

Kleine Peptide in der Gasphase:
Doppelresonanzspektroskopie an laserdesorbierten Di- und
Tripeptiden

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt von
Isabel Hünig
aus Düsseldorf

Düsseldorf
2003

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

Referent: Prof. Dr. K. Kleinermanns

Koreferent: Prof. Dr. R. Weinkauff

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2003

Die Vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis Oktober 2003 am Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie 1 der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Karl Kleinermanns angefertigt.

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

Herrn Prof. Dr. Karl Kleinermanns danke ich für die gute Betreuung, seine stete Diskussionsbereitschaft und die Schaffung einer fruchtbaren und angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Rainer Weinkauff danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, viele inspirierende und motivierende Diskussionen und nicht zuletzt für seine Großzügigkeit, einen Desorptionslaser über einen Zeitraum von zwei Jahren!! zur Verfügung zu stellen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bin ich für die Kameradschaftlichkeit, das freundschaftliche Klima und die gute Zusammenarbeit dankbar.

Frau Schiedel danke ich sehr herzlich für ihren Beistand in schwierigen Situationen.

Den Mitarbeitern der Werkstatt gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit.

Beim Fonds der Chemischen Industrie möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung in Form eines Doktorandenstipendiums bedanken.

Last but not least danke ich meiner Familie herzlichst für unseren Zusammenhalt und die viele Unterstützung, die mir von ihr entgegengebracht wurde.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
2	Experiment	17
2.1	Die Laserdesorption	17
2.1.1	Funktionsweise der Laserdesorption	19
2.1.2	Aufbau der Laserdesorptionsquelle	21
2.2	Spektroskopie am Überschalldüsenstrahl	27
2.2.1	Spektroskopische Methoden	27
2.2.2	Der Überschalldüsenstrahl	29
2.3	Apparativer Aufbau	32
2.3.1	Die Molekularstrahlapparatur	32
2.3.2	Die Lasersysteme	38
2.3.3	Die zeitliche Steuerung	39
3	<i>Ab initio</i>-Rechnungen	45
3.1	Dichtefunktionaltheorie	46
3.1.1	Geometrieoptimierung	50

3.1.2	Normalkoordinatenanalyse	50
4	Ergebnisse	53
4.1	Trp-Gly und Gly-Trp	54
4.1.1	UV-UV Doppelresonanzspektroskopie an Trp-Gly	54
4.1.2	UV-UV Doppelresonanzspektroskopie an Gly-Trp	58
4.1.3	IR-UV Doppelresonanzspektroskopie an Trp-Gly und Gly-Trp	60
4.2	Trp-Gly-Gly	80
4.2.1	UV-UV Doppelresonanzspektroskopie an Trp-Gly-Gly	80
4.2.2	IR-UV Doppelresonanzspektroskopie an Trp-Gly-Gly	80
4.3	Trp-OEt	89
4.4	Andere Peptide	91
4.4.1	UV-UV Doppelresonanzspektroskopie an Trp-Ser	91
4.4.2	UV-UV Doppelresonanzspektroskopie an Pro-Trp	93
4.4.3	REMPI-Spektroskopie an Gly-Trp-Gly	95
5	Zusammenfassung	97

Tabellenverzeichnis

2.1	Ausstattung der Apparaturen	36
2.2	Energien und Wellenlängen der Laser	39
2.3	Steuerpulszeiten für ein UV-UV Doppelresonanzexperiment	41
2.4	Steuerpulszeiten für ein IR-UV Doppelresonanzexperiment	43
4.1	Frequenzen der harmonischen Schwingungsprogressionen von Trp-Gly	56
4.2	Frequenzen der harmonischen Schwingungsprogressionen von Trp-Gly- Gly	83

Abbildungsverzeichnis

2.1	Temperaturverlauf an einer Oberfläche bei Bestrahlung mit einem Laser	19
2.2	Schematische Darstellung der Laserdesorptionsquelle	23
2.3	Fotographische Abbildung der Laserdesorptionsquelle	24
2.4	Signalintensität von desorbiertem PABA in Abhängigkeit von dem vertikalen Abstand zwischen Pulsdüsenöffnung und Laserdesorptionsort.	26
2.5	Termschema für REMPI, UV-UV-SHB und IR-UV-SHB	29
2.6	Modell der adiabatischen Abkühlung während einer Expansion	30
2.7	Schematische Darstellung der Molekularstrahlapparatur	33
2.8	Zeitliche Abfolge des Brenn- und Analyselaserpulses und der Hochspannungsschaltung.	40
2.9	Schematische Abbildung der IR-UV Doppelresonanzapparatur	42
4.1	REMPI- und UV-UV-SHB Spektren von Trp-Gly	55
4.2	REMPI- und UV-UV-SHB von Gly-Trp	59
4.3	Mögliche Konformationen des Peptidrückgrates der beiden Dipeptide Trp-Gly und Gly-Trp	61
4.4	Strukturen der 10 berechneten (DFT B3LYP 6-31G(d,p)) Gly-Trp Konformere vom Typ 6	63

4.5	Berechnete (DFT B3LYP 6-31G(d,p)) Spektren der 10 Gly-Trp Konformere mit Peptidrückgraten ähnlich Konformation 6	64
4.6	Berechnete (DFT B3LYP 6-31G(d,p)) Spektren der 9 Gly-Trp Konformere mit Peptidrückgraten ähnlich Konformation 7	64
4.7	Strukturen der 9 berechneten (DFT B3LYP 6-31G(d,p)) Gly-Trp Konformere vom Typ 7	65
4.8	IR-UV Doppelresonanzspektrum von Trp-Gly	68
4.9	IR-UV Doppelresonanzspektrum von Trp-Gly im Vergleich mit Theorie	71
4.10	Strukturen von Trp-Gly auf DFT B3LYP 6-31G(d,p) Niveau geometrieoptimiert	72
4.11	IR-UV Doppelresonanzspektrum von Gly-Trp	75
4.12	IR-UV Doppelresonanzspektrum von Gly-Trp im Vergleich mit Theorie	76
4.13	Strukturen von Gly-Trp auf DFT B3LYP 6-31G(d,p) Niveau geometrieoptimiert	77
4.14	Überblick über die Schwingungsfrequenzen der Peptid-NH Streck-schwingungen	79
4.15	REMPI- und UV-UV-SHB Spektren von Trp-Gly-Gly	81
4.16	IR-UV Doppelresonanzspektren von Trp-Gly-Gly	82
4.17	Mögliche Konformationen des Peptidrückgrates Von Trp-Gly-Gly . .	85
4.18	IR-UV Doppelresonanzspektren von Trp-Gly-Gly im Vergleich mit der Theorie	87
4.19	Strukturen von Trp-Gly-Gly auf DFT B3LYP 6-31G(d,p) Niveau geometrieoptimiert	88
4.20	REMPI- und UV-UV-SHB Spektren von Trp-OEt	90
4.21	REMPI- und UV-UV-SHB Spektren von Trp-Ser	92
4.22	REMPI- und UV-UV-SHB Spektren von Pro-Trp	94

4.23 REMPI-Spektrum vom Tripeptid Gly-Trp-Gly 96

Kapitel 1

Einleitung

Peptide sind wegen ihres häufigen Vorkommens in der Natur einer der wichtigsten Bausteine des Lebens. Aufgrund der Vielzahl an frei drehbaren Bindungen, sind Peptide sehr flexible Moleküle und können die unterschiedlichsten Strukturen annehmen. Da sie vielfältige funktionelle Gruppen haben, bedeutet die hohe Flexibilität für die direkte Umgebung, dass ein und dasselbe Molekül, abhängig von der aktuellen Konformation, unterschiedliche Eigenschaften und sogar unterschiedliche *Funktionen* annehmen kann.

Die Faltung von Peptidketten in physiologischen Medien hängt von vielen Faktoren ab, zu denen intramolekulare Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Bindungen zählen, aber auch elektrostatische und intermolekulare Wechselwirkungen, besonders mit dem Lösungsmittel, sowie entropische Effekte. Um das Faltungsverhalten und die Eigenschaften von Peptiden verstehen zu können, ist es notwendig, zunächst ihr internes, ihnen eigenes Verhalten fernab von äußeren Einflüssen zu studieren. Nur wenn die Eigenschaften eines Moleküls ohne seine Umgebung bekannt sind, kann beurteilt werden, welchen Effekt äußere Einflüsse haben und das System als Ganzes verstanden werden.

Eine Möglichkeit, vollkommen isolierte Spezies zu untersuchen, bietet die Spektroskopie in Molekularstrahlen. Hier liegen die Moleküle als Neutralteilchen ohne Umgebungsmoleküle vor. Zur Aufklärung von Strukturen hat sich, in Kombination mit

Molekularstrahlen, die Laserspektroskopie bewährt. Doppelresonanzmethoden sind dabei besonders leistungsfähig, da sie die Möglichkeit bieten, zwischen verschiedenen Konformeren desselben Moleküls zu unterscheiden und sie getrennt von einander zu untersuchen. Um Peptide in Molekularstrahlen spektroskopisch untersuchen zu können, müssen sie unzerstört in die Gasphase überführt werden. Es ist jedoch nicht möglich, dies durch Erwärmen oder Erhitzen zu erreichen, da Peptide im allgemeinen nicht flüchtig und zudem thermisch instabil sind. In der jüngeren Vergangenheit sind große Fortschritte bei der Entwicklung von Techniken erzielt worden, die das Problem der thermischen Zersetzung umgehen. Heute stehen uns eine Vielzahl solcher Techniken zur Verfügung, wodurch es möglich geworden, ist vor allem biologische Moleküle isoliert zu untersuchen. Eine der wichtigsten Methoden darunter, mit denen Neutralteilchen in der Gasphase präpariert werden können, ist die Laserdesorption von Graphit. Dabei werden Probemoleküle durch Bestrahlung mit kurzen Laserpulsen von einer Graphitoberfläche desorbiert.

In dieser Arbeit wurde eine Laserdesorptionsquelle entwickelt und diese in eine bestehende Flugzeitmassenspektrometer-Molekularstrahlapparatur eingebaut (s. Abschnitt 2.1.2, s. 21). Mit diesem Aufbau konnten thermisch labile Di- und Tripeptide mit Hilfe der REMPI-Spektroskopie und Doppelresonanzmethoden untersucht werden. Es gelang erstmals, Infrarotspektren des elektronischen Grundzustands von ungeschützten Peptiden aufzunehmen und die Struktur der unterschiedlichen, beobachteten Konformere in der Gasphase von einer Vielzahl von denkbaren Strukturen auf wenige einzugrenzen (s. Abschnitt 4.1.3, s. 67 und Abschnitt 4.2.2, s. 80). Die Interpretation der Spektren wurde dabei von *ab initio*-Rechnungen der Konformerstrukturen und ihrer Schwingungsfrequenzen unterstützt.

Alle spektroskopischen Methoden, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, basieren auf der elektronischen Anregung gefolgt von Ionisierung der Moleküle mit UV-Licht. Daher ist es notwendig, dass die Moleküle, die untersucht werden sollen, einen geeigneten Chromophor enthalten. In der Natur kommen drei Aminosäuren vor, die ein aromatisches Ringsystem enthalten und somit diesem Anspruch genügen, nämlich: Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Phenylalanin (Phe). Die Aminosäure Tryptophan eignet sich aufgrund ihrer leichten Ionisierbarkeit und ihrer intensiven Übergänge besonders für spektroskopische Untersuchungen. Daher enthalten alle in dieser Arbeit untersuchten Di- und Tripeptide Tryptophan als einen ihrer Bausteine.

Im Folgenden werden zunächst der Aufbau und die Funktionsweise der neuen Laser-desorptionsquelle und des Experimentes dargestellt. Anschließend wird die *ab initio* Methode (Dichtefunktionaltheorie), mit der die Strukturen und Spektren der untersuchten Moleküle berechnet wurden, behandelt. Zum Schluss werden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen vorgestellt. Diese umfassen die REMPI-, UV-UV- und IR-UV Doppelresonanzuntersuchungen an den Dipeptiden Tryptophan-Glycin (Trp-Gly) und Glycin-Tryptophan (Gly-Trp) und des Tripeptides Tryptophan-Glycin-Glycin (Trp-Gly-Gly), sowie REMPI- und UV-UV Doppelresonanzuntersuchungen an Tryptophan-Serin (Trp-Ser), Prolin-Tryptophan (Pro-Trp) und Tryptophanethylester (Trp-OEt). Außerdem wurde das Tripeptid Glycin-Tryptophan-Glycin (Gly-Trp-Gly) mit Hilfe der REMPI-Spektroskopie untersucht.

Kapitel 2

Experiment

2.1 Die Laserdesorption

Die Laserdesorption kombiniert mit einem Überschalldüsenstrahl ist eine effiziente Methode, mit deren Hilfe man nichtflüchtige und thermisch instabile Stoffe unfragmentiert in die Gasphase bringen kann. Bei richtig gewählten Bedingungen liegen die Moleküle dann als isolierte Neutralteilchen vor und sind unterschiedlichen spektroskopischen Methoden zugänglich.

