freilegung keinen Einfluss auf die molekulare Information einer SIMS-Analyse dieser Oberflächen. Eine Optimierung der Reproduzierbarkeit der einzelnen Schnittdicken und der Position der Probe unter dem Analyseprimärionenstrahl ist aber für die Anwendung bei Proben mit kleineren Abmessungen noch durchzuführen.

Neben den in dieser Arbeit dargestellten Beispielen konnten mit der Apparatur und dem Protokoll auch Proben erfolgreich analysiert werden, bei der eine Probenkühlung von vorne herein zwar nicht notwendig ist, die Fassung in einem Wassertropfen aber eine einfachere Handhabung ermöglicht. Auf diese Weise konnten zum Beispiel Querschnitte von Haaren oder pharmazeutischen Tabletten, bei denen ein festes für die Querschnittpräparation geeignetes Aufbringen auf den Probenhalter ohne eine Fassung schwierig ist [82], mit dem hier vorgestellten Instrumentarium analysiert werden.

Anhand dieser Beispiele zeigt sich die große Bandbreite möglicher Anwendungen der im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten Kombination aus einer für die Analyse gekühlter Proben optimierten SIMS-Aparatur und einem integrierten Hochvakuum-Schnittinstrument. Mit der mittlerweile vollzogenen, in dieser Arbeit aber nicht präsentierten Integration von zwei Lasersystemen für die nichtresonante Multiphotonenionisierung und für die Einphotonenionisierung, wurden die Analysemöglichkeiten noch einmal deutlich erweitert. Damit steht ein einzigartiges, leistungsstarkes Analyseinstrument zur Verfügung, dessen Einsatzspektrum auch über Fragestellungen an biologische Probensysteme weit hinausgeht und dessen zukünftiger Einsatz die Hoffnung nährt, bisher nicht bearbeitbare Fragestellungen beantworten zu können.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des Aufbaus einer tierischen Zelle mit Angaben zu den Volumenanteilen der jeweiligen Organellen beziehungsweise Bestandteile	14
Abbildung 2:	Darstellung der chemischen Zusammensetzung einer tierischen Zelle.....	14
Abbildung 3:	Schematische Darstellung möglicher Präparationsschritte für die Präparation biologischer Proben für die massenspektrometrische Analyse. Gelb hinterlegt ist der Weg, der mit der in dieser Arbeit beschriebenen Apparatur ermöglicht werden soll.	28
Abbildung 4:	Dampfdruck- beziehungsweise Sublimationskurve von Wasser.....	29
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der Schnittpaparatur sowie deren Position an der Analysekkammer	40
Abbildung 6:	Foto der Schnittpaparatur im eingebauten Zustand. Markiert sind die gleichen Komponenten der Apparatur wie in Abbildung 5, sofern sie sichtbar sind.....	40
Abbildung 7:	Schleusen- und Transportbox in Probenübergabewerkzeug. Im linken Bild von der Seite, im rechten von oben abgebildet.	41
Abbildung 8:	Foto der Probenhalteraufnahme in der Schnittposition, aufgenommen aus Richtung der Andockstelle für die Schleusen- und Transportbox. Die Bewegungsrichtung des Messeres ist durch den weißen Pfeil angedeutet.....	42
Abbildung 9:	Verschiedene an unterschiedliche Probensysteme angepasste Probenhalteraufbauten.....	44
Abbildung 10:	Kühlbare Probenhalteraufnahme als Einzelteil mit aufgestecktem Kühlblock	46
Abbildung 11:	Zeitliche Verläufe der Temperatur auf der Probenhalteraufnahme und in einem Eistropfen auf dem Probenhalter, nach Einstellen der Zieltemperatur von -120 °C, -110 °C beziehungsweise -80 °C	48
Abbildung 12:	Zeitlicher Intensitätsverlauf ausgewählter unmittelbarer über der Probenoberfläche nachionisierter Restgasteilchen nach Beginn der Befüllung der Kaltschildreservoir mit flüssigem Stickstoff.....	50
Abbildung 13:	Ausgewählte Verteilungsbilder positiver Sekundärionen, nach einer Schnittpreparation eines mit wässriger KCl-Lösung gefüllten PVC-Schlauches, aufgenommen bei einer Proben temperatur von -130 °C.....	53
Abbildung 14:	Ausschnitt aus einem SIMS-Spektrum positiver Sekundärionen, aufgenommen auf dem Schlauchbereich einer Probe, die mit einer Lösung aus H ₂ ¹⁸ O und KCl gefüllt war.	55
Abbildung 15:	Ausschnitt aus einem SIMS-Spektrum positiver Sekundärionen, aufgenommen auf dem Schlauchbereich einer Probe, die mit einer Lösung aus D ₂ O und KCl gefüllt war.....	55
Abbildung 16:	Verlauf der Signalintensitäten ausgewählter Sekundärionen während einer Proben temperaturerhöhung von -130 °C auf -105 °C, ermittelt auf dem Schlauchbereich des Testsystems.....	57
Abbildung 17:	Verlauf der Signalintensitäten ausgewählter Sekundärionen während einer Proben temperaturerhöhung von -130 °C auf -105 °C, ermittelt auf dem wässrigen Teil des Testsystems	58
Abbildung 18:	Verlauf der Signalintensitäten ausgewählter Sekundärionen während einer Proben temperaturerhöhung von -130 °C auf -100 °C, ermittelt auf dem wässrigen Bereich des Testsystems mit H ₂ ¹⁸ O	60
Abbildung 19:	Verlauf der Signalintensitäten ausgewählter Sekundärionen während einer Absenkung der Proben temperatur von -105 °C auf -125 °C, ermittelt auf dem wässrigen Bereich des Testsystems mit H ₂ ¹⁸ O (die Intensität des Kaliums ist um den Faktor 1000 herunterskaliert)	61

