

Laser gestützte Analytik

LASER BASED ANALYTICS

Inhaltsverzeichnis

Content

Vorwort	02-07
Preamble	
Einleitung	08-11
General introduction	
1 Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie	12-26
1 Laser-induced fluorescence spectroscopy	
1.1 Einführung	14-17
1.1 Introduction	
1.2 Photolumineszenz	18-21
1.2 Photoluminescence	
1.3 Charakteristika der Fluoreszenzstrahlung	22-26
1.3 Characteristics of fluorescence radiation	
2 Hauptanwendungen der Wechselwirkung	28-55
von Materie mit Laserstrahlung	
2 Main applications of the interaction	
of matter with laser radiation	
2.1 Molekulare Lumineszenzspektroskopie und -analytik	30-35
2.1 Molecular luminescence spectroscopy and analytics	
2.2 MALDI-TOF	36-45
2.2 MALDI-TOF	
2.3 Opto-Akustik LIOAS	44-49
2.3 Opto-acoustics LIOAS	
2.4 LIPS	50-55
2.4 LIBS	

LTB – 15 Jahre innovative Lasertechnik aus Adlershof

Interview

Dr. Matthias Scholz
Geschäftsführer
President

Claudia Scholz
Controlling/Finanzen
Controlling/Finance

Johannes Schurack
stellv. Geschäftsführer/
Leiter F & E, Produktion
Vice president/
Director laser department

Dr. Stephan Mory
wissenschaftliche Sonderprojekte
Senior scientist

Sie sind alle seit Jahrzehnten mit dem Wissenschaftsstandort Adlershof verwurzelt. Warum haben Sie sich 1990 entschlossen, Ihre wissenschaftliche Laufbahn zu beenden und ein eigenes Unternehmen zu gründen?

Dr. Matthias Scholz: Wir waren alle Mitte Vierzig und 20 Jahre am Institut für wissenschaftlichen Gerätebau tätig. Unsere 2. Lebenshälfte schien uns ein idealer Zeitpunkt, um unsere langjährigen Erfahrungen auf dem Gebiet der Lasertechnologie in eigene Ideen umzusetzen. Im Vordergrund der Unternehmensgründung stand ganz klar der Wunsch nach Unabhängigkeit, der materielle Aspekt war dabei eher zweitrangig.

Eine der größten Hürden bei der Gründung eines eigenen Unternehmens ist die Finanzierung. Wie haben Sie den Start der LTB Lasertechnik Berlin GmbH finanziert?

Claudia Scholz: Da die LTB Lasertechnik Berlin GmbH noch nach DDR-Recht gegründet wurde, musste jeder Partner 12.500 Ostmark in das Unternehmen einbringen, was in der damaligen Zeit sehr viel Geld war. 3 Monate später wurde unser Stammkapital im Zuge der Währungsunion 2 zu 1 abgewertet: Aus 50.000 Ostmark wurden über Nacht 25.000 Westmark. Nach bundesdeutschem GmbH-Recht fehlten also 25.000 DM Startkapital, die von den 4 Gründern und ihren Familien unter großen Kraftanstrengungen zusätzlich aufgebracht werden mussten.

Hinter jeder Unternehmensgründung steckt bekanntlich ein tragfähiges Geschäftsmodell. Welche Geschäftsidee liegt der LTB zugrunde?

Johannes Schurack: Ende der 80er Jahre war Lasertechnik noch ein Luxus, den sich nur renommierte Forschungseinrichtungen, Universitäten und große Konzerne leisten konnten. Unsere Geschäftsidee bestand darin, kompakte und preisgünstige Lasersysteme zu entwickeln, um auch Instituten und Unternehmen mit schmaleren Budgets den Einsatz der Lasertechnologie zu ermöglichen.

In Deutschland braucht ein Unternehmensgründer durchschnittlich 3 Monate, bis alle bürokratischen Hürden genommen sind. Wie lange dauerte es bei der LTB und was war der schwierigste Part während der Gründung?

LTB – 15 years of innovative laser techniques at Adlershof

You have all been linked, for many decades, with the scientific site of Adlershof. Why did you decide in 1990 to put an end to your scientific career and to establish your own company?

Dr. Matthias Scholz: We were all in our mid forties and had been working for 20 years at the institute for scientific equipment manufacturing. We felt, at this stage in our lives, that it seemed to be the ideal moment to put our many years of experience in the field of laser technology, into practice. The desire for independence was obviously of prime importance, the materialistic aspect was a secondary consideration.

One of the biggest hurdles in the founding of one's own company is the financial aspect. How was LTB Lasertechnik Berlin GmbH financed at first?

Claudia Scholz: As LTB Lasertechnik Berlin GmbH was founded according to GDR legislation, each partner had to supply 12,500 GDR marks for the company, which was, at the time, a very important sum. Three months later our nominal capital was devaluated from 2 to one in the course of the currency conversion. Overnight our 50,000 GDR marks became 25,000 German marks. According to the Federal Republic of Germany GmbH-legislation 25,000 DM were missing from the nominal capital. This extra capital had to be provided by the 4 founders and their families, with many sacrifices.

Behind every company there is normally a sustainable business model. Which business idea is LTB based upon?

Johannes Schurack: At the end of the eighties, laser technology was still a luxury which only well-known research facilities, universities and large affiliated groups could afford. Our business idea consisted of developing compact and economical laser systems so as to also allow institutes and companies with smaller budgets, to use laser technology.

AdW-Mitarbeiter gründeten High-Tech-Firma Kleinsten batteriebetriebener UV-Laser der Welt in Adlershof vorgestellt

Von unserem Redaktionsmitglied Dr. Michael Gebel

Ihre fertliche Betriebsaufnahme beginnt am Donnerstag die Firma LTB Lasertechnik in Berlin GmbH. Gegründet wurde sie von ehemaligen Mitarbeitern der Akademie der Wissenschaften, die damit den Sprung in die Marktwirtschaft wagen. Sie kreieren das erforderliche Know-How mit, um Stickstoff- und Faserlaser zu produzieren, die für eine breite Anwendung in Forschung und Technik geeignet sind.

Eine Ausnahme bildet die Geschäftsführerin, Claudia Scholz, die zwar nicht in der Akademie, sondern als Ökonomin in einem großen Warenhaus beschäftigt war. Sie erwarb, daß neben Universitäten und anderen Forschungseinrichtungen demnächst auch Industriebetriebe zu ihren Kunden zählen. „Und wie hoffte, bald eine eigene Abteilung für Forschungsapplikation zu haben“, meint sie optimistisch und muß doch erst einmal den Betrieb in schwarze Zahlen bringen.

Eine große Stütze dabei dürfte eine der Geschäftsführer und Förderer des jungen Berliner High-Tech-Unternehmens sein, die Lambda Physik Lasertechnik GmbH aus Göttingen. Mit mehr als 60 Millionen Mark Jahresumsatz ist sie der größte deutsche Lasertechniker und weltweit Marktführer. „Ähnlich wie hier, ist Lambda Physik vor 38 Jahren von Mitarbeitern einer Göttinger Forschungsrichtung mit wenig Kapital, aber viel Optimismus gegründet worden“, erzählt Dr. Dirk Basting, Geschäftsführender Gesellschafter bei Lambda. „Wie glauben, mit LTB einen idealen Partner für den Vertrieb und den Service unserer Hochleistungslaser in Berlin und den neuen Bundesländern gefunden zu haben.“

Zu dem feierlichen Anlaß konnte LTB noch ein besonderes Highlight vorstellen: den Prototypen des kleinsten batteriebetriebenen Stickstoff-UV-Lasers der Welt. Von diesem Gerät, das schon ab Juli produziert werden soll, erhoffen sich die Jungunternehmer aus Berlin-Adlershof einen großen Kundenerfolg. Vielseitige Verwendbarkeit, nicht zuletzt für portable Einsätze in der Umwelttechnik, sowie ein geringer Preis dürfe dem in eine Alternative passenden „Mini-Laser“ eine glänzende Marktposition verschaffen.



Opening of LTB's first premises (1991)

Dr. Stephan Mory: Unsere Forschungsarbeiten waren bis zur Wende Eigentum der Akademie der Wissenschaften. Im Zuge der Evaluierung wurden alle Forschungsbereiche hinsichtlich ihrer Relevanz für die bundesdeutsche Forschungslandschaft überprüft. Da sich dieser Prozess über mehrere Monate erstreckte, befand sich unsere Gründungsidee zunächst in einer Art Schwebestadium. Wir hatten das Glück, dass die mit der Evaluierung beauftragte Unternehmensberatung unsere damaligen Forschungsarbeiten als nicht marktfähig einstufte. Aus heutiger Sicht eine krasse Fehlentscheidung, die jedoch den Grundstein für die LTB legte. Wir konnten unsere Patente zurück erwerben und unsere Gründungsidee realisieren. Eine weitere Hürde war die Suche nach geeigneten Räumen: Anfang der 90er Jahre gab es im Ostteil Berlins überhaupt noch keine Gewerberäume. Also haben wir uns selbst auf die Suche gemacht und ein ehemaliges Polizeirevier gefunden, das wir mit viel Überzeugungskraft anmieten konnten. Eine Situation, die man sich bei dem derzeitigen Überangebot an Gewerbeflächen gar nicht mehr vorstellen kann.

Zu Ihren Kunden zählen internationale Unternehmen wie Zeiss, Nikon, Canon und Bruker sowie renommierte Forschungsinstitute. Mit welcher Strategie konnte sich ein Newcomer wie LTB einen derartig namhaften Kundenstamm aufbauen?

Dr. Matthias Scholz: Geholfen hat uns sicherlich unsere Kooperation mit der damaligen Lambda Physik GmbH. Mit einem starken Partner im Rücken öffnete sich manche Tür, die einem kleinen Unternehmen wie LTB sonst verschlossen geblieben wäre. Darüber hinaus haben wir immer versucht, uns an den Kundenwünschen zu orientieren - auch wenn wir dabei unseren "Forscherehrgeiz" von Zeit zu Zeit zurückstellen mußten. Letztendlich entscheidet der Kunde, was sich am Markt durchsetzt und das müssen nicht zwangsläufig die mit allen technischen Feinessen ausgestatteten Spitzenleistungen sein.

Besonders technologieorientierte Unternehmen brauchen oft Jahre, bis erste Gewinne erzielt werden. Wann hat LTB zum ersten mal die Gewinnzone erreicht und wie haben sich die Umsätze seitdem entwickelt?

Claudia Scholz: Da wir bereits mit zwei marktfähigen Produkten gestartet sind und

Founding a company in Germany, in view of all the administrative problems, requires an average of three months before every administrative barrier has been solved. How long did this period last for LTB and what was the most difficult part during the establishment of the company?

Dr. Stephan Mory: Our research works were the property of the Academy of Sciences within the former GDR. Each research domain was examined, regarding its relevance to the research environment of the Federal Republic of Germany, during the course of evaluation. Since this process was extended over many months, our original idea was, at first, uncertain. Fortunately, the appointed consulting company for the evaluation didn't consider our former research work as being marketable. Looking back on it now, it seemed a hazardous decision but it did lay the foundation of LTB. We could retrieve our patents and go ahead with the creation of the company. Another difficult point was the search for our own premises: at the beginning of the nineties, there were generally no commercial premises available in East Berlin. So we started looking and found a former police station that we were able to rent, after a lot of persuasion. Such a situation is not imaginable today, with the excess supply of commercial premises.

International companies such as Zeiss, Nikon, Canon and Bruker as well as renowned



research institutes are among your customers. With which strategy could a newcomer such as LTB, build up such a well known customer base?

Dr. Matthias Scholz: It is certain that our cooperation with the former Lambda Physik GmbH helped us. With a strong partner to back us up, doors opened which would normally have been closed for a small company such as LTB. Furthermore we have always tried to adapt to our customers' requests -

Dr. M. Scholz adjusts LTB's first nitrogen laser.



Annual works outing (2004)

somit von Anfang an Umsätze machten, sind wir glücklicherweise nie in die roten Zahlen gerutscht, haben in den ersten 10 Jahren aber auch keine nennenswerten Gewinne erwirtschaftet. Der Sprung in die Gewinnzone gelang uns im Jahr 2000, als wir unseren Umsatz durch lukrative Industrieaufträge von 250.000 EUR auf 2,5 Mio. EUR zunächst verzehnfachen und in den Folgejahren auf 6 Mio. EUR steigern konnten. Wir sind uns jedoch im Klaren, dass dies Ausnahmejahre waren und sich die Umsatzentwicklung nicht mit solchen Steigerungsraten fortsetzen wird. Da die Investitionsbereitschaft der Industrie spürbar gesunken ist, dürften sich unsere Umsätze in den nächsten Jahren auf 4 Mio. EUR einpendeln.

Ein Blick auf Ihre Produktpalette zeigt, dass LTB scheinbar auf Spitzenleistungen abonniert ist: MNL - die modernste Stickstofflaserserie, ELIAS - die weltweit leistungsfähigste Echelle-Spektrometerreihe und ARYELLE-Butterfly - eine neue Spektrometergeneration, die zwei Spektrometer in einem vereint. Woher stammen die Ideen zu Ihren Produktentwicklungen?

Johannes Schurack: Mit unserer Produktpalette ist es ähnlich wie im Sport: Im Rampenlicht stehen nur die, die auf dem Siegerpodest stehen. Wir haben aber natürlich auch Produkte im Angebot, die keine Spitzenleistungen vollbringen, qualitativ aber genauso hochwertig sind. Die Ideen für neue Produkte entstehen durch den intensiven Dialog mit den in Adlershof ansässigen Forschungseinrichtungen. Da wir die aktuellsten Forschungstrends quasi direkt vor der Haustür haben, brauchen wir sie eigentlich nur aufzugreifen und in marktfähige Produkte umsetzen.

Laut Wirtschaftssenator Wolf ist LTB ein Paradebeispiel dafür, wie man mit einer guten Idee, langem Atem und viel Engagement ein erfolgreiches Unternehmen auf die Beine stellen kann. Ein Lob aus beruflichem Munde, doch sicher gab es auch schwierige Phasen?

Dr. Stephan Mory: Als kleines Unternehmen aus dem Osten hatten wir es in der Anfangszeit natürlich besonders schwer, uns erfolgreich am Markt zu behaupten. Als ostdeutsches Unternehmen musste man mindestens doppelt so gut sein wie die Konkurrenz. Schwierig war auch die Erschließung industrieller Märkte: Als eingefleischte Wissenschaftler betraten wir

even if we had to postpone our research ambitions from time to time. It is the customer's decision that determines whether it is going to be a success on the market, which doesn't necessarily mean high performing products equipped with all the latest technical finesse.

Technology orientated companies especially, often need years before making a profit for the first time. When did LTB make its first profit and how has the turnover developed since then?

Claudia Scholz: As we started with two marketable products and made a turnover from the beginning, we fortunately never had a deficit, but neither did we make a significant profit during the first ten years. We made our first profit in the year 2000, as we multiplied our turnover by tenfold, from 250,000 EUR to 2.5 million EUR, through lucrative industrial orders and increased it in the following years up to 6 million EUR. We are aware that these were exceptional years and that turnover development will not continue at the same growth rate. Since the investment policy of the industry has decreased noticeably, our turnover should level off to 4 million EUR in the coming years.

Taking a look at your product range shows that LTB is known for high performances: MNL- the most modern range of nitrogen laser, ELIAS- the world wide most efficient range of echelle spectrometer and ARYELLE- Butterfly- a new spectrometer generation, which combines two spectrometers into one. Where did your ideas for your product development come from?

Johannes Schurack: With our product range, it is similar to sport, only those standing on the podium are in the spotlight. Of course we also offer products which do not achieve top performances but which are, in quality, excellent. New product ideas arise from intensive dialogue with research facilities situated at Adlershof. Having the latest research trends directly on our door step, so to speak, we just need to pick them up and to convert them into marketable products.

According to Mr. Wolf, Berlin senator for economics, LTB is a prime example showing how, with a good idea, a lot of staying power and a significant engagement, a company can be set up successfully. Appraisal coming from a competent source; but surely there must also have been difficult phases?

Dr. Stephan Mory: As a small company from the east, it was particularly hard for us to

hier ein völlig neues Terrain, das ganz andere Anforderungen an uns stellte. Statt Einzelfertigung waren plötzlich größere Stückzahlen gefragt. Ein Kraftakt, den wir ohne öffentliche Gelder aus dem Innovationsfonds Berlin nicht hätten bewältigen können.

Innerhalb von 15 Jahren ist Ihr Unternehmen vom regionalen Entwicklungsunternehmen zum führenden Anbieter für innovative Lasersysteme avanciert. Was waren die Meilensteine auf diesem Weg?

Dr. Matthias Scholz: Die wichtigsten Meilensteine, die uns Ende der 90er Jahre den Weg zur Erschließung der industriellen Märkte geebnet haben, waren die Perfektionierung unseres Stickstofflasers nach internationalen Standards sowie die Neuentwicklung unseres Echelle-Spektrometers. Mit diesen beiden Produktlinien und der seit Anfang 2005 fertigestellten ARYELLE-Reihe sind wir sozusagen von der Bundesliga in die Championsleague aufgestiegen. Doch wir wollen uns nicht auf unseren Lorbeeren ausruhen: Zur Laser-Messe in München werden wir eine neue Generation unseres Stickstofflasers präsentieren, die uns den Einstieg in die mobile Analytik ermöglichen wird.

Immer mehr deutsche Unternehmen bauen Arbeitsplätze ab, um ihre Gewinnsituation zu verbessern. Sie haben 24 hochqualifizierte Arbeitsplätze geschaffen. Wie sieht die derzeitige Mitarbeiterstruktur aus und wie wird man als Unternehmer in wirtschaftlich angespannten Zeiten seiner sozialen Verantwortung gerecht?

Claudia Scholz: Mehr als die Hälfte unserer Mitarbeiter sind Fachhochschulabsolventen aus den Bereichen Elektrotechnik, physikalische und medizinische Messtechnik sowie Informatik. Unser Frauenanteil liegt - für unsere Branche eher untypisch - bei 25 Prozent. Darüber hinaus beschäftigen wir 3 Auszubildende und 3 Diplomanden. In den Ausnahmejahren 2001-2003 hatten wir sogar 35 Mitarbeiter. Wenn wir uns aufgrund der Auftragslage zwischenzeitlich von Mitarbeitern trennen müssen, was uns zugegebenermaßen sehr schwer fällt, so wägen wir die sozialen Aspekte sehr genau ab. Immer mit der Hoffnung, bei anspringender Konjunktur möglichst viele wieder an Bord zu holen.

Lasertechnologien zählen zu den Branchen mit dem größten Wachstumspoten-

maintain our hold on the market at the beginning. As an eastern-German company you had to be at least twice as good as the competitors. Entering the industrial markets was also challenging, as confirmed scientists, we were entering an entirely new domain and confronted with different requirements. In place of unit production a higher number of items were suddenly required. We wouldn't have been able to make such an effort, without Berlin public funding.

Within 15 years LTB progressed from being a regional company to a leading supplier for innovative laser systems. What were the milestones encountered?

Dr. Matthias Scholz: The most important milestones which paved the way to enter the industrial market at the end of the nineties were the improvements to our nitrogen lasers, to comply with international standards, and also the new development of our Echelle - spectrometers. With these two product ranges and with the manufacturing of the Aryelle series from the beginning of 2005, we progressed, so to speak, from the German Football League to the Champions' League.

But not wanting to rest on our laurels, a new generation of our nitrogen lasers will be presented at the laser exhibition in Munich, which should enable us to enter the field of mobile analytics.

More and more companies reduce jobs in order to improve their profit. You have provided 24 highly-qualified jobs. How does the present staff structure appear and how does an entrepreneur cope with social responsibilities within a tense economic situation?

Claudia Scholz: More than half of our employees are certified engineers, who come from the electrical engineering and physical and medical measuring technique fields as well as from informatics. Our female gender quote stands at 25 per cent, which is quite unusual in our sector. Furthermore we employ three trainees and three graduates. During the exceptional years of 2001 to 2003, we even had 35 employees. We always consider very seriously the social aspects when we have to make redundancies, because of the order situation, which is never easy for us. We always have the hope of getting the maximum number of people back on board when the economic situation improves.

Laser technology is among the fields which have the biggest growth potential. Which



Product training of Marubun in Japan by LTB, J. Schurack (1996)

zial. Welche Marktposition nimmt LTB im internationalen Wettbewerb ein und wo sehen Sie die Stärken und Chancen des Unternehmens?

Johannes Schurack: LTB bietet innovative, leistungsfähige und kostengünstige Lasersysteme für Nischenmärkte, die von sehr kurzen Produktzyklen bestimmt werden. In einigen Produktbereichen haben wir uns eine führende Position erarbeitet, da wir als kleines Unternehmen wesentlich schneller auf aktuelle Markttrends reagieren können. Ich bin mir sicher, dass wir im Bereich der lasergestützten Analyseverfahren wie z.B. LIF oder LIPS langfristig weitere Marktanteile erobern können.

Adlershof hat als Standort der ehemaligen Akademie der Wissenschaften der DDR eine lange wissenschaftliche Tradition. Was bietet der Standort heute und welche Vorteile ergeben sich daraus für technologieorientierte Unternehmen wie LTB?

Dr. Stephan Mory: Adlershof ist ein Paradebeispiel für gelungene Synergiebildung und funktionierenden Technologietransfer. Wir unterhalten sehr enge Beziehungen zu zahlreichen Instituten. Aus gemeinsamen F & E Projekten sind häufig intensive Partnerschaften entstanden, von denen beide Seiten profitieren. Adlershof ist ein erfolgreiches Modell, das in ganz Deutschland Schule machen sollte.