Zuerst wurde die Laserdesorption 1967 beobachtet, also nur wenige Jahre, nachdem der Laser (1963) erfunden wurde. Damals berichteten Levine et al.¹, dass Elektronen, positive Ionen, Neutralteilchen und Oberflächenmaterial in die Gasphase gehen, wenn eine Wolframoberfläche im Vakuum mit starken Laserpulsen bestrahlt wird. Zu dieser Zeit waren die Moleküle, die im Massenspektrometer beobachtet wurden CO und CO₂, Wasserstoff und Kohlenwasserstoffe (C_nH_m), also unproblematische Moleküle, wenn es darum geht, sie in die Gasphase zu überführen. Trotzdem enthält schon diese Studie den Grundstein zu zahlreichen Entwicklungen, die heute vielfach genutzt werden. Jede der Beobachtungen (LDI (Laser desorption ionization), Laserablation und Laserdesorption) ist über die vergangenen Jahrzehnte hinweg weiter untersucht worden und zum Teil auf spezielle Anwendungen optimiert und nutzbar gemacht worden.

Ein Meilenstein auf dem Weg, große, schwerflüchtige und thermisch instabile Mo-

leküle per Laserdesorption unzerstört in die Gasphase zu bringen, folgte 1978 als es Posthumus et al.² gelang Oligosaccharide, Digitonin (1228D), Nucleoside (bis zu 572D) und Oligopeptide (bis zu 704D) als $(M+\text{Alkalimetall})^+$ Ionen von Metalloberflächen zu desorbieren und im Massenspektrometer nachzuweisen. Die diesem Ansatz verwandte Methode, MALDI, (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) wurde 1987 von Karas, Hillenkamp und Mitarbeitern³ eingeführt und ist heute eine häufig verwendete Methode bei der massenspektrometrischen Analyse von thermisch schwerverdampfbaren Substanzen.⁴⁻⁷ Neben der Laserdesorption wurden auch andere Techniken entwickelt, um thermisch instabile und schwerflüchtige Substanzen hauptsächlich der Massenspektrometrie zugänglich zu machen. Dazu gehören zum Beispiel die Felddesorption,⁸ LIAD (laser induced acoustic desorption)⁹ teilcheninduzierte Desorption in unterschiedlichen Varianten,¹⁰ Elektrospray,¹¹ Thermospray,¹² oder gepulstes schnelles Heizen.^{13,14}

1981 wurde von der Arbeitsgruppe um Smalley¹⁵ und von Bondybay et al.¹⁶ die Laserdesorption von Metallen erstmals mit Molekularstrahlen kombiniert, um Metallcluster spektroskopisch zu untersuchen.

Vier Jahre später gelang es der Arbeitsgruppe Schlag^{17,18} Biomoleküle (Tryptophan und Retinal) als Neutralteilchen in einen Molekularstrahl zu desorbieren und diese Moleküle in einem zweiten Schritt mit REMPI (resonance enhanced multi photon ionization) zu ionisieren. Diese Technik wurde zunächst für massenspektrometrische Untersuchungen verwendet,¹⁹⁻²⁵ aber bald auch von den Arbeitsgruppen um Levy und Lubman mit REMPI²⁶⁻²⁹-, LIF- (laser induced fluorescence) und DF²⁸-Spektroskopie (dispersed fluorescence) kombiniert. In neuerer Zeit hat sich die Laserdesorption von Graphit als besonders vorteilhaft herauskristallisiert, die von der Arbeitsgruppe DeVries optimiert worden ist.³⁰ Die Zahl an Publikationen, die diese Methode einsetzen, um Biomoleküle im Molekularstrahl spektroskopisch zu untersuchen ist in den letzten Jahren stark angestiegen. So sind vor allem Bausteine der DNS,³¹⁻⁴⁰ Aminosäuren⁴¹ und Peptide⁴²⁻⁴⁴ untersucht worden.

Im folgenden Abschnitt (2.1.1) wird zunächst die prinzipielle Funktionsweise der Laserdesorption beschrieben. In Abschnitt 2.1.2 wird auf den Aufbau der Laserdesorptionsquelle im Rahmen dieser Doktorarbeit detailliert eingegangen.

2.1.1 Funktionsweise der Laserdesorption

Die Laserdesorption in Kombination mit Überschalldüsenstrahlen wurde in der Vergangenheit auf unterschiedliche Arten realisiert.^{17,25,27,30,42,46,47} Im allgemeinen wird eine Oberfläche, die mit einer Probenschicht bedeckt ist, der Bestrahlung durch Laserlicht ausgesetzt. Die Oberfläche wird heiß, wodurch die Bindungen zwischen Adsorbat und Adsorbens aufgebrochen werden und heiße, aber dennoch intakte Moleküle in die Gasphase eintreten. Die Moleküle werden in die Expansionsregion eines Molekularstrahls desorbiert. Dies ist die Region des Molekularstrahls, in dem die Abkühlung der Moleküle durch viele Stöße mit den Trägergasatomen stattfindet (s. auch Abschnitt 2.2.2). Die Temperatur, die die Moleküle hier erreichen, liegt in der

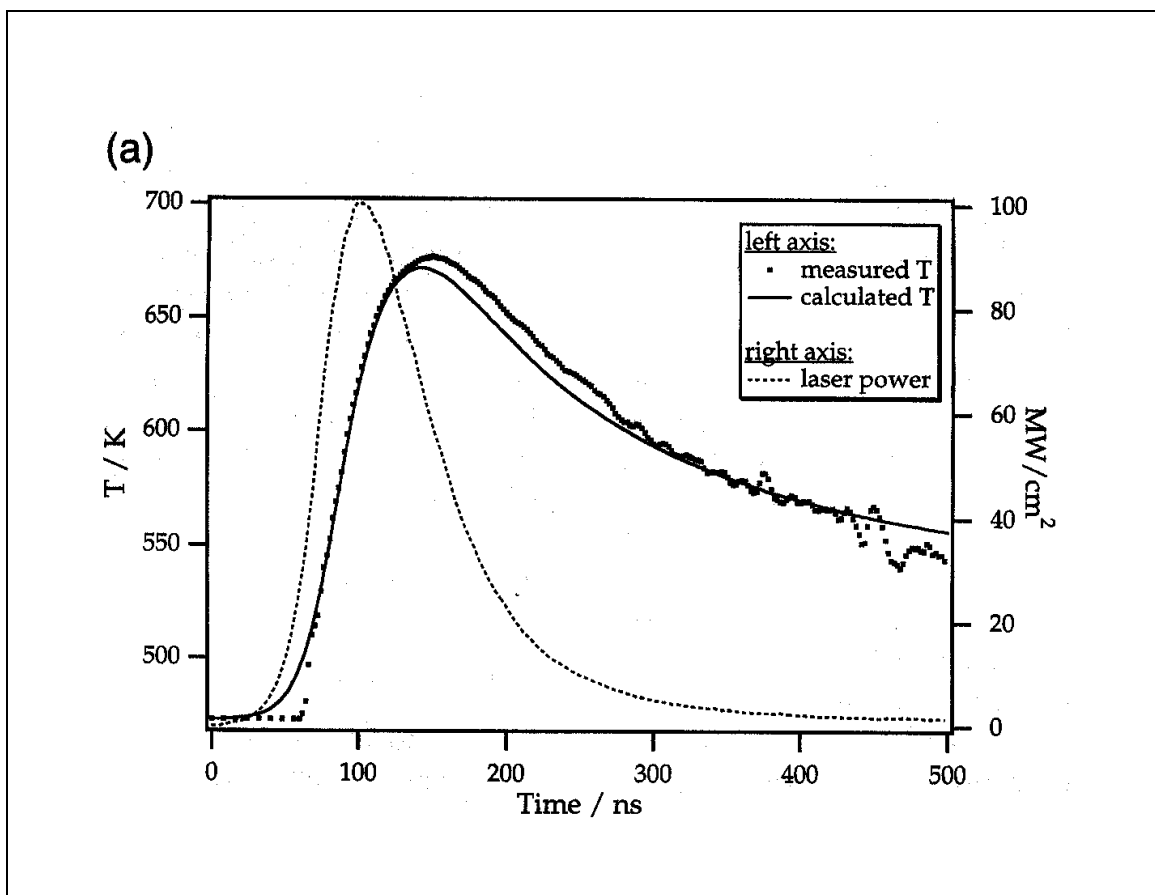


Abbildung 2.1: Gemessener Temperaturverlauf an einer mit Silizium überzogenen Wolframoberfläche in Abhängigkeit von der Zeit (gepunktete Linie) bei Bestrahlung mit einem CO₂-Laser Puls (0.8J/Puls, 100ns FWHM, $\lambda=10.6\mu\text{m}$), Fit der Messung (durchgehende Linie) und Verlauf der Laserleistung (gestrichelte Linie)⁴⁵

Größenordnung von etwa 10K.

Wenn das Licht von der Oberfläche absorbiert wird, heizt sich die Oberfläche sehr schnell mit Heizraten in der Größenordnung 10^8 K/s bis 10^{11} K/s^{45,48} auf. Abbildung 2.1 zeigt die zeitliche Entwicklung der Laserleistung und der Temperatur, während eine mit Silizium überzogene Wolframoberfläche mit 0.8J/Puls (10.6 μ m, 100ns FWHM, entspricht $8 \cdot 10^6$) eines CO₂ Lasers bestrahlt wird.⁴⁵ In diesem Beispiel wird eine Oberflächentemperatur von 650K erreicht. Im allgemeinen gilt: unterhalb von einer Leistungsdichte von 10^8 W/cm² ist das Verhältnis von Neutralteilchen zu Ionen groß.⁴⁹ Die Oberflächentemperatur bei der Desorption von Neutralteilchen wird also voraussichtlich etwa vergleichbar sein. Trotz der hohen Oberflächentemperatur zersetzen sich die Moleküle bis zu einer kritischen Größe nicht. Verschiedene Modelle des Laserdesorptionsmechanismus werden in der Literatur diskutiert und untersucht. Lucchese et al.⁴⁸ und Zare et al.⁵⁰ schlugen vor, dass es eine Engstelle bei der Energieübertragung von der schnell geheizten Oberfläche über die Oberflächen-Adsorbat Bindungen zu den internen Bindungen der desorbierenden Moleküle gibt. Dieser Effekt basiert auf dem Frequenzunterschied der internen Schwingungsmoden des Adsorbates und den niederfrequenten Oberflächenmoden der Oberfläche. Temperaturmessungen der Oberfläche und der desorbierten Moleküle anhand ihrer Geschwindigkeitsverteilung durch Zenobi und Mitarbeiter^{51,52} zeigten jedoch, dass solch ein Übertragungseingpass selbst bei der Desorption im Picosekundenbereich nicht existiert. Zenobi wies darauf hin, dass die Kinetik der meisten Laserdesorptionsprozesse recht gut mit Hilfe der Übergangszustandstheorie erklärt werden können.⁵³ Danach ist die Zersetzung aufgrund niedrigerer Aktivierungsenergie bei niedrigen Temperaturen schneller als die Desorption. Bei hohen Temperaturen kontrollieren die Frequenzfaktoren die Schnelligkeit der beiden konkurrierenden Prozesse, und die Moleküle desorbieren intakt, wenn der Temperaturanstieg so schnell ist, dass die Reaktionsrate der Desorption die der Zersetzung überschreitet, bevor die Moleküle zerfallen.⁵⁴

Eine weitere Erklärung dafür, dass laserdesorbierte Moleküle intakt bleiben, obwohl sie vorübergehend hohe Temperaturen erreichen, ist, dass beim Desorptionsprozess die Energie, die von den Molekülen aufgenommen wird, gleichmäßig über alle Schwingungsmoden verteilt wird. Je größer ein Molekül ist, desto kleiner ist die Wahrscheinlichkeit und desto länger dauert es, bis die Energie sich durch Modenkopplung so in einer Mode aufkonzentriert, dass ein Bindungsbruch erfolgen kann.

Wenn diese Zeit unter der Zeit liegt, die es braucht, bis die Moleküle vom Molekularstrahl erfaßt werden, so bleiben sie unzersetzt, denn im Molekularstrahl werden sie sofort so weit gekühlt, dass die Aktivierungsenergie für die Zersetzung nicht ausreicht.⁵⁵

Erst kürzlich wurde die Laserdesorption von der Arbeitsgruppe de Vries im Hinblick auf die Stabilität der Laserdesorption so weit verbessert, dass es möglich geworden ist, mit normaler Mittelung sehr gute Spektren von thermisch labilen Biomolekülen in der Gasphase zu erhalten.³⁰ De Vries und Mitarbeiter desorbieren mit der Fundamentalen eines Nd:YAG ($1.06\mu\text{m}$) Lasers mit hoher Leistungsstabilität von einer Graphitoberfläche. Der Vorteil hierbei ist, dass die Graphitoberfläche das Laserlicht sehr gut absorbiert, während die Probensubstanzen im allgemeinen bei der verwendeten Wellenlänge nicht oder nur wenig absorbieren.

2.1.2 Aufbau der Laserdesorptionsquelle

In dieser Arbeit wurde eine Laserdesorptionsquelle entwickelt und diese in eine bestehende TOF-MS Molekularstrahl Apparatur eingebaut. Mit diesem Aufbau können thermisch labile Peptide mit Hilfe der REMPI-Spektroskopie und Doppelresonanz Methoden untersucht werden. Der Aufbau der hier entwickelten Desorptionsquelle ist an den Aufbau der von DeVries und Mitarbeitern³⁰ entwickelten Quelle angelehnt. Die in dieser Arbeit gewählte Anordnung bietet jedoch den Vorteil, dass sie durch ihre Kompaktheit leicht in eine bestehende, konventionelle Molekularstrahl-Apparatur eingebaut werden kann.