Abbildung 20:	Sekundärionenverteilungsbilder ausgewählter Elemente und Moleküle, ermittelt auf einer kryofixierten und kryogeschrittenen Zellkultur in Suspension; die analysierte Fläche beträgt $80 \times 80 \mu\text{m}^2$ und die Proben temperatur während der Analyse $-110 \text{ }^\circ\text{C}$	65
Abbildung 21:	Sekundärionenverteilungsbilder ausgewählter organischen Molekülfragmenten zugeordneter Massenintervalle; die analysierte Fläche beträgt $80 \times 80 \mu\text{m}^2$	66
Abbildung 22:	Mikroskopbild einer Kultur von <i>Candida Albicans</i>	69
Abbildung 23:	Struktur- und Summenformel des Chlorhexidins	70
Abbildung 24:	Auszug aus dem Spektrum positiver Sekundärionen, ermittelt auf einer Chlorhexidinprobe	71
Abbildung 25:	Probenbeobachtungskamerabild (links) und Probenmikroskopbild (rechts) des im Schlauch kultivierten Biofilms	72
Abbildung 26:	Bilder einer Lateralverteilungsanalyse ausgewählter positiver Sekundärionen, ermittelt an einem Biofilm, der in einem Schlauch kultiviert wurde. In den Bildern ist jeweils links oben der Bereich des Schlauchmaterials, rechts unterhalb davon der Biofilm und rechts unten das Lumen des Schlauches zu erkennen. Im zweiten Bild des Chlorhexidins sind die Linien, anhand derer ein Intensitätsprofil ermittelt wurde, in Rot, die Schlauchoberfläche in Blau angedeutet; die analysierte Fläche beträgt $400 \times 400 \mu\text{m}^2$	73
Abbildung 27:	Intensitätsverlauf der Chlorhexidinsignale in Abhängigkeit von der Entfernung zur Oberfläche der Schlauchinnenseite	74
Abbildung 28:	Bilder einer Lateralverteilungsanalyse ausgewählter positiver Sekundärionen, ermittelt an einem Biofilm, der in einem Schlauch kultiviert wurde. In den Bildern ist jeweils rechts oben der Bereich des Schlauchmaterials, links unterhalb davon der Biofilm und links unten das Lumen des Schlauches zu erkennen; die analysierte Fläche beträgt $190 \times 190 \mu\text{m}^2$	75
Abbildung 29:	Überlagerungsbild erstellt aus drei MAF-Bildern	76
Abbildung 30:	Auszüge aus den Spektren, die in verschiedenen Regionen der Biofilmkultur ermittelt wurden. Analog zu der Farbwahl im MAF-Bild sind die Spektren von den Flächen, die im MAF-Bild rot dargestellt sind, in Rot dargestellt, die Spektren, die auf den grünen Punkten im MAF-Bild ermittelt wurden, sind in Grün dargestellt.	78
Abbildung 31:	Nickelhyperakkumulator <i>Alyssum Lesbiacum</i> . Links ist ein Foto einer in Hydrokultur gezogenen Pflanze dargestellt, rechts ein Rasterelektronenbild der Oberfläche eines Blattes einer solchen Pflanze	80
Abbildung 32:	Bilder einer Lateralverteilungsanalyse ausgewählter positiver Sekundärionen eines Blattquerschnitts der nickelfreien Probe; die analysierte Fläche beträgt $150 \times 150 \mu\text{m}^2$	83
Abbildung 33:	Bilder einer Lateralverteilungsanalyse ausgewählter positiver Sekundärionen eines Blattquerschnitts der nickelhaltigen Probe; die analysierte Fläche beträgt $125 \times 125 \mu\text{m}^2$	86
Abbildung 34:	Bilder einer Lateralverteilungsanalyse positiver Nickel enthaltender oder mit der Nickelakkumulation korrelierter Sekundärionen eines Blattquerschnitts; die analysierte Fläche beträgt $150 \times 150 \mu\text{m}^2$	87
Abbildung 35:	Rasterelektronenbild der Kalzitschale einer Foraminifere des Typs <i>Ammonia Tepida</i>	90
Abbildung 36:	Sekundärionenverteilungsbilder einer 3D-Analyse von einer Foraminifere. Dargestellt sind die Schnittebenen von 1 bis 7; die analysierte Fläche beträgt $400 \times 400 \mu\text{m}^2$	93
Abbildung 37:	Sekundärionenverteilungsbilder einer 3D-Analyse von einer Foraminifere. Dargestellt sind die Schnittebenen von 8 bis 14; die analysierte Fläche beträgt $400 \times 400 \mu\text{m}^2$	94
Abbildung 38:	Sekundärionenverteilungsbilder einer 3D-Analyse von einer Foraminifere. Dargestellt sind die Schnittebenen von 15 bis 18; die analysierte Fläche beträgt $400 \times 400 \mu\text{m}^2$	95