Eine alte Unternehmerweisheit besagt, dass man mit seinen Aufgaben wächst. Was würden Sie aus heutiger Sicht anders machen und welchen Ratschlag würden Sie heutigen Unternehmensgründern geben?

Dr. Matthias Scholz: Ich würde nichts anders machen, denn es waren meist die Fehler, aus denen wir am meisten gelernt haben. Eine falsch getroffene Entscheidung kann jederzeit korrigiert werden, eine nicht getroffene Entscheidung jedoch fatale Folgen haben. Wie beim Fußball müssen auch im Unternehmen die Schlüsselpositionen mit dem richtigen Mann bzw. der richtigen Frau besetzt sein. Um erfolgreich zu sein, braucht man einen Stürmer, der die Ideen liefert, einen starken Mittelfeldspieler für die praktische Umsetzung und einen Verteidiger, der darauf achtet, dass der Ball nicht ins betriebswirtschaftliche Ausgerät.

In den vergangenen Jahren sind die F & E-Investitionen der deutschen Wirtschaft kontinuierlich gesunken. Bei Ihnen fließen

market position does LTB have within international competition and what are the strengths and chances of the company?

Johannes Schurack: LTB offers innovative products, efficient and economical laser systems for niche markets which are characterised by short product cycles.

We have acquired a leading position in a few fields, since, as a small company, we can react significantly more quickly to the current trend of the market. I am sure that we can gain further market shares in the field of laser based analysis methods, for example LIF or LIPS in the long term.

Being the site of the former science academy of the GDR, Adlershof has a long scientific tradition. What does the site offer today and what advantages are there for technology orientated companies?

Dr. Stephan Mory: Adlershof is a prime example of a successful synergy formation and efficient technology transfers. We have very close contact with numerous institutes. Intensive partnerships have often arisen from common R&D projects for the benefit of each partner. Adlershof is a successful model which should be used as an example for the whole of Germany.

Taking all these past experiences into account and looking back today, what would you do differently and what would you give as advice to company founders today?

Dr. Matthias Scholz: I wouldn't change anything, because it is mainly through mistakes that we have progressed. A decision made wrongly can be corrected at any moment; a decision which is not made at all, can have fatal consequences. As in football, key positions in a company need to be occupied by the right man or respectively the right woman. In order to be successful we need a centre forward who gives ideas, a strong midfielder for the practical implementation and a defender who pays attention to the fact that the ball doesn't go offside economically.

In past years the R&D investment of the German economy has continuously dropped. LTB regularly invests 10 per cent of the profits into new R&D projects. Do you manage better than other companies and why is R&D so important?

Claudia Scholz: The investment in research and development is important, in order to be able to react, with new products, to shorter innovation cycles. This aspect doesn't

regelmäßig 10 Prozent des Gewinns in neue F & E Projekte. Wirtschaften Sie besser als andere Unternehmen und warum sind F & E- so wichtig?

Claudia Scholz: Die Investition in Forschung und Entwicklung ist wichtig, um auf die immer kürzer werdenden Innovationszyklen mit neuen Produkten reagieren zu können. Dabei sind jedoch nicht nur die Unternehmen gefragt. Die öffentliche Förderung kann hier einen wesentlichen Beitrag leisten und sollte deshalb weiter ausgebaut werden. Denn öffentliche geförderte F & E- Programme sind nicht nur eine Investition in die Zukunft, sondern auch für den Staat eine durchaus lohnende Ausgabe. Von den 2,2 Mio. EUR, die LTB an Fördergeldern in Anspruch genommen hat, sind fast 5 Mio. EUR in Form von Steuergeldern in die öffentlichen Kassen zurückgeflossen.

Technologieorientierte Unternehmen, die ihre Marktposition im globalen Wettbewerb weiter ausbauen wollen, müssen ihren Mitbewerbern stets um eine Innovation voraus sein. Welches sind die aktuellen Branchentrends und aus welchem Trend könnte eine neue LTB-Produktlinie entstehen?

Johannes Schurack: Im Bereich der Analytik geht der Trend ganz klar zu preisgünstigen Lösungen, die in immer kürzerer Zeit eine Fülle von Messdaten liefern. Was die Schnelligkeit angeht, liegen wir mit unserer ELIAS-Reihe, die pro Sekunde 4000 Messungen ermöglicht, ganz weit vorn. Bei der Wirtschaftlichkeit dürften unsere Stickstofflaser mit 30 Cent pro Messreihe kaum zu unterbieten sein. So gesehen, sind wir also für die Zukunft bestens gewappnet.

Wirtschafts- und Unternehmerverbände kritisieren regelmäßig die deutsche Bürokratie und das komplizierte Steuersystem. Was kann die Politik tun, um mittelständische Unternehmen wie LTB zu unterstützen?

Dr. Stephan Mory: Die Reform zur Unternehmensbesteuerung weist hier mit Sicherheit in die richtige Richtung. Geringere Steuersätze für in der Firma belassene Gewinne werden sich bestimmt positiv auf die Investitionsbereitschaft der deutschen Firmen auswirken. Darüber hinaus wäre eine Neuausrichtung der staatlichen Förderprogramme wünschenswert: Bislang werden F & E- Projekte nur bis zur Entwicklung eines Prototyps gefördert. Für die Umsetzung in marktfähige Produkte gibt es hingegen zu wenig Fördermöglichkeiten.



Hanover exhibition (1997)

only involve companies. Public investment can make a significant contribution and should therefore be enlarged. Because state aided R&D programmes are not only an investment for the future but are by all means, a profitable expenditure for the state. From the 2.2 million EUR subsidy that LTB has used, nearly 5 million EUR has gone back to the state, in the form of tax.

Technology orientated companies that want to expand their market position further in global competition, must always be ahead of their competitors with innovation. What are the present trends in your field and from which trends could a new LTB - product line emerge?

Johannes Schurack: In the analytical field, the trend is leading to economical solutions which must deliver an abundance of measuring data in a short time. In terms of rapidity we are well ahead with our ELIAS-series which enables 4000 measurements per second. Our nitrogen laser, with 30 per cent per series of measurements, is probably hard to undercut. In this context we are well prepared for the future.

Trade associations regularly criticise German bureaucracy and its complicated tax system. What can politics do to support medium size companies such as LTB?

Dr. Stephan Mory: The reform for company taxation is certainly going in the right direction. Lower tax rates for profits that are kept within the firm, will certainly have a positive impact on the investment policy of German firms. Furthermore, a new organization of the state loan programme would be desirable, up to now, R&D projects are only state aided up to the development of a prototype. However, there are very few state aided possibilities for the creation of marketable products.

*Das Gespräch führte Ariane Steffen
Interview from Ariane Steffen*



Einleitung Wechselwirkung von Materie mit Laserstrahlung –
induziert und analysiert mit Lasern und Meßsystemen von LTB

Introduction Interaction of matter with laser radiation –
induced and analyzed with lasers and measuring devices from LTB

Spezifische Signale

Wechselwirkung von Materie mit Laserstrahlung im Wellenlängenbereich zwischen nahem UV und nahem IR kann auf Grund von Absorption dazu führen, daß die Materie als Reaktion auf die Lasereinwirkung ein spezifisches Signal aussendet und ansonsten aus dem Wechselwirkungsprozeß unverändert hervorgeht. Beispiele für solche spezifischen Signale sind die Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF), sowie die Laser-induzierte gepulste Temperaturerhöhung und die daraus resultierende Druckwelle, die die Grundlage für die Laser-induzierte Optoakustische Spektroskopie (LIOAS) darstellt. Die auf gleichem thermischem Weg ausgelöste Brechungsindexänderung im Medium ist die Basis des sog. „Time Resolved Thermal Lensing (TRTL)“.

Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF)

(bzw. allgemeiner die Laser-induzierte Lumineszenz, die neben der normalen Fluoreszenz auch verzögerte Fluoreszenz und Phosphoreszenz einschließt) kann einerseits Informationen liefern über Anregungs- und Desaktivierungsprozesse in der fluoreszierenden Spezies selbst, ferner kann die fluoreszierende Spezies als Sonde bei der Untersuchung komplexer Systeme zum Einsatz kommen, und schließlich kann das Fluoreszenzsignal für die Analytik von Stoffklassen und die Messung von Umgebungsparametern genutzt werden. Für die Bearbeitung von Meßproblemen aus all diesen drei Hauptanwendungsgebieten der LIF-Spektroskopie und -Analytik hat LTB das Meßsystem LIMES entwickelt. Basierend auf LIMES, stellt LTB für spezielle LIF-Anwendungen problemadaptierte kleinere Meßsysteme zusammen.

Laser-induzierte opto-akustische Spektroskopie (LIOAS)

kann kinetische und kalorimetrische Informationen über kurzlebige angeregte Spezies liefern, die mehr oder weniger vollständig thermisch, d.h. ohne Emission, desaktivieren. Die Methode ist daher ein geeignetes Gegenstück zur LIF-Spektroskopie, anwendbar speziell auch auf lichtundurchlässige oder stark streuende Materialien, z.B. komplexe biologische Systeme. Für diese opto-akustische Spektroskopie hat sich als Laserquelle die Palette der Impulslaser von LTB bewährt.

Specific signals

Interaction of matter with laser radiation in the wavelength range between near UV and near IR may in case of absorption result in the output of a specific signal from matter; apart from that matter leaves the interaction process unchanged. Examples of such specific signals are the laser-induced fluorescence (LIF), as well as the laser-induced pulsed temperature increase of matter and, resulting from that, a pressure wave, which is the basis of laser-induced optoacoustic spectroscopy (LIOAS). The change of refractive index, induced in the same thermic way, is the basis of time-resolved thermal lensing spectroscopy (TRTL).

Laser-induced fluorescence (LIF)

(or, more generally, laser-induced luminescence, which beside the normal fluorescence also includes delayed fluorescence and phosphorescence) may on the one hand give information on excitation and deactivation processes of the fluorescent species itself, moreover, the fluorescent species may act as probe in the investigation of complex systems, and last not least the fluorescence signal may be used to analyze classes of substances and to determine parameters of environment. To solve measuring problems from all three main application fields of LIF-spectroscopy and -analytics, LTB offers the complex measuring system LIMES. Based on LIMES, for special LIF-applications LTB offers especially adapted smaller measuring devices.

Laser-induced opto-acoustic spectroscopy (LIOAS)

may yield kinetic and calorimetric information about such short-living excited species, which deactivate more or less thermically, i.e. without emission. Therefore, this method is a useful counterpart to LIF-spectroscopy, especially also applicable to opaque or strongly scattering systems, e.g. complex biological systems. As laser source for this opto-acoustic spectroscopy, the wide range of pulsed lasers from LTB has proved successful.

Dr. M. Scholz

Dr. D. Leupold

LTB Lasertechnik Berlin

Lichtstreuung

Wechselwirkung von Materie mit Laserstrahlung im Wellenlängenbereich zwischen nahem UV und nahem IR kann auch zu Lichtstreuung führen. Das gestreute Licht kann die gleiche Wellenlänge haben wie das anregende Licht (Rayleigh-Streuung), oder seine Wellenlänge ist verschoben (Raman-Streuung). Beide Streuarten werden z.B. für Zwecke der optischen Entfernungsmessung und Fernerkundung genutzt (LIDAR), und auf der Raman-Streuung basiert auch eine leistungsfähige spektroskopische Methodik. Auf beiden Gebieten hat der Laser substantielle Fortschritte gebracht, und speziell ist die wellenlängenvariable Impulslaserstrahlung der LTB-Stickstofflaser/Farbstofflaser hierfür bestens geeignet.

Laser-LIDAR (light detection and ranging)

basiert auf Laufzeitmessungen zwischen Ausgangsimpuls und rückgestreutem Impuls; die Methode ist nicht nur zur Entfernungsmessung und Fernerkundung ortsfester Ziele geeignet, sondern z.B. auch von atmosphärischen Wolken, Rauch- und Abgaswolken, und generell für extrem zeit aufgelöste Abstandsmessungen. Speziell wird zusätzlich bei der Variante des Raman-LIDAR das gestreute Signal spektral aufgelöst detektiert; auf diese Weise sind räumliche Konzentrationsverteilungen verschiedener Spezies (z.B. CO₂, SO₂, N₂) messbar. Eine Besonderheit ist das auf laserinduzierter (Resonanz)Fluoreszenz basierende sog. Resonanz-LIDAR, hier speziell kommen gepulste Farbstofflaser zum Einsatz. Das rücklaufende Signal kann dabei wesentlich intensiver sein als ein Streusignal.

Laser- (Resonanz) Ramanspektroskopie

ist eine zur Infrarotspektroskopie komplementäre Methode zur Bestimmung z.B. von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen und Molekülkonformationen, sowie zur energetischen Lokalisierung optisch „dunkler“ angeregter Elektronenzustände. Auch für diese Spektroskopie ist das LTB-Meßsystem LIMES bzw. dessen problemadaptierte Varianten geeignet.

Materialveränderung

Wechselwirkung von Materie mit Laserstrahlung im nahen UV, Sichtbaren und nahen IR kann bei hinreichender Energiedichte auch zu irreversibler Materieveränderung führen.

Light Scattering

Interaction of matter with laser radiation in the wavelength range between near UV and near IR may also result in light scattering. The scattered light may have the same wavelength as the exciting light (Rayleigh-scattering), or its wavelength may be shifted (Raman-scattering). Both types of scattering are used e.g. for optical distance measurement and remote ranging (LIDAR). Moreover, Raman scattering is the basis of a powerful spectroscopic technique. In both fields, the laser has brought substantial progress, and here especially the wavelength-tunable pulse laser radiation of LTB's nitrogen lasers/dye lasers is well suited.

Laser-LIDAR (light detection and ranging)

is based on measurement of the transit time of forward pulse and the back-scattered one; the method is useful not only for distance measurement and ranging of spatially fixed targets, but also of atmospheric clouds, clouds of smoke and exhaust, and generally for highly time-resolved distance measurements. In addition, especially with the variant of Raman-LIDAR, the back-scattered light can be detected spectrally resolved and this way the spatial distribution of species like CO₂, SO₂, N₂ can be measured. One special quality is the so-called resonance-LIDAR, it is based on laser-induced (resonance) fluorescence. In this case the backcoming signal may be much more intense than a normal scattered signal.

Laser- (resonance) Raman spectroscopy,

a method complementary to the infrared spectroscopy, is useful e.g. for the determination of inter- and intramolecular interactions and of molecular configurations, as well as for the energetic localization of optically “dark” excited electronic states. The LTB measuring system LIMES and its problem-adapted variants, respectively, are also suited for this spectroscopy.

Alterations of matter

Interaction of matter with laser radiation in the near UV, visible and near IR may at sufficiently high energy density also lead to irreversible alterations of matter. Under the gene-

Unter dem Oberbegriff Ablation sind hier eine Vielzahl komplexer Prozesse mit unterschiedlichsten Anwendungsaspekten zusammengefaßt. Die in diesem Zusammenhang entscheidenden Laserparameter sind die Abstimmbarkeit der Wellenlänge, die hinreichende Fokussierbarkeit und die problemangepaßte gepulste Anregung. Die Laserpalette von LTB mit ihrer breiten Variabilität der genannten Laserparameter ermöglicht maßgeschneiderte Lösungen für verschiedenste Anwendungsfelder der Ablation:

Laser-Materialbearbeitung

a) „laser machining“ und Laser-induzierte Strukturänderungen auf der Basis von lokalem Schmelzen und/oder Verdampfen, wie z. B. Schneiden, Schreiben, Bohren, Schweißen, Oberflächenhärtung, Tempern (laser annealing). Der weitgespannte Bogen reicht z.B. bis zur Manipulation von Biogewebe, Laser-Mikrodissektion und bis zur Laserchirurgie.
b) Laser-induziertes „chemical processing“ auf pyrolytischer (Thermochemie) oder photolytischer Basis (Photochemie), wie z.B. Beschichten, Dotieren und „patterning“ von Oberflächen, Synthese von Materialien. Der weitgespannte Bogen reicht z.B. bis zur Laser-basierenden Photodynamischen Tumorthherapie (PDT).

Laser-induzierte Plasma Spektroskopie (LIPS)

Elementaranalyse von Feststoffen durch Erzeugung von Mikroplasmen mit charakteristischer Emission von angeregten Atomen, Ionen und ggf. auch molekularen Fragmenten. Möglichkeit der Erhöhung der Selektivität von LIPS durch Kombination mit LIF. Besonderer Vorzug von LIPS: Möglichkeit der Analyse von entfernten Proben („remote-site characterization“). LIPS Meßsysteme von LTB: ARYELLE, ARYELLE-Butterfly.

„Matrix-assisted Laser desorption/ionization-Time-of-flight (MALDI-TOF)“ Massenspektrometrie

Schonende Desorption und Ionisation von großen Biomolekülen (z.B. Proteinen, Peptiden, Oligonukleotiden) unter Vermeidung von Fragmentationen durch deren Einlagerung in geeigneten Matrizen. Letztere verdampfen unter Einwirkung der Laserstrahlung, und die Biomoleküle werden in die Gasphase freigesetzt. Nachfolgend Ionisation und Analyse mittels Flugzeit-Massenspektrometrie. Auch bei MALDI-TOF bewähren sich LTB-Laser.

ric term “ablation” a lot of complex processes with widely varying aspects of application are classed. With respect to ablation the critical parameters of laser radiation are tunability of wavelength, possibility to get a sufficiently sharp focus, and problem-adapted pulsed excitation. Lasers from LTB with their broad variability of the said parameters offer tailor-made solutions for the various fields of application of ablation:

Laser treatment of materials

a) laser machining and laser-induced structural changes on the basis of local melting and/or vaporization, e.g. cutting, writing, drilling, welding, surface hardening, laser annealing. The wide-spread bow spans as far as e.g. the manipulation of biotissue, laser-microdissection, and laser surgery.
b) laser-induced chemical processing on pyrolytic or photolytic basis (thermochemistry/photochemistry), e.g. coating, doping and patterning of surfaces, synthesis of materials. The wide-spread bow extends to e.g. the laser based photodynamic tumor therapy (PDT).

Laser-induced breakdown (plasma) spectroscopy (LIBS)

Elementary analysis of solid materials by generation of microplasma with characteristic emission from excited atoms, ions or even molecular fragments. Possibility of increasing the LIBS sensitivity by combination with LIF. Special advantage of LIBS: Possibility of remote-site characterization. LIBS measuring systems from LTB: ARYELLE, ARYELLE-Butterfly.

„Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF)“ mass spectrometry

Soft desorption and ionization of large biomolecules (e.g. proteins, peptides, oligonucleotides), which are deposited to suitable matrices to avoid fragmentation. Under the laser irradiation, these matrices vaporize, and the biomolecules are released to the gas phase with subsequent ionization and time-of-flight mass spectrometry. Also for MALDI-TOF, lasers from LTB have proved successful.



1

Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie Laser-induced fluorescence spectroscopy

- 1.1 Einführung
1.1 Introduction
- 1.2 Photolumineszenz
1.2 Photoluminescence
- 1.3 Charakteristika der Fluoreszenzstrahlung
1.3 Characteristics of fluorescence radiation



1 1

Einführung
Introduction

In diesen Charakteristika der Emission spiegeln sich in sensibler Weise auch Prozesse wider, die mit der Emission konkurrieren. Dies können sowohl Kanäle der intramolekularen Desaktivierung als auch zwischenmolekulare Prozesse (Abb. 2) sein. In diesem Zusammenhang kann auch das Anregungsspektrum der Fluoreszenz informativ sein, insbesondere, wenn es sich vom Absorptionsspektrum unterscheidet.

Die molekulare Emission (Photolumineszenz) enthält also in sehr sensibler Weise sowohl Informationen über das emittierende Molekül selbst, über die intra- und intermolekulare Dynamik, als auch über seine (Mikro)umgebung.

These above mentioned characteristics of luminescence may reflect in an indirect, but sensitive manner also processes, which are in concurrence with the emission. Such processes either may belong to the intramolecular de-activation channels or can be intermolecular processes (Fig. 2). This way, the photoluminescence may deliver in a sensitive manner information on the emitting molecule itself (about its intra- and intermolecular dynamics) as well as information about its (micro)environment.

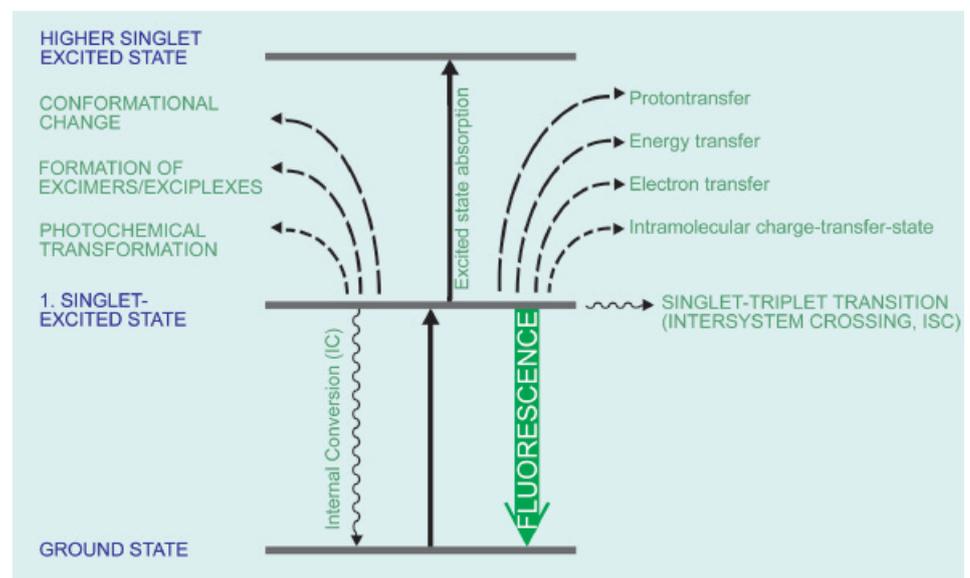


Fig. 2)
Manifoldness of processes, which may start from the first excited singlet state and may influence the fluorescence

Daraus resultieren die *Hauptanwendungsgebiete* der molekularen Lumineszenzspektroskopie und -analytik:

- Aufklärung von photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften und Strukturzusammenhängen für das emittierende Molekül selbst (in seiner jeweiligen Umgebung);
- Einsatz des emittierenden Moleküls als „molekulare Sonde“ („fluorescent probe“) bei der Untersuchung komplexer biologischer, biochemischer oder physikochemischer Systeme;
- Molekulare Emission als analytische Methode zum Nachweis vielfältigster Stoffklassen, wie z.B. Drogen, Kohlenwasserstoffe, Proteine, Pigmente; bzw. auch Einsatz des emittierenden Moleküls als „molekularer Sensor“ für einen bestimmten physikalischen/physikochemischen Parameter (z.B. pH).

