

# Laserspektroskopische und massenspektrometrische Untersuchungen an massenselektierten Ionen in der Paul-Falle

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dirk Nolting

aus Herford

Düsseldorf

2005

Gedruckt mit der Genehmigung  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	Prof. R. Weinkauf
Koreferent:	Prof. H. Bettermann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 7. 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2000 bis Mai 2005 im Institut für physikalische Chemie I, Abteilung für Lasermassenspektroskopie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Weinkauff für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Vergabe des Themas sowie die intensive Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Bettermann für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Hucke, der mit seiner Geduld, Hilfsbereitschaft und technischen Erfahrung jederzeit eine wertvolle Hilfe war.

Allen Angehörigen des Arbeitskreises für eine freundliche Arbeitsatmosphäre und vielen hilfreichen Diskussionen.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Schwager, die mich jederzeit nach Kräften unterstützt haben und mir stets Vorbild und Rückhalt gewesen sind.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b>	<b>ix</b>
<b>1 Allgemeiner Teil</b>	<b>1</b>
1.1 Moderne Methoden der Massenspektrometrie . . . . .	1
1.1.1 Matrix assisted laser desorption/ionization - MALDI . . . . .	1
1.1.2 Elektrospray Ionisation - ESI . . . . .	4
1.1.2.1 Funktionsweise einer ESI-Quelle . . . . .	6
1.1.3 Massenanalyse mittels elektrischer Wechselfelder . . . . .	8
1.1.3.1 Lineare Qudadrupolfalle . . . . .	8
1.1.3.2 Paul-Falle . . . . .	9
1.1.4 Massenanalyse mittels eines statischen Magnetfeldes . . . . .	11
1.2 Photofragmentierung nach elektronischer Anregung . . . . .	13
1.2.1 Prinzip der Photofragmentspektroskopie . . . . .	14
1.2.2 Resonante Mehrphotonenschritte . . . . .	16
1.2.3 Konische Durchschneidungen . . . . .	18
<b>2 Experimenteller Teil</b>	<b>21</b>
2.1 Planung und Wahl der Komponenten . . . . .	21
2.1.1 Wahl der Ionenquelle . . . . .	21
2.1.2 Vergleich von Ionenfallen . . . . .	23
2.1.3 Lasersystem . . . . .	24
2.2 Versuchsaufbau . . . . .	24
2.2.1 Funktionsweise des Massenspektrometers . . . . .	27
2.2.1.1 Ionisation mittels Elektrospray . . . . .	27
2.2.1.2 Transfer der Ionen in die Paul-Falle . . . . .	27
2.2.1.3 Massenanalyse mittels einer Paul-Falle . . . . .	31
2.2.1.4 Ionendetektor . . . . .	34
2.2.2 Aufbau des Lasersystems . . . . .	35

2.2.3	Eigene Modifikationen des Versuchsaufbaus . . . . .	36
2.2.3.1	Aktive Verdopplersteuerung . . . . .	37
2.2.3.2	Piezoverstellbare Spiegelhalterung . . . . .	39
2.2.3.3	Leistungskonstanthaltung . . . . .	42
2.2.3.4	Laserzugriff innerhalb der Paul-Falle . . . . .	43
2.2.3.5	Abhängigkeit vom Phasenwinkel . . . . .	45
2.2.3.6	Kühlung der Paul-Falle . . . . .	46
2.2.3.7	Abschätzung der Kühlleistung . . . . .	50
2.2.3.8	Restgasanalyse der Vakuumkammer . . . . .	53
2.2.3.9	Herausführen wichtiger Signale . . . . .	55
2.2.4	Experimentsteuerung . . . . .	56
2.2.4.1	Einstellung der Ionenzahl und des ESI-Triggers . . . . .	56
2.2.4.2	Signalerfassung . . . . .	56
2.2.4.3	Datenselektion und -aufzeichnung . . . . .	58
2.3	Probenpräparation . . . . .	62
2.3.1	Wahl des Lösungsmittels . . . . .	62
2.3.2	Verwendete Substanzen . . . . .	62
2.3.3	Austausch labiler Wasserstoffatome . . . . .	62
2.3.4	UV/VIS-Spektren im Lösungsmittel . . . . .	63
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>65</b>
3.1	Tryptophan . . . . .	65
3.1.1	Wahl von Tryptophan als Testsubstanz . . . . .	65
3.1.2	Struktur und Nomenklatur . . . . .	66
3.1.3	ESI-MS von Tryptophan . . . . .	68
3.1.4	Auswirkungen von Stößen auf die Ionen im Einlassbereich . . . . .	70
3.1.5	Kollisionsinduzierte Fragmentierung von Tryptophan . . . . .	72
3.1.6	Einfluss der Temperatur auf das Massenspektrum . . . . .	78
3.1.7	Photofragmentierung von Tryptophan . . . . .	84
3.1.8	Wellenlängenabhängigkeit der Photofragmentierung . . . . .	90
3.2	Tryptamin . . . . .	95
3.2.1	Struktur und Nomenklatur . . . . .	95
3.2.2	ESI-MS von Tryptamin . . . . .	97
3.2.3	Kollisionsinduzierte Fragmentierung . . . . .	98
3.2.4	Einfluss der Temperatur auf das Massenspektrum . . . . .	102
3.2.5	Photofragmentierung von Tryptamin . . . . .	105
3.2.6	Wellenlängenabhängigkeit der Fragmentierung . . . . .	110
3.3	Tyrosin . . . . .	113

---

3.3.1	Struktur und Nomenklatur . . . . .	113
3.3.2	ESI-MS von Tyrosin . . . . .	115
3.3.3	Kollisionsinduzierte Fragmentierung . . . . .	117
3.3.3.1	Vergleich der CID-Spektren von Phe, Tyr und Trp . . .	119
3.3.4	Einfluss der Temperatur auf die Massenspektren . . . . .	122
3.3.5	Photofragmentierung von Tyrosin . . . . .	125
3.3.6	Wellenlängenabhängigkeit der Photofragmentierung . . . . .	128
3.4	Adenin . . . . .	131
3.4.1	Struktur und Nomenklatur . . . . .	131
3.4.2	ESI-MS von Adenin . . . . .	133
3.4.2.1	Bildung von 6-Hydroxypurin . . . . .	135
3.4.3	Einfluss der Temperatur auf das Massenspektrum . . . . .	138
3.4.4	Photoinduzierte Fragmentierung von Adenin . . . . .	139
3.4.5	Wellenlängenabhängigkeit der Photofragmentierung . . . . .	140
3.5	Clusterbildung in der Paul-Falle . . . . .	144
3.6	Vergleich von Gasphasen- mit Lösungsmittelspektren . . . . .	149
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>155</b>





# Einleitung

Die Massenspektrometrie ist eine der ältesten Methoden zur Bestimmung von Atom- und Moleküleigenschaften. Ende des 19. Jahrhunderts bestimmte J. J. THOMSON die Masse von Ionen in Kathodenstrahlen mit Hilfe elektrischer und magnetischer Felder [1]. Diese Arbeiten waren Ausgangspunkt für die Entdeckung des Elektrons (J. J. THOMSON, Nobelpreis für Physik 1906) und den Nachweis von natürlichen Isotopen (F. W. ASTON, Nobelpreis für Chemie 1922).

Seitdem hat die Massenspektrometrie wertvolle Beiträge zur Analytik und sogar Informationen zur Aufklärung von Molekülstrukturen geliefert. Limitierend bezüglich der Probenmoleküle war dabei lange die Notwendigkeit, die Probe in die Gasphase bzw. das Vakuum zu überführen. Erst vor etwa zwanzig Jahren wurden neue Ionenquellen entwickelt, die nicht mehr vom Dampfdruck der untersuchten Substanz abhängen.

Mit Hilfe eines Laserpulses können Substanzen mit fast beliebiger Masse desorbiert werden. Durch Einbettung der Probe in eine Matrix aus Metallpulver und Glycerin konnte K. TANAKA 1988 erstmals Ionen mit einer Masse über 100000 *Da* massenspektrometrisch nachweisen (Nobelpreis für Chemie 2001) [2]. Durch das Einbetten in eine feste Matrix, die als Protonendonator oder Akzeptor wirkt, gelang M. KARAS und F. HILLENKAMP 1987 die Desorption von protonierten oder deprotonierten Substanzen [3]. Dieses Verfahren konnte 1989 auf eine Vielzahl von Proteinen mit einer Masse über 100000 *Da* angewendet werden [4]. Die Methode nennt sich *matrix assisted laser desorption/ionization* (MALDI) und ist heute eine der wichtigsten Methoden in der Massenspektrometrie.

Von M. DOLE stammte 1968 die Idee zur Elektrosprayionisation (ESI) [5]. Er konnte erstmals zeigen, dass sich große isolierte Moleküle aus geladenen Tröpfchen heraus erzeugen und ionisieren lassen, war aber nicht in der Lage, diese Moleküle näher zu charakterisieren. Dies gelang erst J. B. FENN. Er konnte die Masse der entstandenen Ionen mittels einer linearen Quadrupol-Ionenfalle analysieren (Nobelpreis für Chemie 2002) [6]. Später gelang ihm der massenspektrometrische Nachweis von Proteinen mit Massen über 70000 *Da* [7]. Die Darstellung nicht-flüchtiger, thermisch instabiler Moleküle als intakte Spezies ermöglicht nun auch ihre Spektroskopie ohne Umgebungseinflüsse in der Gasphase.

Als Nachweis der Photoanregung soll die Photofragmentierung dienen. Die Verwendung von massenspektrometrischen Verfahren bietet den Vorteil, dass man durch Massenselektion parallel zu spektroskopischen Untersuchungen, sicherstellen kann, dass das gemessene Signal von der gewünschten Substanz stammt. Die Fragmentierung als Nachweis der UV-Laser Absorption ist sehr effizient, da die Fluoreszenzquantenausbeute für viele Moleküle kleiner als 50% ist und der Teilchennachweis mit einer Nachweiswahrscheinlichkeit von 1 geführt werden kann.

In den 70er Jahren wurden erstmals Photofragmentspektren von Kationen in Ionenfallen aufgezeichnet. Die ersten Untersuchungen zur Wellenlängenabhängigkeit der Dissoziation von Radikalkationen nach elektronischer Anregung stammen von R. C. DUNBAR aus dem Jahr 1971 [8]. Durch chemische Ionisation konnten B. S. FREISER und J. L. BEAUCHAMP 1977 das erste UV-Spektrum einer protonierten Substanz in der Gasphase aufzeichnen [9]. Als Ionenfalle wurden jeweils Ionenfallen mit statischen elektrischen und magnetischen Feldern verwendet.

Experimentell einfacher ist das Einfangen von Ionen in elektrischen Wechselfeldern. Diese Technik wurde von 1958 von W. PAUL entwickelt (Nobelpreis für Physik 1989) [10]. Die Methode fand lange Zeit wenig Beachtung. Erst durch die von J. B. FENN eingeführte Kombination von Elektrosprayionenquelle mit Quadrupolfallen gewann diese Technik an Bedeutung und ist heute eine der am weitesten verbreiteten massenspektrometrischen Verfahren.

Wie oben beschrieben hat die technische Entwicklung der letzten Jahre zuverlässige und einfach zu bedienende Ionenquellen für protonierte und deprotonierte Substanzen hervor gebracht. Dennoch sind bisher nur wenige spektroskopische Untersuchungen an protonierten oder deprotonierten Systemen in der Gasphase durchgeführt worden. So wurden kleine aromatische Systeme mittels IR-Spektroskopie untersucht [11, 12, 13]. In jüngster Zeit wurden von JOUVET et al. die zeitaufgelöste Photodissoziation von protonierten Aminosäuren und Tryptamin bei einer festen Wellenlänge gemessen. [14, 15, 16].

Besonders wenig ist über die Wellenlängenabhängigkeit der elektronischen Anregung bekannt. Sowohl die Arbeiten von B. S. FREISER und J. L. BEAUCHAMP als auch die Untersuchungen von L. H. ANDERSEN et al. am *green fluorescent protein* [17, 18, 19] haben die Wellenlängenabhängigkeit nur punktweise bestimmt.

Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau einer Maschine mit der routinemäßig Spektroskopie an elektronischen Zuständen protonierter und deprotonierter Systemen durchgeführt werden kann. Elektronisch angeregte Moleküle und Ionen sind hoch reaktive Spezies. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Chemie des Alltags und in der Biologie. Dennoch ist nur

---

wenig über die elektronische Anregung von protonierten Substanzen und ihre Dynamik bekannt. Um die elektronische Anregung und deren Wellenlängenabhängigkeit zu messen, soll eine Elektrosprayionenquelle mit einer Paul-Falle kombiniert werden. Die Absorption kann dann durch die Dissoziation der angeregten Ionen nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieses Aufbaus soll eine deutlich genauere Messung der UV-Spektren von protonierten Substanzen in der Gasphase erreicht werden.

Die zusätzliche Ladung kann entweder direkt, oder über größere Entfernungen durch einen Feldeffekt Einfluss auf den Chromophor nehmen. Man fand z.B., dass die zusätzliche Ladung neue Zustände schafft, die in neutralen Molekülen nicht existieren [14, 20]. Verschieben sich durch die Ladung konische Durchschneidungen, so kann dies großen Einfluss auf die Lebensdauer und damit die Photostabilität haben. Diese Effekte lassen sich nur in der Gasphase störungsfrei untersuchen. Im Lösungsmittel kommt es immer zu einer Überlagerung von molekularen Effekten und Lösungsmittelleffekten. Dabei wird im Allgemeinen der molekulare Anteil vom Lösungsmittelanteil überdeckt.

Für den Nachweis über die Photofragmentierung müssen die untersuchten Systeme folgende Voraussetzungen erfüllen.

1. Die Energie der absorbierten Photonen muss größer sein, als die durchschnittliche Aktivierungsenergie für die Dissoziation.
2. Die untersuchten Systeme müssen oberhalb der Dissoziationsgrenze gut absorbieren.
3. Das Ion muss eine funktionelle Gruppe enthalten, die leicht protonierbar ist, damit es in der ESI ausreichend Ionen bildet. Dafür eignen sich z.B. Amine.

Systeme, die alle Voraussetzungen erfüllen, sind z.B. die aromatischen Aminosäuren. Aus massenspektrometrischen Untersuchungen ist bekannt, dass diese Substanzen leicht zu ionisieren und leicht zu fragmentieren sind. Zudem sind die spektroskopischen Eigenschaften der neutralen Substanzen gut untersucht. Sie sind deshalb gute Testsysteme, bei denen sich die Ladung außerhalb des Chromophors befindet. Untersuchungen an den neutralen Nukleobasen haben einige neu, interessante Eigenschaften zur Photostabilität gezeigt. Da sie sich ebenfalls leicht ionisieren und fragmentieren lassen, bieten sie sich damit ebenfalls für Testmessungen an. Sie sind Testmoleküle mit der Ladung im Chromophor.



# 1 Allgemeiner Teil

## 1.1 Moderne Methoden der Massenspektrometrie

Besonders zwei Ionenquellen haben sich in den letzten Jahren zur Ionisation von großen Molekülen bewährt. Zum einen die *electrospray ionization* ESI und zum anderen die *matrix assisted laser desorption/ionization* MALDI. Entsprechend den Eigenschaften der Ionenquellen haben sich populäre Kombinationen mit zum Teil neuen Massenanalysatoren herausgebildet, die eine wichtige Rolle in der modernen Bioanalytik spielen. Insbesondere ESI wird häufig zusammen mit Ionenfallen zur Massenanalyse verwendet. Da Flugzeitmassenspektrometer selten in Kombination mit ESI verwendet werden, wird hier auf eine nähere Diskussion dieser Technik verzichtet.

### 1.1.1 Matrix assisted laser desorption/ionization - MALDI

Die *matrix assisted laser desorption/ionization* wurde 1987 von KARAS und HILLENKAMP eingeführt [3, 21]. Für die Ionisation wird die Probe in eine Matrix eingebettet. Mit einem Laser wird dann Probe und Matrix desorbiert (s. Abb. 1.1). Während der Desorption kommt es zur Ionisierung der Probe. Diese Technik hat in der Bioanalytik eine wichtige Position eingenommen, da sie den massenspektrometrischen Nachweis auch von großen Proteinen mit standardisierten Methoden und geringem Probenverbrauch erlaubt [21, 4].

Die Matrix muss mehrere Funktionen erfüllen. Sie muss bei der Wellenlänge des Lasers absorbieren und die Ladung auf die Probenmoleküle transferieren. Die Matrix muss einen niedrigen Siedepunkt aufweisen, damit möglichst wenig Energie ins System eingebracht werden muss. Zudem muss die Matrix in der Lage sein, die Probe zu solvatisieren. Die Matrix muss die Probenmoleküle schon im Feststoff von einander separieren. Vielfach kommen aromatische Carbonsäuren wie 2,5-Dihydroxybenzoesäure, Sinapinsäure, Ferulasäure oder 2,4,6-Trihydroxyacetophenon zur Verwendung. Aufgrund der einfachen Bedienung wird häufig ein  $N_2$ -Laser mit  $\lambda = 337 \text{ nm}$  verwendet.

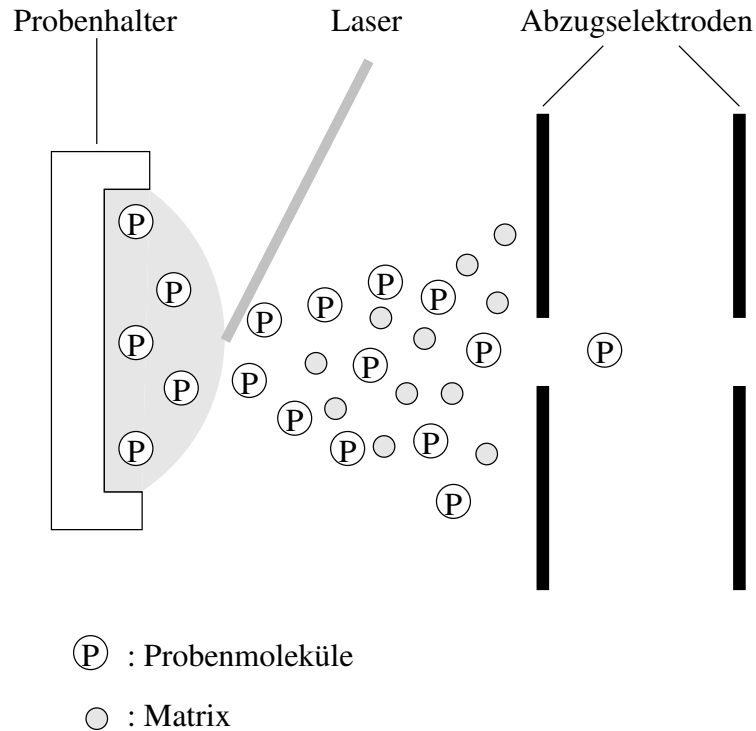


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau einer MALDI-Quelle. Ein Laser desorbiert Matrix und Probe. Während der Desorption kommt es zur Ionisation. Entstandene Ionen werden mit Hilfe der Abzugselektroden zum Detektor hin beschleunigt.

Die Energie des Lasers wird in der Matrix deponiert. Dies führt zu einer sehr schnellen Erhitzung des Materials. Die Matrix verdampft explosionsartig und reißt Proben- und Matrixmoleküle mit. Die Probe liegt schnell als isoliertes Teilchen in der Gasphase vor, so dass die Matrix nur einen Teil ihrer thermischen Energie auf die Probe übertragen kann. Durch Kollisionen mit Neutralteilchen kann die Probe zudem Schwingungsenergie abgeben. Durch dieses schnelle Aufheizen und wieder Abkühlen, wird die Mehrzahl der Probenmoleküle nicht zerstört.

Dieses Konzept des sehr schnellen Aufheizens wird in mehreren massenspektrometrischen Verfahren wie *fast atom bombardement (FAB)* [22], *secondary ion mass spectrometry (SIMS)* [23, 24] oder  *$^{252}\text{Cf}$ -plasma desorption (Cf-PD)* [25] verwendet. Die letzteren Methoden deponieren die Energie kurzfristig in dem Probenmolekül, so dass es insbesondere bei großen Molekülen zu verstärkten Fragmentierungen kommt. Dennoch gelang der Nachweis von kleineren Peptiden sowohl mit FAB [26] als auch mit PD [27].

Im Gegensatz zu FAB, SIMS und PD wird bei MALDI die Energie nicht direkt dem Probenmolekül zugeführt, sondern dessen Umgebung, der Matrix. Diese verdampft schlagartig und reißt die Probe mit, die dabei ionisiert wird. Die Einzelheiten der Ionisation beim Maldiprozess sind nicht geklärt. Diskutiert werden mehrere Modelle.

- Es ist möglich, dass die Ladungstrennung bereits während der Probenpräparation stattfindet und die Probenmoleküle als protonierte Spezies in der Matrix vorliegen, die dann direkt desorbiert werden [21].
- Der primäre Schritt ist ein resonanter Mehrphotonenschritt in der Matrix. Dadurch werden Radikalkationen erzeugt, die anschließend ein Proton auf die Probe übertragen (Photosäuren). Diese Prozesse laufen im Bereich von Nanosekunden ab. Die Ionisation findet während der Desorption statt. Es handelt sich dabei um Gasphasenreaktionen von Einzelteilchen. Der Ladungstransfer auf die Probe findet in der Gasphase statt. Die Coulombkraft wird nicht mehr durch die Matrix abgeschirmt, so dass sich bevorzugt einfach geladene Ionen bilden [28].
- Beim Clusterionisationsmechanismus ist der erste Schritt ebenfalls eine Photoionisation der Matrix. Allerdings schließt sich daran nicht direkt die Ionisation an, sondern die Desorption von geladenen Clustern. Innerhalb des Clusters kommt es dann zu Protontransferreaktionen. Durch Überschussenergie, die während der Bildung des Clusters übertragen wurde, zerfällt der Cluster anschließend. Die Ionisation findet nach der Desorption innerhalb eines Clusters statt [29].

MALDI liefert im Gegensatz zu ESI (s. Kap. 1.1.2) mehrheitlich einfach geladene Ionen. Bei großen Molekülen können auch zwei- oder dreifach geladene Ionen beobachtet werden. Diese haben allerdings nur eine geringere Intensität und je höher die Ladungszahl ist, desto geringer wird die Intensität im Massenspektrum. Dies hat den Vorteil, dass sich das gesamte Signal in einem Peak findet und man dadurch ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis erhält. Ein Nachteil von MALDI ist die aufwendige Probenpräparation. Das Probenmolekül muss in eine geeignete Matrix eingebracht werden. Dafür muss erst eine passende Matrix gefunden werden. Das Erstellen der Matrix ist auch bei bekannter Zusammensetzung zeitaufwendig. Insgesamt ist die Probenpräparation deutlich langwieriger als bei ESI.

Die Ionisation findet im Vakuum statt. Die Probe muss dazu mit der Matrix erst durch eine Schleuse ins Vakuum eingebracht werden. Dies erfordert zusätzlichen apparativen Aufwand. Bei MALDI werden die Ionen durch gepulste Laser erzeugt, im Gegensatz zu ESI handelt es sich also um eine gepulste Ionenquelle. Als Massenanalytoren eignen sich entsprechend gepulst arbeitende Analytoren wie *time of flight* TOF. Bei TOF-Analytoren ist der apparative Aufwand nicht von der Größe der zu untersuchenden Massen abhängig. Sowohl die Massenauflösung als auch die Geschwindigkeit, mit der Massenspektren aufgenommen werden können, sind höher als bei Paul-Fallen. Die Kombination MALDI-TOF wird darum häufig verwendet, wenn die Geschwindigkeit, mit der Massenspektren aufgezeichnet werden, von Bedeutung ist.

## 1.1.2 Elektrospray Ionisation - ESI

Die ESI-Quelle stellt eine besonders leicht zu bedienende Ionenquelle dar. Die Probe wird mittels einer Spritze mit automatischem Vorschub in die Quelle eingebracht. Für alle wasserlöslichen Verbindungen führt dies zu einer sehr einfachen und schnellen Probenpräparation, da lediglich eine Lösung angesetzt werden muss. Die Ionisation findet bei Atmosphärendruck unter Schutzgas statt, so dass auch hier kein großer apparativer Aufwand nötig ist.

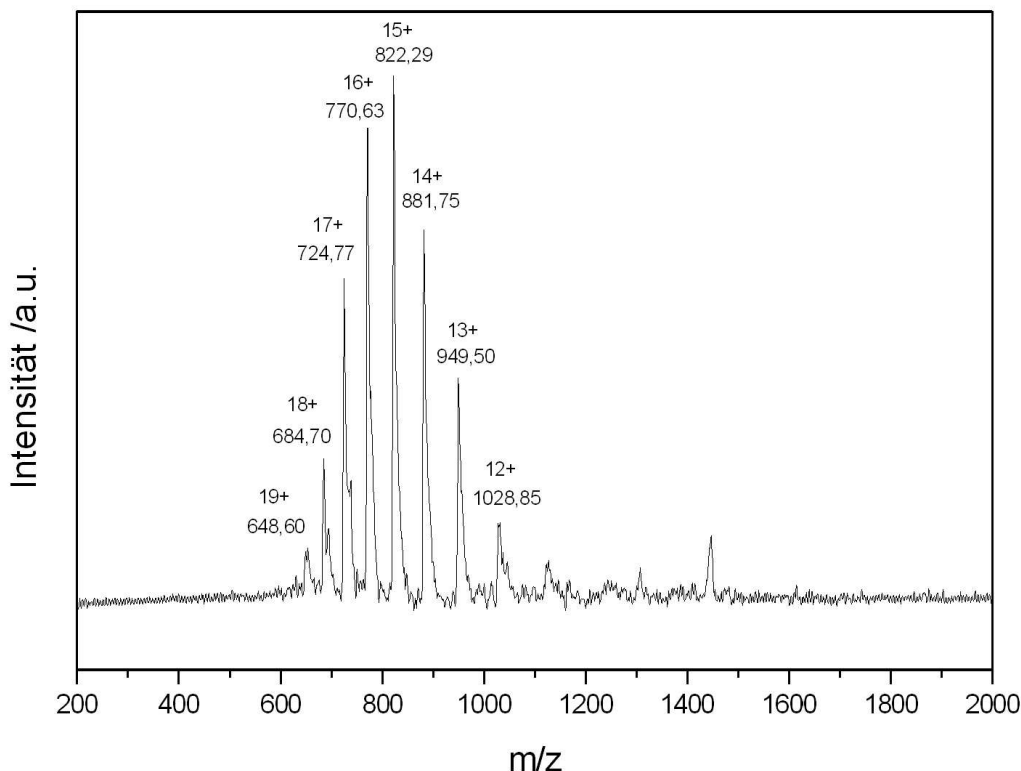


Abbildung 1.2: ESI-MS von Cytochrom C in Methanol:Wasser:Essigsäure 49,5:49,5:1. Es zeigt eine typische, glockenförmige Ladungsverteilung. Der intensivste Peak ist  $[M + 15H]^{15+}$ . Durch die  $1/z$ -Abhängigkeit, sind die Peaks nicht äquidistant. Die Abstände nehmen mit größerem  $m/z$ -Verhältnis zu.

Ein großer Nachteil der ESI-Quelle ist die Entstehung mehrfach geladener Ionen. Damit werden die vorhandenen Probenmoleküle auf mehrere Spezies verteilt, was zu einer Verschlechterung der Signalstärke führt. Zusätzlich werden die Massenspektren komplizierter, da für jede Substanz in der Probe mehrere Peaks im Massenspektrum erscheinen. Ab einer Masse von ca. 1000 Da entstehen vermehrt mehrfach geladene Ionen [30]. Ob weitere Protonen an das Ion gebunden werden, hängt davon ab, ob das Molekül weitere



Orte mit hoher Protonenaffinität besitzt und wie weit diese von einander entfernt sind (Coulomb-Abstoßung). Während der Ionisierung verliert das Molekül seine Solvathülle. Die Ladungen können nicht mehr abgeschirmt werden. Die vom Abstand der Ladungen im Molekül abhängende Coulombabstoßung bestimmt, wieviele Ladungen stabilisiert werden können.

Die bevorzugte Bildung von mehrfach geladenen Ionen hat aber auch den Effekt, dass die Massenanalysatoren nur für einen relativ kleinen  $m/z$ -Bereich ausgelegt werden müssen. Auch bei sehr großen Molekülen liegt das resultierende  $m/z$ -Verhältnis unter 3000 *Da*. Massenanalysatoren, die elektrische oder magnetische Felder nutzen, z.B. Penning oder Paul-Fallen, kommen bei der Verwendung von ESI-Quellen mit deutlich kleineren Feldstärken aus. Der apparative Aufwand wird dadurch erheblich verringert. ESI ist eine kontinuierliche Methode. Sie wird daher bevorzugt mit kontinuierlich arbeitenden Massenanalysatoren wie Quadrupolionenfällen (s. Kap. 1.1.3.1) eingesetzt.

In Abb. 1.2 ist das ESI-Massenspektrum von Cytochrom C<sup>1</sup> gezeigt. Es zeigt eine typische, glockenförmige Ladungsverteilung. Die Verteilung hängt vom pH-Wert des verwendeten Lösungsmittels ab. In essigsaurer Lösung liegt das Maximum zwischen +13 und +16 [31, 32]. Dies ist in guter Übereinstimmung mit Abb. 1.2. In neutraler Lösung verschiebt sich das Maximum zu geringeren Ladungszahlen von +8 bis +10. Die Abhängigkeit des Massenspektrums vom pH-Wert des verwendeten Lösungsmittels wird auf Änderungen der Konformation des Moleküls zurückgeführt [31, 33]. Die Mehrfachladungen führen zu zwei Problemen. Da sowohl die Masse als auch die Anzahl der Ladungen nicht bekannt sind, muss man zwei Peaks im Spektrum eindeutig einem Molekül zuordnen können, um die Masse bestimmen zu können. Hat man allerdings mehrere Peaks einer Masse zuordnen können, erhöht dies die Genauigkeit der Massenbestimmung, da über mehrere Peaks die Masse gemittelt werden kann [30].

Die Berechnung der Molekülmasse aus mehreren unterschiedlich geladenen Spezies im Massenspektrum wird Dekonvolution genannt. Für das gezeigte Massenspektrum ergibt die Dekonvolution eine Masse von 12,3 *kDa*. Dies stimmt mit der Herstellerangabe von ca. 12,4 *kDa* überein. Während der Elektrosprayionisation können nicht nur Protonen sondern auch Natrium- und Kaliumionen als Ladungsträger auf das Molekül gelangen. Dies führt bei der Dekonvolution zu Fehlern in der Massenbestimmung. Der Unterschied zur Herstellerangabe könnte z.B. durch unterschiedlich starke Adduktbildung entstanden sein.

---

<sup>1</sup>Aus Pferdeherzen, Hersteller: Serva Electrophoresis

### 1.1.2.1 Funktionsweise einer ESI-Quelle

In Abb. 1.3 ist der schematische Aufbau der Elektrosprayionenquelle gezeigt. Durch den Probeneinlass wird die Probenlösung zur Elektrospraykapillare gepumpt. Die Ionisation findet im elektrischen Feld zwischen der Spitze der Nadel und der Gegenelektrode (*sprayshield*) statt. Die Ionisationskammer steht dabei unter Atmosphärendruck.

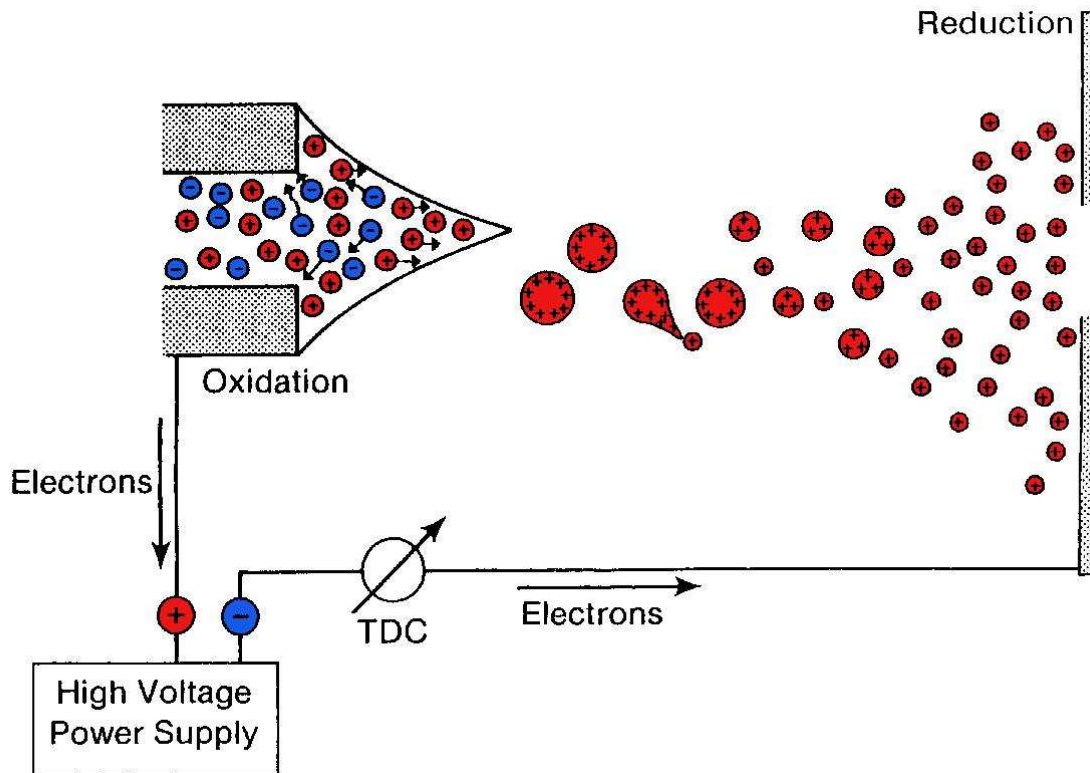


Abbildung 1.3: Elektrospraykapillare mit Taylorcone [34]. Das elektrische Feld sorgt für eine Ungleichverteilung der Ladung in der Flüssigkeit. Es entstehen geladene Tropfen die in immer kleinere Tropfen zerfallen, bis einzelne Ionen übrig bleiben.

Wird die Ionenquelle im positiven Modus betrieben, so liegt die Spitze relativ zum Sprayshield auf einem höheren Potential. Das elektrische Feld an der Spitze sorgt für eine Ladungstrennung. Positive Ladungsträger wie Protonen und Natriumionen werden mit dem Lösungsmittel aus der Spitze der Nadel herausgetrieben. An der Spitze der Nadel bildet sich ein sog. *Taylorcone* aus, in dem eine ungleichmäßige Verteilung von positiven und negativen Ladungen vorliegt. Reißt jetzt von der Spitze des Taylorcones ein Tropfen ab, so enthält dieser vorzugsweise mehr positive als negative Ladungen.

Das Lösungsmittel dampft ab und der Tropfen schrumpft. Dies wird durch einen geheizten Stickstoffgegenstrom unterstützt. Die Überschussladungen sammeln sich auf der Oberfläche des Tropfens. Unterschreitet der Tropfen eine kritische Größe, so wird die

Coulombabstoßung so groß, dass geladene Tröpfchen den primären Tropfen verlassen können. Der Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, diskutiert werden zwei Modelle [34, 35].

- Nach dem *charge residue model* (CRM) von DOLE [5] schrumpft der Tropfen bis er das Rayleigh-Limit [36] erreicht hat. Dannach platzt der Tropfen und bildet mehrere etwa gleichgroße Tropfen, wobei sich die Ladungen auf die neu entstandenen Tropfen verteilen. Dieser Vorgang wiederholt sich so lange, bis im Idealfall nur das Probenmolekül mit einer positiven Überschussladung entsteht.
- Im *ion evaporation modell* (IEM) von IRIBARNE und THOMSON [37] können kleine Ionen wie Protonen und Natriumionen den großen Tropfen mit einem Teil ihrer Solvathülle verlassen. Es verlässt also ein kleinerer Tropfen mit einer Ladung den Muttertropfen. Auch dieser Vorgang wiederholt sich so oft, bis im Idealfall ein Tropfen überbleibt, der nur noch eine Ladung und ein Probenmolekül enthält.

In beiden Fällen ist der letzte Schritt identisch. Der Tropfen besteht nur noch aus wenigen Lösungsmittelmolekülen, einer oder mehrerer positiven Überschussladungen und der Probe. Wenn die letzten Lösungsmittelmoleküle abdampfen verbleibt die Ladung auf der Probe. Das entstandene Ion befindet sich nun ohne Solvathülle in der Gasphase und kann durch geeignete Ionenoptiken (s. Kap. 2.2.1.2) in den Vakuumteil der Apparatur transferiert werden.

Da während der Ionisierung die innere Energie der Probe kaum erhöht wird (Verdampfungskälte), ist diese Ionisierungsmethode sehr schonend. Es findet während der Ionisierung kaum Fragmentierung statt. Die Methode ist damit auch zur Untersuchung von labilen Verbindungen und nicht kovalent gebundenen Komplexen [38] verwendbar. Die Masse spielt bei diesem Prozess keine Rolle. Wichtig ist lediglich, dass sich die Substanz in einem Tropfen einschließen lässt. So wurden mittels ESI schon komplette DNA-Moleküle mit einer Masse von 110 *MDa* erfolgreich massenspektrometrisch untersucht [39].

### 1.1.3 Massenanalyse mittels elektrischer Wechselfelder

#### 1.1.3.1 Lineare Quadrupolfalle

Mit elektrischen Wechselfeldern ist es möglich Ionen einzufangen [10]. Die Kombination aus Spannung und Frequenz, die nötig ist, um ein Ion zu fangen, hängt von der Geometrie der Ionenfalle und vom  $m/z$ -Verhältnis des Ions ab.

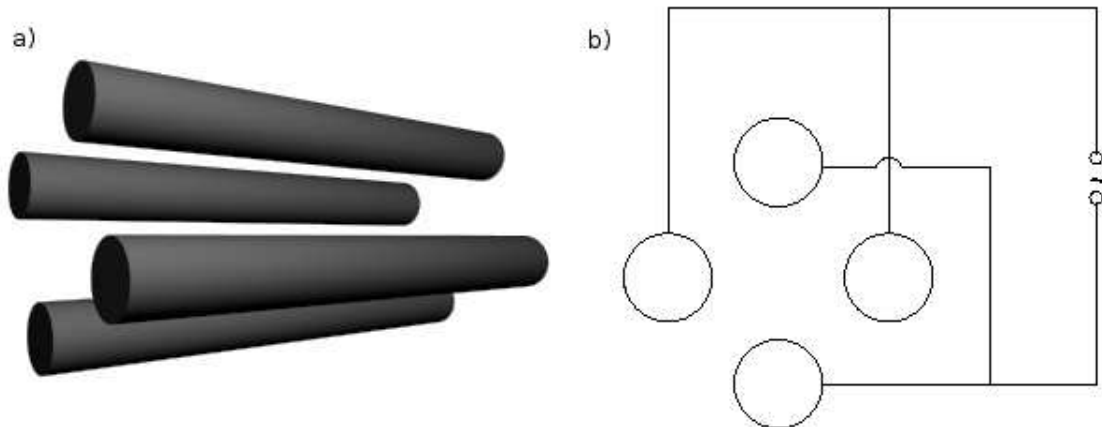


Abbildung 1.4: Lineare Quadrupolfalle. a) Perspektivische Darstellung einer linearen Quadrupolfalle. b) Die gegenüberliegenden Elektroden sind zusammen geschaltet. Zwischen den beiden Elektrodenpaaren wird eine Wechselspannung angelegt.

Die einfachste Anordnung zur Erzeugung eines massenselektiven elektrischen Feldes ist in Abb. 1.4a) dargestellt. Sie besteht aus vier Stäben, die parallel angeordnet sind. Die jeweils gegenüberliegenden Elektroden sind zusammen geschaltet. Zwischen den beiden Elektrodenpaaren wird eine Wechselspannung angelegt (s. Abb. 1.4b)). Diese Anordnung wird lineare Quadrupolfalle genannt. Durch die Wechselspannung führen die Ionen eine Taumelbewegung zwischen den Stäben aus. Entlang der Symmetrieachse erfährt das Ion keine Beschleunigung, es kann nur in zwei Raumrichtungen eingefangen werden.

Abhängig von der Kombination aus Spannung und Frequenz kann nur ein bestimmter Massenbereich den Quadrupol passieren. Bei allen anderen  $m/z$ -Verhältnissen ist die Auslenkung während der Taumelbewegung so groß, dass sie die Falle verlassen. Wird zusätzlich zum Wechselspannungsanteil eine Gleichspannung zwischen den Elektrodenpaaren angelegt, so wird der Massenbereich für den die Falle transparent ist verkleinert. Im Extremfall kann nur ein einziges  $m/z$ -Verhältnis die Falle passieren, sie arbeitet als Massenfilter. Der Filter kann durchgestimmt werden und so zur Erzeugung von Massenspektren genutzt werden.

Der Filter arbeitet kontinuierlich und eignet sich entsprechend zur Verwendung mit eben-

falls kontinuierlich arbeitenden Ionenquellen. Die Quadrupolfalle wird häufig mit Elektronenstoßquellen (z.B. in Restgasanalysatoren) oder mit Elektrosprayquellen verwendet.

Die Anzahl der Stäbe lässt sich beliebig erhöhen. Gebräuchlich sind Hexapol- und Oktupolfallen. Je größer die Anzahl der Stäbe ist, desto größer ist der Massenbereich, der den Multipol gleichzeitig passieren kann. Gleichzeitig sinkt die Massenauflösung für eine einzelne Masse. Solche Multipole werden als Ionenoptiken eingesetzt. Mit ihnen können Ionen über eine große Strecke fast verlustfrei transportiert werden.

### 1.1.3.2 Paul-Falle

Die Paul-Falle wird ebenfalls zu den Quadrupolfallen gezählt, auch wenn sie nur drei Elektroden besitzt.

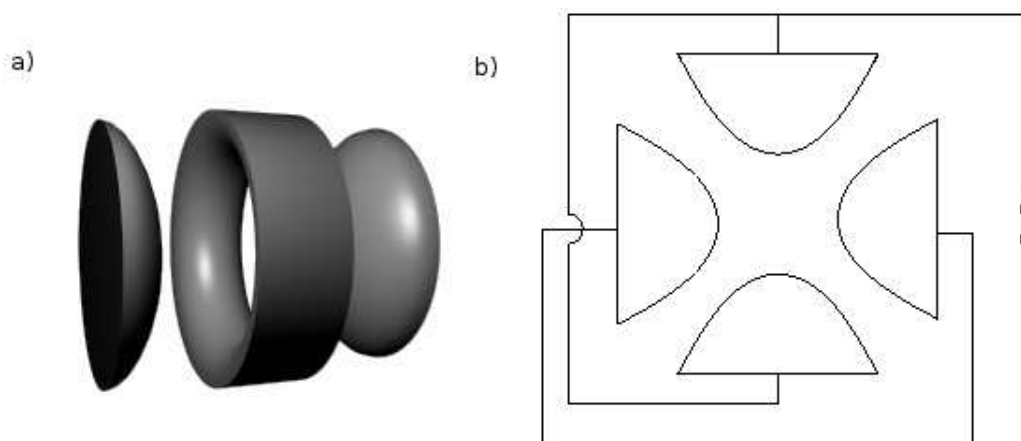


Abbildung 1.5: Paul-Falle. a) Perspektivische Darstellung einer Paul-Falle. b) Querschnitt durch die Falle.

In der schematischen Darstellung in Abb. 1.5 sieht es so aus, als ob die Paul-Falle ebenfalls aus vier Elektroden bestehen würde. Aus der perspektivischen Darstellung (Abb. 1.5) ist jedoch ersichtlich, dass ein Elektrodenpaar zu einer einzigen, ringförmigen Elektrode zusammengefasst ist. Durch diese Anordnung lassen sich Ionen in allen drei Raumrichtungen einfangen. Anders als bei linearen Quadrupolfallen, in denen man Ionen nur in zwei Raumrichtungen einfangen kann.

Wie bei der linearen Quadrupolfalle sind die Flugbahnen von einem breiten Massenbereich stabil, wenn kein Gleichspannungsanteil involviert ist. In diesem Fall können alle ankommenden Massen eingefangen werden. Die Ionen können entweder direkt in der Falle erzeugt, oder von außen in sie hereingeschossen werden. Kommen die Ionen von außen, so müssen Öffnungen in den Elektroden angebracht werden. Häufig werden die Ionen entlang der Rotationsachse durch die Endkappen in die Falle gebracht.

Aus Gründen der Energieerhaltung muss das Ion innerhalb der Falle kinetische Energie verlieren. Ansonsten könnte es die Falle auf der gegenüberliegenden Seite wieder verlassen. Zu diesem Zweck wird Helium in die Falle eingelassen. Durch Stöße mit dem Puffergas überträgt das Ion Energie auf das Helium und kann so die Falle nicht direkt wieder verlassen.

### 1.1.4 Massenanalyse mittels eines statischen Magnetfeldes

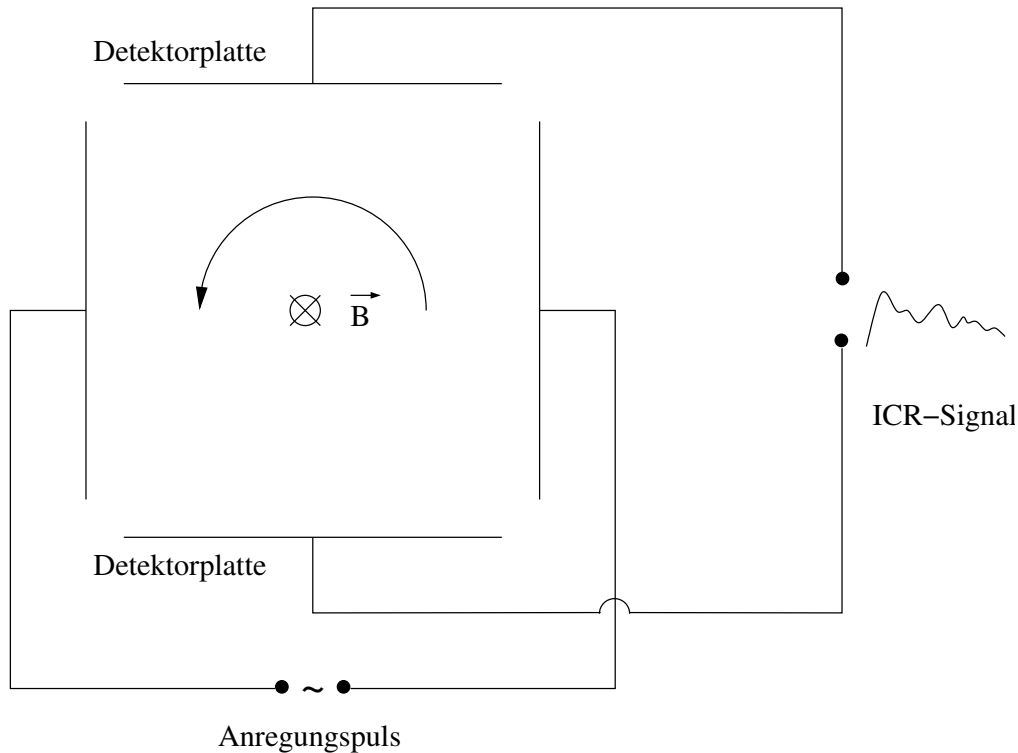


Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau eines ICR. Die im Magnetfeld vorhandenen Ionen werden durch einen Anregungspuls zu einer kohärenten Bewegung angeregt. Durch die umlaufenden Ionen werden auf den Detektorplatten Spiegelladungen erzeugt, deren Frequenz ein Maß für das  $m/z$ -Verhältnis des Teilchens ist.

Fliegt ein geladenes Teilchen senkrecht in ein homogenes Magnetfeld, so wird es von der Lorentzkraft auf eine Kreisbahn gezwungen. Das Ion wird so im Magnetfeld der PENNING Falle eingefangen [40]. Aus Zentripetal- und Lorentzkraft ergibt sich die Cyclotronfrequenz  $f$ , mit der ein geladenes Teilchen im Magnetfeld umläuft:

$$f = \frac{qB}{2\pi m} \quad (1.1)$$

$q$ : Ladung;  $B$ : magnetische Flussdichte;  $m$ : Masse

Daraus ergibt sich, dass bei konstantem Magnetfeld jedes  $m/z$ -Verhältnis mit einer anderen Frequenz umläuft. Die Ionen werden mit einem elektrischen Wechselfeld angeregt. Stimmt die Frequenz des elektrischen Feldes mit der Cyclotronfrequenz überein, so wird das dazugehörige  $m/z$ -Verhältnis zu einer Kreisbewegung angeregt.

Da es sich um eine resonante Anregung handelt, nimmt das Teilchen beständig Energie aus dem elektrischen Feld auf. Dies führt zu einer spiralförmigen Flugbahn. Durch einen geeignet aufgestellten Ionendetektor kann die resonante Anregung nachgewiesen werden.

Dies war in den Anfängen der *Ionen Cyclotron Resonanz* (ICR) Massenspektrometrie eine übliche Methode [41, 42].

Durch die Einführung der Fouriertransform-ICR (FT-ICR) 1974 durch M. B. COMISAROW und A. G. MARSHALL konnte die Messgeschwindigkeit drastisch erhöht werden. Dabei werden die Ionen mit einem Breitbandpuls zu einer kohärenten Bewegung angeregt. Jedes  $m/z$ -Verhältnis beginnt mit seiner Cyclotronfrequenz umzulaufen. Jedes  $m/z$ -Verhältnis erzeugt periodisch Spiegelladungen auf den Detektorplatten. An den Detektorplatten kann so das überlagerte Signal aller Frequenzen gemessen werden. Durch eine Fouriertransformation lassen sich die Frequenzanteile zurück rechnen. Bei bekannter Magnetfeldstärke lässt sich daraus das  $m/z$ -Verhältnis errechnen.



## 1.2 Photofragmentierung nach elektronischer Anregung

Grundsätzliches Problem jedes spektroskopischen, insbesondere optischen Experiments, ist der Nachweis der Absorption. In Lösung ist dies wegen der Möglichkeit hoher Teilchendichte durch eine direkte Intensitätsmessung möglich. In der Gasphase ist dieses Verfahren mit großen Schwierigkeiten verbunden. Durch geringe Teilchenzahlen ist der Effekt klein und die Messungen werden durch starke Fluktuationen der Teilchendichte und der Lichtintensität erschwert.

Besonders bei der Untersuchung der elektronischen Anregung ist es häufig einfacher die molekulare Antwort nach Photoanregung nachzuweisen. Solche sind Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Ionisation und Dissoziation. Durch die *Stokes shift* lassen sich Fluoreszenz- und Phosphoreszenzphotonen deutlich von eingestrahlenen Photonen unterscheiden und liefern so einen eindeutigen Nachweis. Aufgrund der sehr speziellen Geometrie der Paul-Falle ist der Fluoreszenznachweis darin zwar möglich [43] aber schwierig, da ein großer Teil der Photonen auf die Elektroden trifft bzw. diffus herausreflektiert wird. Reicht die Photonenergie aus, um Bindungen zu brechen, ist auch die Dissoziation ein möglicher Nachweis. So lässt sich durch den Nachweis von Fragmenten ebenfalls die Absorption nachweisen. Theoretisch lassen sich alle entstandenen Fragmente detektieren.

Durch die resonante Absorption von mehreren Photonen kann auch ein Elektron herausgeschlagen werden (*resonance enhanced multiphoton ionization / REMPI*). Sowohl das Elektron als auch das Kation können zum Nachweis genutzt werden. Die Photoionisation scheidet für protonierte Systeme aus, denn die Ionisierungsenergie für bereits positiv geladene Systeme ist sehr hoch ( $> 20 \text{ eV}$ ) und kann mit wenigen Photonen nicht erreicht werden.

Nutzt man die molekulare Antwort zum Nachweis der Absorption, so kann ihre genauere Untersuchung weitere Informationen liefern, wie hier die Fragmentanalyse. Auf die in dieser Arbeit verwendete Photofragmentspektroskopie soll nun näher eingegangen werden.

### 1.2.1 Prinzip der Photofragmentspektroskopie

Absorbiert ein Molekül oder Ion ein Photon im Vakuum, so kann es diese Energie, anders als im Lösungsmittel, nicht einfach an die Umgebung abgeben. Abhängig von der absorbierten Energie können verschiedene Prozesse ablaufen. Im Folgenden wird nur die UV-Anregung diskutiert, bei welcher durch elektronische Anregung Energien oberhalb der Dissoziationsenergie eingebracht werden.

Grundsätzlich unterscheidet sich die elektronische Anregung von protonierten Systemen nicht von der in neutralen Systemen. Es gelten sowohl die Auswahlregeln als auch das Franck-Condon-Prinzip. Das protonierte Molekül hat eine geschlossene Elektronenhülle, so dass auch die Nomenklatur der neutralen Moleküle übernommen werden kann. Nach elektronischer Anregung kann man zwischen strahlenden und nichtstrahlenden Deaktivierungsprozessen unterscheiden.

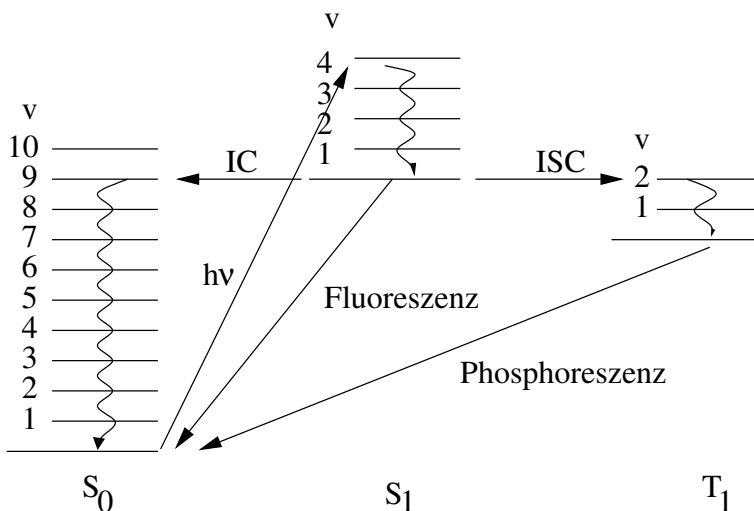


Abbildung 1.7: Jablonski Termschema. Nach Absorption eines Photons  $h\nu$  können mehrere Prozesse stattfinden. Durch Fluoreszenz und Phosphoreszenz kann die Energie direkt wieder abgegeben werden. Strahlungslos kann durch *internal conversion* die elektronische Energie in Schwingungsenergie konvertiert werden.

Durch strahlende Prozesse (Fluoreszenz und Phosphoreszenz) kann die aufgenommene Energie direkt wieder abgegeben werden. Natürlich können normalerweise die emittierten Photonen gemessen werden. In der Paul-Falle ist dies jedoch sehr schwierig. Nach strahlender Relaxation kommt es nicht zur Fragmentierung und die Absorption kann nicht nachgewiesen werden.

Eine hohe Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzausbeute ist aber die Ausnahme. Der weitaus größte Teil der angeregten Ionen konvertiert die elektronische Energie strahlungslos durch *internal conversion* in Schwingungsenergie des elektronischen Grundzustands. Auch wenn

die innere Energie des System oberhalb der Dissoziationsenergie liegt, muss es nicht zwangsweise zur Fragmentierung kommen. Nach der *internal conversion* wird die Energie durch *internal vibrational redistribution* auf alle Schwingungsfreiheitsgrade verteilt. Die Fragmentierung erfolgt dann statistisch nach der RRKM-Theorie. In einem größeren Molekül muss der Ort der Fragmentierung also nicht der Ort der Absorption sein. Je größer die Anzahl der internen Freiheitsgrade, bei gleicher interner Energie, desto kleiner wird die Zerfallsrate. Wie im experimentellen Teil ausgeführt, befindet sich in der Paul-Falle Helium als Stoßgas, um die Ionen im Mittelpunkt der Falle zu konzentrieren. Mit zunehmender Wartezeit bis zum Zerfall steigt die Anzahl der Stöße mit dem Restgas, durch die das Molekül Energie abgeben kann. Je nach vorliegender Situation kann dann die Fragmentierung ausbleiben. Durch die Abstrahlung von IR-Photonen kann eine zusätzliche Deaktivierung erfolgen. Die Effektivität der Photofragmentierung sinkt also prinzipiell mit der Größe des untersuchten Systems.

Die Dissoziation von neutralen Molekülen führt in der Regel zu zwei Neutralfragmenten, da eine Ladungstrennung aufgrund der Coulombkraft in der Gasphase energetisch extrem ungünstig ist. Neutrale Fragmente sind jedoch schwierig nachzuweisen. Die Photofragmentierung ist für die Untersuchung von ungeladenen Systemen also nicht geeignet. Ist das System vor der Absorption aber schon geladen, so muss die Ladung auf einem der beiden Fragmente verbleiben. Beobachtet man das Auftauchen von Fragmenten in Abhängigkeit der eingestrahlten Energie, lassen sich Anregungsspektren aufnehmen.

Die untersuchten Systeme absorbieren alle bei Energien oberhalb von  $34\,000\text{ cm}^{-1}$  ( $4,2\text{ eV}$ ). Diese Energie liegt oberhalb der durchschnittlichen Bindungsenergie von  $C-C$  ( $3,6\text{ eV}$ ) oder  $C-N$  Bindungen ( $3,0\text{ eV}$ ) [44]. Die Präsenz einer Ladung sollte die Bindungen im Molekül schwächen, so dass in protonierten Systemen mit Dissoziationsenergien deutlich unterhalb von  $4\text{ eV}$  zu rechnen ist. Für die protonierten aromatischen Aminosäuren liegt die Dissoziationsenergie entsprechend unterhalb von  $3\text{ eV}$  [45]. Ein Einphotonenschritt kann somit zur Photofragmentierung führen.

Ein Vorteil bei Verwendung von Ionenfallen ist die Möglichkeit, das gleiche Ensemble mehrfach mit mehreren Laserschüssen zu bestrahlen.

## 1.2.2 Resonante Mehrphotonenschritte

Die Absorption von mehreren Photonen unterscheidet sich in protonierten Systemen deutlich von der in neutralen. In neutralen Systemen führt ein Zweiphotonenschritt mit UV-Photonen im Allgemeinen zur Ionisation. Die Bildung von Ionen nach resonanter Lichtabsorption wird *resonance enhanced multi photon ionization* REMPI genannt. Bei der REMPI *Photoelektronenspektroskopie* wird zusätzlich die Energie des herausgelösten Elektrons gemessen.

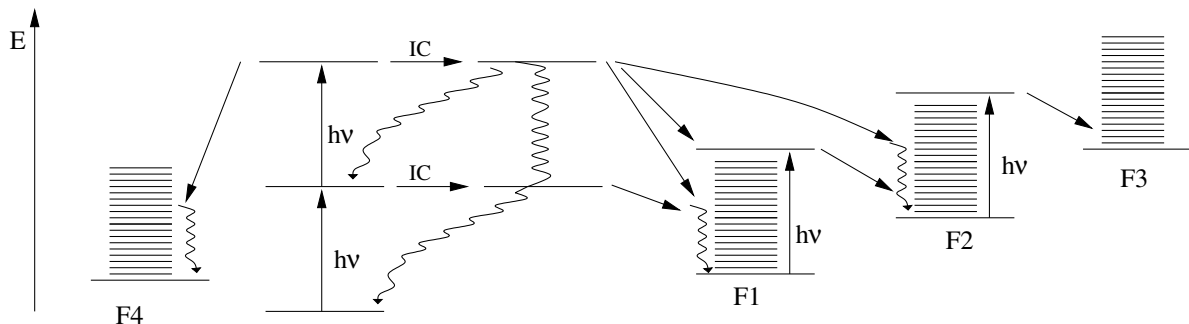


Abbildung 1.8: Mögliche Absorptionswege bei Multiphotonabsorption in protonierten Systemen.

In protonierten Systemen erfolgt im Gegensatz dazu nach einer Zweiphotonenabsorption keine weitere Ionisation. Die bereits vorhandene positive Ladung erhöht das Ionisationspotential so weit, dass dieser Prozess nur mit vielen Photonen möglich wäre und deshalb sehr unwahrscheinlich ist. Das zweite Photon kann nun in höhere elektronische Zustände absorbiert werden.

Nach der Lichtabsorption von zwei Photonen kann sich direkt die Fragmentierung oder eine *internal conversion* anschließen (s. Abb. 1.8). Die hohen elektronischen Niveaus können direkt dissoziativ sein (Fragment F4 in Abb. 1.8). Es kann jedoch auch *internal conversion* zu  $S_1$  und  $S_0$  erfolgen. Das Ion befindet sich danach in einem extrem schwingungsangeregten Zustand. Im Vergleich zum Einphotonenschritt ist die interne Energie entsprechend höher und man befindet sich weit oberhalb aller Dissoziationsenergien. Es können dadurch auch entsprechend hochliegende Fragmentierungskanäle angesprochen werden (Fragment F2 in Abb. 1.8). Aufgrund der größeren Überschussenergie sollte nach der RRKM-Theorie die Fragmentierungsrate wesentlich größer sein als beim Einphotonenschritt. Das so entstandene Fragment könnte je nach Struktur nochmals ein Photon des selben oder eines nachfolgenden Laserpulses absorbieren und weiter fragmentieren (F3 in Abb. 1.8).

Experimentell kann nur schwer zwischen Ein- und Zweiphotonen-Dissoziationsprozessen unterschieden werden. Es sind bei Mehrphotonenanregung die gleichen Fragmentierungs-

kanäle möglich, wobei jedoch höher energetische Fragmentierungskanäle vermehrt auftreten. Theoretisch lässt sich dies an einer linearen bzw. quadratischen Abhängigkeit der Fragmentintensität von der Laserintensität ablesen. Allerdings macht die geringe Teilchenzahl (100 pro Messzyklus) eine verlässliche Aussage sehr schwierig. Nach Zweiphotonenschritten sollten jedoch Fragmente zu beobachten sein, deren Bildungsenergie so hoch ist, dass sie nicht durch einen Einphotonenschritt entstanden sein können. Daran sollte sich eine Mehrphotonenanregung erkennen lassen. Da schon ein Einphotonenschritt für die Fragmentierung ausreicht, ist davon auszugehen, dass experimentell je nach Laserintensität sowohl Ein- also auch Zweiphotonenschritte vorkommen.

Ionen können für mehr als eine Sekunde in der Ionenfalle gefangen werden. Dies ermöglicht es, das gleiche Ionenensemble mehrfach mit dem Laser zu beschießen. Dadurch ist es möglich, einen Großteil der Ionen zu fragmentieren. So lassen sich auch weniger wahrscheinliche Fragmentierungskanäle mit ausreichender Intensität erzeugen. Damit ergibt sich eine weitere Möglichkeit für die Absorption von mehreren Photonen. Ist während des ersten Laserschusses ein Fragment entstanden, so kann dieses Fragment während eines zweiten Laserschusses ein weiteres Photon absorbieren. Danach kann sich eine weitere Fragmentierung anschließen. Es ergeben sich so zwei verschiedene Anregungsschemata für die Fragmentierung.

- Im ersten Fall werden direkt aufeinanderfolgend mehrere Photonen absorbiert. Es schließen sich dann ein oder mehrere Fragmentierungen an.
- Im zweiten Fall erfolgt die Fragmentierung sequenziell. An die Absorption schließt sich direkt eine Fragmentierung an. Das Fragment kann ein weiteres Photon absorbieren und anschließend weiter fragmentieren. Dies kann entweder innerhalb eines Laserpulses oder in aufeinanderfolgenden Laserschüssen passieren.

Bei der Verwendung von gepulsten, fokussierten Lasern hoher Intensität sollte es möglich sein, resonante Zweiphotonenschritte durchzuführen. Bei der Aufnahme von PID-Massenspektren wurden häufig viele Laserschüsse benötigt, um eine ausreichende Fragmentierung zu erreichen. Bei diesen Messungen konnten indirekte Hinweise für beide Mechanismen gefunden werden.

### 1.2.3 Konische Durchschneidungen

Die strahlungslose Relaxation in den Singulettzuständen ist von Molekül zu Molekül sehr verschieden. Entsprechend wird eine sehr hohe Fluoreszenzquantenausbeute oder eine Quantenausbeute nahe Null gefunden.

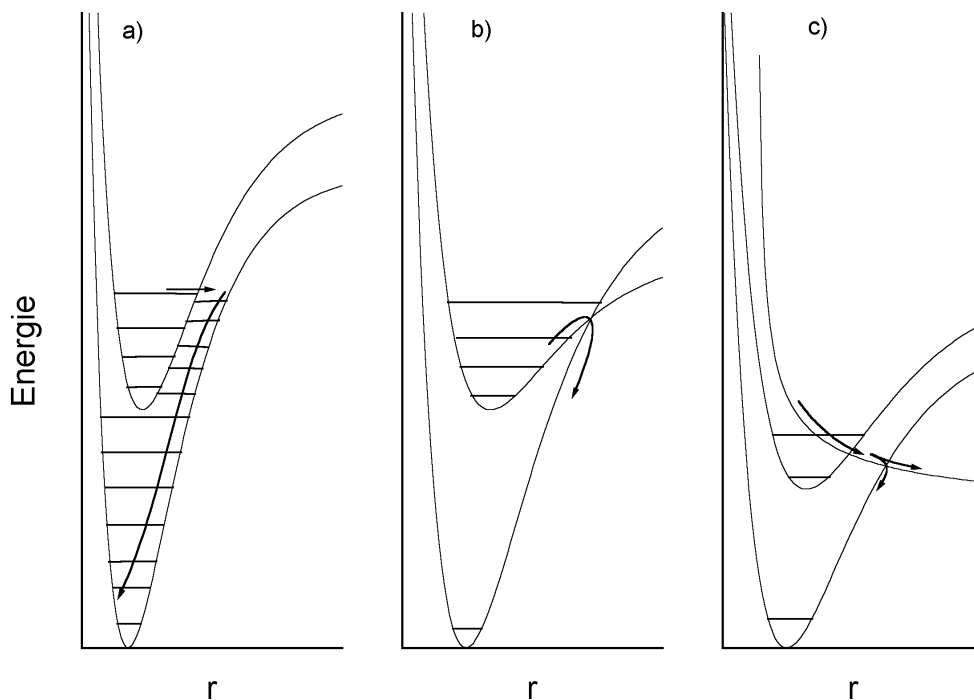


Abbildung 1.9: Schematische eindimensionale Hyperpotentialflächen von elektronischem Grund- und angeregtem Zustand. a) Geschachtelte Anordnung, b) Grund- und angeregter Zustand schneiden sich in einer Koordinate. c) Ein dritter Zustand schneidet sowohl den Grund- als auch angeregten Zustand.

Normalerweise findet kein Schnitt der Hyperpotentialflächen von Grund- und angeregtem Zustand statt (s. Abb. 1.9a)). Dieser Fall tritt besonders für Moleküle mit großen Energieabständen aber sehr kleinen Strukturänderungen ein. Entsprechend ist die Kopplung der elektronischen Zustände schlecht. Daraus ergeben sich Lebensdauern der elektronisch angeregten Zustände im Bereich von Nanosekunden.