Tabellen:

Tabelle 1:	Kenndaten einiger gängiger Kryogene	22
Tabelle 2:	Ausgewählte Kenn- und Leistungsdaten der verwendeten Primärionenquellen	36
Tabelle 3:	Übersicht über typische Molekülfragmente aus biologischen Proben	63

8 Literaturverzeichnis

- 1 **H.F. Arlinghaus, M. Fartmann, C. Kriegeskotte, S. Dambach, A. Wittig, W. Sauerwein, D. Lipinsky**
Subcellular imaging of cell cultures and tissue for boron localization with laser-SNMS
Surface and Interface Analysis **36**, 8 (2004), S. 698ff
2. **S. Dambach, M. Fartmann, C. Kriegeskotte, C. Brüning, S. Hellweg, H.P. Wiesmann, D. Lipinsky, H.F. Arlinghaus**
ToF-SIMS and laser-SNMS analysis of apatite formation in extracellular protein matrix of osteoblasts in vitro
Surface and Interface Analysis **36**, 8 (2004), S. 711ff
- 3 **P. Sigmund**
Theory of Sputtering. I. Sputtering Yield of Amorphous and Polycrystalline Targets
Physical Review **184** (1969), S. 383ff
- 4 **P. Sigmund**
Sputtering by ion bombardment: Theoretical concepts
Sputtering by Particle Bombardment I (Editor: H. Behrisch); Topics in Applied Physics **47**, Springer Verlag, Berlin (1981), S. 9ff
- 5 **M.W. Thompson**
The Energy Spectrum of ejected Atoms during the High Energy Sputtering of Gold
Philosophical Magazine **18** (1968), S. 377ff
- 6 **H.H. Andersen**
The depth Resolution of Sputter Profiling
Applied Physics **18** (1979), S. 131ff
- 7 **R. Hoogerbrugge, P.G. Kistemaker**
Analytical expressions for the internal and kinetic energy distributions of sputtered clusters and molecules.
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B: **21**, 1 (1987), S. 37ff
- 8 **E. Dennis, R.J. MacDonald**
The energy spectra of sputtered ions
Radiation effects **13** (1972), S. 243ff