Thereof result the *main application fields* of molecular luminescence spectroscopy and analytics:

- Enlightenment of photophysics, photochemistry and structural relationships for the emitting molecule itself (in its particular environment);
- Use of the emitting molecule as a “fluorescent probe” in the investigation of complex biological, biochemical or physicochemical systems;
- Molecular emission as analytical method for the detection of multivarious classes of materials like e.g. drugs, environmental poisons, hydrocarbons, proteins, pigments; also the emitting molecule can be used as a molecular sensor for a definite physical/physicochemical parameter (e.g. pH).

Auf verschiedenen dieser Fluoreszenz-Anwendungsgebiete ist die Zugänglichkeit von Informationen über Stoffe und Prozesse durch die Anregung mittels Lasern geradezu revolutioniert worden; die Einzigartigkeit bzw. die Vorzüge von LIF erstrecken sich in viele Dimensionen, beispielsweise hinsichtlich des Ortes sowohl auf Höchstauflösung im Nanometer-Bereich als auch auf Fernerkundung im Kilometer-Bereich. Wesentliche neue LIF-Anwendungsfelder basieren auch auf den Möglichkeiten der Fluoreszenzanregung durch laser-basierte simultane oder stufenweise Mehrphotonenabsorption (siehe Abb. 1).

The availability of excitation by lasers has brought a real “revolution” in several of these fluorescence application fields in the access to information about materials and processes. The uniqueness and advantages, resp., of LIF extend in many dimensions; with respect to local dimensions it spans from the highest-resolution nanometer range to the kilometer range in remote sensing. Other important new fields of LIF application are based on laser-induced simultaneous or stepwise multiphoton absorption (Fig. 1).

1.2

Photolumineszenz
Photoluminescence

Photolumineszenz eines Moleküls tritt auf als Ergebnis der Absorption von Photonen, verbunden mit der Überführung eines Elektrons aus einem Elektronenorbital des Grundzustandes in ein angeregtes Elektronenorbital; das Molekül befindet sich dann in einem elektronischen Anregungszustand.

Anstelle einer Energieaufnahme durch Photonen kann ein Molekül auch durch andere Arten von Energiezufuhr in einen Anregungszustand überführt werden und dann ebenfalls lumineszieren. Solche Möglichkeiten sind zum Beispiel:

- Anregung durch chemische Prozesse, die zu Chemolumineszenz führt,
- Anregung durch biochemische Prozesse, die zu Biolumineszenz führt,
- Anregung durch Reibungskräfte, die zu Tribolumineszenz führt,
- Anregung durch ionisierende Strahlung, die zu Radiolumineszenz führt,
- Anregung im elektrischen Feld, die zu Elektrolumineszenz führt.

Photolumineszenz ist der Oberbegriff für normale Fluoreszenz (häufig einfach als Fluoreszenz bezeichnet), verzögerte Fluoreszenz und Phosphoreszenz.

Bei Fluoreszenz geht ein Elektron aus einem Singulett-Anregungszustand in den Grundzustand über, ohne dass sich die Spinorientierung des Elektrons ändert. Das übergehende Elektron ist sowohl in dem Anregungszustand als auch im Grundzustand mit seinem Spin antiparallel orientiert zu einem zweiten (sog. ungepaarten) Elektron im Grundzustand. Molekulare Energiezustände, in denen alle Elektronen zu Paaren mit antiparallelem Spin gehören, heißen Singulettzustände (in den Abbildungen gekennzeichnet mit dem Symbol S). Fluoreszenz ist also ein Singulett→Singulett Übergang². Solche Übergänge sind „erlaubt“, d.h. sie erfolgen mit hoher Übergangsrate (typischerweise 10^8 s^{-1}).

Der Ausgangszustand der Phosphoreszenz ist ein Triplett-Anregungszustand (in den Abbildungen gekennzeichnet mit T), hier ist das angehobene Elektron mit seinem Spin parallel orientiert zu einem zweiten Elektron in einem Grundzustands-Orbital. Phosphoreszenz erfolgt als Rückkehr des angehobenen Elektrons unter Umkehr seiner Spinorientierung in dieses Grundzustands-Orbital. Phosphoreszenz ist also ein Triplett→Singulett Übergang. Solche Über-

Photoluminescence of a molecule occurs as result of absorption of photons, by which an electron from a ground state orbital is transferred to an excited state orbital; the molecule is then in an electronically excited state.

Instead of energy uptake by photons, molecules can be transferred to an excited state also by other means of energy uptake and as a result, also show luminescence. Such possibilities are for example:

- excitation as result of chemical processes, which results in chemoluminescence,
- excitation via biochemical processes, which results in bioluminescence,
- excitation by frictional forces, which results in triboluminescence,
- excitation by ionizing radiation, which results in radioluminescence,
- excitation in an electric field, which results in electroluminescence.

Photoluminescence is the generic term for normal fluorescence, (usually simply called fluorescence), delayed fluorescence and phosphorescence.

Fluorescence is connected with the transition of an electron from a singlet excited state to the ground state without change in the spin orientation of that electron; this spin is in the excited state as well as in the ground state oriented antiparallel to a second electron in the ground state. Molecular energy states, in which all electrons belong to pairs with antiparallel spin are named singlet states. (In the figures, these states are labeled by symbol S). Therefore, fluorescence is a singlet →singlet transition². Such transitions are “allowed”, which means they take place with a high transition rate (typically 10^8 s^{-1}).

The initial state of phosphorescence is a triplet excited state (in the figures labeled by T), in this case the spin of the lifted electron is oriented parallel to a second (so-called unpaired) electron in a ground state orbital. Phosphorescence occurs as return of the lifted electron in that ground state orbital, connected with spin orientation reversal. Therefore, phosphorescence is a triplet→singlet transition. Such transitions are “forbidden”, they take place with small transition

Dr. D. Leupold
LTB Lasertechnik Berlin

² In einer strikteren Definition ist Fluoreszenz ein Spin-erlaubter strahlender Elektronen-Übergang; ein solcher könnte also auch zwischen zwei Triplett-Zuständen auftreten. In der Praxis wird aber Emission aus höheren molekularen Triplettzuständen kaum beobachtet.

² In a more strict definition, fluorescence is a spin-allowed radiative electron transition; as such, it could occur also between two triplet states. In reality, emission from higher excited molecular triplet states is extremely scarce.

gänge sind „verboten“, sie erfolgen mit geringer Übergangsrate (typischerweise $\leq 10^4 \text{ s}^{-1}$). Direkte Triplett-Anregung aus dem Grundzustand ist als ein Singulett→Triplett Übergang ebenfalls verboten; Triplettzustände werden auf dem „Umweg“ über eine Singulett-Anregung mit einem anschließenden Spinumkehr-Prozeß (Intersystem-Crossing, „ISC“)³ bevölkert, z.B. $S_0 \rightarrow S_1 \rightsquigarrow T_1$ (siehe Abb. 3).

³ Sowohl ISC als auch Phosphoreszenz werden ermöglicht durch eine sogenannte Spin-Bahn-Kopplung, die bewirkt, daß ein Singulett-Anregungszustand eine „Beimengung“ von Triplett-Charakter erhalten kann und umgekehrt.

³ ISC as well as phosphorescence are enabled by a so-called spin-orbit-coupling, which results in small mixture of triplet character to a singlet excited state and vice versa.

Bei der Absorption von Photonen werden Moleküle in der Regel nicht in reine Elektronen-Anregungszustände überführt, sondern es werden gleichzeitig auch Schwingungen angeregt. Diese Schwingungen klingen im allgemeinen schnell ab, d.h. während sich das Molekül noch im Elektronen-Anregungszustand befindet. Die Photolumineszenz erfolgt dann üblicherweise aus diesem schwingungslosen Zustand. (In den Abbildungen bezeichnet der erste Index jeweils die Nummer des Elektronenanregungszustandes, der zweite den Schwingungszustand. Beispiel: $S_{n,v}$ ist der n-te Singulett-Anregungszustand im v-ten Schwingungszustand).

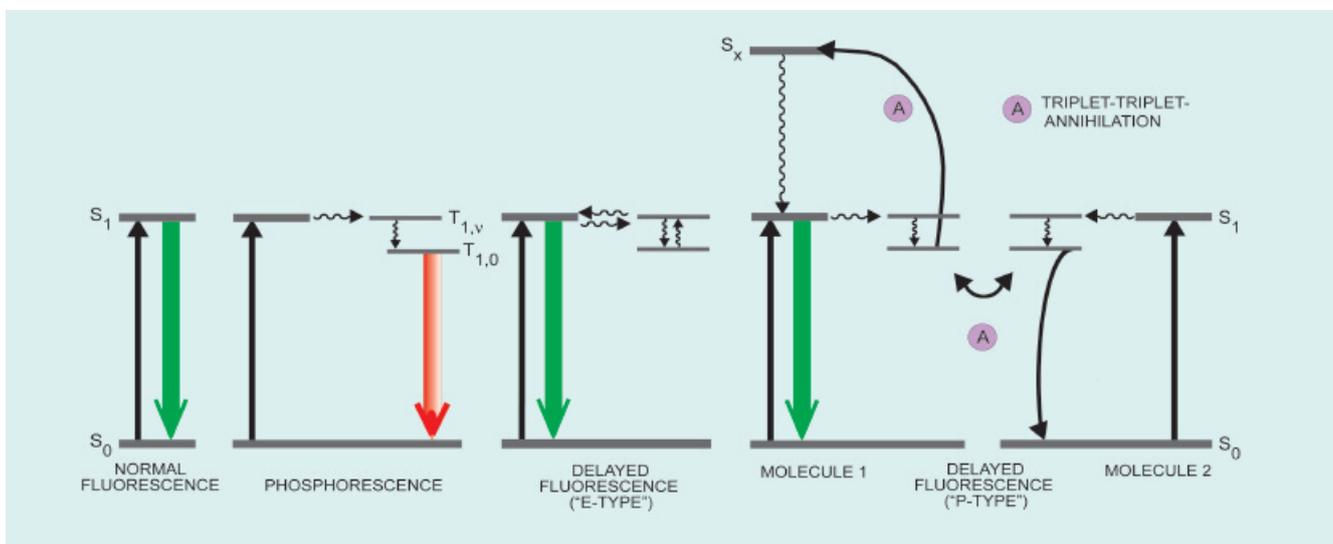
Die normale Fluoreszenz erfolgt bei organischen Molekülen üblicherweise aus dem Zustand $S_{1,0}$, unabhängig davon, zu welchem Singulettzustand die Anregung führt. Dies resultiert daraus, dass in höheren Singulettzuständen eine rasche Umwandlung von Elektronen-Anregungsenergie in Schwingungsenergie möglich ist (Innere Konversion „IC“, siehe Abb. 1, Kap. 1.1). Es gibt wenige Ausnahmen von dieser sog. Kasha-Regel, eine solche atypische Fluoreszenz wird z.B. bei Azulen aus dem 2. Singulett-Anregungszustand beobachtet.

rate (typically $\rightarrow 10^4 \text{ s}^{-1}$). Direct triplet excitation from the ground state is, as a singlet→triplet transition, also forbidden; triplet states become populated on the “round-about route” of singlet excitation with a subsequent spin reversal process (intersystem crossing, abbreviated by ISC)³, e.g. $S_0 \rightarrow S_1 \rightsquigarrow T_1$ (see Fig. 3).

Usually, by absorption of photons, molecules are not transferred to pure electronic excited states, but simultaneously also vibrations become excited. These vibrations usually decay very rapidly, i.e. while the molecule is still in the electron excited state. In this case, photoluminescence starts from this vibrationless state. (In the figures, the labeling of the energy states (S;T) gives with the first index the number of the electron state, with the second index that of the vibrational state. Example: $S_{n,v}$ denotes the v-th vibronic state in the n-th singlet excited state).

With organic molecules, the starting level of direct fluorescence is usually the state $S_{1,0}$, independent of the initially excited state. There are only few exceptions from this so-called Kasha-rule; one of them is fluorescence from the second excited singlet in azulene. This rule is based on the rapid conversion of electronic excitation energy into vibrational energy (Internal conversion, IC), which may occur in higher excited singlet states (see Fig. 1, chap. 1.1). The same is true for higher triplets.

Fig. 3)
Schemes of excitation of phosphorescence and delayed fluorescence (two types) in comparison to normal fluorescence



Neben der normalen Fluoreszenz kann auch verzögerte Fluoreszenz auftreten. Dafür gibt es zwei unterschiedliche Ursachen (siehe Abb. 3): Verzögerte Fluoreszenz vom „E-Typ“ (so genannt, weil erstmals an Eosin beobachtet) basiert auf der thermischen Anregung eines Moleküls aus dem schwingungslosen niedrigsten Triplettzustand auf ein höherenergetisches Triplett-niveau, von dem aus ISC zurück in das Singulettssystem möglich ist, mit anschließender Fluoreszenz. Verzögerte Fluoreszenz vom „P-Typ“ (erstmals am Pyren beobachtet) kann dann auftreten, wenn zwei identische Moleküle, die sich beide im Triplettzustand befinden, so miteinander wechselwirken, daß eines von beiden in den Grundzustand zurückkehrt und das andere in einen höherangeregten Singulettzustand versetzt wird. Aus diesem kann es zum ersten Singulett-Anregungszustand relaxieren und von dort fluoreszieren. Dieser Wechselwirkungsprozeß heißt Triplett-Triplett Annihilation (siehe Abb.3).

Die verzögerte Fluoreszenz hat dieselbe spektrale Verteilung („Farbe“) wie die normale Fluoreszenz, aber ein anderes zeitliches Verhalten: sie klingt langsamer ab.

Üblicherweise (in der konventionellen Spektroskopie) wird die Photolumineszenz durch Einphotonen-Absorption angeregt. Mit Lasern sind solche Anregungsintensitäten verfügbar, die auch *simultane* Zwei- oder Mehrphotonen-Absorptionen ermöglichen, d.h. die Photolumineszenz kann statt mit einem Photon der Energie $E = h \cdot c \cdot \lambda^{-1}$ auch mit zwei Photonen der Energie $E/2 = h \cdot c \cdot (2\lambda)^{-1}$ oder mit n Photonen der Energie $E/n = h \cdot c \cdot (n\lambda)^{-1}$ angeregt werden (siehe Fig. 1). Die Anregungswellenlängen rücken damit immer weiter ins rote/infrarote Spektralgebiet. Das kann Vorteile haben, z. B. wird bei Lumineszenzanregungen im Gewebe mit roter Strahlung die größtmögliche Eindringtiefe erreicht.

Photolumineszenz kann auch durch *stufenweise* Absorption von zwei oder mehreren Photonen angeregt werden, auch dies ist ein Laser-basierter Prozeß. Auf diese Weise ist es z. B. möglich, ultraschwache Fluoreszenzen von höheren Singulett-Anregungszuständen zu detektieren, die bei Einphotonenanregung un beobachtbar sind. Abb. 1, Kap.1.1 zeigt das Schema einer so angeregten anomalen Fluoreszenz.

Beside the normal fluorescence also delayed fluorescence may occur. There are two different causes for this (see Fig. 3): Delayed fluorescence of “E-type” (named after its first observation with eosin) is based on the thermic excitation of a molecule from its vibration-less lowest triplet state to a higher vibronic state, from which ISC back to the singlet system is possible, with subsequent (delayed) fluorescence. Delayed fluorescence of “P-type” (at first observed with pyrene) may occur, if two identical molecules, each in the triplet state, interact in such a way, that one of them returns to the ground state and the other jumps into a higher excited singlet state. From there, it may relax in usual way by IC and then show (delayed) fluorescence. The said interaction process of the two molecules is called triplet-triplet annihilation (see Fig. 3).

Delayed fluorescence shows the same spectral distribution (color) like the normal fluorescence, but a different temporal behaviour: it delays more slowly.

Usually (by conventional spectroscopy) photoluminescence is excited by one-photon absorption. With lasers, excitation intensities are available, which render possible also *simultaneous* two- or multi-photon absorption. This means, photoluminescence can be excited with (instead of one photon of energy $E = h \cdot c \cdot \lambda^{-1}$) two photons of energy $E/2 = h \cdot c \cdot (2\lambda)^{-1}$ each, or with n photons of $E/n = h \cdot c \cdot (n\lambda)^{-1}$ (see Fig. 1). This way, the excitation wavelengths shift more to the red/near infrared spectral region. This may have advantages, e.g. for in-deep excitation in tissue.

Photoluminescence may be excited also by *stepwise* absorption of two or more photons, also this is a laser-based process. This way e.g. it is possible to detect ultraweak fluorescence from higher excited singlet states, what is impossible with direct one-photon excitation. Also this may have special advantages. Fig. 1, chap.1.1 shows the excitation scheme of such an anomalous fluorescence.

1.3

Charakteristika der Fluoreszenzstrahlung Characteristics of fluorescence radiation

Die Fluoreszenz organischer Moleküle ist in erster Linie charakterisiert durch ihre spektrale Verteilung (Farbe). Zur Messung dieses Fluoreszenzspektrums wird bei einer geeigneten Anregungswellenlänge (z.B. im Maximum einer Absorptionsbande) die Intensitätsverteilung über der Wellenlänge registriert. Dieses Fluoreszenzspektrum besteht bei Molekülen in der kondensierten Phase bei Normaltemperatur in der Regel aus einer Bande mit einer spektralen Breite von einigen 10 nm. Dies resultiert daraus, dass, selbst wenn der entsprechende fluoreszierende Elektronenübergang ausschließlich zwischen je einem Schwingungszustand einer dominierenden Schwingungsmode des Ausgangs- und Endzustandes erfolgt (z.B. $S_{1,0} \rightarrow S_{0,v}$ in Abb. 1, Kap. 1.1), dann dennoch diese Emissionslinie spektrale Verbreiterungen verschiedener Ursache erfährt, wie z.B. Rotationen, Stöße, Fluktuationen der Molekülumgebung (z.B. des Lösungsmittel "käfigs").

Meistens erfolgen aus $S_{1,0}$ (mit abgestufter Intensität) noch weitere Übergänge ($S_{1,0} \rightarrow S_{0,\mu}$, $S_{1,0} \rightarrow S_{0,\nu}$). Diese sog. Schwingungsprogression kann in Form mehrerer Subbanden im Fluoreszenzspektrum deutlich ausgeprägt sein (vgl. Abb. 4, links unten), insbesondere bei Tieftemperatur, oder auch „verschmiert“ sein. Informativ ist auch die Intensitätsverteilung innerhalb einer solchen Schwingungsprogression: Die Intensität der einzelnen Subbanden kann vom Kurz- zum Langwelligen mono-

Primarily, the fluorescence of organic molecules is characterized by its spectral distribution (color). To measure this fluorescence spectrum, the wavelength-dependence of the intensity distribution is measured at a suitably fixed excitation wavelength (e.g. at the maximum of the absorption band). With molecules in condensed phase, at room temperature usually this fluorescence spectrum consists of one band with a spectral width of several 10 nm. The reason for this remarkable width is that the emission line is exposed to spectral broadenings of different origin like rotations, impacts, and fluctuations of the molecule environment (e.g. of the solvent cage), even if the fluorescent electronic transition in question takes place solely between one vibrational state of a dominant vibrational mode in the terminal and final state each (e.g. $S_{1,0} \rightarrow S_{0,v}$ in Fig. 1, chap. 1.1).