Bei vielen biologischen Systemen finden sich extrem kurze Lebensdauern, die mit diesem Bild nicht zu erklären sind. Eine Erklärung könnten sog. konische Durchschneidungen in einer Reaktionskoordinate sein (s. Abb. 1.9b)). Dabei kann der angeregte Zustand sehr schnell über den konischen Schnitt entvölkert werden. Diese Situation wird besonders wahrscheinlich für kleine Energieabstände oder große Strukturänderungen. Zur Erklärung des Verhaltens von Molekülen, die Indol oder Benzol als Chromophor enthalten, wurden

von A. L. SOBOLEWSKI und W. DOMCKE spezielle konische Durchschneidungen in der X-H Koordinate vorgeschlagen [46, 47, 48]. Dabei schneidet, wie in Abb. 1.9c) zu sehen ist, ein  $\pi\sigma^*$ -Zustand sowohl den  $S_0$ - als auch den  $S_1$ -Zustand. Moleküle können an solchen Schnittpunkten die Hyperpotentialfläche wechseln. Die Wahrscheinlichkeit für den Flächenwechsel ist sehr hoch und erfolgt auf der Zeitskala der Molekülschwingungen, also im Bereich von Femtosekunden. Damit ergibt sich ein Mechanismus, mit dem sich eine extrem schnelle und effiziente, strahlungslose Deaktivierung erklären lässt. Der  $\pi\sigma^*$ -Zustand ist dissoziativ. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten an der zweiten konischen Durchschneidung.

- i) Erfolgt kein zweiter Wechsel der Hyperpotentialfläche, so kommt es zur Dissoziation. Dies geschieht hier durch die Abspaltung eines Wasserstoffatoms.
- ii) Alternativ kann ein Wechsel in den elektronischen Grundzustand erfolgen. Dieser Fall führt zu dem gleichen Ergebnis wie eine klassische *internal conversion*.

Im Lösungsmittel erwartet man wegen des Käfigeffekts eine Verschiebung der Verzweigung zugunsten der Rekombination, so dass das Molekül keinen photoinduzierten Schaden nimmt. Es wird durch Rechnungen und Experimente gestützt vermutet, dass die gemessene kurze Lebensdauer des protonierten Tryptamins in der Gasphase einem solchen Mechanismus folgt [14].

Es ist aber auch denkbar, dass, wie in Abb. 1.9b) zu sehen ist, der elektronische Grundzustand direkt den ersten elektronisch angeregten Zustand schneidet. Auch dies führt zu einer schnellen strahlungslosen Deaktivierung des elektronisch angeregten Zustands. Allerdings ist dieser Mechanismus nicht dissoziativ. Ein solcher Mechanismus wird z.B. für das neutrale und protonierte Adenin angenommen [49].





## 2 Experimenteller Teil

### 2.1 Planung und Wahl der Komponenten

#### 2.1.1 Wahl der Ionenquelle

Es soll der Protonierungseffekt auf kleine Modellsysteme mit biologischer Relevanz untersucht werden. Zur Erzeugung solcher Ionen stehen zwei Methoden zur Verfügung. Sowohl MALDI (s. Kap. 1.1.1) als auch ESI (s. Kap. 1.1.2) können solche Ionen erzeugen.

Die beiden Methoden unterscheiden sich im Wesentlichen durch drei Aspekte:

- i) ESI ist eine kontinuierliche Methode, MALDI eine gepulste.
- ii) Bei großen Molekülen erzeugt ESI zunehmend mehrfach geladene Ionen, während MALDI weiterhin vorwiegend einfach geladene erzeugt.
- iii) ESI erfolgt aus der Lösung, MALDI aus dem Feststoff.

Im Vergleich mit der Spektroskopie an im Jet gekühlten Neutralteilchen, ist die Teilchendichte, die durch MALDI- oder ESI-Quellen erzeugt werden können sehr gering. Aus diesem Grund sollen die Ionen in einer Falle zwischengespeichert und akkumuliert werden (s. Kap. 2.1.2). Es ist darum für das Experiment nicht wichtig, ob die Ionenquelle gepulst oder kontinuierlich arbeitet.

Da die hier untersuchten Moleküle alle eine Masse deutlich unter 1000 *Da* haben, stellen mehrfach geladene Ionen kein Problem dar. Beide Ionenquellen liefern in diesem Bereich fast ausschließlich einfach geladene Ionen.

Die Probenpräparation ist bei MALDI deutlich aufwendiger. Die Probe muss erst in eine geeignete Matrix eingebracht werden, wobei man erst eine geeignete Matrix finden muss. Im Gegensatz dazu muss bei ESI nur eine Lösung erstellt werden. Die Wahl des Lösungsmittels ist vergleichsweise einfach und stellt kein experimentelles Problem dar (s. Kap. 2.3.1). Bei MALDI wird ein hoher Untergrund bei niedrigen Massen erzeugt. Es handelt sich dabei um photoionisierte Matrixmoleküle, geladene Cluster daraus und

Fragmente. Dieser würde sich bei den geplanten Experimenten sehr störend auswirken. Bei MALDI wird der Probenträger ins Vakuum eingeschleust, wohingegen bei ESI die Probe kontinuierlich über einen Schlauch bei Atmosphärendruck nachgefüllt wird. Dadurch lassen sich beliebig lange Messzeiten erreichen.

Ausschlaggebend für die Wahl der Ionenquelle ist die Handhabbarkeit. Hier hat die ESI-Quelle einen deutlichen Vorteil bei der Probenzufuhr. Sie eignet sich zudem besser für die Kombination mit Ionenfallen, da die Falle kontinuierlich nachgefüllt wird. Aus diesen Gründen eignet sich die Elektrosprayionisation besser für die geplanten Experimente.

## 2.1.2 Vergleich von Ionenfallen

Für eine unmittelbare Verwendung mit gepulsten Lasern ist der aus der ESI-Quelle kommende, kontinuierliche Ionenstrom zu klein. Daher werden zuerst ausreichend Ionen in einer Ionenfalle gesammelt, um einen idealen zeitlichen Überlapp mit dem gepulsten Laser sicherzustellen. Ionen lassen sich in statischen Magnetfeldern oder in elektrischen Wechselfeldern einfangen.

Das Einfangen von Ionen in Magnetfeldern (Penningfalle) wird in der *ion cyclotron resonance* (ICR) Massenspektrometrie genutzt. Vorteil der Methode ist die überragende Massenauflösung von bis zu  $m/\Delta m_{50\%} = 200.000.000$  [50]. Allerdings ist der experimentelle Aufwand für diese Methode enorm, da die Massenanalyse in einer UHV-Kammer stattfindet, die mit einem supraleitenden, bis zu 25 *Tesla* starken Magneten umgeben ist [51].

Experimentell deutlich einfacher ist das Einfangen von Ionen mit Hilfe von elektrischen Wechselfeldern. Typischerweise werden Spannungen von einigen Kilovolt und Frequenzen im Bereich von 1 *MHz* verwendet. Quadrupol Ionenfallen bestehen aus vier parallelen Stäben. Die Ionen werden in zwei Raumrichtungen eingefangen und können sich entlang der dritten Raumrichtung frei bewegen. Diese Anordnung wird hauptsächlich als Massenfilter eingesetzt. Bei geeigneter Beschaltung kann nur ein  $m/z$ -Verhältnis die Falle passieren. Durch das Durchstimmen des Quadrupols lässt sich so ein Massenspektrum aufzeichnen. Nachteil der Methode ist der Verlust der Ionen, die gerade den Massenfilter nicht passieren können. Man benötigt daher insgesamt mehr Ionen für die Erzeugung eines Massenspektrums als bei Penning und Paul-Fallen, die jeweils alle erzeugten Ionen für die Erzeugung eines Massenspektrums nutzen.

Bei der Paul-Falle handelt es sich um eine spezielle Form der Quadrupolfalle. In ihr wird ein dreidimensionales, zeitlich veränderliches Potential erzeugt, welches die Ionen in der Mitte hält. Die Ionen werden in allen Raumrichtungen gefangen. Paul-Fallen haben den Vorteil, dass in ihnen beliebig viele  $MS^n$ -Schritte ausgeführt werden können und dass alle entstandenen Fragmente analysiert werden können (s. Kap. 2.2.1.3).

Die hohe Auflösung von Penning-Fallen wird für die Experimente nicht benötigt. Aufgrund des geringeren apparativen Aufbaus, eignen sich Ionenfallen, die mit elektrischen Feldern arbeiten besser für die geplanten Experimente. Quadrupolfallen bieten keine Möglichkeit für multiple MS/MS-Schritte. Desweiteren kann ein Quadrupol entweder als Ionenfalle oder als Massenanalysator eingesetzt werden. Da Paul-Fallen im Vergleich zu Quadrupolfallen mehr Möglichkeiten bieten, wurde für das Experiment eine Paul-Falle gewählt.

### 2.1.3 Lasersystem

Wichtig für die Wahl des Lasersystems ist die Intensität, die im UV erreicht werden kann. Die elektronischen Übergänge der neutralen Aminosäuren liegen unterhalb von 285 nm. Für die protonierten Spezies werden Übergänge in der gleichen Region erwartet. Um die Wellenlängen in einem großen Bereich durchstimmen zu können, sind Farbstofflaser die beste Wahl. Mit Farbstofflasern ist der gesamte Wellenlängenbereich vom nahen Infrarot bis zum nahen Ultraviolett zugänglich. Durch Frequenzverdopplung ist der gesamte Bereich bis hin zum Vakuum-UV zugänglich.

Hohe Intensitäten lassen sich am einfachsten mit gepulsten Lasersystemen erreichen. Zum Pumpen von gepulsten Farbstofflasern werden häufig Nd:YAG-Laser oder Excimerlaser eingesetzt. Nd:YAG-Laser zeichnen sich durch einfache Handhabung und günstige Betriebskosten aus. Die Fundamentale liegt bei 1064 nm. Zum Betreiben von Farbstofflasern wird die zweite oder dritte Harmonische bei 532 nm bzw. 355 nm verwendet. Bei Verwendung der zweiten Harmonischen können Wellenlängen bis 575 nm erreicht werden. Durch Frequenzverdopplung lassen sich Wellenlängen bis 275 nm erreichen. Dies ist ausreichend um Tryptophan und verwandte Verbindungen zu untersuchen.

Excimerlaser können hohe Energien im UV erzeugen. Am häufigsten verwendet werden XeCl (308 nm), ArF (193 nm) und F<sub>2</sub> (156 nm). Wellenlängen unterhalb von 200 nm werden merklich von der Atmosphäre absorbiert. Bei Verwendung dieser Wellenlängen muss der Strahl daher im Vakuum geführt werden. Der große Vorteil bei der Verwendung von Excimerlasern als Pumplaser ist der große Abstimmbereich der verwendbaren Farbstoffe. Da nur sehr wenig über die Absorption von protonierten Substanzen in der Gasphase bekannt ist, bietet der große Wellenlängenbereich, der ohne Farbstoffwechsel zugänglich ist, einen entscheidenden Vorteil. Aus diesem Grund wurde als Pumplaser ein XeCl-Excimerlaser gewählt.

## 2.2 Versuchsaufbau

Der Versuch (Abb. 2.1) ist eine Kombination aus einem ESI-Massenspektrometer und einem Nanosekunden Lasersystem. Weder die Elektrosprayionisation noch die Paul-Falle soll Gegenstand der Forschung sein. Aus diesem Grund wurde beschlossen eine kommerzielle Kombination zu kaufen. Damit kann auf eine zeitaufwändige Entwicklung dieser Komponenten verzichtet werden. Die Basis bildet das kommerzielle Massenspektrometer (Esquire 3000, Bruker Daltonik GmbH). Das Gerät verwendet eine Kombination aus einer ESI-Ionenquelle und einer Paul-Falle zur Akkumulation von Ionen und zur Massenanalyse.

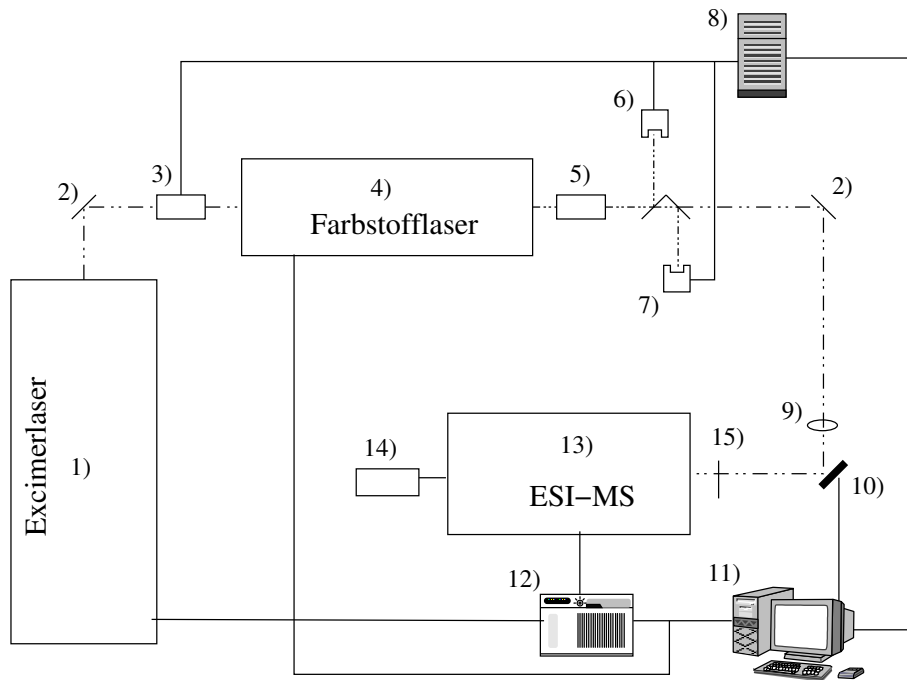


Abbildung 2.1: Versuchsaufbau: 1) XeCl Excimer-Laser, 2) Umlenkspiegel, 3) Pumpstrahlabschwächer, 4) Farbstofflaser, 5) Verdopplereinheit, 6) Quadrantendiode, 7) Fotodiode, 8) Messrechner 1, 9) Linse, 10) Umlenkspiegel mit Piezo-Versteller, 11) Messrechner 2, 12) Messelektronik, 13) ESI-MS, 14) Spritze, 15) Shutter

Das Lasersystem besteht aus einem Farbstofflaser, der von einem XeCl-Excimerlaser gepumpt (LPX110, Lambda Physics) wird. Der Farbstofflaser liefert zunächst Wellenlängen im sichtbaren Bereich. Die Systeme, die untersucht werden sollen, absorbieren allerdings im UV-Bereich. Die Frequenz des Farbstofflasers muss daher in einem nichtlinearen Kristall verdoppelt werden. Die Positionierung des Verdopplerkristalls wird von einem PC (Messrechner 1) übernommen. Dieser Computer zeichnet ebenfalls über die Fotodiode 7) die Leistung des Lasers im UV-Bereich auf.

Die Probe (s. Kapitel 2.3) wird durch eine motorgetriebene Spritze 14) in das Massenspektrometer 13) gebracht und dort ionisiert. Die entstandenen Ionen werden in der Ionenfalle gesammelt und die gewünschte Masse selektiert. Der Laserzugriff erfolgt ebenfalls in der Ionenfalle. Durch den Laserbeschuss entstehen in Abhängigkeit der Wellenlänge Fragmente, die in der Ionenfalle bleiben. Durch eine anschließende Massenanalyse können alle Fragmente, die durch einen Laserschuss entstanden sind, analysiert und nachgewiesen werden.

Die Anzahl der entstandenen Fragmente wird von der Messelektronik 12) gezählt und von einem Computer 11) aufgezeichnet. Dieser Computer übernimmt ebenfalls die Ansteuerung des Farbstofflasers (FL3001, Lambda Physics), die Positionierung des Piezoverstel-

lers 10) und die Kontrolle über die aktive Verdopplersteuerung. Die Aufzeichnung der Messdaten erfolgt ebenfalls mittels dieses Rechners. Die Datenpunkte für die Aufnahme von UV-Spektren werden aus der Wellenlängeninformation vom Farbstofflaser, der Laserintensität vom zweiten Messrechner und den Fragmentzahlen, die die Messelektronik liefert, zusammengesetzt.

In den nachfolgenden Kapiteln werden die einzelnen Komponenten im Detail beschrieben.

## 2.2.1 Funktionsweise des Massenspektrometers

### 2.2.1.1 Ionisation mittels Elektrospray

Die Ionisation im Esquire 3000 mittels Elektrosprayionisation findet wie in Kap. 1.1.2.1 beschrieben bei Atmosphärendruck statt. Wie man in Abb. 2.2 sehen kann, stehen Elektrospraynadel und Gegenelektrode senkrecht zueinander. Dadurch vermindert sich der Eintrag von Lösungsmittel und nicht ionisierten Probenmolekülen in die nachfolgenden Kammern. Zu große oder ungeladene Tröpfchen können dem elektrischen Feld zum Eingang ins Vakuumsystem nicht folgen und werden nach unten abgesaugt.

Zur Unterstützung der Tröpfchenbildung am Taylorcone strömt Stickstoff parallel zur Flussrichtung der Probe ein. Der Tröpfchenstrom wird zur Unterstützung der Ionisation mit  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  heißem Stickstoff im Gegenstrom gespült. Typische Spannung zwischen Nadel und Gegenelektrode liegen zwischen  $3\text{ kV}$  und  $4\text{ kV}$ , wobei die Nadel aus Sicherheitsgründen auf Masse liegt.

### 2.2.1.2 Transfer der Ionen in die Paul-Falle

Die nachfolgende Glaskapillare in Abb. 2.2 dient zur Überführung der Ionen in eine differenzielle Pumpstufe. Die Glaskapillare wird eingesetzt, um die Ionen wieder auf ein massenahes Potential zu bringen. Zwischen Elektrospray-Kapillare und Sprayshield liegen typischerweise Spannungen von  $2 - 3\text{ kV}$  an. Dabei wird die Kapillare, die mit dem Probenbehälter verbunden ist, auf Masse gehalten. Um die Anzahl der unter Hochspannung stehenden Teile innerhalb des Massenspektrometers gering zu halten, ist es nötig, die Ionen wieder auf ein massenahes Potential zu bringen. Beide Enden der Glaskapillare sind metallbeschichtet. Der Eingang befindet sich auf dem gleichen Potential wie das Sprayshield. Der Ausgang wird massenah gehalten, dadurch entsteht für die Ionen eine Gegenspannung. Die Ionen werden durch Stöße mit Neutralteilchen durch die Kapillare getrieben. Um ausreichend Stöße zu erhalten ist eine Druckdifferenz von etwa  $1\text{ bar}$  nötig [52].

Um diese Druckdifferenz zu erzeugen wird der Druck in der Kammer vor dem ersten Skimmer auf  $1\text{ mbar}$  verringert. Über zwei anschließende Skimmer und differentielle Pumpstufen vor der Oktopolkammer wird der Druck weiter erniedrigt. In der Oktopolkammer wird der Druck mit einer Turbomolekularpumpe auf  $1 \cdot 10^{-3}\text{ mbar}$  reduziert. Die letzte Kammer wird mit Hilfe einer weiteren Turbomolekularpumpe auf einen Druck von  $2 \cdot 10^{-5}\text{ mbar}$  gebracht. In dieser Kammer befindet sich die Paul-Falle und der Detektor. Alle Modifikationen wurden an dieser Kammer gemacht.

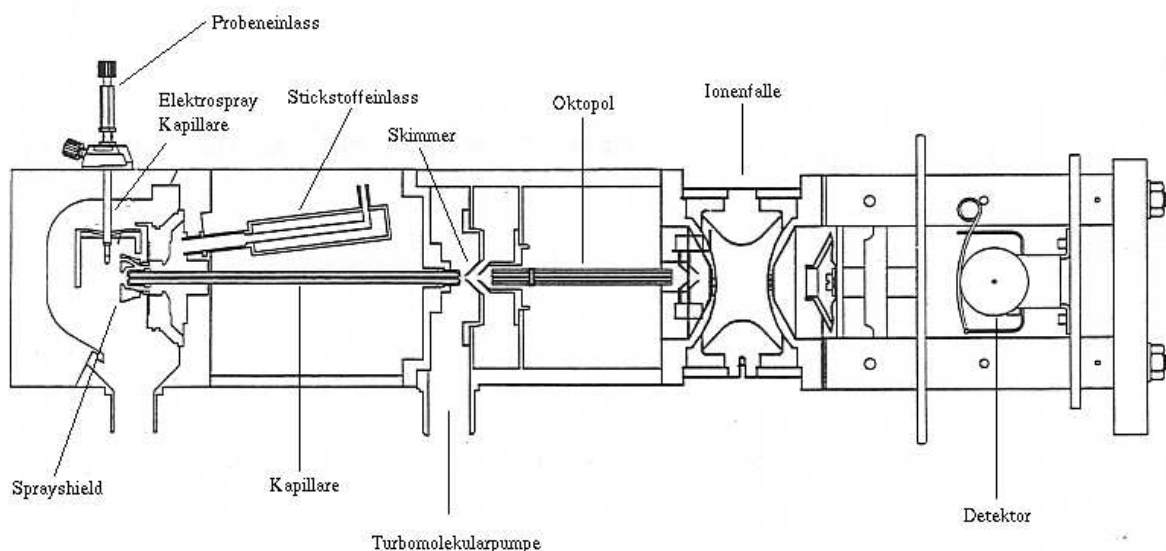


Abbildung 2.2: Aufbau des Esquire 3000. Die zwischen Elektrospray Kapillare und *Sprayshield* entstehenden Ionen werden durch die anschließenden Ionenoptiken in die Ionenfalle geleitet. Zur Massenanalyse werden der Reihe nach alle  $m/z$ -Verhältnisse aus der Falle entfernt und am Detektor nachgewiesen.

Am Ausgang der Glaskapillare herrscht ein Druck von ca. 1 *mbar*. Der erste Skimmer befindet sich unmittelbar dahinter. Trotz des geringen Abstands von weniger als einem Millimeter kommt es an dieser Stelle zu einer Reihe von Stößen zwischen dem Ion und Neutralteilchen. Die mittlere freie Weglänge von Stickstoff in diesem Druckbereich liegt bei etwa 70  $\mu\text{m}$ . Bei einer Entfernung vom Skimmer zur Glaskapillare von einem halben Millimeter erleidet ein Ion etwa ein Dutzend Stöße, bevor es den Skimmer passiert. Übertragen diese Stöße genügend Energie auf das Molekül oder den Komplex, so kann dieses fragmentieren.

Um einen effizienten Transfer der Ionen in die anschließenden Ionenoptiken zu gewährleisten, ist es nötig, an diesem Skimmer eine Spannung anzulegen. Wie man in Abb. 2.3 am Beispiel des Tryptophans sehen kann, hat die Skimmerspannung sowohl Einfluss auf die Größe des Totalionenstroms (Abb. 2.3, Summe), als auch auf den Grad der Fragmentierung. Zunächst steigt der Totalionenstrom mit steigender Skimmerspannung. Gleichzeitig erhöht sich der Anteil an Fragmenten im Massenspektrum (für eine nähere Diskussion der verschiedenen Fragmente s. Kap. 3.1.5). Ab einer Spannung von etwa 15 V beginnt der Totalionenstrom wieder zu sinken. Ab dieser Spannung beginnt verstärkt die Fragmentierung. Es entstehen dabei auch geladene Fragmente mit geringerer Masse, die nur eine geringe Einfangwahrscheinlichkeit in der Falle haben. Der gemessene Totalionenstrom geht somit zurück.

In der sich den beiden Skimmern anschließenden Oktopolkammer befinden sich zwei



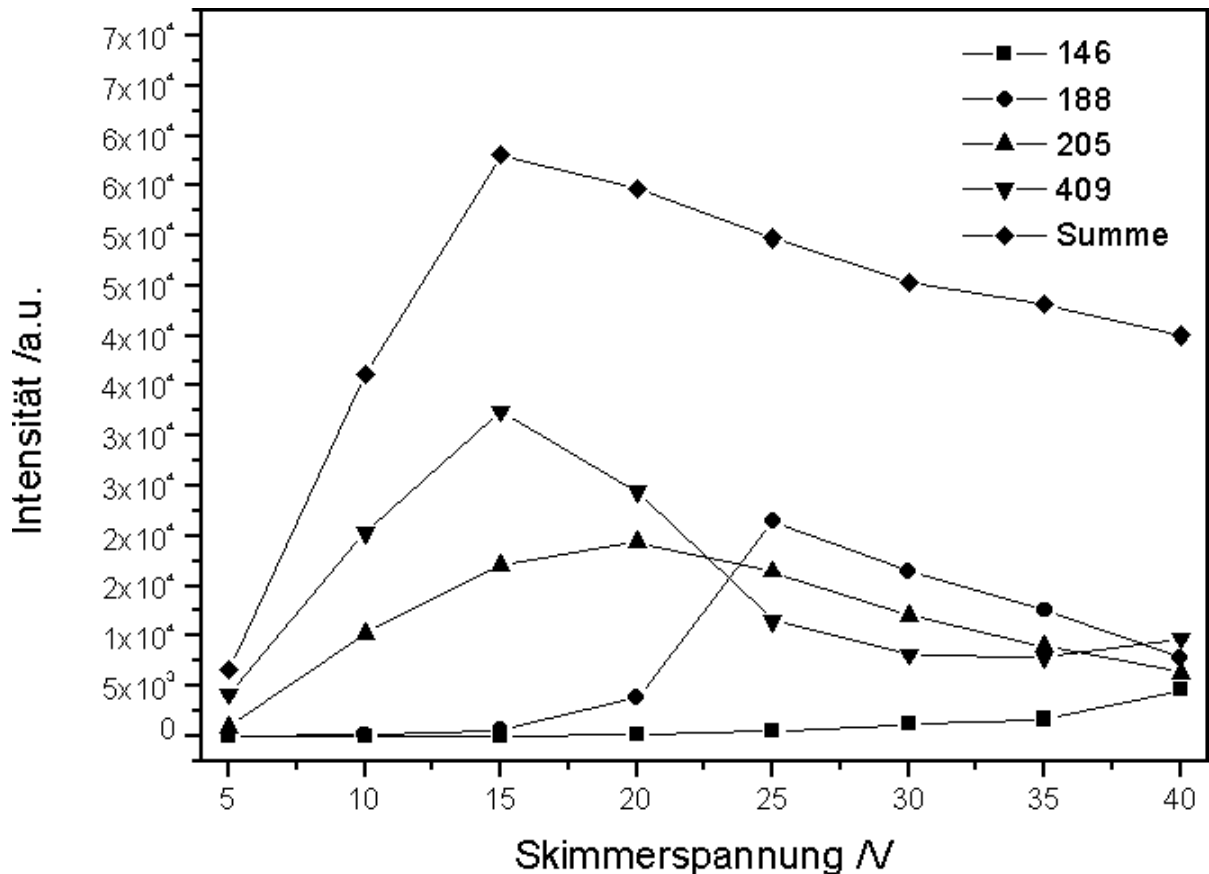


Abbildung 2.3: Einfluss der Skimmerspannung auf das Massenspektrum von Tryptophan. Bei angelegter Skimmerspannung steigt der Totalionenstrom (Summe). Gleichzeitig zerfällt das Dimer ( $m/z = 409 Da$ ) verstärkt in das Monomer ( $m/z = 205 Da$ ) und fragmentiert bei noch höheren Spannungen zunächst in das Fragment  $m/z = 188 Da$  und dann zu  $m/z = 146 Da$ .

Oktopole. Sie dienen nicht der Massenselektion sondern nur dem Transfer der Ionen in die nachfolgende Kammer. Oktopole haben gegenüber Quadrupolen den Vorteil, dass sie für einen größeren  $m/z$ -Bereich transparent sind. Zwischen den beiden Oktopolen kann eine Gleichspannung eingestellt werden. Diese dient zu einer Nachbeschleunigung der Ionen, damit diese die Potentialbarriere am Eingang zur Falle überwinden können. Am Ende der Oktopolkammer befinden sich zwei Ionenlinsen. Mit ihnen werden die Ionen noch einmal beschleunigt, um dann in die Ionenfalle hineinfokussiert zu werden.

Der Eintritt der Ionen in die Falle erfolgt über ein Loch in einer der beiden Endkappen. In der Kammer herrscht ein angelegter Heliumpartialdruck von  $5 \cdot 10^{-6} mbar$ . Innerhalb der Falle liegt der Partialdruck bei etwa 1-10 mbar. Durch Stöße mit dem Helium übertragen die Ionen einen Teil ihrer kinetischen Energie auf das Helium. Dadurch wird verhindert, dass Ionen auf der gegenüberliegenden Seite die Falle wieder verlassen können. Zum Einfangen der Ionen wird zwischen Ringelektrode und den beiden Endkappen eine Frequenz von 780 kHz angelegt. Die Tiefe der Pseudopotentialmulde für ein

bestimmtes  $m/z$ -Verhältnis hängt von der angelegten Spannung ab. In der Regel wird die Spannung so gewählt, dass das Potential für das  $m/z$ -Verhältnis des Mutterions der zu untersuchenden Substanz am tiefsten ist. Die Tiefe des Potentials liegt bei etwa  $2\text{ eV}$ . Die RF-Spannungen, die dafür nötig sind, liegen im Bereich von  $70\text{ V}$ . Während des Einfangs werden die Endkappen auf Masse gehalten.

Die Zeit, die für das Auffüllen der Falle benötigt wird, liegt im Bereich von  $1 - 100\text{ ms}$  und hängt von mehreren Faktoren ab:

- Konzentration der Probe in der Lösung
- Ionisierungswahrscheinlichkeit
- Stabilität des Ions in der Gasphase
- gewünschte Anzahl von Ionen in der Falle

Ist die Konzentration der Probe zu gering führt dies zu deutlich längeren Füllzeiten. Da die Konzentrationen während der Probenpräparation gut kontrollierbar sind, stellen sie kein Problem dar.

Die Ionisierungswahrscheinlichkeit ist, ebenso wie die Stabilität des Ions, von der verwendeten Substanz abhängig. Substanzen mit einer geringen Protonenaffinität weisen eine geringe Ionisationswahrscheinlichkeit auf. Dies macht sich in einem schlechten Signal/Rausch-Verhältnis bemerkbar. Aminosäuren und Peptide haben eine hohe Ionisationswahrscheinlichkeit, wohingegen sich aromatische Systeme wie Indol nur sehr schlecht protonieren lassen.

Die Elektrosprayionisation ist eine sehr schonende Ionisationsmethode. Es entstehen in der Regel nur wenig Fragmente während der Ionisation. Während des Transfers ins Vakuum erleidet das Ion zum Teil hochenergetische Stöße, die zu einer nachträglichen Fragmentierung führen können. Die Energie der Stöße hängt von den Beschleunigungsspannungen ab, so dass durch eine Reduzierung der Spannungen die Stoßfragmentierung verringert werden kann. Dadurch sinkt allerdings auch die Effizienz des Ionen transfers, so dass eine geringe Ionenstabilität nur bedingt durch eine Reduzierung der Beschleunigungsspannungen ausgeglichen werden kann. Am empfindlichsten reagiert die Spannung zwischen den beiden Skimmern, da hier der Druck und damit die Anzahl der Stöße am höchsten ist.

Die Anzahl der Ionen, die für die Aufnahme eines Massenspektrums benutzt wird, beeinflusst sowohl das Signal/Rausch-Verhältnis als auch die Massenauflösung. Je höher die Anzahl der Ionen in der Falle ist, desto besser wird das Signal/Rausch-Verhältnis. Da die

Anzahl der Ionen, die pro Zeiteinheit die Falle verlassen können, limitiert ist, verbreitern sich die Peaks und die Auflösung sinkt. Die Anzahl der Ionen, die für die Aufnahme von Massenspektren verwendet wurde, lag zwischen 200 und 500.

### 2.2.1.3 Massenanalyse mittels einer Paul-Falle

In Abb. 2.4 ist der zeitliche Ablauf für die Aufnahme eines Massenspektrums gezeigt. Zu Beginn des Analysezykluses werden alle eventuell noch in der Falle verbliebenen Ionen entfernt. Nach einer definierten Akkumulationszeit wird der zweite Skimmer auf Masse gelegt. Dadurch gelangen in der Folgezeit keine weiteren Ionen in die Falle. Die Falle kann dann zu folgenden Operationen genutzt werden:

- Einfang (2) und Akkumulation (3) von Ionen
- Isolierung einer einzelnen Masse (4)
- *collision induced dissociation* (CID) eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses (5)
- Analyse aller in der Falle befindlichen  $m/z$ -Verhältnisse (6)

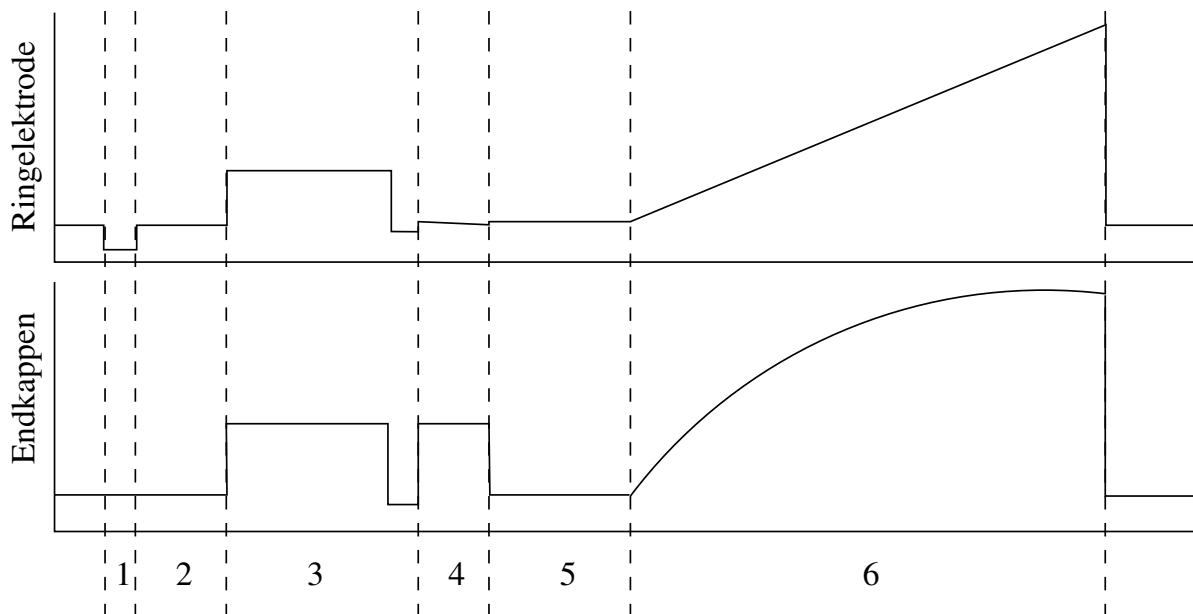


Abbildung 2.4: Zeitlicher Ablauf für die Aufnahme eines Massenspektrums. 1) Entfernen aller Ionen aus der Falle, 2) Akkumulationszeit, 3) Massenisolierung, 4) Fragmentierung, 5) Scandelay, 6) Massenanalyse

Die verschiedenen Möglichkeiten der Paul-Falle sind in Abb. 2.5 am Beispiel von Tryptophan dargestellt. Das Massenspektrum in Abb. 2.5a zeigt als intensivstes Signal das

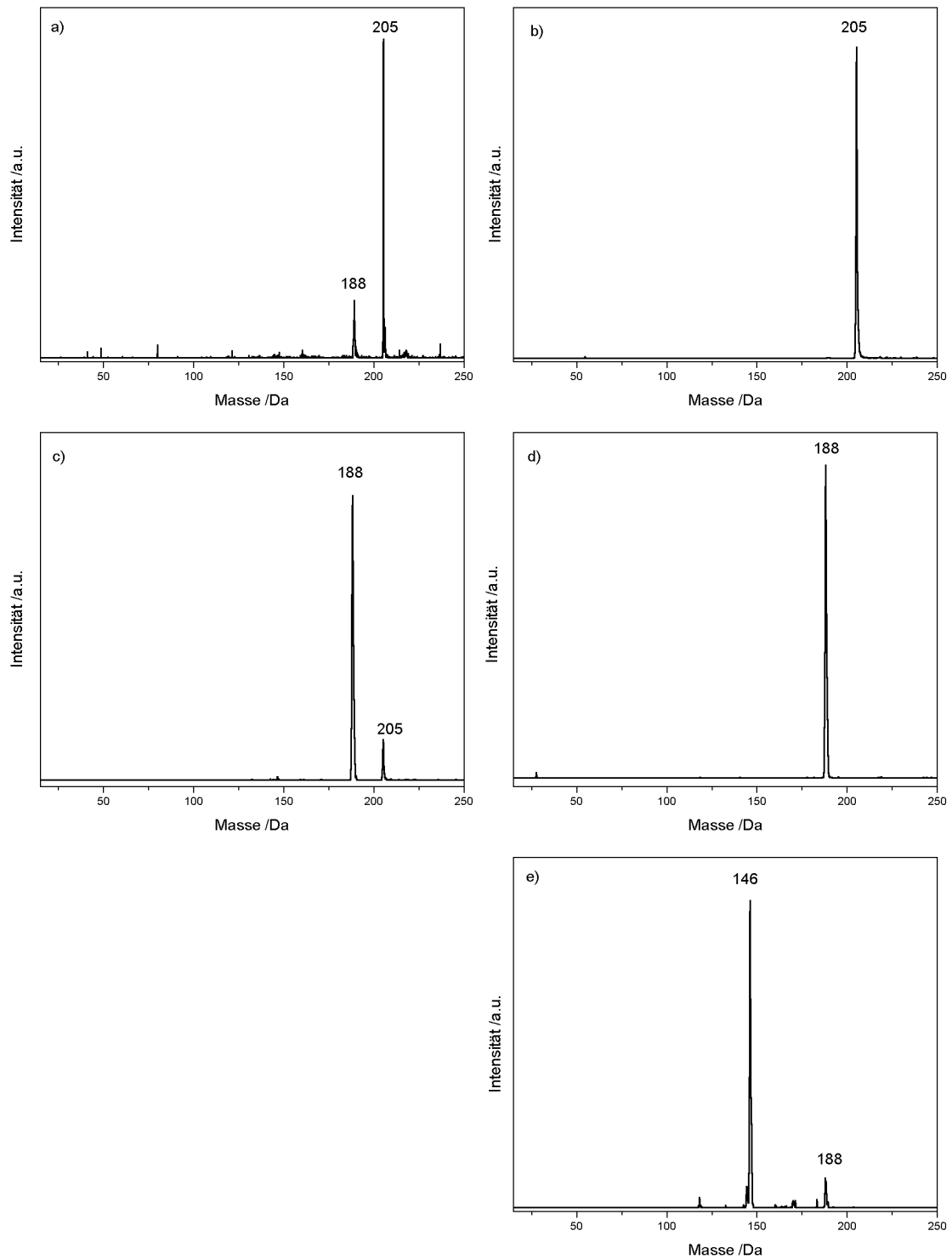


Abbildung 2.5: Mehrfache MS-Schritte am Beispiel von Tryptophan. a) ESI-MS von Tryptophan wie aus dem ESI- und Transferprozess entstanden, b) Isolation von Tryptophan, c) CID-Spektrum von Tryptophan, d) Isolation des Fragments 188 und e) Fragmentierung der Masse 188.

protonierte Tryptophan bei  $m/z = 205 \text{ Da}$  (Prozess 1, 2, 3 und Massenanalyse). Daneben sind noch einige kleinere Peaks zu sehen, die sich zum Großteil aus Fragmenten und eventuellen Verunreinigungen zusammensetzen. Nur der Peak bei  $m/z = 188 \text{ Da}$  besitzt noch eine signifikante Intensität.

Zur weiteren Analyse der Probe können einzelne Massen gezielt isoliert werden. In Abb. 2.5b kann man sehen, dass die Masse  $m/z = 205 \text{ Da}$  isoliert worden ist (Prozess 4). Alle anderen Massen die noch in Abb. 2.5a vorhanden waren, sind entfernt worden. Dies geschieht durch das Anlegen von Wechselfeldern an die Endkappen der Falle. Zu jedem  $m/z$ -Verhältnis existiert eine Frequenz, mit der eine translatorische Schwingung dieses Ions angeregt werden kann. Das so angeregte Ion führt damit eine Pendelbewegung zwischen den Endkappen aus. Ist die angelegte Spannung groß genug, so trifft das Ion auf die Kappe, wird entladen und so aus der Falle entfernt. Auf diese Art und Weise können alle Ionen bis auf ein gewähltes  $m/z$ -Verhältnis aus der Falle entfernt werden.

Wird das Ion nicht so stark angeregt, dass es die Falle verlässt aber dafür länger, so kann man die entstehende Bewegung zur Stossfragmentierung nutzen. Durch die erhöhte Amplitude des Ions in der Falle steigt die Energie der Stöße mit dem Hintergrundgas Helium. Die innere Energie des Ions wird mit jedem Stoß erhöht, bis das Ion fragmentiert. Abb. 2.5c zeigt das CID-Spektrum von Tryptophan. Tryptophan liefert nur ein Fragment mit der Masse  $m/z = 188 \text{ Da}$ . Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin bilden unter Verlust von  $NH_3$  Fragmente mit einem Massenverlust von  $m/z = 17 \text{ Da}$  [53, 54, 55, 56]. Bei Tryptophan führt der Verlust von neutralem  $NH_3$  zur Masse  $m/z = 188 \text{ Da}$ . Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass es sich im Massenspektrum 2.5a bei  $m/z = 188 \text{ Da}$  nicht um eine Verunreinigung der Probe handelt, sondern um ein Fragment des Tryptophans, das während des Transfers in die Falle entstanden ist.

Dass nur ein Fragment gebildet wird, entspricht der Vorstellung, dass das Molekül durch Stöße langsam *aufgekocht* wird. Die Fragmentierung erfolgt in den energetisch niedrigsten Kanal, da die innere Energie des Moleküls nicht ausreicht um energetisch höher liegende Fragmentierungswege zu erreichen. Andere Methoden wie *chemische Ionisation* [55], *Plasma desorption* [54] oder *laser desorption* [56] führen hohe Energien zu und resultieren in mehreren konkurrierenden Fragmentierungswegen.

Es sind in der Paul-Falle beliebige Reihenfolgen aus Isolierung und CID möglich. Dadurch können Fragmentierungspfade experimentell exakt schrittweise ermittelt werden. So kann z.B. das Fragment  $m/z = 188 \text{ Da}$  wieder isoliert (Abb. 2.5d) und dannach fragmentiert (Abb. 2.5e) werden. Das Fragment bei  $m/z = 146 \text{ Da}$  entsteht durch Verlust eines neutralen Fragments mit  $m/z = 42 \text{ Da}$ . Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Keten ( $C_2H_2O$ ). Die schrittweise Fragmentierung durch wiederholte MS/MS-Schritte kann zur

Strukturaufklärung genutzt werden. Bevorzugt werden zuerst schwache chemische Bindungen gebrochen. Häufige Anwendung ist auch die Sequenzierung von Polypeptiden.

Für die Massenanalyse wird die Spannung an der Ringelektrode durchgestimmt. Je größer die Spannung an der Ringelektrode wird, desto flacher wird die Potentialmulde für kleine  $m/z$ -Verhältnisse. Je flacher die Potentialmulde ist, desto größer ist die Amplitude der Bewegung dieser Ionen in der Falle. Zusätzlich wird eine Wechselfeldspannung an die Endkappen angelegt. Die Ionen werden dadurch beschleunigt und können die Falle durch Löcher in der dem Detektor zugewandten Endkappe verlassen. Die Ionen werden mit steigendem  $m/z$ -Verhältnis aus der Falle entfernt. Man erhält dann ein Ionensignal in Abhängigkeit von der Spannung an der Ringelektrode, welches durch eine interne Kalibrierung umgerechnet wird.

Bei der Aufnahme von CID-Spektren können nicht alle möglichen  $m/z$ -Verhältnisse aufgenommen werden. Das elektrische Wechselfeld in der Paul-Falle bildet eine Pseudopotentialmulde, die für ein eingestelltes  $m/z$ -Verhältnis, die größte Tiefe besitzt. Je weiter die Massen von diesem Minimum entfernt sind, desto geringer ist die Bindungsenergie. Je tiefer die Potentialmulde, desto schmaler ist der Massenbereich, der noch eingefangen werden kann [57]. Das kleinste  $m/z$ -Verhältnis, das noch in der Falle verbleiben kann, wird als (*lower mass*) *cut off* bezeichnet. Für eine reine Massenanalyse kann die Tiefe der Potentialmulde so gering gewählt werden, dass der *cut off* bei nahe Null liegt. Will man allerdings eine kollisionsinduzierte Fragmentierung durchführen, würde man zu viel Ionen verlieren. Für die Fragmentierung muss den Ionen kinetische Energie zugeführt werden, um Stöße mit hoher Energie zu erzeugen. Um die Ionen trotz erhöhter kinetischer Energie in der Falle zu halten, muss die Tiefe der Potentialmulde erhöht werden. Dadurch wird aber gleichzeitig der *cut off* erhöht. Im Normalfall liegt der *cut off* bei 20% der Muttermasse.

### 2.2.1.4 Ionendetektor

Die aus der Falle austretenden Ionen werden durch zwei Ionenlinsen zum Detektor geleitet. Der Ionendetektor besteht aus einer Konversionsdynode und einem Channeltron. Die Konversionsdynode steht senkrecht auf der Flugbahn der Ionen. Der Detektor liegt gegenüber der Konversionsdynode.

Die Ionen werden mit 7 kV auf die Konversionsdynode beschleunigt, wo sie beim Auftreffen Elektronen herausschlagen. Durch eine auf Masse liegende Ionenlinse werden die entstandenen Elektronen in den Eingang des Channeltrons fokussiert. An der Innenwand des Channeltrons werden weitere Elektronen herausgeschlagen. Das so vorverstärkte Si-

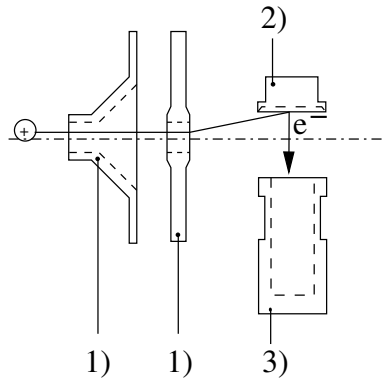


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau des Ionendetektors. 1) Ionenlinse, 2) Konversionsdynode, 3) Channeltron. Die Ionen kommen von links, werden durch die Ionenlinsen fokussiert und treffen dann auf die Konversionsdynode. Dort lösen sie Elektronen aus, die zum Channeltron fliegen und dort verstärkt werden.

gnal wird von der Messelektronik des Massenspektrometers aufgezeichnet. Die Nachweiswahrscheinlichkeit einer solchen Detektoranordnung liegt bei nahezu 100 %.

## 2.2.2 Aufbau des Lasersystems

Bei dem verwendeten Nanosekunden-Lasersystem handelt es sich um eine Kombination aus einem Excimerlaser (LPX 110, Lambda Physics) und einem Farbstofflaser (FL3001, Lambda Physics).

Der Excimerlaser diente zum Pumpen des Farbstofflasers. Er wurde mit XeCl auf  $308 \text{ nm}$  betrieben. Die durchschnittliche Leistung betrug  $70 \text{ mJ}$ .

Bei dem verwendeten Farbstofflaser handelt es sich um einen Laser mit Littrowgitter. Der Laser ist mit zwei Farbstoffküvetten ausgestattet. Die Resonatorküvette wird dabei zusätzlich als Vorverstärker genutzt. Die zweite Küvette dient als Hauptverstärker.

Für die Wellenlängen von  $595 - 535 \text{ nm}$  wurde der Farbstoff Coumarin 153 benutzt. Für den Resonator wurde eine Konzentration von  $4,2 \text{ g/l}$  in Methanol verwendet [58]. Für den Bereich von  $540 - 500 \text{ nm}$  wurde Coumarin 307 verwendet, mit einer Konzentration von  $3,4 \text{ g/l}$  in Methanol für den Resonator [58].

Für die Verstärkerküvette wurde jeweils die Konzentration des Farbstoffes in der Resonatorküvette auf ein Drittel verdünnt. Zum Ansetzen der Lösungen wurde Methanol, p.a. der Firma Merck ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Die Ausgangsfrequenz des Lasers wurde mittels eines BBO-Kristalls verdoppelt und der Strahlversatz durch einen entsprechenden Kompensator ausgeglichen. Das nichtverdoppelte Licht wurde mit einem Pellin-Broka Wellenlängenseparator abgetrennt.

Die Leistung des Farbstofflasers im UV-Bereich betrug  $400 - 900 \mu J$  bei einer Pulslänge von  $5 - 7 \text{ ns}$ . Die Linienbreite des Lasers liegt bei  $0,3 \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.2.3 Eigene Modifikationen des Versuchsaufbaus

Der aus kommerziellen Baugruppen bestehende Versuchsaufbau musste modifiziert werden, um die geplanten Experimente durchführen zu können. Die größten Modifikationen waren am Massenspektrometer nötig:

- Für den Laserzugriff musste die Vakuumkammer um ein Fenster erweitert werden. In die Kammer, die im Aluminiumspritzgussverfahren hergestellt wurde, musste dafür eine zusätzliche Öffnung gebohrt werden.
- Um die Ionen kühlen zu können, sind weitreichende Änderungen am Analysatorblock nötig gewesen.
- Zur Synchronisierung des Massenspektrometers mit der externen Messelektronik war es nötig, interne Signale des Massenspektrometers nach außen zu führen und auszuwerten.

Die Breite der Spektren und die geringe Teilchenzahl machten den Einbau zusätzlicher Elemente im Strahlengang des Lasers nötig.

- Die geringe Größe der Ionenwolke und die geringe Teilchenzahl machen eine manuelle Justage der Spiegel unmöglich. Aus diesem Grund wurde eine durch einen Rechner positionierbare Spiegelhalterung gebaut. Diese Halterung erlaubt eine rechnergestützte Justage.
- Beim Durchstimmen über große Wellenlängenbereiche muss die wellenlängenabhängige Effizienz des Farbstoffes ausgeglichen werden. Dazu wurde eine aktive Regelung für die Intensität des Pumplasers aufgebaut.
- Das Nachführen des Verdopplerkristalls über große Wellenlängenbereiche mit Hilfe von Kalibrierkurven ist sehr mühselig. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine aktiv geregelte Schrittmotorsteuerung aufgebaut.

Die Einzelheiten der Modifikationen werden in den folgenden Kapiteln im Detail beschrieben.



### 2.2.3.1 Aktive Verdopplersteuerung

Fällt eine elektromagnetische Welle  $E = E_0 \cos(\omega t - kz)$  mit  $\omega/k = c/n$  auf ein dielektrisches Medium, so werden durch die im elektrischen Feld oszillierenden Dipole, neue elektromagnetische Wellen erzeugt. Gemäß der dielektrischen Polarisierung

$$P(E) = \epsilon_0[\chi^{(1)}E + \chi^{(2)}E^2 + \chi^{(3)}E^3 + \dots] \quad (2.1)$$

$E$ : Feldstärke,  $\chi$ : Suszeptibilität  $n$ -ter Ordnung

werden dabei neben der eingestrahlten Frequenz auch Vielfache davon erzeugt. Prinzipiell gilt  $\chi^n \gg \chi^{n+1}$ , so dass die Wellen höherer Frequenz nur einen geringen Anteil haben. Die Größe von  $\chi^2$  bestimmt den frequenzverdoppelten Anteil. Damit sich eine makroskopische Welle der Frequenz  $2\omega$  aufbauen kann, gilt die Phasenanpassungsbedingung [59]:

$$n_1\omega_1 = 2n_2\omega_2 \quad (2.2)$$

Die Grundwelle und die erzeugte Welle müssen mit der gleichen Phasengeschwindigkeit durch das Medium laufen, damit die an anderen Orten neu erzeugten Wellen von  $\omega_2$  zueinander phasenrichtig laufen. Die Phasengeschwindigkeit, ist vom durchlaufenden Medium und der Frequenz abhängig. Die Phasenbedingung kann also nur in Ausnahmefällen erfüllt werden, da  $n$  monoton mit  $\omega$  steigt. Dies geht nur, wenn in einem doppelbrechenden Kristall ein Einfallswinkel existiert, bei dem der Brechungsindex  $n_0$  bei der Grundwelle gleich dem außerordentlichen Brechungsindex  $n_a$  bei der erzeugten Oberwelle ist.

Jede Abweichung vom idealen Einfallswinkel schwächt die Verdopplung. Der für die Verdopplung optimale Winkel ist wiederum von der Frequenz des Laserlichts und der Temperatur des Kristalls abhängig. Wird die Frequenz für die Aufnahme eines Spektrums durchgestimmt, so muss der Winkel unter dem der Laser auf den Kristall trifft während der Messung nachgeführt werden. Die Positionierung des Kristalls geschieht mit einem Schrittmotor.

Ein gängiges Verfahren zur Ansteuerung des Schrittmotors besteht in der Verwendung von Kalibrierkurven. Dazu werden einzelnen Wellenlängen Schrittmotorpositionen zugewiesen und die Zwischenwerte interpoliert. Diese Methode ist experimentell leicht umzusetzen und funktioniert für kleine Abstimmbereiche auch sehr gut.

Trotzdem besitzt sie einige Nachteile.

- Die Winkelabhängigkeit von der Wellenlänge kann nur für kleine Abstimmbereiche

als linear angesehen werden. Je größer der Bereich ist, desto mehr Punkte müssen für die Erstellung der Kalibrierkurve benutzt werden.

- Da der Verdopplerkristall empfindlich auf die Temperatur reagiert, muss der Kristall temperiert ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) werden, um eine thermische Drift möglichst zu verhindern.
- Die Methode ist anfällig für Störungen in der Ansteuerung des Schrittmotors. Hohe Störfelder die z.B. beim Zünden der Laser entstehen können zu Fehltriggern des Schrittmotors führen. Dieser verliert seine Position und die Verdopplung ist nicht mehr optimal.

Je größer der Bereich ist, der durchgestimmt werden soll und je größer die Schrittweite ist (hier  $0,1\text{ nm}$ ), desto aufwendiger wird die Verwendung von Kalibrierkurven. Aus diesem Grund wurde hier eine andere Art der Nachführung gewählt, die in Abb. 2.7 dargestellt ist.

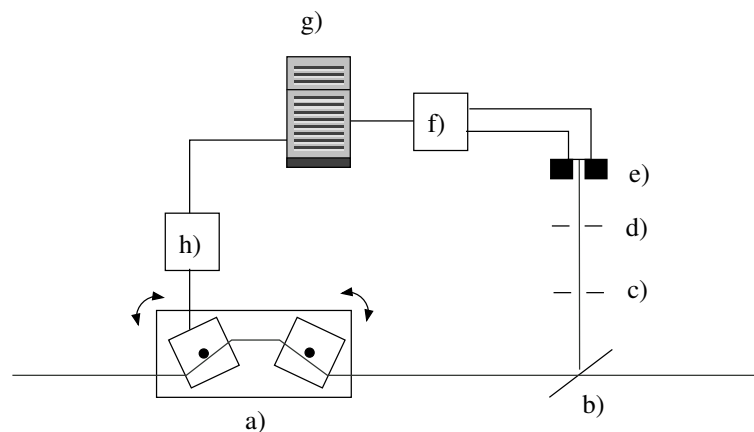


Abbildung 2.7: Aufbau der aktiven Verdopplersteuerung. a) Schrittmotor mit montiertem Verdopplerkristall und Kompensator, b) Fenster, c) Blende, d) Schlitzblende, e) Quadrantendiode, f) Integrator, g) Computer, h) Schrittmotorsteuerung

Der Verdopplerkristall wird von einem aktiven Regelkreis positioniert. Dabei wird ausgenutzt, dass das Strahlprofil des UV-Lichts nur dann symmetrisch ist, wenn der Kristall optimal gekippt ist. Ist der Winkel zwischen Laser und Kristall nicht optimal, so bilden sich direkt neben dem Hauptstrahl links oder rechts, je nach Fehlstellung, Nebenmaxima aus.

Ein kleiner Teil des UV-Lichts wird durch ein Brewsterfenster ausgekoppelt. Die erste Blende dient zum Abtrennen des Rückreflexes am Fenster, so dass nur ein Reflex auf die Fotodiode trifft. Die Schlitzblende wird zum Abschwächen der Intensität benutzt. Es wird nur der obere Teil des Strahls abgeschnitten. Dadurch bleibt die Rechts/Links-Information erhalten. Der Strahl trifft dann auf eine Quadrantendiode. Die Diode ist

so beschaltet, dass der zweite und dritte Quadrant und der erste und vierte Quadrant jeweils zusammengelegt sind und man dadurch eine rechte und linke Hälfte bekommt. Ist der Kristall optimal positioniert, so werden beide Hälften gleich stark beleuchtet. Ist das Strahlprofil unsymmetrisch, so wird eine Hälfte stärker beleuchtet. Dieser Unterschied wird zur Nachregulierung des Kristalls genutzt.

Das Signal der beiden Teildioden wird jeweils integriert und über eine A/D-Wandlerkarte (ME-30, Meilhaus) von einem Rechner ausgelesen, der aus den beiden Signalen ein Steuersignal generiert. Der Rechner veranlasst alle 50 *ms* die Wandlung der an der Steuerung beteiligten A/D-Kanäle. Zur Regelung werden eine wählbare Anzahl von Messwerten für jeden Kanal gemittelt und die Differenz gebildet. Liegt die Differenz über einem festgelegten Schwellenwert, wird aus dem Vorzeichen der Differenz das Richtungssignal für den Schrittmotor gebildet. Das Steuersignal wird über D/A-Kanäle der ME-30 an eine Schrittmotorsteuerung übergeben, die den Motor neu positioniert. Unabhängig von der Generierung dieser Differenz werden die Ergebnisse der einzelnen Wandlungen aufsummiert und im Speicher gehalten. Das arithmetische Mittel der Summe kann abgefragt und als Maß für die mittlere Laserleistung genutzt werden.

Bevor der Schrittmotor um eine Position weiter bewegt wird, wird zuerst die für die Mittelung benötigte Anzahl Messwerte aufgezeichnet. Eine hohe Zahl von Mittelungen gleicht Schwankungen der Laserleistung besser aus, führt aber zu einer langsameren Regelung, da der Schrittmotor weniger Schritte pro Zeiteinheit ausführt.

Das Steuerprogramm öffnet den Port 5555 für TCP/IP Verbindungen. Über diese Verbindung kann die Steuerung kontrolliert werden. Es ist möglich die Steuerung zu aktivieren, deaktivieren, die Anzahl der Mittelungen und die Höhe des Schwellenwertes zu setzen. Die mittlere Laserleistung kann abgefragt und zurück gesetzt werden.

### **2.2.3.2 Piezoverstellbare Spiegelhalterung**

Die Justage des Lasers durch die Paul-Falle ist schwierig, da die Austrittsöffnung der Endkappe nur einen Durchmesser von 1,5 *mm* hat. Der Laser muss sehr genau auf die optische Achse justiert sein, um sowohl durch die Austrittsöffnung der Falle zu kommen, als auch die Ionenwolke möglichst gut zu treffen. Die geringe Ausdehnung der Ionenwolke macht es unmöglich, eine Reproduzierbarkeit der Justage nur durch feststehende Blenden zu erreichen. Selbst die geringe Winkelfreiheit, die fast vollständig geschlossene Blenden zulassen, reicht, um den Überlapp Ionen-Laser zu verlieren. Bereits geringste Temperaturschwankungen und Änderungen in der Laserjustage reichen aus, um den Überlapp Ionen-Laser zu verlieren. Entsprechend ist eine täglichen Justage notwendig, um eine optimale Photofragmentierung zu erreichen.

Die geringe Repititionsrate und die kleinen Teilchendichten mit einem schlechten Signal / Rausch-Verhältnis machen eine manuelle Justage extrem langwierig und schwierig und damit de facto unmöglich. Aus diesem Grund wurde eine Spiegelhalterung gebaut (s. Abb. 2.8), die über einen Computer verstellt werden kann, um so die Feinabstimmung der Laserstrahlführung zu automatisieren.

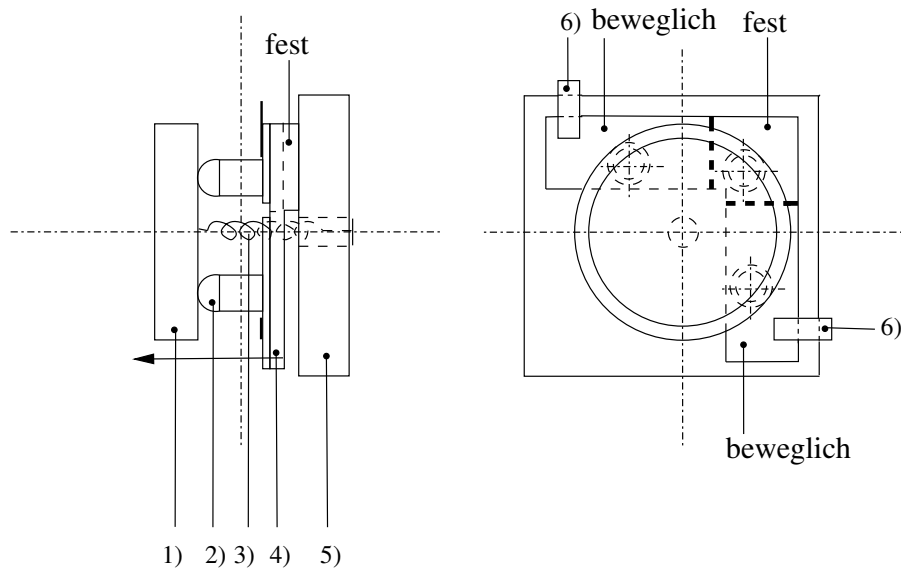


Abbildung 2.8: Spiegelhalter mit Piezopositionierung. 1) Spiegelaufnahme, 2) Keramikabstandshalter, 3) Haltefeder, 4) Piezoelektrischer Biegeschwinger, 5) Bodenplatte, 6) elektrische Kontakte.

Die Positionierung des Spiegels geschieht dabei mittels eines piezoelektrischen Biegeschwingers. Für den Biegeschwinger wurde ein piezomechanisches Element genutzt. Dies ist ein Verbundwerkstoff, der aus einer piezoelektrischen Keramik besteht, die auf einen Aluminiumträger aufgebracht ist. Wird eine Spannung an die Keramik angelegt, so verbiegt sich die Kompositplatte ähnlich einem Bimetall. Der Biegeschwinger hat die Form eines Winkels bei dem die piezoelektrische Keramik an zwei Stellen unterbrochen worden ist. Dadurch können die beiden Schenkel des Winkels getrennt angesprochen werden. Zwischen den beiden Schenkeln liegt ein drittes Feld, welches die Biegebewegung der beiden Schenkel mechanisch entkoppelt.

Die Aufnahme für den Spiegel wird an drei Punkten mit dem Biegeschwinger verbunden. Auf jeweils ein Feld des Biegeschwingers wird dazu ein keramischer Abstandshalter gesetzt. In die Spitze des Abstandshalters ist eine Kugel eingelassen, um eine punktuelle Auflage zu erreichen. Die Spiegelaufnahme wird mit einer Feder gegen die Kugeln gedrückt. Die Feder ist ebenso wie der Biegeschwinger auf einer Aluminiumplatte befestigt. Mit dieser Aluminiumplatte kann der Spiegelhalter an einem mechanischen Spiegelversteller befestigt werden.

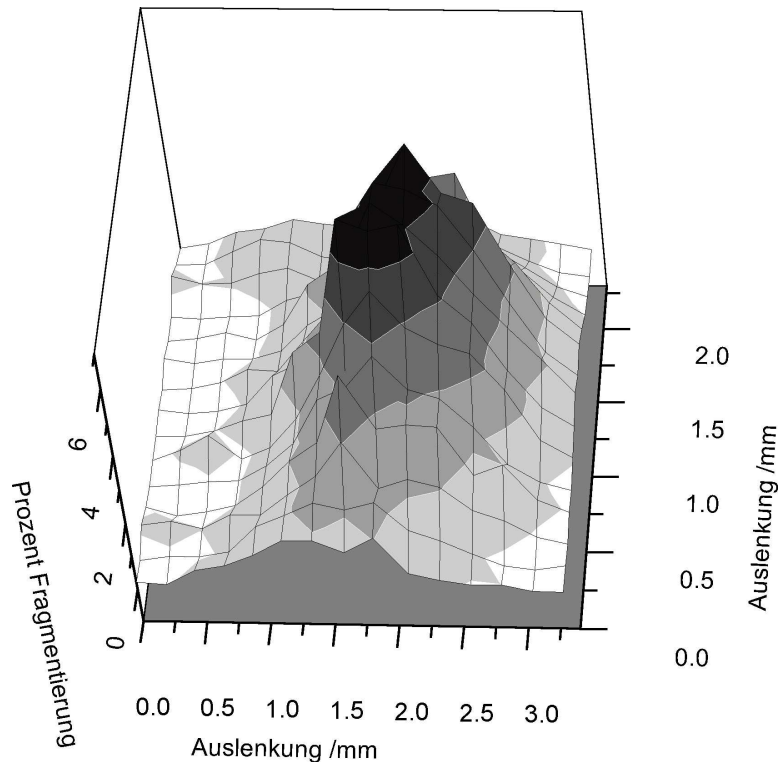


Abbildung 2.9: Abhängigkeit der Fragmentierung von der Auslenkung der Piezoversteller. Per Computersteuerung fährt der Spiegel ein Raster ab. An jedem Punkt wird der Prozentsatz der Fragmentierung gemessen, um so eine optimale Stellung für den Spiegel zu ermitteln.

Die beiden Schenkel sind elektrisch kontaktiert und jeweils mit einem Hochspannungsnetzteil (HCN-7E 3500, FUG) verbunden. Da bei Spannungen größer 500 V keine nennenswerte Verformung mehr eintritt, wurde die maximale Spannung an den Piezoelementen mittels Zener-Dioden auf 500 V begrenzt.

Die Hochspannungsnetzteile können über eine externe Spannung angesteuert werden. Die externen Spannungen werden mittels einer D/A-Wandlerkarte (ME1600, Meilhaus) am PC erzeugt. Zur Ansteuerung wurde unter LabView 6 (National Instruments) ein Programm geschrieben. Das Programm erzeugt ein Raster indem an jedem Punkt die prozentuale Fragmentierung aufgenommen wird.

Der piezoverstellbare Spiegel ist der letzte Umlenkspiegel vor der Ionenfalle (s. Abb. 2.1) und wurde an einem normalen Spiegelversteller befestigt. Mit dem mechanischen Versteller kann der Spiegel grob positioniert werden. Dannach kann über das Regeln der Spannungen an den den beiden Schenkeln eine Feinjustage vorgenommen werden.

Die erreichbare Ablenkung des Lasers am Ort der Ionenwolke wurde ausgemessen. Sie beträgt in x-Richtung 3,3 mm und in y-Richtung 2,3 mm. Geht man davon aus, dass die Ablenkung linear von der angelegten Spannung abhängt, so ergibt dies 6,6  $\mu\text{m}/\text{V}$

für die X-Richtung und  $4,6 \mu\text{m}/V$  für die y-Richtung. Die unterschiedliche Empfindlichkeit für die x- und y-Richtung liegt darin begründet, dass die Haltepunkte nicht völlig symmetrisch auf dem piezomechanischen Element angebracht sind. Daraus resultieren unterschiedlich lange Hebelwege, die unterschiedlich große Abweichungen bewirken.