-
- 9 **N. Winograd, B.J. Garrison, D.E. Harrison:**
Angular distributions of ejected particles from ion-bombarded clean and reacted single-crystal surfaces
Physical Review letters **41** (1978) 16, 1120ff
 - 10 **G. Falcone, P.Sigmund**
Depth origin of Sputtered Atoms
Applied Physics **25** (1981) 307f
 - 11 B. Garrison, N. Winograd
Ion Beam Spectroscopy of Solids and Surfaces
Science **216** (1982), S. 805ff
 - 12 **G. Slodzian**
Some problems encountered in secondary ion emission applied to elementary analysis
Surface Science **48**, 1 (1975), S. 161ff
 - 13 **P. Williams**
Sputtered ion ejection from ionic materials
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics **53** (1983), S. 101ff
 - 14 **P. Williams**
The sputtering process and sputtered ion emission
Surface Science **90**, 2 (1981), S. 588ff
 - 15 **A. Benninghoven**
Some aspects of secondary ion mass spectrometry of organic compounds
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics **53** (1983), S. 85ff
 - 16 **R.G. Cooks, K.L. Bush**
Matrix effects, internal energies and MS/MS spectra of molecular ions sputtered from surfaces
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics **53** (1983), S. 111ff
 - 17 **B.V. King, A.R. Ziv, S.H. Lin, I.S.T Tsong**
Interpretation of the mass distribution of ejected (CsI)_nCs⁺ ion clusters by the non-cascade sputtering model
Surface Science **167**, 1 (1985), S. 18ff
 - 18 **A. Benninghoven, F.G. Rüdener, H.W. Werner**
Secondary Ion Mass Spectrometry
JohnWiley & Sons, New York (1987)
 - 19 **D. Lipinsky, R. Jede, O. Ganschow, A. Benninghoven**
Performance of a new ion optics for quasisimultaneous ion, secondary neutral, and residual gas mass spectrometry
Journal of Vacuum Science Technology A **3**, 5 (1985), S. 2007ff

-
- 20 **H. Oechsner**
Sputtered Neutral Mass Spectrometry (SNMS) as a tool for Chemical Surface Analysis and Depth Profiling
Applied Physics **14**, 1 (1977), S. 43ff
- 21 **C.H. Becker, K.T. Gillen**
Surface Analysis by nonresonant multiphoton ionization of desorbed or sputtered species
Analytical Chemistry **56**, 9 (1984), S. 1671ff
- 22 **W. Paul**
Elektromechanische Käfige für geladene und neutrale Teilchen
Physikalische Blätter **46** (1990), S. 227ff
- 23 **C. Brunée, H. Voshage**
Massenspektrometrie
Karl Thieme Verlag, München (1964)
- 24 **H. Düsterhöft, M. Riedel, B.-K. Düsterhöft**
Einführung in die Sekundärionenmassenspektrometrie –SIMS–
Teubner Taschenbücher, B.G. Teubner Stuttgart, Leipzig (1999)
- 25 **A. Benninghoven**
Moderne Verfahren der Oberflächenanalyse
DECHEMA-Monographie **78**, Weinheim, Vlg. Chemie (1975)
- 26 **K. Iltgen, C. Bendel, A. Benninghoven, E. Niehuis**
Optimized time-of-flight secondary ion mass spectroscopy depth profiling with a dual beam technique.
Journal of Vacuum Science and Technology A **15**, 3 (1997), S. 460ff
- 27 **C. Brüning**
Anwendung der Hauptkomponentenanalyse zur Auswertung massenspektrometrischer Untersuchungen an Proteinproben
Diplomarbeit im Fach Physik, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (2004)
- 28 **B.J. Tyler**
Multivariate statistical image processing for molecular specific imaging in organic and bio-systems
Applied Surface Science **252**, 19 (2006), S. 6875ff
- 29 **D.G. Castner, B.J. Tyler, G. Rayal**
Multivariate analysis strategies for processing ToF-SIMS images of biomaterials
Biomaterials **28**, 15 (2007), S.2412ff.
- 30 **E.R. Alinowski, D.G. Howery**
Factor Analysis in Chemistry
Robert E. Krieger Publishing Company Malaba, Florida (1989)