In most cases, from $S_{1,0}$ there are further transitions with differing intensity ($S_{1,0} \rightarrow S_{0,\mu}$, $S_{1,0} \rightarrow S_{0,\nu}$). This so-called vibrational progression may be reflected by several sub-bands in the fluorescence spectrum, especially at low temperatures (Fig. 4, lower, left), or it can be smeared out (Fig. 4, lower, right). Also informative is the intensity distribution within such vibrational progression: If the intensity of the sub-bands is monotonously decreasing from the shorter to lon-

Dr. D. Leupold
LTB Lasertechnik Berlin

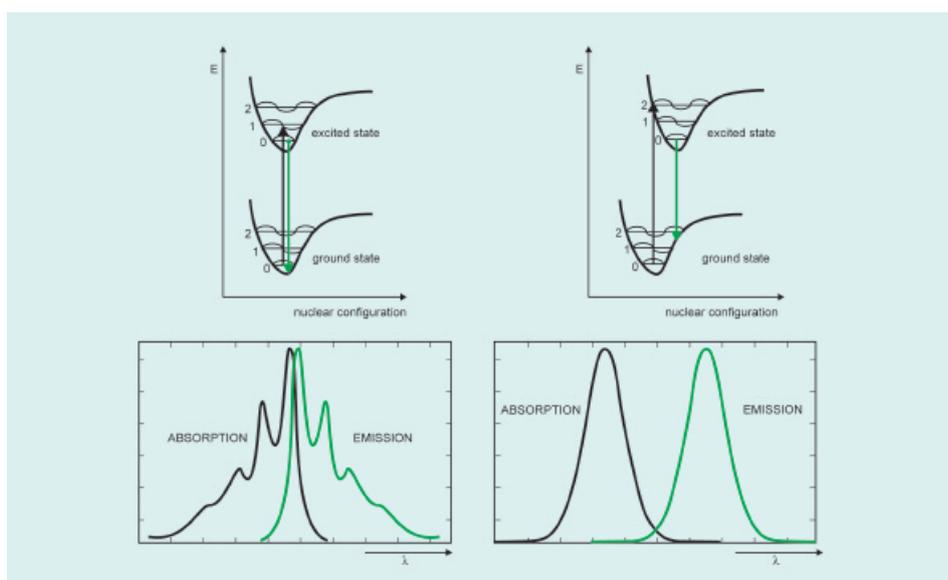


Fig. 4)
Potential energy diagrams (top) and related absorption/fluorescence spectra (bottom) of fluorophores without (left) and with (right) change of nuclear configuration as result of excitation. In addition, a different degree of spectral resolution is shown to illustrate the usual effect of low (left) and room (right) temperature.

ton abnehmen, dies deutet an, dass die Kernkonfigurationen im Grund- und Anregungszustand weitgehend identisch sind

ger wavelenghts, this reflects almost identical nuclear configurations in the ground and excited state (Fig. 4, left). If on the other hand

(vgl. Abb. 4, links). Durchläuft hingegen die Intensität der Subbanden ein Maximum, so sind die relaxierten Kernkonfigurationen im Grund- und Anregungszustand verschieden, d.h. die Potentialkurven sind gegeneinander versetzt (siehe Abb. 4, rechts).

Im einfachsten Fall ist das Fluoreszenzspektrum ein Spiegelbild der langwelligsten Absorptionsbande (siehe Abb. 4). Diese Spiegelsymmetrie sagt dann aus, dass die energetischen Abstände zwischen den Schwingungsniveaus im Grund- und Anregungszustand (nahezu) gleich sind.

Zwischen Absorptionsbande und Fluoreszenzbande gibt es in der Regel eine spektrale Versetzung, nämlich eine Rotverschiebung der Fluoreszenz. Diese sog. Stokes-Verschiebung ist in erster Linie eine Folge der FC-Relaxation bei differierenden Elektronendichteverteilungen und Kernkonfigurationen im Grund- und Anregungszustand. Solche Unterschiede in der Elektronendichteverteilung können durch Umgebungseinflüsse zu noch größeren Stokes-Verschiebungen führen: Beispielsweise bewirken Umorientierungen einer Lösungsumgebung als Reaktion auf eine durch Elektronenübergang veränderte Elektronendichteverteilung im gelösten Molekül eine energetische Stabilisierung des Anregungszustandes. Solche Lösungsmittel-bedingten Rotverschiebungen (bathochrome Solvatochromie) der Fluoreszenz können mehrere 100 nm betragen.

Genannte Effekte wie die Änderung des Lösungsmittelkäfigs schlagen sich nur dann in den Fluoreszenzeigenschaften nieder, wenn sie innerhalb der Lebensdauer des fluoreszierenden Anregungszustandes wirksam werden, wenn also z.B. die Lösungsmittel hinreichend viskos sind.

Eine informative Meßgröße kann in bestimmten Fällen auch das Fluoreszenz-Anregungsspektrum sein. Zu dessen Messung wird die Fluoreszenzintensität bei fester Wellenlänge (z.B. im Maximum der Fluoreszenzbande) mit einer über den Spektralbereich des entsprechenden Absorptionsspektrums variierten Anregung konstanter Intensität ermittelt. Abweichungen dieses Anregungsspektrums vom Absorptionsspektrum liefern z.B. bei zusammengesetzten Energietransferketten direkte Aussagen zur Effektivität des zwischenmolekularen Transfers.

from shorter to longer wavelengths the intensity of the sub-bands goes through a maximum, this means that the relaxed nuclear configurations in the ground and excited state are different from each other, i.e. their potential surfaces are shifted from each other (Fig. 4, right).

In the simplest case, the fluorescence spectrum is the mirror image of the longest-wavelength (red-most) absorption band (see also Fig. 4). This mirror symmetry reflects, that the energetic differences (spacings) between the vibrational levels in the ground and excited state are more or less equal.

Usually, there is a spectral shift between the red-most absorption and fluorescence band, namely a red-shift of fluorescence. This so-called Stokes-shift is primarily caused by the FC-relaxation at differing electron density distributions as well as nuclear configurations in the ground and excited state. Due to influences from the environment, such differences in electron density distributions can result in even enhanced Stokes-shifts: for example, reorientation of a solvent cage as reaction of a changed electron density distribution after electron transition in the dissolved molecule results in an energetic stabilization of the excited state. Such solvent-caused red shifts of fluorescence (bathochromic solvatochromism) may be as large as several 100 nm.

The said effects like change of the solvent cage result in changes of the fluorescence properties only if they occur within the lifetime of the fluorescent excited state, e.g. if the solvent is sufficiently viscous.

In certain cases, also the excitation spectrum of the fluorescence may be informative. To measure it, the fluorescence intensity at a fixed wavelength (for example at the maximum of the fluorescence band) is registered while varying the wavelengths of a constant excitation intensity over the spectral range of the corresponding absorption spectrum. Differences between the latter and this excitation spectrum give e.g. for composed energy transfer chains direct information on the efficiency of intermolecular transfer.

Die Messung des Fluoreszenz-Anregungsspektrums kann auch eine wichtige Identifizierungsmethode für Spuren von organischen Verunreinigungen sein.

Die Fluoreszenzlebensdauer τ_F ergibt sich als reziproker Wert der Summe der Geschwindigkeitskonstanten aller Prozesse, die zu einer Desaktivierung des fluoreszierenden Anregungszustandes führen; bei Betrachtung von ausschließlich intramolekularen Prozessen gilt

$$\tau_F = (k_T + k_{IC} + k_{ISC})^{-1},$$

dabei ist

k_T die Geschwindigkeitskonstante für die strahlende Desaktivierung, die ausschließlich durch die elektronischen Eigenschaften des Moleküls bestimmt wird, k_T^{-1} heißt natürliche Lebensdauer, bzw. Strahlungslebensdauer; sie ist in der Regel umso größer, je schwächer der zugehörige Absorptionsübergang ist.

k_{IC} ist die Geschwindigkeitskonstante der inneren Konversion (Umwandlung von Elektronen- in Schwingungsenergie und deren strahlungslose Desaktivierung)

k_{ISC} ist die Geschwindigkeitskonstante der Singulett-Triplett-Konversion.

Je dominanter k_T im Verhältnis zu den beiden strahlungslosen Prozessen ist, desto höher ist die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F ; sie stellt das Verhältnis der Anzahl der durch Fluoreszenz emittierten Photonen zu den absorbierten Photonen dar und berechnet sich gemäß

$$\Phi_F = k_T(k_T + k_{IC} + k_{ISC})^{-1}.$$

Sinngemäß entsprechend sind Φ_{IC} und Φ_{ISC} definiert, die die Anteile der angeregten Moleküle angeben, die über innere Konversion bzw. Singulett-Triplett-Konversion desaktivieren.

Alle zwischenmolekularen Prozesse, die während der Lebensdauer des fluoreszierenden Anregungszustandes wirksam werden, tragen zum Abklingverhalten bei und verringern die Fluoreszenzquantenausbeute. Dies können Stöße mit sog. Fluoreszenzlöschern (dynamische Löschung) sein, weitere solche Prozesse zeigt Abb. 2, Kap. 1.1. Es gibt aber auch zwischenmolekulare Prozesse, die zwar die Quantenausbeute, aber nicht das Abklingverhalten beeinflussen. Diese Prozesse finden dann in einem anderen als dem fluoreszierenden Zustand statt, z. B. die Bildung von Löschkomplexen im Grundzustand (statische Löschung).

Measurement of the excitation spectrum of fluorescence also may be an important method to identify traces of organic impurities.

The fluorescence lifetime τ_F is the reciprocal of the sum of rate constants of all processes, which contribute to the deactivation of the fluorescent excited state; if these processes are exclusively intramolecular, then it holds

$$\tau_F = (k_T + k_{IC} + k_{ISC})^{-1},$$

where

k_T is the rate constant for radiative deactivation, which is determined exclusively by the electronic properties of the molecule.

k_T^{-1} is called natural lifetime or radiative lifetime, respectively. As a rule, it is the larger, the weaker the corresponding absorptive transition is.

k_{IC} is the rate constant of internal conversion (transformation of electronic in vibrational energy and radiationless deactivation of the latter)

k_{ISC} is the rate constant of singlet-triplet conversion ("intersystem crossing").

The more dominant k_T is in relation to both radiationless processes, the higher is the fluorescence quantum yield Φ_F ; it represents the ratio of the number of emitted and absorbed photons; it holds

$$\Phi_F = k_T(k_T + k_{IC} + k_{ISC})^{-1}$$

The definitions of Φ_{IC} and Φ_{ISC} are analogously; they represent the portion of excited molecules, which deactivate via internal conversion and via intersystem crossing, respectively.

All intermolecular processes, which become effective during the lifetime of the fluorescent excited state, contribute to the decay and diminish the fluorescence quantum yield, e.g. impacts with so-called fluorescence quenchers (called dynamical quenching); other types of such processes are indicated in Fig. 2, chap.1.2. On the other hand, there are also intermolecular processes, which influence the fluorescence quantum yield, but not the decay. These processes take place in another state than the fluorescent state, one example is the formation of quenching complexes in the ground state (static quenching).

Ein weiteres informatives Charakteristikum der Fluoreszenz ist deren Polarisierung: Wird mit monochromatischem, linear polarisiertem Licht in eine isotrope Molekülverteilung eingestrahlt, so werden bevorzugt jene Moleküle angeregt, deren Übergangsdipolmoment parallel ist zur Polarisationsrichtung, d.h. es entsteht durch diese sog. Photo-selektion eine anisotrope Verteilung angeregter Moleküle. Wenn diese Moleküle fluoreszieren, dann ist auch die Fluoreszenz anisotrop, d.h. bevorzugt in einer Richtung polarisiert. Diese Anisotropie berechnet sich aus den parallel und senkrecht zur Anregungspolarisation gemessenen Fluoreszenzintensitäten I_p und I_s zu

$$A = (I_p - I_s) (I_p + 2 I_s)^{-1}$$

Diese Anisotropie ist maximal, wenn während der Fluoreszenzlebensdauer keinerlei Rotationsdiffusion erfolgt („rigid systems“) und kein Energietransfer.

Dann gilt

$$A = (3 \cos^2 \delta - 1)/5,$$

wobei δ den Winkel zwischen Absorptions- und Emissions-Übergangsdipolmoment darstellt, der sich also auf diese Weise experimentell ermitteln lässt. So ergibt sich beispielsweise im Fall von parallelem Absorptions- und Emissions-Übergangsmoment ein Wert

$$A=2/5.$$

Sind hingegen diese beiden Übergangsmomente senkrecht zueinander (möglich z.B. bei Anregung in den Zustand S_2 und Fluoreszenz aus S_1), dann ergibt sich der Wert

$$A=-1/5.$$

Der andere Extremfall, in dem sich während der Fluoreszenzlebensdauer die angeregten Moleküle bereits vollständig isotrop verteilen, ergibt den Wert

$$A=0.$$

Für die meisten Moleküle, insbesondere auch biomolekulare Systeme, liegt der Wert für die Fluoreszenz-Anisotropie zwischen den genannten Grenzfällen; die durch Photo-selektion erzeugte Fluoreszenz-Anisotropie klingt während der Fluoreszenzlebensdauer nur partiell ab. Hier liefert die statische und insbesondere auch die zeitaufgelöste Anisotropiemessung (Kurzpulsanregung) interessante Zugänge beispielsweise zu schnellen Energietransferprozessen und zur Bewegung, Größe und Form von Makromolekülen, letzteres zugänglich gemacht über starr angekoppelte Fluoreszenzsonden.

Another informative characteristic of fluorescence is their polarization: if molecules in an isotropic distribution are irradiated by monochromatic, linearly polarized light, then preferentially those molecules with transition dipole moment parallel to the direction of polarization become excited, which means that because of this so-called photoselection an anisotropic distribution of excited molecules occurs. If these molecules fluoresce, then also the fluorescence is anisotropic, i.e. is polarized preferentially in one direction. If I_p and I_s are the intensities of fluorescence parallel and perpendicular to the polarization of excitation, then the anisotropy A is calculated according to

$$A = (I_p - I_s) (I_p + 2 I_s)^{-1}$$

This anisotropy is maximal, if during the lifetime of the fluorescent state there is no rotational diffusion (so-called rigid systems) and no energy transfer.

Then it holds

$$A = (3 \cos^2 \delta - 1)/5,$$

with δ as the angle between the transition dipole moments of absorption and emission, respectively, which this way can be determined experimentally. For example, in case of parallel orientation of these moments it holds

$$A=2/5.$$

In case of perpendicular orientation (which may be the case for excitation to S_2 and fluorescence from S_1) it holds

$$A=-1/5.$$

In the other extreme case, if during the lifetime of the fluorescent state the excited molecules become completely isotropically distributed, it holds

$$A=0.$$

For most of the molecules, especially also for biomolecular systems, the fluorescence anisotropy is within these limiting cases; it decays during the fluorescence lifetime only partially. Here the static and especially the time-resolved measurement of the anisotropy (the latter realized by short-pulse excitation) gives informative access to rapid energy transfer processes as well as to movement, size and shape of macromolecules, measured e.g. via rigidly coupled fluorescent probes.

2

Hauptanwendungen der Wechselwirkung von Materie mit Laserstrahlung

Main applications
of the interaction of matter
with laser radiation

- 2.1 Molekulare Lumineszenzspektroskopie und -analytik
2.1 Molecular luminescence spectroscopy and analytics

- 2.2 MALDI-TOF
2.2 MALDI-TOF

- 2.3 Opto-Akustik LIOAS
2.3 Opto-acoustics LIOAS

- 2.4 LIPS
2.4 LIBS

2.1

Molekulare Lumineszenz-
spektroskopie und -analytik

Molecular luminescence
spectroscopy and analytics

Die wesentlichsten Anwendungen der molekularen Lumineszenz lassen sich in drei Kategorien einteilen:

1) Lumineszenzspektroskopie zur Aufklärung von Photophysik, Photochemie (in der in Abb. 2, Kap. 1.1 gezeigten Mannigfaltigkeit) und Strukturzusammenhängen für das emittierende Molekül selbst (unter den Einflüssen seiner jeweiligen Mikro-Umgebungsparameter. Ein komplexes Beispiel hierfür ist die (Bakterio)Chlorophyll-Fluoreszenz als universeller Informationsträger zu photosynthetischen Lichtsammelungs-, Energietransfer- und Energiedissipations-Prozessen im Zusammenhang mit strukturbedingten exzitonischen Pigmentkopplungen.

2) Einsatz des emittierenden Moleküls als molekulare Sonde bei der Untersuchung komplexer biologischer, biochemischer oder physikochemischer Systeme („fluorescent probes“). Typische Fragestellungen sind dabei z.B. die Dynamik von Polymerketten; Lipid-Protein-Wechselwirkungen und Licht-induzierte Änderungen in biologischen Membranen; Bindungsorte, Konformations-Übergänge, Denaturierung, Dynamiken und Geometrien in Proteinen; Wechselwirkungen von Zellen untereinander und von Zellen mit Viren. Dabei kann diese fluoreszierende Sonde (i) selbst Bestandteil des zu untersuchenden Systems sein (intrinsic probes), dies ist der (seltene) Idealfall, ein Beispiel ist Tryptophan in Proteinen; (ii) kovalent an das zu untersuchende System gebunden sein (extrinsic covalently bound probes), z. B. Fluorescein-Derivate, die über geeignete funktionelle Gruppen verfügen, um kovalent an Aminosäuren zu binden. Insgesamt ist dieser Fall aber auch nicht sehr häufig wegen der Schwierigkeit der Synthese von Makromolekülen mit kovalent gebundenen spezifischen fluoreszierenden Sonden; (iii) mit dem zu untersuchenden System nicht-kovalent assoziiert sein (extrinsic associating probes). Das ist der hauptsächlichste Fall. Der Ort der Solubilisierung der Sonde im zu untersuchenden System hängt ab von der chemischen Natur der Sonde und der am Ort induzierbaren spezifischen Wechselwirkung. Im einfachsten Fall ist eine Sonde Indikator einer hydrophilen oder hydrophoben Umgebung.

Die Fälle (ii) und (iii) enthalten als mögliche Komplizierung der Interpretation die lokale Störung des Systems durch die eingeführte fluoreszierende Sonde; diese Störung wird

The essential applications of molecular luminescence can be subdivided into the following three categories:

1) Luminescence spectroscopy is used to enlighten the photophysics, photochemistry (in the variety as shown in Fig. 2, cap. 1.1) and structural relationships for the emitting molecule itself (in dependence on the parameters of its micro-environment). In this respect, a comprehensive example is the (bacterio)chlorophyll fluorescence as a universal carrier of information about photosynthetic light harvesting, energy transfer, as well as energy dissipation processes in relation to structure-based excitonic couplings of pigments.

2) Use of the emitting molecules as fluorescent probes in the investigation of complex biological, biochemical or physico-chemical systems. Typical problems in this respect are e.g. the dynamics of polymer chains; lipid-protein interactions and light-induced changes in biological membranes; positions of bonds, conformation changes, denaturation, dynamics and geometries in proteins; interaction of cells with each other and with viruses. In these cases,

(i) the fluorescent probe may be itself part of the system under investigation (“intrinsic probes”), this is the (rare) ideal case, one example is tryptophan in proteins; or (ii) an extrinsic fluorescent probe may be covalently bound to the system under investigation, fluorescein derivatives with functional groups for covalent bonding to amino acids are an example, but also this case is rather rare because of the difficulty to synthesize macromolecules with such covalently bound, specifically fluorescing probes; therefore (iii) extrinsic fluorescent probes non-covalently associated to the system under investigation represent the dominating application. The site of solubilization of the probe within the system depends on the chemical nature of the probe as well as on the inducible specific interaction at that site. In the simplest case, the fluorescent probe is an indicator of a hydrophilic or hydrophobic environment.

In cases (ii) and (iii) a possible complication of interpretation may be caused by a local perturbation of the system under investigation by the introduced fluorescent probe; this per-

Dr. D. Leupold
LTB Lasertechnik Berlin

hauptsächlich bestimmt durch die Größe und Form (Struktur) der Sonde in Relation zur sondierten Region.

3) Molekulare Emission als analytische Methode. Dabei kann das Zielobjekt der Analyse selbst fluoreszierend sein (direct fluorometric detection), z.B. Nachweis aromatischer Kohlenwasserstoffe, Protein-Nachweis in Blutserum oder in Milch, Nachweis bestimmter Drogen, Nachweis von Chlorophyll. Überwiegend sind aber indirekte Methoden erforderlich, z.B.

(i) Reaktion des Analyseobjekts mit einer Spezies unter Bildung einer fluoreszierenden Verbindung (üblicher Fall in der Flüssig-Chromatographie in Bio- und klinischer Chemie; die Bildung eines fluoreszierenden Komplexes ist auch die Grundlage für viele Ionen-Nachweisverfahren), bzw.

(ii) Fluoreszenz-löschende Kollision des Analyseobjektes mit einem Fluorophor (geeignet z.B. für den Nachweis von Gasen wie SO_2 , H_2S , oder auch von O_2 , z.B. gelöst in Wasser oder Blut). Ein für einen selektiven Spezies-Nachweis geeigneter Fluorophor wird molekularer Fluoreszenz-Sensor genannt. Ein auf einem solchen molekularen Fluoreszenz-Sensor basierendes komplettes Meßsystem für den selektiven Nachweis des entsprechenden Analyseobjektes, z.B. O_2 , wird häufig (auch) Fluoreszenz-Sensor genannt.

(iii) Es gibt auch solche molekularen Fluoreszenz-Sensoren für bestimmte System-Parameter, z.B. den pH-Wert. (In diesem Fall meist als „fluorescent pH indicator“ bezeichnet, solche sind z.B. Cumarine).

Für diese Anwendungen insbesondere in biologischen Systemen sind eine Reihe von standardisierten Techniken entwickelt worden, wie z.B. FRET, der mittels Fluoreszenz gemessene (Förster)-Resonanz-Energie-Transfer über interessierende und so zu ermittelnde Distanzen, FLIM, das „fluorescence lifetime imaging“ Lebensdauer-sensibler fluoreszierender Spezies, sowie FRAP („fluorescence recovery after photobleaching“), das die Laserbleichung von Sondenmolekülen für laterale Diffusionsmessungen, z.B. von Lipiden oder Proteinen, nutzt.

Zahlreiche dieser Anwendungen sind durch die Verfügbarkeit der Laser als Fluoreszenz-Anregungsquelle überhaupt erst möglich geworden bzw. in ihrem Informationsgehalt wesentlich verbessert worden. Zeitaufösungen im Femtosekundenbereich, Analytik im Femtoliterbereich, Fernerkundung im Kilo-

turbation is determined by the shape (structure) and the size of the probe in relation to the probed region.

3) Use of molecular emission as analytical method. In this case, the target of analysis itself may be fluorescent (direct fluorimetric detection); examples are the detection of aromatic hydrocarbons, proof of proteins in blood serum and milk, detection of drugs, detection of chlorophyll. Most cases represent indirect fluorometric detection, e. g.