Wie in Abb. 2.9 zu sehen ist, zeigt das Signal eine starke Abhängigkeit von der Position des Spiegels. Das Maximum ist länglich geformt. Das liegt an den oben erwähnten Unterschieden in der Empfindlichkeit von x- und y-Achse. Die Messung der prozentualen Fragmentierung erfolgt wie in Kap. 2.2.4.3 beschrieben.

Der Bereich, in dem der Spiegel mit Hilfe des Computers (Messrechner 2 in Abb. 2.1) verstellt werden kann, reicht aus, um den gesamten Bereich, in dem ein Fragmentsignal erhalten wird, zu überstreichen. Die Vorrichtung ist somit geeignet, um eine Feinjustierung zu übernehmen.

### 2.2.3.3 Leistungskonstanzhaltung

Schwankungen der Laserleistung wirken sich sehr störend auf die Messungen aus. Da die Wellenlängenabhängigkeit der Fragmentierung zu breiten Strukturen führt, ist es unabdingbar, die Laserleistung während der Messung konstant zu halten. Eine Normierung scheidet aus, da die Anzahl der Photonenschritte nicht immer bekannt ist (Normierung mit  $I$  oder  $I^2$ ) bzw. können einzelne Photoanregungsschritte gesättigt sein (Zweiphotonenschritt aber lineare  $I$ -Abhängigkeit). Zu beachten ist, dass diese Effekte von der Wellenlänge und der Intensität abhängen können. Die Intensität eines Farbstofflaser ist nicht über den gesamten Wellenlängenbereich konstant. Die Fluoreszenz des verwendeten Laserfarbstoffes bestimmt die Wellenlängenabhängigkeit der Intensität. Typischerweise ergibt sich für die Abhängigkeit eine flache Glockenkurve, die an den Rändern des verwendbaren Wellenlängenbereichs steil abfällt.

Die Schwankungen die durch die Leistungskurve des Farbstoffes verursacht wird, wirken sich auch entsprechend auf das Fragmentsignal aus. Die Änderungen im Fragmentsignal, die dadurch hervorgerufen werden, haben eine vergleichbare Größe wie das Signal selber. Wie in Abb. 2.10a) zu sehen ist, folgt der Anstieg der Fragmentierung der Laserintensität. Man kann nicht erkennen, ob die Fragmentierung lediglich der Intensität folgt, oder sich die molekulare Absorption verändert. Ohne Konstanzhaltung der Laserleistung kann man daher nicht sicher stellen, dass die gemessenen Spektren wirklich durch eine Wellenlängenabhängigkeit zustande gekommen sind, oder durch Zu- oder Abnahme, oder einer Schwankung in der Intensität des Lasers hervorgerufen wurden. Erst durch die Konstanzhaltung der Laserleistung (s. Abb. 2.10b)) kann die spektrale Struktur eindeutig der wellenlängenabhängigen Absorption des Ions zugewiesen werden.

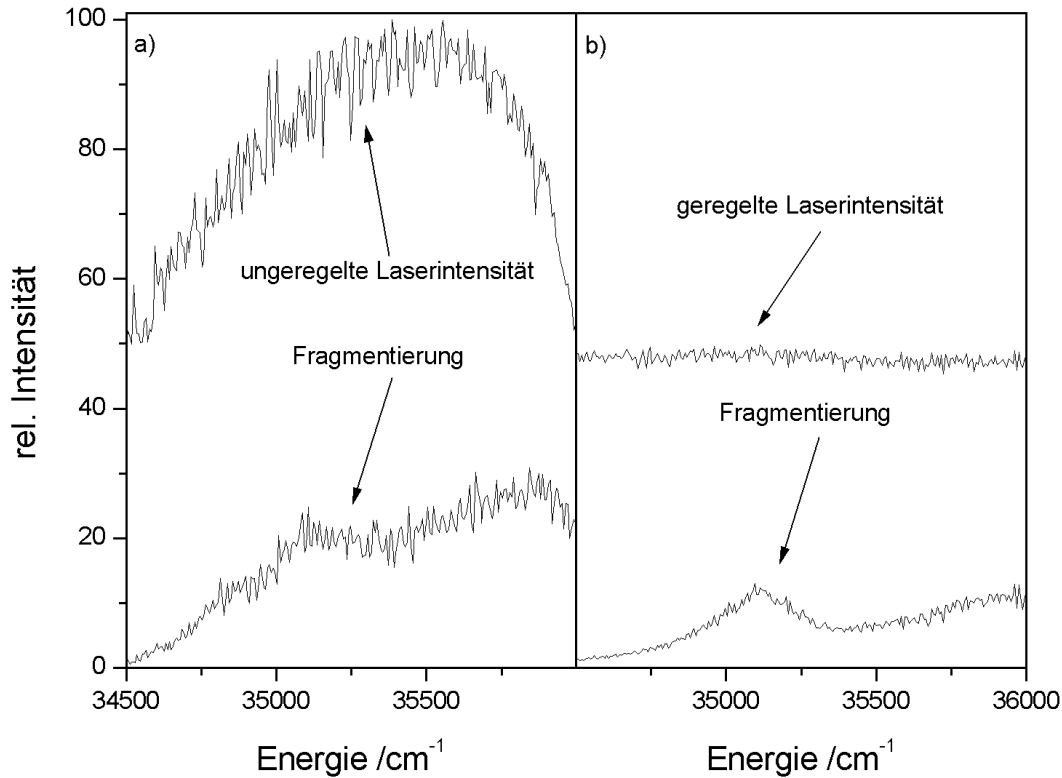


Abbildung 2.10: Photofragmentspektren von Tryptophan. a) Die unregelte Laserintensität folgt der Farbstoffkurve. b) Bei geregelter Laserleistung schwankt die Laserintensität über den ganzen Bereich um weniger als 5%.

Aus diesem Grund wurde eine Regelung aufgebaut, mit der man die Laserleistung während der Messung konstant halten kann. Dazu wird innerhalb des Farbstofflasers die Intensität des Pumpstrahls der Verstärkerküvette reguliert. Dies geschieht mit einem Drahtgitter, das über einen Motor in den Pumpstrahl gefahren werden kann und somit den Pumpstrahl mehr oder weniger abschwächt. Als Sollwert wird die Intensität am Rand der Farbstoffkurve vorgegeben.

Die Position des Gitters wird von einer speziell für diese Anwendung entwickelten Steuereinheit geregelt. Die Laserleistung wird mittels einer Fotodiode (s. Abb 2.1) aufgenommen und von der Steuereinheit verarbeitet. Gleichzeitig wird das Signal der Fotodiode über einen Integrator und einer A/D-Wandlerkarte von einem Messrechner (Messrechner 1, Abb. 2.1) registriert. Während der Messungen wird die gemessene Laserintensität zusammen mit den Ionensignalen aufgezeichnet.

#### 2.2.3.4 Laserzugriff innerhalb der Paul-Falle

Um auf die Ionen innerhalb der Falle mit dem Laser zugreifen zu können, waren einige Modifikationen am Vakuumsystem des Massenspektrometers notwendig. In der origi-

nenalen Vakuumkammer war z.B. kein Fenster vorhanden. Entsprechend war die größte Modifikation der Anbau eines Flansches mit einem Fenster an die Hochvakuumkammer (s. Abb. 2.11). Desweiteren wurden zusätzliche elektrische Durchführungen angebracht (s. Kap. 2.2.3.6).

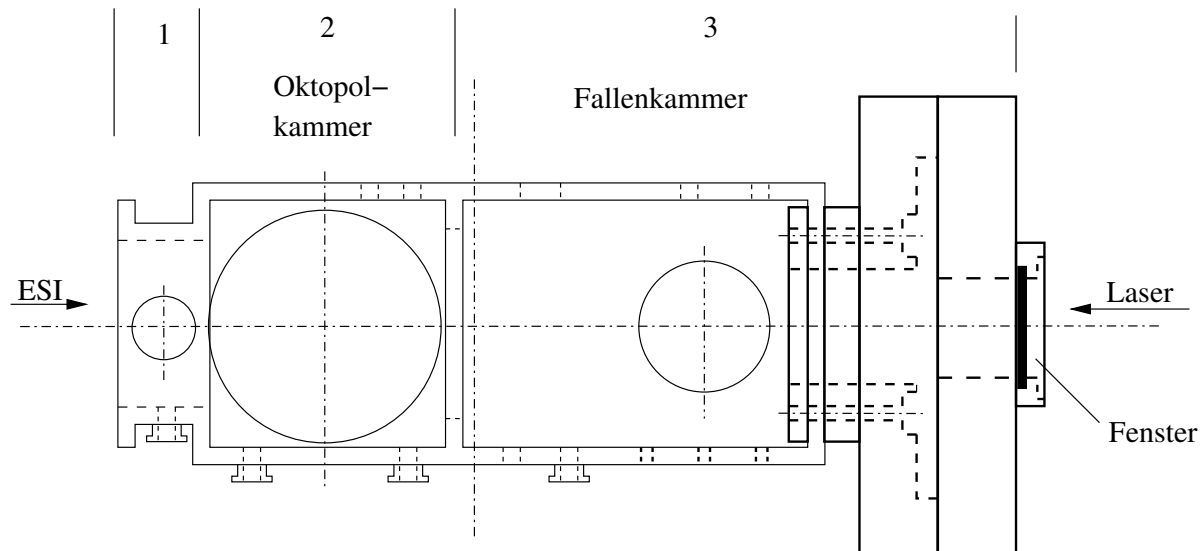


Abbildung 2.11: Aufsicht auf die modifizierte Vakuumkammer. Die Kammer besteht aus drei Bereichen, die durch Trennwände unterteilt sind. Die Modifikationen wurden an der dritten Kammer angebracht und sind durch breitere Linien hervorgehoben.

Um mit dem Laser innerhalb der Falle zugreifen zu können, musste ein Fenster an der Fallenkammer (s. Abb. 2.11) angebracht werden. Dazu wurde ein Loch in die Rückwand der Kammer gebohrt. Um ein Fenster anbringen zu können wurde ein Aluminiumblock an die Wand angeflanscht. Aufgrund der geringen Wandstärke wurde der Block von der Innenseite der Kammer gegengeschraubt. An diesen Aluminiumblock wurde dann ein CF 200 Flansch angebracht. Der Flansch soll größtmögliche Flexibilität für eventuelle, spätere Experimente garantieren. An diesen Flansch kann z.B. eine weitere Kammer mit einem Lecksuchgerät angeschlossen werden. Für die Durchführung der Messungen ist es ausreichend, einen weiteren CF 200 Flansch anzubringen, auf dem ein CF 35 mit einem Fenster montiert ist.

Der Laser wird durch das Fenster entlang der optischen Achse durch das Gerät geführt. Da der Detektor senkrecht auf der Längsachse des Massenspektrometers steht (s. Abb. 2.6), trifft der Laser direkt auf die Endkappe der Falle.

Um den Laserzugriff zu erleichtern, wurde die Endkappe der Falle modifiziert. Die originale Endkappe in Abb. 2.12a) besitzt sieben Löcher mit einem Durchmesser von je 1 mm. Damit sind die Löcher kleiner als der Strahldurchmesser des Lasers. Um nicht unnötig viel vom Laserstrahl abzuschneiden und um Probleme mit Fotoelektronen zu vermeiden,



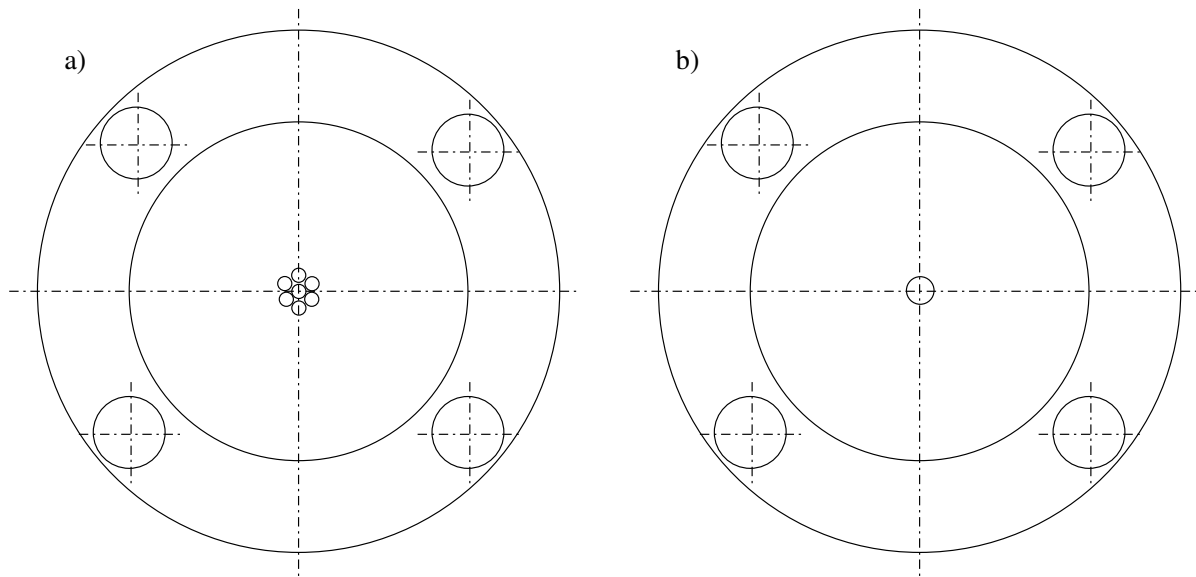


Abbildung 2.12: Modifizierung der detektorseitigen Endkappe. a) Originale Endkappe. In der Mitte befinden sich sieben Bohrungen mit  $\varnothing = 1 \text{ mm}$ , durch die die Ionen die Falle in Richtung Detektor verlassen. b) Die modifizierte Endkappe hat nur ein Loch, mit einem Durchmesser von  $1,5 \text{ mm}$ .

wurde diese Endkappe modifiziert. In der modifizierten Version in Abb. 2.12b) wurden die sieben Löcher durch eine größere Austrittsöffnung mit einem Durchmesser von  $1,5 \text{ mm}$  ersetzt.

### 2.2.3.5 Abhängigkeit vom Phasenwinkel

In der Paul-Falle bewegen sich die Ionen auf Lissajoufiguren. Der Laser besitzt einen Fokus von etwa  $100 \mu\text{m}$ . Über die Größe der Ionenwolke und den Radius der Kreisbahn der Ionen gibt es keine Angaben. Es besteht somit die Möglichkeit, dass sich die Ionenwolke komplett aus dem Laserfokus heraus bewegt. Ist die Auslenkung durch das elektrische Wechselfeld in der gleichen Größenordnung wie der Durchmesser der Ionenwolke, so wird der Zeitpunkt des Laserschusses wichtig, da man sicherstellen muss, dass der Laser einen Großteil der Ionen bestrahlt.

Es wurde daher überprüft, ob die Bewegung der Ionen in der Falle Einfluss auf die Fragmentierung hat. Zu diesem Zweck wurde der Zeitpunkt des Laserzugriffs mit dem Phasenwinkel der Ringspannung synchronisiert. Die Abhängigkeit vom Phasenwinkel ist in Abb. 2.13 dargestellt. Man kann eine sinusförmige Abhängigkeit vom Phasenwinkel erkennen. Dies entspricht der Vorstellung, dass die Ionen einer angeregten harmonischen Schwingung in der Falle folgen.

Der Einfluss auf die Fragmentierung liegt im Bereich von  $5\%$ . Die Ionenwolke verlässt

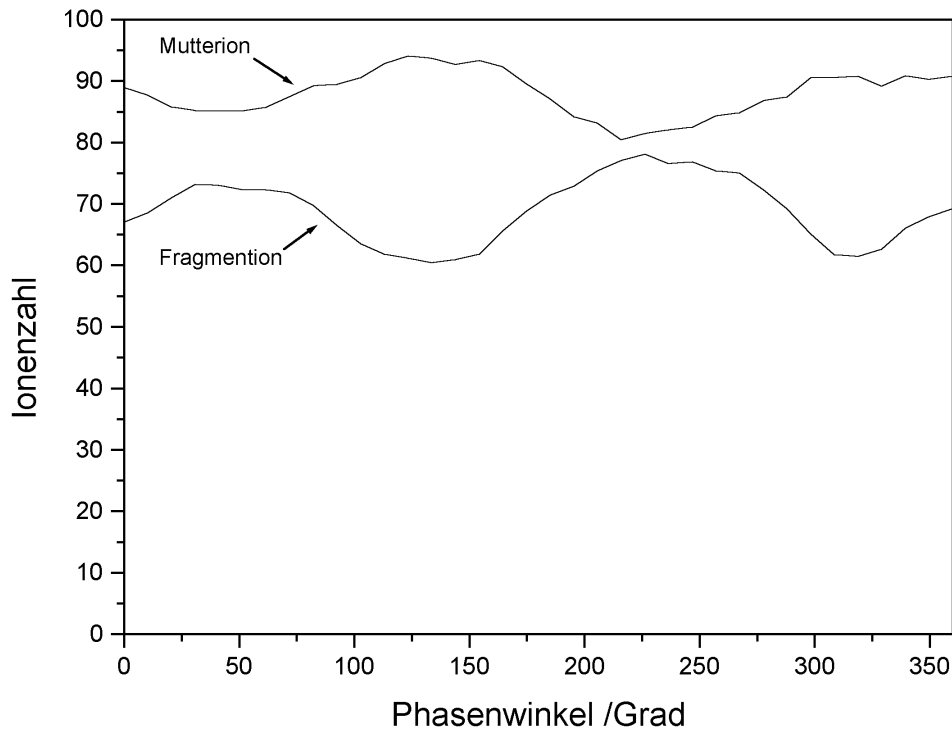


Abbildung 2.13: Abhängigkeit der Fragmentierung vom Phasenwinkel der Spannung an der Ringelektrode. Die Intensität der Fragmentationen zeigt eine sinusförmige Abhängigkeit. Allerdings ist die Abhängigkeit gering.

nie komplett den Laserfokus. Demnach muss der Radius der Lissajoufiguren kleiner sein, als der Durchmesser der Ionenwolke.

### 2.2.3.6 Kühlung der Paul-Falle

Die Ionen werden bei Raumtemperatur gebildet und dann durch elektrische Felder beschleunigt. Durch die hohe Dichte an Neutralteilchen bei einem Druck von  $1 - 1 * 10^{-3} \text{ mbar}$  erleiden die Ionen eine Vielzahl von Stößen mit dem Restgas. Wenn die Ionen in der Falle eingefangen werden, sollte ihre Temperatur mindestens Raumtemperatur entsprechen, oder noch darüber liegen, wenn Stöße mit Neutralteilchen die Ionen weiter aufgeheizt haben. Da aber nur ein geringer Prozentsatz fragmentiert, kann die Temperatur auch nicht wesentlich darüber liegen.

Die hohe Temperatur ist für spektroskopische Experimente äußerst störend. Scharfe Peaks sind nur bei niedrigen Temperaturen zu erwarten. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Besetzung der Schwingungsniveaus im elektronischen Grundzustand. Nur bei Temperaturen deutlich unter Raumtemperatur ist nur der Schwingungsgrundzustand besetzt. Bei höheren Temperaturen werden zunehmend höhere Schwingungen thermisch besetzt. Dies äußert sich durch das Auftreten von *hot bands* in den Spektren. Neben den

Schwingungen werden auch höhere Rotationsniveaus angeregt. Bei Molekülen können die Rotationsübergänge in der Regel nicht mehr aufgelöst werden. Dies führt zu einer Verbreiterung der Umhüllenden des Schwingungsübergangs. Wird die Temperatur des Moleküls zu groß, so laufen die Umhüllenden von Schwingungsgrundzustand und hot bands ineinander und die Schwingungsauflösung geht verloren.

Die niedrige Ionendichte führt zu einem weiteren Problem. Werden zunehmend energetisch höhere Niveaus besetzt, so wird im Gegenzug der Grundzustand depopuliert. Im gleichen Maß wie die Teilchenzahl im Grundzustand sinkt, sinkt auch die Signalstärke und das Signal/Rausch-Verhältnis nimmt zu.

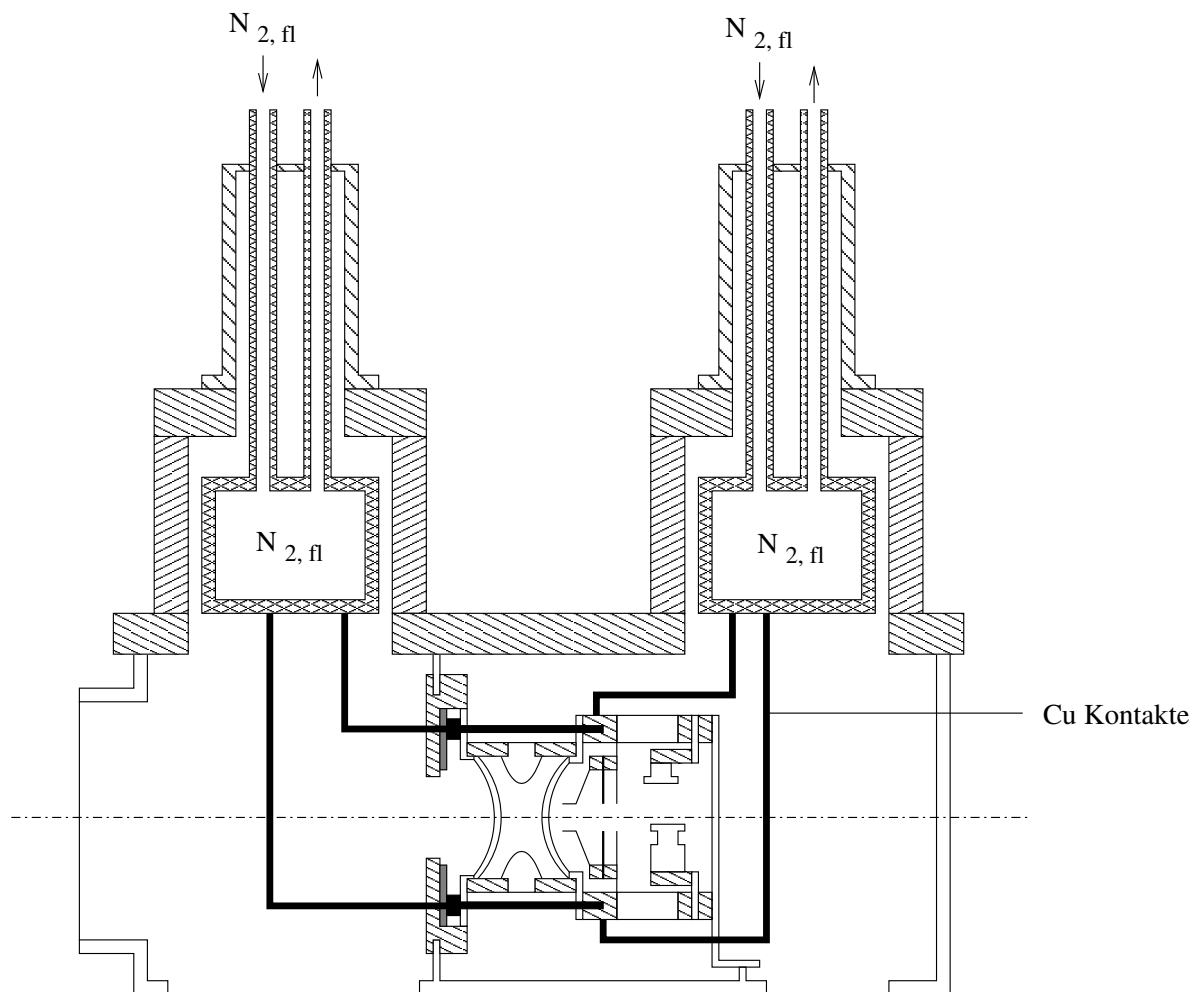


Abbildung 2.14: Übersicht über die Kühlung der Paul-Falle. Der Deckel der Vakuumkammer wurde so modifiziert, dass er zwei Voratsbehälter für flüssigen Stickstoff aufnehmen kann. Mit Kupferlitzen wird die Paul-Falle von zwei Seiten kontaktiert. Einmal direkt im Hochvakuumbereich und einmal durch die Trennwand von der Oktopolkammer aus.

Um die Temperatur der Ionen zu senken, wurde eine Kühlung für die Falle gebaut. Dazu waren sowohl größere Modifikationen an der Paul-Falle, als auch an Teilen des Vaku-

umsystems notwendig (s. Abb. 2.14). Die Kühlung besteht aus zwei Vorratsbehältern für flüssigen Stickstoff, sieben Kälteleitungen aus Kupfer und einem Hitzeschild um die Paul-Falle.

Die Kälteleitungen müssen möglichst kurz sein. Ansonsten sind die Verluste auf dem Weg vom Reservoir des Kühlmittels zur Falle zu groß. Je länger die Leitungen werden, desto höher ist die Temperatur auf die man das System kühlen kann. Für das gesamte Kühlsystem war es daher wichtig, alle Wege so kurz wie möglich zu halten und Verluste durch Wärmeleitung und Wärmestrahlung möglichst weit zu reduzieren.

Je tiefer die erreichbaren Temperaturen werden, desto vorteilhafter sollte sich dies auf die Ergebnisse auswirken. Als Kühlmittel wurde flüssiger Stickstoff gewählt. Flüssiger Stickstoff ist preisgünstig und steht in großen Mengen zur Verfügung. Die maximal erreichbare Temperatur ist damit  $-195,8\text{ °C}$  [60] und durch den Siedepunkt von Stickstoff bei Atmosphärendruck gegeben.

Durch den Aufbau der Falle ist es nicht möglich das Kühlmittel bis direkt an die Falle heranzubringen. Darum wurden in unmittelbarer Nähe der Falle zwei Reservoirs angebracht. Die Vorratsbehälter wurden aus Edelstahl gefertigt. Es handelt sich dabei um Zylinder mit einem Fassungsvermögen von jeweils  $500\text{ ml}$ . Beide Vorratsgefäße befinden sich im Vakuum. Das eine in der Kammer mit den Oktopolen, das zweite in der Kammer mit der Paul-Falle. Beide Vorratsbehälter sind mit jeweils zwei Vakuumdurchführungen nach außen geführt. Die Vorratsgefäße befinden sich innerhalb der Vakuumkammer und können durch einen  $50\text{ l}$  Dewar aufgefüllt werden.

Die Behälter sind jeweils auf Edelstahlflanschen montiert. Dazu wurde auf einem Edelstahlflansch eine vakuumtaugliche Flüssigkeitsdurchführung angebracht. Das Vorratsgefäß ist an die beiden Röhren der Durchführung geschweißt. Der Wärmekontakt nach draußen ist äußerst gering. Das Vorratsgefäß befindet sich im Vakuum, so dass die Wärmeleitung gering ist. Einzige direkte Verbindung sind zwei dünne Edelstahlröhren. Der Aufbau gleicht damit einer Thermosflasche aus Edelstahl.

Für die Installation der Vorratsgefäße wurde der Deckel der Vakuumkammer durch einen modifizierten Nachbau ersetzt. Die Vakuumkammer des Esquire 3000 lies keinen Platz für die Reservoirs. Auf den Deckel wurden darum Zylinder aufgesetzt, die die Behälter aufnehmen.

Die Falle selber kann nicht effizient gekühlt werden. Die einzelnen Komponenten der Falle liegen zum Teil auf hohen Wechselspannungen, so dass keine elektrisch leitenden Verbindungen möglich sind. Aus diesem Grund wird nur die unmittelbare Umgebung gekühlt (s. Abb 2.15). Dies geschieht mit Kupferlitzen mit einem Durchmesser von  $10\text{ mm}$ . Die Litzen verbinden die Vorratsgefäße mit den Halterungen der Endkappen.

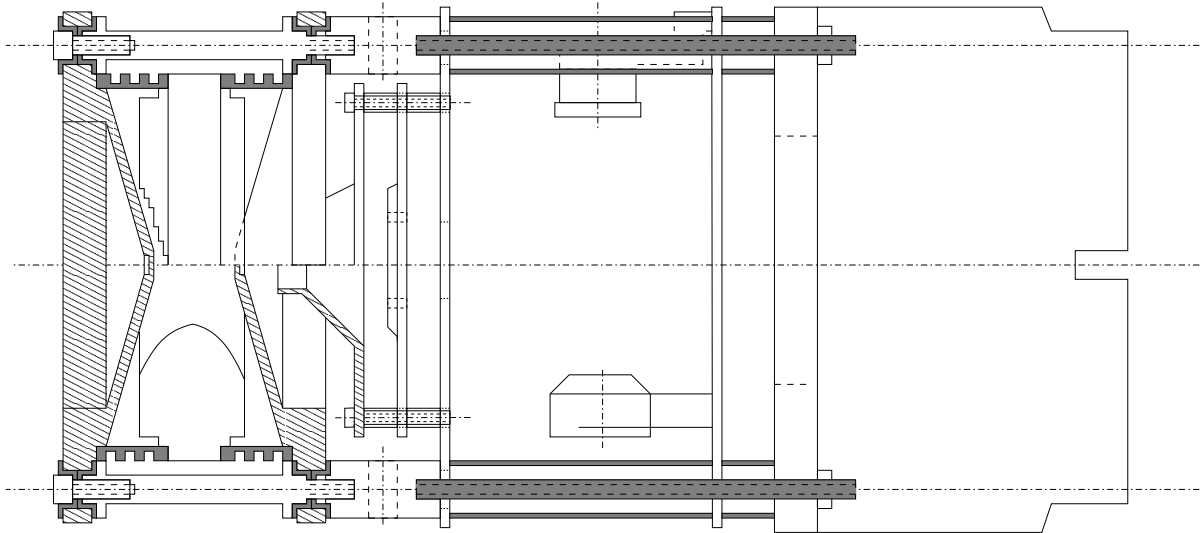


Abbildung 2.15: Analysatorblock des Massenspektrometers. Alle grau markierten Teile wurden durch Vespel ersetzt: Alle Isolatoren an den Elektroden der Falle, und die Gewindestangen und Abstandshülsen im Detektorbereich. Die Abstandshalter im Bereich der Ionenoptik wurden mit Bohrungen versehen, in denen die Kühlleitungen befestigt werden können.

Besonderer Wert wurde auf die Vermeidung von Verlusten der Kühlleistung durch Wärmeleitung und Wärmestrahlung gelegt. Alle Halterungen für die Ionenoptiken, die Ionenlinsen selber, sowie die Aufnahmen für diesen Analysatorblock bestehen aus Metall, sorgen also für große Verluste durch Wärmeleitung. Um diese zu reduzieren wurden mehrere Teile durch Kunststoffteile ausgetauscht.

Die Trennwand zwischen der Oktopolkammer und der Fallenkammer war ursprünglich aus Aluminium gefertigt. Diese wurde durch einen Nachbau aus Teflon ersetzt, in die nur noch ein Aluminiumring auf der Seite der Falle eingelassen ist. Die Eingangsseite der Falle wird in dem Teflon geführt und liegt auf dem Aluminiumring auf. Der Ring wird an drei Punkten mit Kupferlitzen mit dem Stickstoffgefäß in der Oktopolkammer verbunden. Dadurch wird der Ring gekühlt, der über die Berührungspunkte mit der Halterung der Endkappe die Eingangsseite der Falle kühlt.

Auf der Ausgangsseite der Falle wird ebenfalls die Halterung der Endkappe gekühlt. Die originalen Halterungen wurden durch Nachbauten aus Messing ersetzt. In die modifizierten Halterungen sind Löcher angebracht, in denen Kupferlitzen befestigt werden können. Die Litzen stehen in direktem Kontakt zu dem Stickstoffvoratsgefäß in der HV-Kammer.

Die Abstandshalter zwischen Ionenoptik und Detektor bestanden ursprünglich aus Edelstahl. Um Verluste durch Wärmeleitung an dieser Stelle zu vermeiden, wurden sowohl die Abstandshalter als auch die dazugehörigen Schrauben aus Vespel<sup>1</sup> nachgebaut. Bei

<sup>1</sup>Andere gebräuchliche Handelsnamen sind Kapton, Kinel, Upilex, Upimol

Vespele handelt es sich um ein Polyimidpolymer. Das Polymer ist in einem Temperaturbereich von  $-270$  bis  $300$  °C einsetzbar und zeichnet sich durch hohe Abriebfestigkeit, geringe Ausgasung im Vakuum und gute mechanische Bearbeitbarkeit aus.

Die elektrische Isolierung zwischen den Endkappen und deren Halterungen bestand aus Keramik. Beim Abkühlen der Falle auf Stickstofftemperatur sind erhebliche mechanische Spannungen zu erwarten. Um zu verhindern, dass die spröden Keramiken brechen wurden sie durch Vespelisolatoren ersetzt.

Neben der Wärmeleitung zu den umliegenden Geräteteilen spielt auch die Wärmestrahlung eine wichtige Rolle. Die umgebenden warmen Teil des Geräts heizen durch Wärmestrahlung die Falle auf. Um die Aufheizung auf diesem Weg möglichst gering zu halten, wurde ein Hitzeschild um die Falle gebaut. Das Hitzeschild besteht aus vergoldetem Kupferblech. Gold besitzt eine hohe Reflektivität für Wärmestrahlung und ist deshalb für die Abschirmung von Wärmestrahlung besonders gut geeignet. Das Hitzeschild wird auf den selben Halterungen befestigt wie die Auslasskappe der Falle. Es ist dadurch mit den Kühlreservoirs verbunden und wird ebenfalls gekühlt.

Das Helium welches sich als Stoßgas in der Paul-Falle befindet, überträgt die Energie von den Ionen auf die Wand der Falle. Es stellt sich ein thermisches Gleichgewicht ein, bei dem die Ionen die gleiche Temperatur wie die Fallenwände annehmen können.

Das Abkühlen der Falle dauert mehrere Stunden. Wie man in Abb. 2.16 sehen kann, teilt sich der Kühlprozess in zwei Bereiche auf. Innerhalb der ersten 25 Minuten sinkt die Temperatur auf  $-80$  °C. Danach verlangsamt sich der Prozess. In dieser Zeit werden die Vorratsgefäße auf ihre Endtemperatur runtergekühlt. Das Gefäß in der Oktopolkammer erreicht eine Temperatur von  $-140$  °C und das in der HV-Kammer  $-160$  °C. Dadurch, dass sich die Vorratsbehälter schneller abkühlen als die Falle selber, vergrößert sich in dieser Zeit die Temperaturdifferenz zwischen Falle und Vorratsbehälter. Der Wärmetransport zwischen den den Reservoirs ist der Temperaturdifferenz proportional. Die Falle kühlt sich in dieser Zeit schnell ab. Wenn die Vorratsgefäße annähernd ihre Endtemperatur erreicht haben, verringert sich die Differenz zur Fallentemperatur und man bekommt ein langsames Angleichen der Temperaturen.

### 2.2.3.7 Abschätzung der Kühlleistung

Die Kühlung der Paul-Falle erfolgt über sieben Kupferlitzen. Die komplette Kühlleistung muss durch diese Verbindungen erfolgen. Die Leistung durch Wärmetransport lässt sich wie folgt berechnen [61]:

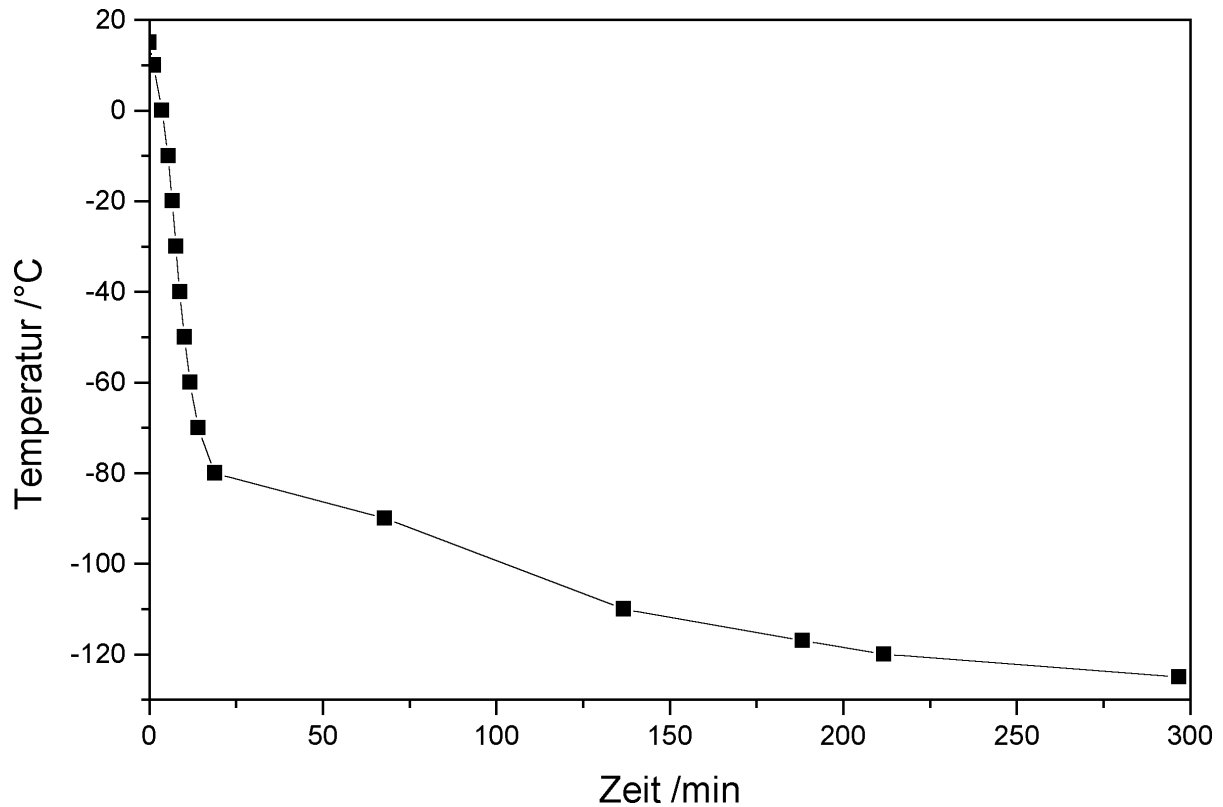


Abbildung 2.16: Zeitabhängigkeit der Temperatur beim Abkühlen der Falle. Beim zeitlichen Verlauf des Kühlprozesses sind zwei Bereiche zu erkennen. Innerhalb von 25min kühlt die Falle auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ab. Danach verlangsamt sich der Abkühlprozess drastisch. Erst nach fünf Stunden hat die Falle ein Temperatur von  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$  erreicht.

$$P = \frac{dW}{dt} = A\lambda \frac{T_1 - T_2}{l} \quad (2.3)$$

*P*: Leistung; *W*: Wärmeenergie; *A*: Fläche;  $\lambda$ : Wärmeleitfähigkeit; *T*: Temperatur.

Aufgrund seiner sehr guten Wärmeleitfähigkeit (s. Tab. 2.1) wurden für die Verbindung vom Stickstoffreservoir zur Ionenfalle Kupferlitzen verwendet. Die zur Isolierung verwendeten Kunststoffe besitzen eine etwa hundertmal schlechtere Wärmeleitfähigkeit als die Metalle. Vespel hat die bessere Wärmeleitfähigkeit als Teflon ist aber mechanisch stabiler als Teflon. Bauteile, die einer mechanischen Belastung ausgesetzt sind, wurden deshalb aus Vespel gefertigt.

Die Anfangs- und Endpunkte der Kupferlitzen sind mit *Pt-100* Temperatursensoren versehen. Die Temperaturdifferenz kann so direkt bestimmt werden.

In Tab. 2.2 sind die Zuleitungen aufgelistet. Die vier Leitungen durch die Analysetorkammer und die drei Leitungen durch die Oktopolkammer bringen zusammen eine Kühlleistung von etwa  $13\text{ W}$  auf.

Material	Wärmeleitfähigkeit $\lambda$ / $WK^{-1}m^{-1}$
Kupfer	429
Eisen	104
Teflon	0,25
Vespel	0,78

Tabelle 2.1: Wärmeleitfähigkeiten der verwendeten Materialien [62].

Anzahl	Länge / $m$	Temperaturdifferenz / $K$	Kühlleistung / $W$
4	0,18	40	8
3	0,10	20	5

Tabelle 2.2: Abmessungen der zur Kühlung verwendeten Kupferlitzen. Alle Kupferlitzen besitzen einen Querschnitt von  $2 * 10^{-5} m^2$ . Die Gesamtkühlleistung liegt somit bei  $\approx 13 W$ .

Die Kälteverluste sind dagegen nur schwer abzuschätzen. Wärmeenergie kann der Falle durch Konvektion, Konduktion und Strahlung zugeführt werden. Aufgrund der komplizierten Geometrie ist eine genaue Berechnung nicht möglich. Mit einigen vereinfachenden Annahmen kann die zugeführte Wärmemenge jedoch abgeschätzt werden.

Anzahl	Beschreibung	Länge / $m$	Querschnitt / $m^2$	Heizleistung / $W$
4	Abstandshalter (Vespel)	0,035	$1 * 10^{-4}$	1,2
1	Trennwand (Teflon)	0,016	$7 * 10^{-4}$	1,6
2	Kontakte Endkappen (Eisen)	0,2	$2 * 10^{-7}$	0,03
1	Kontakt Ringelektrode (Eisen)	0,2	$2 * 10^{-6}$	0,3

Tabelle 2.3: Wärmezufuhr durch Konduktion. Die Temperaturdifferenz wurde jeweils mit  $150 K$  angenommen. Die Heizleistung beträgt etwa  $3 W$ . Der Anteil der elektrischen Kontakte ist gering.

In der Vakuumkammer herrscht ein Druck von  $5 * 10^{-5} mbar$ . Bei diesem Druck kann davon ausgegangen werden, dass die Verluste durch Konvektion klein sind, im Vergleich mit denen durch Wärmestrahlung. Die Konvektion wird deshalb nicht berücksichtigt. Die Ausgangsseite der Ionenfalle ist durch vier Abstandshalter aus Vespel thermisch isoliert (s. Abb. 2.15). Unter der Annahme, dass die Temperatur vollständig über dem Polymer abfällt, lässt sich der Verlust an dieser Stelle gut abschätzen (s. Tab. 2.3). Auf der Eingangsseite der Falle findet die Wärmezuführung über eine Trennwand aus Teflon statt (s. Abb. 2.14). In die Trennwand ist eine dünne Scheibe aus Aluminium eingelassen,



die direkt gekühlt wird. Die Ionenfalle ist an drei Stellen elektrisch kontaktiert. Diese Verbindungen tragen ebenfalls zur Wärmeleitung bei. In Tabelle 2.3 sind alle Kontakte, die zum Energietransport beitragen, aufgelistet. Die Heizleistung über Wärmeleitung im Festkörper beträgt etwa 3 W. Der Anteil der elektrischen Kontakte ist gering. Dies liegt daran, dass die Leitungen dünn und lang sind.

Am schwierigsten gestaltet sich die Abschätzung der Wärmestrahlung. Der Energietransfer durch Wärmestrahlung lässt sich wie folgt berechnen [61]:

$$P = \sigma A(T_1^4 - T_2^4) \quad (2.4)$$

$\sigma = 5,7 * 10^{-8} \text{ Wm}^{-2}\text{K}^{-4}$ ;  $A$ : Fläche;  $T$ : Temperatur

Bei einer Temperaturdifferenz von 150 K ergibt sich eine Heizleistung von 430 Wm<sup>-2</sup>. Aufgrund der komplizierten Geometrie und der hohen Anzahl der Flächen ist es nicht möglich, die exakte Fläche, die zum Wärmetransport beiträgt, zu bestimmen. Um dennoch eine Abschätzung für die Wärmestrahlung treffen zu können, wurde davon ausgegangen, dass der Hitzeschild (s. Kap. 2.2.3.6) eine geschlossene Kiste um die Falle bildet. Die Kiste hätte dann eine Oberfläche von 0,025 m<sup>2</sup>. Die Strahlungsleistung beträgt damit:

$$P = 0,025 \text{ m}^2 * 430 \frac{\text{W}}{\text{m}^2} = 10,75 \text{ W} \quad (2.5)$$

Zusammen genommen ergibt sich eine gesamte Heizleistung von etwa 14 W. Angesichts der großen Vereinfachungen bei der Berechnung stimmt dieser Wert gut mit der Kühlleistung von 13 W überein. Knapp 80% der Energie wird über Strahlung der Falle zugeführt. Sie ist damit der limitierende Faktor für die erreichte Temperatur der Ionenfalle.

### 2.2.3.8 Restgasanalyse der Vakuumkammer

Die Modifikationen an der Vakuumkammer (s. Kap. 2.2.3.4) ermöglichen das Anbringen eines Restgasanalysators. Der Restgasanalysator ist nicht direkt an der Analysatorkammer angebracht. Dadurch ist der Abstand zur Paul-Falle und dem Detektor so groß, dass auch während der Aufnahme von Massenspektren, die Restgasanalyse durchgeführt werden kann.

Die Zusammensetzung des Restgases in der Vakuumkammer in Abb. 2.17a) entspricht den Erwartungen. Das Restgas besteht zum größten Teil aus Stickstoff. Dieser stammt zum Teil aus dem Einlassbereich. Dort wird Stickstoff zur Unterstützung des Ionisierungsprozesses eingesetzt. Auch ohne Probeneinlass wird dieser Bereich permanent mit

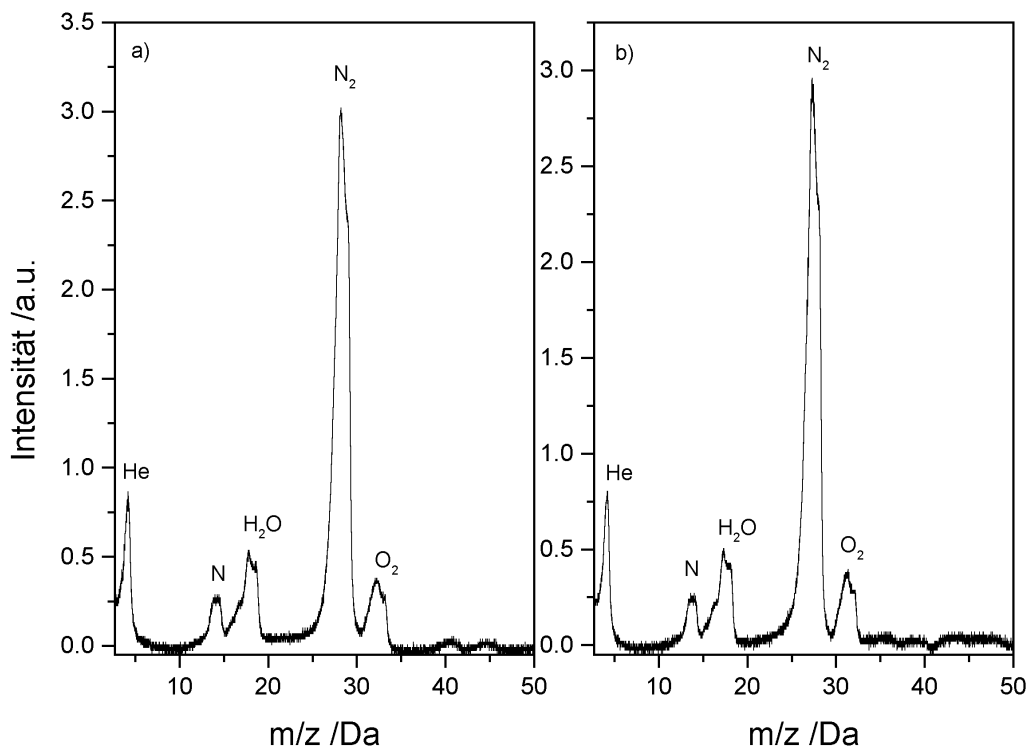


Abbildung 2.17: Restgasanalyse der Vakuumkammer. a) Restgasanalyse bei normalem Gaseinlass. b) Restgasanalyse mit Probeneinlass. Das mit der Probe eingelassene Lösungsmittel macht sich im Restgas nicht bemerkbar.

Stickstoff gespült, um eine Kontamination mit Wasser zu vermeiden. Da in der Vakuumkammer lediglich ein Druck von  $5 \cdot 10^{-5}$  mbar herrscht, folgt daraus, dass ein erheblicher Leckstrom durch die zahlreichen Aussenanschlüsse in das Gerät gelangt.

In deutlich geringeren Konzentrationen sind Wasser und Sauerstoff in der Kammer vorhanden. Diese gelangen ebenfalls durch Leckströme in die Kammer. Der hohe Anteil Helium rührt daher, dass Helium als Stoßgas in die Paul-Falle eingelassen wird. Helium besitzt im Vergleich mit Stickstoff eine etwa fünfmal geringere Ionisierungswahrscheinlichkeit [63]. Der Partialdruck des Heliums ist deutlich höher, als der, den der Vergleich der Peakflächen suggeriert.

Während der Messungen mit dem Elektrospray-Massenspektrometer wird Lösungsmittel mit in das Gerät hineingesaugt. Dieses Lösungsmittel ist in der Analysatorkammer nicht mehr nachweisbar (s. Abb. 2.17b)). Das Lösungsmittel wird in den differentiellen Pumpstufen vor dem Eintritt in die Analysatorkammer vollständig entfernt.

### 2.2.3.9 Herausführen wichtiger Signale

Das Esquire 3000 lässt sich nicht von externen Geräten aus ansteuern. Aus diesem Grund muss die externe Messelektronik mit den internen Abläufen des Massenspektrometers synchronisiert werden. Auf zwei Platinen der Steuerelektronik des Massenspektrometers wurde jeweils ein Testpunkt nach außen geführt.

Bei dem einem Signal handelt es sich um das  $780\text{ kHz}$  Signal des Schwingquarzes, der die Frequenz der Ringelektrode bestimmt. Alle internen Abläufe des Massenspektrometers werden von diesem Signal synchronisiert. Mit diesem Signal ist es möglich, die externe Messelektronik phasensynchron zur Spannung der Ringelektronik laufen zu lassen.

Das andere Signal ist das Steuersignal der Hochspannung an der Ringelektrode. Dieses Signal liegt im Bereich von  $0 - 5\text{ V}$  und wird vom Hochspannungsgenerator des Massenspektrometers in eine Spannung von  $0 - 14\text{ kV}_{p-p}$  umgesetzt. Der zeitliche Ablauf ist in Abb. 2.4 dargestellt. Anhand der Spannung lässt sich erkennen, an welchem Punkt des Analysezykluses sich das Massenspektrometer gerade befindet.

Das Detektorsignal wird von der Messelektronik des Esquires direkt weiter verarbeitet und per Ethernet an den zum Esquire gehörenden Messrechner geschickt. Das Detektorsignal steht damit nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde das Detektorsignal direkt abgegriffen und nach außen geführt und von der externen Messelektronik, die Einzelteichen zählt, weiter verarbeitet.

Das Massenspektrometer nutzt einen Pin eines 21-poligen Sub-D Steckers, um zu bestimmten Ereignissen ein Triggersignal für Peripheriegeräte zur Verfügung zu stellen. Mögliche Ereignisse sind Akkumulationszeit, beliebige Isolations- und Fragmentierungsschritte, *scandelay* und Massenanalyse. Es sind beliebige Kombinationen der Ereignisse triggerbar. Beim Eintritt in das jeweilige Ereignis wird der Pin von  $5\text{ V}$  auf Masse gelegt und beim Austritt wieder auf den Ausgangswert. Diese Signal ist invertierbar. Soweit nicht anders erwähnt, wurde das Ende der Massenisolations als Haupttrigger für das Experiment verwendet.

## 2.2.4 Experimentsteuerung

### 2.2.4.1 Einstellung der Ionenzahl und des ESI-Triggers

Der Zeitablauf für die Aufnahmen eines Massenspektrums kann nur über die mitgelieferte Software eingestellt werden. Ausschlaggebend für die Anzahl der Ionen, die sich während der Analyse in der Ionenfalle befinden, ist die Akkumulationszeit (s. Abb. 2.4). Sie wurde so eingestellt, dass sich im Schnitt zwischen 200 bis 250 Ionen in der Falle befanden. Die Zeit, die benötigt wird, um die gewünschte Zahl an Ionen in der Falle zu fangen, hängt von mehreren Faktoren ab (s. Kap. 2.2.1.2).

### 2.2.4.2 Signalerfassung

Zur Datenerfassung und Experimentsteuerung wurde ein PC mit Pentium I Prozessor unter Windows 98SE verwendet. Die Kommunikation mit der Peripherie erfolgte entweder über eine IEEE-488.2 (GPIB) Schnittstelle, oder mittels TCP/IP über eine Ethernet-Verbindung. Über GPIB sind der Farbstofflaser (s. Kap. 2.2.2), ein Zähler (995, Ortek) und ein Oszilloskop (TDS 520D, Tektroniks) angeschlossen (s. Abb. 2.18). Der Messrechner ist über eine Ethernet-Verbindung mit einem weiteren Rechner verbunden, der die Verdopplereinheit kontrolliert (s. Kap. 2.2.3.1).

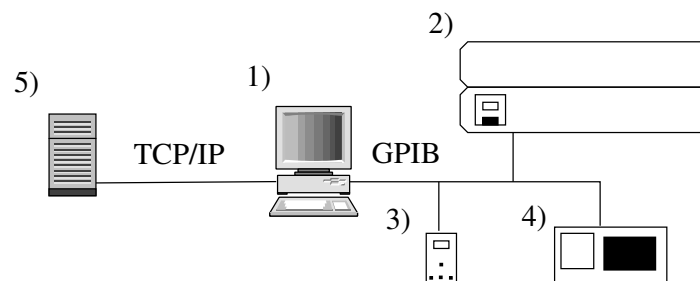


Abbildung 2.18: Schema der Datenverbindungen. An den Messrechner 1) sind über eine GPIB-Schnittstelle ein Farbstofflaser 2), ein Zähler 3) und ein Oszilloskop 4) angeschlossen. Über eine TCP/IP-Verbindung ist ein weiterer Rechner angeschlossen, der die Verdopplereinheit steuert.

Sämtliche Programme zur Steuerung der Geräte wurden in *LabView 6* (National Instruments) erstellt. Für das Oszilloskop stehen vom Hersteller Tektroniks *Virtual Instruments (VIs)* zur Verfügung. Für den Zähler und den Farbstofflaser wurden eigene VIs geschrieben, um eine Ansteuerung der Geräte unter Labview zu realisieren.

In Abb.2.19 ist der Zeitablauf für die Erfassung eines einzelnen Datenpunktes dargestellt. Beim Ende der Massenisolierung wird der ESI-Trigger von *low* auf *high* gesetzt und damit das Oszilloskop getriggert. Das Oszilloskop triggert über TTL-Signale den Laser und

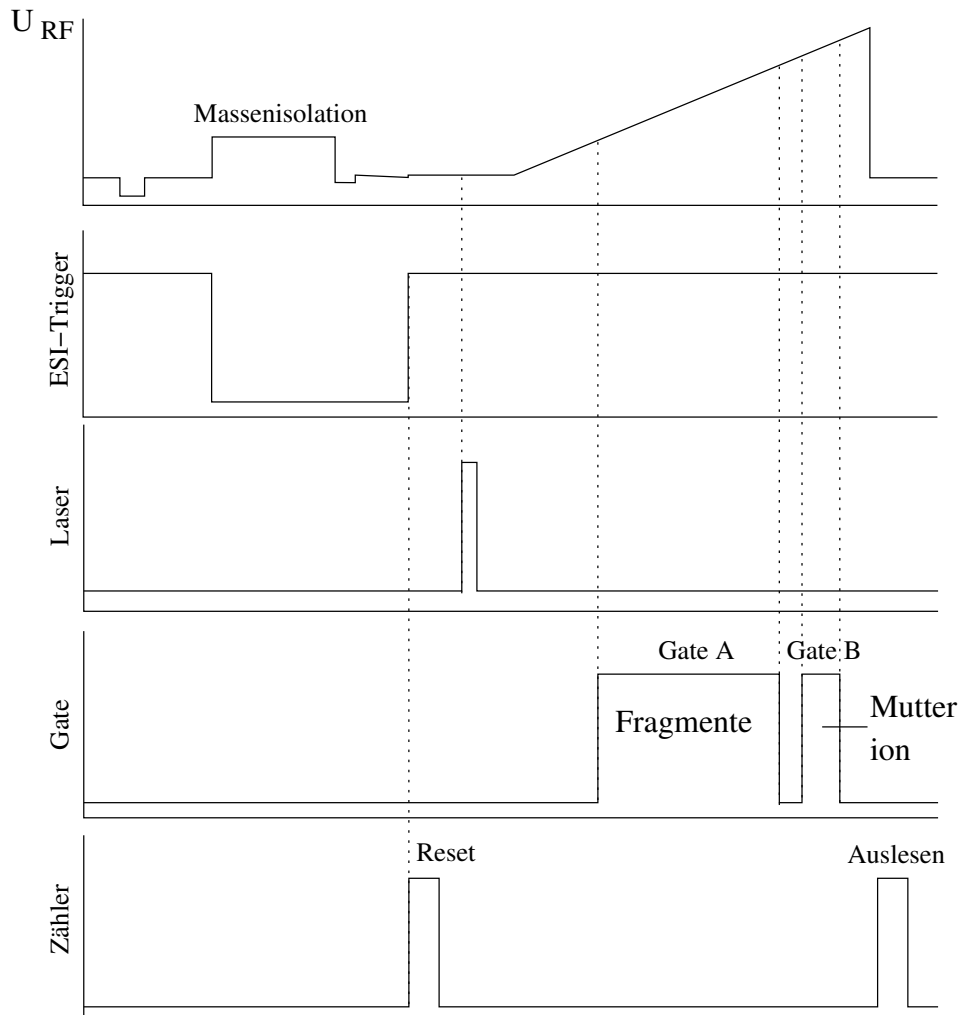


Abbildung 2.19: Zeitablauf für die Aufnahme eines einzelnen Datenpunktes. Das Ende der Massenisolation triggert das Oszilloskop. Das Oszilloskop gibt den Trigger über TTL-Signale an Delaygeneratoren für die Gates A und B und den Laser weiter und über GPIB an einen Computer der den Zähler steuert.

den Gategenerator (DG 535, Stanford Research Systems, Inc.) für die beiden Zähler. Über GPIB wird das Signal an den Messrechner weitergegeben, der das Timing für das Auslesen des Zählers übernimmt. Der Laser wird so abgefeuert, dass der Schuss zwischen dem Ende der Massenselektion und dem Beginn der Massenanalyse liegt.

Das Signal des Ionendetektors wird aus dem Massenspektrometer heraus geführt und weiter verarbeitet. Dazu wird das Signal zuerst durch einen sehr schnellen Operationsverstärker (Modell 774, Phillipsscintific) um den Faktor 25 verstärkt. Das verstärkte Signal wird dann von einem Diskriminator (Modell 7011, CMTE) zu einem TTL-Signal konvertiert. Das TTL-Signal wird von einem gegateten Zweikanal-Zähler aufgezeichnet. Das Signal des Ionendetektors wird an den Eingang beider Kanäle gelegt. Der Zähler zeichnet Ereignisse nur auf, wenn der entsprechende Kanal zusätzlich durch ein TTL-Signal freigegeben wird. Das Freigeben erfolgt über einen *digital delay generator*, der vom Oszilloskop getriggert wird. Das Gate für den ersten Kanal liegt über dem Mutterion. Über den zweiten Kanal werden die Fragmentionen aufgezeichnet. Soweit nicht anders angegeben, werden jeweils alle Fragmentionen erfasst.

Der Messrechner ist mit dem Zähler über eine IEEE-488.1 konforme Schnittstelle verbunden. Der Zähler kann vom Messrechner aus gestartet, gestoppt, ausgelesen und zurück gesetzt werden. Das Oszilloskop gibt den Start des Messzyklus mittels GPIB an den Messrechner weiter. Der Messrechner setzt den Zähler zurück und wartet eine voreingestellte Zeit bis zum Ende der Massenanalyse. Anschließend werden die Werte der beiden Zählerkanäle über GPIB eingelesen.

Der Farbstofflaser ist an den selben Bus wie der Zähler angeschlossen. Die Position des Lasers wird vom Messrechner kontrolliert.

Für die Erfassung der Laserleistung wurde der Steuerrechner der Verdopplersteuerung mit genutzt. Die Laserleistung wird über eine Fotodiode vom Messrechner aufgezeichnet und kann über eine TCP/IP Verbindung abgefragt werden (s. Kap. 2.2.3.3).

### 2.2.4.3 Datenselektion und -aufzeichnung

Aufgrund der geringen Teilchenzahl in Verbindung mit der geringen Wiederholrate des Experiments wurden einige Vorkehrungen getroffen, um eine Vorabselektion und -verarbeitung der Daten durchzuführen.

Ein großes Problem stellt die geringe Teilchenzahl in der Paul-Falle dar. Zudem schwankt die Teilchenzahl von einem zum anderen Massenspektrum sehr stark. In Abb. 2.20 ist die zeitliche Stabilität des Ionensignals dargestellt. Pro Massenspektrum befanden sich etwa 200 Ionen in der Falle. Die durchschnittlichen Schwankungen betragen  $\pm 20\%$  vom Mittel-

wert. Diese Schwankungen können z.B. durch Dichteschwankungen in der Probenlösung hervorgerufen werden.

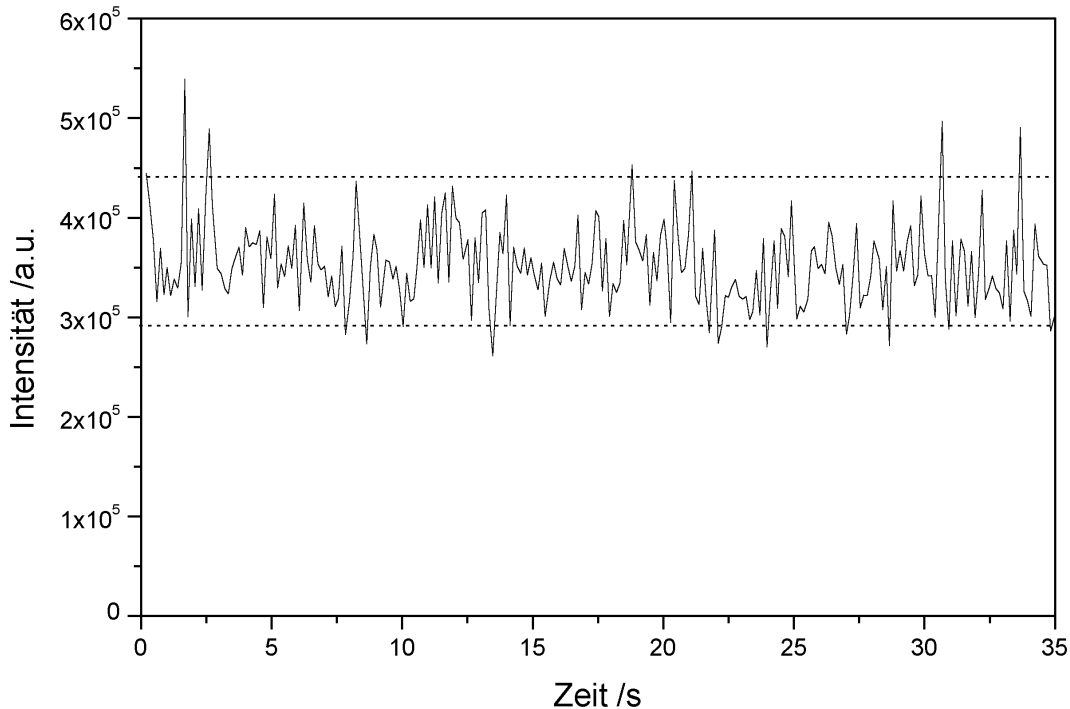


Abbildung 2.20: Zeitliche Stabilität des Ionensignals. Das Signal von  $[TrpH]^+$  ( $m/z = 205 Da$ ) wurde über 35 s mit der internen Messelektronik aufgezeichnet. Das Zeitintervall entspricht 255 aufeinanderfolgenden Massenspektren. Pro Spektrum waren etwa 200 Ionen in der Falle. Das Signal schwankt um etwa  $\pm 20\%$  (gestrichelte Linien).

In Abb. 2.20 wurden in 35 s etwa 255 einzelne Massenspektren aufgezeichnet. Das entspricht einer Wiederholrate von 8 Hz. Für das Aufzeichnen von Massenspektren ohne Laserzugriff lassen sich in Abhängigkeit der Konzentration der Probenlösung und der Größe des aufzunehmenden Massenbereichs Wiederholraten von 5 – 10 Hz erreichen. Soll zusätzlich noch ein Laserzugriff erfolgen, so reduziert sich die Wiederholrate durch den zusätzlichen Schritt im Aufnahmezyklus auf maximal 5 Hz. Das Signal in Abb. 2.21 wurde mit der internen Messelektronik des Esquire 3000 aufgezeichnet. Dazu wird das Signal des Detektors linear verstärkt, so dass die Intensität proportional zur Zahl der Ionen ist. In Abb. 2.21 wurden 250 aufeinanderfolgende Massenspektren mit der externen Zählelektronik aufgezeichnet. Der Intensitätsverlauf in Abb. 2.20 zeigt qualitativ den gleichen Verlauf wie die Schwankungen in der Ionenzahl in Abb. 2.21. Die Ionenzahl schwankt ebenso wie die Intensität um etwa  $\pm 20\%$ . Der Zähler gibt somit das Detektor-

signal gut wieder. Ausnahme bilden eine kleine Anzahl von signifikanten Ausreißern in Abb. 2.21.

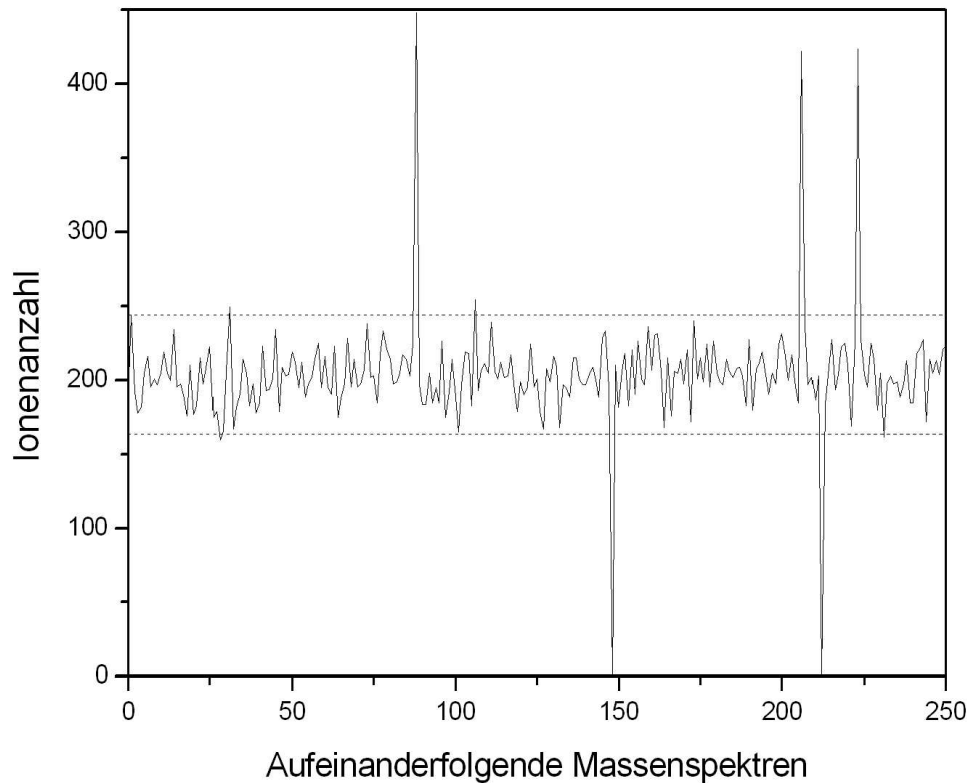


Abbildung 2.21: Anzahl der Ionen in 250 direkt aufeinanderfolgenden Massenspektren, aufgezeichnet mit externer Messelektronik. Die mittlere Ionenanzahl pro Massenspektrum betrug 204. Die gestrichelten Linien schließen das Intervall  $204 \pm 20\%$  ein. Die Schwankungen von Massenspektrum zu Massenspektrum liegen bei knapp 20%. Die fünf Ausreißer sind Artefakte die aus dem computergesteuerten Timing des Zählers resultieren.