-
- 31 **J. Koolman, K.-H. Röhm**
Taschenatlas der Biochemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2003), S. 199
- 32 **J. Koolman, K.-H. Röhm**
Taschenatlas der Biochemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2003), S. 203
- 33 **P. Echlin**
Low-Temperature Microscopy and Analysis
Plenum Press, New York (1992)
- 34 **G.P. Johari, A. Hallbrucker, E. Mayer**
The glass-liquid transition of hyperquenched water
Nature **330** (1987), S. 552ff
- 35 **J.L.A.N. Murk, G. Posthuma, A.J. Koster, H.J. Geuze, A.J. Verkleij, M.J. Kleijmer, B.M. Humbel**
Influence of aldehyde fixation on morphology of endosomes and lysosomes: quantitative analysis and electron tomography
Journal of Microscopy **212**, 1 (2003), S. 81ff
- 36 **B.P.M. Menco**
A survey of ultra-rapid cryofixation methods with particular emphasis on applications to freeze-fracturing, freeze-etching, and freeze-substitution
Journal of electron microscopy technique **4** (1986), S. 177ff
- 37 **H. Sitte, L. Edelmann, K. Neumann**
Cryofixation without pretreatment at ambient pressure
Cryotechniques in Biological Electron Microscopy (Editoren R.A. Steinbrecht, K. Zierold), Springer-Verlag, Berlin, S. 88ff
- 38 **P. Echlin**
Low-Temperature Microscopy and Analysis
Plenum Press, New York (1992) S. 71
- 39 **A. van Harreveld, J. Crowell**
Electron microscopy after rapid freezing on a metal surface and substitution fixation
The Anatomical Record **149**, 3 (1964), S. 381ff
- 40 **T.E. Phillips, A.F. Boyne**
Liquid nitrogen-based quick freezing: Experiences with bounce-free delivery of cholinergic nerve terminals to a metal surface
Journal of Electron Microscopy Technique **1**, 1 (1984), S. 9ff

-
- 41 **P.M. Bennett**
Structural changes in samples cryofixed by contact with a cold metal block
Journal of Microscopy **192**, 3 (1998) S. 259ff
- 42 **H. Moore**
Theory and Practice of high pressure freezing
Cryotechniques in Biological Electron Microscopy (ed. Bei R.A. Steinbrecht und K. Zierold), Springer Verlag Berlin, S. 175ff
- 43 **E. Shimoni, M. Müller**
On optimizing high-pressure freezing: from heat transfer theory to a new microbiopsy device
Journal of Microscopy **192**, 3 (1998), S. 236ff
- 44 **P. Walther**
Recent progress in freeze-fracturing of high-pressure frozen samples
Journal of Microscopy **212**, 1 (2003), S. 34ff
- 45 **S. Chandra, W.A. Ausserer, G.H. Morrison**
Evaluation of matrix effects in ion microscopic analysis of freeze-fractured, freeze dried cultured cells
Journal of microscopy **148**, 3 (1987) S. 223ff
- 46 **H. Plattner, J. Hentschel**
Taschenbuch Zellbiologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1997), S. 133ff
- 47 **P. Walther**
Cryo-Fracturing and Cryo-Planing for In-Lens Cryo-SEM, Using a Newly Designed Diamond Knife
Microscopy and Microanalysis **9** (2003), S. 279ff
- 48 **A. Al-Amoudi, J. Dubochet, H. Gnaegi, W. Lüthi, D. Studer**
An oscillating cryo-knife reduces cutting-induced deformation of vitreous ultrathin sections
Journal of Microscopy **212**, 1 (2003), S. 26ff
- 49 **D.R.. Smith, S. Chandra, R. Barth, W. Yang, D.D.. Joel, J.A. Coderre**
Quantitative Imaging and Microlocalization of Boron-10 in Brain Tumors and Infiltrating Tumor Cells by SIMS Ion Microscopy: Relevance to Neutron Capture Therapy
Cancer Research **61** (2001), S. 8179ff
- 50 **M. Wutz, H. Adam, W. Walcher**
Theorie und Praxis der Vakuumtechnik
Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden (1992) S. 376