(i) reaction of the object of analysis with a species which results in the formation of a fluorescent compound (this is the standard case in liquid chromatography application in biochemistry and clinical chemistry, it is also the basis of several methods to detect ions);

(ii) fluorescence-quenching collision of the object of analysis with a fluorophor (useful for the detection of gases like SO_2 , H_2S , also for O_2 , dissolved e.g. in water or blood). A fluorophor, suitable for such a selective detection of a species, is called molecular fluorescence sensor. Often the complete measuring device for selective detection based on such a sensor is also called fluorescence sensor, e.g. for O_2 .

(iii) There are also such molecular fluorescence sensors for certain system parameters, like pH. (This special case, represented e.g. by coumarines, is often called directly “fluorescent pH indicator”).

For these applications of molecular fluorescence spectroscopy especially in biological systems, a series of standardized techniques has been developed, e.g. FRET for the determination of intermolecular distances, based on the fluorescence measurement as result of Förster Resonance Energy Transfer, FLIM, the Fluorescence Lifetime IMaging of lifetime-sensitive fluorescent species, FRAP for the determination of lateral diffusion coefficients, e.g. of lipids or proteins, based on the laser bleaching of molecular probes (Fluorescence Recovery After Photobleaching).

Many of these applications of molecular fluorescence spectroscopy and analytics either has become possible only since the availability of lasers as excitation source of fluorescence, or lasers essentially improved their content of information. Some of these highlights are time resolution in the femtosecond range,

meterbereich, Ortsauflösung im Nanometerbereich und nicht-invasive optische Biopsien sind einige der Highlights. (In diese Kategorie gehört auch die nachstehend beschriebene diagnostische Anwendung einer Gewebefluoreszenz nach Femtosekundenlaser-basierter stufenweiser Zweiphotonen-Absorption).

Anwendungsbeispiel

Fluoreszenzanalyse des Melanins mit Hilfe des Femtosekundenlasers (Hautkrebsfrüherkennung)

Fluoreszenzmethoden spielen in der Differenzialdiagnostik des malignen Melanoms bisher keine Rolle. Mittlerweile steht ein Femtosekundenlaser-basiertes mobiles Gerät zum klinischen Testbetrieb bereit. Dieses ermöglicht die fluoreszenzspektroskopische Identifizierung selbst kleinster Tumoreareale. Das Verfahren basiert auf einem neuen Mechanismus einer stufenweisen Zweiphotonenabsorption von Melanin.

Die Rolle von Melanin im menschlichen Hautgewebe ist zweischneidig: Einerseits ist Melanin für die Pigmentierung der Haut verantwortlich und schützt sie als natürlicher „Sonnenschirm“. Andererseits spielt Melanin bei der Entartung gesunden Gewebes zum malignen Melanom eine Schlüsselrolle. Es liegt daher nahe, für die Differenzialdiagnostik des malignen Melanoms auch nach einer auf Melanin basierenden Methode zu suchen. Allerdings führten Untersuchungen in dieser Hinsicht, insbesondere was die Fluoreszenz-Methoden betrifft, lange Zeit zu keinem Erfolg.

Dafür gibt es zwei Gründe: Zum einen lag dies daran, dass die Fluoreszenz des Melanins außerordentlich schwach ist; nur etwa jedes zehntausendste Photon, das für die Anregung vom Melanin absorbiert wird, wird als Fluoreszenz re-emittiert (d.h. die Fluoreszenz-Quantenausbeute beträgt etwa 10^{-4} , der überwiegende Teil des Anregungslichtes wird in thermische Energie umgewandelt). Zum anderen unterscheiden sich die Fluoreszenzspektren von normalem Hautgewebe und malignem Melanom nur geringfügig (Abb. 5), wenn sie auf konventionelle Weise durch Einphotonenabsorption angeregt werden (Abb. 6a). Darüber hinaus können andere körpereigene Stoffe mit höherer Fluores-

remote sensing in the kilometer range, local resolution in the nanometer range as well as non-invasive optical biopsies. (To this category belongs also the subsequently described diagnostic application of a tissue fluorescence excited via a femtosecond laser-based stepwise two-photon absorption).

Application example

Femtosecond laser-based analysis of melanin fluorescence (Early diagnosis of black skin cancer)

Up to today, fluorescence-based methods do not play any role in the differential diagnosis of malignant melanoma. Now, a femtosecond laser-based equipment is ready for clinical testing, which will allow fluorescence spectroscopic identification of even smallest areas of tumorous skin tissue. The method is based on a novel mechanism of stepwise two-photon absorption of melanin.

The role of melanin in human skin may be characterized as a two-edged sword: On the one hand, melanin is responsible for pigmentation of skin and its parasol-like protection. But, on the other hand, melanin also plays a key role in the malignant degeneration of healthy skin tissue. Therefore it seemed well-grounded to look for a melanin-based diagnosis method for malignant melanoma. Until quite recently however, such investigations were not successful, especially with fluorescence.

There are two reasons for it: firstly, the fluorescence of melanin is extremely weak; only about each tenthousandth of the absorbed photons is re-emitted as fluorescence, i.e. the fluorescence quantum yield is about 10^{-4} , the predominant portion of the absorbed excitation energy is transformed to thermal energy. Secondly, the fluorescence spectra of healthy tissue and of malignant melanoma (when measured in the conventional way by one-photon excitation, Fig. 6a) differ only very slightly (Fig. 5) and moreover, the fluorescence of other endogeneous fluorophors with considerably higher fluorescence quantum yield like NADH, tryptophane, flavins may additionally mask this

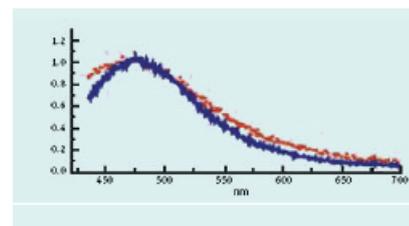
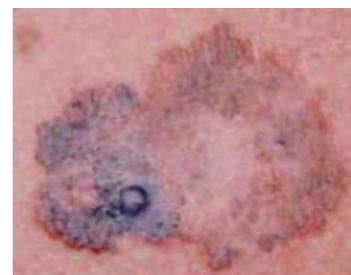


Fig. 5) Fluorescence spectra of excised samples of human skin tissue, obtained by conventional one-photon excitation at 400 nm (Fig. 6a). Blue: normal healthy tissue; red: malignant melanoma (nodular melanoma, Clark level 4, tumor thickness 1.7 mm according to Breslow).

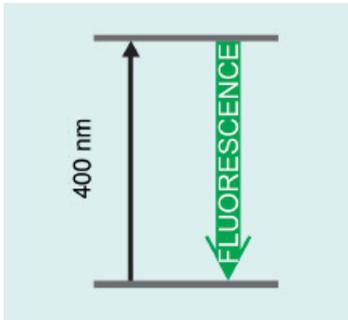
Schematic representation of
fluorescence excitation

Fig. 6a)
in the conventional manner by
absorption of one photon

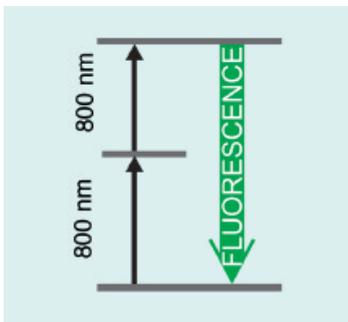


Fig. 6b)
by stepwise (subsequent) absorption
of two photons of half the energy
(twice of the wavelength) as com-
pared to case a).

zenausbeute (endogene Fluorophore, z.B. NADH, Tryptophan, Flavine) selbst diese geringen Unterschiede überstrahlen. Auch der Einsatz von Fluoreszenzmarkern konnte an dieser Situation nichts ändern.

Eine auf Melanin basierte Diagnostik führte also bisher nicht zum Erfolg, darüber hinaus gibt es generell noch keine nicht-invasive Früherkennungsmethode für das maligne Melanom. Grundsätzlich muss eine solche Methode zwei Bedingungen erfüllen; adaptiert auf eine auf Melaninfluoreszenz basierende Methode lauten diese:

- Selektivität, insbesondere auch unter in-vivo Bedingungen, d.h. die Melaninfluoreszenz muß ungestört von anderen Stoffen, insbesondere endogenen oder exogenen Fluorophoren, messbar sein.
- Die maligne Entartung muß die selektierten Fluoreszenz-Messparameter spezifisch und signifikant verändern.

Die Lösung des Problems, d. h. ein neuer Zugang zur Melaninfluoreszenz in-vivo, ergab sich erst kürzlich, als man sich die ungewöhnlichen Absorptionseigenschaften von Melanin im langwelligen Spektralbereich zu Nutze machte: Melanin verfügt vom nahen Ultraviolett bis hin zum nahen Infrarot über eine stetig abnehmende Absorptionsstärke, d.h. sein Absorptionsspektrum ist eine monoton fallende Kurve. Damit verhält sich Melanin nicht nur vollkommen anders als die meisten organischen Verbindungen, deren Absorption auf bestimmte begrenzte Spektralbereiche konzentriert ist und die damit über ein Bandenspektrum verfügen, sondern es wird auch möglich, Melanin als Einzelkomponente zu messen, indem es in einer Spektralregion angeregt wird, in der keine andere Hautkomponente absorbiert und folglich auch nicht zur Fluoreszenz angeregt wird. Ein solcher Spektralbereich liegt z.B. bei und um 800nm. Zwar ist die Energie eines 800 nm-Photons zu gering zur Anregung der Melaninfluoreszenz, aber dank eines kurzlebigen energetischen Zwischenniveaus kann Melanin ein zweites 800 nm-Photon absorbieren und erreicht über diese stufenweise Zweiphotonen-Absorption das Fluoreszenzniveau (Abb. 6b). Das Fluoreszenzspektrum des auf diese Weise selektiv angeregten Melanins widerspiegelt die maligne Entartung des Hautgewebes spezifisch und signifikant: Die signifikante Veränderung des Fluoreszenzspektrums ist beispielhaft in Abb. 7 gezeigt; die maligne Entartung verschiebt das Fluoreszenzmaximum ins Rote. An einer breiten

difference. Experiments with markers did not improve the situation.

In summary, till now the general criteria of a clinical method for early detection of malignant melanoma could not be fulfilled.

- Such criteria, adapted to the aim of melanoma detection by fluorescence, are
- selectivity of the method (especially also in-vivo, this means exclusion of any disturbance by endogeneous or exogeneous fluorophores), and
 - the malignant degeneracy parameter must change the selected fluorescence parameter specifically and significantly.

The solution of the problem, i.e. a new approach to the melanin fluorescence in-vivo, could be found only recently by making use of the unusual absorption behaviour of melanin. Its spectrum between the UV and the near IR shows a monotonously decreasing shape, whereas other organic compounds typically show absorption bands in distinct spectral regions. Due to this special absorption, it is possible to excite melanin in a spectral range, where no other components of skin tissue absorb and therefore do not fluoresce. Such spectral range e.g. is at and around 800 nm. The energy of one 800 nm-photon is too small to induce the melanin fluorescence. But thanks to an intermediate energy level melanin can absorb a second 800 nm-photon, and via this stepwise two-photon absorption melanin reaches the fluorescent level (Fig. 6b).

The fluorescence spectrum of the this way selectively excited melanin reflects specifically and significantly a malignant degeneration of skin tissue. The significant change of the spectral shape of the fluorescence is shown exemplarily in Fig. 7: the malignant degeneration shifts the maximum towards the red. Investigation of a broad range of other skin diseases like basal cell carcinoma, fibroma, keloid, balanitis, squamous cell carcinoma showed, that this spectral red shift of the fluorescence occurs exclusively with malignant melanoma. The cause of this shift is a changed ratio of pheomelanin to eumelanin: In the process of malignant degeneration this ratio changes in favour of pheomelanin. This

Palette von exzidierten Gewebeproben von anderen Hauterkrankungen (z.B. Basalzellkarzinom, Fibrom, Keloid, Balanitis, Plattenepithel-Karzinom) konnte belegt werden, daß der Effekt der Rotverschiebung der Fluoreszenz ausschließlich beim malignen Melanom auftritt. Ursache dieser Fluoreszenzverschiebung ist ein verändertes Verhältnis von Pheomelanin zu Eumelanin. Im Prozess der malignen Entartung verschiebt sich das Verhältnis zugunsten von Pheomelanin. Dies ergab die laser-fluoreszenz-spektroskopische Charakterisierung verschiedener präparierter Melaninspezies.

Die Untersuchungen ergaben auch, daß sich eine zweite Eigenschaft der Fluoreszenz im Prozess der malignen Entartung ändert: Die Abklingzeit der Melaninfluoreszenz ist beim malignen Melanom deutlich verkürzt gegenüber der von gesundem Gewebe. Auch dies ist auf das geänderte Pheomelanin/Eumelanin-Verhältnis zurückzuführen: Die Fluoreszenzlebensdauer von Pheomelanin ist kürzer als die von Eumelanin.

Mit der Selektivität der Anregung und der demonstrierten Spezifität und Signifikanz der Fluoreszenz sind beide Voraussetzungen für eine zuverlässige Früherkennung des malignen Melanoms mit Hilfe der Fluoreszenzdiagnostik erfüllt.

Als Strahlenquelle für die stufenweise Zweiphotonenanregung dient der Femtosekundenlaser. Er liefert die erforderliche hohe Intensität während der ultrakurzen Impulsdauer und erfüllt damit die Forderung nach optischer Präparation einer hinreichend hohen Konzentration fluoreszierender Spezies im Hautgewebe, ohne das Gewebe selbst zu beeinträchtigen. Zudem erlaubt die Fokussierung der Laserstrahlung auch eine Frühdiagnostik an kleinsten Arealen.

Nachdem die Grundlagenuntersuchungen an exzidierten Gewebeproben an Laboraufbauten mit ortsfesten Femtosekundenlasern erfolgreich abgeschlossen wurden, wird gegenwärtig ein erstes mobiles, auf verstärkter Femtosekunden-Faserlaserstrahlung basierendes Fluoreszenzdiagnostikgerät für maligne Melanome für den klinischen Einsatz getestet (MLS 200, LTB Lasertechnik Berlin).

could be concluded from laser-fluorescence spectroscopic investigations of prepared different melanin species.

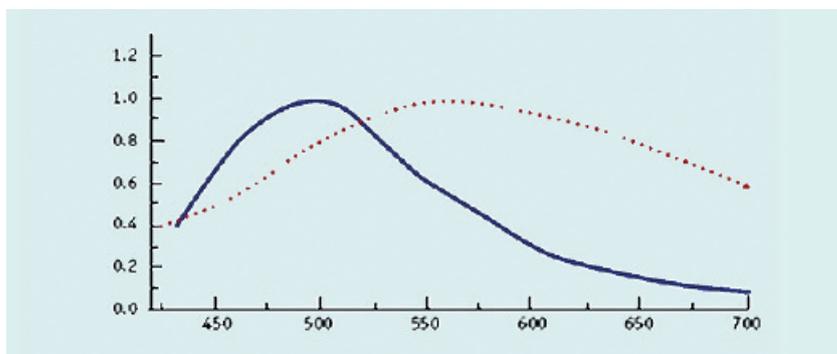


Fig. 7) Fluorescence spectra of excised samples of human skin tissue (the same as in Fig. 5), obtained by stepwise two-photon excitation by an 800 nm-photon emitting femtosecond laser (Fig. 6b). Blue: normal healthy tissue; red: malignant melanoma (nodular melanoma, Clark level 4, tumor thickness 1.7 mm according to Breslow).

The investigations also showed, that in the process of malignant degeneration a second fluorescence property changes: The decay time of the fluorescence of the malignant melanoma is distinctly shortened as compared to the fluorescence decay from healthy tissue. Also this is caused by the changed pheomelanin/eumelanin ratio. The fluorescence lifetime of pheomelanin is shorter than that of eumelanin.

With the demonstrated significance as well as specificity both the suppositions of a reliable early diagnosis of malignant melanoma by fluorescence diagnostics are fulfilled.

As light source for the stepwise two-photon excitation of the fluorescence of skin tissue a femtosecond-pulse laser is used. It delivers the necessary high intensity during the short pulse duration, which in one realizes the optical preparation of a sufficient concentration of fluorescent species and avoids tissue damage. Moreover, due to the ability to focus the laser radiation early diagnosis on very small skin areas is possible.

After successfully finishing the basic research with laboratory equipments at stationary femtosecond lasers, a first mobile, intensified femtosecond fiber laser-based device for fluorescence diagnostics of malignant melanoma (MLS 200, LTB Lasertechnik Berlin) is tested for clinical use.



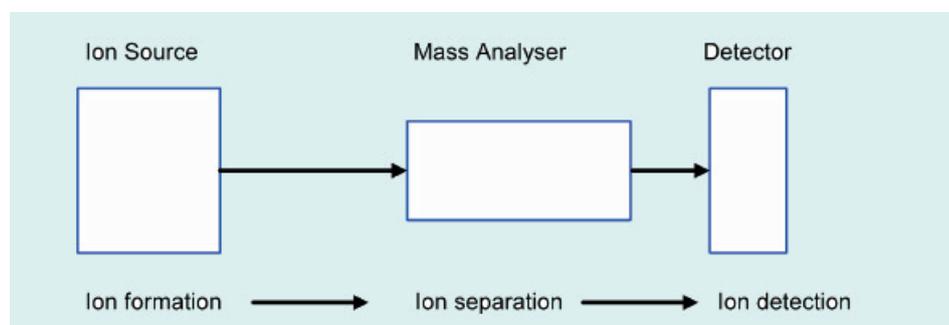
12.2

MALDI-TOF
MALDI-TOF

Einführung

Massenspektrometrie ist eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse von freien Ionen im Hochvakuum mit Hilfe eines Massenspektrometers.

Solch ein Gerät (Abb. 8) besteht aus einer Ionenquelle, wo ein Strahl von gasförmigen Ionen aus einer Probe gebildet wird, einem Massenanalysator, der die Ionen bzgl. ihres Masse-Ladungsverhältnisses (m/z) trennt, und einem Detektor, der das Massenspektrum liefert. Letzteres zeigt, welche Ionen in welchen relativen Mengen gebildet werden.



Seit den 70er Jahren des vorigen Jahrhunderts wurden Lasergeräte in der massenspektrometrischen Analyse verwendet, um eine direkte Desorption von intakten Molekül-Ionen aus kondensierten Gasphasen durch eine geeignete Primäranregung zu erreichen. Während dieser anfänglichen Versuche wurde eine dünne Schicht der Proben auf einer Metalloberfläche platziert, um durch einen gepulsten Laser bestrahlt zu werden. Jedoch waren Massenspektren, die aus diesem Herangehen resultierten, von geringerer Intensität, außerdem war die Laserintensität so hoch, dass molekulare Fragmentierung der Probenmoleküle verursacht wurde. Deshalb war die Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (LDI-MS) von geringem praktischen Nutzen für die Analyse von Biomolekülen, da nur Ionen eines Molekulargewichts von unter 1000 Da detektiert werden konnten.

Diese Situation änderte sich völlig, als M. Karas und F. Hillenkamp von der Universität Münster den Wechselwirkungsprozess zwischen UV-Laserstrahlung und organischen Molekülen untersuchten. Sie fanden heraus, daß durch die Einbettung der Probe in ein geeignetes Matrixmaterial aus kleinen organischen Molekülen das Laserlicht stark

Introduction

Mass spectrometry is an analysis technique to determine by means of a mass spectrometer the molecule mass of free ions in the high vacuum.

A mass spectrometer (Fig. 8) consists of an ion source where a beam of gaseous ions is formed from a sample, a mass analyzer that separates the ions regarding their mass-charge-ratio (m/z), and a detector to deliver a mass spectrum. The latter shows which ions in which relative quantities are formed.

Since the 1970's laser devices were employed in mass spectrometric analysis to achieve a direct desorption of intact molecule ions from condensed gas phases by a suitable primary excitation. During these initial attempts a thin layer of the samples was placed on a metal surface to be irradiated by a pulsed laser. However, mass spectra resulting from these approaches were of less intensity, as the laser energy was sufficient enough to cause molecular fragmentation of the sample molecules. Therefore the laser desorption ionization mass spectrometry (LDI-MS) was of less practical use for the analysis of bio molecules since only ions of a molecular weight below 1000 Da could have been detected.

This situation changed entirely as M. Karas and F. Hillenkamp from the University of Münster inspected the correlation process between UV laser irradiation and organic molecules. They figured out that embedding the sample into suitable matrix material, consisting of small organic molecules, the laser light was strongly absorbed and

Dr. J. Höhndorf
Bruker Daltonik GmbH

Fig. 8)
Components of a mass spectrometer

absorbiert wurde und somit nicht nur höhere Intensitäten des Analyten erzielt wurden, sondern auch Probenfragmentationen auf ein Minimum reduziert wurden. Diese Methode, MALDI-MS (Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation) genannt, gestattet es nun, große Moleküle wie Proteine zu detektieren.

Mit MALDI verknüpfte Analysatoren sind Flugzeit (TOF)-Instrumente, wo die Massenbestimmung im Hochvakuumbereich durch eine sehr präzise Messung der Zeitperiode nach dem Beschleunigungsprozeß der Ionen in der Quelle und ihrem Auftreffen auf den Detektor erfolgt. Diese Kombination wird als MALDI-TOF abgekürzt.

Grundlagen

Der erste Schritt der Massenspektrometrie ist die Erzeugung der Ionen. Die Ionisation des Analytmoleküls wird durch die Aufnahme oder den Verlust eines Elektrons erreicht. Dieser Prozeß kann durch Elektronenstoß (EI), Beschuß der Probe mit Atomen oder Ionen (FAB), oder durch Photonen (Laser Desorption/Ionisation, LDI) ausgelöst werden. Ein weiterer Ionenbildungsprozeß wird als Elektrospray-Ionisation bezeichnet, wo eine gelöste Probe in ein elektrisches Feld gesprüht wird.