Die Ausreißer im Bereich von Null und 400 sind Artefakte. Bei den Ausreißern nach oben liegt die Ionenanzahl in etwa bei dem doppelten des Mittelwerts. Der Messrechner, der den Zähler ausliest und dabei zurücksetzt, ruft die Daten so spät ab, dass bereits ein weiterer Messzyklus durchlaufen wurde. Die Ursache liegt in der Art, wie die Daten des Zählers an den Messrechner übermittelt werden. An zwei Stellen kommt es zu deutlichen Jittern. Der Messrechner ruft im Pollingbetrieb über GPIB den Triggerstatus des Oszilloskopes ab. Die Reaktionszeit des Busses bestimmt hier die Geschwindigkeit. Nachdem der Trigger ausgelöst worden ist, wird das Timing für das Starten, Stoppen, Auslesen und Zurücksetzen des Timers von der Sleep-Funktion unter LabView übernommen. Da Win98 kein Echtzeit Betriebssystem ist, kann es hier zu erheblichen Ungenauigkeiten



kommen. Weicht die durchschnittliche Zeit für das Auslesen der Daten nach oben ab, kann im Extremfall ein kompletter Analysezyklus übersprungen werden. Liest das System den Zähler überdurchschnittlich schnell aus, wird der Zähler ausgelesen, bevor der Massenscan abgeschlossen ist.

Solche Ausreißer würden das ohnehin schon schlechte Signal/Rausch-Verhältnis weiter verschlechtern. Aus diesem Grund werden die einzelnen Messwerte schon während der Datenaufnahme auf solche Ausreißer geprüft. Alle Datenpunkte, bei denen die Teilchenzahl um einen vorher festgelegten Prozentsatz von einem Zielwert abweicht, werden von vornherein verworfen. Es ist dabei wichtig, zur Bestimmung der Teilchenzahl die Summe von Mutter- und Fragmention zu bilden. Ansonsten würden Datenpunkte mit einer hohen Fragmentrate verworfen, da die verbleibenden Mutterionen unter der geforderten Mindestteilchenzahl liegen können. Typischerweise werden Datenpunkte verworfen, bei denen die Teilchenzahl um mehr als 50% vom eingestellten Wert abweichen.

Neben der Teilchenzahl haben Schuss zu Schuss Schwankungen in der Laserleistung einen großen Einfluss auf das Signal/Rausch-Verhältnis. Schwankungen in der Laserleistung haben zwei Ursachen. Zum einen gibt es zufällige Schwankungen im Laser. Es kann aber auch zu Schwankungen in der Leistung kommen, wenn die Wellenlänge des Farbstofflasers verändert wird. Die Regelkreise zur Konstanthaltung der Laserleistung (s. Kap. 2.2.3.1, 2.2.3.3) sind langsamer als die Positionierung des Farbstofflasers. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Datenpunkte in einem Abstand von  $\Delta\lambda = 0,1 \text{ nm}$  aufgenommen. Dies entspricht etwa 10 Schritten in der Positionierung des Verdopplerkristalls. Der Farbstofflaser erreicht schneller die neue Wellenlänge als der Verdopplerkristall, so dass die Laserleistung im UV für einige Schüsse abfällt. Aus diesem Grund wurden Datenpunkte auch nach der Laserleistung selektiert. Alle Datenpunkte, bei denen die Laserleistung um mehr als 10% vom vorgegebenen Wert abgewichen sind, wurden verworfen.

Um das Signal/Rausch-Verhältnis weiter zu verbessern, wurden für jeden Punkt im Spektrum über 20 Einzelpunkte gemittelt. Ein aufgezeichneter Datenpunkt wurde wie folgt aufgenommen:

Das Steuerprogramm fährt sowohl den Farbstofflaser als auch den Verdopplerkristall zu der gewünschten Wellenlänge. Die genaue Positionierung des Kristalls übernimmt danach die aktive Verdopplersteuerung (s. Kap. 2.2.3.1). Die Laserleistung wird von der Konstanthaltung überwacht. Es werden solange Messpunkte nach dem in Abb. 2.19 gezeigten Schema aufgenommen, bis eine gewünschte Anzahl an Einzelpunkten erfasst wurde, bei denen sowohl die Anzahl der Ionen als auch die Laserleistung innerhalb der vorgegebenen Schwankungen lag. Über diese Punkte wurde gemittelt. Bei einer Messung werden vier Datenspuren mitgeschrieben: Die Wellenlänge, die beiden Kanäle des Zählers und die Laserleistung.

## 2.3 Probenpräparation

### 2.3.1 Wahl des Lösungsmittels

Von entscheidender Bedeutung ist die Wahl des Lösungsmittels. Ideal sind polare protische Lösungsmittel, die eine geringe Oberflächenspannung aufweisen. Da die Ionisation durch die Übertragung eines Protons realisiert wird, sind aprotische Lösungsmittel nicht geeignet [64]. Ein wichtiger Prozess während der Ionisierung ist die Tropfenbildung an der Spitze der Elektrospray-Nadel. Lösungsmittel mit einer hohen Oberflächenspannung wie Wasser sind deshalb nur bedingt geeignet.

Das am häufigsten verwendete Lösungsmittelgemisch in der Elektrosprayionisation ist eine Mischung aus Acetonitril/Wasser/Essigsäure, welches im Massenverhältnis 66:33:1 verwendet wird. Durch das Acetonitril wird die Oberflächenspannung des Wassers herabgesetzt. Die Essigsäure senkt den pH-Wert und sorgt damit für eine erhöhte Ionisationswahrscheinlichkeit. Außerdem taucht die Essigsäure nicht im Massenspektrum auf und stört damit nicht die Messung. Alle Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit diesem Lösungsmittelgemisch durchgeführt.

### 2.3.2 Verwendete Substanzen

Acetonitril und Essigsäure wurden von Fluka bezogen und besaßen die höchste Reinheit. Das Wasser wurde vor der Verwendung deionisiert und zweifach destilliert.

Alle verwendeten Aminosäuren lagen in der L-Form vor. Die Aminosäuren (Reinheit > 98%) und Adenin (Reinheit > 99%) wurden von Bachem bezogen. Tryptamin wurde von Fluka mit einer Reinheit > 98% bezogen.

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, ohne weitere Reinigung verwendet.

### 2.3.3 Austausch labiler Wasserstoffatome

Der Austausch von Wasserstoffatomen an Heteroatomen mit dem Lösungsmittel vollzieht sich sehr rasch. Dies wurde ausgenutzt, um partiell deuterierte Substanzen darzustellen. Diese partiell deuterierten Substanzen können dazu genutzt werden, um Hinweise auf die Struktur von Fragmenten zu erhalten.

Dazu wurde ein von Kap. 2.3.1 abweichendes Lösungsmittelgemisch verwendet. Die Probe wurde in einem Gemisch aus 99% Deuteriumoxid (99,9%) mit 1% Essigsäure gelöst. Der

Anteil der nicht deuterierten Essigsäure erhöht formal den Anteil an nicht vollständig deuterierten Molekülen. Es hat sich aber gezeigt, dass der Austausch der labilen Wasserstoffatome quantitativ ist.

### 2.3.4 UV/VIS-Spektren im Lösungsmittel

Die in Kap. 3.6 gezeigten Lösungsmittelspektren wurden mit einem kommerziellen UV/VIS-Spektrometer aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde bei allen Spektren eine Mischung aus Ethylenglykol und Wasser im Verhältnis 1:1 verwendet. Dieses Lösungsmittel wurde verwendet, um die erhaltenen Spektren mit Literaturdaten [65] vergleichen zu können. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde *HCl* verwendet.



## 3 Ergebnisse

Wie in der Einleitung beschrieben, gab es bei Beginn dieser Arbeit nur eine Untersuchung zur Photofragmentierung von protonierten Systemen in der Gasphase [9]. Die Auswahl der molekularen Systeme erfolgte also vor allem unter dem Gesichtspunkt der Durchführbarkeit und des Tests des neu aufgebauten Experiments.

### 3.1 Tryptophan

#### 3.1.1 Wahl von Tryptophan als Testsubstanz

Zur Überprüfung des experimentellen Aufbaus wurde Tryptophan gewählt (s. Abb. 3.1). Es ist wahrscheinlich, dass im Tryptophan die Protonierung an der Aminogruppe stattfindet [66, 67]. Die Absorption sollte hingegen im Indolring erfolgen. Zwischen dem Ort der Protonierung und dem Ort der Absorption liegen mehrere Bindungen und es wird erwartet, dass der Feldeffekt der Ladung durch den Raum bestimmend ist. Entsprechend sollte die Ladung nur eine geringe Verschiebung in der relativen Lage der elektronischen Niveaus verursachen. Tryptophan ist ein Modellmolekül für dieses Experiment, da es einen relativ unpolaren  $L_b$ -Zustand und einen polaren  $L_a$ -Zustand als niedrigste angeregte Zustände besitzt. Interessant ist also die Wirkung der Ladung auf diese angeregten Zustände.

Die spektroskopischen Eigenschaften des neutralen Tryptophans sind gut untersucht [68, 69, 70]. Aufgrund der erwarteten geringen Verschiebung für das protonierte Tryptophan liefert dies einen guten Ausgangspunkt.

Im Vergleich der aromatischen Aminosäuren hat Tryptophan die höchste Anregungswahrscheinlichkeit. Damit ist hier die Chance am größten, auch bei nicht optimalen experimentellen Bedingungen ein Signal zu finden. Tryptophan erfüllt somit beste physikalische Voraussetzungen für ein erstes Test-Experiment.

Die spektroskopischen Eigenschaften von Tryptophan werden häufig benutzt, um strukturelle Information über Proteine zu erlangen [71]. Tryptophan ist damit für Untersuchungen zur Ladungs-Chromophor-Wechselwirkung von höchstem Interesse.

### 3.1.2 Struktur und Nomenklatur

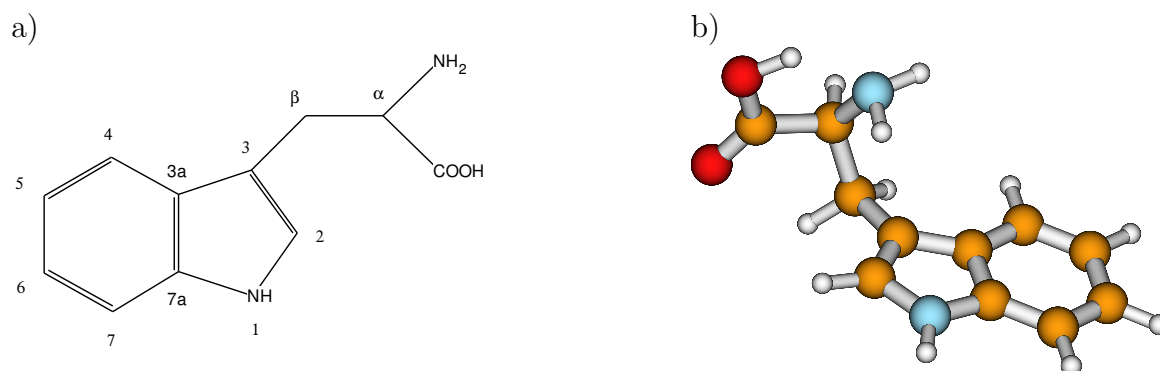


Abbildung 3.1: a) Lewisstruktur von Tryptophan b) Niederstenergetisches Konformer des neutralen Tryptophans in der Gasphase [72, 20].

Der systematische Name für Tryptophan lautet 2-Amino-3-(1*H*-indol-3yl)-propansäure. In der Dreibuchstabennotation wird das Symbol Trp verwendet. Die Nummerierung der Atome erfolgt wie in der in Abb. 3.1a) dargestellten Lewisstruktur [73]. Sie beginnt am Stickstoff des aromatischen Rings und erfolgt von der Brücke wegzeigend. Der Kohlenstoff an dem die Aminogruppe hängt bekommt die Bezeichnung  $\alpha$ , der an dem der aromatische Ring hängt  $\beta$ . Die im folgenden benutzen Symbole zur Beschreibung von Positionen innerhalb des Moleküls entsprechen diesem System.

Durch *resonance enhanced two photon ionization spectroscopy* konnten sechs Konformere des neutralen Tryptophans im Vakuum nachgewiesen werden [68, 69]. Die aus dem Lösungsmittel bekannte zwitterionische Form ist im Vakuum nicht das stabilste Tautomer. Das Zwitterion wird erst durch die Solvataion mit Wasser zur stabileren Form.

Die Position der Carboxylgruppe wird durch die Wechselwirkung des freien Elektronenpaares an der Aminogruppe mit der *OH*-Gruppe bestimmt. Für die relative Position von Ring und Alkylkette ist hauptsächlich die Wechselwirkung zwischen Aminogruppe und dem aromatischen Ring bestimmend.

Die Problematik der verschiedenen Konformere wird bei protonierten Systemen noch durch die möglichen Tautomeren erschwert. Für jedes mögliche Tautomer existieren mehrere Konformere, so dass die Anzahl der möglichen Molekülgeometrien deutlich höher ist, als bei dem entsprechenden Neutralteilchen.

Im Tryptophan bieten sich drei Positionen zur Protonierung an.

- An der Aminogruppe, im folgenden als  $N - H^+ - Trp$  bezeichnet, Abb. 3.2a)
- 1-Position, im folgenden als  $1 - H^+ - Trp$  bezeichnet, Abb. 3.2b)

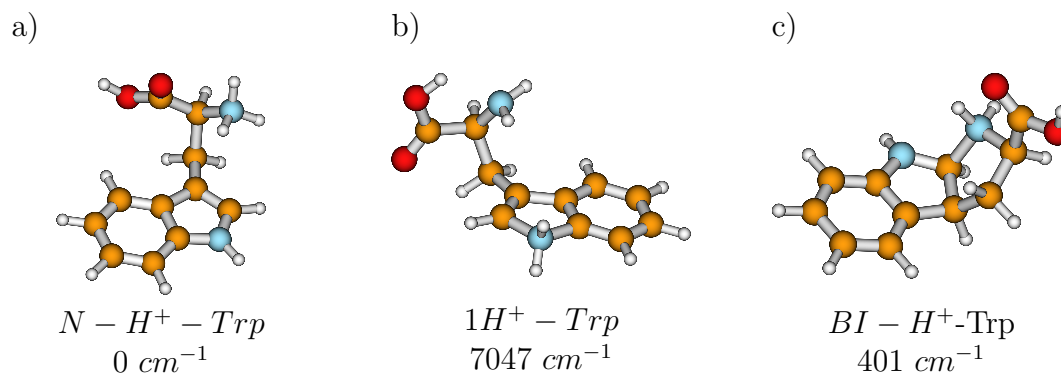


Abbildung 3.2: Relative Energien von drei möglichen Tautomeren des protonierten Tryptophans. a) Die günstigste Struktur ergibt sich aus der Protonierung an der Aminogruppe. c) Die Protonierung am Indolstickstoff ist sehr ungünstig. c) Nach Protonierung in 1-Position erfolgt eine Isomerisierung.[20].

- 3-Position, im folgenden als  $BI - H^+ - Trp$  bezeichnet, Abb. 3.2c)

Alle übrigen Möglichkeiten sind energetisch deutlich ungünstiger. Bei Protonierung an der 3-Position, schließt sich eine Isomerisierung an [20]. Diese Umlagerung wird normalerweise durch eine hohe Reaktionsbarriere verhindert. Die Protonierung an der 1-Position ist denkbar, aber energetisch ungünstig. Das niederstenergetische Konformer (s. Abb. 3.2 a)) entsteht bei der Protonierung an der Aminogruppe [53, 66, 67, 20]. Es ist vermutlich das einzige Tautomer in der Ionenwolke.

### 3.1.3 ESI-MS von Tryptophan

Die niedrigen Dampfdrücke der natürlichen Aminosäuren erschwerten lange Zeit eine systematische Untersuchung in der Gasphase. Erste Untersuchungen wurden deshalb an Derivaten durchgeführt, an denen die polaren Gruppen geschützt wurden, um so den Dampfdruck zu erniedrigen [74, 75]. Das erste Massenspektrum einer freien Aminosäure konnte 1962 mittels *Elektronenstoßionisation* (EI) aufgezeichnet werden [76]. Die ersten Massenspektren von Tryptophan und anderen natürlichen Aminosäuren gelangten 1963 [77]. Mittels *chemischer Ionisation* (CI) konnten 1970 erstmals die Massenspektren von protonierten Aminosäuren gemessen werden [78]. Erst gegen Ende der 90er Jahre begann die systematische Untersuchung von Aminosäuren mittels ESI-MS [79, 80].

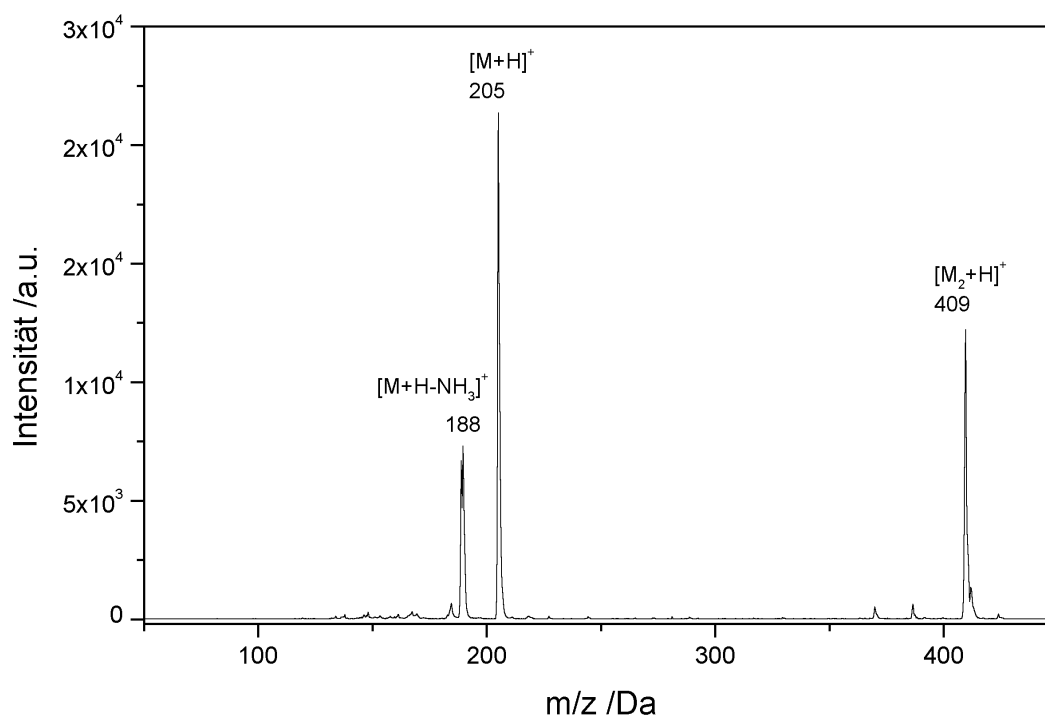


Abbildung 3.3: ESI-MS von Tryptophan. Die drei intensivsten Peaks stammen vom Mutterion  $[Trp + H]^+$ , dem protonierten Dimer  $[M_2 + H]^+$ , und einem Fragment bei  $[M + H - 17]^+$ .

In Abb. 3.3 ist ein typisches ESI-MS von Tryptophan gezeigt. Das Spektrum enthält drei Signale, die vom Tryptophan stammen. Das intensivste Signal stammt vom protonierten Tryptophan  $[Trp + H]^+$  mit  $m/z = 205$  Da. Neben dem Monomer ist auch das einfach protonierte Dimer  $[M_2 + H]^+$  mit  $m/z = 409$  Da als zweitintensivster Peak zu sehen. Das drittintensivste Signal bei  $m/z = 188$  Da ist ein Fragment des protonierten Monomers



(s. Kap. 3.1.5), das durch den Verlust von  $NH_3$  entsteht.

Der hohe Anteil von Dimeren im Massenspektrum lässt also darauf schließen, dass während der Ionisation hauptsächlich das Dimer entsteht. Tryptophan ist nicht flüchtig. Nach dem Transfer ins Vakuum sind nicht mehr genug Neutralteilchen im Restgas enthalten, um eine Entstehung nach der Ionisation zu erklären. Insbesondere kann folglich das protonierte Monomer nicht in der Falle ein neutrales Tryptophan anlagern und so ein Dimer bilden. Die häufigsten und energiereichsten Stöße erfährt das Ion direkt nach dem Transfer durch die Glaskapillare (s. Abb. 2.2, S. 28).

### 3.1.4 Auswirkungen von Stößen auf die Ionen im Einlassbereich

Bereits beim Transfer der Ionen in die Paul-Falle kommt es zu Fragmentierungen (s. Kap. 3.1.3). Wie man in Abb. 3.4 sieht, kann der Grad der Fragmentierung durch die Beschleunigungsspannungen während des Transports in die Falle manipuliert werden. Je nach Stabilität des Ions ist die Fragmentierung nicht immer vermeidbar. Sie kann, wie beim Tryptophan, aber auch erwünscht sein, um das während der Ionisation entstandene Dimer zu dissoziieren. Gleichzeitig ist die Beschleunigungsspannung ein relatives Maß für die Stabilität des Ions. Je höher die Spannung am ersten Skimmer, desto höher ist die Beschleunigung der Ionen. Je größer die Beschleunigung desto größer ist die maximale kinetische Energie der Ionen bei einem Stoß mit Neutralteilchen bei konstantem Druck. Die angegebene Skimmerspannung ist lediglich ein relatives Maß für die Stabilität der Verbindung.

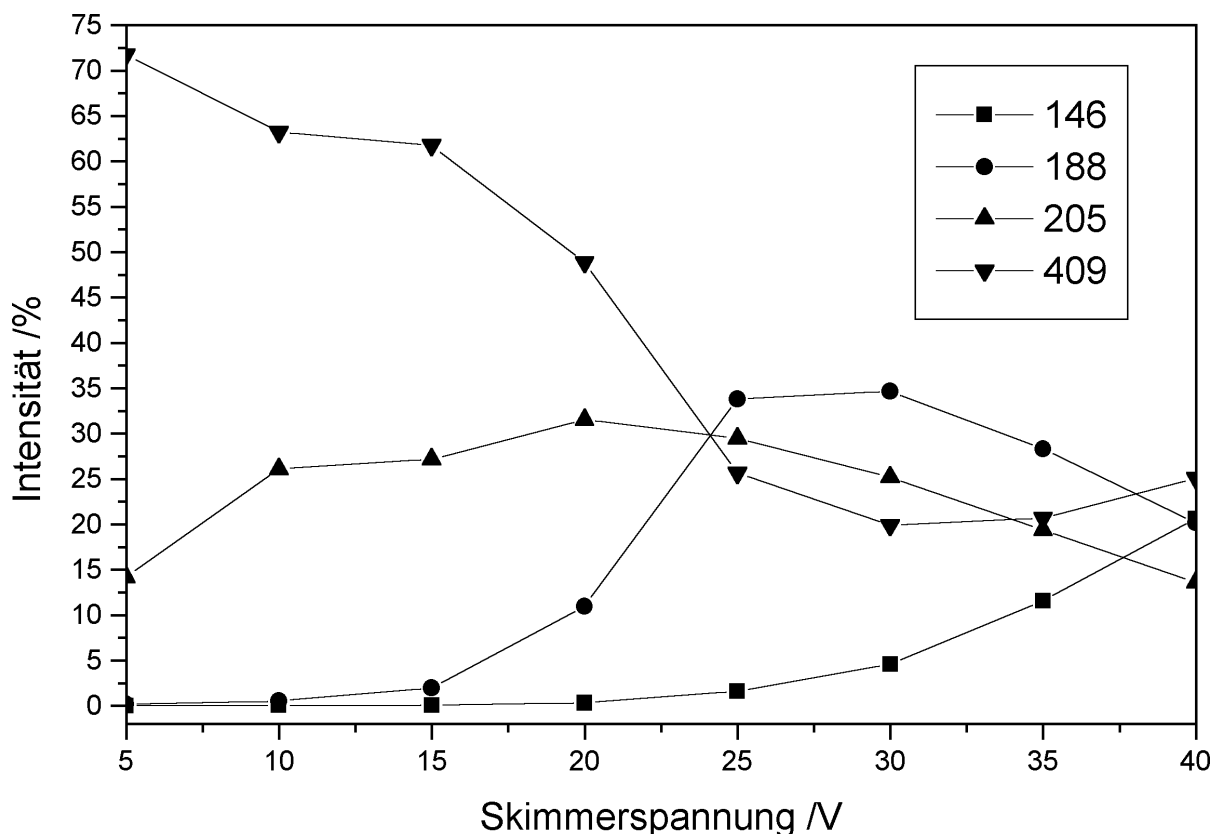


Abbildung 3.4: Abhängigkeit der verschiedenen Massen im Massenspektrum des Trp von den Beschleunigungsspannungen an den Skimmern (s. Abb. 2.2). Die Intensität der Peaks ist jeweils genormt auf das Gesamtsignal. Je höher die Beschleunigungsspannung, desto größer wird der Anteil an Fragmenten im Massenspektrum.

Die Stöße erfolgen im Wesentlichen mit Stickstoff. Dennoch führt die Fragmentierung zwischen den Skimmern zu den gleichen Fragmenten, wie die stufenweise Fragmentierung

in der Falle, obwohl in der Falle mehrheitlich Helium als Stoßpartner dient. Die Stöße während des Transports in die Falle haben, aufgrund der höheren Masse des Stickstoffs, eine größere Stoßenergie als die mit Helium, wie sie später in der Falle stattfinden [81]. Die angelegten Beschleunigungsspannungen reichen theoretisch aus, damit ein Stoß für die Fragmentierung reicht.

Bei einer geringen Skimmerspannung von nur 5 V macht das protonierte Dimer 75 % des gesamten Ionensignals aus. Das Monomer ist mit 15 % vertreten. Die Fragmente bei 188 Da und 146 Da sind noch nicht vorhanden. Erhöht man die Spannung am Skimmer und somit die Stoßenergie, so nimmt zunächst der Anteil an Monomer zu, während der Anteil des Dimers sinkt. Dies spricht dafür, dass während der Elektrosprayionisation überwiegend das Dimer gebildet wird und dass das Monomer erst anschließend durch Dissoziation des Dimers entsteht.

Ab einer Spannung von 15 V steigt die Intensität des Fragments  $m/z = 188$  Da stark an, während die Intensität des Dimers stark abnimmt. Im Gegensatz zu dem nur elektrostatisch gebundenen Dimer, müssen bei der Bildung des Fragments  $m/z = 188$  Da chemische Bindungen gebrochen werden. Entsprechend ist eine höhere Energie nötig und die Bildung dieses Fragments setzt bei höheren Skimmerspannungen ein, als die Bildung des Monomers.

Ab einer Spannung von 25 V steigt die Intensität des Fragments  $m/z = 146$  Da. Die Bildung dieses Fragments erfordert noch mehr Energie, als die der anderen Fragmente. Durch das Erhöhen der Skimmerspannungen kann man die relative Stabilität von Fragmenten festlegen. Mit zunehmenden Stoßenergien werden mehr und kleinere Fragmente gebildet, da mit zunehmender Stoßenergie auch energetisch höher liegende Fragmentierungskanäle erreicht werden können.

Die Bildung des Fragments  $m/z = 188$  Da zeigt aber auch, dass das Molekül, während des Transfers in die Falle, sehr viel Innere Energie aufnehmen kann. Da Umlagerungen wie Tautomerisierungen oder der H/D-Austausch energetisch unterhalb der Dissoziationschwelle liegen, muss das Ion, das sich in der Falle befindet, nicht mehr mit dem identisch sein, das während der Elektrosprayionisation gebildet wird. Demnach kann man nicht mehr unterscheiden, ob der H/D-Positionstausch der in Abb. 3.7b) zu sehen ist, während der Dissoziation in der Falle passiert ist, oder schon vorher, während des Transfers ins Vakuum.

Bei der Fragmentierung im Skimmerbereich ist es auch nicht ersichtlich, ob das Fragment  $m/z = 146$  Da aus dem Fragment  $m/z = 188$  Da gebildet wird, oder ob die Energie des Stoßes ausreicht, einen anderen Fragmentierungspfad anzusprechen. Dies kann man erst durch eine sequenzielle Fragmentierung in der Falle geklärt werden.

### 3.1.5 Kollisionsinduzierte Fragmentierung von Tryptophan

Als Stoßpartner innerhalb der Ionenfalle dient Helium. Aufgrund seiner geringen Masse sind mehrere Stöße mit dem Ion erforderlich, bevor es zur Fragmentierung kommen kann. Das Ion wird dadurch langsam aufgeheizt und die Energie gleichmäßig im Molekül verteilt. Entsprechend erfolgt die Fragmentierung statistisch. Dadurch wird häufig nur der energetisch niedrigste Fragmentierungskanal beobachtet.

Die Fragmentierung der Aminosäuren folgt zwei verschiedenen Mechanismen. Die Mehrheit der Aminosäuren spalten in aufeinander folgenden Schritten die Carboxylgruppe als  $CO$  und  $H_2O$  ab. Dabei entsteht das Immoniumion  $[RHC = NH_2]^+$  [78, 79, 80, 82]. Aminosäuren mit Heteroatomen in der Seitenkette können alternativ  $NH_3$  abspalten. In diesen Fällen können häufig beide Fragmentierungskanäle beobachtet werden. Welchem Fragmentierungspfad die Aminosäure folgt, hängt von der Seitengruppe ab.

Wie man in Abb. 3.5 sehen kann, findet beim Tryptophan zu 100% ein Verlust von  $m/z = 17 Da$  statt. Die Aktivierungsenergie für diesen Schritt liegt unterhalb von  $2,5 eV$  [45]. Um zu unterscheiden, ob es sich bei dem neutralen Fragment um  $OH^\bullet$  oder  $NH_3$  handelt, wird das Tryptophan partiell deuteriert. Löst man die Probe in  $D_2O$  statt in  $H_2O$  so werden, wie man in Abb. 3.7a) sehen kann, fünf Wasserstoffatome ausgetauscht, alle Wasserstoffatome sowohl am Amino- als auch am Indolstickstoff, sowie das Proton der Carboxylgruppe [53].

Fragmentiert man die Masse  $m/z = 210 Da$ , so erhält man drei Fragmente mit den Massen 190, 191 und 192  $Da$ . Dies entspricht der Abspaltung der neutralen Fragmente  $ND_3$ ,  $NHD_2$  und  $NH_2D$ . Dadurch ist bewiesen, dass es sich bei dem Verlust von  $m/z = 17 Da$  in Abb. 3.5 nicht um den Verlust von  $OH^\bullet$  handeln kann. Dieser hätte lediglich zu zwei Peaks bei  $m/z = 193 Da$  ( $[M+H-OH]^{+\bullet}$ ) und bei  $m/z = 192 Da$  ( $[M+H-OD]^{+\bullet}$ ) geführt.

Bei dem Mutterion sind alle Wasserstoffatome an den Heteroatomen durch Deuteriumatome ersetzt worden. Bei der Fragmentierung entstehen aber auch Fragmente, die wieder Wasserstoffatome am Stickstoff enthalten. Daraus ist ersichtlich, dass die Energie für die Dissoziation des Moleküls oberhalb der Energie für einen intramolekularen  $H/D$ -Austausch liegt. Aus sterischen Gründen findet nur ein Austausch mit den Protonen in 2- und 4-Position statt [53]. Dies erklärt, dass der Verlust von  $NH_3$ , also völlig ohne D-Substitution, in Abb.3.7b) nicht zu finden ist.

Der Verlust von Ammoniak wird vermutlich von einem intramolekularen Angriff vom aromatischen Ring am  $C-\alpha$  Atom ausgelöst [82]. In Abb. 3.6 sind verschiedene Vorschläge für mögliche Strukturen des Fragments  $m/z = 188 Da$  gezeigt. Struktur **1** erhält man durch einen nukleophilen Angriff von  $C-2$  an  $C-\alpha$  mit anschließender Ringerweiterung

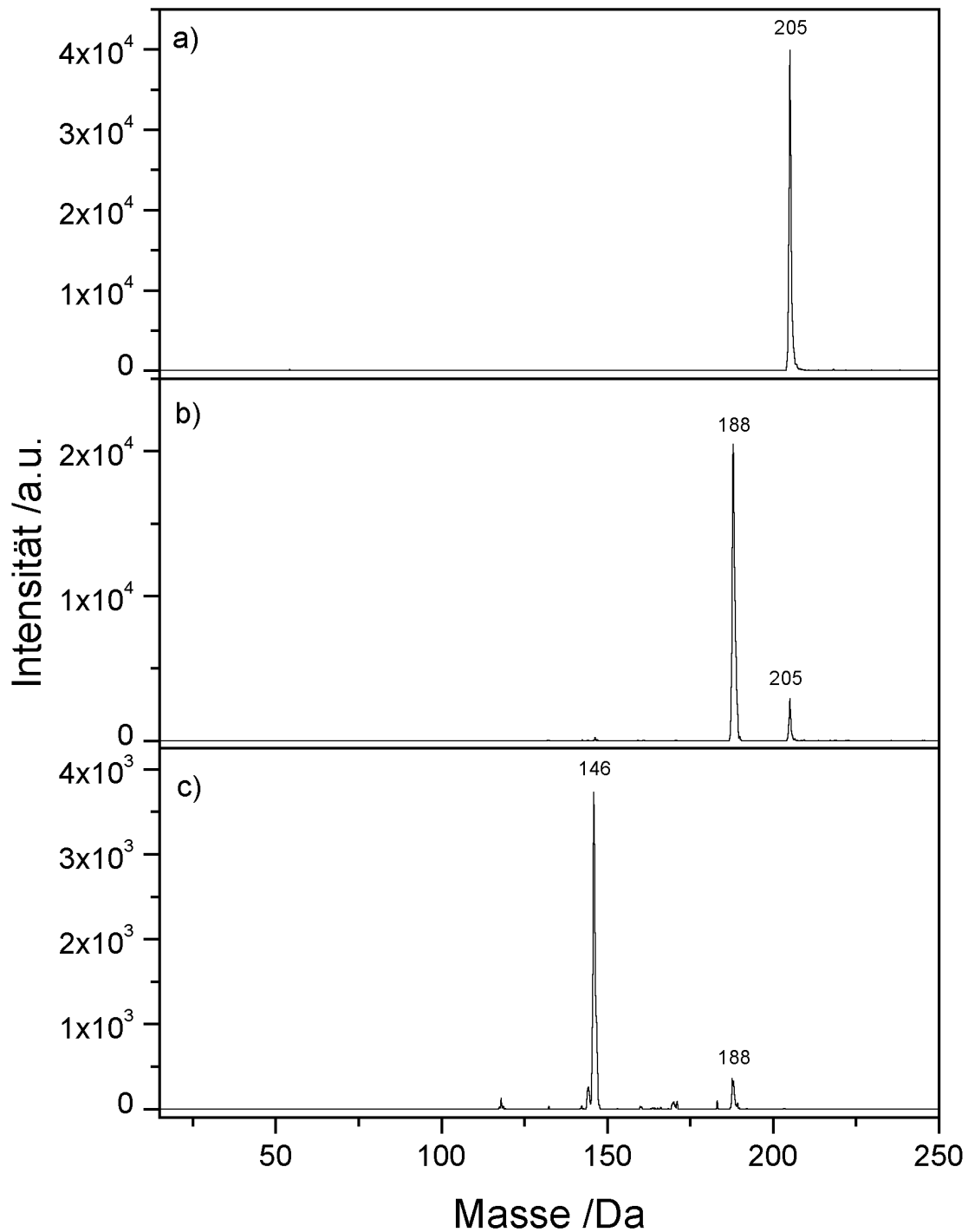


Abbildung 3.5: a) Massenspektrum von Tryptophan. b) Das Mutterion  $[TrpH]^+$  fragmentiert bei CID vollständig zu  $m/z = 188$  Da. c) Eine anschließende CID führt im  $MS^3$  Schritt zu einem Fragment mit  $m/z = 146$  Da.

[83]. Analog dazu erhält man Struktur **2** wenn der Angriff ans  $C-\alpha$  Atom von  $C-4$  aus erfolgt [80] und Struktur **3** wenn der Angriff von  $C-3$  ausgeht [53]. Experimentelle Daten über die Struktur des Fragments  $m/z = 188$  Da stehen allerdings aus.

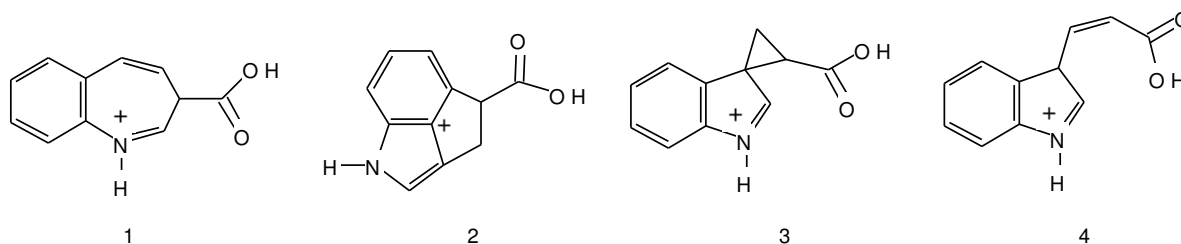


Abbildung 3.6: Mögliche Strukturen für das Fragment  $m/z = 188$  Da. Sie entstehen durch einen intramolekularen, nukleophilen Angriff an das  $C-\alpha$  Atom von verschiedenen Stellen des aromatischen Rings aus [83, 80, 53].

Theoretisch ist auch Struktur **4** möglich, diese wurde aber bisher in der Literatur nicht diskutiert. Da die Innere Energie der Ionen während der Fragmentierung auch für Umlagerungen ausreicht, ist es denkbar, dass sich diese Struktur bildet. Sie vermeidet sterische Spannungen und das aromatische System bleibt weitgehend ungestört. Theoretisch ließe sich die Struktur des Fragments durch UV-Anregung aufklären.

Wie in Abb. 3.5c) zu sehen ist, lässt sich ein zweiter Tandem-MS Schritt anschließen, in dem das Fragment  $m/z = 188$  Da weiter fragmentiert wird. Im ersten Fragmentierungsschritt können die Hälfte der Mutterionen in das Fragmentation überführt werden. Die Effizienz der zweiten Fragmentierung ist deutlich geringer. Nur 1/5 der Ionen können danach noch nachgewiesen werden. Dementsprechend ist das Signal/Rausch-Verhältnis deutlich schlechter. Hierbei entsteht fast ausschließlich ein Fragment mit  $m/z = 146$  Da.

Diese Masse lässt sich bei keiner der Strukturen in Abb. 3.5 durch einen einfachen Bindungsbruch erreichen. Ermittelt man systematisch alle möglichen Summenformeln, in denen man aus den Elementen  $C$ ,  $H$ ,  $N$  und  $O$  die Masse 146 bildet, so ergeben sich 292 mögliche Summenformeln für die Masse 146 Da. Beschränkt man die maximale Anzahl Atome eines Elements auf die Anzahl im Mutterion  $[TrpH]^+$ , so reduzieren sich die Möglichkeiten auf die in Tabelle 3.1 angegebenen Summenformeln.

1: $C_9H_8NO$	2: $C_8H_6N_2O$	3: $C_8H_4NO_2$
4: $C_7H_2N_2O_2$	5: $C_{10}H_{10}O$	6: $C_9H_6O_2$
7: $C_{10}H_{12}N$	8: $C_9H_{10}N_2$	9: $C_{11}N$

Tabelle 3.1: Alle möglichen Summenformeln für das Fragment  $m/z = 146$  Da. Unter der Voraussetzung, dass die Anzahl der Atome pro Element durch die Summenformel  $C_{11}H_{13}N_2O_2$  des protonierten Tryptophans begrenzt ist, ergeben sich neun mögliche Summenformeln.

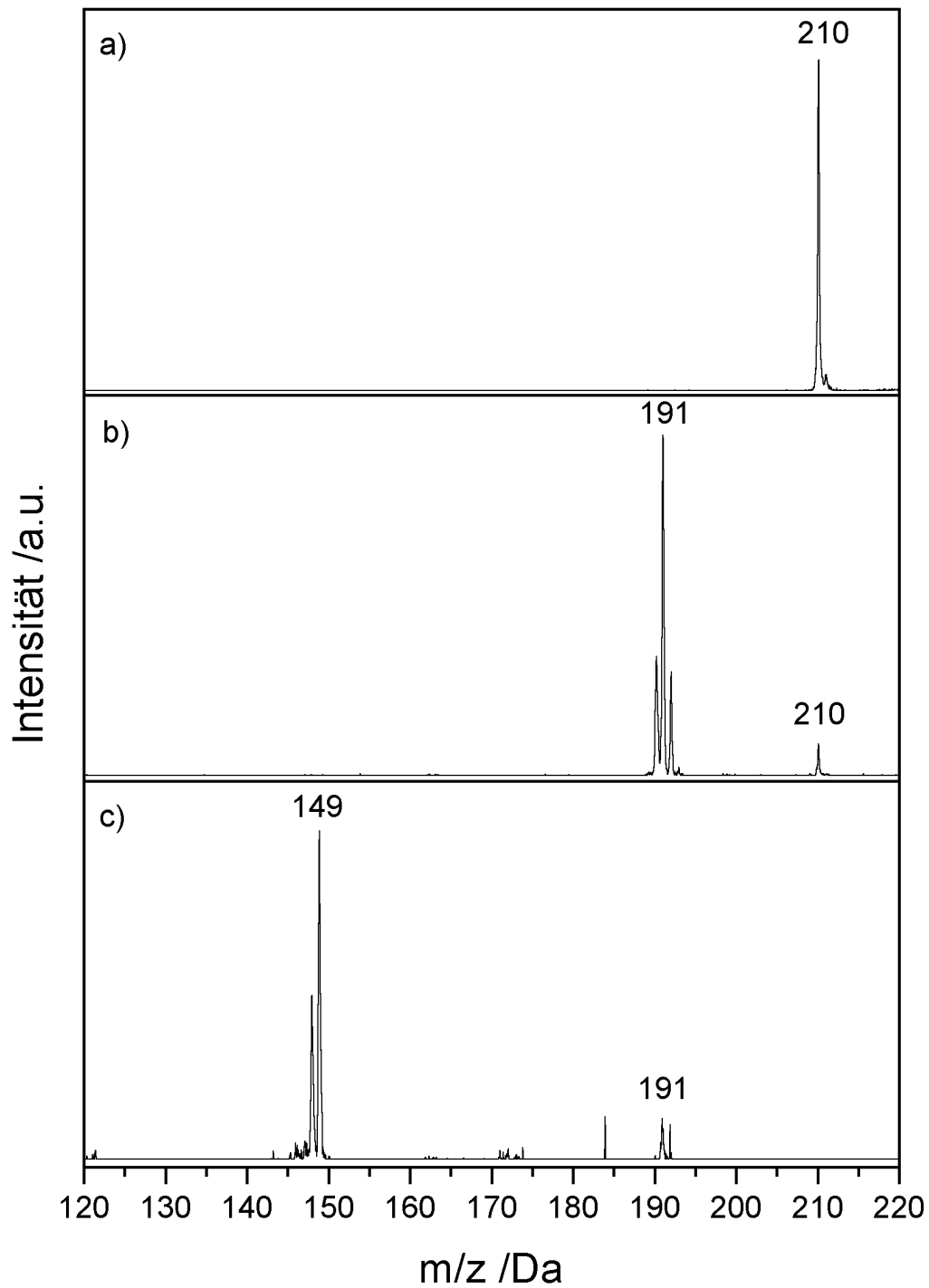


Abbildung 3.7: Tandem Massenspektren des deuterierten Tryptophans. a) ESI-MS von Tryptophan in  $D_2O$ . Es werden 5 Wasserstoffatome ausgetauscht. b) Isolierung der Masse  $m/z = 210$  Da mit anschließender CI-Dissoziation. c) Isolation und CID der Masse  $m/z = 191$  Da. Die Masse 149 Da enthält noch drei Deuteriumatome.

Unter der Voraussetzung, dass die Masse 146 *Da* aus dem Fragment  $[Trp + H - NH_3]^+$  entsteht, können alle Summenformeln aus Tabelle 3.1 ausgeschlossen werden, in denen mehr als 10 Wasserstoffatome oder mehr als ein Stickstoffatom enthalten sind. Dies sind die Summenformeln **2**, **4**, **7** und **8**. Im deuterierten Tryptophan hat das Fragment aus dem  $MS^3$ -Schritt (Abb. 3.7c) die Masse  $m/z = 149$  *Da*. Das Fragment enthält demnach drei Deuteriumatome. Da die Summenformel **9** kein Wasserstoff mehr enthält, kann sie ausgeschlossen werden. Die Summenformeln **5** und **6** können mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, da die Fragmente Radikale wären und somit die Dissoziationsenergie groß ist.

Bei Summenformel **3** würde sich dem Verlust von *Ammoniak* der Verlust von *Propen*  $C_3H_6$  anschließen. Die auf dem geladenen Fragment verbleibenden vier Wasserstoffatome reichen nicht aus, um stabile Strukturen zu generieren. Für die Bildung von *Propen* müssten mehrere Protonen innerhalb des Ions verschoben werden. Dementsprechend würde man für das Neutralfragment große Anteile an  $C_3DH_5$ ,  $C_3D_2H_4$  und  $C_3D_3H_3$  erwarten. In Abb. 3.8 kann man sehen, dass kein nennenswerter intramolekularer H/D-Austausch mehr stattfindet. Der Verlust von *Propen* und damit die Summenformel **3** kann somit als unwahrscheinlich ausgeschlossen werden.

Bei Summenformel **1** würde das Fragment  $m/z = 146$  *Da* durch den Verlust von *Keten*  $C_2H_2O$  gebildet werden. Dieses Fragment kann auch nicht durch einen einfachen Bindungsbruch erreicht werden. Zur Bildung der Keto-Gruppe ist eine Umlagerung nötig, bei der die *OH*-Gruppe der Säurefunktion vom Carbonylkohlenstoff zum Ion wandern muss. In Abb. 3.8 ist ersichtlich, dass die Fragmente 192,191 und 190 *Da* aus Abb. 3.7 fast ohne H/D-Austausch zu 150, 149 und 148 *Da* fragmentieren. Aus der sehr geringen Intensität der  $[M - 43]^+$ -Signale in Abb. 3.8 kann man schließen, dass die *OH*-Gruppe vollständig wandert, das Säureproton also nicht auf dem Neutralfragment verbleibt. In Abb. 3.8a) befinden sich von den ursprünglich fünf Deuteriumatomen noch vier im Ion. Diese befinden sich wahrscheinlich an *C*-4, *C*-2, *N*-1 und an der Säuregruppe. Wahrscheinlich ist daher, dass ein Proton von *C*- $\beta$  zu *C*- $\alpha$  wandert.

Die Abspaltung von *Keten* ist demnach die wahrscheinlichste Ursache für das Fragment  $m/z = 146$  *Da*. Die Abspaltung einer  $C_2$ -Kette ist ein Indiz dafür, dass die Struktur des Precursors  $m/z = 188$  *Da* eher der Struktur **3** ähnelt. Bei den Strukturen **1** oder **2** erfordert die Abspaltung von *Keten* eine Ringöffnung. Dabei sind mehr Bindungsbrüche als bei Struktur **3** nötig.



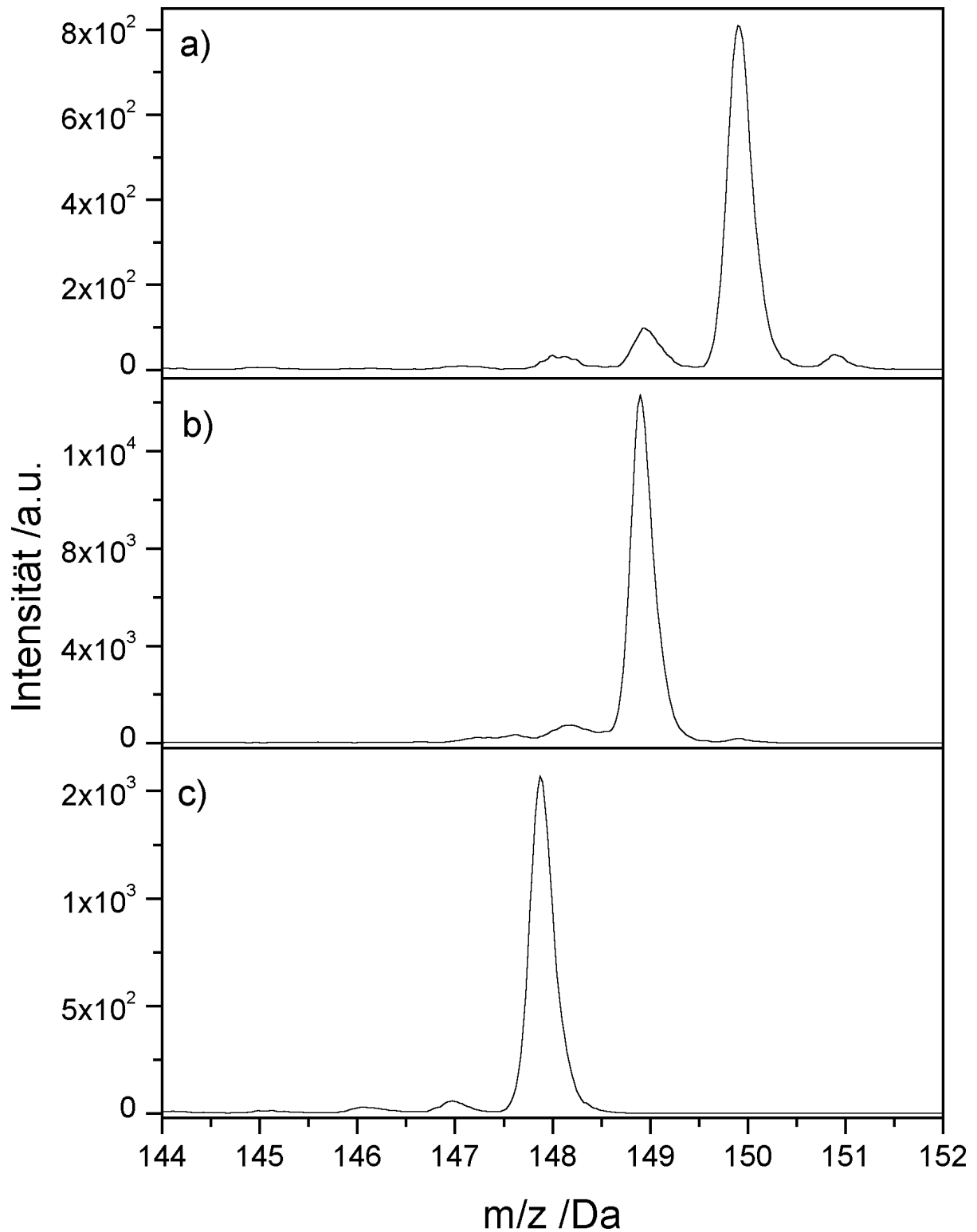


Abbildung 3.8: CID-Massenspektren von  $m/z = 192$  Da,  $m/z = 191$  Da und  $m/z = 190$  Da. Durch den Verlust von  $ND_3$ ,  $ND_2H$  und  $NDH_2$  entstehen im ersten MS/MS-Schritt aus dem deuterierten Tryptophan die Massen 190, 191 und 192. Diese verlieren jeweils ein Neutralfragment der Masse 42. a) Aus der Masse 192 entsteht ein Fragment der Masse 150. b) Die Masse 191 bildet ein Fragment der Masse 149 und c) aus 190 entsteht 148. Ein nennenswerter H/D-Austausch findet nicht statt.

### 3.1.6 Einfluss der Temperatur auf das Massenspektrum

Die Temperatur der Ionenfalle beeinflusst maßgeblich die Massenspektren. Vergleicht man das Massenspektrum bei Raumtemperatur (Abb. 3.9a)) mit dem bei gekühlter Falle (Abb. 3.9b)), so ergeben sich zwei deutliche Unterschiede. Bei gekühlter Falle ist der Anteil an Fragmenten deutlich kleiner. Der Ammoniakverlust  $m/z = 188$  Da ist z.B. deutlich geringer als bei Raumtemperatur. Im Vergleich zur Raumtemperatur ist nicht das protonierte Monomer  $m/z = 205$  Da der intensivste Peak sondern das protongebundene Dimer  $m/z = 409$  Da.

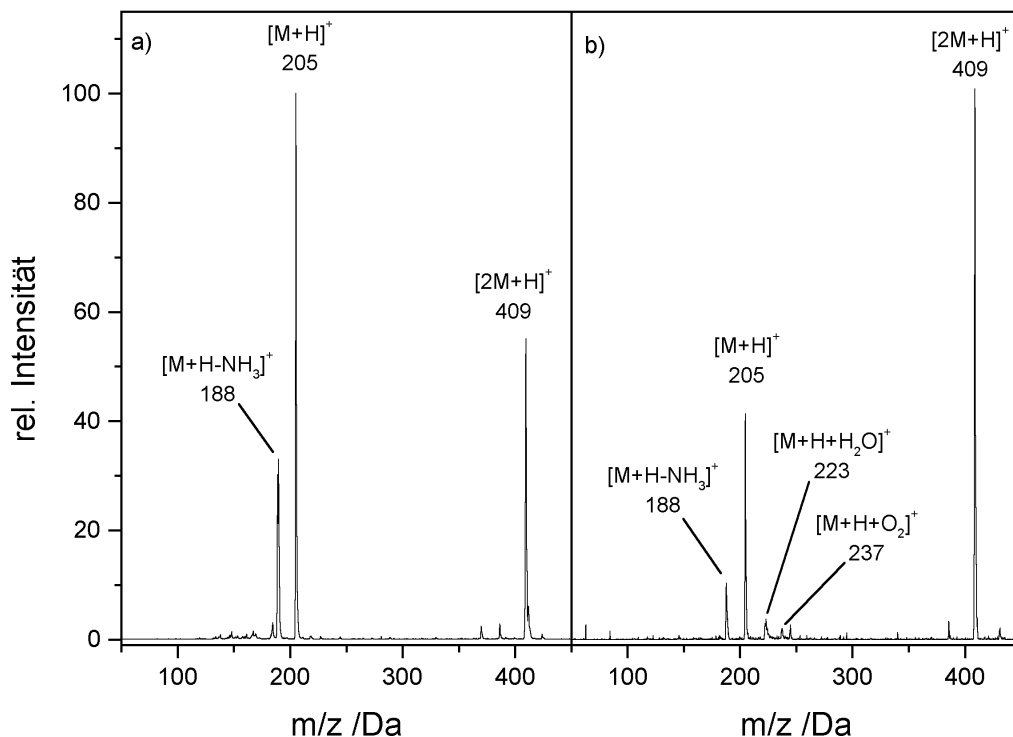


Abbildung 3.9: Unterschied zwischen gekühlter und ungekühlter Falle. a) Massenspektrum bei Raumtemperatur, b) Massenspektrum mit gekühlter Falle. Bei gekühlter Falle ergibt sich eine geringere Fragmentierung. Gleichzeitig kann die Bildung von *Wasserstoffbrücken gebundenen Clustern* beobachtet werden.

Der zweite große Unterschied ist die Bildung von *Wasserstoffbrücken gebundenen Clustern*. In Abb. 3.9b) kann man drei *Cluster* erkennen:

- i) das Wasseraddukt  $[M + H + H_2O]^+$  mit  $m/z = 223$  Da
- ii) das Sauerstoffaddukt  $[M + H + O_2]^+$  mit  $m/z = 237$  Da
- iii) das Acetonitriladdukt  $[M + H + CH_3CN]^+$  mit  $m/z = 246$  Da

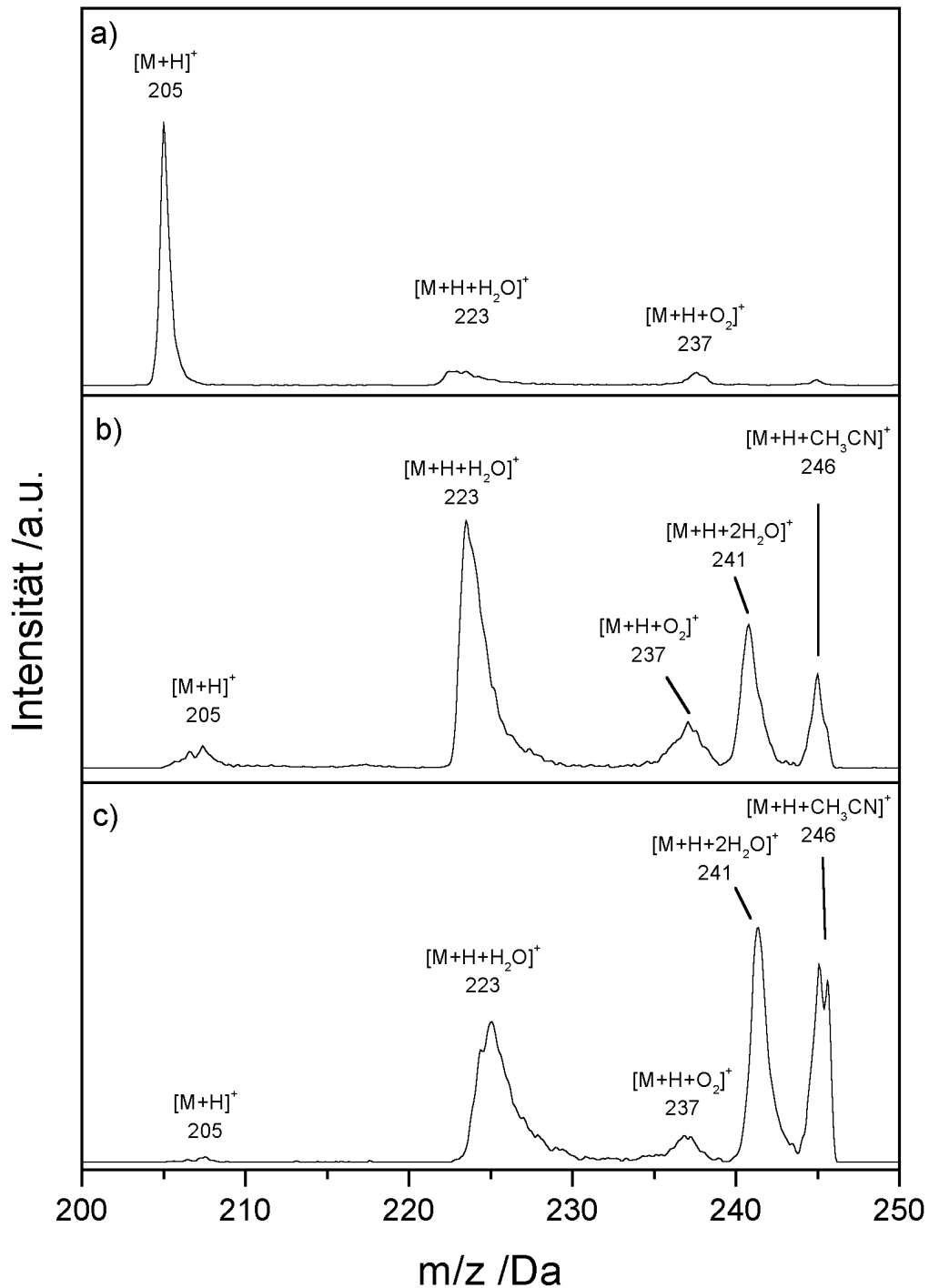


Abbildung 3.10: Massenspektren bei gekühlter Ionenfalle und unterschiedlichen Verweildauern nach der Massenisolierung. A) 0 ms, b) 200 ms und c) 500 ms Wartezeit zwischen Massenisolierung und Massenanalyse. Da das Mutterion jeweils vorher isoliert wurde, kann die Bildung von Addukten nur innerhalb der Falle stattgefunden haben.

Aus Abbildung 3.9 ist nicht ersichtlich, wann die Cluster gebildet werden. Möglich ist die Bildung während des Transfers in die Ionenfalle oder während der Akkumulation in der Falle. Auf dem gleichen Weg wie die Ionen können auch Neutralteilchen in die Falle gelangen und dort Cluster bilden. Isoliert man das Mutterion vor der Massenanalyse, so müssen alle danach im Massenspektrum nachweisbaren Cluster erst in der Falle gebildet worden sein. In Abb. 3.10 wurde das Mutterion isoliert und die Massenanalyse wurde verzögert. Je länger die Zeitverzögerung ist, desto mehr Cluster werden gebildet. Dies beweist, dass die Cluster in der Falle gebildet werden. Dass selbst ohne Verzögerung Cluster beobachtet werden, ist ein Artefakt der Messung: Das Massenspektrometer benötigt einige Millisekunden um nach der Isolation die Massenanalyse zu starten. Diese kurze Zeit reicht aus, um Cluster in geringen Mengen zu erzeugen.

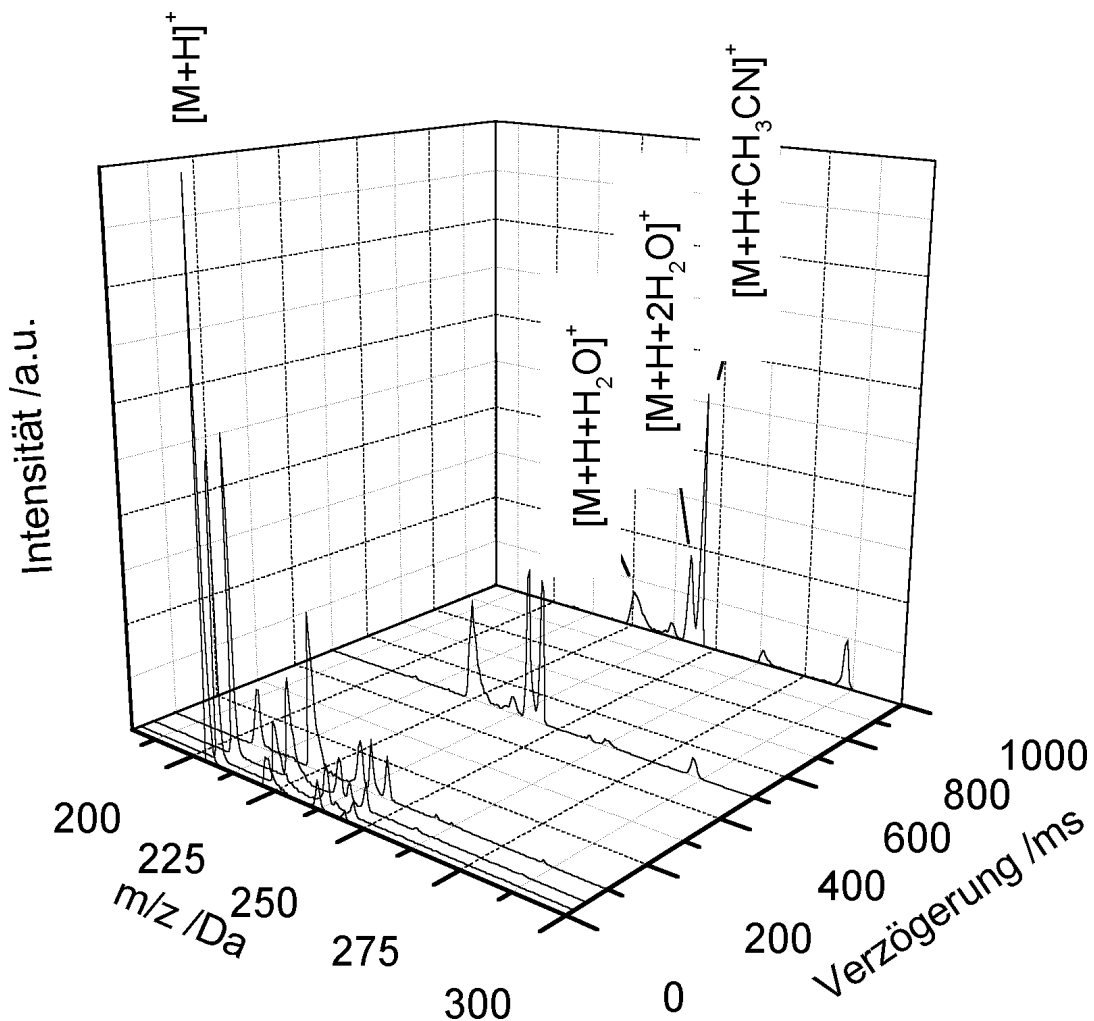


Abbildung 3.11: Zeitabhängigkeit der “pick-up” Clusterbildung in der Paul-Falle. Nach der Isolation des Mutterions wurde der Beginn der Massenanalyse verzögert. Innerhalb der ersten 200 *ms* ist das Mutterion verschwunden. Entsprechend nehmen die Peaks der Cluster an Intensität zu.

Das Mutterion verschwindet innerhalb der ersten 200 *ms* fast vollständig. Im gleichen

Maße nimmt die Intensität der Cluster zu. Es bildet sich vorrangig das Wasseraddukt bei  $m/z = 223$  Da. In geringerem Maße sind Stickstoff- und Sauerstoffcluster vorhanden. Ab einer Verzögerung von 20 ms ist bei  $m/z = 241$  Da das Addukt  $[Trp + H + 2H_2O]^+$  zu erkennen. Die Intensität des Wasserclusters  $[Trp + H + H_2O]^+$  nimmt nach zweihundert Millisekunden wieder ab. Dieser Wassercluster lagert ein zweites Wassermolekül an und bildet  $[Trp + H + 2H_2O]^+$ . Im gleichen Maße wie die Masse  $m/z = 223$  Da abnimmt, nimmt das Signal bei  $m/z = 241$  Da zu.

Masse /Da	Adduktion
205	$[Trp + H]^+$
223	$[Trp + H + H_2O]^+$
233	$[Trp + H + N_2]^+$
237	$[Trp + H + O_2]^+$
241	$[Trp + H + 2H_2O]^+$
246	$[Trp + H + CH_3CN]^+$
264	$[Trp + H + CH_3CN + H_2O]^+$
287	$[Trp + H + 2CH_3CN]^+$

Tabelle 3.2: Liste der beobachtbaren Cluster im Massenspektrum von Tryptophan.

Die Peakbreiten in Abb. 3.10 liegen deutlich über den sonst gemessenen Peakbreiten bei Raumtemperatur. Es ist denkbar, dass dies die Folge von Dissoziationen während der Massenanalyse ist [84]. Zum Nachweis werden die Ionen beschleunigt. Dadurch kommt es zu höher energetischen Stößen mit Helium, die bei den nur schwach gebundenen Clustern zur Dissoziation während der Massenanalyse führen können. Dies kann aber nicht den extrem breiten Peak des Wasserclusters erklären. Eine Möglichkeit wäre, dass es sich dabei um kurz vorher gebildete schwerere Cluster (z.B.  $[M + 2H_2O]^+$ ) handelt, die nun teilweise wieder zerfallen.