Bei der Entwicklung einer Laserdesorptionsquelle, die für spektroskopische Zwecke eingesetzt werden soll, sind sowohl die Schuss-zu-Schussstabilität, als auch die Langzeitstabilität des Signals von großer Bedeutung. Erstere kann dadurch erreicht werden, dass die Verteilung der Probensubstanz sehr fein und gleichmäßig auf der Oberfläche ist. Ferner kann eine hohe Stabilität durch eine gute Schuss-zu-Schussstabilität des Desorptionslasers erreicht werden.

Bei der Laserdesorption von einer Oberfläche, auf der sich eine dünne Substanzschicht befindet, wird mit jedem Laserpuls kontinuierlich Substanz von der Oberfläche entfernt. Die Menge an desorbierter Substanz nimmt also im Laufe der Zeit ab,

was sich in einer etwa exponentiellen Abnahme der Signalintensität niederschlägt. Daher ist es für die Langzeitstabilität des Signals wichtig, dass laufend eine Oberflächenstelle mit frischer Substanz zur Verfügung gestellt wird, was durch eine Verschiebung des Probenträgers erzielt wird. Da die Signalintensität jedoch auch stark von dem Abstand zwischen Oberfläche und Molekularstrahl abhängt, muss, wenn eine Langzeitstabilität garantiert werden soll, die Oberfläche glatt sein und gleichmäßig bewegt werden können; das heißt, während der Probenträger in X-Richtung bewegt wird, darf er sich nicht gleichzeitig in Y und Z-Richtung verschieben.

Abbildung 2.2 zeigt den schematischen Aufbau der Quelle und ihre Anordnung in der Molekularstrahlapparatur, wie sie zur Aufnahme der Spektren, die in dieser Arbeit dargestellt werden, verwendet wurde, Abbildung 2.3 zeigt eine photographische Abbildung derselben Quelle. Eine Graphitscheibe (Rohmaterial: Schunk, Kohlenstofftechnik) von 60mm Durchmesser und 2 mm Dicke dient als Probenträger. Die zu untersuchende Substanz wird mit einem weichen Gegenstand auf dem Rand der Graphitscheibe gleichmäßig aufgetragen und die Scheibe so befestigt, dass ihr Rand mit den Probemolekülen direkt unter dem Pulsdüsenloch sitzt. Die Probe wird nun mit einem gepulsten Nd:Yag Laser (Minilite, Continuum; 10ns Pulslänge) bestrahlt, der bei 1064nm betrieben wird und dessen Leistungsdichte auf etwa $5\text{mJ}/\text{cm}^2$ abgeschwächt wird. Die Wellenlänge des Lasers wurde hierbei so gewählt, dass sie zwar vom Graphit absorbiert wird, nicht aber von der Probensubstanz, so dass photochemische Prozesse verhindert werden. Der Laserstrahl hat einen Durchmesser von etwa 2mm und wird so justiert, dass er die Moleküle unter 1mm von der Pulsdüse entfernt desorbiert. Der senkrechte Abstand der Probenoberfläche von der Pulsdüsenöffnung kann während eines laufenden Experimentes mit Hilfe eines Motors (Motor 2 in Abbildung 2.3), der einen Verschiebetisch bewegt, eingestellt werden und ist bei einem Abstand von etwa 0.5mm optimal.

Der senkrechte Abstand und die Laserintensität, mit der desorbiert wird, haben beide einen empfindlichen Effekt auf die Kühlung der Moleküle durch den Molekularstrahl. Ob die Kühlung ausreichend ist, kann oft anhand der Linienbreite der Banden beurteilt werden. Die vibronischen Banden, die mit den gepulsten Farbstofflasern aufgenommen werden können, sind die Rotationseinhüllenden und somit bedeutet eine breite Bande oftmals, dass viele Rotationsniveaus besetzt und damit nicht gekühlt worden sind. Die Linienbreite der Banden eines typischen Peptides (Trp-Gly) beträgt mit der hier vorgestellten Desorptionsquelle 2 cm^{-1} , was einer

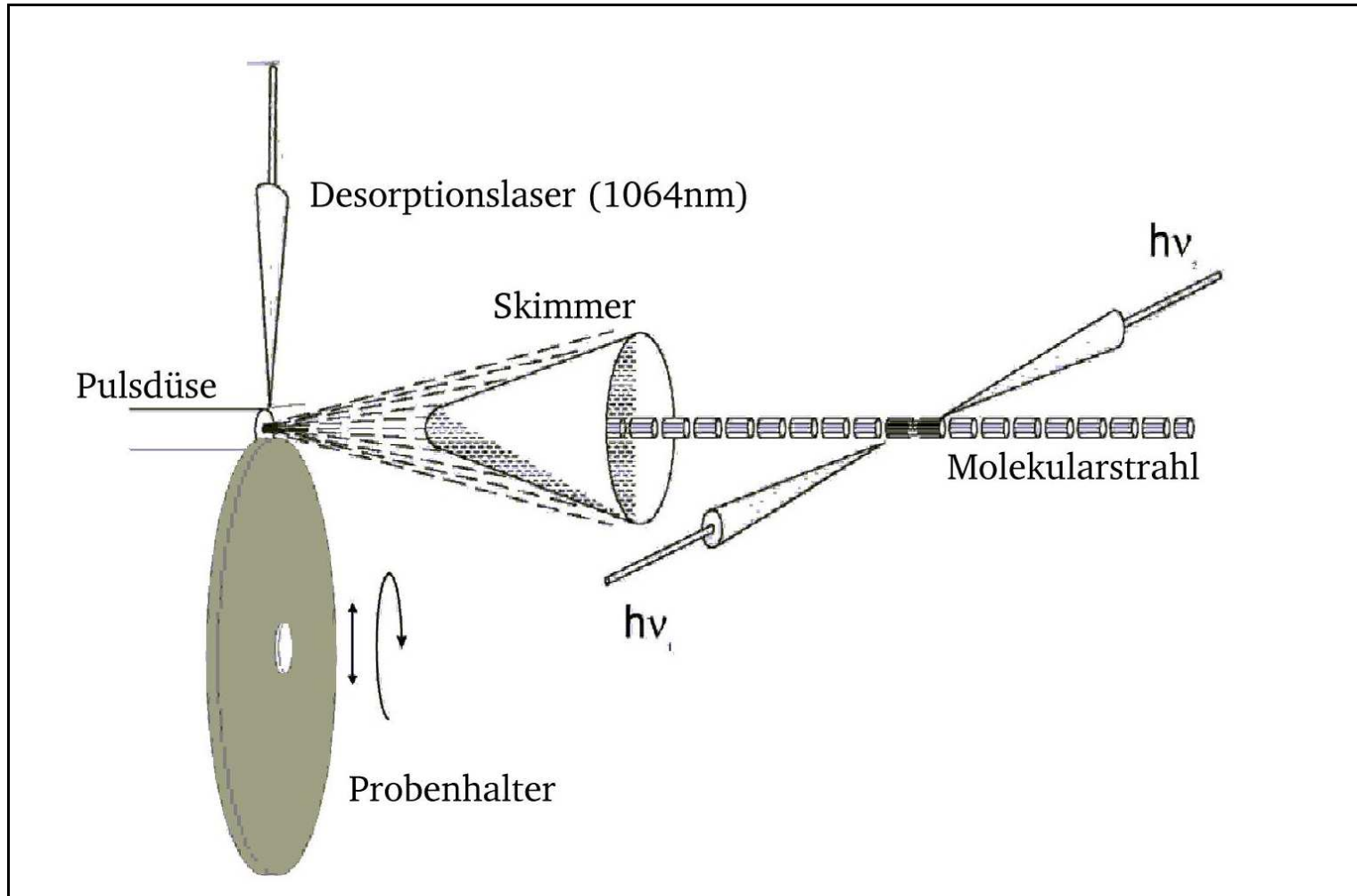


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Laserdesorptionsquelle mit der Anordnung der Pulsdüse, des Molekularstrahls und der Laserstrahlen.

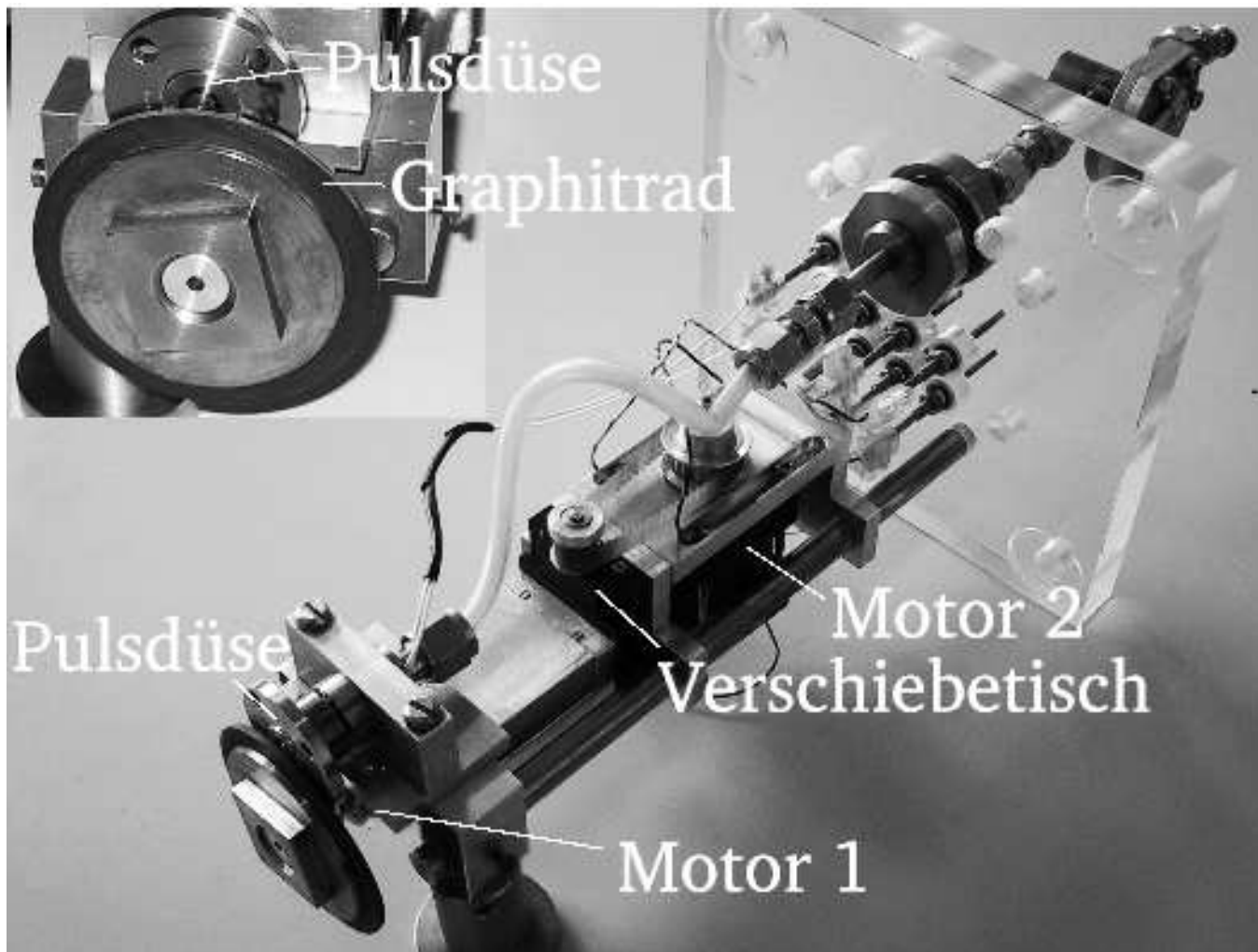


Abbildung 2.3: Fotografische Abbildung der Laserdesorptionsquelle. Motor 1 dreht den Probenhalter; Motor 2 kann den Verschiebetisch mit Motor 1 und Graphitscheibe in der Höhe verstellen.

sehr guten Kühlung entspricht.

Die Halterung der Graphitscheibe ist auf der Achse eines zweiten Motors (Motor 1 in Abbildung 2.3) befestigt und wird während des Experimentes mit einer Geschwindigkeit von einer Umdrehung/45min kontinuierlich gedreht. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass das Material gleichmäßig desorbiert wird und die Menge an Probenmolekülen im Molekularstrahl relativ konstant bleibt. Die Puls-zu-Pulsstabilität beträgt bis zu 80%. Aufgrund der starken Abhängigkeit der Molekülkonzentration von dem senkrechten Abstand zwischen dem Probenhalter und der Pulsdüsenöffnung ist es außerordentlich wichtig, dass die Graphitscheibe exakt zentrisch an der Motorachse befestigt wird und dass sie möglichst wenige Unebenheiten am Rand aufweist. Wie stark die Signalintensität von dem senkrechten Abstand zwischen Oberfläche und Pulsdüsenöffnung abhängt, kann anhand von Abbildung 2.4 nachvollzogen werden. In dem dort dargestellten Graphen ist die Signalintensität gegen den Abstand aufgetragen. Desorbiert wurde in diesem Experiment Para-aminobenzoesäure (PABA) aus einer Mischung mit Graphitpulver mit einem leicht fokussierten Yttrium-Lanthanfluorid-Laser (YLF, 1047nm, 5.5ns, 250 μ J/Puls, 10Hz, ca. 0.6mm Durchmesser) desorbiert.