Die Ionenformation im MALDI-Verfahren geschieht folgendermaßen: Das Mischen eines Analyten auf einer Metallproben-Sonde mit einer geeigneten Matrixverbindung von einem 1000 bis 10000 fachen molaren Überschuß, die die verwendete Laserwellenlänge absorbiert, verursacht einen Kokristallisationsprozeß sowohl der Matrix als auch des Analytenmaterials nach der Verdampfung des Lösungsmittels. Die Einbettung der Probenmoleküle in die Gitterstruktur der Matrix soll die Voraussetzung dafür bilden, daß der Laser Desorptions-/Ionisierungsprozeß funktioniert.

Die kristallisierte Oberfläche der präparierten Probe wird dann im Hochvakuumbereich innerhalb der Ionenquelle des Massenspektrometers einem intensiven kurzwelligeren Laserpuls ausgesetzt. Die Einkopplung der Energie, die notwendig ist für die Ionen, erfolgt mittels UV-Strahlung durch resonante Anregung der Matrixmoleküle, z.B. des π -Elektronen-Systems

thus not only higher intensities of the analyte were obtained but also sample fragmentation was reduced to a minimum. This method denoted MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) allows now detecting large molecules such as proteins.

Analyzers associated with MALDI experiments are Time-Of-Flight instruments where the mass determination in the high vacuum area is performed by a very precise measurement of the period of time after the acceleration process of the ions in the source and their impact on the detector, this combination is called MALDI-TOF.

Basics

The first step of mass spectrometry is ion formation. Ionization of the analyte molecule is performed by reception or loss of an electron. This process can be initiated by electron impact (EI), bombarding the sample with atoms, or ions (Fast Bombardment Ionization, FAB), or by photons (Laser desorption/ionization, LDI). A further ion formation process is denoted Electro Spray Ionization (ESI) where solved sample is sprayed into an electrical field.

Ion formation in the MALDI process works as follows: mixing an analyte on a metal sample probe with a suitable matrix compound of a 1.000 up to 10.000 times molar excess absorbing at the used laser wavelength, causes a cocrystallization process of both matrix and analyte material after evaporation of the solvent. The incorporation of the sample molecules into the lattice structure of the matrix is supposed to be the precondition that the laser desorption/ionization process will work.

The crystallized surface of the prepared sample is then exposed to an intensive, short wave laser pulse in the high vacuum area inside the ion source of the mass spectrometer. The coupling of the energy, which is necessary for the ions, is performed on UV radiation by resonant excitation of the matrix molecules, e.g. into the π -electron system of aromatic compounds. Theoretical

aromatischer Verbindungen. Theoretische Berechnungen lassen vermuten, daß die Anregungsenergie, die zunächst in den Matrixmolekülen gespeichert ist, in extrem kurzen Zeiten in die Festkörpergitter relaxiert und hier eine starke Störung der Ausdehnung verursacht. Diesem Prozeß folgt ein Übergang in eine Phase, in der ein Teil der festen Oberfläche explosiv verdampft, lange bevor ein thermisches Gleichgewicht auftritt. Bei diesem Schritt werden sowohl Matrix-Moleküle als auch Probenmoleküle in die Gasphase freigesetzt (Abb. 9). Offensichtlich sind die inneren Freiheitsgrade der Moleküle, die an diesem Prozeß teilnehmen, gering genug, so daß sogar thermisch labile Makromoleküle wie Proteine in diesem Prozeß Bestand haben. Dies gilt jedoch nur für einen begrenzten Bereich von Strahlungsleistung zwischen 10^6 und 10^7 W/cm², der auf die Probe trifft. Eine zu hohe Strahlung zerstört die Probe zum großen Teil. Viele Experimente zeigen, daß die Matrix auch als ein Agens zu betrachten ist, das die Probenmoleküle ionisiert. Entsprechend photoionisiert verursachen Matrixmolekülradikale durch den Transfer von Protonen einen hohen Ertrag an elektrisch geladenen Probenmolekülen. Eine Elektrode, welche einige mm abseits gegenüber der Probenposition befestigt ist, dient dazu, ein elektrostatisches Feld im Bereich von einigen bis einigen tausend V/cm zu erzeugen. Abhängig von der Polarität werden positiv oder negativ geladene Ionen von der Probenoberfläche hin zum Analysator beschleunigt.

calculations let suppose that the excitation energy being stored in the matrix molecules relaxes in extremely short time periods into the solid-state lattices causing here a strong distortion of the expansion. This process is followed by transition into a phase in which a part of the solid-state surface is vaporized explosively long before a thermal balance occurs. In this step matrix molecules and sample molecules as well are released into the gas phase (Fig. 9). Obviously the internal degree of freedom of the molecules sharing this process is low enough that even thermal labile macromolecules such as proteins endure this process. However this is only valid as long as a limited range of irradiation power on the sample between 10^6 and 10^7 W/cm² is concerned. Too a high radiation destroys the sample to a great extent. A lot of experiments indicate that the matrix is also considered an agent ionizing the sample molecules. Accordingly photo ionized, radical matrix molecules cause by transferring protons a high yield of electrically charged sample molecules. An electrode, which is mounted some mm apart opposite to the sample position, is used to generate an electrostatic field in the range of some to some 1000 V/cm. Depending on the polarity positively or negatively charged ions are accelerated from the sample surface towards the analyzer.

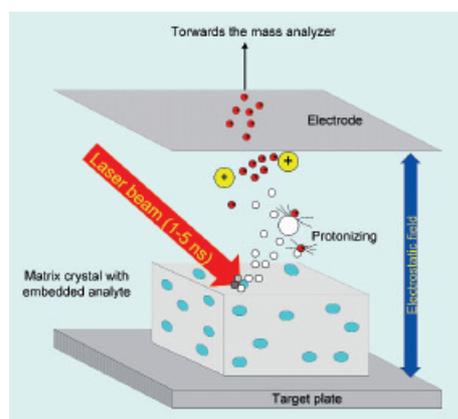


Fig. 9)
Principle of the MALDI-Process

Lasergeräte, die in MALDI Experimenten verwendet werden, sind UV-Laser, wie Nd:YAG-Laser bei Pulsbreiten von 5-15 ns und bei Wellenlängen von 355 nm (frequenzverdreifacht) oder 266 nm (frequenzvervieracht), bzw. N₂-Laser, die bei einer Wellenlänge von 337 nm mit einer Pulsdauer von 1-5 ns arbeiten. Für den Infrarot-Bereich stehen Er:YAG-Laser zur Verfügung, die bei einer Wellenlänge von 2,94 µm mit einer Pulsdauer von 90 ns arbeiten. Der Strahl wird durch eine geeig-

Laser devices employed in MALDI experiments are UV lasers, such as Nd-YAG lasers (Yttrium-aluminum-garnet-crystals doped with neodymium) at pulse durations of about 5-15 ns and at wavelengths of 335 nm (tripled frequency) or 266 nm (quadrupled frequency) respectively or N₂-lasers operating at a wavelength of 337 nm with a pulse duration of 1-5 ns. Concerning the infrared range Er:YAG-lasers (Yttrium-aluminum garnet-crystals doped with erbium) are at the disposal working at a wavelength of

nete Optik auf die Probe innerhalb der Ionenquelle auf einen Durchmesser von $\leq 150 \mu\text{m}$ fokussiert.

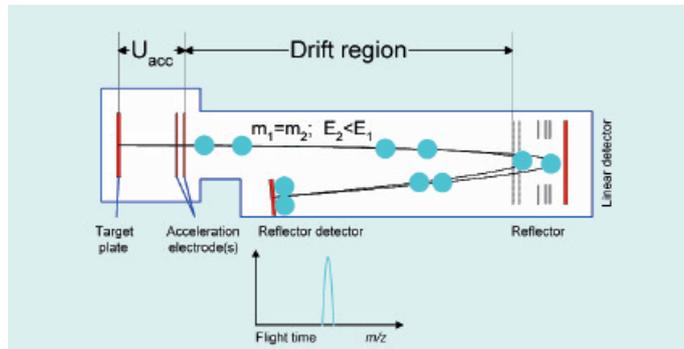
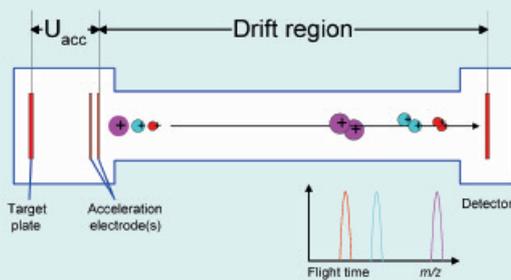
Ein spezieller Punkt bei MALDI ist die Präparation der Matrix. Das Prinzip der MALDI-MS geht von der Isolierung des Analyten-Moleküls im Festkörper des kristallisierten Matrix-Materials aus. Wie bereits erwähnt ist eine der Anforderungen an die Matrix-Moleküle, daß sie die eingestrahnten Laserphotonen absorbieren. Hinzu kommt, daß die Analytmoleküle in die Gitterstruktur der Matrix in einer Weise eingebaut werden müssen, die ihre intermolekularen Wechselwirkungen neutralisiert. Jedoch sind zur Ko-Kristallisation nur wenige in UV absorbierende Verbindungen befähigt. Z. B. kann von allen möglichen Dihydroxy-Derivaten der Benzoesäure nur die 2,5-Dihydroxybenzoesäure verwandt werden.

Der zweite Schritt bei der Massenspektrometrie ist die Ionenseparation. Verwendet man das TOF-Verfahren, so beschleunigt ein elektrostatisches Feld die während eines kurzen Laserpulses innerhalb der Quelle gebildeten Ionen auf eine kinetische Energie von einigen keV. Nachdem sie

$2,94 \mu\text{m}$ with a pulse duration of 90 ns. The beam is focused by a suitable ion optics onto the sample inside the ion source to a diameter of $\leq 150 \mu\text{m}$.

A special point of MALDI is the matrix preparation. The principle of MALDI assumes the insulation of analyte molecules in solid crystallized matrix material. As mentioned before one of the requirements to the matrix molecules is absorbing the irradiating laser photons. Additionally the analyte molecules must be incorporated into the lattice structure of the matrix in a manner to neutralize their intermolecular correlation. However the property of co-crystallization is associated only with a few number of compounds absorbing at the UV range. For example, from all the possible dihydroxyderivates of the benzoic acid only the 2,5 dihydroxybenzoic acid can be used.

The second step of mass spectrometry is ion separation. Using the Time-Of-Flight method, an electro-static field accelerates ions formed during a short laser pulse inside the source to a kinetic energy of some keV. After leaving the source the ions pass a field free drift region in which they are separated due



*Fig. 10) and Fig. 11)
Reflector flight tube*

die Quelle verlassen haben, passieren die Ionen eine feldfreie Driftregion, in welcher sie entsprechend ihres m/z -Verhältnisses getrennt werden. Das geschieht, weil Ionen mit identischer kinetischer Energie, aber verschiedenen m/z -Werten in der Ionenquelle auf verschiedene Geschwindigkeiten beschleunigt werden. Bei Kenntnis der Beschleunigungsspannung und der Länge der Driftregion kann man das m/z -Verhältnis durch Messung der Flugzeit bestimmen.

Abb.10 und 11 illustrieren das Funktionsprinzip eines Flugzeit-Massenspektrometers im

to their m/z ratio. This takes place because at a fixed kinetic energy ions with different m/z values are accelerated in the ion source to different velocities. Knowing the acceleration voltage and the length of the drift region the m/z ratio can be determined by measuring the flight time.

Fig. 10 and 11 illustrate the principle how a TOF mass spectrometer works in linear and

linearen und im Reflektor-Modus. Von einem Laserpuls gebildete Ionen gleicher Ladung aber mit unterschiedlichen m/z -Werten werden auf verschiedene Geschwindigkeiten beschleunigt. Große Ionen mit hohen m/z -Werten treffen den Detektor später als kleine Ionen. Ionen mit gleichen Massen starten mit gewissen Energieunterschieden. Das beeinflusst in einem gewissen Maße die Pulsbreite. Indem man einen Reflektor verwendet, kann der Einfluß der Anfangsenergie auf die Flugzeit am Ort des Reflektordetektors kompensiert werden.

Für ein TOF-Instrument ist das Verhältnis der Molekülmasse zur Ladungszahl (m/z) proportional zum Quadrat der Flugzeit t . Somit kann die entsprechende Masse aus der gemessenen Flugzeit bestimmt werden. Die Kalibrierung erfolgt mit definierten Referenz-Massen. Der Bereich der typischen MALDI-Flugzeiten liegt zwischen einigen μs und einigen 100 μs . Die Driftregionen sind typischerweise 1 - 4 m lang.

Ein wichtiger Prozeß, der während des Beschleunigungsprozesses oder beim Passieren des Drift-Bereiches spontan stattfinden kann, ist Zerfall (Fragmentierung) der Molekülionen. Der Prozeß des metastabilen Zerfalls im Bereich der Driftregion wurde PSD (Post Source Decay) genannt.

Metastabiler Zerfall des Analyt-Ions geschieht durch die Absorption hoher Energien während MALDI durch Stoßanregungsprozesse innerhalb der Matrix-Wolke unmittelbar nach der Lasereinwirkung auf die Probe. Die Effizienz des metastabilen Zerfalls hängt von der Dichte der Matrixwolke nach dem Laserschuß ab, sowie von der kinetischen Energie im Stoßprozeß zwischen Analyt-Ionen und der Matrixwolke. Die Dichte der Matrixwolke hängt von der Laserintensität und der Temperatur ab, bei der die Matrix sublimiert. Die angelegte Beschleunigungsspannung bestimmt die Kollisionsenergie. In der Regel wird während des metastabilen Zerfalls ein geladenes Fragment-Ion sowie ein neutrales Fragment-Molekül gebildet.

In der Regel liefert die Analyse von PSD-Ionen nützliche Informationen bezüglich der Struktur der Originalmolekül-Ionen. Beispielsweise sind PSD-Analysen von Proteinen informativ im Zusammenhang mit Sequenzierungstechniken von Peptiden, da die Fragmentierung hauptsächlich entlang

reflector mode. Ions formed by the laser pulse of the same charge but with different m/z values are accelerated to different velocities. Large ions with high m/z values strike the detector at a later moment than small ions. Ions of the same mass start with a certain energy spread. This affects the peak width to a certain amount. Applying a reflector the influence of the initial energy on the flight time can be compensated at the location of the reflector detector.

Associated with a TOF instrument the relation of molecule mass and charge number (m/z) is proportional to the square of the flight time t . Thus the related mass can be determined from the measured flight time. Calibration is performed with well-known reference masses. The range of typical MALDI flight times is between few μs and some 100 μs . The drift regions are typically 1 - 4 m long.

An important process which may happen during the acceleration process, or when passing the drift region is a decay of molecule ions. The process of metastable decomposition in the area of the drift region was called PSD (Post Source Decay).

Metastable decomposition of the analyte ions happens by absorbing high energies during MALDI by collision excitation processes inside the matrix cloud immediately after the laser pulse has hit the sample. The efficiency of the metastable decomposition depends on the density of the matrix cloud after the laser shot and the height of the kinetic energy making analyte ions and matrix molecules collide. The density of the matrix cloud depends on the laser intensity and the temperature the matrix sublimates. The applied acceleration voltage defines the collision energy. Normally during metastable decomposition a charged fragment ion is formed and a neutral fragment molecule as well.

As a rule the analysis of PSD ions delivers useful information concerning the structure of the original molecule ion. For example, PSD analyses related to proteins benefit in sequencing techniques of peptides, since decompositions mainly occur along the peptide chain.

der Peptidkette erfolgt.

Der dritte Schritt bei der Massenspektrometrie ist der Ionen-Nachweis. Im allgemeinen besteht ein Ionen-Nachweissystem aus einem Sekundärelektronenverstärker. Dessen Funktionsprinzip ist so, daß auftreffende geladene oder neutrale Partikel Sekundärelektronen erzeugen, welche als elektrisches Signal am Ausgang des Detektors zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung stehen.

Moderne Detektoren, die in der massenspektrometrischen Flugzeit-Analyse genutzt werden, sind als Mikrokanalplatten-

The third step of mass spectrometry is ion detection. Generally, ion detection systems consist of a Secondary Electron Multiplier (SEM). The assembly works in a manner that impacting particles such as ions and neutrals produce secondary electrons, which are available as an electrical signal at the output of this assembly for further processing.

Modern detectors used in TOF mass spectrometric analysis are designed as micro channel plate detectors. Such a device is a

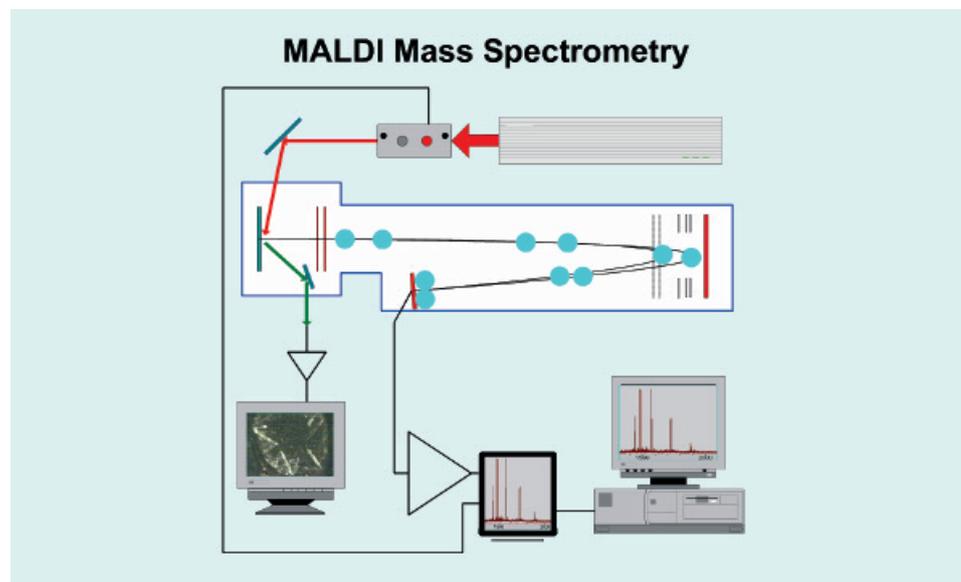


Fig. 12)

Scheme of a typical instrument arrangement of a MALDI measurement

Detektoren konstruiert. Dabei handelt es sich um einen porösen Festkern-Aufbau mit Millionen von winzigen Löchern ($\sim 5\text{-}10\ \mu\text{m}$, Länge $0,5\text{-}0,8\ \text{mm}$), welche innen eine halbleitende Schicht tragen. Die Löcher werden als Mikrokanäle bezeichnet. Jeder von ihnen arbeitet als ein Elektronen-Multiplier, unabhängig von den angrenzenden Kanälen. Um eine maximale Elektronenausbeute zu erzielen, werden alle Kanäle elektrisch parallel geschaltet. Mikrokanalplatten-Detektoren haben den Vorteil, von kleinen bis großen Eingangssignalen ohne Änderung der Multiplier-Charakteristik zu arbeiten, somit werden Sättigungseffekte auf ein Minimum beschränkt. Die Multiplier-Ausgangsspannung wird in einem Transientenrecorder digitalisiert und das Signal zu einem PC geleitet (Abb. 12).

porous solid core assembly with millions of tiny holes ($\sim 5\text{-}10\ \mu\text{m}$, length $0.5\text{-}0.8\ \text{mm}$), which are coated inside with a semiconductive layer. The holes are denoted micro channels. Everyone of them works as an electron multiplier, independent of the adjacent ones. To obtain a maximum electron yield all these channels are electrically connected in parallel. Micro channel plate detectors benefit in detecting small to large input signals without changing the multiplier characteristics, thus keeping saturation effects to a minimum. The multiplier output voltage is guided to a transient recorder to be digitized and delivered to a PC (Fig. 12).

Anwendungsbeispiel

Das Einsatzgebiet der MALDI-TOF Instrumente betrifft Fragestellungen aus dem Life-Science Bereich (Biologie, Medizin und entsprechende interdisziplinäre Gebiete). Im gegenwärtigen Schwerpunkt, der Protein-Identifizierung, wird z.B. das Gerät Ultraflex II (Abb. 13) zur Bestimmung der Masse einzelner Proteine in komplexen Mischungen benutzt. Die Genauigkeit korrespondiert mit einer Identifizierung von einem Gramm in einer Tonne, wodurch sehr große Moleküle identifiziert werden können. Dies wird erreicht durch eine auf der ermittelten genauen Masse basierende Recherche in den großen Protein-Datenbanken. Generelle Zielstellung dieser unter dem Begriff Proteomics zusammengefassten Aktivitäten ist das Verständnis für Zellbiologie auf molekularer Ebene, um auf dieser Grundlage Wege zu Wirkstoffen mit minimalen Nebenwirkungen zu finden. Ein gleichermaßen wichtiges Anwendungsgebiet ist der Nachweis und der Einsatz von Biomarkern zum Erkennen von Erkrankungen in bisher unbekanntem Frühstadium. Dieses Gebiet wird als „clinical proteomics“ bezeichnet.

Application example

The applications for the MALDI TOF/TOF instruments are in the life science business. In the today's major application, the protein identification, the Ultraflex II (Fig. 13) TOF/TOF is used to determine the weight of proteins out of complex mixtures. This very accurate mass determination which is equivalent to 1 gram out of a ton allows identification of big molecules. This is achieved by searching huge public protein databases and identifying the compounds just by knowing their mass. The goal behind this business called proteomics is to understand the cell biology on a molecular level, to finally discover pathways and develop corresponding drugs with a minimum of adverse reactions. The detection and use of biomarkers to detect diseases in an unprecedented early stage, just likewise important, is done by this approach in a field called "clinical proteomics".