Das für die Elektrosprayionisation verwendete Lösungsmittel enthält neben Wasser auch Acetonitril. Dieses bildet ebenfalls Cluster. Die Geschwindigkeitskonstante ist allerdings geringer als die von Wasser. Entsprechend kann das Adduktion  $[Trp + H + CH_3CN]^+$  mit einer Masse von  $m/z = 246$  Da im Spektrum beobachtet werden. Die Intensität ist deutlich kleiner als die der Wasserpeaks. Der Einfluss der Restgaszusammensetzung wird am Ende dieses Abschnitts erörtert.

Bei längeren Verzögerungszeiten treten weitere Massen im Spektrum auf. Diese entstehen, wenn sich weitere Wasser- oder Acetonitrilmoleküle an bereits gebildete Cluster anlagern. Dabei können auch gemischte Cluster beobachtet werden. Eine Liste der beobachtbaren Cluster ist in Tab. 3.2 gegeben. Gemischte Cluster mit Stickstoff oder Sauerstoff sind nicht zu beobachten. Der Cluster mit zwei Wassern wird sehr schnell gebildet. Vergleichsweise

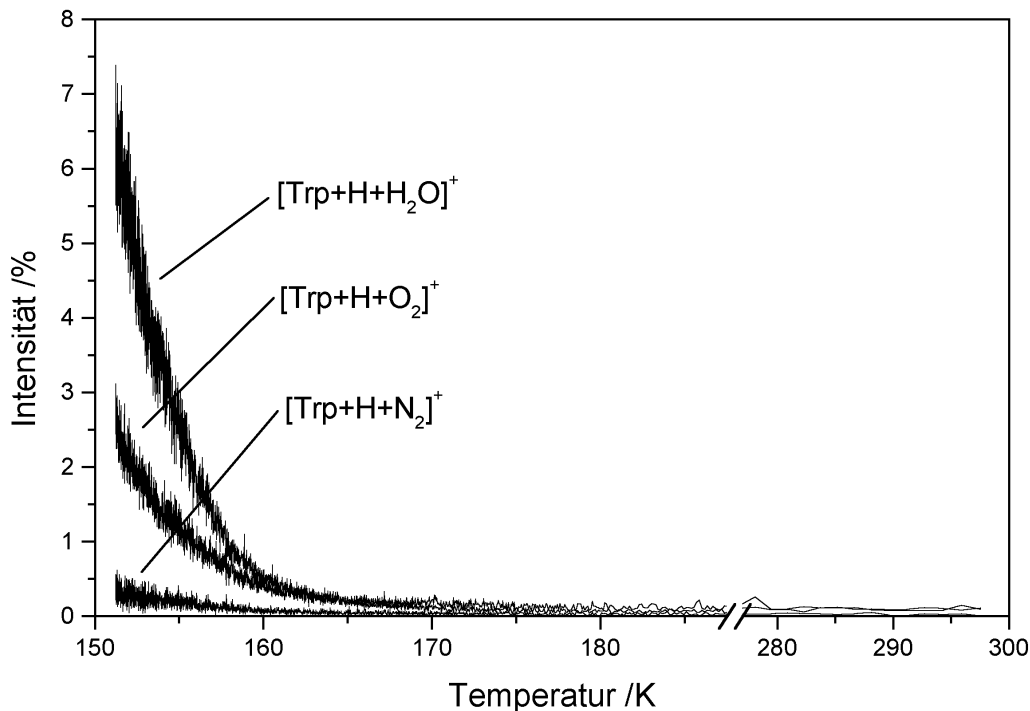


Abbildung 3.12: Temperaturabhängigkeit der verschiedenen Clusterintensitäten. Die Bildung von Clustern zeigt eine starke Temperaturabhängigkeit. Erst ab einer Falltemperatur von etwa 160 K treten sie verstärkt im Massenspektrum auf.

langsam ist die Bildung von höheren Clustern, die Acetonitril erhalten. Die Anlagerung eines zweiten Acetonitrilmoleküls bekommt erst ab Verzögerungszeiten von mehr als 200 ms einen signifikanten Anteil. Die Bildung des gemischten Cluster bei  $m/z = 264$  Da verläuft nochmal deutlich langsamer als die Bildung von  $[Trp + H + 2CH_3CN]^+$ . Eine genauere Betrachtung der Zeitabhängigkeit folgt in Kap.3.5.

Das Auftreten der Cluster bei gekühlter Falle beweist, dass die Temperatur der Außenwände Einfluss auf die Innere Energie der Ionen hat. Die Ionen treten nie in direkten Kontakt mit den Gefäßwänden. Der Energietransfer kann also nur über Strahlung oder durch Stöße mit Neutralteilchen stattfinden. Die Strahlungskühlung ist aber zu langsam. Für kleine Systeme beträgt die Rate der Kühlung durch die Emission von IR Photonen  $\approx 1 \text{ s}^{-1}$  [85]. Für Oligopeptide kann die Zeit bis zur Einstellung des thermischen Gleichgewichts im Bereich von Sekunden liegen [86]. Für einen effektiven Wärmetransfer kommen nur Stöße mit Neutralteilchen (hier meist Helium) in Frage. Zwischen den Ionen und den Gefäßwänden bildet sich somit ein thermisches Gleichgewicht.

Die Temperatur der Fallenwände sollte dementsprechend einen großen Einfluss auf die

Bildung von Clustern haben. In Abb. 3.12 kann man eine entsprechend starke Abhängigkeit sehen. Erst ab einer Temperatur unter 160 K bilden sich vermehrt Cluster. Der Wassercluster hat dabei den größten Anteil. Durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken ist die Bindungsenergie größer, als die von Stickstoff und Sauerstoff.

Die Bindungsenergie von unpolaren Neutralteilchen wie Stickstoff oder Sauerstoff an eine punktförmige Ladung beträgt einige hundert Wellenzahlen. Der Einlassbereich des Massenspektrometers wird zur Unterstützung der Ionisation mit Stickstoff gespült. Der Sauerstoffanteil im Restgas der Falle ist sehr gering (s. Abb. 2.17). Der Anteil des Sauerstoffclusters ist deutlich größer, als der Anteil des Sauerstoffs im Restgas. Der Sauerstoffcluster muss also eine größere Bildungsrate haben, als der Stickstoffcluster. Wasserstoffbrückengebundene System wie  $[Trp + H + H_2O]^+$  weisen Bindungsenergien von einigen tausend Wellenzahlen auf. Die hohen Bindungsenergien und die Tatsache, dass man keine Cluster findet deuten darauf hin, dass die Innere Energie der Ionen in der Paul-Falle unter normalen Bedingungen ( $T = 300 K$ ) sehr hoch ist.

### 3.1.7 Photofragmentierung von Tryptophan

Bestrahlt man das protonierte Tryptophan mit UV-Licht der Wellenlänge 285 nm (s.Kap. 3.1.8), so kommt es zur Photofragmentierung. Wie man in Abb. 3.13 erkennen kann, entstehen dabei mehrere Fragmente.

Masse /Da	Massendifferenz /Da	Fragment
205	-	$[M + H]^+$
204	1	$[M]^{\bullet+}$
188	17	$[M + H - NH_3]^+$
156	46	$[M + H - CO - H_2O]^+$
146	59	$[M + H - NH_3 - C_2H_2O]^+$
132	73	$[M - C_3H_4O_2]^{\bullet+}$
130	75	$[M - C_2H_4NO_2]^{\bullet+}$

Tabelle 3.3: Liste der durch Photofragmentierung entstehenden Fragmente. Neben den durch CID bekannten Fragmenten entstehen zwei weitere Fragmente.

Die Ionenfalle ist in der Lage ein Ionenensemble über einen Zeitraum von mehr als einer Sekunde örtlich zu fixieren. In dieser Zeit kann wiederholt mit dem Laser in die Falle geschossen werden. Durch wiederholtes Bestrahlen der selben Ionen kann das Mutterion fast vollständig ausgelöscht werden. In Abb. 3.13a) wurden zwei Laserschüsse in die Falle gelassen. Die Reaktionszeit des verwendeten Shutters (s. Abb. 2.1) liegt zwischen 50 und 100 ms. Da der Laser mit konstanten 20 Hz läuft, war es nicht möglich einen Einzelschuss in die Falle zu lassen.

Die Fragmente  $m/z = 188$  Da und  $m/z = 146$  Da konnten bereits in den CID-Spektren beobachtet werden (s. Abb 3.5). Es ist wahrscheinlich, dass es sich dabei um den gleichen Fragmentierungskanal, wie bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung handelt. Das Fragment  $m/z = 146$  Da entsteht nach der Abspaltung von  $NH_3$  aus dem Fragment  $m/z = 188$  Da. Die kollisionsinduzierte Fragmentierung führt dem Ion kontinuierlich Energie zu und es wird nur der jeweils niedrigste Kanal angesprochen. Die Fragmentierung zu  $m/z = 146$  Da läuft deshalb in zwei Stufen ab.

Bei der Photofragmentierung wird die gesamte Energie auf einmal in das Molekül eingebracht. Dadurch können auch höhere Fragmentierungskanäle effizient angesprochen werden und es ergeben sich mehrere Wege für die Fragmentierung.

Denkbar ist ein Einphotonen- und ein Zweiphotonenschritt (s. Abb. 3.14). Es ist außerdem möglich, dass das Ion zweimal ein Photon absorbiert. Die Bildung des Fragments  $m/z = 146$  Da erfordert mehrere Bindungsbrüche (s. Kap. 3.1.5). Die mittlere Bindungsenthalpie beträgt für eine C-C-Bindung  $348 \frac{kJ}{mol}$  ( $\equiv 3,6$  eV) und für eine C-N-Bindung



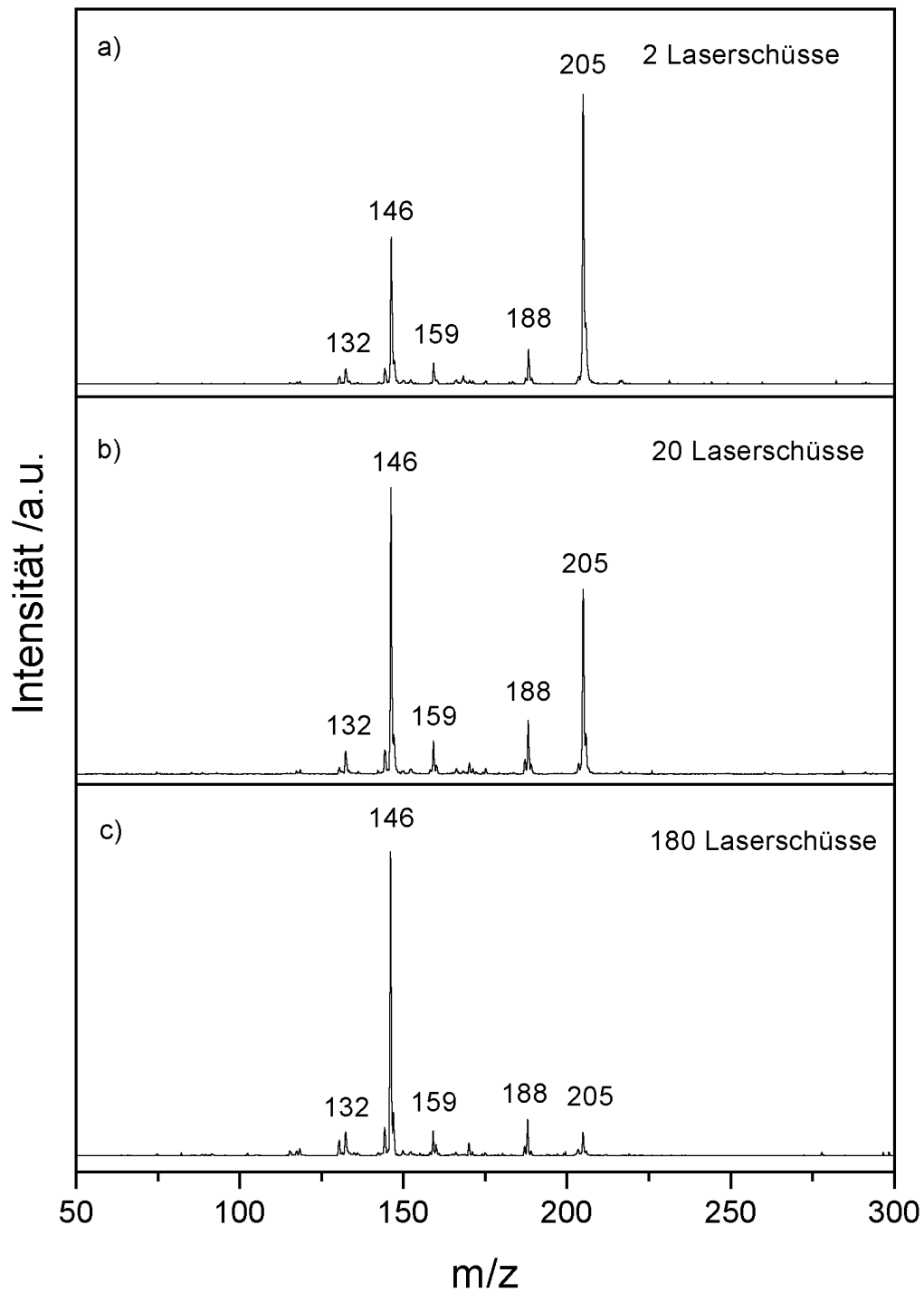


Abbildung 3.13: Photofragmentierung von Tryptophan. Das selbe Ionenensemble wurde jeweils mit mehreren Laserschüssen bestrahlt. a) 2 Laserschüsse, b) 20 Laserschüsse, c) 180 Laserschüsse. Eingestrahlt wurde mit  $1 \text{ mJ/Puls}$  bei  $\lambda = 285 \text{ nm}$ . Das Fragment  $m/z = 146 \text{ Da}$  kann nicht weiter photodissoziiert werden.

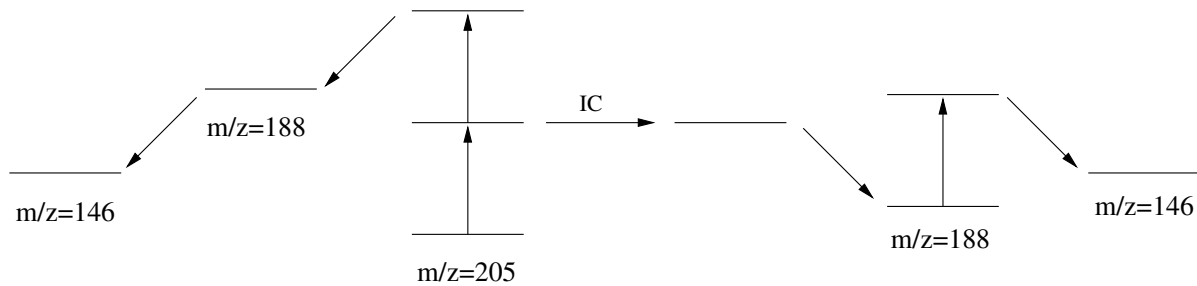


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung von verschiedenen Fragmentierungswegen für das Fragment  $m/z = 146$  Da. Denkbar ist ein Zweiphotonenschritt nachdem direkt die Fragmente  $m/z = 188$  Da und  $m/z = 146$  Da gebildet werden. Alternativ ist ein sequentieller Weg möglich, der aus zwei Einphotonenschritten besteht.

$292 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} (\equiv 3,0 \text{ eV})$  [44]. Die Energie eines Photons bei der Wellenlänge  $\lambda = 285 \text{ nm}$  beträgt  $E = 4,35 \text{ eV}$ . Es kann also nicht genug Energie für mehrere Bindungsbrüche und Umlagerungen liefern. Dies macht es wahrscheinlich, dass das Fragment  $m/z = 146$  Da durch die Absorption von zwei Photonen entsteht. Man kann allerdings nicht unterscheiden, ob das Fragment direkt aus einem Zweiphotonenschritt entsteht oder ob nach der Absorption eines Photons das Fragment  $m/z = 188$  Da gebildet wird, das nach der Absorption eines weiteren Photons weiter fragmentiert.

Da die Ionen mit zwei Laserschüssen bestrahlt worden sind, ist es möglich, dass Ionen bei jedem Schuss jeweils ein Photon absorbiert haben. Zwischen den Laserschüssen liegen  $50 \text{ ms}$ . In dieser Zeit erleidet das Ion so viele Stöße mit Helium, dass sich wieder ein thermisches Gleichgewicht eingestellt hat. Die mittlere Lebensdauer bis zur Fragmentierung beträgt  $10 - 20 \mu\text{s}$  [87]. Sollte das Ion beim ersten Laserschuss genügend Energie aufgenommen haben um zu fragmentieren, dann wird es das auch bis zum nächsten Laserschuss getan haben. Dass zwei Laserschüsse in die Falle gelangten hat damit keinen qualitativen Einfluss auf das Fragmentierungsmuster.

Der Zweiphotonenschritt im protonierten Molekül unterscheidet sich grundlegend von dem im Neutralen. Im neutralen Tryptophan führt die resonante Zweiphotonenabsorption zur Bildung des Radikalkations. Dies ist im protonierten Tryptophan nicht möglich. Da bereits eine positive Ladung vorhanden ist, liegt die Energie für die Bildung des zweifach geladenen Ions  $[\text{Trp}+H]^{2+}$  oberhalb der Energie von  $2h\nu = 8,7 \text{ eV}$ . Entsprechend konnte diese Spezies auch nicht nachgewiesen werden. Die Energie bleibt im Ion und kann dort zu Fragmentierungen führen.

Erhöht man die Anzahl der Laserschüsse (Abb. 3.13b) und 3.13c)) so treten keine weiteren Fragmente auf. Allerdings ist es möglich, das Mutterion vollständig zu fragmentieren. Fast die gesamte Intensität sammelt sich im Fragment  $m/z = 146$  Da. Offensichtlich absorbiert die Masse  $146$  Da nicht bei  $285 \text{ nm}$ . Das lässt den Schluss zu, dass eine

signifikante Änderung am Chromophor stattgefunden haben muss.

Das Fragment 188 *Da* hat auch nach mehreren Schüssen nur eine geringe Intensität. Dies kann mehrere Ursachen haben. Es ist möglich, dass die hohe interne Energie nach der Absorption ausreicht, um nach dem Verlust von  $NH_3$  direkt eine weitere Fragmentierungsreaktion anzuschließen. Dass dennoch die Masse 188 *Da* gebildet wird, würde dann daran liegen, dass durch Stöße mit Helium bei einem Teil der Ionen die Energie gequencht wird und es zu keiner Folgereaktion kommt. Dies würde auch erklären, warum das Fragment nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit entsteht.

Eine zweite Erklärung liegt in der Weiterabsorption des Fragments. Der Verlust von Ammoniak sollte keinen großen Einfluss auf die Absorption des Indolrings haben. Das Fragment kann dann in den folgenden Laserschüssen ein weiteres Photon absorbieren und weiter fragmentieren. Dabei ist es egal, ob das Tryptophan direkt in zwei Schritten in die Masse 146 *Da* zerfällt, oder ob erst das Fragment  $m/z = 188$  *Da* gebildet wird. Da in Abb. 3.13a) allerdings nach zwei Laserschüssen die Intensität des Peaks  $m/z = 146$  *Da* um ein vielfaches höher ist, als die von  $m/z = 188$  *Da*, ist davon auszugehen, dass ein Großteil der Ionen direkt zu der Masse 146 *Da* zerfällt. Dass in Abb. 3.13c) die Intensität des Fragments  $m/z = 188$  *Da* immer noch klein ist, liegt wahrscheinlich daran, dass dieses Fragment ein weiteres Photon absorbieren kann und dann nachträglich weiter fragmentiert.

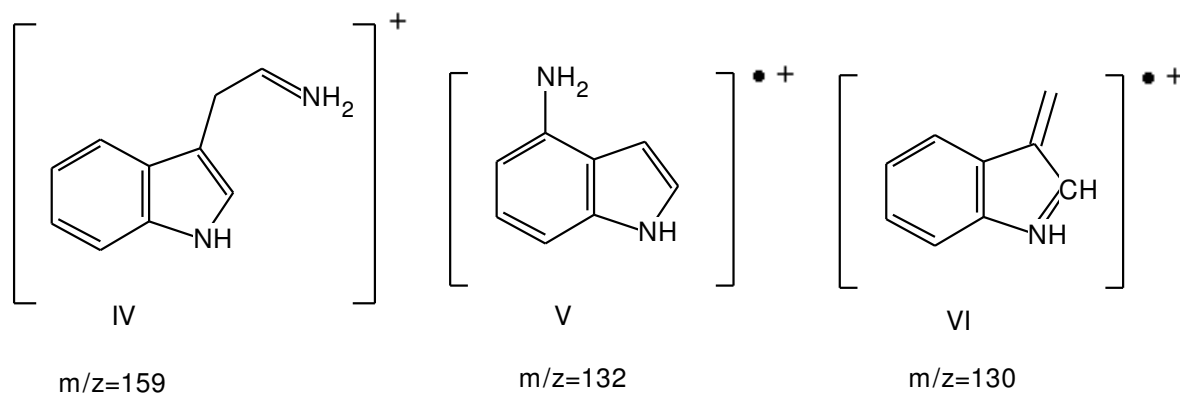


Abbildung 3.15: Mögliche Strukturen für die durch photoinduzierte Fragmentierung gebildeten Ionen. **IV** Das Immoniumion wird nach Abspaltung von  $CO$  und  $H_2O$  gebildet. **V** u. **VI** sind Radikalfragmente, die nach Abspaltung eines H-Atoms entstehen [16].

Im Vergleich zur kollisionsinduzierten Fragmentierung (CID), führt die erhöhte Energie nach Photoanregung dazu, dass zusätzliche Fragmentierungskanäle angesprochen werden können. Die Bildung des Fragmentions  $[M + H - CO - H_2O]^+$  ist bei protonierten Aminosäuren sehr häufig, fehlt im CID-Spektrum von Tryptophan aber vollständig. Im photoinduzierten Spektrum kann dieser Kanal ebenfalls angesprochen werden. Es bildet

sich dabei das Immoniumion (Struktur **IV** in Abb. 3.15). Die Aktivierungsenergie für diesen Kanal liegt nach quantenmechanischen Rechnungen  $110,53 \text{ kJmol}^{-1}$  über der Aktivierungsenergie für den Ammoniakverlust [53]. Führt man die Energie langsam über Stöße zu, zerfällt das Ion bevor die dafür nötige Energie ins Ion gelangen kann. Die Photonenenergie reicht aber aus, um die nötige Aktivierungsenergie in das Ion in einem Schritt einzubringen.

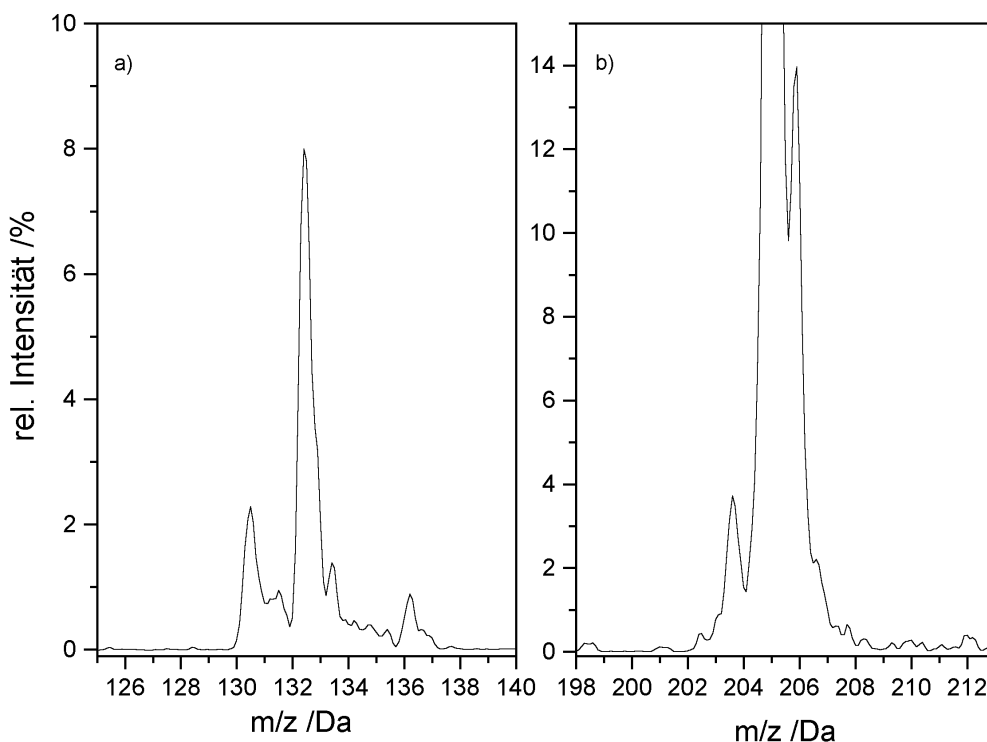


Abbildung 3.16: Vergrößerte Ausschnitte aus Abb. 3.13b). a) Das radikalische Fragment  $m/z = 204 \text{ Da}$  zerfällt weiter zu den Massen  $132 \text{ Da}$  und  $130 \text{ Da}$ . b) Mit sehr geringer Intensität kann der Verlust eines Wasserstoffatoms beobachtet werden.

Die durch Elektrospray entstehenden Ionen haben eine gerade Anzahl von Elektronen, es handelt sich um *closed shell* Systeme. Das führt dazu, dass auch die beobachtbaren Fragmente fast ausschließlich eine geschlossene Elektronenschale besitzen. Beim Tryptophan kann man, mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit, auch einen radikalischen Fragmentierungspfad nachweisen. Dabei verliert das protonierte Tryptophan ein H-Atom und es bildet sich dadurch das Radikalkation des Tryptophans  $[\text{Trp}]^{\bullet+}$  mit einer Masse von  $204 \text{ Da}$  [16].

Zu der Abspaltung des Wasserstoffatoms kommt es über einen *charge transfer*-Zustand. Durch die Absorption des Photons wird ein  $\pi\pi^*$ -Übergang angeregt. Dieser ist im In-

dolring lokalisiert. Das Elektron kann mit der positiven Ladung am protonierten Stickstoff zu einem  $\pi\sigma^*$ -Zustand rekombinieren. Die positive Ladung gelangt dadurch in den Indolring und wird dort vollständig delokalisiert. Der Transfer des Elektrons führt in einen dissoziativen Kanal, der zur Abspaltung des Wasserstoffatoms führt [16]. Die Intensität des entstandenen Radikalkations ist sehr gering (s. Abb. 3.16). Die Intensitäten betragen 4% für das Radikalkation des Tryptophans und 8% für das Folgefragment bei  $m/z = 132 Da$  relativ zum Hauptfragment  $m/z = 146 Da$ . Dieser Fragmentierungskanal ist beim Tryptophan also von untergeordneter Bedeutung. Die Lebensdauer des angeregten Zustands liegt im Bereich von Femtosekunden [15]. Der Grund könnten konische Schnitte des  $\pi\sigma^*$  Zustands sein, der sowohl den  $S_0$  als auch den  $S_1$  schneidet [15, 16]. Das Verzweungsverhältnis am Schnittpunkt mit dem  $S_0$  (s. Abb. 1.9) läge stark auf Seiten der nichtdissoziativen Rückkehr in den Grundzustand. Die sehr schnelle Relaxation ist ein ausschließlich ein Effekt der Ladung. Im neutralen Tryptophan, Gasphase wie Lösungsmittel, beträgt die Lebensdauer des angeregten Singuletzustands wenige *ns* [68]. Die Absorption des Radikalkations  $[Trp]^{\bullet+}$  ist in den sichtbaren Bereich verschoben [88]. Durch die Absorption eines weiteren Photons kann das Radikal weiter fragmentieren. Es bildet dabei die Fragmente 132 *Da* und 130 *Da* (Strukturen **V**, **VI** in Abb. 3.15). Das Fragment  $m/z = 130 Da$  ist ebenfalls in den EI [77], PD [54] und FAB [89] Massenspektren zu beobachten. Es handelt sich dabei um ein radikalisches Fragment des Tryptophans. Aufgrund der geringen Intensität des Fragments  $m/z = 204 Da$  war ein direkter Nachweis, dass diese Fragmente durch die Absorption eines weiteren Photons des Radikalkations  $[Trp]^{\bullet+}$  entstehen, aber nicht möglich. Allerdings konnte bei der Untersuchung der Photofragmentierung des Tryptamins in Kap. 3.2.5 experimentell nachgewiesen werden, dass das Fragment  $m/z = 130 Da$  tatsächlich aus dem Radikal entsteht.

### 3.1.8 Wellenlängenabhängigkeit der Photofragmentierung

Trägt man die prozentuale Fragmentierung gegen die Photonenenergie auf, so bekommt man das in Abb. 3.17b) dargestellte Spektrum. Man kann einen Peak und danach einen breiten Anstieg sehen. Eine Schwingungsstruktur lässt sich nicht erkennen. Dies kann zwei Ursachen haben. Die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustands ist so kurz, dass es zu einer Lebensdauererweiterung kommt. Zeitaufgelöste Messungen haben eine Lebensdauer von  $250 \text{ fs}$  ergeben [15]. Daraus ergibt sich eine deutliche Lebensdauererweiterung von ca.  $60 \text{ cm}^{-1}$ , die eine fehlende Schwingungsauflösung zum Teil erklärt.

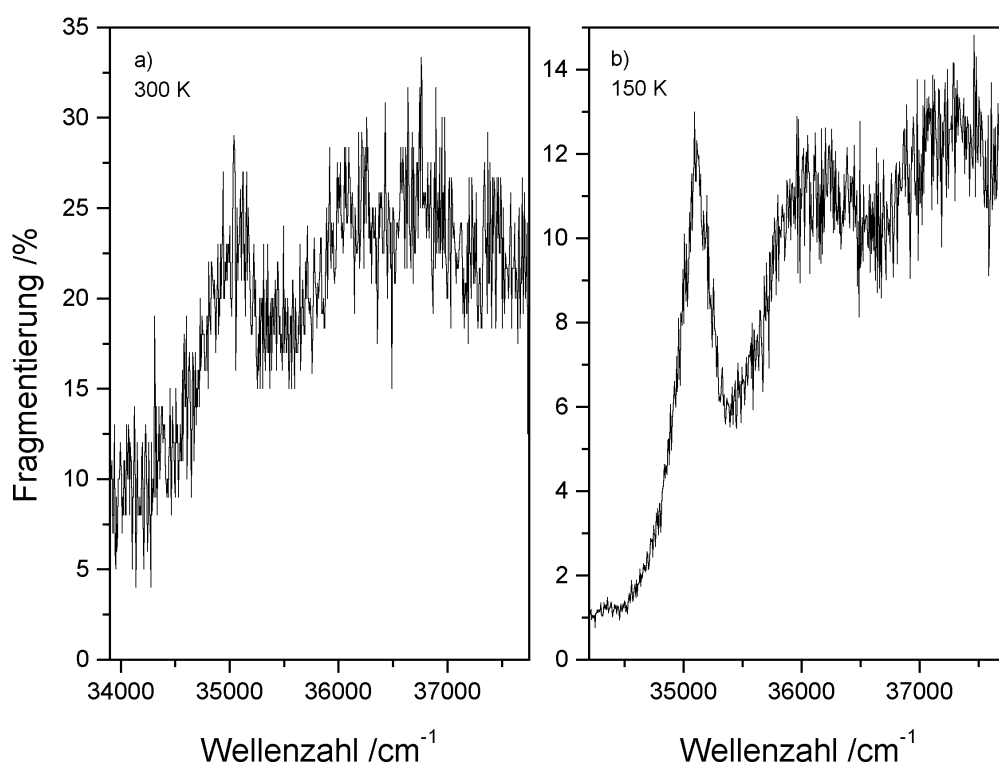


Abbildung 3.17: Einfluss der Temperatur auf das Photofragmentspektrum von Tryptophan. a) Spektrum bei Raumtemperatur. b) Spektrum bei gekühlter Falle. Das Signal/Rausch-Verhältnis ist bei gekühlter Falle besser, dennoch ist keine gut aufgelöste Schwingungsstruktur erkennbar.

Befindet sich die Falle bei Raumtemperatur (Abb. 3.17a)) so ist davon auszugehen, dass auch die Iontemperatur bei  $300 \text{ K}$  oder darüber liegt. Bei solch hohen Temperaturen geht die Schwingungsauflösung durch *hot bands* und Rotationsverbreiterungen verloren. Aus diesem Grund wurde die Falle, wie in Kap. 2.2.3.6 beschrieben, mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Reduzierung der Falltemperatur hat einen deutlichen Einfluss. Wie in Abb. 3.17b) zu sehen ist, ist der Peak schärfer und der Einschnitt vor dem breiten

Anstieg ist tiefer. Dennoch ist keine gut aufgelöste Schwingungsstruktur zu erkennen.

Die Kühlung der Falle resultiert über Heliumstöße in einer Erniedrigung der Inneren Energie der Ionen. Dies ist sowohl an der Bildung von Clustern (s. Kap. 3.1.6), als auch an den schärferen Strukturen in Abb. 3.17b) zu erkennen. Dass dennoch keine gut aufgelöste Schwingung zu beobachten ist, kann nur daran liegen, dass die Innere Energie der Ionen immer noch sehr groß ist und im Tryptophan die Liniendichte relativ hoch ist [68, 69]. Die Innere Energie der Ionen wird durch Stöße mit den neutralen Restgasteilchen bestimmt. Wie man in Abb.2.17 sehen kann, besteht das Hintergrundgas hauptsächlich aus Stickstoff. Der Stickstoff gelangt durch den Probeneinlass mit in die Kammer. Aufgrund der Abmessungen der differentiellen Pumpstufen kann ein Teil des Stickstoffs ohne Stöße in einem gerichteten Strahl in die Falle gelangen. Dieser gerichtete Teilchenstrom kann mit den Ionen stoßen, bevor die kinetische Energie durch Wandstöße auf Falltemperatur gesenkt wird. Hier sind Verbesserungen geplant.

Der  $S_0 - S_1$ -Übergang des neutralen Tryptophans liegt bei  $34\,873\text{ cm}^{-1}$  ( $286,75\text{ nm}$ ) [68, 69, 70]. Der  $S_0 - S_1$ -Übergang des protonierten Tryptophans ist gegenüber dem der neutralen Aminosäure um etwa  $300\text{ cm}^{-1}$  zu höheren Energien verschoben. Diese geringe Verschiebung zeigt, dass die Ladung nur einen geringen Einfluss auf den  $S_1$ -Zustand des Chromophors hat.

Zustand	neutral	$N - H^+ - Trp$	$1 - H^+ - Trp$	$BI - H^+$
$S_0$	0	0	0	0
$S_1$	$L_b$ 4,50/0,019	$L_b$ 4,47/0,045	$L_b$ 4,42/0,009	4,43/0,028
$S_2$	$L_a$ 4,76/0,137	diffus 4,67/0,050	diffus 4,93/0,005	5,12/0,006
$S_3$	4,93/0,002	$L_a$ 4,88/0,129	$L_a$ 5,03/0,231	5,31/0,004
<i>exp.</i> $S_0 - S_1$	4,32	4,36		

Tabelle 3.4: Berechnete elektronische Übergänge. Beim Neutralen handelt es sich um die Werte für das niederstenergetische Konformer. Angegeben sind Art des Zustands, die vertikale Anregungsenergie  $\Delta E$  in eV und die Oszillatorstärke. Der  $S_0 - S_1$ -Übergang des Neutralen liegt bei  $4,46\text{ eV}$ .

Durch die geringe absolute Signalstärke und die Breite des Signals kann man nicht sicher sein, ob das Signal tatsächlich vom protonierten Tryptophan stammt. Es wäre denkbar, dass sich in der Falle neutrales Tryptophan befindet. Ionen könnten durch Kontakt mit der Fallenwand entladen werden und sich als Verunreinigung anreichern. Aufgrund des niedrigen Dampfdrucks des Tryptophans können solche Verunreinigungen über lange Zeit in der Kammer bleiben.

Dass es sich nicht um das Signal des neutralen Tryptophan handelt, kann durch das simultane Aufzeichnen von Mutter- und Fragmentionen gezeigt werden. Im gleichen Maß

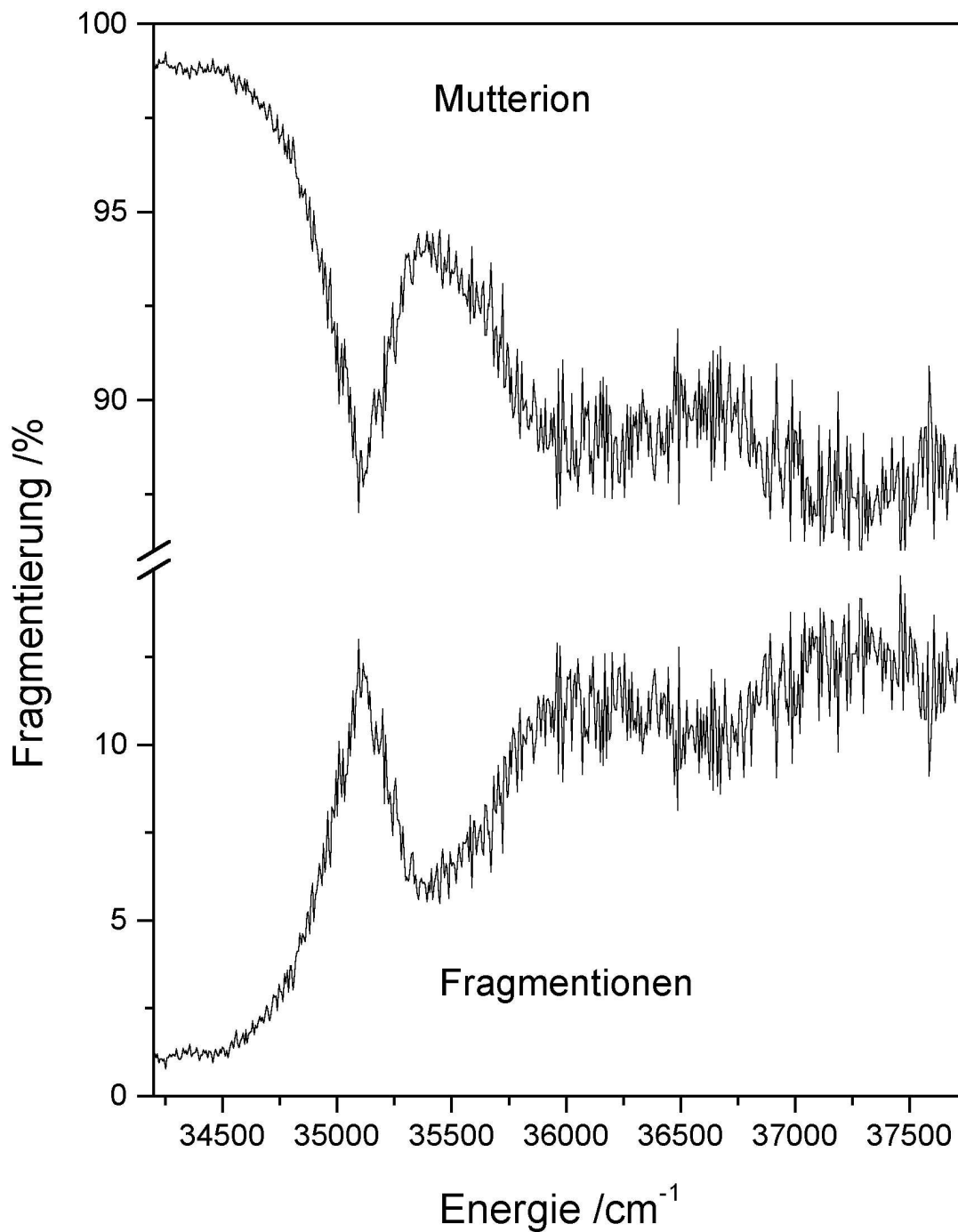


Abbildung 3.18: Photofragmentspektrum des protonierten Tryptophans. Die Anzahl der Mutter- und Fragmentionen sind komplementär. Die Fragmentionen entstehen also durch Fragmentierung der Mutterionen und nicht durch Ionisation neutraler Produkte. Der Übergang bei  $35150\text{ cm}^{-1}$  wird dem  $S_0 - S_1$ -Übergang zugeordnet.



wie das Fragmentationensignal zunimmt, muss das Mutterionensignal abnehmen. Wie man in Abb. 3.18 sehen kann, sind die Signale von Mutter- und Fragmention komplementär. Das beobachtete Signal, muss damit von dem protonierten Tryptophan stammen.

Wie man in Abb. 3.18 sehen kann, steigt ab einer Energie von  $34\,500\text{ cm}^{-1}$  die Absorption deutlich an. Die Anregung bei niedrigeren Energien, wurde stichpunktartig überprüft. Da bei kleineren Energien keine Fragmentierung stattfindet, wird der Peak bei  $35\,150 \pm 50\text{ cm}^{-1}$  dem  $S_0 - S_1$ -Übergang des protonierten Tryptophans zugeordnet. Nach theoretischen Untersuchungen liegt der  $S_0 - S_1$ -Übergang des protonierten Tryptophans bei  $36\,053\text{ cm}^{-1}$  [20]. Die Abweichung von Theorie und Experiment beträgt damit nur 2,5%. Experiment und Theorie stimmen also hervorragend überein.

Das elektronische Spektrum des Indols wird durch zwei Übergänge bestimmt. Im neutralen Indol bildet der unpolare  $L_b$ -Zustand den  $S_1$ . Der sehr polare  $L_a$ , der ein hohes Dipolmoment besitzt, ist der  $S_2$ . Die Reihenfolge der elektronisch angeregten Zustände bleibt bei der Protonierung erhalten. Die Ladung ermöglicht einen weiteren Zustand. Befindet sich das Elektron im angeregten Zustand in einem stark delokalisierten Orbital, kann man es auch als eine negative Ladung auffassen, die um zwei positive Ladungen kreist. Solche Zustände werden im Folgenden als diffus bezeichnet.

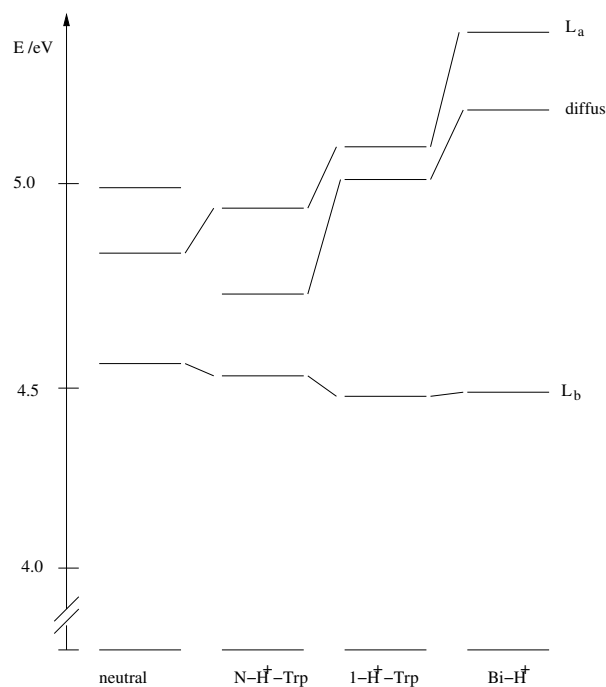


Abbildung 3.19: Relative Lage des neutralen Tryptophans und der protonierten Tautomere  $N - H^+ - Trp$ ,  $I - H^+ - Trp$  und  $Bi - H^+$ .

Die theoretischen Werte für die Anregungsenergien sind in Tab. 3.4 gegeben [20]. Wie im neutralen Tryptophan bildet der  $L_b$ -Zustand den  $S_1$ . Bei allen drei Tautomeren und beim Neutralen ist die Anregungsenergie fast identisch. Die Protonierung hat nur geringen

Einfluss auf die Lage des  $S_1$ . Anders als beim Neutralen bildet der  $L_a$ -Zustand nicht den  $S_2$ . Durch die Ladung schiebt sich ein diffuser Zustand zwischen  $L_b$  und  $L_a$  (s. Abb. 3.19). Anders als der unpolare  $L_b$ -Zustand, zeigt der polare  $L_a$ -Zustand eine starke Verschiebung zu höheren Energien. In deprotonierten Systemen sollte der  $L_a$ -Zustand stark zu niedrigeren Energien verschoben sein. Messungen an deprotonierten Systemen sind geplant.

Der Ort der Protonierung ist durch den geringen Einfluss der Ladung auf den  $S_1$  nicht zu bestimmen. Allerdings ist davon auszugehen, dass durch den hohen Energieunterschied von  $84 \text{ kJmol}^{-1}$  zwischen dem  $N - H^+ - Trp$  und dem  $1 - H^+ - Trp$  während der Elektrosprayionisation nur das  $H - N^+ - Trp$  Tautomer entsteht.

## 3.2 Tryptamin

### 3.2.1 Struktur und Nomenklatur

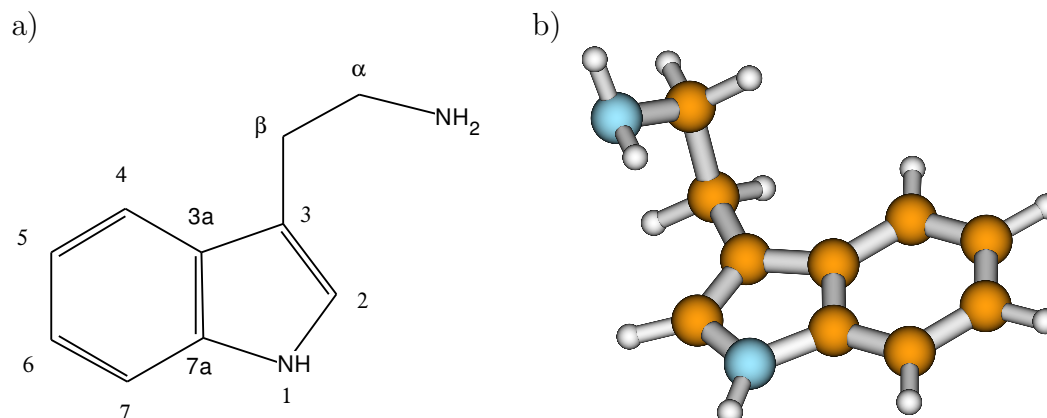


Abbildung 3.20: a) Lewis-Struktur des neutralen Tryptamins b) Niederstenergetisches Konformer in der Gasphase

Der systematische Name des Tryptamins lautet 3-(2-Aminoethyl)indol. Die chemische Struktur (s. Abb. 3.20) ähnelt der des Tryptophans (s. Abb. 3.1). Die Nummerierung der einzelnen Positionen im Molekül entspricht deshalb auch der des Tryptophans. Zusätzlich weist das Tryptamin große Ähnlichkeit zu den Neurotransmittern Serotonin (3-(2-Aminoethyl)-5-hydroxyindol) und Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamin) auf. Tryptamin ist ebenfalls biogen und löst beim Menschen Halluzinationen aus. Man vermutet, dass nur die protonierte Form, die bei  $pH$  7 vorliegt, aktiv ist. Entsprechend lohnen sich nähere Untersuchungen zur protonierten Form.

Tryptamin eignet sich als Modellsubstanz da ihm, im Vergleich mit Tryptophan, Serotonin und Melatonin, polare Gruppen fehlen, die den Dampfdruck der Substanz soweit erhöhen, dass es Gasphasenuntersuchungen zugänglich ist. Entsprechend wurde schon eine Vielzahl von spektroskopischen Untersuchungen am neutralen Tryptamin vorgenommen [90, 91, 92, 93, 94, 95].

Aufgrund der flexiblen Seitenkette kann das neutrale Tryptamin in mehreren Konformeren vorliegen, von denen sieben experimentell gefunden wurden [90, 91]. Durch den Vergleich von experimentellen Daten mit *ab initio* Methoden wurde das Konformer in Abb. 3.20 b) als das stabilste Konformer gefunden [92, 93].

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zum Tryptophan kann davon ausgegangen werden, dass die Protonierung ebenfalls am primären Amin stattfindet. Durch die Protonierung gewinnt die Aminogruppe an Symmetrie, so dass nur noch drei Konformere

denkbar sind. Diese ergeben sich durch die Rotation um die  $C-\alpha - C-\beta$ -Bindung (s. Abb 3.21).

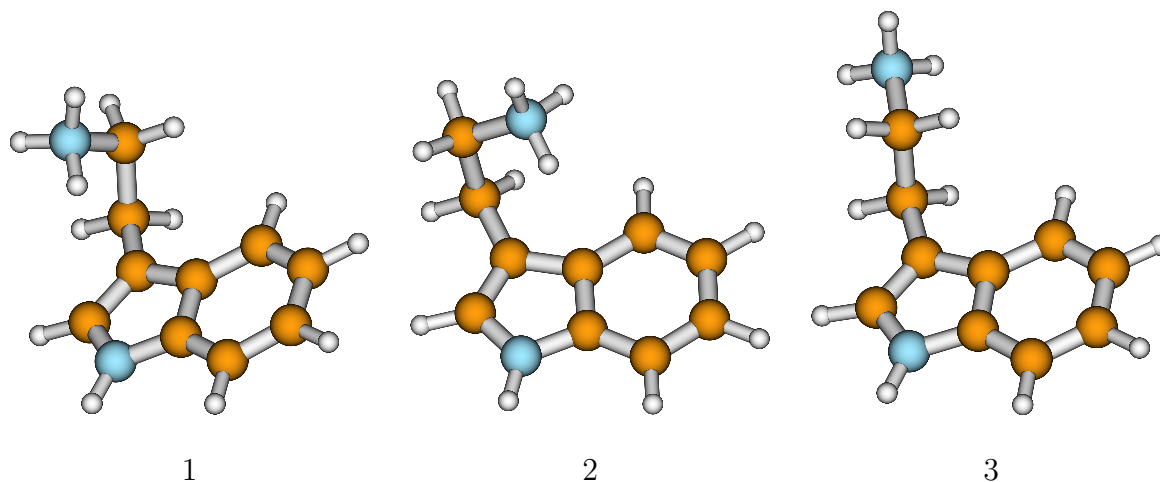


Abbildung 3.21: Die drei Konformere des niederstenergetischen Tautomers des protonierten Tryptamins.

Im neutralen Tryptamin ist, im günstigsten Konformer, die Aminogruppe zum Pyrrolring orientiert [92, 93]. Im Gegensatz dazu ist die protonierte Aminogruppe zum Benzolring gedreht. Allerdings beträgt der Unterschied zwischen beiden Konformeren nur  $100 \text{ cm}^{-1}$  (s. Tab. 3.5).

Konformer	Basissatz		
	B3LYP/3-21G $\text{cm}^{-1}$	B3LYP/6-31+G* $\text{cm}^{-1}$	B3LYP/6-311++G** $\text{cm}^{-1}$
1	439	130	115
2	0	0	0
3	2679	1840	1893

Tabelle 3.5: Vergleich der relativen Energien der verschiedenen Konformere in Abb. 3.21 bei verschiedenen Basissätzen.

Deutlich ungünstiger ist die Anti-Position (Konformer 3 in Abb. 3.21). Das die beiden Konformere, in denen die Aminogruppe zum Ring zeigt, bevorzugt sind, ist ein Indiz, dass die positive Ladung durch die hohe Elektronendichte des aromatischen Rings stabilisiert wird.

## 3.2.2 ESI-MS von Tryptamin

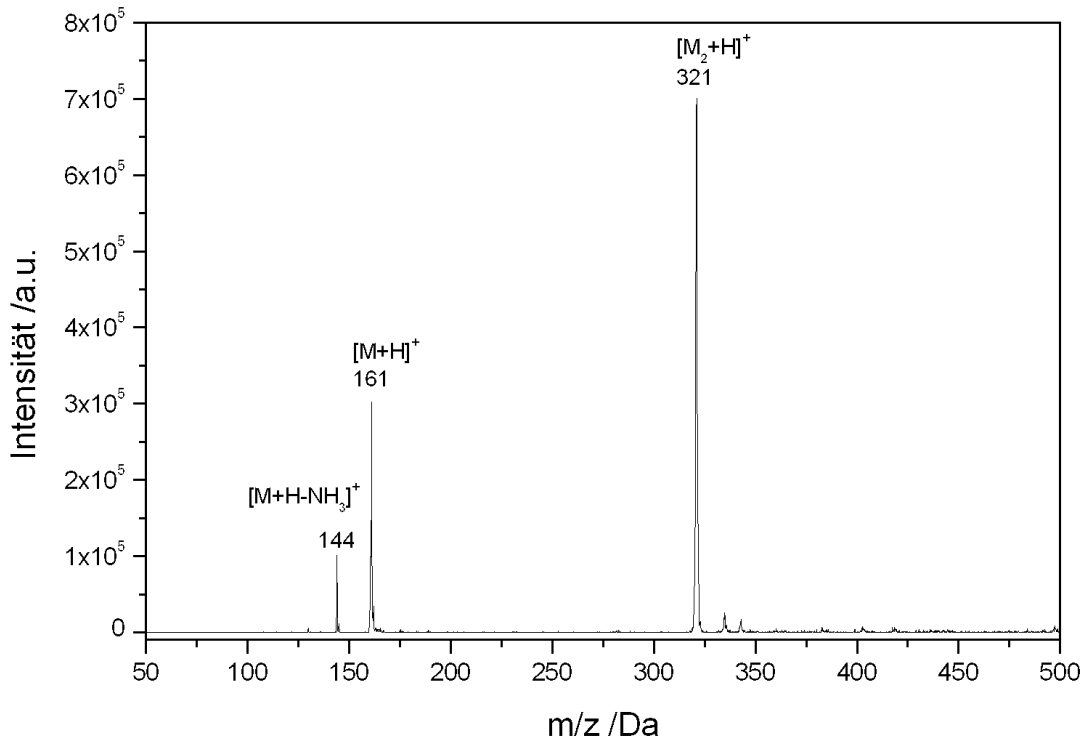


Abbildung 3.22: ESI-MS von Tryptamin. Im Massenspektrum von Tryptamin sind drei Peaks zu sehen. Der intensivste Peak bei  $m/z = 321$  Da stammt vom protonengebundenen Homo-Dimer. Desweiteren ist das Monomer bei  $m/z = 161$  Da und ein Fragment bei  $m/z = 144$  Da zu erkennen.

Im Elektrospraymassenspektrum von Tryptamin in Abb 3.22 sind drei Peaks zu erkennen. Sie stammen vom protonierten Dimer  $[M_2 + H]^+$  mit 321 Da, dem Monomer  $[M + H]^+$  mit 161 Da und einem Fragment  $[M + H - 17]^+$ . Das Fragment bei  $m/z = 144$  Da entsteht durch den Verlust von Ammoniak [96]. Das Massenspektrum ähnelt dem des Tryptophans (Abb. 3.3), in dem die analogen Massen zu sehen sind. Wegen der fehlenden Carboxylgruppe im Tryptamin ist der Ammoniakverlust der bevorzugte Fragmentierungskanal. Sowohl das Dimer als auch das Fragment bei  $[M + H - 17]^+$  werden in beiden Massenspektren gebildet.

### 3.2.3 Kollisionsinduzierte Fragmentierung

Die kollisionsinduzierte Fragmentierung von Tryptamin liefert, wie in Abb. 3.23b) zu sehen ist, ausschließlich ein Fragment mit der Masse  $m/z = 144$  Da. Dieses Fragment entsteht durch den Verlust von Ammoniak. Die Struktur dieses Fragments ist ungeklärt.

Die Fragmentierung der Masse 144 Da erzeugt das Indolkation  $m/z = 177$  Da in Abb.3.23c)). Der Indolring bleibt demnach bei der Fragmentierung des Mutterions erhalten. Die Energie für den intramolekularen H/D-Austausch liegt unterhalb der Dissoziationsenergie. Während der Fragmentierung kann es deshalb zu Umlagerungen kommen. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass sich das niederstenergetische Tautomer bildet. Durch *ab initio* Rechnungen wurde die relative Energie der möglichen Tautomere bestimmt (s. Tab. 3.6).

Tautomer	Basissatz		
	B3LYP/3-21G	B3LYP/6-31+G*	B3LYP/6-311++G**
$\alpha$	0	0	0
1	100,7	113,46	105,45
2	42,24	44,82	42,58
3	63,86	77,31	73,22
4	91,22	88,72	85,80
5	91,26	91,33	87,82
6	90,69	88,14	84,62
7	102,24	103,67	100,8
3a	141,40	148,68	142,03
7a	152,55	150,09	144,82
b3	69,41	56,30	57,81
b4	110,82	122,05	124,10

Tabelle 3.6: Die relativen Energien der möglichen Tautomere. Alle Angaben in  $kJmol^{-1}$ . Die dazugehörigen Strukturen sind in Abb. 3.24 dargestellt.

Am günstigsten ist die Protonierung am  $\alpha$ -Kohlenstoff. Nach der Abspaltung von Ammoniak wandert ein Proton vom  $\beta$ - zum  $\alpha$ -Kohlenstoff. Dadurch kann der Ring die positive Ladung teilweise stabilisieren, ohne dass die Aromatizität zerstört wird. Tautomere, in denen nach der Ammoniakabspaltung keine Umlagerung stattfindet, also ein primäres Carbokation am  $\alpha$ -Kohlenstoff gebildet wird, sind nicht stabil. In den Rechnungen lagerten sie sich, je nach Startgeometrie, entweder zu dem Tautomer  $\alpha$  oder b3 um.

Die Protonierung am Ring ist energetisch sehr ungünstig. Die entsprechenden Tautomere liegen mindestens  $40 kJmol^{-1}$  über der Protonierung am  $\alpha$ -Kohlenstoff. Als besonders ungünstig erweist sich die Protonierung am Stickstoff. Die Tautomere 1 und 6 sind analog

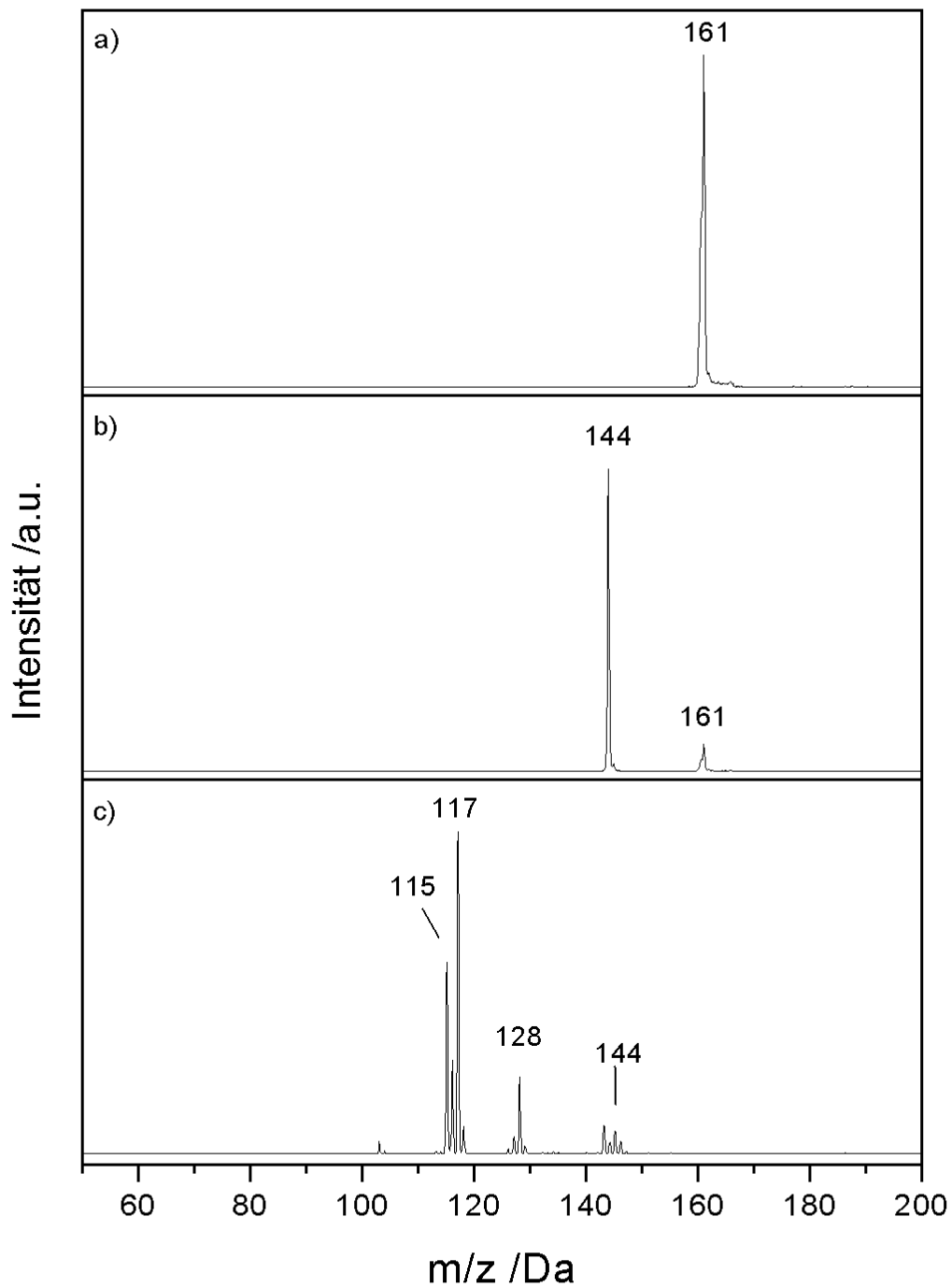


Abbildung 3.23: Kollisionsinduzierte Fragmentierung von Tryptamin. a) Isoliertes Mutterion  $[M + H]^+$ . b) Die Fragmentierung des Mutterions ergibt nur ein Fragment bei  $[M + H - 17]^+$ . c)  $MS^3$ -Schritt. Die CID der Masse 144 Da liefert ein Fragment mit der Masse 117 Da.

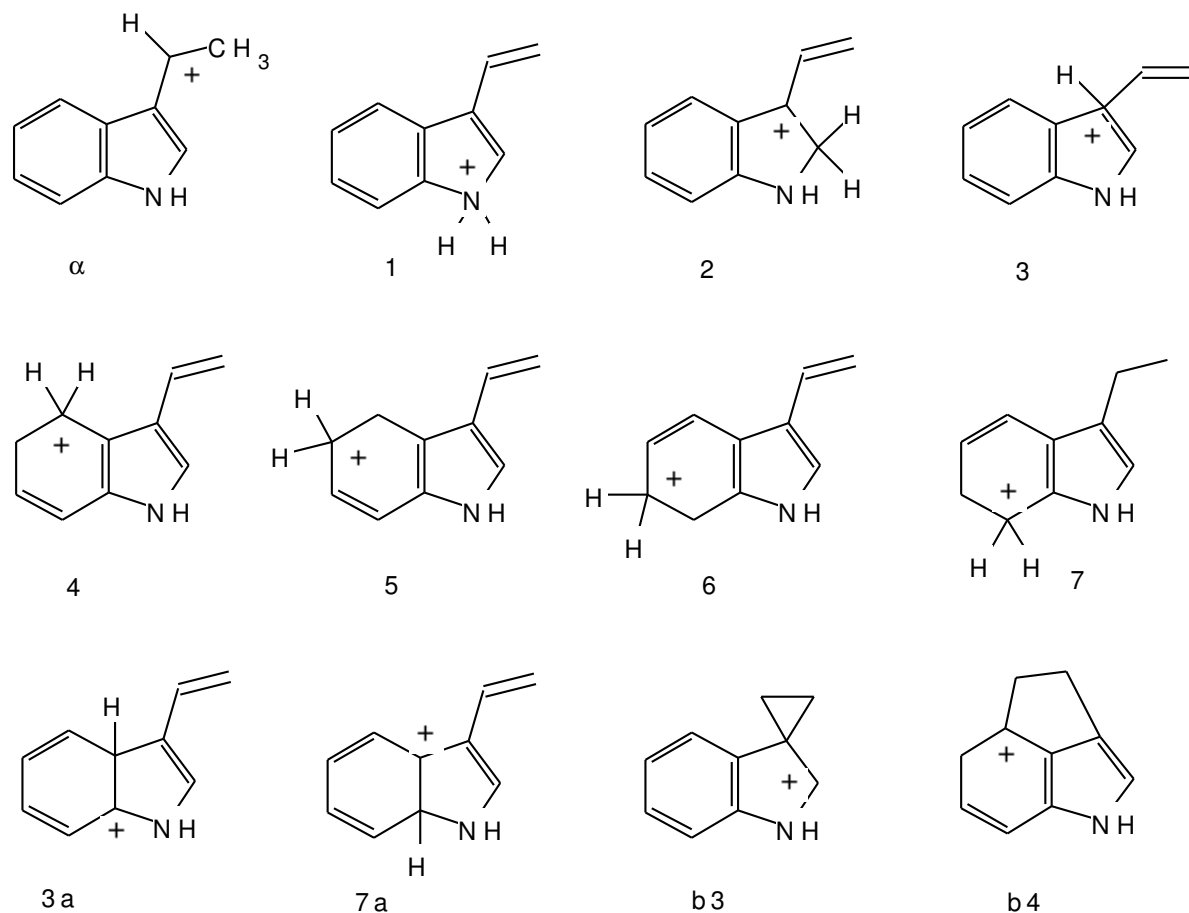


Abbildung 3.24: Die zwölf niederstenergetischen Tautomere des Fragments  $m/z = 144$  Da. Das stabilste Tautomer entsteht durch Protonierung des  $\alpha$ -Kohlenstoffs. Tautomere, bei denen sich das Proton an einem der Ringe anlagert, sind am ungünstigsten.

den Strukturen **2** und **3** in Abb. 3.6. Sie sind energetisch allerdings sehr ungünstig. Wie zu erwarten, ist Protonierung am Sechsring ungünstiger als die Protonierung am Fünfring. Die Abspaltung von Ammoniak konnte bei allen untersuchten Aminen beobachtet werden, bei denen ein aromatischer Ring durch eine Ethylengruppe mit der Aminogruppe verbunden ist. Die Abspaltung wird also nicht speziell durch den Indolring ermöglicht. Wahrscheinlich wird die Abspaltung von  $NH_3$  durch den positiven induktiven Effekt der Aromaten begünstigt.