Wie lange die Graphitscheibe für eine Messung ohne Erneuerung der Probensubstanz benutzt werden kann, ist stark vom untersuchten Molekül abhängig und kann bei tryptophanenthaltenden Peptiden bis zu 10 h betragen. Dabei kann mehrmals von den selben Stellen desorbiert werden, solange dies gleichmäßig geschieht. Wenn danach die gleiche Substanz verwendet werden soll, reicht, es neue Substanz aufzutragen. Wenn jedoch im Anschluß eine andere Substanz verwendet werden soll, so muss die Oberfläche der Graphitscheibe gründlich gereinigt werden. Dazu wird das Rad mit der Halterung an der Achse eines Handbohrers befestigt und bei laufendem Motor mit Schmirgelpapier (Körnung 1000) abgeschliffen. Danach kann die neue Probensubstanz ganz normal aufgetragen werden. Das Graphit ist zwar gegenüber Aceton und Ethanol stabil, jedoch reicht eine Reinigung mit Hilfe dieser Lösungsmittel nicht aus, um die vorige Probensubstanz komplett zu entfernen.

Während der Optimierung der Desorptionsquelle stellte sich heraus, dass durch den Einbau eines 3mm-Skimmers anstelle eines 1mm-Skimmers eine Verbesserung des Signals um etwa den Faktor drei erfolgt. Ferner wurde beobachtet, dass die Puls zu Puls Schwankungen von 50% auf 20% abnahmen, wenn man anstelle von Helium als Trägergas Argon verwendet.

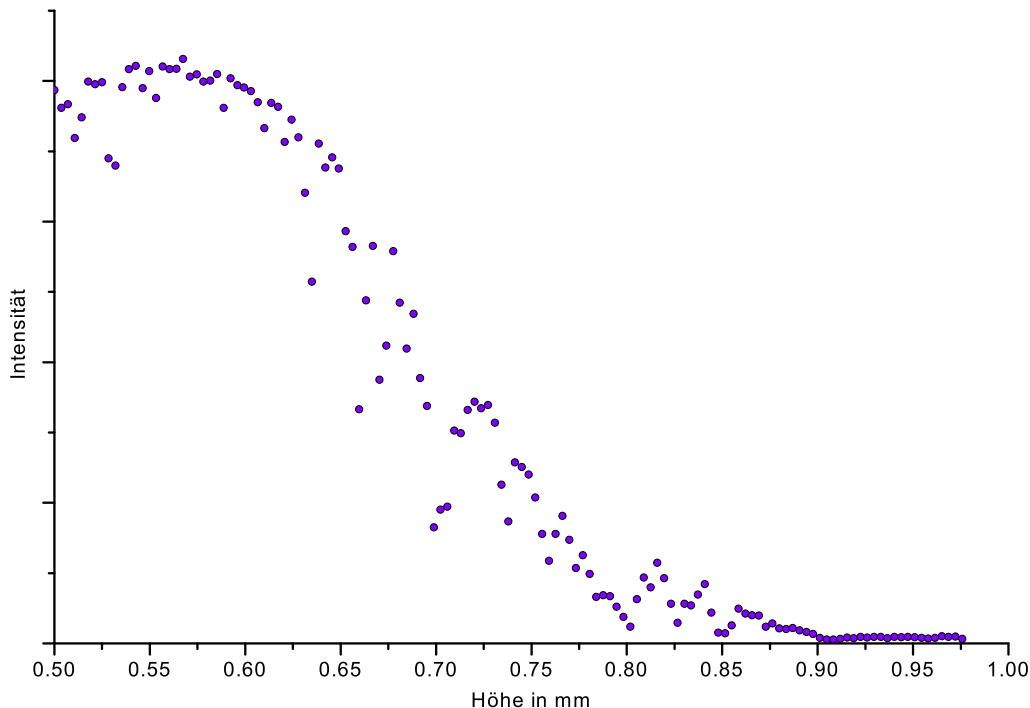


Abbildung 2.4: Signalintensität von desorbiertem PABA in Abhängigkeit von dem vertikalen Abstand zwischen Pulsdüsenöffnung und Laserdesorptionsort.

Andere Konzepte der Laserdesorption von Graphit

Ein weiteres erfolgreiches Konzept für die Laserdesorption von Graphit, das unter anderem benutzt wurde, war die Verwendung von einem Pressling aus Graphitpulver und Substanz, der mit Hilfe einer KBr-Pressen für IR-Geräte hergestellt wurde. Diese Methode wurde durch Piuzzi et al.⁴¹ eingeführt: Ein Gemisch aus fünf Teilen Substanz und einem Teil Graphitpulver wurde fein gemörsert und mit sieben Tonnen gepreßt. Wenn 0.25g Substanz und 0.05g Graphit verwendet wurden, hat der Pressling eine Größe von 6mm Durchmesser und <1mm Dicke. Der Pressling wurde dann direkt unter der Pulsdüse befestigt, und es wurde wie oben beschrieben (s. Abschnitt 2.1.2) desorbiert. Die Puls-zu-Pulsschwankungen waren in diesem Experiment vergleichbar mit denen in dem oben beschriebenen. Jedoch war es nicht möglich, den Pressling während des Experimentes zu drehen, so dass immer nur an einer Stelle desorbiert wurde und die Probe im Laufe des Experimentes ausdünnte. Dies führte

zu einer etwa exponentiellen Abnahme des Signals innerhalb der Spektren. Aufgrund der geringen Größe der Presslinge konnte eine Drehung während des Experimentes nicht ohne großen technischen Aufwand realisiert werden. Ein weiterer Nachteil bei dieser Methode war, dass für jeden Pressling etwa 250mg Probensubstanz benötigt wurden, während man bei der in Abschnitt 2.1.2 beschriebenen Methode mit einigen wenigen μg auskommt.

2.2 Spektroskopie am Überschalldüsenstrahl

2.2.1 Spektroskopische Methoden

In dieser Arbeit wurden verschiedene spektroskopische Methoden angewendet, um die Probenmoleküle, die mit Hilfe der Laserdesorption (s. Abschnitt 2.1) in die Gasphase gebracht wurden, zu untersuchen. Die einfachste der angewendeten Methoden ist die resonanzverstärkte Multiphotonenionisation (REMPI; Resonance Enhanced Multi Photon Ionisation), die im Folgenden erklärt wird. Ein REMPI-Spektrum enthält die Summe der vibronischen Spektren aller Konformere, die dieselbe Masse haben. Mit Hilfe der Doppelresonanzspektroskopie (SHB, Spectral Hole Burning) können dagegen die vibronischen und Grundzustands-Spektren unterschiedlicher Konformere separat aufgenommen werden. Diese Methode wird im zweiten der nachfolgenden Abschnitte erklärt.

Die resonanzverstärkte Multiphotonenionisation

Bei der resonanzverstärkten Multiphotonenionisation werden Atome, Moleküle oder Cluster mit einem Photon vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen elektronisch angeregten Zustand (S_n ; $n > 0$) überführt und mit einem zweiten Photon ionisiert. In Abbildung 2.5a ist zur Verdeutlichung des REMPI-Vorgangs das Termschema dieses Prozesses abgebildet. Entspricht die Energie des ersten Photons der einer Resonanz im Molekül, so besteht der Ionisationsprozess aus zwei effizienten, aufeinanderfolgenden Einzelphotonenprozessen, während er im nichtresonanten Fall einem ineffizienten Zweiphotonenprozess entspricht, bei dem daher wesentlich weniger Io-

nen entstehen. Die Ionen können dann mit einem Detektor nachgewiesen werden. Um ein REMPI-Spektrum eines Moleküls aufzunehmen, wird die Ionenintensität aufgezeichnet, während der Laser durchgestimmt wird. Beim REMPI können das Anregungsphoton und das Ionisationsphoton aus dem selben Laser kommen und somit auch die selbe Farbe haben (Einfarben-REMPI, (1+1) REMPI) oder die beiden Farben können aus unterschiedlichen Lasern kommen und unterschiedliche Farben haben (Zweifarben-REMPI oder (1+1') REMPI). Alle Moleküle, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind aromatisch und haben daher ihren ersten elektronisch angeregten Zustand (S_1) im nahen UV-Bereich. Ferner liegen die S_1 Zustände relativ genau zwischen dem S_0 und dem Ionisationspotential, so dass ohne Ausnahme das (1+1) REMPI durchgeführt werden konnte. Als Detektor wurde ein Flugzeitmassenspektrometer verwendet, daher erhält man bei der Aufnahme eines Spektrums gleichzeitig eine Masseninformation. Bei der Verwendung eines Flugzeitmassenspektrometers sollte der Ionisationslaserpuls möglichst kurz sein ($<15\text{ns}$), damit ein eindeutiger Startzeitpunkt für die Aufnahme des Flugzeitmassenspektrometers gegeben ist und die Auflösung des Massenspektrums nicht durch die Pulslänge beschränkt wird.

Doppelresonanzspektroskopie

Die Doppelresonanzspektroskopie wird häufig auch spektrales Lochbrennen (spectral hole burning; SHB) genannt. Mit ihrer Hilfe ist es möglich die Spektren von Molekülen oder Clustern mit der selben Masse aber unterschiedlichen Grundzuständen (z.B. von unterschiedlichen Konformeren) diskret aufzunehmen. Bei dieser Methode wird die Wellenlänge eines schwachen UV-Lasers fest auf eine Resonanz des Moleküls eingestellt (Analyse laser, vgl. Abbildung 2.5b) und mit ihm ein konstantes Ionensignal erzeugt. Etwa 100-200ns vor diesem Laser wird ein zweiter, starker Laser eingestrahlt, der in der Wellenlänge durchgestimmt wird (Lochbrennlaser, vgl. Abbildung 2.5b). Wenn dieser Laser resonant zu derselben Grundzustandspezies ist wie der Analyse laser, so wird durch Anregung (und Ionisation) ein Großteil des Grundzustands dieser Spezies depopuliert und das Ionensignal des Analyse lasers bricht ein. Ist der Brennlaser jedoch resonant zu einem anderen Grundzustand, so bleibt das Ionensignal des Analyse lasers völlig unbeeinflusst.

In dieser Arbeit wurden als Lochbrennlaser ein UV-Laser im Wellenlängenbereich des

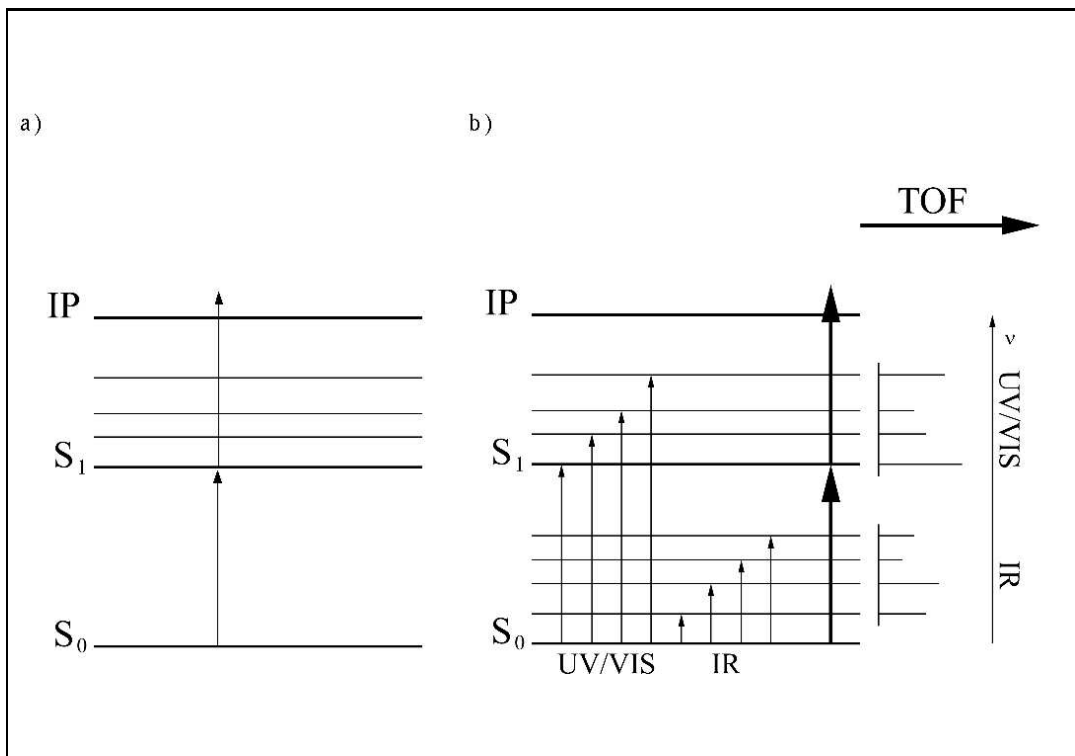


Abbildung 2.5: a) REMPI-Termschema; Die Pfeile symbolisieren Übergänge, die durch Photonen eines Lasers induziert werden. b) UV-UV- und IR-UV-SHB Term-schemata; die dicken Pfeile symbolisieren die Übergänge, die der Analyselaser induziert. Die dünneren Pfeile symbolisieren die Übergänge, die durch den Lochbrenn-laser induziert werden. Der Lochbrenn-laser kann ein UV (bzw. Vis) oder IR-Laser sein.

Analyselasers ($34300\text{-}36000\text{cm}^{-1}$), sowie ein IR-Laser ($2800\text{-}3600\text{cm}^{-1}$) verwendet. Somit konnten sowohl die vibronischen Spektren (S_1), als auch die schwingungsaufgelösten Spektren des S_0 Zustandes von unterschiedlichen Konformeren aufgenommen werden. Die resultierenden Spektren werden UV-UV- bzw. IR-UV Doppelresonanzspektren genannt.