Fig. 13)
MALDI-TOF instrument
„Ultraflex II“



23

Opto-Akustik LIOAS

Opto-acoustics LIOAS

Einleitung

In der industriellen Prozesskontrolle erlangt die zerstörungsfreie Schicht- und Oberflächenprüfung eine stetig zunehmende Bedeutung. Die Lebensdauer und Zuverlässigkeit vieler moderner Bauteile wird heute oft von den kontrollierten Eigenschaften der Beschichtungen bestimmt. Zur Optimierung und Kontrolle der Schichteigenschaften werden zuverlässige und aussagefähige Schichtmessverfahren benötigt.

Für die mechanische Prüfung stehen eine Reihe von eingeführten Verfahren wie Mikro- und Nanohärterprüfer, Kratztester, Impact- und Kavitationstester u.a. zur Verfügung. Die Eignung ist durch Schichtdicke, Härte, Haftfestigkeit, Oberflächenrauigkeit oder Porosität eingeschränkt.

Die laserakustische Prüfmethode LAwave aus den Fraunhofer- IWS in Dresden bietet eine gute Ergänzung dieser Prüfverfahren und eröffnet darüber hinaus weitreichend neue Möglichkeiten.

Mit sub-Nanosekunden Laserimpulsen werden breitbandige akustische Oberflächenwellen an der Werkstoffoberfläche angeregt. Die Wellenausbreitung reagiert sehr empfindlich auf Beschichtungen und Oberflächenmodifizierungen.

Die laserakustische Prüfmethode LAwave misst die Ausbreitungsgeschwindigkeit der akustischen Oberflächenwellen in Abhängigkeit von der Frequenz und kann daraus Materialeigenschaften, wie den Elastizitätsmodul von Nanometer-Schichten oder die Tiefe von Bearbeitungsrand-schichten in Halbleitermaterialien, bestimmen. Die Schichten können hart sein wie Diamant oder nachgiebig wie Polymere. Auch an rauen Oberflächen kann gemessen werden.

Introduction

In the industrial process control, an increasing importance is given to the non-destructive layers and surface testing. The life time and reliability of many modern components are essentially determined by the controlled characteristics of the coating. For the optimizing and examining of the layer characteristics, reliable and informative layer measuring methods are needed.

A series of imported process like micro and nano-hardness tester, scratch tester, impact and cavitation tester are available. The applicability is limited by the layers thickness, hardness, adhesiveness, surfaces roughness or porosity.

The laser acoustic test method LAwave from the " Fraunhofer - IWS" in Dresden offers a good complement to these testing method and opens further on far reaching new possibilities.

Wideband surface acoustic waves are excited in materials via sub-nanosecond laser pulses. Wave dispersion reacts very sensitively to coating and surface modifications.

The laser acoustic test method LAwave measures the dispersion velocity of the surface acoustic wave depending on frequency and can thereof determine material characteristics like modulus of elasticity of nanometer layers or the depth of damage layers within semi-conductor materials. The layers can be hard like diamond and soft like Polymers. It can also be measured on rough surfaces.

Dr. Dieter Schneider
Fraunhofer IWS, Dresden

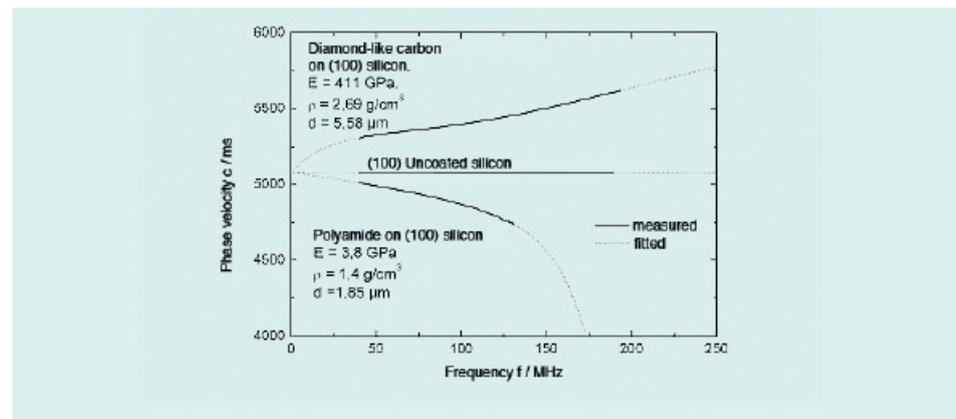
Messmethode

Akustische Oberflächenwellen sind elastische Schwingungen, die sich entlang der Werkstoffoberfläche ausbreiten. Ihre Amplitude ist an der Oberfläche am höchsten und fällt ins Materialinnere hinein exponentiell ab. Ihre Eindringtiefe entspricht etwa der Wellenlänge. Diese nimmt ab, wenn die Frequenz zunimmt. Abb. 14 zeigt die Ausbreitungsgeschwindigkeit der akustischen Oberflächenwelle in Abhängigkeit von der Frequenz für drei Fälle: unbeschichtetes Silizium, Silizium mit einer diamantähnlichen Kohlenstoffschicht, die steifer ist als das Substratmaterial, und Silizium mit einer Polymerschicht, die wesentlich nachgiebiger ist als das Substrat. Im Falle des unbeschichteten Siliziums ist die Schallgeschwindigkeit konstant, da sich die Wellen unabhängig von der Fre-

Measuring method

Surface acoustic waves are elastic vibrations which are propagated along the material surface. Their amplitude is at the maximum height at the surface and decays exponentially in the inner material. Their penetration depth is equivalent approx. to the wavelength. If the frequency increases, the penetration depth of the wave reduces. Three different cases showing the dispersion velocity of surface acoustic waves depending on frequency are described in Fig. 1: uncoated silicon, silicon with a diamond-like carbon film which is stiffer than substrate material, and silicon with a polymeric film which is considerably softer than substrate. In the case of the uncoated silicon, the velocity of acoustic propagation is constant because waves not depending on frequency and therewith not depending on penetration

Fig. 14)
Phase velocity c of surface acoustic waves on coated and uncoated silicon depending on frequency



quenz und damit unabhängig von der Eindringtiefe im gleichen Material ausbreiten. Dies ändert sich, wenn das Grundmaterial beschichtet wird. Die Schicht aus diamantähnlichem Kohlenstoff ruft einen Anstieg der Kurve hervor, da bei höheren Frequenzen die Welle weniger tief in das Material eindringt und somit mehr von der steifen Schicht als vom Substratmaterial beeinflusst wird. Die Schicht beschleunigt die Wellenausbreitung mit steigender Frequenz.

Die Polymerschicht ruft den entgegengesetzten Effekt hervor. Die Wellengeschwindigkeit sinkt mit der Frequenz, da das Schichtmaterial wesentlich nachgiebiger als das Substrat ist. Extrapoliert man die Kurven zum Frequenznullpunkt, treffen sie sich im selben Punkt, der Schallgeschwindigkeit des Substrates. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Wellen mit abnehmender Frequenz immer tiefer in das Material eindringen, so dass die Schicht keinen Einfluss mehr ausübt. Bild 14 legt nahe, dass der Anstieg der Kurve

depth propagate themselves in the same material. This changes when the base material is coated. The diamond-like carbon film generates a rise in the curve as with higher frequency the wave penetrates not as deep in the material and therewith is more affected by the stiffer layer than by the substrate material. The layer accelerates the wave dispersion with increasing frequency.

The polymer layer generates the opposite effect. The wave velocity sinks with the frequency, as the coating material is considerably softer than the substrate. If the curves are extrapolated to zero point of the frequency they meet each other in the same point, the acoustic velocity of the substrate. This has to be put down to the fact that waves with decreasing frequency penetrate deeper and deeper in the material so that the layer exercises no more influence. Fig. 14 suggests that the ascend of the curve contains information on

Informationen über die Schichteigenschaften enthält, über dessen Elastizitätsmodul, die Dichte und die Schichtdicke. Aus der Lage des Nullpunktes kann hingegen der Elastizitätsmodul des Substrates bestimmt werden. Die Kurven in Abb. 14 werden Dispersionskurven genannt. Sie werden vom laserakustischen Messsystem LAwave (Abb. 15) gemessen und daraus die Materialeigenschaften berechnet.

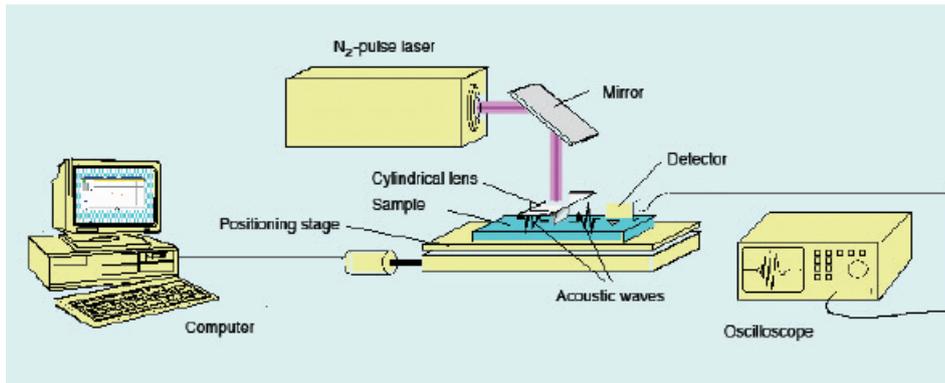


Fig. 15)
Schematic representation of the
laser-acoustic equipment.

Laserpulse eines StickstoffimpulsLasers (Puls-länge: 500 ps, Pulsenergie: 400 μ J, Wellenlänge: 337 nm) regen die akustischen Oberflächenwellen an, die mit einem piezoelektrischen Detektor empfangen werden. Durch Fourier-Transformation werden aus den laserakustischen Signalen, aufgenommen in verschiedenen Abständen des Detektors von der Laserbrennlinie, die Phasenspektren berechnet, aus denen die Phasengeschwindigkeit c in Abhängigkeit von der Frequenz f bestimmt wird. Eine solche Dispersionskurve kann auch aus einer Theorie berechnet werden, die sich aus der Lösung der Wellengleichung für die Randbedingungen von Spannung und Verschiebung an der Oberfläche und an der Grenzfläche für Schicht- und Substrat ableiten lässt. Zur Bestimmung der Werkstoffkennwerte wird durch nichtlineare Ausgleichsrechnung die theoretische Kurve an die Messkurve angepasst.

Die Prüfung dauert wenige Minuten. Sie kann an ebenen oder zylindrischen Oberflächen durchgeführt werden. Weitere Anforderungen an die Probengeometrie bestehen nicht. Das Messverfahren ist um so empfindlicher gegen dünne Schichten, je geringer die Schallschwächung im Material ist. Auf einkristallinen und feinkörnigen Werkstoffen, wie Silizium bzw. Vergütungsstählen, können ultradünne Schichten untersucht werden. Auf grobkörnigen Werkstoffen, wie Edelstählen oder Aluminium, sollten die Schichten nicht viel weniger als 100 nm dick sein.

the layer characteristics, on its modulus of elasticity, on its density and on the thickness of the film. From the position of the zero point, the modulus of elasticity of the substrate can be determined. The curves in Fig. 14 are called dispersion curves. They are measured with the laser acoustic measure system LAwave (Fig. 15) and their material characteristics are thereof calculated.

Laser pulses of a nitrogen pulse laser (pulse duration: 500 ps, pulse energy: 400 μ J, wavelength: 337nm) excite the acoustic surface waves which are detected by a piezoelectric transducer. The phase spectra are calculated via Fourier-transformation from the laser acoustic signals, taken in various distances of the detector from the laser focus line, from which the phase velocity C depending on the frequency f will be determined. The material parameters are deduced by fitting a theory to the measured curve. Such a dispersion curve can also be calculated with a theory based on the solution of the wave equation for the boundary conditions from tension and shifting at the surface and at the bordure area for layer and substrate. The theoretical curve is fitted to the measured curve via non linear regression calculation to determine material parameters.

The test needs only a few minutes. It can be conducted on plain or cylindrical surfaces. There are no further requirements to the specimen geometry. This measuring method is the more sensitive towards thin layers the lower the acoustic attenuation in the material is. Ultra thin layers can be examined on mono-crystal and fine-grained material like silicon or coated steel. The layers should not be much thinner than 100 nm for coarse-grained materials like stainless steel and aluminium.

Anwendungsbeispiele

Ultradünne Schichten

Nanometerschichten gewinnen zunehmend an Bedeutung, darunter auch ultradünne, harte Schichten aus diamantähnlichem Kohlenstoff für den Verschleißschutz. Ein Anwendungsbeispiel dafür sind Computerfestplatten. Zum Schutz gegen Berührung durch den in einem Abstand von nur einigen zehn Nanometer schwebenden Schreib-Lesekopf werden sie mit einer nur wenige Nanometer dicken Kohlenstoffschutzschicht versehen. Solche Schichten mechanisch zu prüfen, ist nach wie vor problematisch.

Application examples

Testing Ultra-thin Diamond-like Carbon Films

Evaluating ultra-thin films of a few nanometers thickness is still a challenge for mechanical testing. The laser-acoustic technique was demonstrated to have the capability of measuring the Young's modulus of diamond-like carbon (DLC) films with thickness of 3 nm deposited on silicon wafers.

Fig. 16 shows an example for a laser-acoustic results obtained for two DLC-films with thickness of 3 and 16 nm, respectively. The films were deposited by the pulsed arc technique on silicon. The measurement provides the disper-

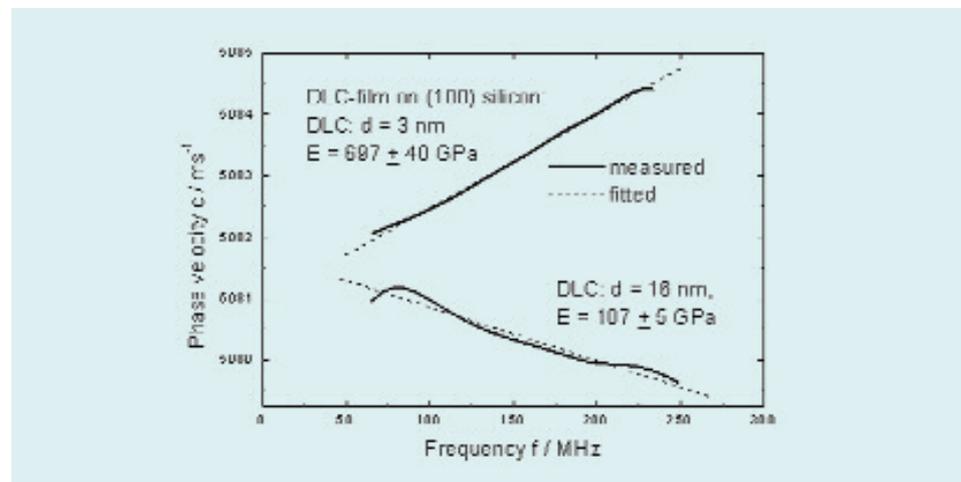


Fig. 16)
Laser-acoustic measuring result for
ultra-thin diamond-like carbon
films deposited on silicon

Abb. 16 zeigt Messungen an zwei diamantähnlichen Kohlenstoffschichten (diamond-like-carbon: DLC) mit einer Dicke von $d = 3$ bzw. 16 nm, abgeschieden auf Silizium. Die Kurve der 3 nm-Schicht steigt deutlich an, was die höhere Schallgeschwindigkeit und hier auch den höheren E-Modul der Schicht gegenüber dem Substrat verrät. Für den E-Modul der Schicht ergab sich ein Wert von $E = 697$ GPa.

Berücksichtigt man, dass Graphit einen E-Modul von 10 bis 20 GPa hat und Diamant 1147 GPa, lässt dieser Wert auf einen hohen Anteil an Diamantbindungen und damit auch auf eine hohe Härte dieser amorphen Kohlenstoffschicht schließen. Die Messkurve der zweiten Schicht, die 16 nm dick ist, fällt ab. Dieser Abfall verrät bereits anschaulich den deutlich niedrigeren E-Modul von $E = 107$ GPa dieser DLC-Schicht im Vergleich zur Schicht von 3 nm Dicke. Sie war bei einer höheren Substrattemperatur abgeschieden worden, was eine Graphitisierung des Kohlenstoffes begünstigt. Die laserakustische Prüfung zeigt deutlich

die Dispersion curve as phase velocity depending on frequency. The effect of the 3 nm DLC film causes a distinct rise of the dispersion curve. The Young's modulus is deduced by fitting the theoretical curve. The fit yielded a Young's modulus of 697 GPa. To verify the effect of the measuring uncertainty, the measurement was repeated 10 times. The film modulus scattered within the limits of " Δ " $E \pm 40$ GPa.

For diamond-like carbon, Young's modulus was shown to correlate with the sp^3 -fraction of the atomic bonds that also determines the hardness of this film material. That is the reason why Young's modulus correlates with hardness ($H > E/10$). The high film modulus proved the high quality of the ultra-thin diamond-like carbon film deposited by a new plasma source consisting of a high current pulsed vacuum arc evaporator combined with a sectioned filter unit]. The dispersion curve of the 16 nm film descend revealing the low elastic modulus of this film compared to the 3 nm film. The fit yields a film modulus of only 107 GPa. The film was deposited at higher substrate temperature favoring the graphitization of the carbon

den beträchtlichen Unterschied in beiden Schichtqualitäten.

Bearbeitungsrandschichten auf GaAs-Wafern

Ein weiteres Anwendungsbeispiel für die LAwave-Prüfmethode ist die Prüfung von Bearbeitungsrandschichten in GaAs-Wafern. Nach dem Ziehen des Kristalls werden die Wafer aus dem Rohling herausgesägt. An der Oberfläche des äußerst spröden GaAs entsteht dabei eine Zone, die stark mit Mikrorissen behaftet ist. Für die einwandfreie Funktion der aus den Wafern hergestellten Schaltkreise ist es unerlässlich, diese Bearbeitungsrandschicht sorgfältig durch spezielle Polierbehandlungen zu beseitigen. Eine Optimierung und Überwachung der einzelnen Bearbeitungsschritte ist aus Kostengründen und zur Qualitätssicherung geboten.

film. The tests prove the laser-acoustic test method to be able to indicate clearly the different mechanical behavior of these films and to provide reliable material parameters for the film material.

Testing Damage Layers in GaAs Wafers

Slicing GaAs wafers from ingots produces damage layers that have to be completely removed by polishing. A non-destructive control of the machining process is desirable. The laser induced surface acoustic waves has been demonstrated to be a method for characterizing the finishing state of such surfaces.

Fig. 17 presents the laser-acoustic results for a wafer stepwise polished after having been sawn from the GaAs ingot. For the as-sawn wafer (polishing depth $d = 0 \mu\text{m}$), the velocity drastically decreases with increasing frequency.

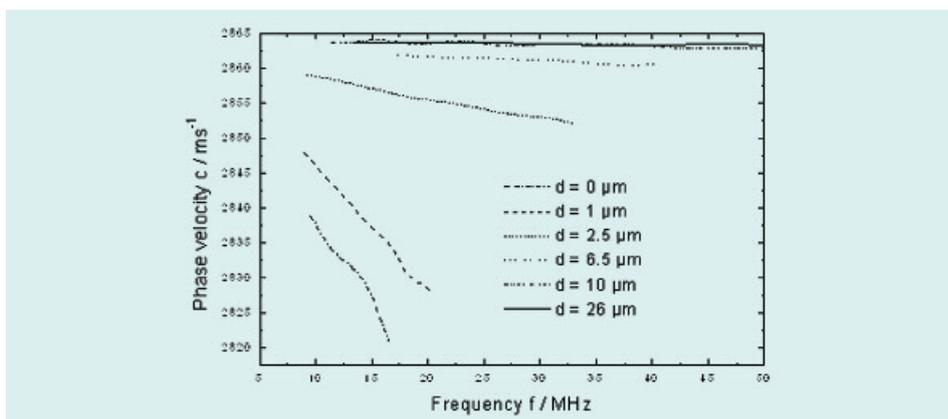


Fig. 17)
Laser-acoustic results for GaAs wafers with different polishing depth d

Abb. 17 zeigt laserakustische Messkurven, die am gesägten Ausgangszustand ($TP = 0$) und nach mehreren Bearbeitungsschritten erhalten wurden. Mit TP wird hier der Polierabtrag bezeichnet. Nach dem Sägen wird eine Dispersionskurve ($TP = 0 \mu\text{m}$) gemessen, die steil abfällt. Dies deutet auf eine Schicht hin, die einen wesentlich niedrigeren E-Modul als das Substrat besitzt. Es ist offenkundig, dass hierfür die Mikrorisse verantwortlich zu machen sind, welche die oberflächennahen Bereiche durchsetzen. Stufenweises Abpolieren führt zu Messkurven, die immer weniger steil abfallen, bis sie parallel zur Frequenzachse verlaufen, wie dies typisch für die Oberflächenwellenausbreitung in einem homogenen, randschichtfreien Werkstoff ist. Dies bedeutet, dass die nachweisbare Bearbeitungsrandschicht beseitigt wurde.

Diese Ergebnisse ermöglichen es, aus dem Anstieg der Kurve dL/df die Tiefe der Stör-schicht zu bestimmen.

This suggests that a layer with a remarkable lower velocity covers the surface. High density of micro-cracks must be assumed causing such a considerable reduction of the stiffness of the surface layer. Polishing the samples results in more gradually descending dispersion curves. The velocity is nearly constant for a polishing depth of $10 \mu\text{m}$. This means that all waves independent on the velocity and therefore consequently independent on their penetration depth propagate through the same material.

The results enable to use the slope for determinations of damages depth.