Die kollisionsinduzierte Fragmentierung des Fragments  $m/z = 144$  Da ergibt das in Abb.3.23c) gezeigte Massenspektrum. Es entstehen mehrere, teils radikalische Fragmente (s. Tab. 3.7). Hauptfragment im  $MS^3$  Spektrum ist die Masse  $m/z = 117$  Da. Dieses Fragment kann nur durch die Abspaltung von  $C_2H_3^\bullet$  gebildet werden. Bei dem Fragment  $m/z = 117$  Da handelt es sich um das Radikalkation des Indols (s. Struktur **8** in Abb. 3.25). Dieses Radikal kann in einer Folgereaktion  $H_2$  abspalten und bildet da-



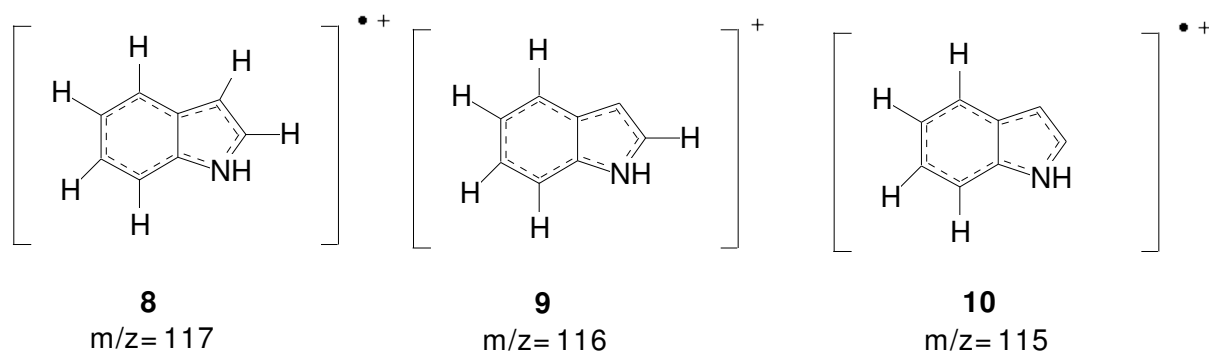


Abbildung 3.25: Lewis-Strukturen der Fragmente 115, 116 und 117 Da.

durch die Masse 115 Da (s. Struktur **10** in Abb. 3.25). Die Bildung von radikalischen Fragmenten ist ungewöhnlich. In den meisten Fällen ist es energetisch günstiger zwei geschlossenschalige Ionen anstatt von zwei Radikalen zu bilden.

Masse /Da	Massendifferenz /Da	Fragment
144	17	$[M + H - NH_3]^+$
128	33	$[M + H - NH_3 - CH_4]^+$
117	44	$[M + H - NH_3 - C_2H_3]^{\bullet+}$
116	45	$[M + H - NH_3 - C_2H_4]^+$
115	46	$[M + H - NH_3 - C_2H_3 - H_2]^{\bullet+}$

Tabelle 3.7: Liste der Fragmente, die durch kollisionsinduzierte Fragmentierung erzeugt werden können. Die Bildung von radikalischen Fragmenten (117 Da und 115 Da) durch kollisionsinduzierte Fragmentierung ist ungewöhnlich.

Alternativ kann das Fragment  $m/z = 144$  Da auch  $C_2H_4$  abspalten. Dadurch entsteht das Indolkation mit  $m/z = 116$  Da (s. Struktur **9** in Abb. 3.25). Dieses Fragment kann auch bei Elektronenstossionisation beobachtet werden [97]. Da das Kation **8** mit deutlich geringerer Intensität gebildet wird, lässt es darauf schließen, dass das Radikalkation des Indols **9** deutlich stabiler ist.

### 3.2.4 Einfluss der Temperatur auf das Massenspektrum

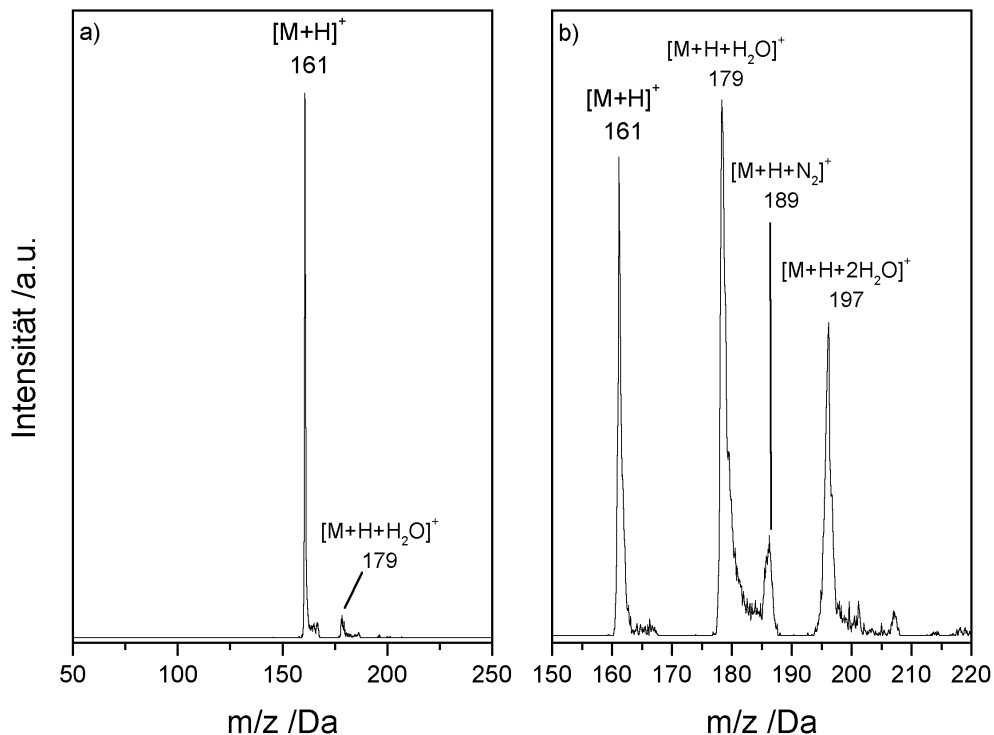


Abbildung 3.26: Bildung von Clustern bei gekühlter Falle. a) Die Massenanalyse von Tryptamin schließt sich der Massenisolation so dicht wie möglich an. Selbst in dieser kurzen Zeit werden geringe Mengen Cluster gebildet. b) Die Massenanalyse wurde gegenüber der Massenisolation um 200  $ms$  verzögert. Es ist eine deutliche Clusterbildung zu erkennen.

Kühlt man die Falle, so bildet Tryptamin wasserstoffbrückengebundene Cluster. Dabei werden fast ausschließlich Wassercluster gebildet. Auch wenn man die Zeit zwischen Massenisolation und Massenanalyse so kurz wie möglich hält (s. Abb. 3.27a) ) kann man die Bildung des Wasserclusters mit  $m/z = 179 Da$  beobachten.

Verzögert man die Massenanalyse, so bilden sich vermehrt Cluster mit größeren  $m/z$ -Verhältnissen (s. Abb. 3.26 b). Eine Liste der beobachteten Cluster ist in Tab. 3.8 präsentiert. Es wird fast ausschließlich Wasser angelagert. Man kann die Anlagerung von einem und zwei Wassermolekülen beobachten. Höhere Wassercluster wurden beim Tryptamin nicht gefunden.

Trägt man die Massenspektren gegen die Wartezeit auf, so erhält man Abb. 3.27. Die Anlagerung des ersten Wassers ( $m/z = 179 Da$ ) geschieht so schnell, dass sie schon ohne zusätzliche Verzögerungszeit beobachtet werden kann. Die Anlagerung des zweiten Was-

Masse /Da	Massendifferenz /Da	Cluster
179	18	$[M + H + H_2O]^+$
189	28	$[M + H + N_2]^+$
197	36	$[M + H + 2H_2O]^+$
202	41	$[M + H + CH_3CN]^+$

Tabelle 3.8: Liste der beobachteten Cluster im Massenspektrum von Tryptamin.

sers ist eine Folgereaktion. Dementsprechend erfolgt die Bildung zeitverzögert. Erst wenn eine hinreichende Menge des einfachen Wasserclusters gebildet wurde, setzt die Bildung von  $[M + H + 2H_2O]^+$  vermehrt ein. Erst ab einer Wartezeit von etwa 200 *ms* beträgt die Intensität des  $[M + H + 2H_2O]^+$  Komplexes ungefähr 10%. Vergleicht man die Bildung der Wassercluster beim Tryptamin mit der beim Tryptophan (s. Abb. 3.11) so sieht man, dass die Anlagerung von Wasser beim Tryptophan deutlich schneller abläuft. Bei maximaler Wartezeit ist die Anlagerung des zweiten Wassers schon vollständig abgelaufen. Beim Tryptamin haben bei gleicher Wartezeit erst die Hälfte der  $[M + H + H_2O]^+$ -Cluster ein zweites Wassermolekül angelagert.

Neben den Wasserclustern werden auch noch Addukte mit Stickstoff  $m/z = 189$  *Da* und Acetonitril  $m/z = 202$  *Da* gebildet. Diese haben jedoch erst ab hohen Wartezeiten eine signifikante Intensität. Bei maximaler Wartezeit liegt ihr Anteil bei weniger als 30% vom Gesamtionenstrom. Wie beim Tryptophan ist das Mutterionensignal bei maximaler Wartezeit fast vollständig verschwunden. Es macht weniger als 5% vom Gesamtionenstrom aus. Eine ausführliche Beschreibung der Kinetik erfolgt in Kap. 3.5.

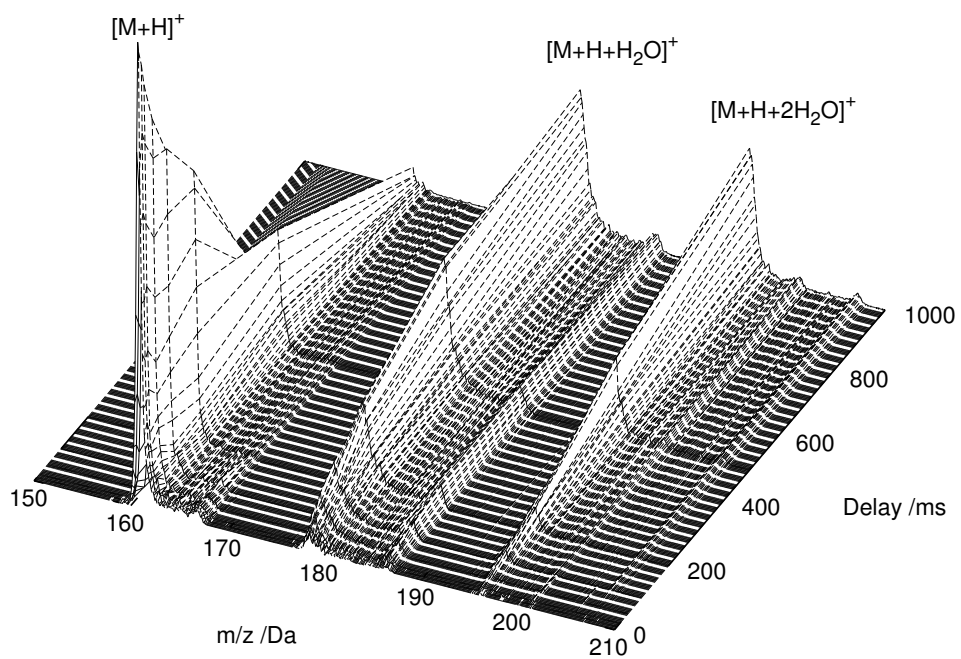


Abbildung 3.27: Zeitabhängigkeit der Clusterbildung. Je größer die Wartezeit desto größer ist der Anteil an Clustern im Massenspektrum. Bei langen Wartezeiten verschwindet das Mutterionensignal fast vollständig.

### 3.2.5 Photofragmentierung von Tryptamin

Die photoinduzierte Dissoziation von Tryptamin unterscheidet sich deutlich von der kollisionsinduzierten Dissoziation. Wie in Abb. 3.28 zu sehen ist, entstehen durch Photofragmentierung eine ganze Reihe von Fragmenten, wohingegen die kollisionsinduzierte Fragmentierung nur ein einziges Fragment liefert (s. Abb. 3.23). Wie bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung ist der Verlust von Ammoniak ein wichtiger Fragmentierungskanal.

Masse /Da	Massendifferenz /Da	Fragment
160	1	$[M]^{\bullet+}$
145	16	$[M + H - NH_2]^{\bullet+}$
144	17	$[M + H - NH_3]^+$
131	30	$[M + H - CH_2NH_2]^{\bullet+}$
130	31	$[M + H - CH_2NH_3]^+$
116	45	$[M + H - NH_3 - C_2H_4]^+$
115	46	$[M + H - NH_3 - C_2H_3 - H_2]^{\bullet+}$

Tabelle 3.9: Liste der bei der photoinduzierten Fragmentierung von Tryptamin entstehenden Fragmente.

Der Hauptfragmentierungskanal ist jedoch der Verlust eines H-Atoms. Dadurch wird ein radikalisches Fragment erzeugt. Der Mechanismus unterscheidet sich somit deutlich von dem vorherrschenden Mechanismus bei der CID. Erhöht man die Anzahl der Laserschüsse, mit denen die Ionen beschossen werden, so kommt es verstärkt zu einer Folgefragmentierung (s. Abb. 3.28b) und c)). Die meisten dieser Fragmente (s. Tab. 3.9) sind bereits aus dem EI-Massenspektrum bekannt und können somit eindeutig einem radikalischen Fragmentierungspfad zugewiesen werden.

Die Fragmente 131 Da und 130 Da sind die Hauptfragmente, die durch Elektronenstoßionisation entstehen. Sie werden also durch eine Fragmentierung des Radikalkations des Tryptamins gebildet [97]. Das Fragment bei  $m/z = 145$  Da wird bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung nicht beobachtet. Es handelt sich wahrscheinlich um einen konkurrierenden Kanal zum H-Verlust, bei dem  $[NH_2]^{\bullet}$  abgespalten wird.

Im PID Spektrum des Tryptamins sind somit drei Fragmentierungspfade vorhanden (s. Abb. 3.29). Nach 10 Laserschüssen sind die primären Fragmente aller Fragmentierungspfade deutlich zu erkennen (s. Abb. 3.28a)). Erhöht man die Anzahl der Laserschüsse, so nimmt die Intensität von Fragmenten mit kleineren  $m/z$ -Verhältnissen zu. Diese sekundären Fragmente entstehen erst, wenn die entsprechenden Vorgänger in ausreichender Menge entstanden sind (s. Abb. 3.28 c) u. d)).

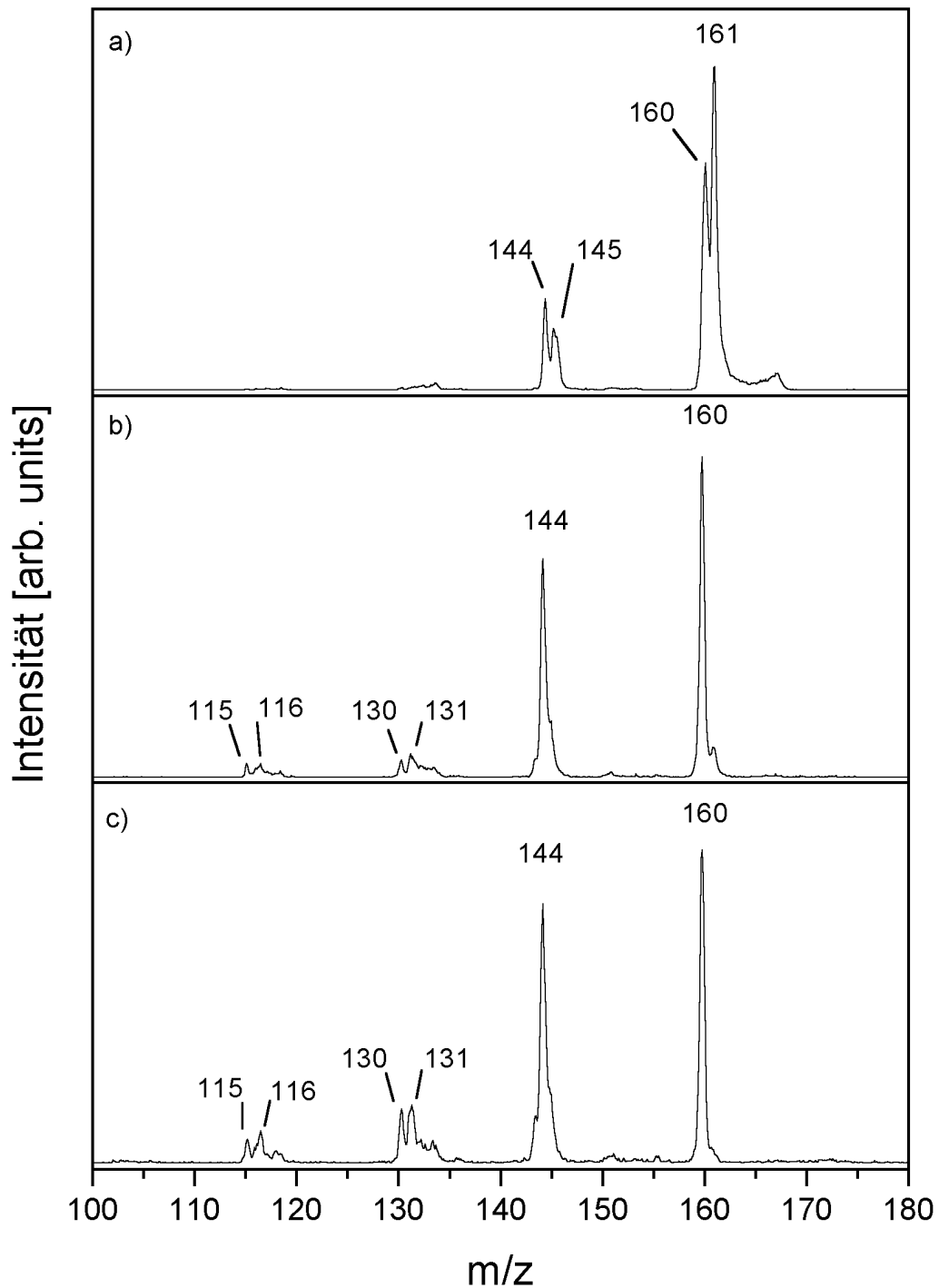


Abbildung 3.28: Photoinduzierte Fragmentierung von Tryptamin. Das in der Paul-Falle isolierte Tryptamin wurde durch mehrfachen Laserbeschuss fragmentiert. a) 10 Schuss, b) 50 Schuss, c) 100 Schuss. Die Pulsenergie betrug jeweils  $500\mu\text{J}$  bei  $285\text{ nm}$ . Auffällig ist die schlechte Absorption des Fragments  $m/z = 144\text{ Da}$ .

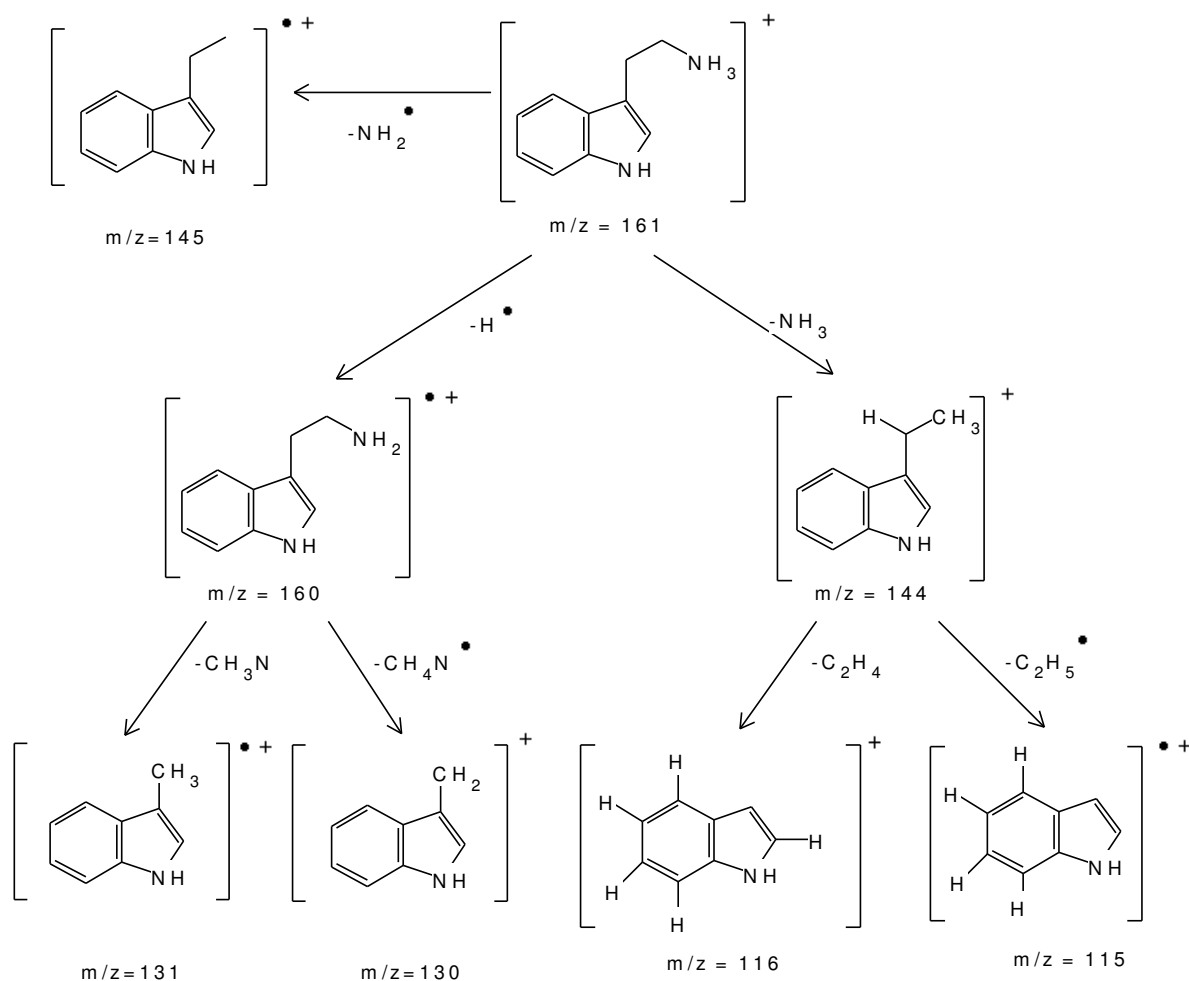


Abbildung 3.29: Durch Photofragmentierung entstandene Fragmente des Tryptamins. Die Fragmentierung folgt im Wesentlichen zwei verschiedenen Pfaden. Zum einen der Verlust von Ammoniak und zum anderen der Verlust eines H-Atoms.

Die Fragmente 144 Da, 116 Da und 115 Da sind auch in den CID Spektren zu erkennen (s. Abb. 3.23). Die elektronische Energie wird durch *internal conversion* in Schwingungsenergie des Grundzustands konvertiert. Durch anschließendes IVR erfolgt eine schnelle Gleichverteilung der Energie im Molekül. Das Molekül befindet sich dann in einem hochangeregten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustands, aus dem heraus die Fragmentierung erfolgt. Dieser Mechanismus ist dem durch CID sehr ähnlich, bei dem die Fragmentierung ebenfalls aus dem schwingungsangeregten Grundzustand heraus erfolgt. Man kann deshalb davon ausgehen, dass durch CID gebildete Fragmente auch durch PID gebildet werden können. Die Fragmente 115 Da und 116 Da sind Folgefragmente, die nach der Abspaltung von Ammoniak entstehen.

Der zweite wichtige Kanal bei der photoinduzierten Fragmentierung des Tryptamins ist die Abspaltung eines H-Atoms. Dabei entsteht ein Fragment mit  $m/z = 160$  Da. Dieses

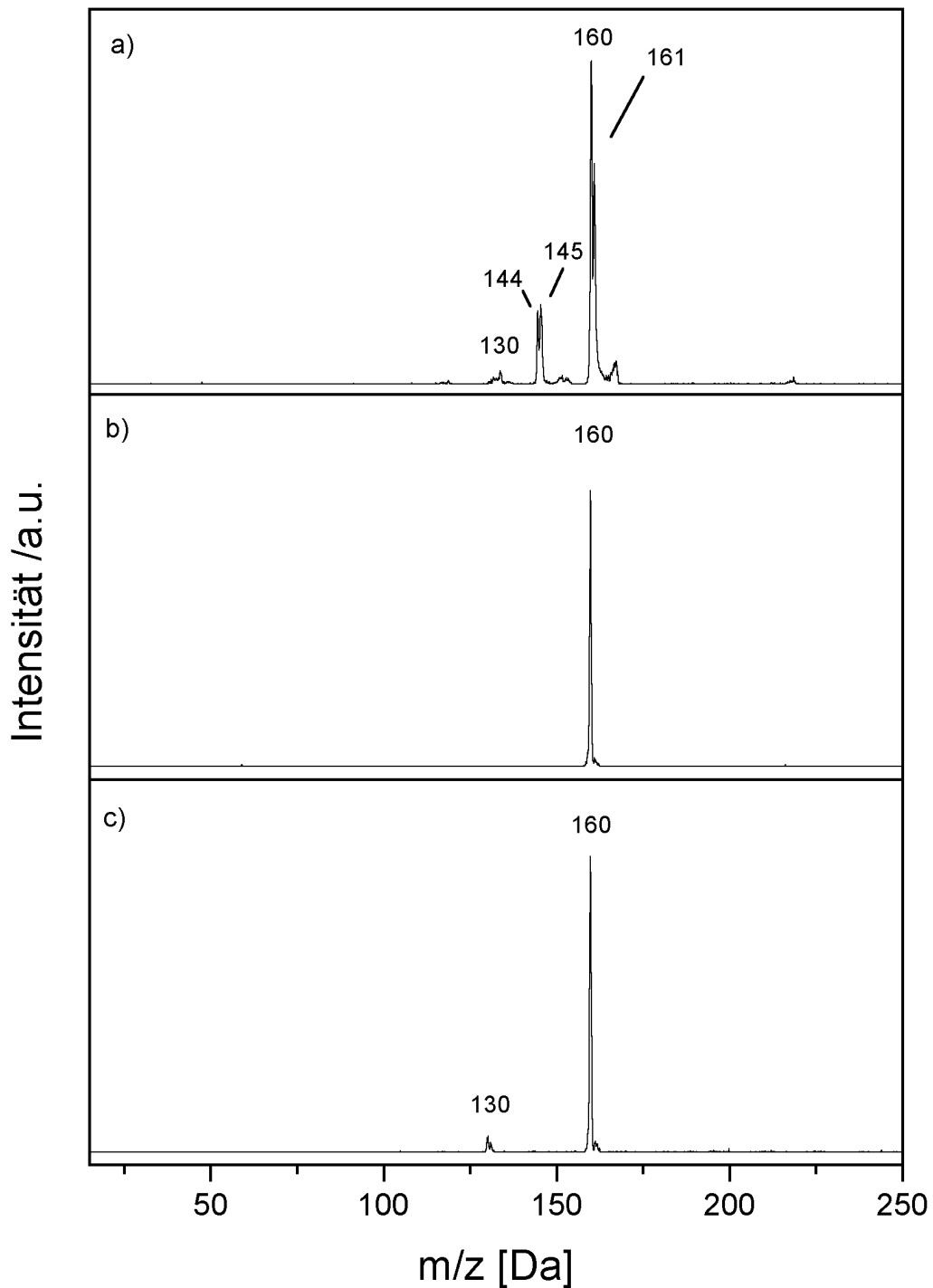


Abbildung 3.30: Wiederholte photoinduzierte Fragmentierung von Tryptamin  $m/z = 161$  Da. a) Photofragmentierung von Tryptamin bei  $285\text{ nm}$  nach 20 Schuss. b) Isolierung des Fragments mit  $m/z = 160$  Da. c) Photoinduzierte Fragmentierung von b), ebenfalls mit 20 Schuss bei  $285\text{ nm}$ . Die Pulsenergie betrug jeweils  $500\text{ }\mu\text{J}$ .



Fragment lässt sich isolieren und durch erneuten Laserbeschuss weiter fragmentieren (s. Abb. 3.30). Dies liefert Fragmente bei 131 *Da* und 130 *Da*. Diese Fragmente sind charakteristisch für das Radikalkation des Tryptamins. Das Fragment bei  $m/z = 145$  *Da* in Abb. 3.28 ist nicht zu beobachten. Es muss demnach direkt aus dem Mutterion entstehen.

Die Fragmente, die durch photoinduzierte Fragmentierung in Abb. 3.28 entstehen, lassen sich also drei verschiedenen Pfaden zuordnen, die in Abb. 3.29 dargestellt sind. Einer dieser Pfade entspricht der kollisionsinduzierten Fragmentierung. Die beiden anderen Pfade entstehen durch die Abspaltung eines Radikals. Dieser Kanal kann ebenfalls beim Tryptophan beobachtet werden, spielt dort aber nur eine untergeordnete Rolle. Beim Tryptophan wird diese Abspaltung einem *charge transfer* Prozess zugeschrieben [16, 15]. Für das Tryptamin, bei dem der H-Verlust ein sehr wichtiger Kanal ist, wird der gleiche Mechanismus diskutiert [14].

Demnach findet im Tryptamin bei der Absorption eines UV-Photons eine  $\pi\pi^*$ -Anregung statt. Entlang des N-H-Abstands der Aminogruppe gibt es eine konische Durchschneidung mit dem  $\pi\sigma^*$ , durch die der  $\pi\pi^*$  ankoppeln kann. Als Folge kommt es zu einem *charge transfer*. Das Elektron wandert zur Aminogruppe und die positive Ladung ist jetzt über den Indolring verteilt. Der  $\pi\sigma^*$  ist entlang der N-H-Koordinate dissoziativ und kann ein H-Atom abspalten. Vor der Dissoziation kommt es zu einer weiteren konischen Durchschneidung mit dem elektronischen Grundzustand. Nach dem *charge transfer* kann es also entweder zu einer Dissoziation kommen, oder eine schnelle *internal conversion* stattfinden. Ersteres führt zur Bildung des Radikalkations mit  $m/z = 160$  *Da*. Letzteres zu einem hoch schwingungsangeregten Diradikal. Aus dem angeregten Schwingungszustand heraus kann dann die Abspaltung der Aminogruppe erfolgen.

Der Verlust des H-Atoms verläuft mit hoher Effizienz. Bereits nach zehn Laserschüssen (s. Abb. 3.28 a)) ist die Intensität des Mutterions auf etwa 60 % abgesunken. Nach 50 Laserschüssen (s. Abb. 3.28 b)) ist das Mutterion fast vollständig verschwunden. Die beiden intensivsten Peaks bei  $m/z = 160$  *Da* und  $m/z = 144$  *Da* entstehen direkt aus dem Mutterion. Die Folgefragmentierungen dieser beiden Fragmente laufen mit deutlich geringerer Effizienz ab. Auch nach 100 Laserschüssen (s. Abb. 3.28 c)) haben die Peaks bei 115/116 *Da* und 130/131 *Da* nur eine geringe Intensität. Dies lässt auf eine stark veränderte Anregungswahrscheinlichkeit schließen. Der  $D_0 - D_1$ -Übergang des Tryptamin Radikalkation ist stark zu niedrigeren Energien verschoben [14], so dass eine resonante Anregung zumindest zu einem höheren Zustand möglich sein sollte. Verantwortlich für die geringe Folgefragmentierung ist wahrscheinlich eine Veränderung der Anregungswahrscheinlichkeit auf Grund der Radikalbildung im Indolring.

### 3.2.6 Wellenlängenabhängigkeit der Fragmentierung

Trägt man die Abhängigkeit der Intensität der Fragmentierung von der Photonenenergie auf, so erhält man das in Abb. 3.31a) dargestellte Spektrum des protonierten Tryptamins.

Die vibronische Struktur des Spektrums ist nur schwach ausgeprägt. Dennoch lässt sich ein Peak bei  $35\,120 \pm 50\text{ cm}^{-1}$  erkennen. Dieser wird den überlagerten  $S_0 - S_1$ -Übergängen der verschiedenen Strukturen zugeordnet. Durch Stichproben wurde überprüft, dass bei geringeren Anregungsenergien keine Absorption stattfindet. Die Absorption des neutralen Tryptamins beginnt bei  $34\,834\text{ cm}^{-1}$  [91]. Im Vergleich zum neutralen Tryptamin ist die Absorption des protonierten Tryptamins um  $\approx 300\text{ cm}^{-1}$  zu höheren Energien verschoben. Nach dem Peak folgt ein breiter Anstieg. Dieser wird vermutlich durch die zunehmende Zustandsdichte im  $S_1$  hervorgerufen.

Es ergibt sich die gleiche Situation wie beim Tryptophan. Im Vergleich zum Tryptophan (s. Abb. 3.18) fällt auf, dass der Peak deutlich schwächer ausgeprägt ist. Dafür sind mehrere Gründe denkbar. Es ist möglich, dass die experimentellen Bedingungen nicht optimal gewählt waren. Es ist auch möglich, dass die Linien durch die kurze  $S_1$ -Lebensdauer von  $250 \pm 50\text{ fs}$  [14] verbreitert werden. Die kurze Lebensdauer verursacht eine Energieverbreiterung von  $60\text{ cm}^{-1}$ , die damit im Bereich der Energieabstände der  $S_0 - S_1$ -Übergänge der Konformere liegt.

Tryptamin bildet vergleichsweise stabile Cluster, die in Ausnahmefällen isoliert werden konnten. Die Isolierung ist für die Aufnahme von Photofragmentspektren unbedingt notwendig. Die bei der Photoanregung entstehenden Fragmente sind weitgehend mit denen durch CID identisch. Da es schon auf dem Weg in die Falle zu CID kommt (s. Abb. 2.3), müssen diese Fragmente vor der spektroskopischen Untersuchung entfernt werden. Beim Tryptamin gelang sowohl die Isolierung des Homo-Dimers als auch des Acetonaddukts (s. Abb. 3.31 b) und c)).

Spezies	Peakmaximum $\text{cm}^{-1}$
Monomer	35 120
Homo-Dimer	35 013
Tryp+Aceton	35 122

Tabelle 3.10: Lage der Übergänge des protonierten Tryptamins. Das Homo-Dimer zeigt eine deutliche Verschiebung im Vergleich zum Monomer. Das angelagerte Aceton hat keinen Einfluss auf die Lage des Peakmaximums.

Bei beiden Spektren lässt sich ein deutlicher Peak erkennen. Im Vergleich zum Spektrum des Monomers ist der Peak deutlich größer und die Flanken sind steiler. Das Peakmaxi-

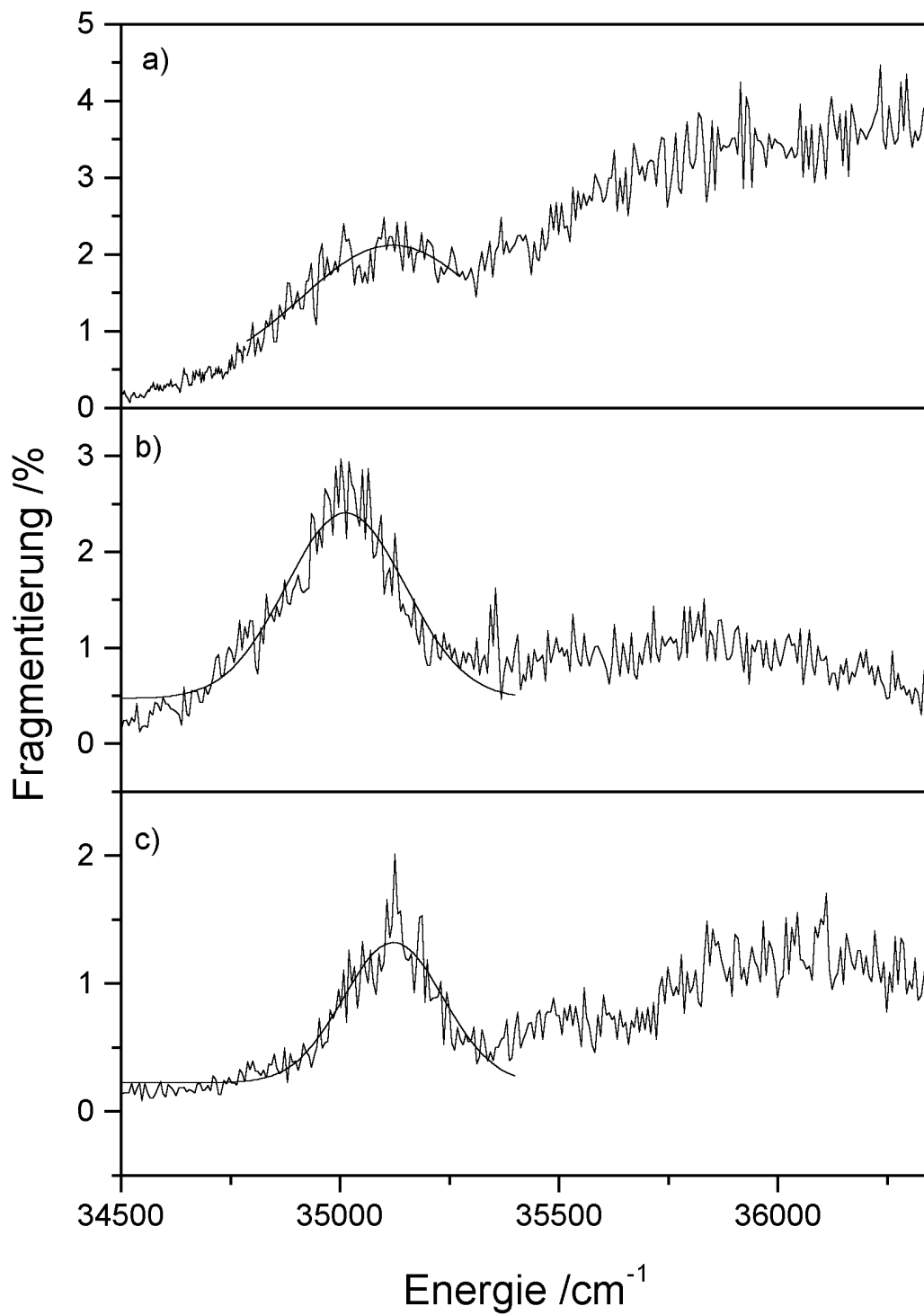


Abbildung 3.31: Wellenlängenabhängigkeit der Fragmentierung bei Tryptamin. Jeweils mit eingezeichnet ist ein Fit mit einer Gausfunktion, der zum Ermitteln des Peakzentrums dient. a) Monomer, b) Homo-Dimer, c) Tryptamin+Aceton

mum des Homo-Dimers ist etwa 100 Wellenzahlen zu niedrigeren Energien verschoben. Nach dem Peak erfolgt nur noch ein schwacher Anstieg.

Die Position des Maximums hat sich beim Tryptamin-Aceton Cluster im Vergleich zum Monomer im Rahmen der Messungenauigkeit nicht verschoben. Man kann allerdings eine deutliche Lücke zwischen dem Peak und dem breiten Anstieg erkennen. Die Lücke kommt, wie beim Tryptophan, durch das Fehlen von Schwingungszuständen zwischen den *in-plane* Schwingungen des Indolrings ( $> 400 \text{ cm}^{-1}$ ) zustande [92].

Die deutlich schärfere Struktur, sowohl im Spektrum des Homo-Dimers, als auch des Acetonclusters, kann mehrere Ursachen haben. Es ist möglich, dass sich die Lage der konischen Durchschneidung des  $\pi\pi^*$ - mit dem  $\pi\sigma^*$ -Zustand zu höheren Energien verschoben hat. Als Folge davon würde die Lebensdauer des  $S_1$  stark zu- und die Breite der Peaks entsprechend abnehmen.

Die zweite Ursache kann die Temperatur der Cluster sein. Cluster konnten nur bei gekühlter Falle beobachtet werden. Sie sind damit ein Indiz für die innere Energie der beobachteten Ionen. Das Isolieren der Cluster ist neben der Massenselektion auch eine Temperaturselektion. Nur Ionen, deren innere Energie unterhalb der Bindungsenergie der Cluster liegt, werden isoliert. Die Durchschnittstemperatur des beobachteten Ensembles ist wahrscheinlich geringer als die des Monomers. Dies kann zu einer verminderten Populierung von *hot bands* im Spektrum führen. Da der beobachtete Peak eine Umhüllende für die niederenergetischen Schwingungsmoden des Ions darstellt, würde eine Verringerung der *hot bands* den Peak aufsteilen.

Als dritte Ursache ist es möglich, dass bei der Bildung von Clustern, die Anzahl der Konformere reduziert wird. Damit würde die Liniendichte sinken und die Strukturen schärfer werden.

## 3.3 Tyrosin

### 3.3.1 Struktur und Nomenklatur

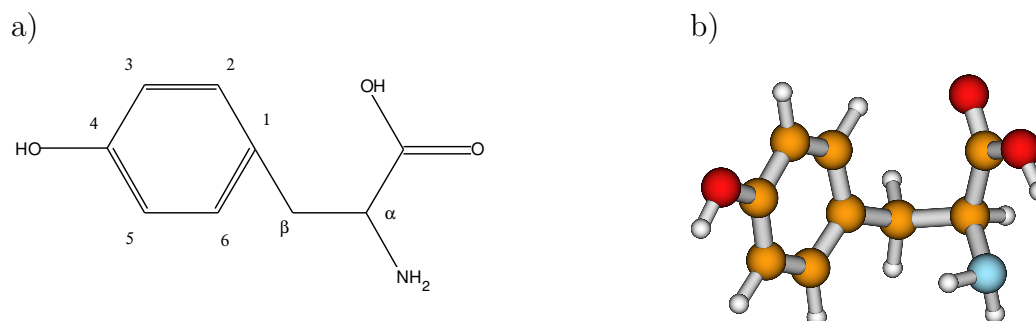


Abbildung 3.32: a) Lewisstruktur von Tyrosin. Die Nummerierung folgt den Richtlinien der IUPAC b) Dreidimensionale Struktur eines der niederstenergetischen Konformere.

Der systematische Name für Tyrosin lautet *2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)-propansäure*. Die Nummerierung in Abb. 3.32a) folgt den Regeln der IUPAC. Die 1 Position bezeichnet die Stelle, an der sich die Alkylkette befindet [73].

Durch Drehung um die  $C\text{-}\alpha\text{-}C\text{-}\beta$ -Bindung ergeben sich drei Orientierungen. Dabei sind jeweils zwei Orientierungen für die  $OH\text{-}$  und  $NH_2$ -Gruppe möglich. Somit erhält man zwölf mögliche Konformere durch die Orientierungsmöglichkeiten der Alkylkette. Für jede dieser Möglichkeiten gibt es jeweils zwei Orientierungsmöglichkeiten der  $OH\text{-}$ -Gruppe am Ring, so dass insgesamt 24 Konformere möglich sind [98].

Wie beim Tryptophan [72] und Phenylalanin [99] ergeben sich die stabilsten Konformere des Tyrosins, wenn sowohl die Carboxyl- als auch die Aminogruppe zum aromatischen Ring zeigen (s. Abb. 3.32b)). Die unterschiedliche Orientierung der  $OH\text{-}$ -Gruppe erzeugt jeweils Konformerenpaare, deren Energien sich jeweils um weniger als  $40\text{ cm}^{-1}$  unterscheiden [98].

Die bevorzugte Protonierungsstelle für das Tyrosin ist ebenfalls die Aminogruppe [66, 67]. Entscheidend für die Stabilität der Konformere ist die Position der Aminogruppe zum Ring. Kann die Aminogruppe mit dem  $\pi$ -System des Rings interagieren, kommt es zu einer deutlichen Stabilisierung. Entsprechend ungünstig sind Konformere, in denen die Aminogruppe in Anti-Position zum Ring steht.

Wie in Tab. 3.11 zu sehen ist, sind die Konformere **1** und **2** in Abb. 3.33 fast isoenergetisch. Die Position der phenolischen  $OH$ -Gruppe hat nur geringen Einfluss auf die relative Stabilität. Konformere, bei denen die Carboxylgruppe um  $180^\circ$  gedreht, ist liegen über  $1000\text{ cm}^{-1}$  oberhalb von Konformer **1**.

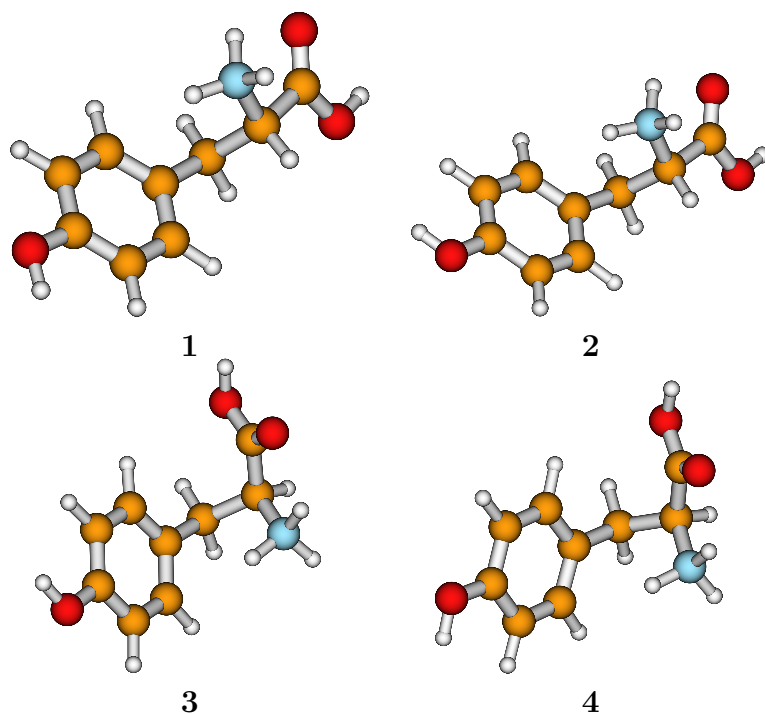


Abbildung 3.33: Die vier niederstenergetischen Konformere des protonierten Tyrosins.

Konformer	rel. Energie $/cm^{-1}$
1	0
2	9
3	211
4	255

Tabelle 3.11: Relative Energien der vier günstigsten Konformere des Tyrosins. Die Nummerierung entspricht der in Abb. 3.33. Zur Geometrieoptimierung wurde Gaussian98 unter Verwendung von B3LYP/6-311++G\*\* verwendet.

Alle vier Konformere liegen energetisch nah zusammen. Die Interne Energie der Ionen im Einlassbereich liegt nah an der Dissoziationsgrenze. Es können also mehrere Konformere in der Falle vorliegen.

### 3.3.2 ESI-MS von Tyrosin

In Abb. 3.34 ist das Elektrospraymassenspektrum von Tyrosin dargestellt. Neben dem Mutterionensignal bei  $m/z = 182$  Da für das protonierte Tyrosin sind noch einige andere Massen zu erkennen, die in Tab. 3.12 zusammengefasst sind.

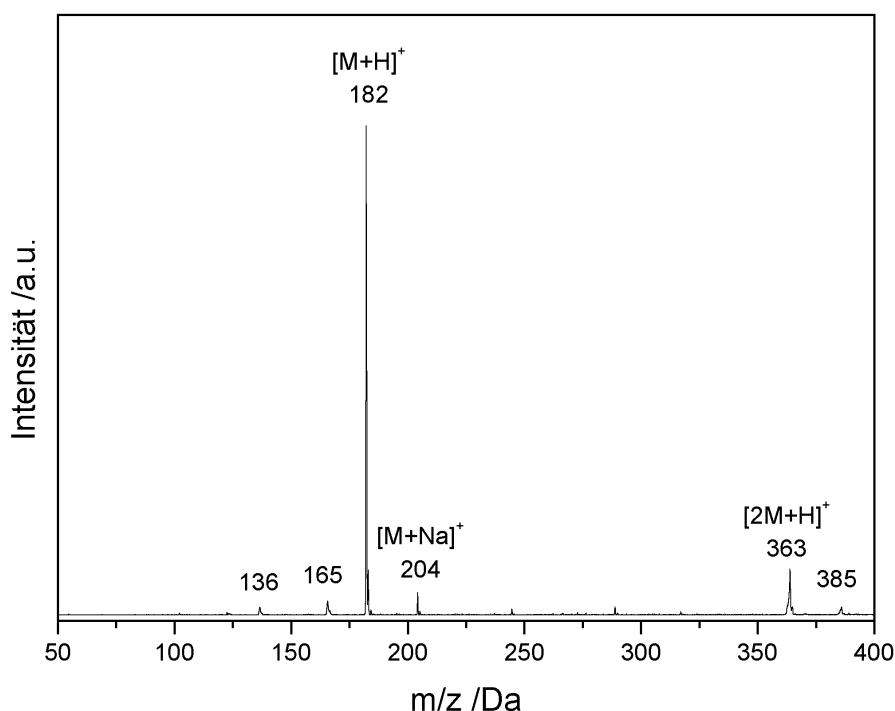


Abbildung 3.34: ESI-MS von Tyrosin. Das Mutterion  $[M + H]^+$  ist der intensivste Peak. In geringem Maße sind Fragmentionen vorhanden. Das Dimer hat nur einen verschwindenden Anteil am Ionensignal.

Das Signal des Dimers hat nur eine geringe Intensität. Deutlich erkennbar ist allerdings das Natriumaddukt bei  $m/z = 204$  Da, das im Massenspektrum von Tryptophan (s. Abb. 3.3) nicht zu erkennen ist. Die Protonenaffinität des Tyrosins ist tendenziell etwas kleiner als die des Tryptophans [67, 100, 101]. Dies könnte eine mögliche Ursache für das Auftreten des Natriumaddukts sein. Desweiteren sind beide für protonierte Aminosäuren typische Fragmentierungspfade zu erkennen. Der Verlust von Ammoniak  $m/z = 165$  Da ist stärker als der aufeinander folgende Verlust von  $H_2O$  und  $CO$  mit  $m/z = 136$  Da.

Das Massenspektrum von Tyrosin unterscheidet sich damit deutlich von dem des Tryptophans (s. Abb. 3.3). Beim Tryptophan ist das Dimer der intensivste Peak, wohingegen das Dimer beim Tyrosin kaum gebildet wird. Die Fragmentierung des Tryptophans erfolgt ausschließlich über den Verlust von Ammoniak, wohingegen beim Tyrosin zwei Fragmen-

Masse /Da	Differenz /Da	Fragment
385		$[2M + Na]^+$
363		$[2M + H]^+$
204		$[M + Na]^+$
182		$[M + H]^+$
165	17	$[M + H - NH_3]^+$
136	46	$[M + H - CO - H_2O]^+$

Tabelle 3.12: Liste der im ESI-Massenspektrometer von Tyrosin beobachteten Ionen.

te ( $[M + H - CO - H_2O]^+$  und  $[M + H - NH_3]^+$ ) beobachtet werden. Die Tendenz, Adduktionen mit Natrium zu bilden, ist beim Tyrosin im Vergleich mit Tryptophan deutlich stärker.



### 3.3.3 Kollisionsinduzierte Fragmentierung

Wie in Abb. 3.35 a) zu sehen ist, folgt die Fragmentierung des protonierten Tryptamins zwei verschiedenen Pfaden. Die beiden intensivsten Peaks bei  $m/z = 165 \text{ Da}$  und  $m/z = 136 \text{ Da}$  in Abb. 3.35 entstehen durch den Verlust von Ammoniak bzw. von Wasser und Kohlenmonoxid (s. Abb. 3.36). Die übrigen Fragmente in Abb. 3.35a) entstehen durch Folgefragmentierung dieser beiden Fragmente. Durch Folgefragmentierungen der Massen  $m/z = 165 \text{ Da}$  in Abb. 3.35b) und  $m/z = 136 \text{ Da}$  in Abb. 3.35c) lassen sich alle Fragmente die in Abb. 3.35a) zu sehen sind, einem dieser beiden Fragmentierungspfade zuweisen.

Der Verlust von Ammoniak ist der bevorzugte Fragmentierungspfad des Tyrosins. Es bildet damit (zusammen mit Tryptophan) eine Ausnahme im Fragmentierungsverhalten der natürlichen  $\alpha$ -Aminosäuren, bei denen mehrheitlich  $H_2O$  und  $CO$  abgespalten werden, wobei sich als Fragment ein Immoniumion bildet. [80, 82, 45].

Fragmentiert man das Hauptfragment  $m/z = 165 \text{ Da}$  weiter, so entstehen drei weitere Fragmente (s. Abb. 3.35 b)). Der intensivste Peak entsteht formal durch den Verlust von Wasser. Für das resultierende Fragment ist eine ketenähnliche Struktur denkbar. Ausgehend von der Summenformel des Tyrosins lassen sich für das Fragmente  $m/z = 123 \text{ Da}$  fünf verschiedene Summenformeln aufstellen. Unter der Annahme, dass im ersten Schritt Ammoniak abgespalten wurde, bleiben drei Summenformeln mit dieser Masse möglich:  $C_6H_3O_3$ ,  $C_7H_7O_2$  und  $C_8H_{11}O$ . Die Summenformel  $C_6H_3O_3$  enthält zu wenig Wasserstoff, um eine sinnvolle Struktur zu bilden. Bei der Fragmentierung des Immoniumions  $m/z = 136 \text{ Da}$  (s. Abb. 3.35c)) wird dieses Fragment nicht gebildet. Dies spricht für die Summenformel  $C_7H_7O_2$ , da diese aus dem Immoniumion nicht mehr gebildet werden kann. Das Fragment  $m/z = 123 \text{ Da}$  wird durch den Verlust eines Neutralfragments der Masse  $42 \text{ Da}$  gebildet. Dies entspricht dem Fragment  $m/z = 146 \text{ Da}$  beim Tryptophan, welches vermutlich durch den Verlust von Keten gebildet wird [45]. Der entsprechende Kettenverlust beim Tyrosin würde zu  $C_7H_7O_2$  führen.

Für das Fragment  $m/z = 119 \text{ Da}$  sind acht verschiedene Summenformeln denkbar. Da dieses Fragment bei beiden Fragmentierungswegen gebildet wird, kann weder die Säuregruppe noch die Aminogruppe für dessen Formierung nötig sein. Daraus ergibt sich, dass die Summenformel maximal acht Kohlenstoff-, ein Sauerstoff- und kein Stickstoffatom enthalten darf. Unter diesen Voraussetzungen ist nur die Summenformel  $C_8H_7O$  möglich. Für die Bildung dieses Fragments müssen  $NH_3$ ,  $H_2O$  und  $CO$  abgespalten werden. Das Fragment  $m/z = 119 \text{ Da}$  kann in beiden  $MS^3$  Spektren (s. Abb. 3.35b) und 3.35c)) beobachtet werden. Die Reihenfolge, in der die einzelnen Neutralfragmente abgespalten werden, ist dabei also nicht von Bedeutung.

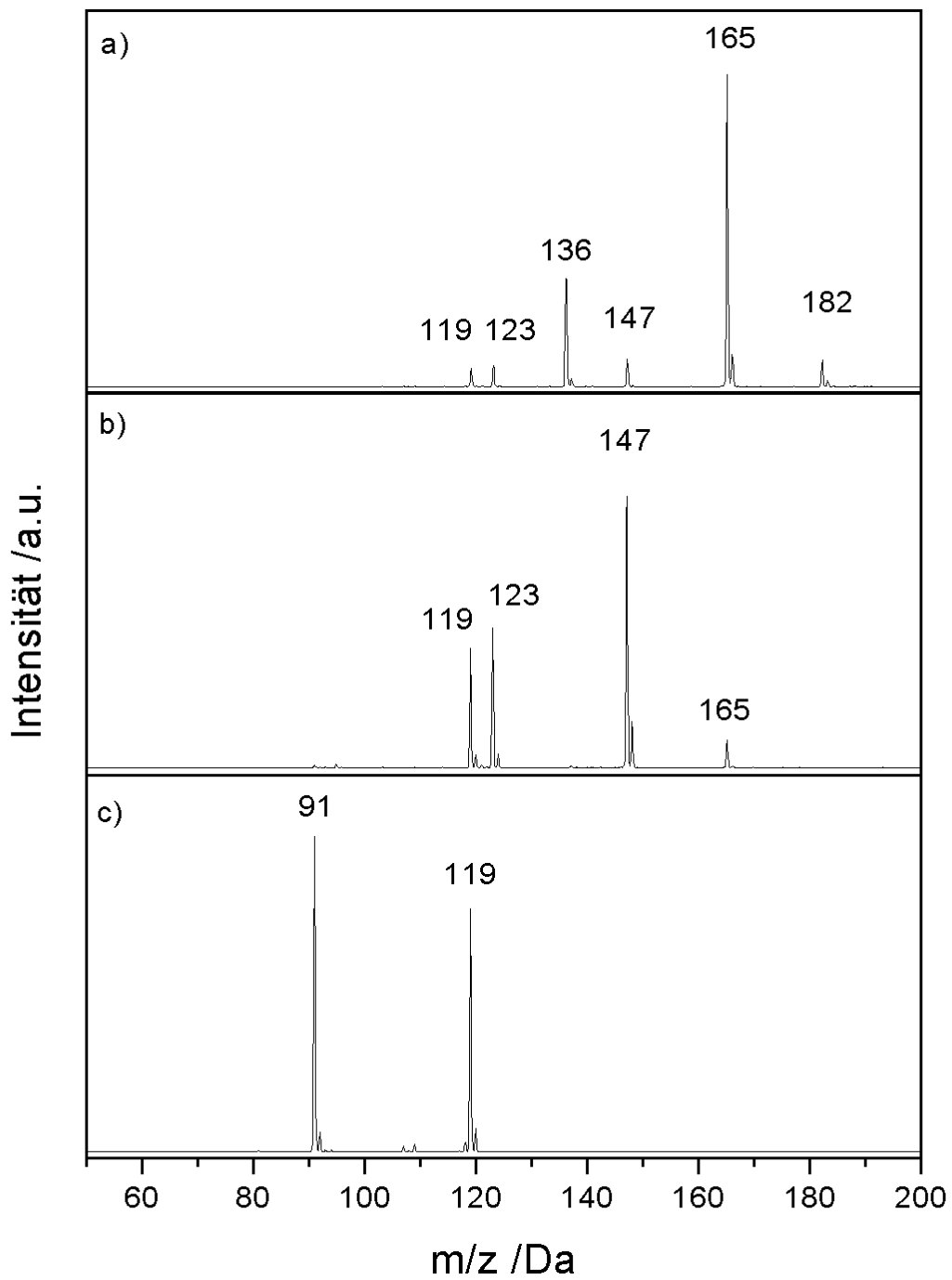


Abbildung 3.35: Kollisionsinduzierte Fragmentierung von Tyrosin. a) Fragmentierung des Mutterions  $m/z = 182$  Da, b) Fragmentierung von  $m/z = 165$  Da, c) Fragmentierung von  $m/z = 136$  Da.

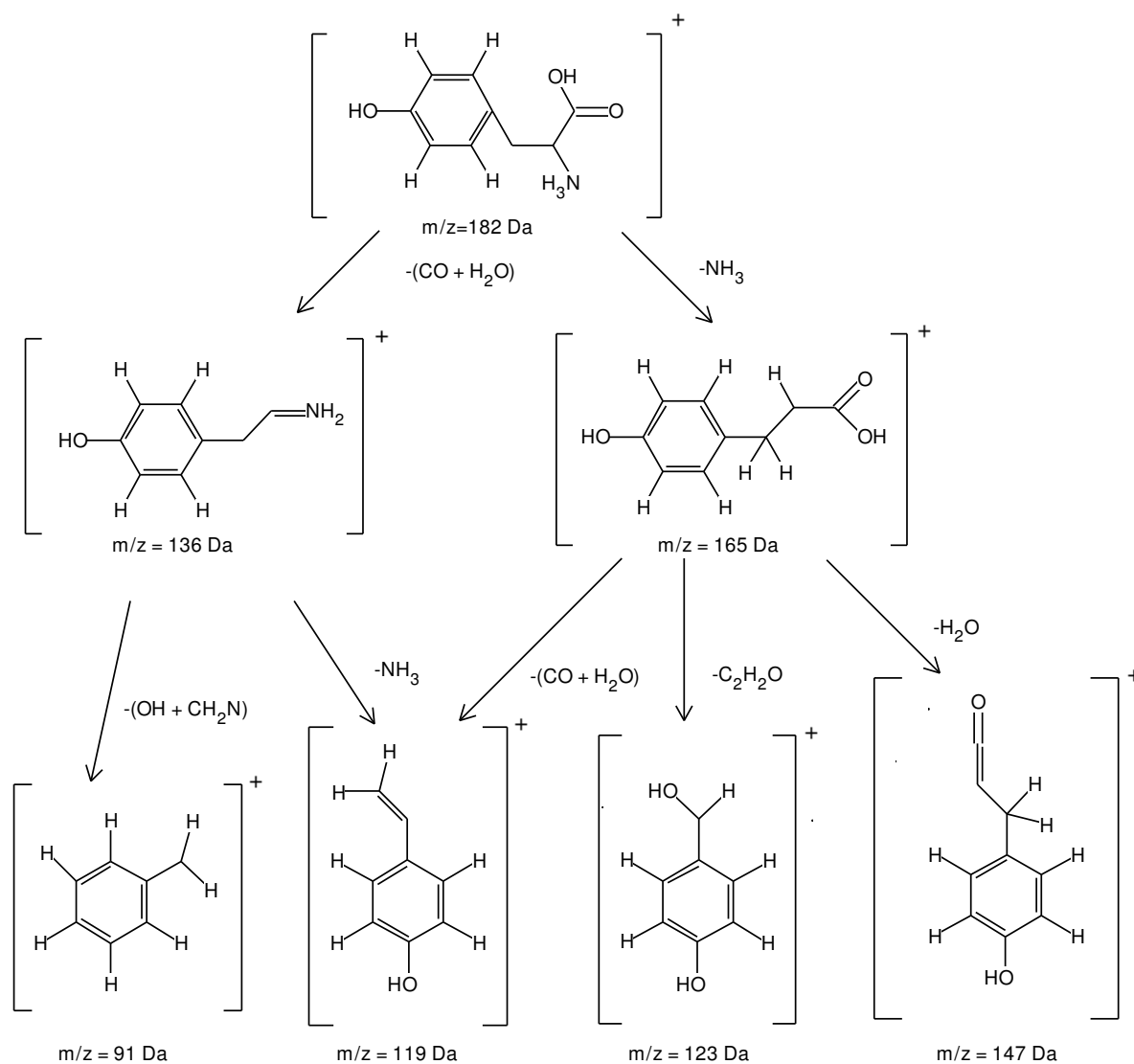


Abbildung 3.36: Mögliche Fragmentierungspfade für das protonierte Tyrosin.

Für das Fragment  $m/z = 91$  Da lässt sich keine eindeutige Summenformel ermitteln. Ausgehend von der Summenformel des Tyrosins, sind acht Summenformeln möglich. Nach Ausschluss aller Möglichkeiten, die mehr als ein Sauerstoffatom enthalten, bleiben zwei Möglichkeiten bestehen:  $\text{C}_7\text{H}_7$  und  $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$ . Geht man davon aus, dass die Aromatizität des Rings erhalten bleibt, so enthält die Summenformel  $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$  zu wenig Wasserstoff. Entsprechend bleibt das Tropyliumkation  $\text{C}_7\text{H}_7$  als die wahrscheinlichere Struktur für das Fragment  $m/z = 91$  Da.

### 3.3.3.1 Vergleich der CID-Spektren von Phe, Tyr und Trp

Vergleicht man die Fragmentierung der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, so sieht man, dass zwei verschiedene Fragmentierungspfade existieren,

die unterschiedlich stark angesprochen werden.

Man geht allgemein davon aus, dass bei der Decarboxylierung ein Immoniumion der Form  $[R - C = N]^+$  gebildet wird. Beim Tryptophan wird bei der Struktur des Fragments häufig davon ausgegangen, dass ein nukleophiler Angriff vom Indolring auf die  $C-\alpha$ -Position stattfindet [80, 82, 83]. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass alle aromatischen  $\alpha$ -Aminosäuren Ammoniak abspalten können [45]. Es ist unwahrscheinlich, dass die Struktur des Indolrings ausschlaggebend für dieses Verhalten ist. Der Rest scheint die relative Energie der beiden Fragmentierungspfade zu beeinflussen. Beim Phenylalanin liegt die Aktivierungsenergie des Kanals, der zur Decarboxylierung führt, deutlich unter dem, für den Ammoniakverlust. Beim Tyrosin ist der Ammoniakverlust schon energetisch günstiger [45], und beim Tryptophan ist der Ammoniakverlust so weit energetisch begünstigt, dass nur noch die Ammoniakabspaltung beobachtet wird. Dies entspricht auch der Fähigkeit des Rests, eine positive Ladung zu kompensieren.

	Ammoniakverlust /%	Decarboxylierung /%
Phenylalanin	0	100
Tyrosin	70	30
Tryptophan	100	0

Tabelle 3.13: Intensitätsverteilung auf die beiden Fragmentierungspfade bei den drei aromatischen Aminosäuren.

Das Verhältnis, mit dem die beiden Fragmente  $165 Da$  und  $136 Da$  gebildet werden, hängt stark von den experimentellen Bedingungen ab. Hochenergetische Stöße führen zu einer verstärkten Decarboxylierung [102], wohingegen, unter niederenergetischen Bedingungen hauptsächlich Ammoniak abgespalten werden kann (s. Abb 3.35).

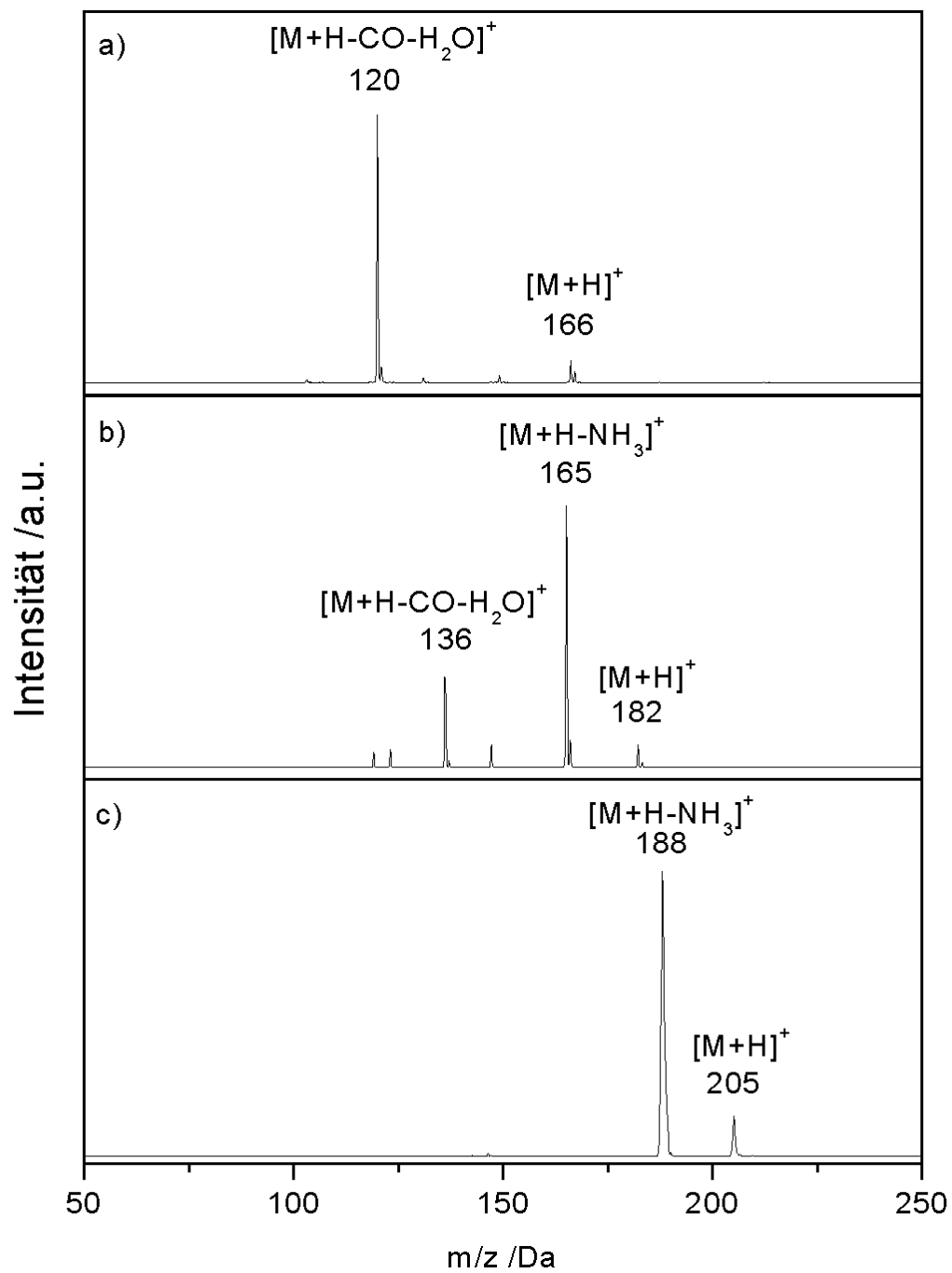


Abbildung 3.37: Vergleich der CID Spektren von a) Phenylalanin, b) Tyrosin und c) Tryptophan.