-
- 51 **M. Henzler, W. Göpel**
Oberflächenphysik des Festkörpers
B.G. Teubner, Stuttgart (1994), S. 36
- 52 **W. Demtröder**
Experimentalphysik 3 – Atome, Moleküle und Festkörper
Springer-Verlag, Berlin (2005), S. 523
- 53 **C. Kriegeskotte, J. Möller, D. Lipinsky, A. Wittig, W. Sauerwein, J. Haier, H.F. Arlinghaus**
Imaging of atomic and molecular species in tissue with laser-SNMS for pharmaceutical studies
Surface and Interface Analysis **38** (2006), S. 121ff
- 54 **J. Möller**
Aufbau einer Kombinationsapparatur für die Sekundärionen- und die resonante Laser-Sekundärneutralteilchenmassenspektrometrie
Diplomarbeit im Fach Physik, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (2001)
- 55 **E. Niehus**
Entwicklung und Anwendung von Hochauflösenden Flugzeitspektrometern für die statische Sekundärionen-Massenspektrometrie
Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (1988)
- 56 **D. Touboul, F. Kollmer, E. Niehuis, A. Brunelle, O. Lapr evote**
Improvement of biological time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source
American Society for Mass Spectrometry **16** (2005), S. 1608ff
- 57 **A. Brunelle, D. Touboul, O. Lapr evote**
Biological tissue imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cluster ion sources
Journal of Mass Spectrometry **40** (2005), S. 985ff
- 58 **C. Bendel**
Optimierung einer gepulsten Gallium-Flüssigmetallionenquelle für die Mikrobereichsanalyse mit Flugzeit-Massenspektrometrie
Diplomarbeit im Fach Physik, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (1994)
- 59 **T.H. Bergmann**
Entwurf eines Flugzeit-Massenspektrometers und Messungen an Cäsiumclustern
Dissertation, Universität Stuttgart (1988)
- 60 **T.H. Bergmann, T.P Martin, H Schaber**
High Resolution time-of-flight mass spectrometers. Part III reflector design
Review of Scientific Instruments **61** (1990), S. 2592ff

- 61 **N. R. Daly**
Scintillation type mass spectrometer ion detector
The Review of Scientific Instruments **31**, 3 (1960), S 264ff
- 62 **F. Kollmer**
Aufbau und Erprobung eines Flugzeitmassenspektrometers mit gitterlosem Reflekttron
Diplomarbeit im Fach Physik, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (1997)
- 63 **P. Walther, M. Müller**
Biological ultrastructure as revealed by high resolution cryo-SEM of block faces after cryo-sectioning
Journal of Microscopy **196**, 3 (1999), S. 279ff
- 64 **M. Fartmann**
Darstellung subzellulärer Strukturen und quantitative Abbildung borhaltiger Krebsmedikamente in kryopräparierten Zellkulturen und Geweben mittels Laser-SNMS und ToF-SIMS
Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (2004)
- 65 **H. Gross**
Controlled deposition of water vapour on clean membrane fracture faces: decoration and contamination phenomena
Acta histochemica, Proceedings of the International Symposium on freeze-etching, Schloß Kapellendorf, DDR (1979), S. 21ff
- 66 **J. Möller, A. Beumer, D. Lipinsky, H.F. Arlinghaus**
Introduction of a cryosectioning-ToF-SIMS instrument for analysis of non-dehydrated biological samples
Applied Surface Science **252**, 19 (2006), S. 6709ff
- 67 **A. Beumer**
Einfluss der Proben temperatur bei Kryo-ToF-SIMS-Analysen von nicht dehydrierten, im Vakuum präparierten Gewebe und Biofilmen
Diplomarbeit im Fach Physik, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (2005)
- 68 **M. Fartmann, C. Kriegeskotte, S. Dambach, A. Wittig, W. Sauerwein, H.F. Arlinghaus**
Quantitative imaging of atomic and molecular species in cancer cell cultures with TOF-SIMS and Laser-SNMS
Applied Surface Science **231–232** (2004), S. 428ff
- 69 **T. P. Roddy, D. M. Cannon, S.G. Ostrowski, N. Winograd, A. Ewing**
Identification of cellular sections with imaging mass spectrometry following freeze fracture
Analytical Chemistry **74** (2002), S. 4020ff