2.2.2 Der Überschalldüsenstrahl

Überschalldüsenstrahlen werden durch die adiabatische Expansion eines Gases hohen Drucks durch ein kleines Düsenloch ins Vakuum erzeugt. Die innere Energie

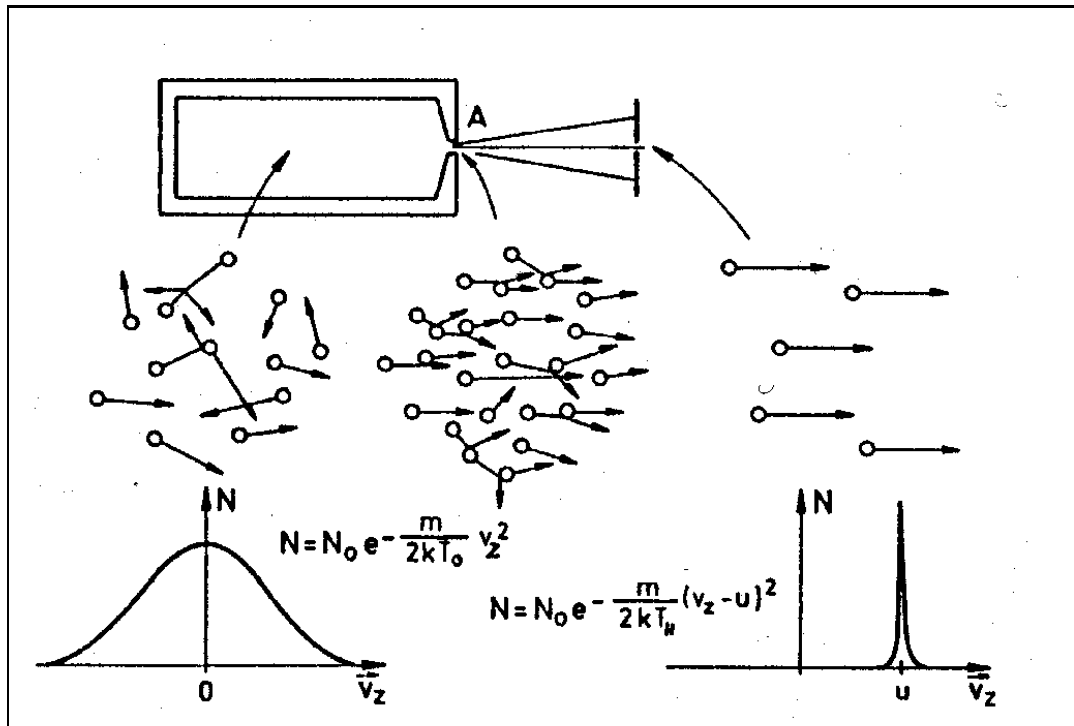


Abbildung 2.6: Modell der adiabatischen Abkühlung während der Expansion mit den jeweiligen Geschwindigkeitsverteilungen⁵⁶ im Reservoir (links) und im Strahl (rechts)

der Atome oder Moleküle wird dabei durch Stöße sowohl mit anderen Molekülen, als auch mit den Wänden des Gasreservoirs und des Düsenloches in Translationsenergie umgewandelt. Wenn die mittlere, freie Weglänge des Gases viel kleiner ist als die Größe des Düsenloches, kühlt sich das Gas bei der Expansion auf wenige Kelvin ab. Besonders effizient werden hierbei die Translationsfreiheitsgrade senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Strahls abgekühlt. Außerdem erhöht sich die Durchschnittsgeschwindigkeit der Teilchen, während sich ihre Relativgeschwindigkeit durch Stöße, bei denen schnellere Teilchen Translationsenergie auf langsamere Teilchen übertragen, verringert. Unter optimalen Bedingungen ereignen sich wenige Millimeter hinter der Expansionsregion kaum noch Stöße. Direkt hinter dem Düsenloch ist das Potential Moleküle durch Stöße abzukühlen jedoch enorm groß, was man sich bei der Laserdesorption zu Nutze macht (vgl. Seite 19).

Etwa 2-2.5cm hinter dem Düsenloch wird mit einem Skimmer der divergenteste und gleichzeitig wärmste Teil des Düsenstrahls abgeschält und nur der kalte Kern zum Kreuzungspunkt mit dem Laser weitergeleitet. Abbildung 2.6 stellt die Ent-

stehung eines Überschalldüsenstrahls schematisch dar. Außerdem sind die Maxwell-Boltzmann Verteilung im Reservoir und die Geschwindigkeitsverteilung im Strahl dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die Geschwindigkeit und deren Verteilung im Strahl deutlich höher bzw. schmaler ist, als im Reservoir.

Im allgemeinen ist zu beachten, dass der Wirkungsquerschnitt für die Übertragung von Rotations- und Schwingungsenergie in Translationsenergie viel kleiner ist als die Energieübertragung der Translationsenergie durch elastische Stöße, was dazu führt, dass sich ein thermisches Ungleichgewicht zwischen Translations-, Rotations- und Schwingungstemperatur ergibt: $T_{Trans} < T_{Rot} < T_{Schw}$. Je schwerer das verwendete Edelgas als Trägergas ist, desto effizienter ist die Abkühlung. Außerdem scheinen schwere Trägergase Moleküle, die vor der Pulsdüse desorbiert wurden, besser mitzureißen, was zu einer besseren Stabilität und Intensität des Signals führt. In dieser Arbeit wurde ausschließlich Argon als Trägergas benutzt, was einen hervorragenden Kompromiss zwischen dem Preis (die schwereren Edelgasen Neon oder Xenon sind deutlich teurer) und der Güte der Abkühlung und Signalstabilität darstellt. Obwohl durch die höhere Polarisierbarkeit der schwereren Edelgase Argon, Neon und Xenon eine Clusterbildung zu erwarten war, wurde mit Argon keine Clusterbildung beobachtet, so dass die Wahl auch in dieser Hinsicht optimal war.

Für die Laserspektroskopie bieten Molekularstrahlen wertvolle Vorteile:

1. Dadurch, dass die Moleküle nur wenige Kelvin kalt sind, sind nur wenige Rotations- und Schwingungszustände besetzt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass jede vibronische und Schwingungsanregung bis auf wenige Ausnahmen vom Schwingungsgrundzustand ausgehen.
2. Der Laser kreuzt den Molekularstrahl senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Moleküle, so dass die Dopplerverbreiterung der Absorptionsbanden minimal ist.
3. Moleküle können in einer stoßfreien Umgebung spektroskopiert werden, so dass es keine Störungen der Spektren durch Umgebungsmoleküle gibt, wie zum Beispiel in Gaszellen oder in der kondensierten Phase.
4. Durch die wenigen Stöße und geringe Temperatur im Molekularstrahl sind Assoziate von Molekülen und Atomen, die durch Wasserstoffbrückenbindungen oder Van-der-Waals Wechselwirkungen zusammengehalten werden, stabil,

während sie bei Zimmertemperatur leicht dissoziieren und nur in äußerst geringen Konzentrationen vorhanden sind. Molekularstrahlen eröffnen somit auch den spektroskopischen Zugang zu solchen Clustern.

Um die Anforderungen an die Pumpkapazität möglichst gering zu halten, wird häufig und so auch in dieser Arbeit, eine gepulste Düse zur Erzeugung des Molekularstrahles verwendet, die auf die gepulsten Laser zeitlich abgestimmt werden (s. Abschnitt 2.3.3). Sowohl die Laser, als auch die Pulsdüsen arbeiten hierbei bei 10Hz.

2.3 Apparativer Aufbau

Die REMPI- und alle Doppelresonanzspektren wurden an zwei prinzipiell baugleichen Molekularstrahlapparaturen mit einem linearen Flugzeitmassenspektrometer durchgeführt. Die Apparaturen bestehen aus drei differentiell gepumpten Vakuumkammern (s. Abbildung 2.7): der Quellkammer, der Ionisationskammer und dem Flugzeitmassenspektrometer. Im Folgenden werden die Apparaturen allgemein beschrieben. Einzelheiten über die verwendeten Geräte finden sich in Tabelle 2.3.1. Anschließend werden die verwendeten Lasersysteme und die zeitliche Steuerung beschrieben. Am Ende dieses Kapitels befindet sich eine schematische Abbildung der gesamten IR-UV Doppelresonanzapparatur (s. Abbildung 2.9 auf s. 42)

2.3.1 Die Molekularstrahlapparatur

Quellkammer

Abbildung 2.7 enthält eine schematische Darstellung der Molekularstrahlapparatur. In der Quellkammer befindet sich die Laserdesorptionsquelle mit der Pulsdüse (0.3mm Durchmesser, Repititionsrate: 10Hz, Öffnungszeit: 300-400 μs), durch die 3 atm Argon ins Vakuum expandiert werden. Die Quellkammer wird von einer Öl-Diffusionspumpe mit einer Drehschieberpumpe als Vorpumpe evakuiert. Der Druck beträgt ohne Gasballast etwa 10^{-5} mbar, während er mit laufender Pulsdüse etwa

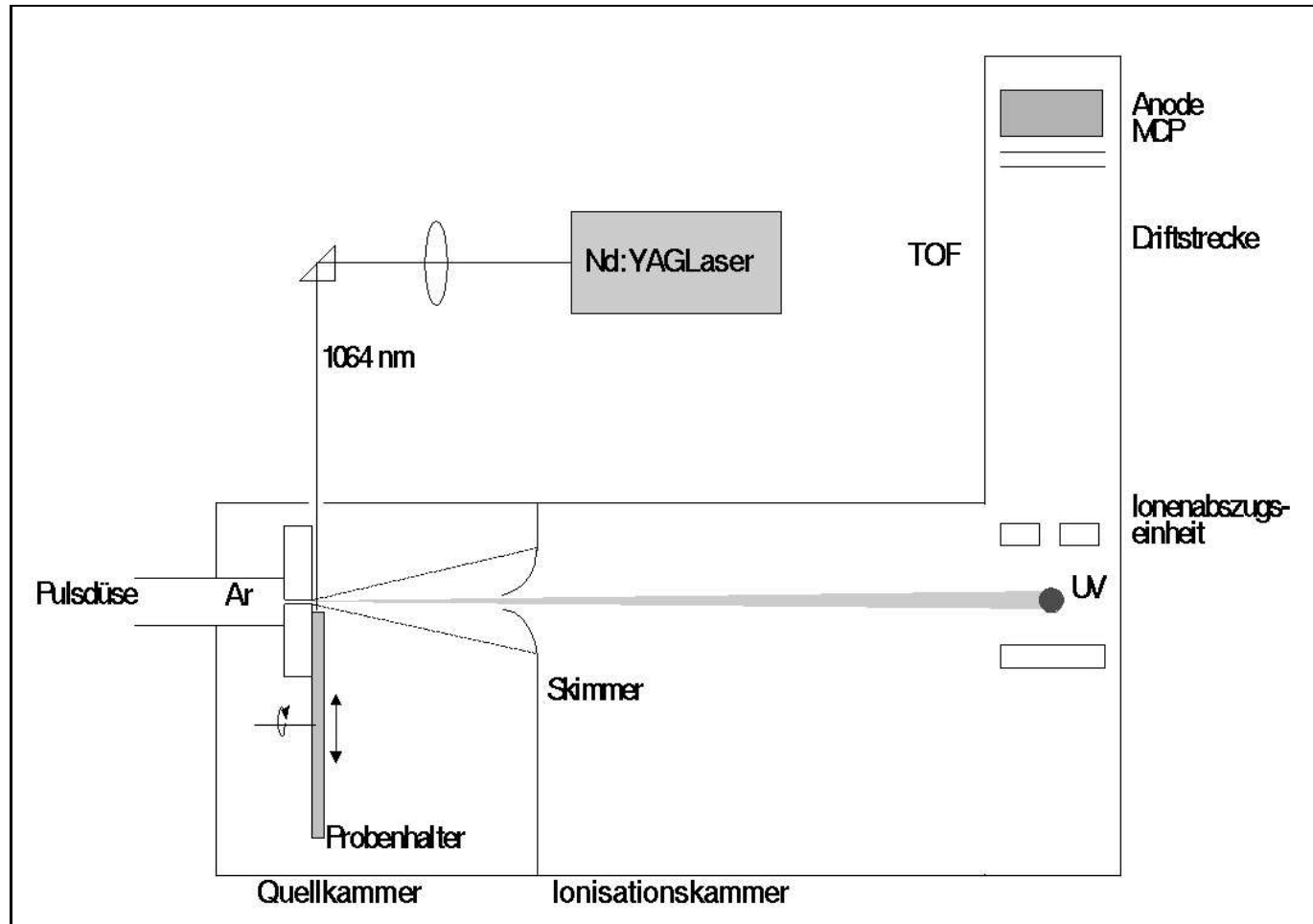


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Molekularstrahlapparatur mit den drei differentiell gepumpten Kammern: Quellkammer, Ionisationskammer und Flugzeitmassenspektrometer

$5 \cdot 10^{-4}$ mbar beträgt. In einer Entfernung von etwa 2 cm vor dem Pulsdüsenloch befindet sich ein Skimmer mit einer Öffnung von 2 bzw. 3 mm Durchmesser (apparaturabhängig). Dieser ist an der Trennwand zwischen Quell- und Ionisationskammer befestigt und ist, neben einem Bypass, der zum Belüften geöffnet werden kann, die einzige Verbindung zwischen den beiden Kammern.