### 3.3.4 Einfluss der Temperatur auf die Massenspektren

Kühlt man die Paul-Falle so bildet Tyrosin Cluster mit dem Hintergrundgas (s. Abb. 3.38). Es werden vornehmlich Cluster mit dem Lösungsmittel gebildet, allerdings ist auch der Stickstoffcluster deutlich zu erkennen.

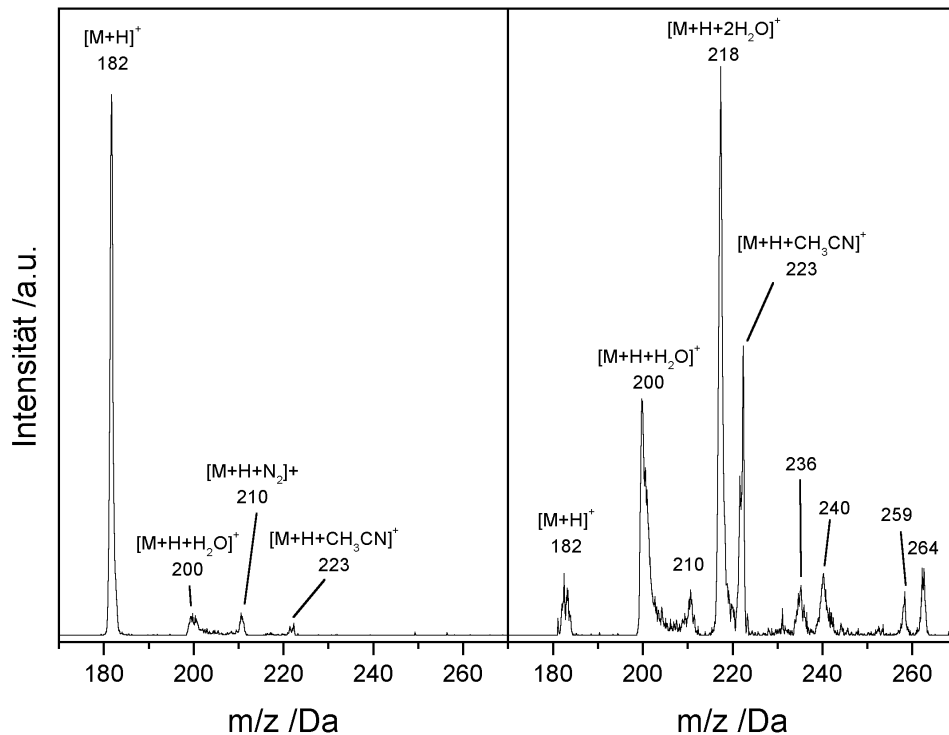


Abbildung 3.38: Bei gekühlter Falle bildet Tyrosin Cluster mit dem Restgas. a) Massenspektrum mit 10 *ms* Verzögerung und b) Massenspektrum mit 500 *ms* Verzögerung zwischen Isolation und Massenanalyse.

Bevorzugt werden Wassercluster gebildet. Schon bei kürzest möglichem Delay (s. Abb. 3.38a)) ist der Wassercluster  $m/z = 200$  Da deutlich zu erkennen. Auch bei längeren Verzögerungen (s. Abb. 3.38c)) sind die Wassercluster dominant. Neben dem einfachen Wassercluster  $m/z = 200$  Da ist auch das Tyrosin mit zwei ( $m/z = 218$  Da) und drei ( $m/z = 236$  Da) angelagerten Wassermolekülen zu sehen.

In Abb. 3.39 ist der zeitliche Verlauf der Intensitäten der wichtigsten Cluster in der Paul-Falle abgebildet. Der exponentielle Abfall des Mutterions (s. Kap. 3.5) ist gut zu erkennen. Bei etwa 200 *ms* erreicht der Wassercluster  $[M + H + H_2O]^+$  die größten Anteil am Ionenstrom. Danach verliert er auf Kosten der größeren Cluster wieder an Signalstärke. Der Intensitätsverlauf dieses Clusters ist typisch für Folgereaktionen. Die Intensität des Clusters  $[M + H + 2H_2O]^+$  übersteigt bei etwa 300 *ms* die des einfachen

Masse /Da	Massendifferenz /Da	Cluster
182	0	$[M + H]^+$
200	18	$[M + H + H_2O]^+$
210	28	$[M + H + N_2]^+$
218	36	$[M + H + 2H_2O]^+$
223	41	$[M + H + CH_3CN]^+$
236	54	$[M + H + 3H_2O]^+$
241	59	$[M + H + H_2O + CH_3CN]^+$
259	77	$[M + H + 2H_2O + CH_3CN]^+$
264	82	$[M + H + 2CH_3CN]^+$

Tabelle 3.14: Liste der beobachteten Cluster im Massenspektrum von Tyrosin.

Wasserclusters.

Die Bildungsraten der Wassercluster ist deutlich größer, als die des Clusters mit Acetonitril. Die Intensität der Acetonitrilcluster bleibt immer unter dem der Wassercluster. Da der Anteil des Acetonitrils im Lösungsmittel höher als der Wasseranteil ist (s. Kap. 2.3.1), würde bei gleichen Bildungsraten die Intensität der Wassercluster geringer sein.

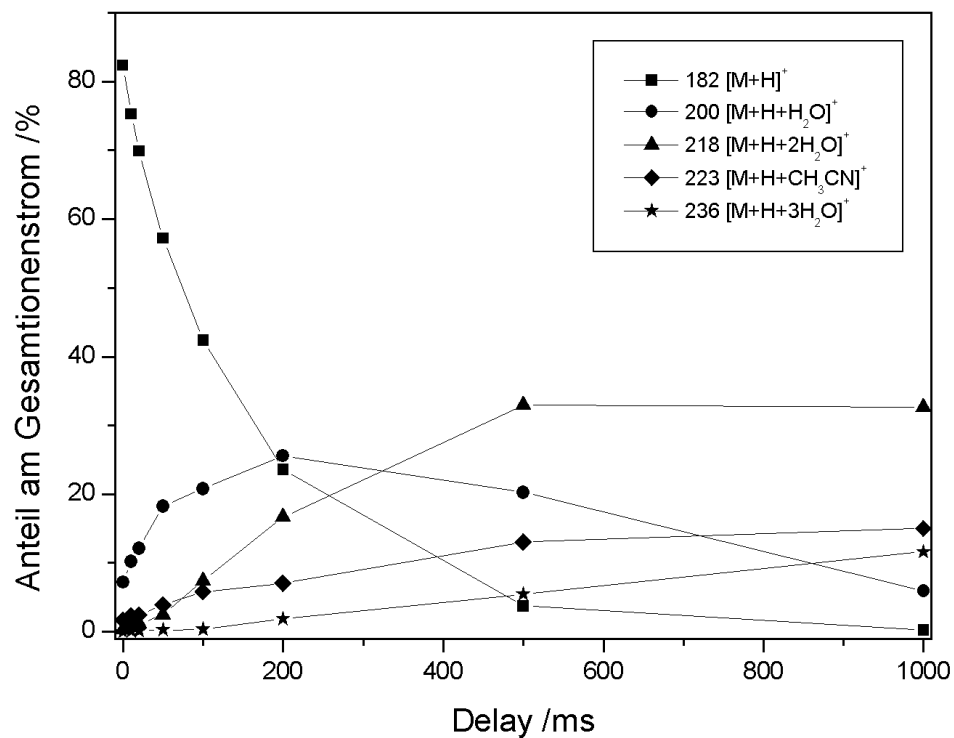


Abbildung 3.39: Intensität der wichtigsten Cluster in Abhängigkeit von der Wartezeit in der Paul-Falle zwischen Massenselektion und Massennachweis. Am schnellsten werden Wassercluster gebildet. Es können Cluster mit ein, zwei und drei angelagerten Wassermolekülen beobachtet werden. Die Intensität des Addukts mit Acetonitril ist vergleichsweise gering.



### 3.3.5 Photofragmentierung von Tyrosin

Die Photofragmentierung in Abb. 3.40 führt zu einem ähnlichen Ergebnis, wie die kollisionsinduzierte Fragmentierung in Abb. 3.35. Allerdings hat sich der Anteil der einzelnen Fragmentierungspfade stark verschoben. Das Hauptfragment im CID-Massenspektrum ist  $m/z = 165 Da$ , das während der Photofragmentierung nur in geringem Maße gebildet wird. Das Fragment  $m/z = 123 Da$  in Abb. 3.40c) ist ein Folgefragment, das nur aus dem Fragment  $m/z = 165 Da$  entstehen kann. Das Fragment  $m/z = 119 Da$  kann durch Decarboxylierung ebenfalls aus  $m/z = 165 Da$  gebildet werden. Es wird also anteilig durch diesen Fragmentierungsweg entstanden sein. Nach der Abspaltung von Ammoniak schließt sich demnach direkt die Abspaltung von Keten bzw. die Decarboxylierung an (s. Abb. 3.36). Dennoch ist die Intensität der Fragmente aus diesem Kanal deutlich geringer als die durch Decarboxylierung.

Primärfragment der Decarboxylierung ist die Masse  $m/z = 136 Da$ , die im PID Spektrum die größte Intensität hat. Das Fragmente  $m/z = 91 Da$  und anteilig das Fragment  $m/z = 119 Da$  können durch die CID-Spektren in Abb. 3.35 eindeutig diesem Fragmentierungspfad zugewiesen werden. Das Fragment  $m/z = 95 Da$  konnte in den CID Spektren nicht beobachtet werden. Wiederum ausgehend von der Summenformel  $C_9H_{12}NO_3$  für das protonierte Tyrosin sind nur 8 Summenformeln für dieses Fragment denkbar. Unter der Voraussetzung, dass der aromatische Ring erhalten bleibt, sind noch die Summenformeln  $C_7H_{11}$ ,  $C_6H_9N$  und  $C_6H_7O$  denkbar. Nur  $C_6H_7O$  lässt sich einer chemisch sinnvollen Struktur, nämlich der des protonierten Phenols, zuordnen.

Anders als bei Tryptophan (s. Tab. 3.3) und Tryptamin (s. Tab. 3.9) konnten beim Tyrosin keine radikalischen Fragmente beobachtet werden.

Vorherige Untersuchungen der kollisionsinduzierten Fragmentierung des Tyrosins haben sehr unterschiedliche Aufteilungen auf die beiden Fragmentierungspfade ergeben [55, 80, 82, 45, 102]. Ausschlaggebend scheint dabei die innere Energie der Ionen bei der Fragmentierung zu sein. Bei kleinen Energien, wie sie bei CID auftreten, kann nur ein Kanal angesprochen werden (s. Abb. 3.41). Je höher die Energie ist, desto stärker tritt die Decarboxylierung in den Vordergrund. Bei großen Energien kann es zu einem Schnitt der Raten kommen. In diesem Fall wird bei hohen Energien, wie sie bei der photoinduzierten Fragmentierung verwendet wird, mehrheitlich ein anderes Fragment gebildet. Die Aktivierungsenergie für die Fragmentierung der protonierten Aminosäuren liegt deutlich unter der eingestrahlt Photonenergie von etwa  $4,3 eV$  [45]. Entsprechend ist die Abspaltung von Ammoniak bei der Photofragmentierung nur noch von untergeordneter Bedeutung. Nach *internal conversion* hat das Ion im Vergleich zur Kollisionsaktivierung deutlich mehr innere Energie. Entsprechend ist die Zerfallsrate für die Decarboxylierung

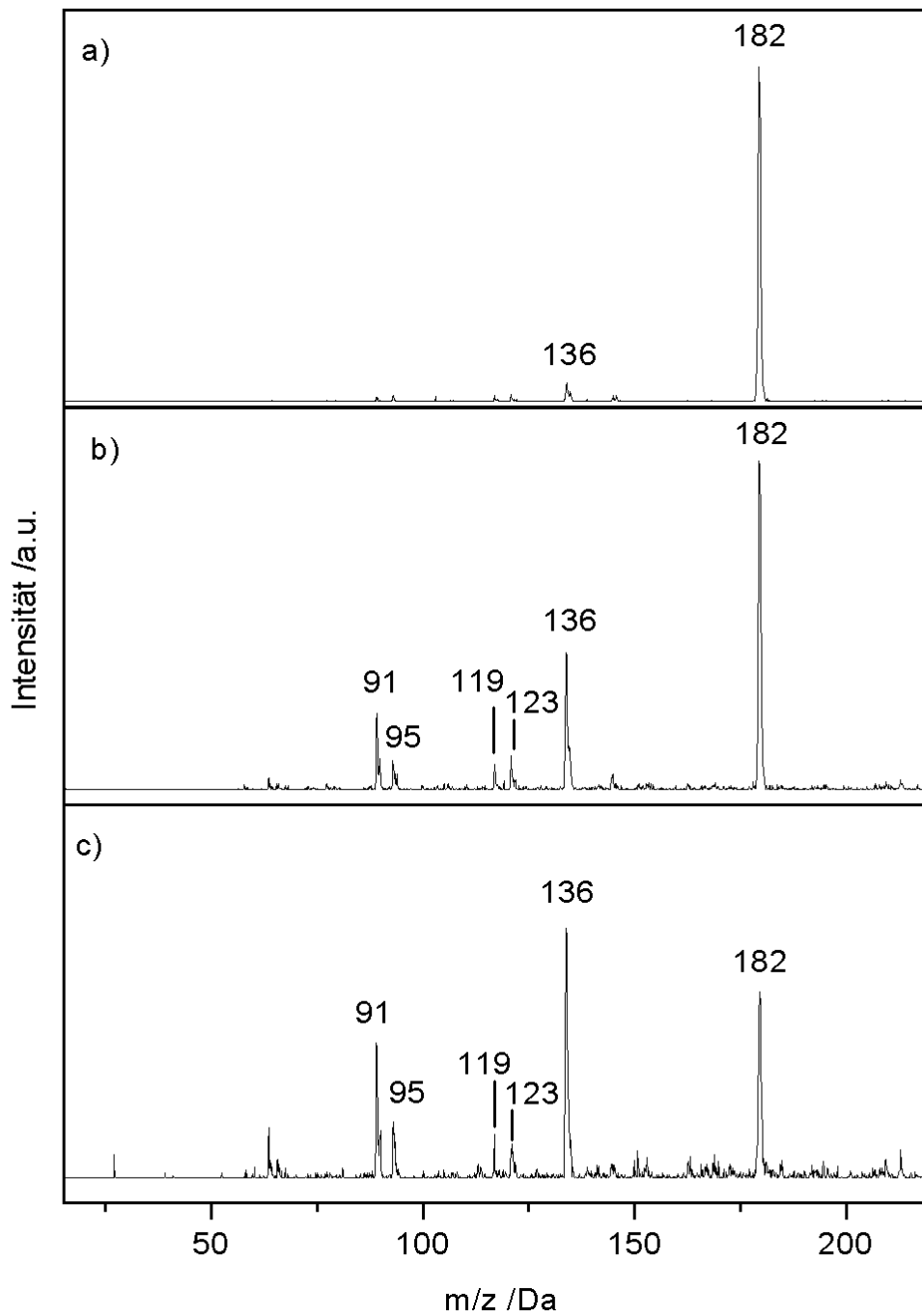


Abbildung 3.40: Photofragmentierung von Tyrosin. a) 10 Schuss, b) 50 Schuss, c) 100 Schuss. Die Pulsenergie betrug  $500 \mu J$ .

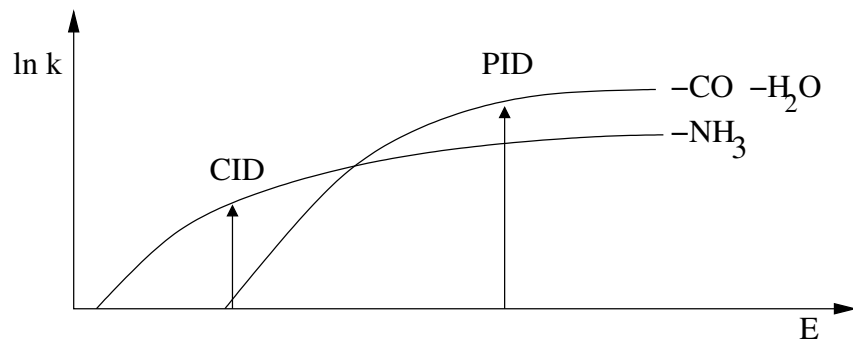


Abbildung 3.41: Schematische Darstellung der Abhängigkeit der verschiedenen Fragmentierungsrate von der inneren Energie. Bei kleinen Energien (CID) kann nur ein Fragmentierungskanal angesprochen werden. Bei großen Energien wird die Rate für die Decarboxylierung größer als die des Ammoniakverlusts (PID).

deutlich größer, als die der Ammoniakabspaltung.

### 3.3.6 Wellenlängenabhängigkeit der Photofragmentierung

In Abb. 3.42 ist die Wellenlängenabhängigkeit der Photofragmentierung von Tyrosin gezeigt. Man kann sehen, dass unterhalb von  $34\,700\text{ cm}^{-1}$  keine Fragmentierung stattfindet. Danach folgt ein Anstieg zu einem breiten Peak mit dem Maximum bei  $35\,300 \pm 50\text{ cm}^{-1}$ . Da vorher keine Fragmentierung stattfindet, wird dieses Maximum dem  $S_0 - S_1$  Übergang zugeordnet.

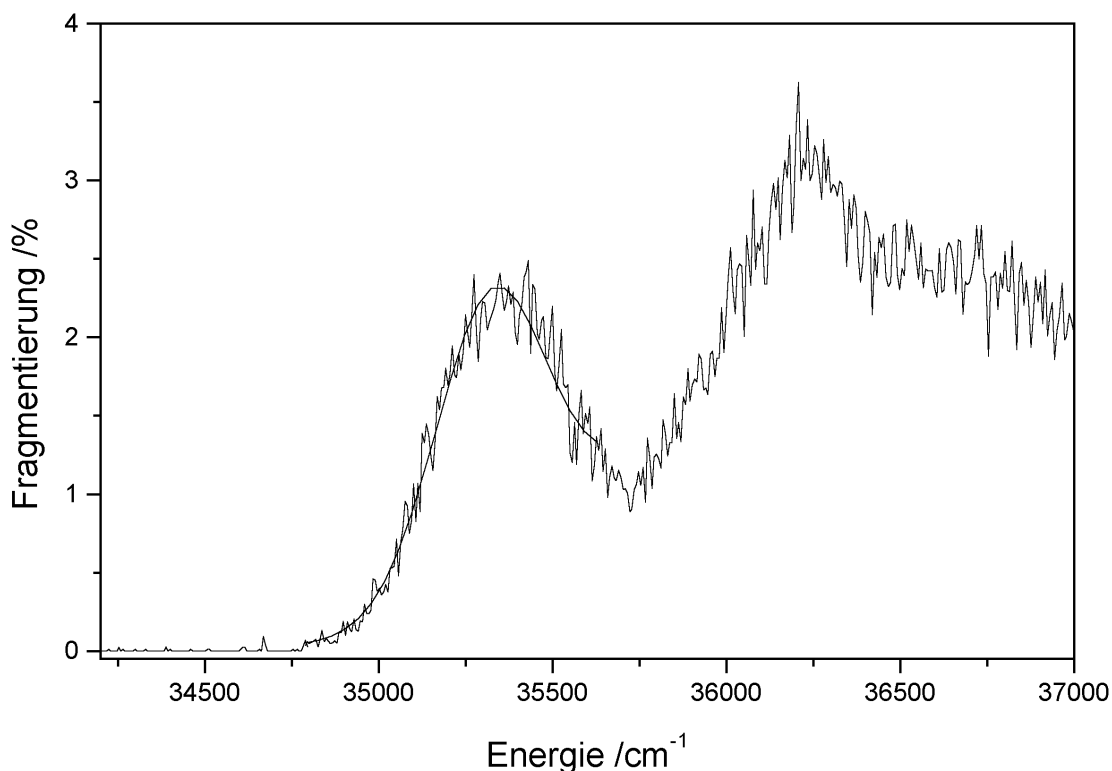


Abbildung 3.42: Wellenlängenabhängigkeit der Fragmentierung von Tyrosin. Oberhalb von  $34\,700\text{ cm}^{-1}$  setzt eine deutliche Photofragmentierung ein. Man kann ein deutliches Maximum bei  $35\,300\text{ cm}^{-1}$  erkennen. Danach folgt ein breiter Anstieg.

Der  $S_0 - S_1$  Übergang des neutralen Tyrosins liegt bei  $35\,486\text{ cm}^{-1}$  [98, 103, 104]. Innerhalb der Messungenauigkeit absorbiert das protonierte Tyrosin im gleichen Bereich, wie das Neutrale. Wie beim Tryptophan (s. Abb. 3.18) und Tryptamin (s. Abb. 3.31) lassen sich keine nennenswerten Verschiebungen des  $S_0 - S_1$  Übergangs feststellen. Die  $OH$ -Gruppe in 4-Position (s. Abb. 3.32a)) führt im neutralen Tyrosin zu einer Aufspaltung der Konformere, deren *origin* jeweils nur etwa  $5\text{ cm}^{-1}$  auseinander liegen. Insgesamt lassen sich im REMPI-Spektrum des neutralen Tyrosins sieben Konformere nachweisen. Zusammen mit den niederfrequenten Gerüstschwingungen ergibt sich eine hohe Zustandsdichte im Bereich von  $35\,500 - 35\,700\text{ cm}^{-1}$ . Danach folgt eine Lücke von mehreren hundert Wellenzahlen bis die Ringschwingungen anfangen [103].

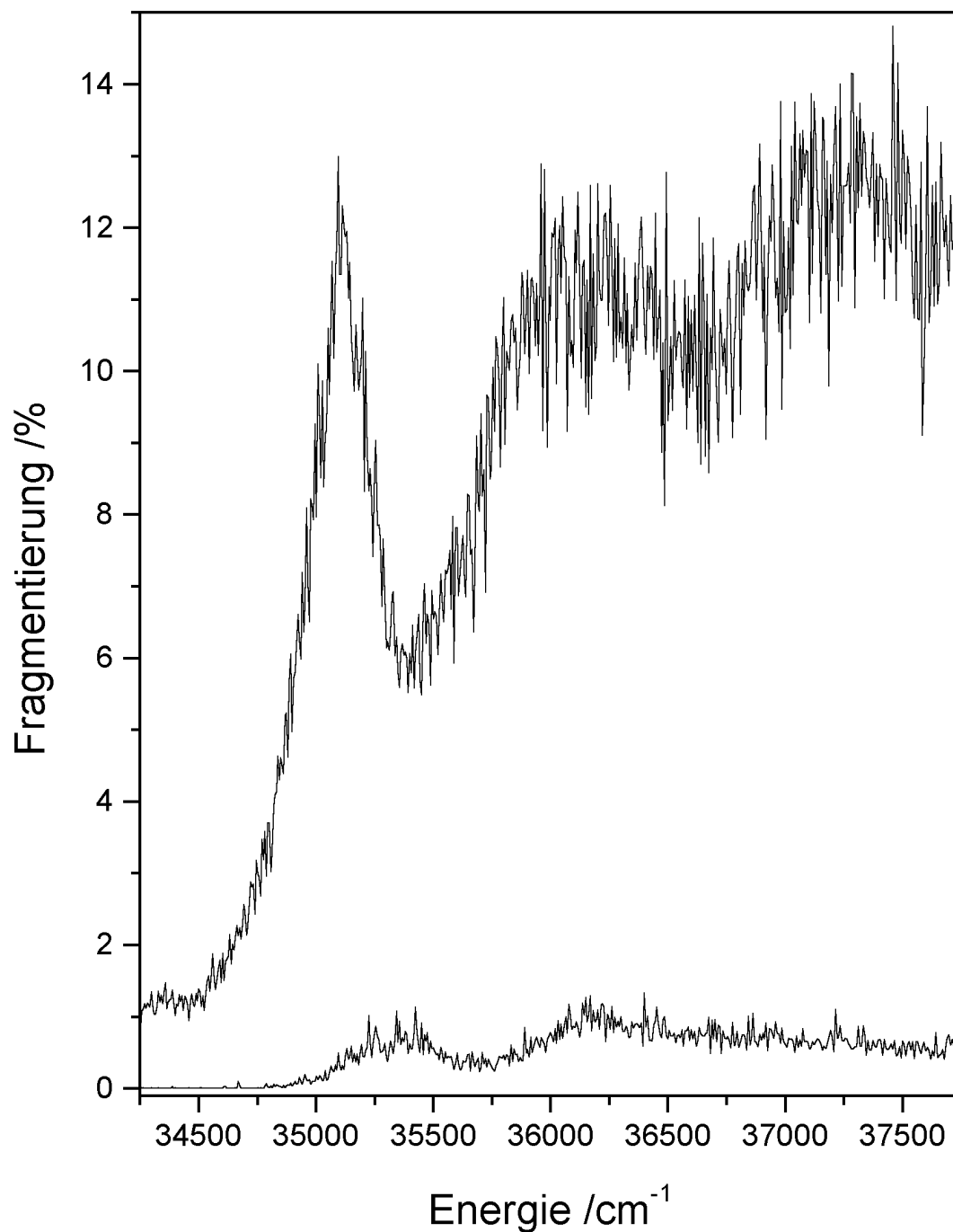


Abbildung 3.43: Vergleich der Photofragmentierung von Tryptophan und Tyrosin. Beide Spektren wurden unter gleichen Bedingungen aufgenommen. Damit ist die Stärke der Fragmentierung direkt vergleichbar. Tryptophan zeigt eine etwa 20 mal stärkere Fragmentierung als Tyrosin.

Aufgrund der fehlenden Schwingungsauflösung in Abb. 3.42 wird davon ausgegangen, dass der Peak eine Umhüllende darstellt, unter dem die *origins* von einem oder mehreren Konformeren und die niederfrequenten ( $< 50 \text{ cm}^{-1}$ ) Gerüstschwingungen liegen. Danach folgt eine Lücke zwischen den Gerüstschwingungen und den Schwingungen des aromatischen Rings und der Alkylkette, die oberhalb von  $200 \text{ cm}^{-1}$  liegen. Der Anstieg oberhalb von  $35\,700 \text{ cm}^{-1}$  entsteht durch die zunehmende Zustandsdichte der Schwingungen des Rings und der Alkylkette.

Die Photofragmentspektren in Abb. 3.43 wurden in direkt aufeinanderfolgenden Messungen aufgenommen. Die Messbedingungen wie Laserintensität, Falltemperatur und Justage des Strahlengangs sind somit identisch. Der deutliche Unterschied in der Höhe des Fragmentsignals kann daher nur durch die unterschiedliche Fragmentierungswahrscheinlichkeit hervorgerufen werden. Beide Moleküle folgen sehr ähnlichen Fragmentierungspfaden. Die Aktivierungsenergien für die Fragmentierung liegen bei beiden Molekülen unterhalb von  $2 \text{ eV}$  [45] und damit weit unterhalb der Photonenenergie ( $E_{\text{Photon}} > 4,3 \text{ eV}$ ). Das stark unterschiedliche Fragmentensignal wird deshalb der unterschiedlichen Anregungswahrscheinlichkeiten des Indol- bzw. Phenolrings zugeschrieben. Das Fragmentensignal des Tyrosins ist etwa zwanzig mal schwächer als das des Tryptophans. Im Lösungsmittel absorbiert das Tryptophan etwa vier mal besser als das Tyrosin [105].

Die Anregungswahrscheinlichkeit des Phenylalanins ist noch einmal deutlich geringer als die des Tyrosins. Aufgrund der zu geringen Laserleistung war es nicht möglich, eine ausreichende Photofragmentierung für die Aufnahme eines Photofragmentspektrums zu erreichen.

## 3.4 Adenin

### 3.4.1 Struktur und Nomenklatur

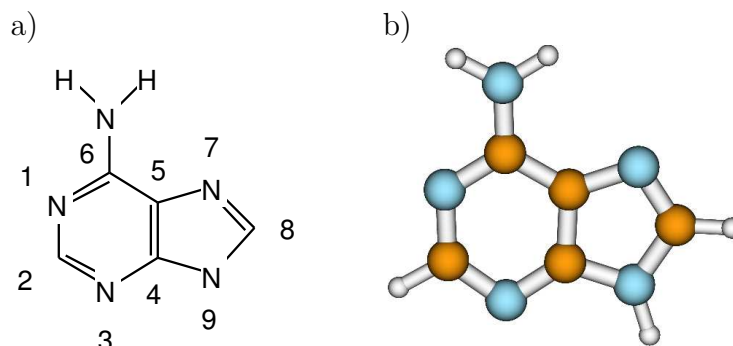


Abbildung 3.44: Adenin a) Lewisstruktur mit IUPAC-Nummerierung b) dreidimensionale Darstellung des 9H-Tautomers. Alle Atome liegen in einer Ebene.

In Abb. 3.44 a) ist die Lewisstruktur von Adenin gezeigt. Die Nummerierung folgt der Empfehlung der IUPAC [106]. Der systematische Name lautet 6-Aminopurin. Adenin gehört als Vitamin  $B_4$  zu den wasserlöslichen Vitaminen.

In der Biologie ist Adenin von zentraler Bedeutung. Es ist eine der vier Basen, die in der DNA die Erbinformationen kodieren. In der DNA ist Adenin in 9-Position an den Zucker Desoxyribose gebunden und bildet so das Nukleosid Adenosin. Adenosintriphosphat (ATP) ist ein wichtiger Energiespeicher der Zellen.

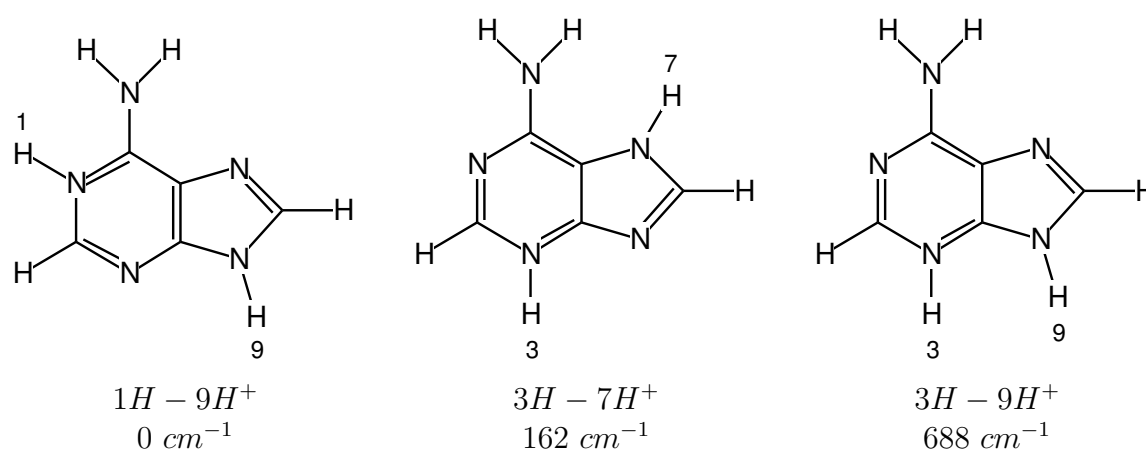


Abbildung 3.45: Die drei niederstenergetischen Tautomere des protonierten Adenins und ihre relativen Energien [49].

Adenin kann in mehreren Tautomeren vorliegen. Zur Kennzeichnung der Tautomere wird davon ausgegangen, dass  $H-2$ ,  $H-61$ ,  $H-62$  und  $H-8$  in allen Tautomeren gleich sind. Angegeben wird die jeweils unterschiedliche Position des fünften Wasserstoffatoms. Im

protonierten Adenin wird entsprechend die Position des fünften und sechsten Wasserstoffatoms angegeben.

In Abb. 3.44b) ist das in Lösung stabilste 9H-Tautomer gezeigt. Das 7H-Tautomer kommt in Lösung nur mit einem geringen Anteil vor [107, 108, 109].

Über die Struktur des protonierten Adenins ist wenig bekannt. Kristallstrukturanalysen haben ergeben, dass im Festkörper das 1H-9H-Tautomer vorliegt [110]. Experimentelle Ergebnisse für den Ort der Protonierung in der Gasphase gibt es nicht. *Ab initio* Untersuchungen haben für die Gasphase ebenfalls das 1H-9H-Tautomer als die stabilste Struktur ergeben [49]. Die positive Ladung ist jeweils vollständig delokalisiert. Eine Unterscheidung welches Wasserstoffatom das angelagerte Proton ist, ist daher nicht sinnvoll.

Die stabilsten Tautomere (1H-9H und 3H-7H) erhält man, wenn jeweils diagonal gegenüberliegende Stickstoffatome mit einem Wasserstoffatom verbunden sind. Besonders ungünstig sind Tautomere, in denen ein Kohlenstoffatom oder die Aminogruppe protoniert werden. Diese Tautomere sind nicht mehr planar und sie verlieren dadurch einen Teil der Stabilisierung durch das aromatische System.



### 3.4.2 ESI-MS von Adenin

Das ESI-Massenspektrum von Adenin (s. Abb. 3.46a)) zeigt als einzigen Peak die protonierte Substanz. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Substanzen sind im Massenspektrum weder Fragmente noch Dimere zu erkennen. Die Abwesenheit von Fragmenten deutet auf eine höhere Stabilität des protonierten Adenins hin. Das CID-Spektrum des Adenin zeigt ein Fragment bei  $m/z = 119 Da$ .

$m/z$ /Da	Massendifferenz /Da	Ion
136		$[M + H]^+$
119	-17	$[M + H - NH_3]^+$
92	-44	$[M + H - NH_3 - HCN]^+$

Tabelle 3.15: Liste der im ESI Spektrum beobachteten Peaks von Adenin und der durch CID entstandenen Fragmente.

Der Verlust von 17 Da kann im Adenin nur durch den Verlust von  $NH_3$  verursacht werden. Dabei bricht die Aminogruppe ab und die positive Ladung ist über den aromatischen Ring verteilt. Fragmentiert man das Fragment  $m/z = 119 Da$  weiter (s. Abb. 3.46c)) so entsteht ein Fragment mit  $m/z = 92 Da$ . Dabei wird ein Neutralfragment mit  $m/z = 27 Da$  abgespalten. Ausgehend von der Summenformel des Adenins sind nur die beiden Summenformeln  $C_2H_3$  und  $HCN$  denkbar. Das Fragment  $C_2H_3$  kann nur durch den Bruch von mindestens drei Bindungen und mehrfache Umlagerungen erzeugt werden. Für das Fragment  $HCN$  sind unter Ringöffnung und zweifachen Bindungsbruch drei Möglichkeiten zur Bildung möglich. Es ist somit wahrscheinlich, dass es sich bei dem Fragment  $m/z = 92 Da$  um die aufeinander folgende Abspaltung von  $NH_3$  und  $HCN$  handelt.

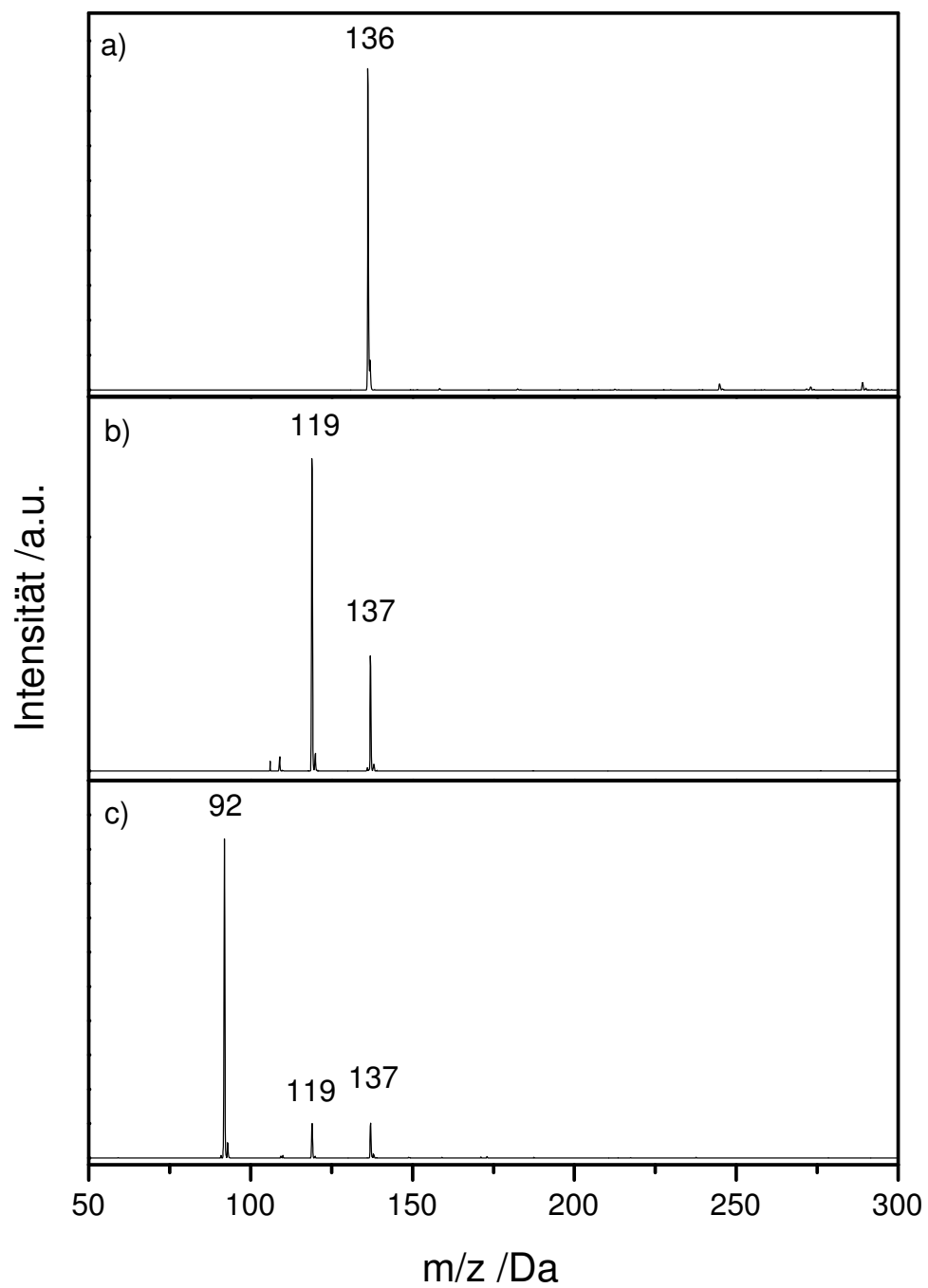


Abbildung 3.46: ESI-MS von Adenin. a) ESI-MS von Adenin. b) CID-Massenspektrum, c) CID-Spektrum der Masse  $m/z = 119$  Da.

### 3.4.2.1 Bildung von 6-Hydroxypurin

In den CID-Massenspektren (s. Abb. 3.46b) und 3.46c)) kann man deutlich die Masse  $m/z = 137 Da$  erkennen. Diese kann nicht durch das Isotopenmuster entstanden sein. Durch die natürliche Isotopenverteilung ergibt sich eine relative Intensität von 7,5% für das protonierte Adenin bei  $m/z = 137 Da$ .

Bei der Fragmentierung wurde das Massenfenster allerdings so gewählt, dass auch die Isotopenpeaks fragmentiert werden. Das Verhältnis der beiden Peaks bleibt während der Fragmentierung erhalten. Das auch nach der Isolation und Fragmentierung des Fragments  $m/z = 119 Da$  die Masse  $137 Da$  beobachtet werden kann, lässt darauf schließen, dass diese Masse in der Falle durch Anlagerung eines Moleküls aus dem Restgas gebildet wird.

Die Masse  $m/z = 137 Da$  ist direkt nach der Fragmentierung zu beobachten (s. Abb. 3.47a). Verzögert man die Massenanalyse nach der Fragmentierung um 1 s, so kann man erkennen, dass die Intensität von  $m/z = 137 Da$  zunimmt (s. Abb. 3.47b)). Das Ion muss also nach der Fragmentierung durch eine Gasphasenreaktion entstehen.

Es wird die Masse  $18 Da$  an das Fragment  $m/z = 119 Da$  addiert. Diese Masse kann nur durch die Addition von  $H_2O$  oder  $NH_4$  zustande kommen.  $NH_4$  könnte nur als Radikal an das Fragment  $m/z = 119 Da$  addieren, da beim positiv geladenen  $NH_4$  die Coulomb Abstoßung eine Reaktion verhindern würde. Außerdem gibt es keine  $NH_4$  Quellen in der Apparatur. Es ist demnach viel wahrscheinlicher, dass Wasser angelagert wird. Wasser gelangt während des Probeneinlasses in großen Mengen in die Apparatur (s. Abb. 2.17) und findet sich dort als Restgas. Der entsprechende Reaktionsverlauf ist in Abb. 3.48 dargestellt. Während der Fragmentierung wandert ein Proton zu der Aminogruppe. Danach folgt der Bruch der C-6-N-6-Bindung und es bildet sich das Fragment  $m/z = 119 Da$  (s. Abb. 3.46b). Danach lagert sich Wasser an. Ein Proton wandert an den Ring und es bildet sich 6-Hydroxypurin.

Es ist auch möglich, dass sich lediglich ein van der Waals gebundener Cluster bildet. Allerdings sprechen mehrere Indizien dafür, dass sich eine echte chemische Bindung bildet.

Das durch Anlagerung entstandene Fragment lässt sich, wie in Abb. 3.47c) zu sehen ist, sowohl isolieren als auch fragmentieren. Bei keiner anderen untersuchten Substanz war es möglich, einen nicht-kovalent gebundenen Wassercluster zu isolieren. Die für die Dissoziation nötige Anregungsamplitude der Masse  $137 Da$  entspricht auch der einer chemischen Bindung.

Das protonierte Adenin bildet bei gekühlter Falle kaum Cluster (s. Kap. 3.4.3). Die geringe Tendenz zur Clusterbildung wird der geringen Anzahl an internen Freiheitsgraden zugeschrieben. Das Fragment  $m/z = 119 Da$  sollte eine entsprechend geringe Bildungs-

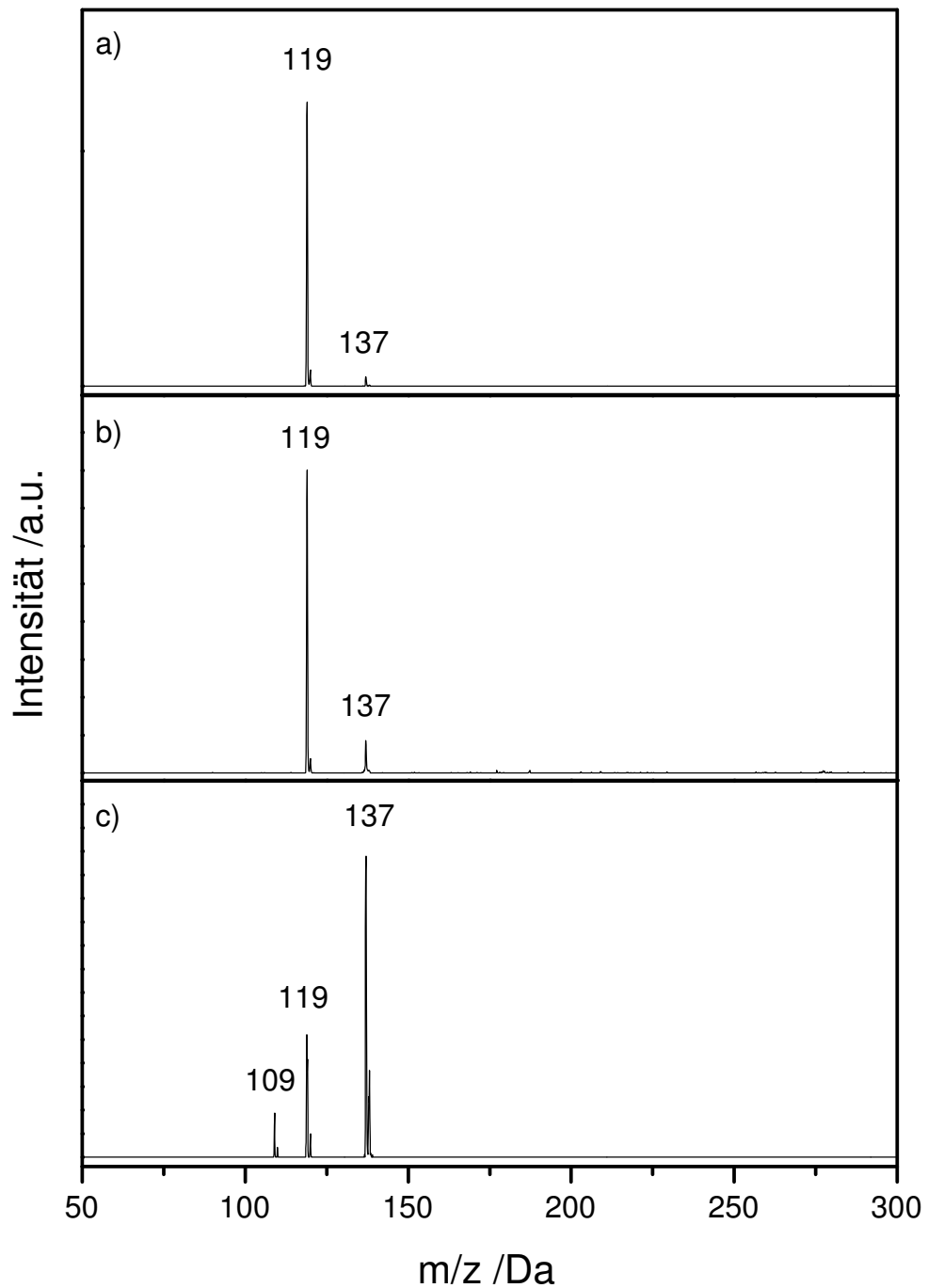


Abbildung 3.47: Bildung und Fragmentierung der Masse  $m/z = 137$  Da innerhalb der Paul-Falle. a) Fragmentierung von Adenin mit direkt anschließender Massenanalyse, b) Wie a) allerdings mit 1 s Verzögerung nach der Fragmentierung, c) Fragmentierung des in b) entstandenen Fragments mit  $m/z = 137$  Da

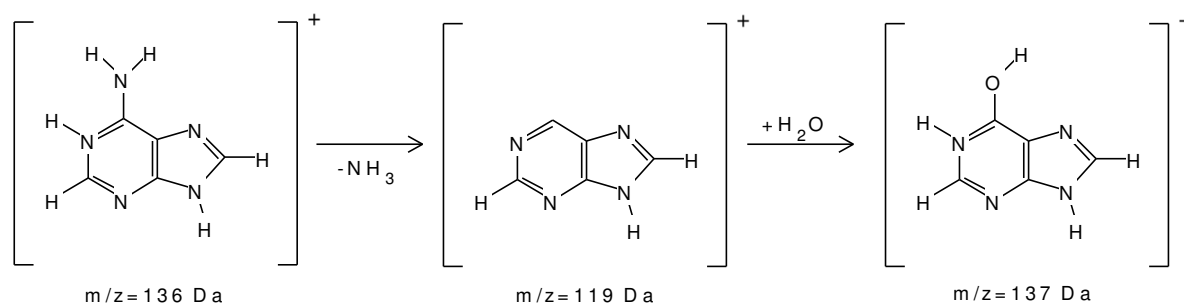


Abbildung 3.48: Bildung von 6-Hydroxypurin in der Paul-Falle. Durch die Abspaltung von  $\text{NH}_3$  entsteht ein Fragment mit  $m/z = 119 \text{ Da}$ . Durch Reaktion mit Wasser aus dem Restgas kann 6-Hydroxypurin mit  $m/z = 137 \text{ Da}$  gebildet werden.

rate von Addukten aufweisen. Die Anzahl der internen Freiheitsgrade sowie die Schwingungsfrequenzen des Fragments sollten denen des Mutterions ähnlich sein. Die deutlich erhöhte Bildungsrate kann somit nicht über statistische oder elektrostatische Effekte erklärt werden, deutet jedoch zusätzlich auf eine kovalente Bindung hin.

Die Tatsache, dass im Photofragmentspektrum in Abb. 3.50b) das Ion  $m/z = 137 \text{ Da}$  ebenfalls zu beobachten ist, obgleich 50 Laserschüsse verwendet wurden, zeigt, dass das Ion bei dieser Wellenlänge offenbar keine Absorption hat. Im Lösungsmittel ist die Absorption des 6-Hydroxypurins im Vergleich zum Adenin um  $14 \text{ nm}$  zu kürzeren Wellenlängen verschoben [65]. Die bei der Photofragmentierung verwendete Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  würde nicht ausreichen, um ein potenziell entstandenes 6-Hydroxypurin weiter zu fragmentieren.

Auch wenn keine direkten experimentellen Daten über die Struktur des Fragments  $m/z = 137 \text{ Da}$  vorliegen, deuten die Indizien stark darauf hin, dass das Wasser kovalent gebunden ist. Es würde dabei das protonierte 6-Hydroxypurin entstehen.

### 3.4.3 Einfluss der Temperatur auf das Massenspektrum

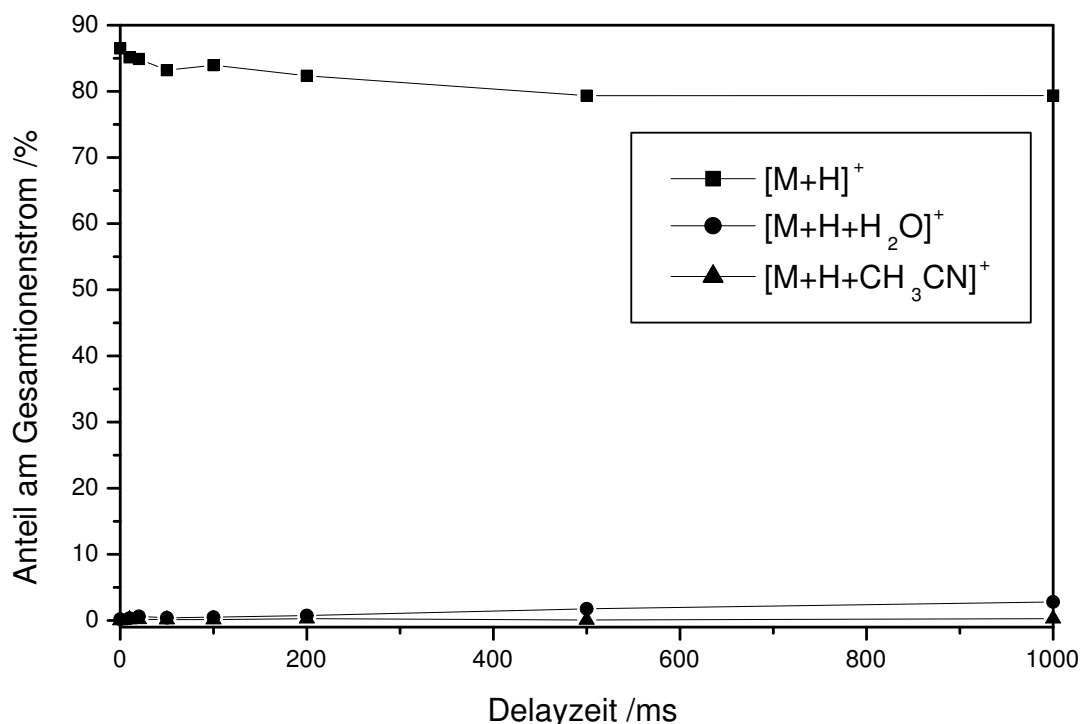


Abbildung 3.49: Clusterbildung bei Adenin. Es ist nur eine sehr geringe Clusterbildung zu beobachten. Wir schreiben dies der kurzen Lebensdauer des Stoßkomplexes zu (siehe Text).

Adenin zeigt von allen untersuchten Substanzen die geringste Tendenz, bei gekühlter Falle, Addukte mit dem Lösungsmittel zu bilden. Selbst nach einer Wartezeit von 1 s (s. Abb. 3.49) machen die Cluster weniger als 10 % vom Gesamtionenstrom aus. Maßgeblich für die Bildungsrate ist die Struktur und die Bindungsenergie. Je größer die Anzahl an internen Freiheitsgraden, desto besser kann die Energie im Ion verteilt werden, bevor sie durch Stöße mit dem Hintergrundgas abgeführt wird (s. Kap. 3.5). Adenin ist ein starres aromatisches System, in dem keine niederfrequenten Moden verfügbar sind. Die Energie des Stoßes kann deshalb schnell in einen dissoziativen Kanal zurück fließen, und es werden kaum Cluster gebildet. Die Clusterbildungsrate ist der des Anilins vergleichbar (s. Abb. 3.55), was auf den gleichen strukturellen Effekt zurück zu führen ist.

### 3.4.4 Photoinduzierte Fragmentierung von Adenin

Das Photofragmentspektrum von Adenin ähnelt sehr dem CID Spektrum (s. Abb. 3.46). Der einzige Fragmentierungspfad ist wieder die Abspaltung von Ammoniak unter Bildung der Masse  $m/z = 119$  Da.

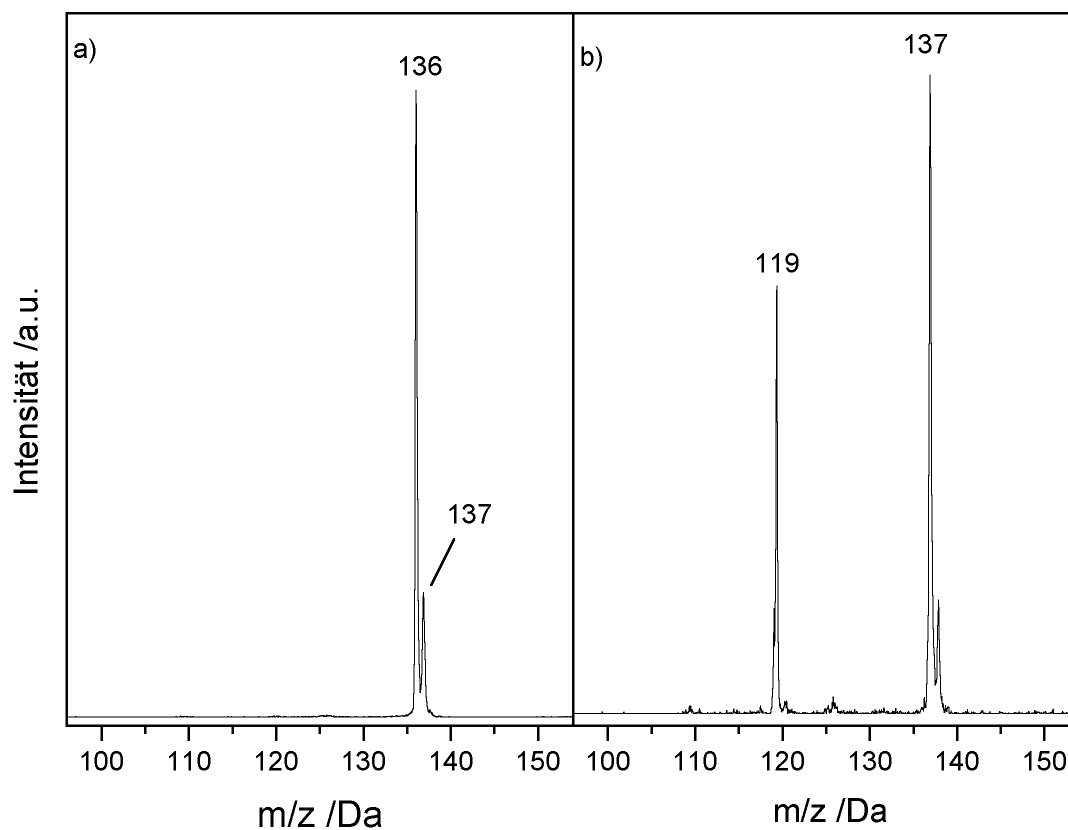


Abbildung 3.50: Photoinduzierte Fragmentierung von Adenin bei  $\lambda = 260$  nm. a) 2 Schuss, b) 50 Schuss. Die Pulsenergie betrug jeweils  $500 \mu J$ .

Besonders auffällig ist der Peak bei  $m/z = 137$  Da. Dieser entsteht wahrscheinlich wieder durch die Addition von Wasser an das Fragment  $m/z = 119$  Da (s. Kap. 3.4.2.1). Im Vergleich zum CID Spektrum in Abb. 3.46b) ist in Abb. 3.50b) der Peak bei  $m/z = 137$  Da der mit der größten Intensität. Da es sich bei diesem Peak um eine Adduktion handelt, lässt sich der Unterschied in der Intensität durch eine unterschiedliche Verweildauer in der Falle erklären. Bei der Photofragmentierung wurde das gleiche Ionenensemble mehrfach mit dem Laser beschossen. Bei einer Wiederholrate von  $20$  Hz und 50 Laserpulsen ergibt sich somit eine minimale Verweildauer von  $2,5$  s. In dieser Zeit können die entstandenen Photofragmente Wasser anlagern und entsprechend Abb. 3.48 die Masse  $m/z = 137$  Da bilden.

### 3.4.5 Wellenlängenabhängigkeit der Photofragmentierung

Aufgrund seiner Bedeutung in der Biologie wurden zahlreiche Untersuchungen am neutralen Adenin durchgeführt. Spektroskopische Untersuchungen des neutralen Adenins zeigen eine extrem kurze Lebensdauer des  $S_1$  Zustands sowohl in Lösung [107, 111, 112, 113, 114, 115], als auch in der Gasphase [116, 117, 118, 119]. Diskutiert wird ein schnelles Ankoppeln des  $\pi\pi^*$  an den  $\pi\sigma^*$  [117, 119, 120, 121]. Neuere Modelle diskutieren die Relaxation durch eine konische Durchschneidung des  $\pi\pi^*$  mit dem Grundzustand [122, 123, 124].

Im Molekularstrahl konnte sowohl das 9H- als auch das 7H-Tautomer nachgewiesen werden. Ebenso konnte zwischen  $n\pi^*$  und  $\pi\pi^*$  unterschieden werden. Der  $\pi\pi^*$  des 7H-Tautomers liegt im neutralen Adenin bei  $35\,824 \pm 5\text{ cm}^{-1}$  und der 9H-Tautomers bei  $36\,105 \pm 5\text{ cm}^{-1}$  [125, 126, 127, 128].

In Abb. 3.51a) ist das Photofragmentspektrum des protonierten Adenins gezeigt. Man kann einen breiten Anstieg oberhalb von  $35\,000\text{ cm}^{-1}$  erkennen. Bei etwa  $36\,400\text{ cm}^{-1}$  und  $36\,800\text{ cm}^{-1}$  sind schwach ausgeprägte Maxima zu erkennen. Der Einschnitt bei  $37\,700\text{ cm}^{-1}$  (s. Pfeil in Abb. 3.51a)) ist vermutlich auf einen 5% Abfall der Laserintensität, im Randbereich der Farbstoffe, zurück zu führen.

Im Photofragmentspektrum von Tryptophan in Abb. 3.51b) erstreckt sich der Anstieg über knapp  $500\text{ cm}^{-1}$ . Im Vergleich ist der Anstieg beim Adenin ungefähr drei mal flacher. Beim Tryptophan wurde das breite Maximum mit nicht aufgelösten niederfrequenten Schwingungen erklärt. Im Adenin fehlt eine flexible Seitengruppe, so dass es keine niederfrequenten Schwingungen geben sollte. Entsprechend sollten die Strukturen im Adeninspektrum schärfer sein als beim Tryptophan. Der breite Anstieg in Abb. 3.51a) kann also nicht durch das geringe Auflösungsvermögen verursacht sein. Für eine Verbreiterung der Struktur kommen mehrere molekülinterne Ursachen in Frage:

- i) Eine Überlagerung von mehreren Tautomeren
  - ii) Eine starke Geometrieverschiebung
  - iii) Eine kurze Lebensdauer
- i) Es ist denkbar, dass mehrere Tautomere vorliegen. Durch die Überlagerung der Spektren der einzelnen Tautomere könnte die Zustandsdichte in diesem Bereich so stark steigen, dass die einzelnen Übergänge nicht mehr auflösbar sind. Vergleicht man die relativen Energien der Tautomere (s. Kap. 3.4.1), so sollten nur zwei Tautomere (1H-9H und 3H-7H) bei Raumtemperatur populiert sein. Das Vorhandensein mehrerer Tautomere kann



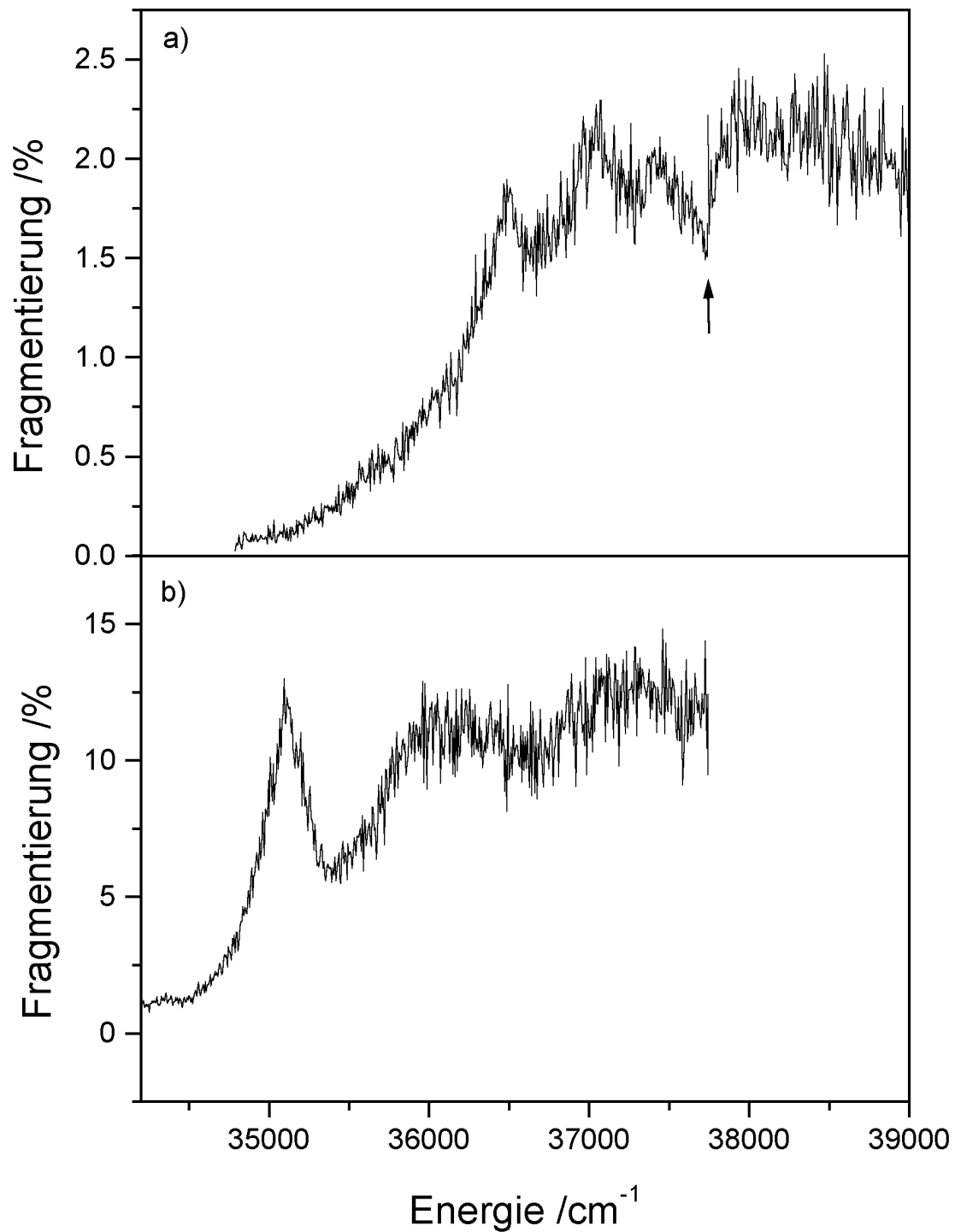


Abbildung 3.51: a) Wellenlängenabhängigkeit der Photofragmentierung von Adenin. Man erkennt einen breiten Anstieg. Der Pfeil markiert den Wechsel des Farbstoffs. b) Photofragmentspektrum von Tryptophan. Der Anstieg ist deutlich steiler und das Maximum deutlicher ausgeprägter.

die breite Struktur aber nicht erklären. Im Photofragmentspektrum von Tryptophan (s. Abb. 3.51b)) werden mindestens zwei Konformere vermutet. Zudem besitzt Tryptophan niederfrequente Schwingungen. Dennoch ist das Photofragmentspektrum deutlich strukturierter. Es wird daher ausgeschlossen, dass der breite Anstieg durch hohe Liniendichte hervorgerufen wird. Das energetisch höher liegende 3H-7H-Tautomer sollte zudem eine höhere Anregungsenergie besitzen und nicht zum Anstieg beitragen. Ein Anteil des 3H-7H-Tautomers bei höheren Energien des Spektrums ist aber nicht auszuschließen [49]. Das 3H-7H-Tautomer sollte im angeregten Zustand eine ähnliche Doppelminimumstruktur besitzen. Allerdings gibt es Unterschiede in den Energien, der Tiefe des Doppelminimums und der Lage der konischen Schnitte.