-
- 70 **N. Xia, C.J. May, S.L. McArthur, D.G. Castner**
Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis of Conformational Changes in Adsorbed Protein Films
Langmuir **18**, 10 (2002), S. 4090ff
- 71 **O.D. Sanni, M.S. Wagner, D. Briggs, D.G. Castner, J.C. Vickerman**
Classification of adsorbed protein static ToF-SIMS spectra by principle component analysis and neural networks
Surface and Interface Analysis **33**, 9 (2002), S. 715ff
- 72 **Newton T. Samuel, M. S. Wagner, K. D. Dornfeld, and David G. Castner**
Analysis of Poly(amino acids) by Static Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS)
Surface Science Spectra **8**, 3 (2001), S. 163ff
- 73 **Internet:** http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:C_albicans_en.jpg [12.02.2008]
- 74 **Internet:** <http://de.wikipedia.org/wiki/Chlorhexidin> [12.02.2008]
- 75 **B.J. Tyler, S. Ranganjan, J. Möller, A. Beumer, H.F. Arlinghaus**
ToF-SIMS imaging of chlorhexidine-digluconate transport in frozen hydrated biofilms of the fungus Candida Albicans
Applied Surface Science **252**, 19 (2006), S. 6712ff
- 76 **K.E. Smart, M.R. Kilburn, C.J. Salter, J.A.C. Smith, C.R.M. Grovenor**
NanoSIMS and EPMA analysis of nickel localisation in leaves of the hyperaccumulator plant Alyssum Lesbiacum
International Journal of Mass Spectrometry **260**, 2-3 (2007), S. 107ff
- 77 **Internet:** http://www.mpg.de/bilderBerichteDokumente/multimedial/mpForschung/2002/heft03/mpf02_3_22_27.pdf [12.02.2008]
- 78 **H. Küpper, E. Lombi, F.-J. Zhao, G. Wieshammer, S. McGrath**
Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators Alyssum lesbiacum, Alyssum bertolonii and Thlapsi goesingense
Journal of Experimental Botany **52**, 365 (2001), S. 2291ff
- 79 **G. Wefer, W.H. Berger, J.Bijma, G. Fischer**
Clues to ocean history: a brief overview of proxies
Use of proxies in paleoceanography: Examples from the South Atlantic (Editor: G. Fischer, G. Wefer) Springer Verlag (1999), S. 1ff
- 80 **D.W. Lea**
Trace elements in foraminiferal calcite
Modern Foraminifera (Editor: B.K.S. Gupta), Kluwer Academic Publishers (1999), S. 259ff

- 81 **Internet:** http://www.ucmp.berkeley.edu/people/klf/KLF_files/Haynesina-depressula.gif [12.02.2008]
- 82 **S.Y. Luk, N. Patel, M.C. Davies**
Chemical Imaging of pharmaceuticals by time-of-flight secondary ion mass spectrometry
Spectroscopy Europe **15**,1 (2003), S. 14ff

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn PROF. DR. H.F. ARLINGHAUS danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit anfertigen zu können, und für die Bereitstellung der umfangreichen finanziellen Mittel, die für die Konstruktion der Apparatur notwendig waren.

Herrn DR. D. LIPINSKY danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während der gesamten Zeit des Promotionsstudiums sowie das gewissenhafte Korrekturlesen der Arbeit.

Besonderer Dank gilt dem gesamten Team der Feinmechanischen Werkstatt unter Leitung von W. DAVID und W. SPIEKERMANN, ohne dessen Mitarbeit und Hilfe die Realisierung dieser Arbeit gänzlich unmöglich gewesen wäre.

Herrn W. MAI und Herrn W. LUDWIG sowie der Elektronik-Werkstatt gilt mein Dank für die Entwicklung, Bereitstellung und, falls notwendig, Reparatur der zahlreichen elektronischen Komponenten.

Den „Kellerkindern“ S. DAMBACH, S. GALLA und C. KRIEGESKOTTE danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herrn H. WENSING gilt mein besonderer Dank für die stete Hilfsbereitschaft bei mechanischen oder Konstruktionsproblemen.

Herrn C. BRÜNING, Frau DR. R. BUDELL, Herrn S. DAMBACH, Herrn S. HELLWEG, Herrn C. KRIEGESKOTTE sowie Frau C. RYLL danke ich für das Korrekturlesen von Teilen der Arbeit.

Herrn C. BRÜNING danke ich für die Erstellung der MAF-Bilder sowie Herrn S. HELLWEG für die funktionierenden Computer.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Arlinghaus gilt mein besonderer Dank für die stets kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Zuletzt möchte ich noch ganz besonders meiner Mutter danken, die mir das Physikstudium überhaupt erst ermöglicht hat und mich jederzeit in vielerlei Hinsicht unterstützt hat.