Ionisationskammer

Die Ionisationskammer wird von einer Turbomolekularpumpe mit einer zweistufigen Drehschieberpumpe als Vorpumpe bis auf $3 \cdot 10^{-6}$ mbar evakuiert. Hier befindet sich die Ionenoptik, die Abzugsregion des linearen Flugzeitmassenspektrometers (TOF-MS, time of flight mass spectrometer) (Bergmann, Messgeräte Entwicklung (BME), Murnau). In der Abzugsregion wird der kollimierte Molekularstrahl mit einem oder zwei Laserstrahlen senkrecht gekreuzt, so dass die Moleküle im Molekularstrahl elektronisch angeregt und ionisiert werden. Die so erzeugten Ionen werden im rechten Winkel zum Düsen- und Laserstrahl in die Flugstrecke TOF-MS gelenkt.

Flugzeitmassenspektrometer

Das Massenspektrometer hat eine spezialisierte Wiley McLaren Anordnung:[?] Unter dem Ionisationsort liegt eine Repellerplatte auf einem Potential von +2.3 kV, die die Ionen nach oben, zwischen zwei halbzyylinderförmige Platten, beschleunigt. Diese beiden Platten liegen zunächst beide auf einem Potential von +1.7 kV. Das Potential der in Strahlrichtung ersten Platte wird nun mit einstellbarer Geschwindigkeit um 150 V abgesenkt, gleichzeitig wird das Potential der hinteren Platte um 300 V erhöht. Dadurch entsteht ein Feldgradient, der die Horizontalkomponente der Ionen-geschwindigkeit (=Molekularstrahlgeschwindigkeit) kompensiert. Hierzu müssen der Startzeitpunkt und die Steigung der Spannungsrampe exakt auf die Molekularstrahl-geschwindigkeit und somit tränergasspezifisch eingestellt werden. Die Spannungsrampe der Ionenoptik verhindert, dass Ionen, die nicht aus dem Molekularstrahl kommen und somit eine andere Geschwindigkeit besitzen als die Probenmoleküle, nicht auf den Detektor gelangen. Somit ist es möglich, jegliche Hintergrundsignale vollständig zu unterdrücken.

Über der Ionenoptik befindet sich die feldfreie Flugstrecke des Massenspektrometers, die durch eine Turbomolekularpumpe mit einer zweistufigen Drehschieberpumpe als Vorpumpe bis auf 10^{-7} mbar evakuiert wird. Die Ionen, die von der Ionenoptik hier hereingelenkt wurden und nun lediglich eine von ihrer Masse abhängige Geschwindigkeitskomponente senkrecht zum Molekularstrahl haben, werden nach dem Durchlaufen der Flugstrecke durch ein weiteres Hochspannungsfeld nachbeschleunigt (-6kV) und treffen dann auf den Detektor. Dieser besteht aus zwei hintereinandergesetzten Mikrokanalplatten (MCP, Micro channel plate) in Chevron Anordnung. Wenn Ionen auf die erste MCP treffen, werden aus der Oberfläche der Kanäle Elektronen herausgeschlagen. Diese werden in Richtung der zweiten MCP durch das Spannungsgefälle, das über den beiden Platten anliegt beschleunigt. Indem jedes der Elektronen wiederum eine Vielzahl von Elektronen aus der Oberfläche der zweiten Mikrokanalplatte herausschlägt, wird der Elektronenstrom verstärkt. Jede MCP kann das Signal potentiell um den Faktor 1000 verstärken. Danach werden die Elektronen auf die Anode beschleunigt, wo das dort entstehende Spannungssignal von einem Vorverstärker 40 fach verstärkt und dann mit einem Digitaloszilloskop dargestellt wird.

Bei der Verwendung von Argon als Trägergas, hat das Massenspektrometer eine Massenauflösung von:

$$\frac{t}{2\Delta t} = 335. \quad (2.1)$$

Tabelle 2.1: Ausstattung der beiden Apparaturen, die zur Aufnahme der hier vorgestellten Spektren verwendet wurden.

	Apparatur 1	Apparatur 2
Quellkammer		
Vorpumpe	Leybold, Trivac D40B 40m ³ /h	Leybold, Trivac D65B 65m ³ /h
Öldiffusionspumpe	Edwards, Diffstark160/700C 760 l/s	Balzers, Dif 250 1800 l/s
Baffle	in Diffpumpe integriert	BFA 250 MF
Schieberventil	VAT (Handantrieb)	-
Pulsdüse	General Valve, Iota One 300 oder 500μm	General Valve, Iota One 500μm
Skimmer	Beamdynamics, 3mm	Beamdynamics, 2mm
Ionisationskammer		
Vorpumpe	Leybold, Trivac D65B 65m ³ /h	Alcatel, 2033C1 30m ³ /h
Turbopumpe	Leybold, Turbovac 151 145 l/s	Leybold, Turbovac 151 145 l/s
Schieberventil	VAT (Handantrieb)	-
Frequenzwandler	Leybold Turbotronik NT20	Leybold Turbotronik NT20
TOF	BME	BME
Vorpumpe	Vacuubrand, RZ5 5m ³ /h	Edwards, E2M5 5.6m ³ /h
Turbopumpe	Leybold, Turbovac CSV 145 l/s	Leybold, Turbovac 151C 145 l/s
Schieberventil	VAT (pneumatischer Antrieb)	VAT (Handantrieb)
Frequenzwandler	Leybold Turbotronik NT150/360	Leybold Turbotronik NT151/361
Detektor	Topag, MCP 24-10E	Topag, MCP 24-10E

Bei der UV-UV Doppelresonanzspektroskopie werden durch den leistungsstarken Brennlaser viele Ionen erzeugt, die den Nachweis der Analyselaserionen stören können. Zum einen kann der Detektor überlastet werden, zum anderen kann das Feld der Ionenoptik durch Raumladungseffekte vieler Ionen so stark gestört werden, dass nachfolgende Ionen nicht optimal auf den Detektor abgelenkt werden und somit ein

Fortsetzung Tabelle 2.3.1:

	Apparatur 1	Apparatur 2
Laser		
Desorptionslaser	Continuum, Minilite 1	Continuum, Minilite 1
Pumplaser	Spectra Physics GCR 170-30	Spectra Physics GCR 3
Dye-Laser (UV)	LAS, LDL 205 (REMPI/Brennlaser)	LAS, LDL 205 (REMPI/Analyselaser)
Pumplaser	Spectra Physics, Indi-HG	-
Dye-Laser (UV)	Lambda Physik, FL 2003 Analyselaser	-
Pumplaser	-	Spectra Physics, Pro 230-10
Dye-Laser (IR)	-	Sirah, Pricisin Scan-D (Brennlaser)
Mischeinheit (IR)	-	Sirah, Tandem-V
Sonstiges		
Delay/ Puls-Generatoren	Stanford Research DG535	Stanford Research DG535
	Eigenbau (K. Kelbert) 25ns Einheiten	Eigenbau (K. Kelbert) 50ns Einheiten
	Eigenbau (K. Kelbert) 100ns Einheiten (20Hz)	Eigenbau (K. Kelbert) 100ns Einheiten
Hochspannungsschalter	Behlke, GHTS60	-
Digitaloszilloskop	Tektroniks TDS 520, 500MHz	Tektroniks TDS 520, 500MHz

verfälschender Einbruch des Analyselasersignals erzeugt wird. Aufgrund dessen wird die Repellerplatte für die Dauer des Brennlaserpulses durch einen Hochspannungsschalter (Behlke GHTS60) auf ein negatives Potential von -250V gesetzt. So werden die Ionen des Brennlaserpulses aus der Ionenoptik herausgelenkt und gelangen nicht auf den Detektor.

2.3.2 Die Lasersysteme

Als UV-Laser werden für die REMPI- und Doppelresonanzexperimente frequenzverdoppelte (SHG: second harmonic generation) Farbstofflaser verwendet, die mit den zweiten Harmonischen (532nm) von Nd:YAG Lasern (Neodym dotiertes Yttriumaluminiumgranat) gepumpt werden. Welche Pump- und Farbstofflaser jeweils kombiniert werden, ist Tabelle 2.3.1 zu entnehmen. Die SHG der Farbstofflaser findet in Beta-Bariumborat-Kristallen (BBO) statt. Für den Bereich zwischen $34650\text{--}36000\text{cm}^{-1}$ können die Farbstofflaser mit dem Farbstoff Rhodamin 6G in Methanol (Standardkonzentration) betrieben werden, während der Farbstoff Rhodamin B in Methanol (Standardkonzentration) sich für den roten Bereich eignet. Da Rhodamin B jedoch nur bis 34700cm^{-1} verwendbar ist, der interessanteste spektrale Bereich der meisten untersuchten Peptide jedoch zwischen 34400 und 35000cm^{-1} liegt, wird gewöhnlich eine Mischung aus Rhodamin 6G und Rhodamin B in Methanol verwendet (Standardkonzentrationen im Verhältnis 3/4 zu 1/4). Die Laserenergie im UV wird für die Aufnahme der REMPI- und Doppelresonanzspektren von den resultierenden 2-3 mJ auf etwa 0.5 mJ abgeschwächt.

Zur Erzeugung des IR-Lasers von 2800 bis 3600cm^{-1} wird ein Nd:YAG (532nm) gepumpter Farbstofflaser im Bereich von 770nm bis 820nm mit 100 mJ der Fundamentalen des geseedeten Nd:YAG Lasers in einem Magnesiumoxid-dotierten MgO:LiNbO₃-Kristall gemischt. Die resultierende Differenzfrequenz liegt dann im benötigten Wellenlängenbereich.

Für die Differenzfrequenzmischung (DFG: difference frequency generation) stehen zwei verschiedene Kristalle zur Verfügung. Kristall 1 hat im Bereich zwischen 3450 und 3500cm^{-1} eine Kristallwasserabsorption und liefert hier keine Leistung. Kristall 2 hat dagegen eine ähnliche Kristallwasserabsorption im Bereich von $3400\text{--}3450\text{cm}^{-1}$, liefert dafür aber im Bereich der Absorption von Kristall 1 genügend Leistung.

Tabelle 2.2: Energien und Wellenlängen der Laser (alle ca. 10ns lang). Es werden die Abkürzungen AL für Analyselaser und BL für Brennlaser verwendet.

Laser	Verwendung	Wellenlänge [nm]	Energie [mJ/Puls]
Nd:YAG (Indi)	Pumplaser für FL2003, AL1	532	200
Dyelaser (FL2003)	für UV, AL1	540-600	15
SHG (FL30)	UV, AL1	270-300	1-2
Nd:YAG (GCR 170)	Pumplaser für LAS, BL 1	532	300
Dyelaser (LAS)	für UV, BL 1	540-600	20-30
SHG (LAS)	UV, BL 1	270-300	2-4
Nd:YAG (GCR 3)	Pumplaser für LAS, AL 2	532	500
Dyelaser (LAS)	für UV, AL 2	270-300	20-30
SHG (LAS)	UV, AL 2	270-300	2-4
Nd:YAG (Pro 230)	Pumplaser für Sirah, BL 2	532	400
Dyelaser (Sirah)	für IR, BL 2	40-70	770-820
Mischeinheit	IR, BL 2	2800-3600	1-3
Nd:YAG (Pro 230)	IR, BL 2	1064	500

Für die Differenzfrequenzen im Bereich von 3250cm^{-1} bis 3600cm^{-1} (entspricht 770 bis 790nm) wird der Farbstofflaser mit einer Lösung von 0.15g/l Styryl 8 in Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Das DMSO hat hierbei die Aufgabe, den Wellenlängenbereich der Farbstofflösung im Verhältnis zu einer methanolischen Lösung rot zu verschieben. Für die Differenzfrequenzen im Bereich von 2800 bis 3200cm^{-1} (entspricht 793 bis 820nm) wurde eine Lösung von 0.15g/l Styryl 9 in Methanol verwendet. Der Bereich von 3200 bis 3250cm^{-1} kann von den beiden Lösungen nicht abgedeckt werden, da die Energie des Farbstofflasers hier zu niedrig ist. Die Pulsenergie der Differenzfrequenz beträgt in den übrigen Bereichen ca. 1-3 mJ. Die Pulsenergien der Pump-, Farbstoff-, UV- und des IR-Lasers sind in Tabelle 2.3.2 aufgelistet.