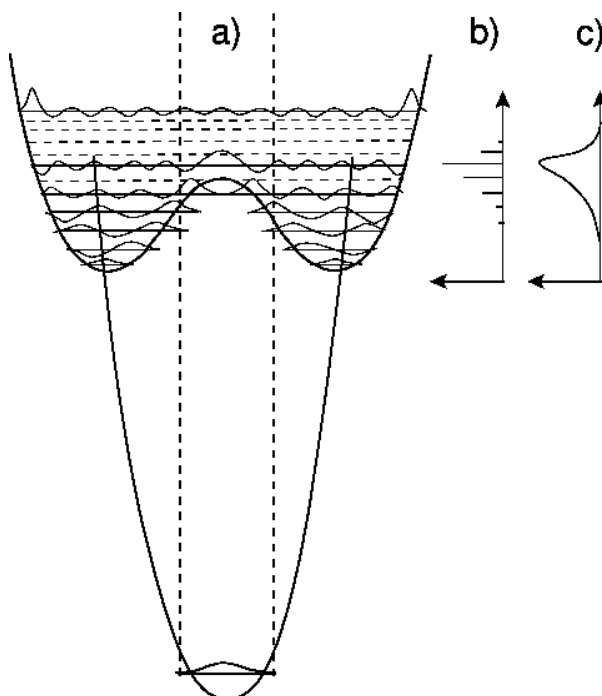


Abbildung 3.52: a) Hyperpotentialflächen des elektronischen Grundzustands und des angeregten Zustands für das 1H-9H-Tautomer. Die Gleichgewichtsstruktur des Grundzustands bildet im angeregten Zustand einen Sattelpunkt. Es kommt zu einer konischen Durchschneidung des  $S_0$  und  $S_1$ . b) Die Franck-Condon-Faktoren steigen monoton an. c) Die Verbreiterung durch die kurze Lebensdauer (konischer Schnitt) ergibt einen breiten Anstieg, wie er experimentell beobachtet wird.

ii) Eine andere Möglichkeit ist deshalb eine starke Geometrieverschiebung im angeregten Zustand des 1H-9H-Tautomers. Die Geometrieoptimierung des  $\pi\pi^*$  zeigt, dass die Gleichgewichtsgeometrie des Grundzustands einem Sattelpunkt im elektronisch angeregten Zustand entspricht [49]. Die Gleichgewichtsstruktur des  $\pi\pi^*$  weicht stark von der des Grundzustands ab. Der Kohlenstoff in 2-Position klappt aus der Ringebene. Die H-2-C-2-Bindung steht dabei fast senkrecht zur Ringebene. Wie in Abb. 3.52a) zu sehen ist,

ergibt sich für den 0-0 Übergang ein verschwindender Franck-Condon-Faktor. Mit steigender Schwingungsquantenzahl steigen auch die Franck-Condon-Faktoren monoton an. Weit oberhalb des lokalen Maximums haben die Wellenfunktionen im Franck-Condon-Bereich nur eine geringe Amplitude und es kommt zu einem Abbruch des Spektrums. Dies wurde in Abb. 3.52b) angedeutet. Die starke Geometrieverschiebung im angeregten Zustand und die daraus resultierenden stetig ansteigenden Franck-Condon-Faktoren können den beobachteten stetigen Anstieg im Photofragmentspektrum erklären. Allerdings reicht dies nicht aus, um die fehlende Schwingungsauflösung zu erklären.

iii) Wie in Abb. 3.52 zu sehen ist, kommt es zu einem direkten konischen Schnitt von elektronischem Grund- und angeregtem Zustand. Ionen im angeregten Zustand können die konische Durchschneidung ohne Barriere erreichen. Man kann entsprechend davon ausgehen, dass die Kopplung des  $S_1$  an den  $S_0$  sehr effektiv ist. Daraus ergibt sich eine Lebensdauer des angeregten Zustands im Bereich von Femtosekunden. Durch die kurze Lebensdauer ergibt sich eine Energieunschärfe. Verbreitert man das Strichspektrum in Abb. 3.52b), so dass nur noch die Umhüllende zu sehen ist, so erhält man die in Abb. 3.52c) gezeigte Struktur mit einem sägezahnartigen, ersten Peak. Dies stimmt qualitativ mit dem gemessenen Spektrum (s. Abb. 3.52a)) überein.

Die Kombination aus Lebensdauererweiterung und steigenden Franck-Condon-Faktoren kann den beobachteten breiten Anstieg im Photofragmentspektrum des protonierten Adenins erklären. Die Übereinstimmung bestätigt die theoretische Vorhersage der Geometrieänderung und den konischen Schnitt.

Die beobachteten Strukturen bei höheren Energien können durch eine simultane Anregung der Streck- und der Biegeschwingungen entstehen: Jeder Übergang in einer Streckkoordinate ist mit der breiten Struktur, wie sie in der *out-of-plane* Mode in Abb. 3.52 resultiert, gefaltet.

Messungen an 9-Methyladenin und 7-Methyladenin könnten genauere Informationen liefern. Durch die Methylierung wird jeweils eins der beiden Tautomere verhindert. Dadurch könnte man wahrscheinlich die Anteile der beiden Tautomere zum Spektrum in Abb. 3.51a) unterscheiden. Diese Messungen stehen unmittelbar bevor.

### 3.5 Clusterbildung in der Paul-Falle

Beim Kühlen der Falle konnte eine starke Bildung von wasserstoffbrückegebundenen Clustern beobachtet werden. Diese Cluster werden innerhalb der Paul-Falle durch Anlagerung von Lösungsmittelmolekülen aus dem Restgas gebildet. Um den zeitlichen Verlauf der Clusterbildung zu messen, wurde die Zielmasse zuerst isoliert. Danach wird der Beginn der Massenanalyse zeitverzögert. Dadurch wird ausgeschlossen, dass sich die beobachteten Cluster schon während der Ionisation bzw. dem Trapping gebildet haben. Die Verzögerung kann durch die Steuersoftware kontrolliert werden. Die Zeit, die für die Bildung der Cluster zur Verfügung steht, kann somit genau angegeben werden.

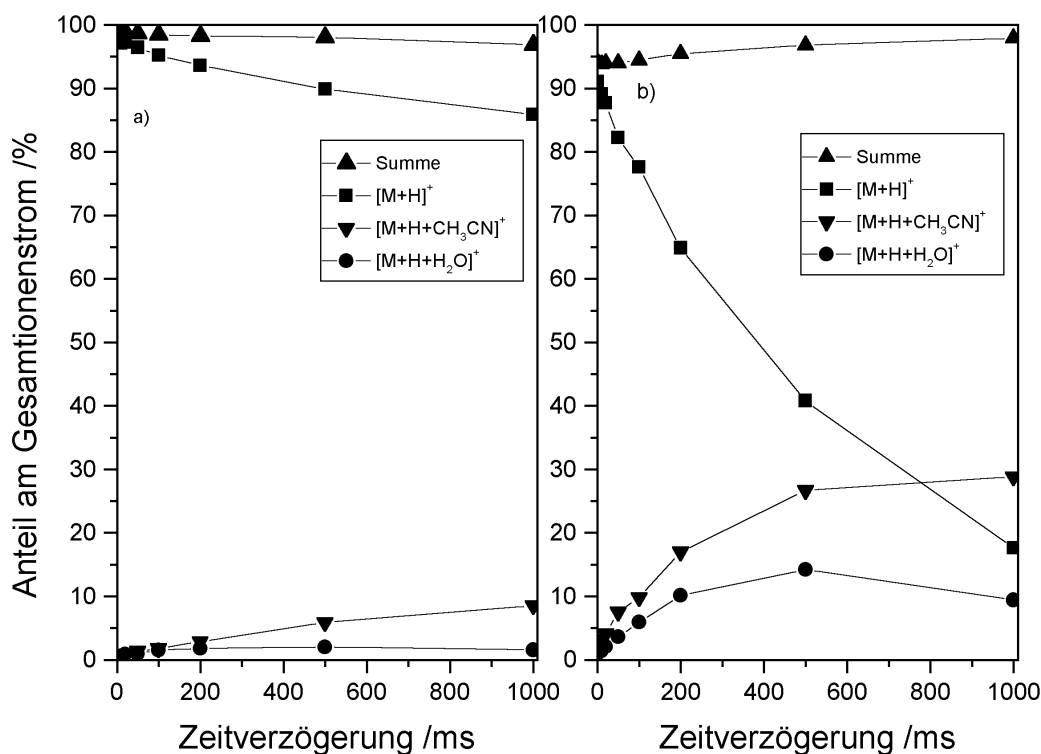


Abbildung 3.53: Unterschiedlich starke Clusterbildung bei verschiedenen Substanzen. a) Anilin, b) Benzylamin. Gezeigt ist jeweils das Mutterionensignal, zwei charakteristische Cluster und die Summe über alle Signale.

Die Struktur der Substanzen hat einen großen Einfluss auf die Tendenz, Cluster zu bilden. Anilin bildet fast gar keine Cluster (s. Abb. 3.53a). Benzylamin unterscheidet sich von Anilin nur durch eine Methylengruppe (s. Abb. 3.54). Dennoch unterscheidet sich die Clusterbildung bei den beiden Substanzen erheblich. Es wurden hauptsächlich Addukte mit dem Lösungsmittel (Wasser und Acetonitril) beobachtet. In geringerem Umfang wurden Addukte mit Stickstoff oder Sauerstoff beobachtet. Cluster mit Essigsäure wurden nicht gefunden. Dies liegt wahrscheinlich an der geringen Konzentration der Essigsäure im Lösungsmittel (s. Kap. 2.3.1).

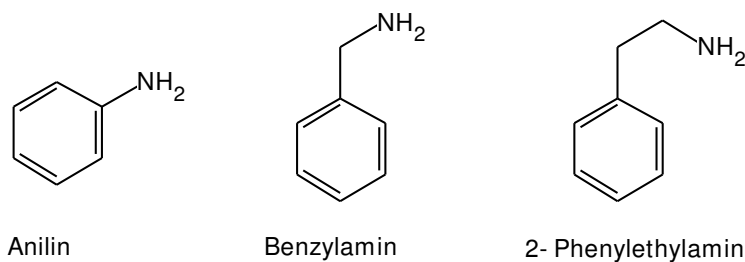


Abbildung 3.54: Lewisstrukturen von Anilin, Benzylamin und 2-Phenylethylamin.

Druck und Anzahl der Ionen ist in allen Experimenten vergleichbar. Die Stoßrate zwischen Ion und Neutralteilchen sollte somit bei allen Versuchen ähnlich sein. Die unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten können also nicht durch unterschiedliche Stoßzahlen entstanden sein, sondern nur die Wahrscheinlichkeit mit der ein Stoß zur Clusterbildung führt. Ausschlaggebend sind dabei die Bindungsenergie und die Lebensdauer des Stoßkomplexes.

Bei allen Substanzen ist davon auszugehen, dass die Protonierung an der Aminogruppe erfolgt. Die Bindungsenergie sollte damit bei allen Substanzen ähnlich sein. Theoretische Untersuchungen ergeben für den Adenin/Wasser Cluster Bindungsenergien von  $3800\text{ cm}^{-1}$  bis  $4500\text{ cm}^{-1}$  [49]. Für den Tryptophan/Wasser Cluster ist die Bindungsenergie mit  $5800\text{ cm}^{-1}$  etwas größer [129].

Große Moleküle können die Stoßenergie besser in den Schwingungsfreiheitsgraden verteilen. Es dauert statistisch länger bis sich die Energie in einer dissoziativen Koordinate sammelt. In dieser Zeit können Stöße mit Helium die Stoßenergie abführen. Dadurch wird der Cluster stabilisiert.

Die Ionen sind von allen Seiten von Flächen umgeben, die auf eine Temperatur von  $150\text{ K}$  gekühlt waren. Der Dampfdruck des Lösungsmittels bei diesen Temperaturen ist äußerst gering. Die Neutralteilchen können also nicht aus dem Hintergrundgas stammen. Sie würden an den kalten Flächen der gekühlten Falle ausgefroren: Ein Wassermolekül, das einmal auf eine gekühlte Falle trifft, wird auf dieser hängen bleiben.

Die Teilchen können nur als gerichteter Teilchenstrom von der Oktopolkammer kommen und mit den Ionen stoßen, bevor sie auf eine der gekühlten Flächen auftreffen. Dieser Teilchenstrom kann als zeitlich konstant und in allen Experimenten als gleich angesehen werden. Für den Vergleich der Bildungsraten kann man deshalb von einer Reaktion pseudo erster Ordnung ausgehen. Für die Reaktionsgeschwindigkeit gilt dann:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A] \quad (3.1)$$

Mit  $[A]$ : Konzentration von  $A$ ;  $k$ : Reaktionskonstante

Bei gekühlter Falle tritt die Bildung der verschiedenen Cluster in Konkurrenz zueinander. Da die einzelnen Konkurrenzreaktionen alle pseudo erster Ordnung sind, folgt auch die Gesamtreaktion einem Zeitgesetz erster Ordnung [130]. Die beobachtete Reaktionskonstante für die Abnahme des Mutterions setzt sich additiv aus den Konstanten der einzelnen Konkurrenzreaktionen zusammen.

Nach Integration und Linearisierung erhält man:

$$\ln \left( \frac{[A]}{[A_0]} \right) = -kt \quad (3.2)$$

Logarithmiert man den Anteil des Mutterions am Gesamtionenstrom und trägt ihn gegen das Delay auf, so erhält man die Abb. 3.55 dargestellte Abhängigkeit. Bei allen Molekülen ist eine Aminogruppe durch eine Alkylkette mit einem Benzolring verbunden. Die Bindungsenergien sollte für alle Komponenten etwa gleich sein. Die Unterschiede sind also in erster Linie auf strukturelle Unterschiede zurückzuführen. Die lineare Regression ergibt eine gute Übereinstimmung. Die Bildung von Clustern in der Paul-Falle folgt somit einer Reaktion erster Ordnung.

Die Steigung der Geradengleichung ist nach Gl. 3.2 die Reaktionskonstante  $k$  und ist ein direktes Maß für die Geschwindigkeit einer Reaktion. Je steiler die Kurven, die in Abb. 3.55 desto schneller verläuft die Bildung der Cluster.

Die Geschwindigkeit, mit der ein Stoßkomplex innerhalb der Falle gebildet wird, hängt von der Teilchendichte, dem Stoßquerschnitt und der Bindungsenergie ab.

Diese Bedingungen für die Bildung der Cluster, ist für alle Substanzen vergleichbar. Dass unterschiedliche Substanzen mit unterschiedlicher Intensität Cluster bilden, hängt davon ab, wie schnell der gebildete Cluster wieder zerfällt.

Damit der Cluster bis zur Massenanalyse überlebt, muss die Überschussenergie abgeführt werden, bevor sie sich in einer dissoziativen Koordinate sammeln kann. Nach dem Zusammenstoß verteilt sich die überschüssige Energie gleichmäßig auf alle internen Freiheitsgrade (*internal vibrotional redistribution, IVR*). Je größer die Anzahl der internen Freiheitsgrade, desto unwahrscheinlicher wird es, dass sich die Energie in einer dissoziativen Reaktionskoordinate sammelt. Die Lebensdauer des Clusters erhöht sich. Durch Kollisionen mit dem gekühlten Puffergas kann der Cluster Energie abgeben. Je länger die Lebensdauer des Clusters ist, desto wahrscheinlicher wird es, dass die überschüssige Energie abgegeben wird, bevor es zur Dissoziation kommt. Die Lebensdauer des Clusters wird groß genug, um bis zur Massenanalyse zu bestehen. Daraus folgt, dass die Kopplung zwischen inter- und intramolekularen Schwingungen effizient genug ist, um dies zuzulassen.

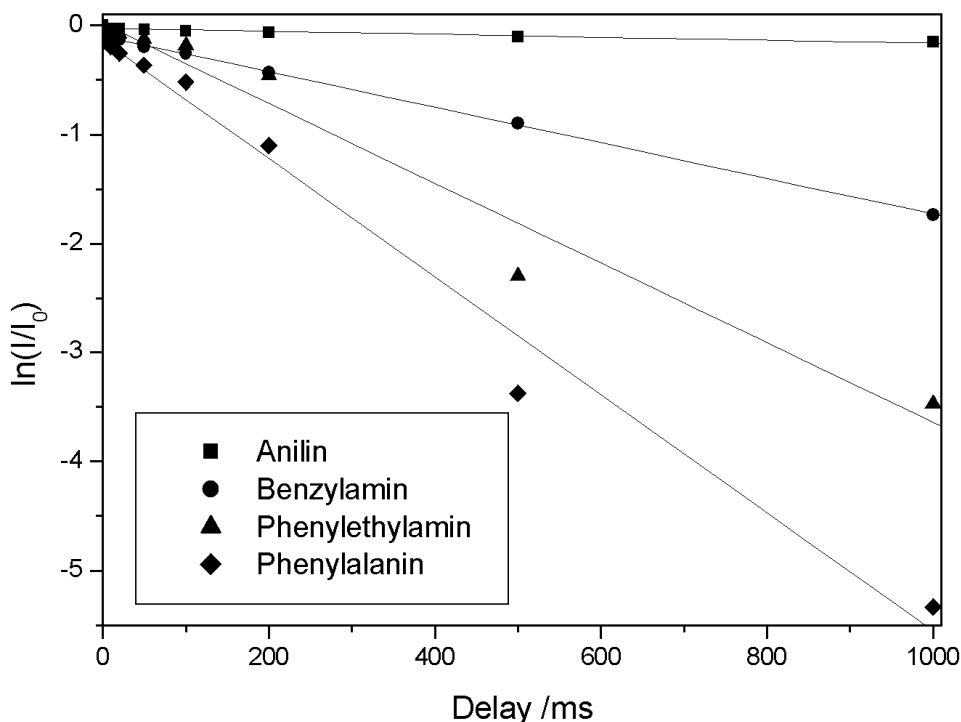


Abbildung 3.55: Linearisierte Auftragung des Anteils des Mutterions am Gesamtionenstrom gegen das Delay. Die Messpunkte der einzelnen Substanzen wurden jeweils durch eine lineare Regression verbunden.

Nach der Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus Theorie (RRKM-Theorie) sinkt die Rate für einen unimolekularen Zerfall mit der Größe des Moleküls.

$$k_{RRKM} = \frac{1}{h} \frac{W(E - E_0)}{\rho_N(E)} \quad (3.3)$$

Mit  $h$ : Plancksche Konstante,  $W$ : Summe über alle Zustände im Übergangszustand im Energiebereich  $E$  bis  $E_0$ ,  $\rho$ : Zustandsdichte des Moleküls.

Für eine genaue Voraussage der Zerfallsraten ist die genaue Kenntnis der Zustandsdichte nötig, die von der Geometrie des Übergangszustands abhängt. Dieser ist allerdings nicht bekannt und wird oft vereinfachend als dem Molekül ähnlich angenommen. Vergleichsweise einfach lässt sich die Anzahl der Schwingungszustände im Molekül abschätzen. Dazu wurde eine Frequenzanalyse mittels B3LYP/3-21G durchgeführt. Mit Hilfe eines dafür entwickelten Computerprogramms wurden alle möglichen Obertöne insbesondere auch der Kombinationsschwingungen bis zur oberen Energiegrenze ermittelt. In harmonischer Näherung erhält man so die Anzahl der Molekülschwingungen im gesuchten Energieein-

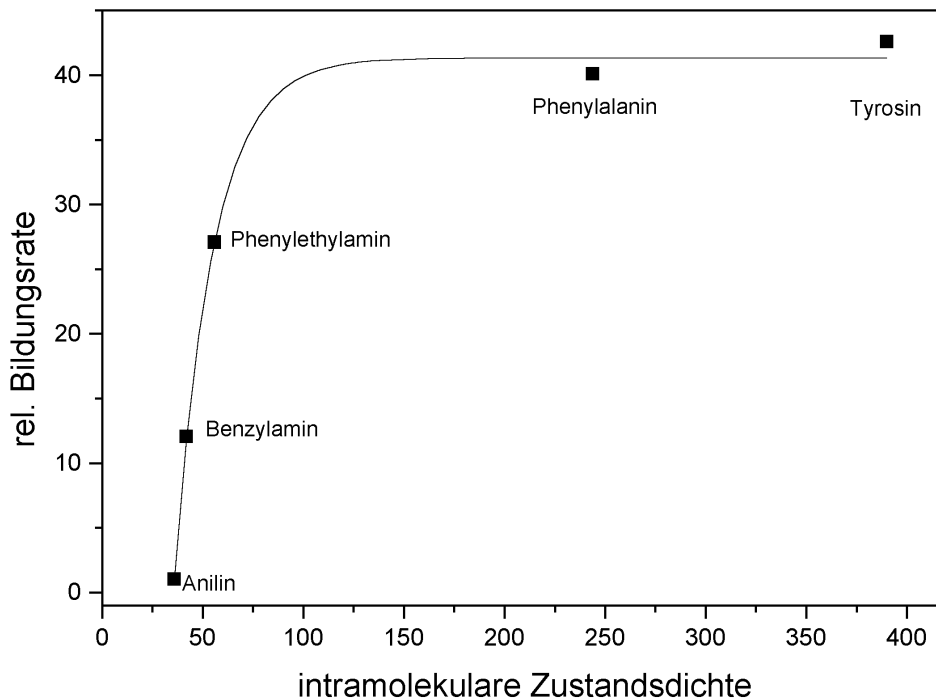


Abbildung 3.56: Relative Bildungsraten gegen die Zustandsdichte im Molekül (interne Energie  $500 \text{ cm}^{-1} \approx$  Stodenergie). Größere Moleküle haben höhere Bildungsraten als kleinere.

tervall. Nach Gl. 3.3 sollte die Zerfallsrate des Clusters mit steigender Zustandsdichte im Edukt sinken. Entsprechend sollte die Intensität der Cluster zunehmen. Wie man in Abb. 3.56 sehen kann, folgen die gemessenen Raten im Wesentlichen dieser Voraussage. Dipeptide bilden so schnell Cluster, dass es nicht möglich war, das Mutterion in ausreichender Zahl zu isolieren.



## 3.6 Vergleich von Gasphasen- mit Lösungsmittelspektren

Im alltäglichen Leben sind die Eigenschaften von Molekülen im Lösungsmittel oder in komplexer Proteinumgebung bestimmend. Die Aufnahme von UV/VIS-Lösungsmittelspektren ist einfach. Allerdings ist es im Lösungsmittel im Vergleich zur Gasphase schwieriger, an die gewünschten molekularen Informationen zu kommen. Man erhält immer die Überlagerung aus molekularem Effekt und Lösungsmiteleinfluss. Vergleicht man allerdings Messungen in der Gasphase mit Messungen im Lösungsmittel, so lassen sich daraus Informationen zum Einfluss des Lösungsmittels gewinnen, bzw. direkt intermolekulare Effekte nachweisen.

Die Eigenschaften eines Chromophors in einer Umgebung hängt von den Eigenschaften der Umgebung (Polarisierbarkeit  $\alpha$ , Dipolmoment  $\mu$ , oft sind  $\alpha$  und  $\mu$  in  $\epsilon_r$  subsumiert) und spezifischen Lösungsmittel-Molekülwechselwirkungen ab (Wasserstoffbrückenbindungen u.a.). Die relative Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  in Wasser beträgt 80 und in Proteinen  $\approx 2 - 4$  [131]. Folglich sind Gasphasenuntersuchungen der Proteinumgebung ähnlicher als Untersuchungen in wässriger Lösung.

Messungen im Lösungsmittel führen immer zu einer Linienverbreiterung. Jede mögliche Anordnung der Lösungsmittelmoleküle um das Probenmolekül verschiebt den Übergang jeweils um einen kleinen Betrag. Im Ensemble befinden sich viele Moleküle mit verschiedenen Umgebungen und das Spektrum wird breit.

Ist das Dipolmoment von Grund- und angeregtem Zustand in Richtung und Größe stark unterschiedlich, so kommt es zu einer Blau- oder Rotverschiebung. Es kommt nach der Anregung zu einer Neuorientierung des Lösungsmittels im angeregten Zustand. Entlang der Lösungsmittelkoordinate findet man also eine große Geometrieänderung vom Grund- zum angeregten Zustand in einer verallgemeinerten Molekül-Lösungsmittelkoordinate. Die vertikale Anregung führt dann zu höheren Schwingungsniveaus in dieser Koordinate. Die Anregung in diese erhöhte Zustandsdichte verbreitert die Lösungsmittelspektren zusätzlich.

Zum Vergleich der gemessenen Gasphasenspektren wurden UV/VIS-Spektren im Lösungsmittel aufgenommen (s. Kap 2.3.4). In Abb. 3.57 sind die UV/VIS-Spektren von Tryptophan, Tryptamin, Tyrosin und Adenin, jeweils bei  $pH$  2 und  $pH$  7 (bei Tryptamin  $pH$  7 und  $pH$  11) gezeigt. Alle Spektren lassen sich grob in zwei Bereiche unterteilen. Unterhalb von  $42\,000\text{ cm}^{-1}$  weisen alle Spektren ein Maximum auf. Dieses wird  $\pi\pi^*$ -Übergängen im aromatischen System zugewiesen. Die Absorption steigt im Bereich von  $34\,000\text{ cm}^{-1}$  steil an und läuft dann flach zu höheren Energien hin aus. Oberhalb von  $42\,000\text{ cm}^{-1}$  steigt die Absorption wieder steil an. Diese wird  $\sigma\sigma^*$ -Übergängen zugeordnet.  $n\pi^*$ -Übergänge sind schwach und deshalb überlagert. Im Folgenden werden nur die

niederenergetischen Strukturen in den Spektren diskutiert.

Die Spektren von Tryptophan (Abb. 3.57a)) und Tryptamin (Abb. 3.57b)) sind fast identisch. In dem ersten Bereich ist eine vibronische Struktur zu sehen. Man kann jeweils drei Peaks erkennen, die ungefähr äquidistant bei  $34\,700\text{ cm}^{-1}$ ,  $35\,700\text{ cm}^{-1}$  und  $36\,700\text{ cm}^{-1}$  liegen. Sie stammen vermutlich aus C-C-Streckschwingungen des Indolrings. Die beiden Substanzen unterscheiden sich nur durch eine Carboxylgruppe in der Seitenkette, die praktisch keinen Effekt auf das Spektrum hat. Für das Spektrum bestimmend ist der Indolring. Der pH-Wert hat keinen nennenswerten Einfluss auf das Spektrum.

Das UV/VIS-Spektrum von Tyrosin (Abb. 3.57c)) ähnelt denen von Tryptophan und Tryptamin. Allerdings sind die Strukturen im vorderen Teil des Spektrums deutlich schwächer ausgeprägt. Dennoch lassen sich zwei Peaks bei  $35\,400\text{ cm}^{-1}$  und  $36\,400\text{ cm}^{-1}$  vermuten. Es ist denkbar, dass die im Vergleich zum Tryptophan höhere Anzahl von Konformeren den ersten Peak soweit verbreitert, dass dieser im Lösungsmittel nicht mehr auflösen ist. Auch hier hat der pH-Wert keinen Einfluss auf die Position der Struktur.

Die beiden Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sollten bei neutralem pH-Wert in der zwitterionischen und bei *pH* 2 in der protonierten Form vorliegen. Tryptamin sollte schon bei *pH* 7 vollständig protoniert vorliegen. Ort der Protonierung ist in allen obigen Molekülen die Aminogruppe. Dennoch unterscheiden sich die Spektren nur geringfügig. Bei *pH* 7 (*pH* 11 bei Tryptamin) ist die Absorption im vorderen Teil etwas größer, wohingegen die Absorption im hinteren Teil etwas geringer ist, als bei *pH* 2 (*pH* 7 bei Tryptamin). Die Position der Peaks im Spektrum wird innerhalb der Messungenauigkeit vom pH-Wert aber nicht beeinflusst. Vermutlich wird die positive Ladung vollständig durch das Lösungsmittel abgeschirmt, so dass keine Wechselwirkung der Ladung mit dem Chromophor stattfindet.

Beim Adenin (Abb. 3.57d)) ist im vorderen Teil des Spektrums fast keine Struktur zu erkennen. Lediglich bei *pH* 7 ist eine schwache Schulter bei  $35\,700\text{ cm}^{-1}$  zu sehen. Im Unterschied zu den anderen untersuchten Substanzen unterscheidet sich das Lösungsmittelspektrum bei *pH* 2 deutlich von dem bei *pH* 7. Adenin sollte bei *pH* 2 größtenteils protoniert vorliegen. Bei der protonierten Form ist der Anstieg im vorderen Bereich deutlich breiter und zu niedrigeren Energien verschoben. Die Änderung deutet also darauf hin, dass die Protonierung einen deutlichen Einfluss auf die elektronische Struktur hat. Da die Protonierung direkt am Chromophor stattfinden muss, kann das Lösungsmittel die Ladung nicht abschirmen. Ein reiner Lösungsmittelleffekt ist jedoch auch möglich.

Vergleicht man die Spektren im Lösungsmittel mit denen in der Gasphase, so lässt sich anhand der Unterschiede, der Einfluss des Lösungsmittels bestimmen. In Abb. 3.58 wird

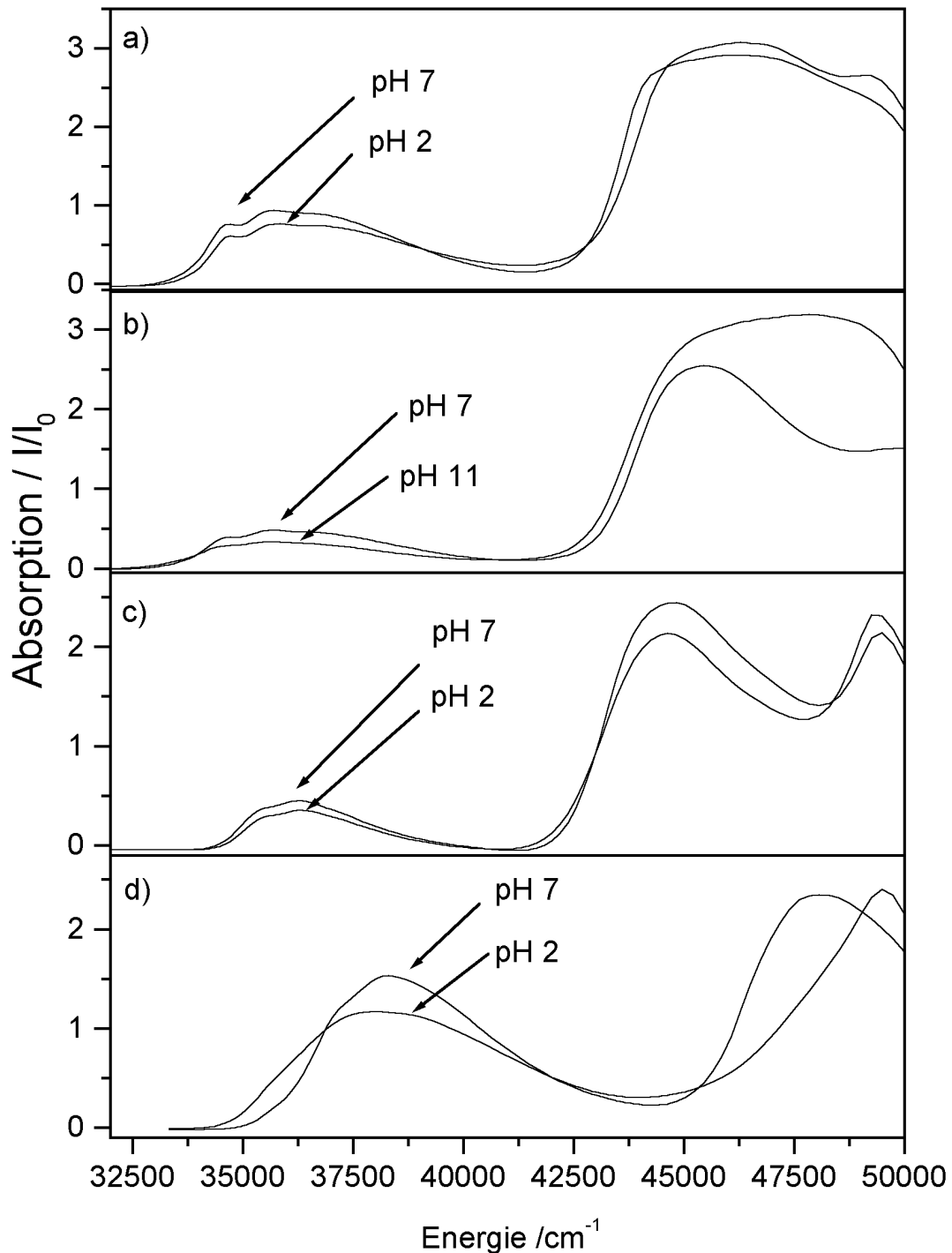


Abbildung 3.57: UV/VIS-Spektren von a) Tryptophan, b) Tryptamin, c) Tyrosin und d) Adenin. Außer bei Tryptamin ( $pH$  11 und  $pH$  7) wurden die Spektren jeweils bei  $pH$  2 und  $pH$  7 aufgenommen. Nur bei Adenin hat der  $pH$ -Wert einen Einfluss auf die Struktur des Spektrums. Aufgenommen in Ethylenglykol/Wasser 1:1 bei Raumtemperatur. Die Probenkonzentration betrug jeweils  $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ .

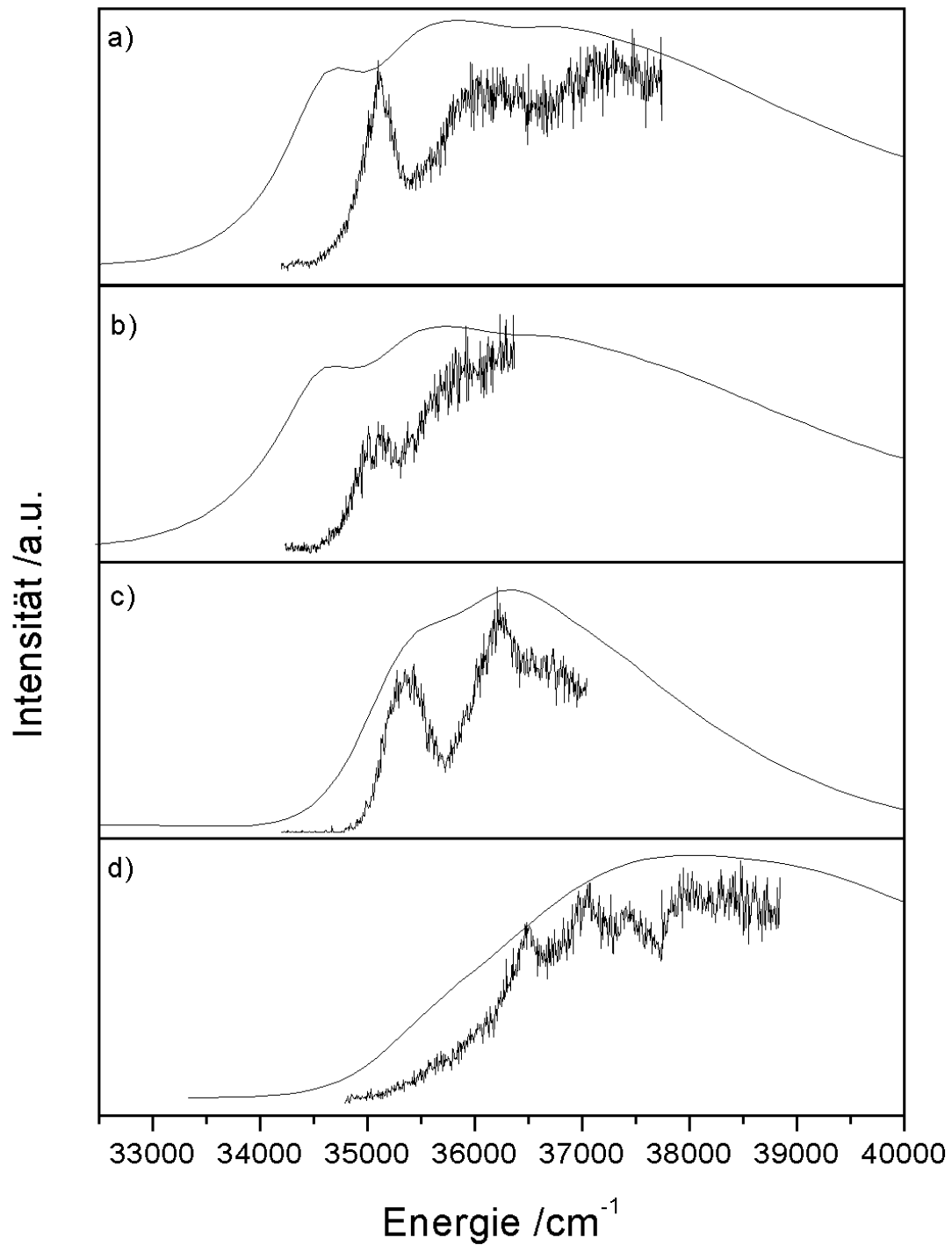


Abbildung 3.58: Direkter Vergleich der Photofragmentspektren mit den Absorptionsspektren bei *pH* 2. a) Tryptophan, b) Tryptamin, c) Tyrosin und d) Adenin.

jeweils das Absorptionsspektrum bei  $pH$  2 mit dem Photofragmentspektrum verglichen. Vergleicht man das Gasphasen- und Lösungsmittelspektrum von Tryptophan in Abb. 3.58a), so kann man sehen, dass das Gasphasenspektrum um etwa  $450\text{ cm}^{-1}$  zu höheren Energien verschoben ist. Die Struktur der Spektren ist sich hingegen sehr ähnlich. In beiden Spektren lassen sich drei Peaks erkennen, die etwa  $1000\text{ cm}^{-1}$  auseinander liegen. Der  $S_0 - S_1$  des neutralen Tryptophans in der Gasphase liegt bei  $34\,873\text{ cm}^{-1}$  [68, 69, 70], also im Bereich der Lösungsmittelabsorption.

Spezies	Absorption $/\text{cm}^{-1}$	Differenz $/\text{cm}^{-1}$
Neutral, Lösungsmittel	34 700	0
Protoniert, Lösungsmittel	34 700	0
Neutral, Gasphase	34 873	+173
Protoniert, Gasphase	35 150	+450

Tabelle 3.16: Vergleich der Absorptionen von Gasphase und Lösungsmittel bei Tryptophan.

Vergleicht man die Spektren von Tryptamin in der Gasphase mit denen im Lösungsmittel (s. Abb. 3.58b)), so ergibt sich die gleiche Situation wie beim Tryptophan. Auch hier ist das Gasphasenspektrum um etwa  $450\text{ cm}^{-1}$  zu höheren Energien verschoben.

Sowohl beim Tryptophan als auch beim Tryptamin setzt sich die Verschiebung vom Lösungsmittelspektrum zur protonierten Substanz in der Gasphase um  $450\text{ cm}^{-1}$  im Wesentlichen aus zwei Effekten zusammen. Durch die Wechselwirkung von Indol mit einem Wassermolekül, verschiebt sich bereits der elektronische Übergang vom neutralen Indol um  $\approx 150\text{ cm}^{-1}$  zu niedrigeren Energien [132]. In der Gasphase fehlt die Abschirmung und die Wechselwirkung zwischen Ladung und Indolring verschiebt den Übergang des neutralen Indols durch Protonierung offensichtlich um  $\approx 300\text{ cm}^{-1}$  zu höheren Energien. Es ergibt sich mit diesem simplen Modell ein Unterschied von  $\approx 450\text{ cm}^{-1}$  zwischen Lösungsmittel- und Gasphasenspektrum (s. Tab. 3.16).

Im Gegensatz dazu zeigt sich beim Tyrosin (s. Abb. 3.58c)) fast keine Verschiebung in den Spektren. Die REMPI-Spektren zeigen, dass die 0-0-Übergänge der verschiedenen neutralen Konformere in der Gasphase sowie die niederfrequenten Gerüstschwingungen im Bereich von  $35\,500\text{ cm}^{-1}$  bis  $35\,700\text{ cm}^{-1}$  liegen [103]. Die Absorption im Lösungsmittel liegt im gleichen Bereich. Das Photofragmentspektrum ist im Vergleich dazu leicht zu niedrigeren Energien verschoben. Vermutlich ist die Ursache der geringeren Verschiebung von Tyrosin im Vergleich zu Tryptophan und Tryptamin, dass sich das Dipolmoment von  $S_0$  und  $S_1$  nur geringfügig ändert.

Adenin zeigt als einzige untersuchte Substanz einen deutlichen Einfluss des pH-Werts auf das Lösungsmittelspektrum. Allein aus den Lösungsmittelspektren bei verschiedenen pH-Werten (s. Abb. 3.57d)) kann man aber nicht erkennen, ob es sich um einen Effekt des Lösungsmittels oder der Protonierung handelt. Der Vergleich mit dem Gasphasenspektrum (s. Abb. 3.58d)) deutet allerdings darauf hin, dass es sich um eine Wirkung der Protonierung handelt. In beiden Spektren ist ein breiter Anstieg zu erkennen. Dieser wird vermutlich durch die Überlagerung von zwei Effekten hervorgerufen [49]. Die Geometrie des elektronisch angeregten Zustands ist im Vergleich zum Grundzustand stark verschoben, so dass die Grundzustandssymmetrie einen Sattelpunkt in der Geometrie des angeregten Zustands bildet. Dadurch ergibt sich ein monoton steigender Franck-Condon Faktor. Die Lebensdauer des angeregten Zustands ist extrem kurz, so dass es zusätzlich zu einer Lebensdauererweiterung kommt. Durch die Überlagerung beider Effekte entsteht ein breiter, flacher Anstieg (s. Kap. 3.4.5).

Durch den Vergleich von Gasphasen- und Lösungsmittelspektren war es möglich, zwischen molekularen und Lösungsmittelleffekten zu unterscheiden. Bei Tryptophan, Tryptamin und Tyrosin konnte gezeigt werden, dass das Lösungsmittel die positive Ladung vollständig abschirmt. Schon ein kleiner Abstand von Ladung zum Chromophor reicht aus, um die Ladung vollständig abzuschirmen. Das UV/VIS-Spektrum von Adenin zeigt eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert. Durch den Vergleich mit dem Gasphasenspektrum konnte gezeigt werden, dass es sich nicht um einen Lösungsmittelleffekt handelt, sondern dass dies ein intramolekularer Effekt ist.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollten protonierte Substanzen mit biologischer Relevanz Methoden der optischen Spektroskopie in der Gasphase zugänglich gemacht werden. Ausgangspunkt der Arbeit war ein kommerzielles Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonik, das mit einer Elektrospray Ionenquelle und einer Paul-Falle ausgestattet ist.

Zur Durchführung der optischen Untersuchungen wurde das Gerät entsprechend modifiziert. Die komplexen und umfangreichen Modifikationen konzentrierten sich auf folgende Bereiche.

- i) Es musste ein optischer Zugang zur der Ionenfalle geschaffen werden. Zu diesem Zweck wurde die Vakuumkammer des Gerätes so geändert, dass ein Fenster montiert werden konnte. Dadurch war es möglich mit dem Laser direkt in der Paul-Falle zuzugreifen. Durch den Laserzugriff innerhalb der Falle konnten die massenspektrometrischen Möglichkeiten des Gerätes auch für die optischen Untersuchungen genutzt werden. So war es möglich, durch eine vorab Massenisolation sicher zu stellen, dass nur die gewünschte Spezies in der Falle vorhanden war. Nach dem Laserzugriff konnten die entstandenen
- ii) Die internen Abläufe des Massenspektrometers mussten mit dem Laser synchronisiert werden. Dazu wurden zusätzliche elektronische Anschlüsse an dem Massenspektrometer angebracht, sowie Elektronik zur Signalverarbeitung die dies ermöglichen.
- iii) Die Auflösung der optischen Spektren hängt stark von der internen Energie der Ionen ab. Aus diesem Grund wurde die Befestigung der Ionenfalle dahingehend modifiziert, dass die Umgebung der Ionenfalle gekühlt werden kann. Zur Verbesserung der Wärmeisolierung wurden Teile der Befestigung durch Vespelteile ersetzt. Zur Verminderung der Strahlungsverluste wurde die Falle mit einem Hitzeschild umgeben. Dadurch ist es möglich, die unmittelbare Umgebung der Paul-Falle auf  $150\text{ K}$  zu kühlen. Alle Modifikationen am Massenspektrometer wurden so ausgeführt, dass der originale Zustand des Geräts jederzeit wieder zu erreichen ist.

- iv) Die Ionenquelle liefert nur geringe Teilchenzahlen und schwankt zudem um etwa 20%. Um Raumladungseffekte zu vermeiden wurde im Schnitt mit 200 Ionen gearbeitet. Die gefundenen breiten Strukturen in den Photofragmentspektren erschweren die Arbeit zusätzlich. Das Lasersystem und der optische Aufbau wurden deshalb um einige Komponenten ergänzt, um die Schwankungen in den Laserintensitäten zu reduzieren.

Wichtig ist die Konstanz der Laserintensität über einen weiten Wellenlängenbereich. Dazu wurde eine Steuerung aufgebaut, mit der die Intensität des Farbstofflasers aktiv gesteuert werden kann. Zur Positionierung des Verdopplerkristalls wurde ebenfalls eine aktive Steuerung aufgebaut. Dadurch entfällt die Notwendigkeit zum Erstellen von geeigneten Kalibrierkurven. Das System ist in der Lage Störungen z.B. durch Temperaturschwankungen aktiv auszugleichen. Die Positionierung des Kristalls ist im kompletten durchstimmbaren Bereich optimal. Die Handhabbarkeit der Verdopplereinheit konnte dadurch deutlich verbessert werden.

- v) Die geringe Teilchenzahl macht die Justage des Laserstrahls sehr schwierig. Um eine möglichst gute Feinabstimmung zu erreichen, wurde deshalb eine computergesteuerte Spiegelhalterung aufgebaut. Damit ist es möglich, das Messsignal in Abhängigkeit der Spiegelposition zu ermitteln und die Position automatisch zu optimieren.
- vi) Zur Ansteuerung der einzelnen Komponenten wurden umfangreiche Computerprogramme mit Bilddarstellung unter LabView geschrieben. Die Programme zur Messdatenerfassung wurden ebenfalls unter LabView erstellt.

Bei gekühlter Ionenfalle konnte die Bildung von wasserstoffbrücken gebundenen Clustern beobachtet werden. Dies wird als Beweis gewertet, dass ein Energietransfer von den Ionen über das Puffergas an die Umgebung stattfindet. Die aufgebaute Kühlung ist somit zur Erniedrigung der Inneren Energie der Ionen in der Falle geeignet. Es konnten im Wesentlichen Cluster mit dem Lösungsmittel beobachtet werden. Aber auch Cluster mit Stickstoff und Sauerstoff konnten nachgewiesen werden.

Die Rate, mit der die Cluster gebildet werden, hängt interessanterweise stark von der Größe (Anzahl der Atome) und der Struktur der Substanz ab. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der internen Freiheitsgrade eine wichtige Rolle spielt. Kleine und starre Ionen bilden kaum Cluster, während Substanzen mit flexiblen Ketten schnell Cluster bilden.

Mit diesem experimentellen Aufbau konnten dann spektroskopische Daten an protonierten Substanzen gewonnen werden. Ausführliche Untersuchungen konnten an Tryptophan,



---

Tyrosin, Tryptamin und Adenin vorgenommen werden. Die Daten wurden für Tryptophan und Adenin direkt mit theoretischen Ergebnissen verglichen. Dazu wurde eine Veröffentlichung publiziert und eine weitere eingereicht.

Durch Beschuss mit einem UV-Laser konnte jeweils eine photoinduzierte Dissoziation (PID) erreicht werden. Die Art der Fragmentierung, die durch dieses Verfahren beobachtet wird, ähnelt der, die bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung (CID) beobachtet wird. Dies ist verständlich wenn man davon ausgeht, dass die Fragmentierung nach *internal conversion* aus einem hoch schwingungsangeregten Zustand heraus erfolgt. Die interne Energie der Ionen vor der Dissoziation ist größer als bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung. Entsprechend können in den PID Spektren Fragmente beobachtet werden, für deren Bildung eine höhere Aktivierungsenergie nötig ist. Für die untersuchten Aminosäuren konnten entsprechende Unterschiede nachgewiesen werden.

Im Falle von Tryptamin konnte im PID Spektrum ein dissoziativer Kanal gefunden werden, der im CID Spektrum fehlt. Dieser Kanal konnte von *Jouvet at al.* einem direkt dissoziativen *charge transfer* Zustand zugewiesen werden. Die photoinduzierte Fragmentierung lässt hier somit auch Rückschlüsse auf den elektronisch angeregten Zustand zu.

Es konnte die Wellenlängenabhängigkeit der Photofragmentierung gemessen werden. Damit konnte ermittelt werden, wie groß der Einfluss der Protonierung auf das elektronische Spektrum ist. In allen untersuchten Substanzen lag der Unterschied zwischen der neutralen und der protonierten Spezies im Bereich von wenigen hundert Wellenzahlen. Durch Kooperation mit Prof. Marian konnten die gemessenen Anregungsenergien mit theoretischen Untersuchungen verglichen werden. Es haben sich dabei sehr gute Übereinstimmungen von Theorie und Experiment ergeben. Beim Adenin konnten so starke Hinweise auf einen konischen Schnitt vom elektronisch angeregten Zustand mit dem Grundzustand gefunden werden. Die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Untersuchungen stellen die bis dahin genauesten Messungen des  $S_0$ - $S_1$  Übergangs von protonierten Substanzen in der Gasphase da.

Die Messungen innerhalb der Paul-Falle erfordern einen großen apparativen Aufwand. In dieser Arbeit konnte das erste mal erfolgreich ein Experiment aufgebaut werden, mit dem die Wellenlängenabhängigkeit der Photofragmentierung innerhalb einer Paul-Falle gemessen werden konnte. Die Kombination von Elektrosprayionisation mit einer Paul-Falle macht eine Vielzahl von Substanzen zugänglich, so z.B. eine Vielzahl biologisch relevanter Systeme. Damit wird hier eine Methode mit genereller Anwendbarkeit vorgestellt. Der Aufbau und die Durchführung des Experiments ist also erfolgreich. Dennoch lassen sich noch Verbesserungen durchführen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten nur Substanzen mit hoher Anregungswahrscheinlich-

keit untersucht werden. Die Leistung des verwendeten XeCl-Lasers reichte nicht aus, benzolähnliche Systeme wie Anilin oder Phenylalanin zu untersuchen. Es ist zu erwarten, dass man am Anilin eine Vielzahl von Hypothesen überprüfen kann. UV/VIS-Spektren bei verschiedenen pH-Werten haben eine erhebliche Blauverschiebung bei niedrigen pH-Werten gezeigt. Vermutlich wird dies durch Protonierung am Stickstoff hervorgerufen. Das freie Elektronenpaar kann nicht mehr ins aromatische System integriert werden, so dass sich ein UV/VIS-Spektrum ähnlich des Benzols ergibt. Durch das Fehlen von niederfrequenten Moden, wird ein gut aufgelöster 0-0 Übergang erwartet. Entsprechende Versuche sind wegen der mangelnden Laserleistung aber nicht erfolgreich gewesen.

Hauptaufgabe für zukünftige Arbeiten muss die Verbesserung der Auflösung sein. Durch eine Schwingungsauflösung ließen sich strukturelle Daten gewinnen und der Einfluss der Protonierung könnte besser bestimmt werden. Eine Ursache für die hohe Temperatur der Ionen kann der gerichtete, neutrale Teilchenstrom aus dem Einlassbereich sein. Durch den Einbau eines Shutters in die Trennwand von der Oktopol- zur Analysatorkammer könnte dieser unterbunden werden. Allerdings ist dies, aufgrund der geringen Baugröße des ESI-MS-Geräts, extrem aufwendig.

Im Tryptophananion erwartet man aufgrund des großen Dipolmoments des  $L_a$ -Zustands, dass dieser unter den  $L_b$ -Zustand rutschen könnte. In diesem Fall müsste das Photofragmentspektrum stark zu niedrigeren Energien verschoben sein.

Durch einen H/D-Austausch z.B. beim Tryptamin könnte man experimentell nachweisen, ob die H-Abspaltung direkt aus dem angeregten Zustand heraus erfolgt. Durch Lösen in  $D_2O$  lassen sich alle Wasseratome an der Aminogruppe austauschen. Findet die Dissoziation direkt aus dem angeregten Zustand heraus statt, so sollte nur der Deuteriumverlust beobachtet werden. Bei der Dissoziation aus dem Grundzustand kann es (wie in CID-Spektren zu sehen) zu einem intramolekularen H/D-Austausch kommen und man sieht sowohl den Verlust von Wasserstoff- als auch von Deuteriumatomen. Bisher hat auch für dieses Experiment die Laserleistung nicht ausgereicht.

# Literaturverzeichnis

- [1] J. J. Thomson, *Phil. Mag.*, 1899, **48**, 547.
- [2] K. H. Tanaka, H. Wake, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, und I. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1988, **8**, 2.
- [3] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, und F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. und Ion Processes*, 1987, **78**, 53.
- [4] M. Karas, U. Bahr, und F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 1989, **92**, 231.
- [5] M. Dole, L. L. Mack, und R. L. Hines, *J. Chem. Phys.*, 1968, **49**(5), 2240.
- [6] M. Yamashita und J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.*, 1984, **88**, 4451.
- [7] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, und C. M. Whitehouse, *Science*, 1989, **246**, 64.
- [8] R. C. Dunbar, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**(18), 4354.
- [9] B. S. Freiser und J. L. Beauchamp, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**(10), 3214.
- [10] W. Paul, O. Osberghaus, und E. Fischer, Forschungsberichte des wirtschaftsministeriums nordrhein-westfalen, 1958.
- [11] N. Soclá, *Phys. Lett.*, 2001, **342**, 191.
- [12] N. Soclá und O. Dopfer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 3628.
- [13] N. Soclá und O. Dopfer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 1421.
- [14] H. Kang, C. Jouvét, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, C. Charrière, G. Grégoire, C. Desfrancoise, J. Schermann, M. Barat, und J. A. Fayeton, *J. Chem. Phys.*, 2005, **122**, 084307.

- [15] H. Kang, C. Jouvét, C. Dedonder-Lardeux, S. Martrenchard, G. Grégoire, C. Desfrancoise, J.-P. Schermann, M. Barat, und J. A. Fayeton, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, **7**(2), 394.
- [16] H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvét, S. Martrenchard, G. Grégoire, C. Desfrancoise, J.-P. Schermann, M. Barat, und J. A. Fayeton, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, **6**(10), 2628.
- [17] S. Brønstedt Nielsen, A. Lapierre, J. U. Anderson, U. V. Pedersen, S. Tomita, und L. H. Andersen, *Phys. Rev. Lett.*, 2001, **87**, 228102.
- [18] L. H. Andersen, A. Lapierre, S. Brønstedt Nielsen an I. B. Nielsen, S. U. Pedersen, U. V. Pedersen, und S. Tomita, *Eur. Phys. J. D*, 2002, **20**, 597.
- [19] S. Boyé, I. B. Nielsen, H. Krogh, A. Lapierre, S. U. Pedersen, U. V. Pedersen, und L. H. Andersen, *J. Chem. Phys.*, 2003, **119**, 338.
- [20] D. Nolting, C. Marian, und R. Weinkauff, *Phys Chem. Chem. Phys.*, 2004, **6**(10), 2633.
- [21] M. Karas und F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 2299.
- [22] M. Barber, R. S. Bordolli, R. D. Sedgwick, und A. N. Tyler, *J. Chem Soc., Chem. Commun.*, 1981, (7), 325.
- [23] R. E. Honig, *J. Appl. Phys.*, 1958, **29**(3), 549.
- [24] A. Benninghoven, *Surf. Sci.*, 1973, **35**, 427.
- [25] D. F. Torgerson, R. P. Skowronski, und R. Macfarlane, *Biophys. Res. Commun.*, 1976, **60**, 616.
- [26] M. Barber und B. N. Green, *Rapid Commun. mass spectrom.*, 1987, **1**, 80.
- [27] P. Håkansson, I. Kamensky, B. Sundquist, J. Fohlman, P. Peterson, C. J. McNeal, und R. D. Macfarlane, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 2948.
- [28] H. Ehring, M. Karas, und F. Hillenkamp, *Org. Mass Spectrom.*, 1992, **27**, 472.
- [29] M. Karas und R. Krüger, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 427.
- [30] R. Bakhtiar und R. W. Nelson, *Biochemical Pharmacology*, 2000, **59**, 891.
- [31] S. K. Chowdhury, V. Katta, und B. T. Chait, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 9012.
- [32] U. A. Mirza, S. L. Cohen, und B. T. Chait, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 1.

- [33] R. R. Hudgins, J. Woenckhaus, und M. F. Jarrold, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 1997, **165/166**, 497.
- [34] P. Kebarle und M. Peschke, *Anal. Chem. acta*, 2000, **406**, 11.
- [35] G. Wang und R. B. Cole, *Anal. Chem. acta*, 2000, **406**, 53.
- [36] Rayleigh, *Phil. Mag.*, 1882, **14**, 184.
- [37] J. V. Iribarne und B. A. Thomson, *J. Chem. Phys.*, 1976, **64**(6), 2287.
- [38] S. Kubik, R. Goddard, R. Kirchner, D. Nolting, und J. Seidel, *Angewandte Chemie*, 2001, **113**(14), 2722.
- [39] R. Chen, X. Cheng, D. W. Mitchel, S. A. Hofstadler, A. L. R. Qinyuan Wu, M. G. Sherman, und R. D. Smith, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 1159.
- [40] F. M. Penning, *Physica*, 1936, **III**, 873.
- [41] J. A. Hipple, H. Sommer, und H. A. Thomas, *Phys. Rev.*, 1949, **76**, 1877.
- [42] H. Sommer, H. A. Thomas, und J. A. Hipple, *Phys. Rev.*, 1951, **82**(5), 697.
- [43] A. S. Danell und J. H. Parks, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2003, **229**, 35.
- [44] W. J. Moore und D. O. Hummel, *Physikalische Chemie*, de Gruyter, 4 ed., 1986.
- [45] H. el Aribi, G. Orlova, A. C. Hopkins, und K. W. M. Siu, *J. Phys. Chem. A*, 2004, **108**, 3844.
- [46] A. L. Sobolewski und W. Domcke, *Chem Phys. Lett.*, 1999, **315**, 293.
- [47] A. L. Sobolewski und W. Domcke, *J. Phys. Chem. A*, 2001, **105**, 9275.
- [48] A. L. Sobolewski, W. Domcke, C. Dedonder-Lardeux, und C. Jouvet, *Phys Chem. Chem. Phys.*, 2002, **4**, 1093.
- [49] C. Marian, D. Nolting, und R. Weinkauff, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, submitted.
- [50] A. G. Marshall und L. Schweikhard, *Int J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 1992, **118/119**, 37.
- [51] S. D.-H. Shi, J. J. Drader, C. L. Hendrickson, und A. G. Marshall, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1999, **10**, 265.
- [52] C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, und J. B. Fenn, *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 675.

- [53] H. Lioe und R. A. J. O'Hair, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2004, **15**, 65.
- [54] S. Bouchonnet, J.-P. Denhez, Y. Hoppilard, und C. Mauriac, *Anal. Chem.*, 1992, **64**, 743.
- [55] G. W. A. Milne, T. Axenrod, und H. M. Fales, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 5170.
- [56] C. D. Parker und D. M. Hercules, *Anal. Chem.*, 1985, p. 698.
- [57] R. E. March, *Journal of mass Spectrometry*, 1997, **32**, 351.
- [58] U. Brackmann, *Lambdachrome Laser Dyes*, Lambda Physik, 2 ed., 1997.
- [59] W. Demtröder, Springer-Verlag, 1991; Kapitel Optische Frequenzverdopplung, S. 230; 2 ed.
- [60] N. N. Greenwood und A. Earnshaw, *Chemie der Elemente*, VCH, 1. korrigierter nachdruck der 1. ed., 1990.
- [61] C. Gerthsen, H. O. Kneser, und H. Vogel, Springer Verlag, 1989; Kapitel Die Gesetze der Wärmeleitung, S. 216 ff; 16 ed.
- [62] ed. D. R. Lide, CRC Press LLC, 1999; chapter Properties of solids, pp. 12–195; 80 ed.
- [63] T. A. Flaim und P. D. Ownby, *J. Vac. Sci. Technol*, 1971, **8**, 661.
- [64] Esquire software und manuals. Bruker Daltonik GmbH, September , 2002.
- [65] S. F. Mason, *J. Chem. Soc.*, 1954, **2**, 2071.
- [66] M. Rožman, S. Kazazić, L. Klasnic, und D. Srzić, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, **17**, 2769.
- [67] Z. B. Maksić und B. Kovačević, *Chem. Phys. Lett.*, 1999, **307**, 497.
- [68] T. R. Rizzo, L. P. Young D. Park, und D. H. Levy, *J. Chem. Phys.*, 1985, **83**(9), 4819.
- [69] T. R. Rizzo, L. P. Young D. Park, und D. H. Levy, *J. Chem. Phys.*, 1986, **84**(5), 2543.
- [70] Y. D. Park, T. R. Rizzo, L. A. Peteanu, und D. H. Levy, *J. Chem. Phys.*, 1986, **84**(12), 6539.

- [71] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999.
- [72] L. C. Snoek, R. T. Kroemer, M. R. Hockridge, und J. P. Simons, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2001, **3**, 1819.
- [73] IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry und IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochem.*, 1975, **14**(2), 449.
- [74] C. O. Anderson, *Acta. Chem. Scand.*, 1958, **12**, 1353.
- [75] K. Biemann, J. Seibl, und F. Gapp, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1959.
- [76] K. Biemann und J. A. McCloskey, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 3192.
- [77] G. Junk und H. Svec, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**(7), 839.
- [78] G. A. W. Milne, T. Axenrod, und H. M. Fales, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**(17), 5170.
- [79] J. S. Klassen und P. Kebarle, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 6552.
- [80] F. Rogalewicz, Y. Hoppilliard, und G. Ohanessian, *Int. J. mass spectrom.*, 2000, **195/199**, 565.
- [81] C. Gerthsen, H. O. Kneser, und H. Vogel, Springer Verlag, 1989; Kapitel Arbeit, Energie, Impuls, Leistung, S. 27 ff; 16 ed.
- [82] N. N. Dookeran, T. Yalcin, und A. G. Harrison, *J. Mass Spectrom.*, 1996, **31**, 500.
- [83] L. Prokai, K. Prokai-Tatrai, E. Pop, N. Bodor, J. Lango, und J. Roboz, *Org Mass. Spectrom.*, 1993, **28**, 707.
- [84] J. E. McClellan, J. P. Murphy, III, J. J. Mullholland, und R. A. Yost, *Anal. Chem.*, 2002, **74**(2), 402.
- [85] R. C. Dunbar, *J. Chem. Phys.*, 1989, **90**, 7369.
- [86] W. D. Price, P. D. Schnier, und E. R. Williams, *Anal. Chem.*, 1996, **68**(5), 859.
- [87] J. U. Andersen, H. Cederquist, J. S. Forster, B. A. Huber, P. Hvelplund, J. Jensen, B. Liu, B. Manil, L. Maunoury, S. Brøndstedt Nielsen, U. V. Pedersen, J. Rangama, H. T. Schmidt, S. Tomita, und H. Zettergren, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, **6**(10), 2676.

- [88] R. Weinkauff, P. Schanen, A. Metsala, und E. W. Schlag, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**(47), 18567.
- [89] L. Li, A. M. Hogg, A. P. L. Wang, J.-Y. Zhang, und D. S. Nagra, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 974.
- [90] L. A. Philips und D. H. Levy, *J. Chem. Phys.*, 1988, **89**(1), 85.
- [91] Y. R. Wu und D. H. Levy, *J. Chem. Phys.*, 1989, **91**(9), 5278.
- [92] J. R. Carney und T. S. Zwier, *J. Phys. Chem.*, 2000, **104**, 8677.
- [93] J. R. Carney und T. S. Zwier, *Chem. Phys. Lett.*, 2001, **341**, 77.
- [94] L. L. Connel, T. C. Corcoran, P. W. Joireman, und P. M. Felker, *Chem. Phys. Lett.*, 2002, **166**(5-6), 510.
- [95] W. Caminati, *Phys. Chem Chem. Phys.*, 2004, **6**, 2806.
- [96] G. W. A. Milne, H. M. Fales, und R. W. Colburn, *Anal. Chem.*, 1973, **45**(11), 1952.
- [97] A. Bertazzo, S. Catinella, und P. Traldi, *J. Mass Spektrom.*, 1996, **31**, 735–740.
- [98] R. Cohen, B. Brauer, E. Nir, L. Grace, und M. de Vries, *J. Phys. Chem.*, 2000, **104**(27), 6351.
- [99] E. G. Robertson und J. P. Simons, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2001, **3**, 1.
- [100] G. S. Gorman, J. P. Speir, C. A. Turner, und I. J. Amster, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**(10), 3986.
- [101] E. P. L. Hunter und S. G. Lias, *J. Phys. Chem. ref. data*, 1998, **27**(3), 413.
- [102] E. P. Burrows, *J. Mass Spectrom.*, 1998, **33**, 221.
- [103] L. I. Grace, R. Cohen, T. M. Dunn, D. M. Lubman, und M. S. de Vries, *J. Mol. Spectrosc.*, 2002, **215**, 204.
- [104] S. J. Martinez III, J. C. Alfano, und D. H. Levy, *J. Mol. Spectrosc.*, 1992, **156**, 421.
- [105] J. R. Lakowicz, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999; chapter Protein Fluorescence, p. 446; 2 ed.
- [106] IUPAC-IUB joint comission on biochemical nomenclature, *Eur. J. Biochem.*, 1983, **131**, 9.



- [107] B. Cohen, P. Hare, und B. Kohler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 13594.
- [108] R. W. Wilson und P. R. Callis, *Photochem. Photobiol.*, 1980, **31**, 323.
- [109] J. W. Eastman, *Ber. Bunsenges. Physik. Chem.*, 1969, **73**, 401.
- [110] W. Cochran, *Acta Cryst.*, 1951, **4**, 81.
- [111] C. Canuel, M. Mons, F. Piuzzi, B. Tardivel, I. Dimicoli, und M. Elhanine, *J. Chem. Phys.*, 2005, **122**, 074316.
- [112] T. Gustavsson, A. Sharonov, und D. Markovitsi, *Chem. Phys. Lett.*, 2002, **351**, 195.
- [113] J. Peon und A. H. Zewail, *Phys. Lett.*, 2001, **348**, 255.
- [114] J.-M. Pecourt, J. Peon, und B. Kohler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 10370.
- [115] J.-M. Pecourt, J. Peon, und B. Kohler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 9348.
- [116] D. C. Lührs, J. Viallon, und I. Fischer, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2001, **3**, 1827.
- [117] S. Ullrich, T. Schulz, M. Zgierski, und A. Stolow, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 2262.
- [118] Y. Lee, B. Kim, M. Schmitt, und K. Kleinermanns, *submitted*, 2005.
- [119] H. Kang, B. Jung, und S. K. Kim, *J. Chem. Phys.*, 2003, **113**, 6717.
- [120] A. Broo, *J. Phys. Chem. A*, 1998, **102**, 526.
- [121] H. Kang, K. T. Lee, B. Jung, Y. J. Ko, und S. K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 12958.
- [122] C. M. Marian, *J. Chem. Phys.*, 2005, **122**, 104314.
- [123] S. Perun, A. L. Sobolewski, und W. Domcke, *Chem. Phys.*, 2005, **313**, 107.
- [124] S. Perun, A. L. Sobolewski, und W. Domcke, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **in the press**.
- [125] C. Plützer, E. Nir, M. S. de Vries, und K. Kleinermanns, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2001, **3**, 5466.
- [126] E. Nir, C. Plützer, K. Kleinermanns, und M. de Vries, *Eur. Phys. J. D*, 2002, **20**, 317.

- [127] C. Plützer und K. Kleineremanss, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2002, **4**, 4877.
- [128] N. J. Kim, H. Kang, Y. D. Park, und S. K. Kim, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, **6**, 2802.
- [129] C. Marian, private Mitteilungen.
- [130] R. Brdička., VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1972; Kapitel 9, S. 797; 11 ed.
- [131] D. S. Groiss und E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 883.
- [132] T. Montoro, C. Jouvét, A. Lopez-Campillo, und B. Soep, *J. Phys. Chem.*, 1983, **87**, 3582.