124

LIPS

LIBS

Einführung

Laser-induzierte Plasmaspektroskopie, LIPS, ist eine analytische Methode, welche die Laserablation und die nachfolgende Atomemission des Plasmas zur Elementanalyse nutzt. Neben dem Akronym LIPS können heute auch andere Bezeichnungen, wie z.B. LIBS (laser induced breakdown spectroscopy), LAOES (laser ablation optical emission spectroscopy) oder LSS (laser spark spectroscopy) in der Literatur gefunden werden.

Laserablation ist gegenwärtig die einzige elementanalytische Methode, die eine direkte Probenahme von allen Arten von Material ohne Probenvorbereitung ermöglicht. Somit ermöglicht LIPS eine Multielementanalyse von nahezu allen Arten von Material (Gase, Feststoffe, Flüssigkeiten) durch Atomemissionsspektroskopie. Die heutige Verfügbarkeit verlässlicher und kostengünstiger Laserquellen und verbesserter Spektrometer und Detektoren gestattet eine schnelle, on-line und in-situ Analyse mit LIPS. Dies macht LIPS besonders attraktiv für alle Arten von Prozeßanalyse und Umweltschutz und -überwachung.

Grundlagen

Abb. 18 zeigt die typische zeitliche Abfolge einer LIPS-Analyse. Der Laser regt vibronische und elektronische Zustände an, deren Energie in kinetische Energie umgewandelt wird und schließlich zur Bildung eines schwach ionisierten, sich ausdehnenden Plasmas führt. Die beobachtete Veränderung der Oberfläche erfolgt für mehr als eine monomolekulare Schicht und ist nicht-

Introduction

Laser-induced plasma spectroscopy, LIPS, is a method utilizing laser ablation and the subsequent atomic emission from the plasma for elemental analysis. Besides the acronym LIPS, today other designations such as LIBS (laser induced breakdown spectroscopy), LAOES (laser ablation optical emission spectroscopy), or LSS (laser spark spectroscopy) can be found in the literature.

Laser ablation is at present the only analytical method that offers direct sampling from any kind of material without sample preparation. So LIPS allows a multielement analysis of virtually all types of materials (gas, solids, liquids) through atomic emission spectroscopy. Today's availability of reliable and less costly laser sources and improved spectrometers and detectors permits a rapid, on-line, and in-situ analysis with LIPS. This makes LIPS especially attractive for all kind of process analysis and environmental screening and monitoring.

*Prof. Dr. U. Panne
BAM
Federal Institute for Materials
Research and Testing*

Basics

Fig. 18 displays the typical temporal sequence of a LIPS analysis. The laser excites vibronic and electronic states, the energy of which is converted to kinetic energy and finally results in the formation of a weakly ionized expanding plasma. The observed modification of the surface is beyond a monolayer and non-linearly related to the number of excited states. Further, an irra-

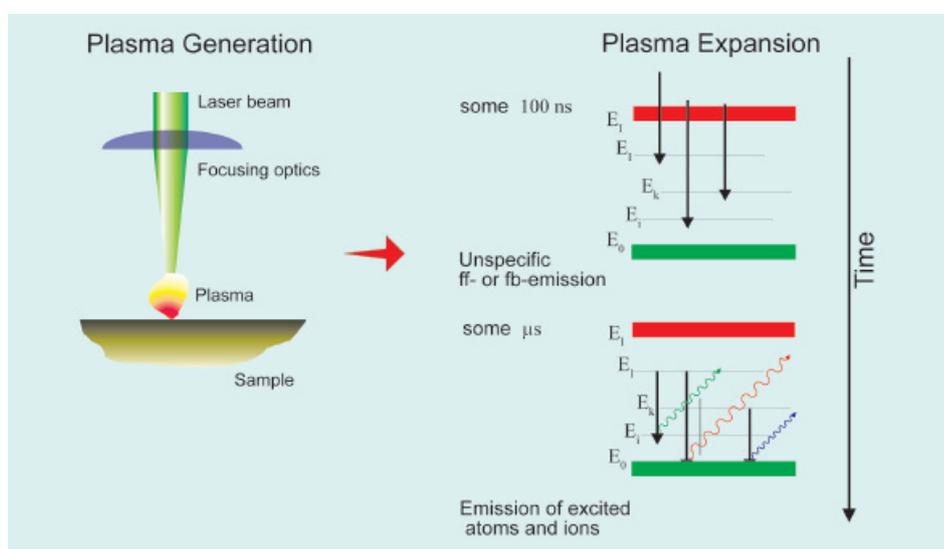


Fig. 18) Temporal sequence of a LIPS analysis.

linear in Bezug auf die Anzahl der angeregten Zustände. Außerdem wird ein Grenzwert der Bestrahlungsstärke für die Laserablation beobachtet. Wegen der dominierenden unspezifischen Emission von Bremsstrahlung und Rekombination, kann die Anfangsphase der Plasmaemission nicht für die Atomspektroskopie genutzt werden. Nach einer definierten Verzögerung relativ zur Plasmazündung können die charakteristischen Atom- oder Ionenemissionslinien beobachtet werden. Die Linienintensität wird über eine bestimmte Zeit integriert und dann für analytische Zwecke genutzt. Die beobachtete Emission steht in direktem Zusammenhang zur Konzentration des Analyten in der beobachteten Probe bzw. im Plasma. Typischerweise werden Elektronendichten zwischen 10^{16} - 10^{18} cm^{-3} und Temperaturen von 6000-23000 K nach 1-5 μs bei 1 atm Luft beobachtet.

dianze threshold is observed for laser ablation. Due to the dominating unspecific emission from bremsstrahlung and recombination, the early phase of plasma emission cannot be used for atomic spectroscopy. So after a certain delay, relative to the plasma ignition, the characteristic atomic or ionic emission lines can be observed. The line intensity is integrated for a defined time and then utilized for analytical purposes. The observed emission is directly related to the concentration of the analyte under study in the sample resp. in the plasma. Typically, electron densities between 10^{16} - 10^{18} cm^{-3} and temperatures of 6000-23000 K are observed after 1-5 μs delay at 1 atm of air.

A distinct advantage of LIPS is not only the conceptual simplicity, but also the versatility and simplicity of the experimental set-up. Most present LIPS systems are based on

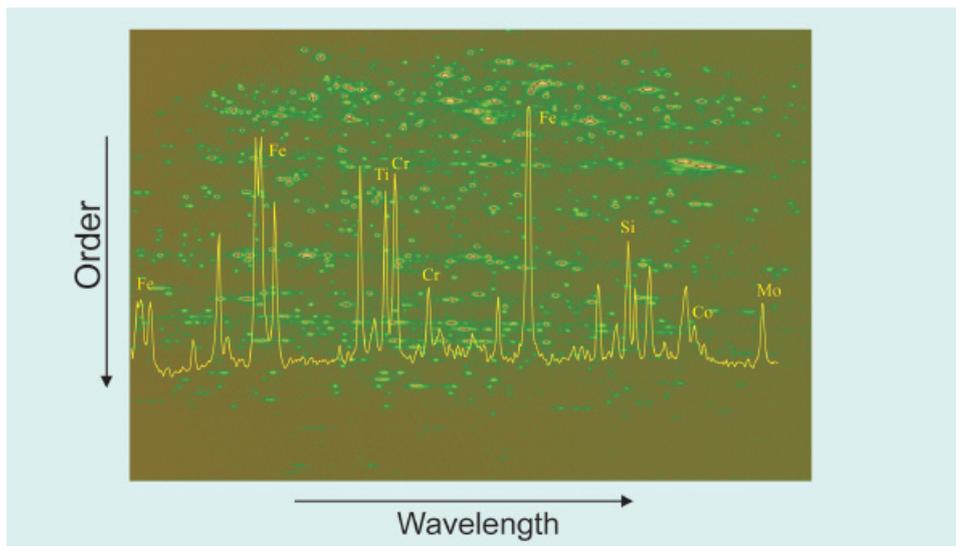


Fig. 19)
Echelle spectrum from a tungsten mineral (inset: 128th order, 302.0-304.8 nm); adapted from ref. (Florek et al. 2001)

Ein deutlicher Vorteil von LIPS ist nicht nur das einfache Konzept des experimentellen Aufbaus sondern auch seine Flexibilität. Die meisten gegenwärtigen LIPS-Systeme basieren entweder auf einem gütegeschalteten Nd:YAG-Laser oder auf einem Gaslaser, wie z.B. Excimer- oder Stickstofflaser, zur Plasmaerzeugung. Sowohl der Laser für die Plasmaerzeugung als auch die Plasmaemission selbst können über Faseroptiken geführt werden. Dadurch kann man Orts- bzw. Umgebungsunabhängig LIPS Messungen realisieren. Eine weitere Möglichkeit ist eine Fernerkundung mittels teleskopischer Überwachung und Plasmaerzeugung. Konventionelle Monochromatoren oder Spektrographen decken entweder einen großen Spektralbereich ab oder führen zu einer hohen spektralen Auflösung ($\lambda/\Delta\lambda > 10000$), was zu einer eingeschränkten Eignung für

either a Q-switched Nd:YAG-laser or a gas laser such as excimer and nitrogen lasers for plasma ignition. Both the laser for plasma ignition and the plasma emission itself can be delivered via fiber optics, which allows a remote sensing over several meters. Another option is a direct sensing via telescopic observation and plasma generation. Conventional monochromators or spectrographs can yield either a wide spectral coverage or a high spectral resolution ($\lambda/\Delta\lambda > 10000$), which results in limited applicability for multielement analysis in complex matrices. For simultaneous detection of multiple elemental lines over a large spectral range, echelle spectrographs in combination with CCD detectors are the systems of choice. Echelle systems offer the necessary spectral coverage and spectral resolution for minimizing spectral interferences in complex

die Multielementanalyse in komplexen Matrizes führt. Für die simultane Detektion von mehreren Elementlinien über einen großen Spektralbereich sind Echellespektrographen mit CCD-Detektoren die Systeme der Wahl. Echellesysteme bieten die notwendige spektrale Abdeckung und spektrale Auflösung zur Minimierung der spektralen Interferenzen in komplexen Matrizes. Abb. 19 zeigt die Informationsfülle, die ein Echellesystem liefert, wenn komplexe Matrizes, wie z.B ein Mineral, untersucht werden.

matrices. Fig. 19 demonstrates the wealth of analytical information available from an echelle system, when complex matrices are studied.

Anwendungen

Die Analyse von festen Proben ist wahrscheinlich das erfolgreichste Anwendungsgebiet für LIPS. Seit den ersten Untersuchungen zur Laserablation sind Metalle die bevorzugten Proben für alle Arten von grundlegenden und analytischen Studien mit LIPS. Besonders Aluminiumlegierungen und Stahlproben wurden eingehend im

Application examples

Solid sample analysis is probably the most successful area of application for LIPS. Due to the fact that metals have been the preferential samples for all kind of fundamental and analytical studies with LIPS since the first investigations of laser ablation, alloys and steel samples have been investigated in detail either in laboratory-based studies or

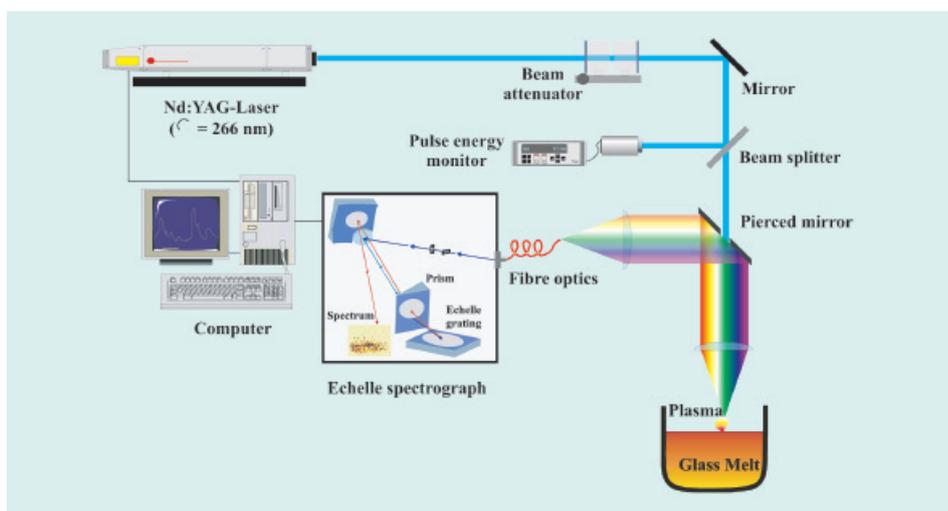


Fig. 20a)
Experimental set-up for remote analysis of glass melts via LIPS (adapted from (Panne et al. 1998))

Labor oder in prozeßanalytischen Arbeiten untersucht. Normalerweise kommen die LIPS-Nachweisgrenzen denen der klassischen Funkenanalyse gleich und gestatten zusätzlich die Analyse von nichtleitenden Proben wie Schlacken, Beton, Glas, Kunststoff und Holz.

process analysis work. Usually, the LIPS detection limits rival the classical spark analysers and additionally permit the analysis of non-conducting samples as slags.

Ein anderes sehr weit verbreitetes Gebiet der LIPS-Analyse ist das schnelle Screening von natürlichen Matrizes wie z.B. Böden, Erden, Sanden, Abfallstoffen (z.B. Klärschlamm). Obwohl Probleme hinsichtlich der räumlich und chemischen Heterogenität der Matrix beobachtet wurden, werden normalerweise Nachweisgrenzen in der Größenordnung von 10-100 ppm erreicht,

Another very popular area of LIPS analysis is the fast screening of natural materials such as soils, sands, and waste materials (e.g. sewage sludge). Although several problems were reported due to the heterogeneity of the matrix both spatially and chemically, usually detection limits in the order of 10-100 ppm are obtained if the sample can be conditioned through drying, mixing with a reference material, or pressing of pellets. Other materials of industrial importance



Fig. 20b)
Remoste sensing with LIPS through ignition of a laser plasma on a glass melt at 1200°C



Fig. 21)
LIBS analysis of recycled thermoplasts from consumer electronic products.

wenn die Proben durch Trocknen, Mischen mit einem Referenzmaterial oder Pressen von Granulat aufbereitet werden.

Andere Materialien von industrieller Bedeutung, die mit LIPS untersucht werden, sind Glas und Keramik, die auch in größerer Entfernung durch Fernerkundung analysiert werden können. Abb. 20a stellt den experimentellen Aufbau für eine LIPS-Fernanalyse von heißen Glasschmelzen dar während Abb. 20b die Plasmabildung an einer heißen Glasschmelze bei 1200°C zeigt. Weitere LIPS-Anwendungen sind die Analyse von Erzen und Kohle, Farben und Recyclingstoffen, wie z.B. Kunststoffen mit verschiedenen Arten von Füllstoffen und Pigmenten, finden. Abb. 21 zeigt beispielsweise einen LIPS-Aufbau an einem Polymerextruder, um die Extrusion der wiederaufbereiteten Thermoplaste aus Unterhaltungs- und Haushaltelektronik-Produkten auf giftige Schwermetalle zu untersuchen.

Vielversprechend ist auch die Mikroanalyse von heterogenen Materialien mit LIPS. Durch eine spezielle Strahlhomogenisierung kann ein Laser auf eine Spotgröße von bis zu 3-10 µm fokussiert werden. LIPS bietet nicht nur örtliche Auflösung, sondern auch eine Tiefenauflösung durch mehrfache Ablation. Im Vergleich zu anderen Strahltechniken benötigt LIPS nur eine geringfügige Probenvorbereitung und keine Vakuuminfrastruktur. Dieser Ansatz wurde für die verschiedenen heterogenen und geschichteten Materialien wie z. B. Papierbeschichtungen, Katalysatoren und Mikroein Schlüssen in Stahl demonstriert.

Aufgrund der schnellen Deaktivierung der angeregten Spezies, sind die Nachweisgrenzen für die direkte Analyse von gelösten Analyten oder Kolloiden in Wasser signifikant höher (in der Größenordnung von 0,1%). Nicht überraschend ist, daß die erfolgreichste Herangehensweise an die Analyse von Flüssigkeiten mittels LIPS die Ablation von der Oberfläche ist. In diesem Fall entwickelt sich das Plasma in einem Puffergas, was den Nachweis im ppm-Bereich ermöglicht.

Die Analyse von Gasen und Aerosolen mit LIPS wurde hauptsächlich für flüchtige Metalle besonders Quecksilber und halogenhaltige Verbindungen mit Nachweisgrenzen im ppm-Bereich untersucht. Für die Analyse von Aerosolen können zwei ver-

investigated by LIPS are glass and ceramics, which can be also analysed in remote fashion. Fig. 20a shows the experimental set-up for a remote LIPS analysis of hot glass melts, while Fig. 20b demonstrates the plasma formation on a hot glass melt at 1200°C. Further LIPS applications can be found for ores and coals, paints and recycling materials such as plastics with different kind of fillers and pigments. Fig. 21 reveals a LIPS set-up installed at a polymer extruder to monitor the extrusion of recycled thermoplasts from consumer electronic products for toxic heavy metals.

Promising appears also the microanalysis of heterogeneous materials. Through special beam homogenization, a laser can be focused down to a spot size of 3-10 µm. LIPS provides not only spatial resolution, but offers also some depth resolution through multiple ablation on a single spot. In comparison to other beam techniques, LIPS needs only minor sample preparation and no vacuum. This approach was demonstrated for different heterogeneous and layered materials such as paper coatings, catalysts, or microinclusions in steel.

The detection limits for the direct analysis of dissolved analytes in water or colloidal materials in water significantly decrease (in the order of 0.1%) due to the fast deexcitation of the excited species. Not surprisingly, the most successful approach for analysis of liquids via LIPS is the ablation from the surface. In this case the plasma is expanding into a buffer gas, which permits ppm detection limits.

Analysis of gases and aerosols with LIPS was mainly studied for volatile metals especially mercury and halogenated compounds with detection limits in the ppm range. For the analysis of aerosols, two principal experimental set-ups, can be realized: (i) a direct, on-line detection in the focal volume or (ii) sampling of the aerosol on filter or impactor. While the first approach permits an on-line detection, it is hampered by the low sampling volume and the corresponding decreased sensitivity (detection limits in the µg m⁻³ range). Due to the threshold dependence of the plasma ignition, the pulse energy can be adjusted in such a way that only with an aerosol in the focal volume a plasma is generated. This allows a dedicated single pulse analysis which can improve the detection limits considerable. The analysis

schiedene grundlegende Experimentalanordnungen realisiert werden: (i) ein direkter on-line Nachweis im fokalen Volumen oder (ii) die Probennahme des Aerosols auf einem Filter

Obwohl die erste Herangehensweise einen On-line-Nachweis ermöglicht, wird sie erschwert durch das geringe Probenvolumen und die entsprechend verminderte Sensitivität (Nachweisgrenzen im $\mu\text{g m}^{-3}$ -Bereich). Wegen der Schwellenabhängigkeit der Plasmazündung, kann die Pulsenergie so eingestellt werden, daß nur mit einem Aerosol im Fokusbereich ein Plasma erzeugt werden kann. Dies gestattet eine definierte Einzelpulsanalyse, welche die Nachweisgrenzen beträchtlich verbessern kann.

Die Analyse an Filterproben ermöglicht, größere Luftvolumina zu integrieren, so daß die Analyse von geringeren Aerosolkonzentrationen (im ng m^{-3} -Bereich) möglich ist. Aerosole wurden nicht nur im Bereich der industriellen Emissionen (Feinstaub-Problematik) analysiert, sondern auch für Studien zum Klimawandel.

LIPS stellt für einige der heutigen analytischen Probleme die einzige sinnvolle Lösung für die on-line und in-situ Elementanalytik dar. In Zukunft wird die Anzahl der spezialisierten Anwendungen wegen der minimalen Probenvorbereitung, der verminderten Kosten für eine Messung und des Potentials für eine weitgehende Automatisierung steigen. Die Anwendung im Bereich der Festkörperanalytik, insbesondere der Mikroanalyse für die Nanotechnologie oder ultrakleine Volumina wird aufgrund der Limitierung durch Blindwerte in der Spurenanalyse wachsen. Fortschritte in der Lasertechnologie und der Optoelektronik werden einen direkten und kostensenkenden Einfluss auf das Design und die Miniaturisierung von LIPS-Systemen haben. Anwendungen in der Prozessanalyse werden außerdem von faseroptischen Systemen profitieren, die den Laser an die erforderliche Messstelle übertragen und die Emission an ein zentralisiertes Nachweissystem leiten. Die Kombination mit anderen Spektroskopiearten, die molekulare Informationen liefern, wie z.B. Ramanspektroskopie, wird weitere Anwendungsfelder für LIPS erschließen.

on filter samples allows to integrate larger volumes of air so that analysis of lower aerosols concentration (in the ng m^{-3} range), e.g. from remote areas, is possible. Aerosols were analyzed via LIPS not only for industrial hygiene and anthropogenic emissions, but also for climate change related studies

In summary LIPS represents for some of today's analytical problems the only reasonable solution to in-situ and/or elemental remote sensing. In future, the number of specialized applications will probably increase in the future due to the minimum sample preparation, the reduced cost for a single measurement, and the potential for an extensive automation. The application of solid sample analysis, especially microanalysis techniques for nanotechnology or ultra-small volumes, will grow due to inherent blank limits in ultratrace analysis.

Due to the fact that LIPS is technology-driven, advances in the laser technology and optoelectronics will have direct impact on the design and miniaturization of LIPS systems. Applications in process analysis will further profit from fiber-optical systems delivering the laser to the point of demand and guiding the emission to a centralized detection system. The combination with other types of spectroscopy providing molecular information such as Raman spectroscopy will open further applications for LIPS.