2.3.3 Die zeitliche Steuerung

Da das Experiment gepulst mit einer Frequenz von 10Hz betrieben wird, ist es nötig, die Pulsdüsenöffnungszeit, alle Laserpulse, das Oszilloskop, den Abzugszeitpunkt des TOF (Rampe) und den Zeitpunkt der Hochspannungsschaltung (Behlkeschalter) exakt aufeinander abzustimmen. Alle Geräte werden daher von Steuerpulsen

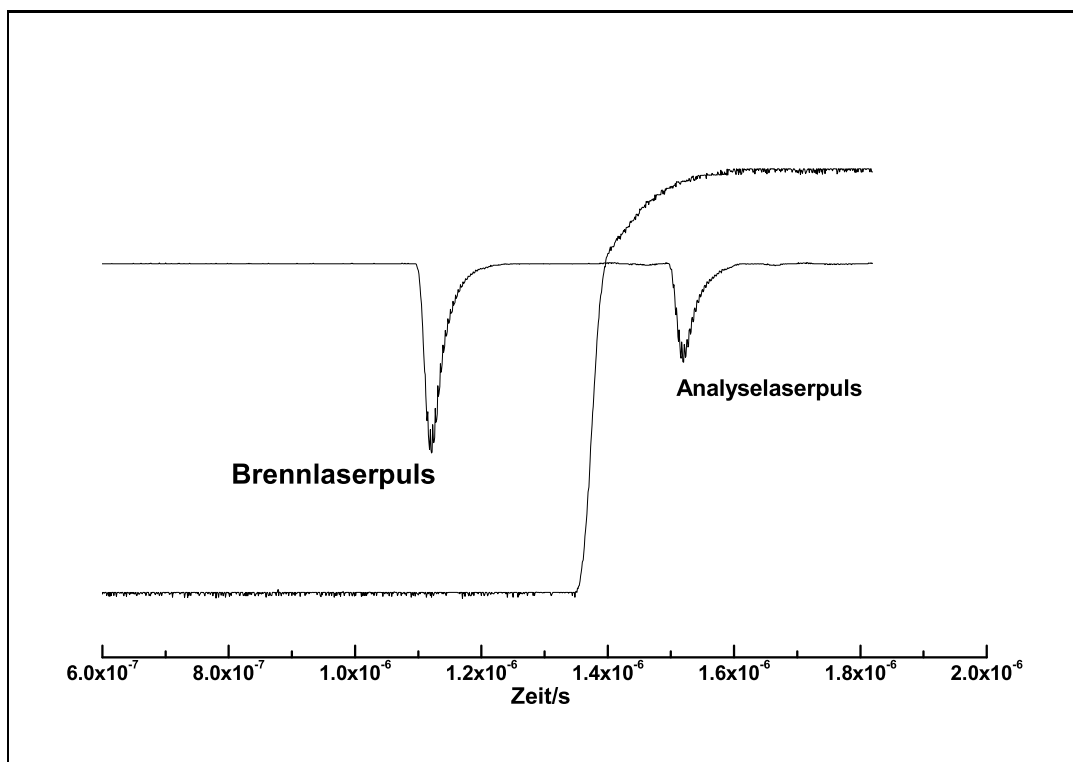


Abbildung 2.8: Zeitliche Abfolge des Brenn- und Analyselaserpulses und der Hochspannungsschaltung.

getriggert. Da die Laserpulse Längen von etwa 10ns haben, müssen die Pulsgeneratoren eine Genauigkeit auf der Nanosekunden Zeitskala haben. Dafür stehen im Institut entwickelte Uhren (Klaus Kelbert), die in Einheiten von 25ns, 50ns oder 100ns verstellt werden können, zur Verfügung. Des weiteren wurden kommerzielle Pulsgeneratoren (Stanford Research) eingesetzt, die Schrittweiten von 5ps zulassen. Die Triggerzeiten für ein UV-UV Doppelresonanzexperiment mit Trp-Gly an Apparatur 1 (vergl. Tabelle 2.3.1) können Tabelle 2.3.3 entnommen werden. Tabelle 2.3.3 enthält die Triggerzeiten eines IR-UV Doppelresonanzexperimentes mit Trp-Gly an Apparatur 2 (vergl. Tabelle 2.3.1). Die Eigenbau-Uhr x100ns an Apparatur 1 läuft auf 20Hz und hat einen Ausgang, der auch mit dieser Frequenz Triggersignale ausgibt. Das ist notwendig, da der Nd:YAG-Laser GCR 170-30, dessen Blitzlampen mit diesem Ausgang getriggert werden, auf 20Hz optimiert ist und der Laser nur dann zeitlich stabil läuft, wenn seine Blitzlampen mit 20Hz getriggert wird. Aus diesem Grund muss die Eigenbau-Uhr x100ns auch als Mastertrigger verwendet werden. Die drei übrigen Ausgänge der Uhr (und der T_0 Ausgang) geben mit 10Hz Triggersignale aus. Des weiteren werden mit dieser Uhr die Blitzlampe und der Q-Switch des

Desorptionslasers, die Pulsdüse und die Eigenbau-Uhr $\times 25\text{ns}$ ($T_0^{\text{out}} \rightarrow T_0^{\text{in}}$) getriggert. Von der Eigenbau-Uhr $\times 25\text{ns}$ werden der Q-Switch des Nd:YAG-Lasers GCR170-30, der kommerzielle Pulsgenerator, die Spannungsrampe und der Behlkeschalter getriggert. Von dem Pulsgenerator werden sowohl die Blitzlampe, als auch der Q-Switch des Nd:YAG-Lasers Indi getriggert. Alle Triggersignale sind TTL-Signale. Das Triggersignal der Spannungsrampe ist ein invertiertes TTL-Signal. Es ist zu beachten, dass die Tabellen 2.3.2 und 2.3.3 lediglich die Triggerzeiten enthalten, nicht aber die Zeiten, zu denen die Aktionen (z.B. Laserpulse, Öffnung der Pulsdüse etc.) passieren. Abbildung 2.8 enthält den zeitlichen Verlauf der mit einer Photodiode aufgezeichneten Laserpulse zusammen mit dem zeitlichen Verlauf der Hochspannungsschaltung, die mit Hilfe des Monitorausgangs des Behlkeschalters gemessen wurde. Dabei beträgt die zeitliche Differenz zwischen Brennlaser und der ansteigenden Flanke der Hochspannung 237ns.

Tabelle 2.3: Steuerpulszeiten für ein UV-UV Doppelresonanzexperiment (Trp-Gly) an Apparatur 1 ausgehend vom willkürlich gewählten Startzeitpunkt T_0 .

Gerät	Verzögerungszeit $T_{0+}[\text{ms}]$
Pulsdüse	0.377000
Desorptionslaser Blitzlampe	1.812000
Desorptionslaser Q-Switch	1.967000
Brennlaser Blitzlampen (GCR 170-30)	2.063000
Analyselaser Blitzlampen (Indi)	2.042302
Oszilloskop	2.251198
Brennlaser Q-Switch (GCR 170-30)	2.250050
Analyselaser Q-Switch (Indi)	2.252302
Spannungsrampe TOF-MS	2.252425
Hochspannungsschalter (Behlke)	2.251391

Bei Apparatur 2 wird als Mastertrigger ein kommerzieller Pulsgenerator (Stanford Research) verwendet, von dem das Oszilloskop, die Spannungsrampe und die Q-Switches von Brenn- und Analyselaser getriggert werden. Von der Eigenbau-Uhr $\times 50\text{ns}$ werden die Blitzlampe des Desorptionslasers, die Pulsdüse und die Blitzlampen der Pumplaser von Brenn- und Analyselaser getriggert. Der Q-Switch des Desorptionslasers wird von der Eigenbau-Uhr $\times 100\text{ns}$ getriggert. Alle Triggerpulse sind TTL-Pulse. Das TTL-Signal der Spannungsrampe ist invertiert.

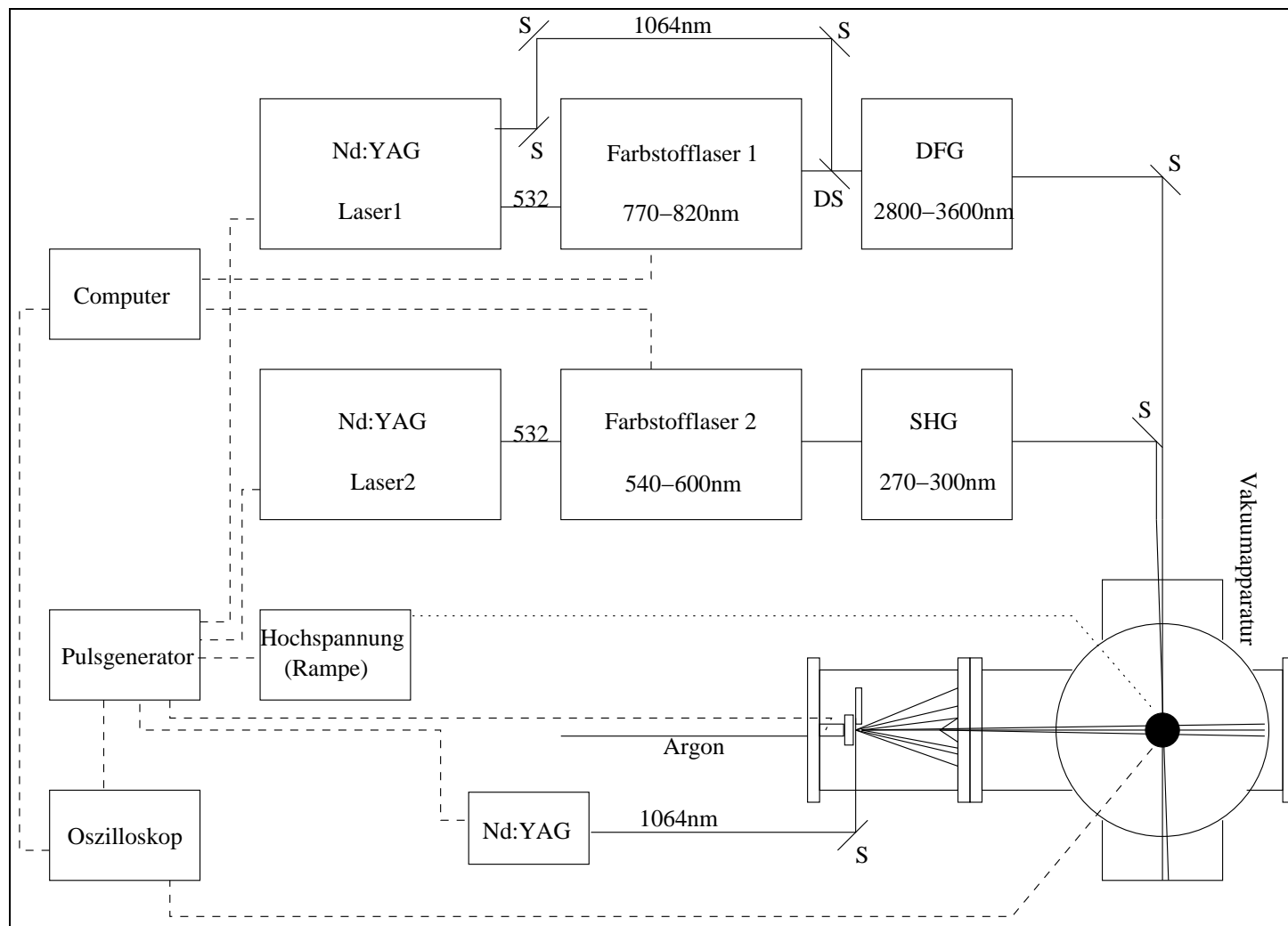


Abbildung 2.9: Zusammenfassende schematische Abbildung der IR-UV Doppelresonanzapparatur

Tabelle 2.4: Steuerpulszeiten für ein IR-UV Doppelresonanzexperiment mit Trp-Gly an Apparatur 2 ausgehend vom willkürlich gewählten Startzeitpunkt T_0 .

Gerät	Verzögerungszeit $T_0 + [ms]$
Pulsdüse	0.416700
Desorptionslaser Blitzlampe	1.752950
Desorptionslaser Q-Switch	1.976100
Brennlaser Blitzlampen (GCR 230)	2.068850
Analyselaser Blitzlampen (GCR 3)	2.010050
Oszilloskop	2.254032
Brennlaser Q-Switch (GCR 230)	2.253556
Analyselaser Q-Switch (GCR 3)	2.253895
Spannungsrampe TOF-MS	2.250913

Kapitel 3

Ab initio-Rechnungen

Die *ab initio*-Rechnungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden mit dem Programm Gaussian 98⁵⁷ ausgeführt. Hierzu standen der Parallelrechner vom Typ SGI Origin 2000 (Silicon Graphics Inc, SGI) im Rechenzentrum der Heinrich Heine Universität Düsseldorf und die des Regionalen Rechenzentrums der Universität zu Köln vom Typ SGI Origin 2000 und SUN Fire 15K (Sun Microsystems) zur Verfügung. Alle Konvergenzkriterien für die Geometrieoptimierungen entsprachen den defaultmäßig im Gaussian 98 Programm eingestellten Kriterien („tight“, s. Abschnitt 3.1.1). Die *ab initio*-Methode, die zur Berechnung der Strukturen der in dieser Arbeit untersuchten Peptide hauptsächlich verwendet wurde, ist die Dichtefunktionaltheorie (DFT), die im folgenden Teil beschrieben wird. Dazu wurde das B3LYP-Funktional und der Basissatz 6-31G(d,p) eingesetzt (s. Abschnitt 3.1). Diese Methode stellt besonders bei größeren Molekülen einen guten Kompromiß zwischen Rechenaufwand und Genauigkeit der Rechnungen dar. Einige der Strukturen von Gly-Trp wurden auf AM1 bzw. HF3-21G(d) Niveau voroptimiert. Um die Schwingungsspektren der Moleküle zu berechnen wurde eine Normalkoordinatenanalyse durchgeführt. Alle Energien wurden um die Nullpunktenergie (ZPE, zero point energy) korrigiert.

3.1 Dichtefunktionaltheorie

Die grundlegende Idee bei der DFT ist, dass die Energie eines elektronischen Systems in Abhängigkeit von der Elektronendichte ρ beschrieben werden kann. Die Elektronendichte ist wiederum eine Funktion des Raumes $\rho(r)$ und die elektronische Energie ist das Funktional $E[\rho]$. Hohenberg und Kohn⁵⁸ brachten den Beweis dafür, dass es ein einziges Funktional gibt, das die Grundzustandsenergie und alle anderen elektronischen Eigenschaften des Grundzustandes eines Moleküls beschreibt. Um es mit den Worten E.B. Wilson⁵⁹ zu sagen:

“Wenn man die genaue Elektronendichte kennen würde, würden die Spitzen der Elektronendichte an den Stellen sein, an denen die Atomkerne sind. Der Gradient der Elektronendichte würde die Ladung des Kernes verraten. Somit würde der Hamiltonoperator bekannt sein, weil er bekannt ist, sobald die Positionen und die Ladungen der Kerne gegeben sind. Also sind im Prinzip die Wellenfunktion und die Energie bekannt und so ist alles bekannt.”

Allerdings ist es nicht trivial, an ein alles beschreibendes Funktional zu kommen. Von Kohn und Sham⁶⁰ wurde gezeigt, dass die exakte Energie des elektronischen Grundzustands E von einem closed shell n -Elektronen System

$$E[\rho] = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_{i=1}^n \int \psi_i^*(r_1) \nabla_1^2 \psi_i(r_1) dr_1 - \sum_{I=1}^N \int \frac{Z_I e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{I1}} \rho(r_1) dr_1 \\ + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}} dr_1 dr_2 + E_{XC}[\rho] \quad (3.1)$$

ist, mit den Eielektronenraumorbitalen $\psi_i (i = 1, 2, \dots, n)$ (Kohn-Sham Orbitale (KS Orbitale)). Die exakte Grundzustandselektronendichte ρ an einem bestimmten Ort r ist die Summe über alle besetzten Kohn-Sham Orbitale

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^n |\psi_i(r)|^2 \quad (3.2)$$

und ist bekannt, sobald diese berechnet wurden. Der erste Term von Gleichung 3.1 repräsentiert die kinetische Energie der Elektronen; der zweite die Anziehung zwischen Kernen und Elektronen mit der Summe über alle N Kerne mit den Indizes I und der Kernladungszahl Z_I ; der dritte Term repräsentiert die Coulombwechselwirkung zwischen der Gesamtladungsverteilung (summiert über alle Orbitale) an den Stellen r_1 und r_2 ; der letzte Teil der Gleichung ist die Austausch-Korrelationsenergie

des Systems, die alle nicht-klassischen Wechselwirkungen zwischen Elektronen berücksichtigt. E_{XC} ist derjenige der vier Terme der Gleichung, von dem nicht exakt bekannt ist, wie man ihn erhält. Durch das Hohenberg-Kohn Theorem ist jedoch gegeben, dass E und damit auch E_{XC} Funktionale der Dichte sind. E_{XC} wird durch Näherungsfunktionale repräsentiert.

Wendet man das Variationsprinzip Gleichung 3.1 mit der durch Gleichung 3.2 gegebenen Elektronendichte an, so erhält man die Kohn-Sham Gleichungen für die Einelektronenorbitale:⁶¹

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_1^2 - \sum_{I=1}^N \frac{Z_I e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{I1}} + \int \frac{\rho(r_2) e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}} dr_2 + V_{XC}(r_1) \right\} \psi_i(r_1) = \varepsilon_i \psi_i(r_1) \quad (3.3)$$

mit den KS-Orbitalenergien ε_i und dem Austausch-Korrelations-Potential V_{XC} , dass die Ableitung der Austausch-Korrelations-Energie nach der Dichte ρ ist:

$$V_{XC}[\rho] = \frac{\delta E_{XC}[\rho]}{\delta \rho} \quad (3.4)$$

Die KS-Orbitale werden durch das Lösen von Gleichung 3.3 erhalten und durch Einsetzen in Gleichung 3.2 kann die Elektronendichte ρ berechnet werden. Die KS-Gleichungen (3.3) werden nach der SCF-Methode (self consistent field) gelöst. Das bedeutet, dass die Elektronendichte ρ zunächst geschätzt wird, indem für die KS-Orbitale ein Basissatz eingesetzt wird. V_{XC} wird mit Hilfe einer genäherten Form der Korrelationsaustauschenergie E_{XC} , die während der Iteration gleich bleibt, berechnet. Nun wird der erste Satz der KS-Orbitale durch Lösen der Kohn-Sham Gleichungen berechnet und die neue, außerdem nun verbesserte, Elektronendichte. Dieser Prozess wird so lange wiederholt, bis die Orbitale bis zu einem gesetzten Limit konvergiert sind. Dann wird mit Gleichung 3.1 die elektronische Energie E berechnet. Der größte Fehler in der Dichtefunktionaltheorie wird dadurch hervorgerufen, dass das E_{XC} Funktional lediglich angenäherter Natur ist. Es wurden verschiedene Wege entwickelt um an eine genäherte Form des Austausch-Korrelationsfunktionals zu kommen. Zunächst kann man es als Summe aus Austauschfunktional E_X und Korrelationsfunktional E_C schreiben:

$$E_{XC}[\rho] = E_X[\rho] + E_C[\rho] \quad (3.5)$$

Sowohl das Austauschfunktional E_X , als auch das Korrelationsfunktional E_C sind Funktionale der Elektronendichte ρ . Beide Komponenten können durch zwei verschiedene Typen von Funktionalen ausgedrückt werden, zum einen durch lokale Funktionale, die nur von der Elektronendichte ρ abhängen, oder durch gradientenkorrigierte Funktionale, die von der Elektronendichte ρ und deren Gradienten $\nabla\rho$ abhängen.

Die einfachste Form des Austauschfunctionals kommt aus der Lokaldichtenäherung (LDA, local density approximation), die ursprünglich entwickelt wurde, um ein homogenes Elektronengas mit konstanter Dichte zu beschreiben. Darin bewegen sich unendlich viele Elektronen in einem unendlich großen Raum mit gleichmäßig verteilten positiven Ladungen um die Elektroneutralität zu wahren:

$$E_X^{LDA} = -\frac{3}{2} \left(\frac{3}{4\pi} \right)^{\frac{1}{3}} \int \rho^{\frac{4}{3}} dr, \quad (3.6)$$

Becke formulierte ein gradientenkorrigiertes Austauschfunktional basierend, auf dem LDA-Austauschfunktional.⁶² Dieses wird heute häufig genutzt und ist die Grundlage des noch häufiger genutzten 3-Parameterfunctionals von Becke (B3LYP):

$$E_X^{Becke88} = E_X^{LDA} + \Delta E_X^{B88} \quad (3.7)$$

$$E_X^{Becke88} = E_{LDA}^X - \gamma \int \frac{\rho^{\frac{4}{3}} x^2}{(1 + 6\gamma \sinh^{-1} x)} dr, \quad (3.8)$$

mit $x = \rho^{-4/3} |\nabla\rho|$. γ ist ein Parameter, der so gewählt wurde, dass die Austauschenergien der Edelgasatome damit präzise angeglichen wurde. Der Wert beträgt 0,0042 Hartree und mit diesem Wert werden auch Moleküle vernünftig beschrieben. Das Becke-Funktional behebt viele der Unzulänglichkeiten des LDA-Functionals und es war im Prinzip der Grund dafür, dass die DFT schließlich als eine wertvolle *ab initio* Methode akzeptiert wurde.

Analog zu den Austauschfunctionalen gibt es bei den Korrelationsfunctionalen auch lokale und gradientenkorrigierte Funktionale. Das wohl bekannteste gradientenkor-

rigierte Funktional ist das von Lee, Yang und Parr formulierte Funktional:⁶³

$$E_C = -a \int \frac{\rho}{1+d\rho^{-\frac{1}{3}}} dr - ab \int \omega \rho^2 \left[C_F \rho^{\frac{8}{3}} + |\nabla \rho^2| \left(\frac{5}{12} - \delta \frac{7}{72} \right) - \frac{11}{24} \rho^2 |\nabla \rho|^2 \right] dr \quad (3.9)$$

mit

$$\omega = \frac{e^{-c\rho^{-1/3}}}{1+d\rho^{-1/3}} \rho^{-1/3} \quad (3.10)$$

$$\delta = c\rho^{-1/3} + \frac{d\rho^{-1/3}}{1+d\rho^{-1/3}} \quad (3.11)$$

und den Konstanten a, b, c und d, die von der Anpassung des Funktionals an die Heliumatomenergie stammen.⁶⁴

Wenn das Lee-Yang-Parr Korrelationsfunktional mit dem Becke Austauschfunktional zusammen in Gleichung 3.5 eingesetzt werden, so wird dieses das B-LYP-Funktional genannt. Dieses Funktional ist unter anderem in das Gaussian98 Programmpaket integriert.

Das B3LYP-Hybridfunktional

Hybridfunktionale sind Funktionale, in denen die nicht lokale Hartree-Fock Austauschenergie E_X^{HF} mit DFT-Austausch- bzw. Korrelationstermen empirisch gemischt wird.

$$E_{XC}^{hybrid} = c_{HF} E_X^{HF} + c_{DFT} E_{XC}^{DFT} \quad (3.12)$$

wobei die c 's optimierte Parameter sind. In dieser Arbeit wurde für alle dargestellten DFT-Rechnungen das 3-Parameterfunktional (B3LYP) nach Becke verwendet. In diesem Funktional wird die Hartree-Fock-Austauschenergie E_X^{HF} mit dem Korrelationsfunktional E_C^{LYP} und Beckes Korrekturterm für das LDA-Funktional ΔE_X^{B88} sowie einem weiteren lokalen Korrelationsfunktional von Vosko, Wilk und Nusair⁶⁵ E_C^{VWN} gemischt:

$$E_{XC}^{B3LYP} = E_X^{LDA} + c_0 (E_X^{HF} - E_X^{LDA}) + c_X \Delta E_X^{B88} + E_C^{VWN} + c_C (E_C^{LYP} - E_C^{VWN}) \quad (3.13)$$

Der Parameter c_0 erlaubt es, jede Mischung von Hartree-Fock Austauschenergie und lokalen LDA-Austauschfunktionalen zu benutzen. Zusätzlich ist die Gradientenkorrektur von Becke, skaliert mit dem Parameter c_X , zu dem lokalen LDA-Austauschfunktional enthalten. Analog wird der Korrelationsterm aufgebaut. Zunächst wird das lokale VWN-Korrelationsfunktional benutzt, das mit der LYP-Korrelationskorrektur berichtigt wird.

3.1.1 Geometrieoptimierung

Die bisher vorgestellten Berechnungen der elektronischen Gesamtenergie E eines Moleküls wird für eine feste Geometrie durchgeführt. Um zuverlässige Schwingungsanalysen durchführen zu können, muß die Struktur mit einer Energie, die ein lokales Minimum darstellt, ermittelt werden. Dies bedeutet, dass eine Geometrieoptimierung durchgeführt werden muss, nach der der Energiegradient entlang aller inneren Kernkoordinaten (fast) gleich Null wird. Die Geometrieoptimierung erfolgt mit Hilfe von Gradientenverfahren („Bergy“ Optimierung⁶⁶), bei denen die Hesse-Matrix ermittelt werden muß, welche die zweiten Ableitungen der Energie nach den Ortskoordinaten, also die Kraftkonstanten, enthält. Da eine vollständige Bestimmung der Kraftkonstanten durch zweifache analytische Ableitung der SCF-Energien sehr zeitaufwendig ist, werden die Elemente der Hesse-Matrix zunächst aus den Ergebnissen von Kraftfeldrechnungen abgeschätzt. Die Optimierung der Geometrie wird beendet, wenn die Konvergenzbedingungen erfüllt sind. In Bezug auf den Gradienten der Energie bedeutet dies, dass der Mittelwert aller Gradienten kleiner als $1,5 \cdot 10^{-5}$ Hartree/Bohr und der maximale Energiegradient kleiner als $1 \cdot 10^{-8}$ Hartree/Bohr ist. Basierend auf der optimierten Geometrie kann eine Normalkoordinatenanalyse durchgeführt werden (s. 3.1.2).

3.1.2 Normalkoordinatenanalyse

Um die Schwingungsspektren N-atomiger Moleküle interpretieren zu können, werden Normalkoordinatenanalysen⁶⁷ durchgeführt. Bei diesen Analysen wird eine klassisch mechanische Behandlung eines Systems aus Massenpunkten durchgeführt, bei

denen eine Separation der Schwingungsbewegung von der Translation und der Rotation durchgeführt wird, so dass Zentrifugaldehnung und Coriolis-Kopplung nicht berücksichtigt werden. Weiterhin wird eine harmonische Näherung der potentiellen Energie angesetzt, d. h. für Schwingungen mit stark anharmonischem Potentialen werden keine zuverlässigen Schwingungsfrequenzen berechnet.

Betrachtet man ein System aus N -Teilchen, das durch $3N$ kartesische Koordinaten x_i beschrieben werden kann, dann wird die potentielle Energie entlang jeder Koordinate x_i in einer Taylor-Reihe um die Gleichgewichtslage entwickelt. Es gilt:⁶⁸⁻⁷⁰

$$V(x_i) = V_0 + \sum_i \left(\frac{dV}{dx_i} \right)_0 x_i + \frac{1}{2!} \sum_{i,j} \left(\frac{d^2V}{dx_i dx_j} \right)_0 x_i x_j + \frac{1}{3!} \sum_{i,j,k} \left(\frac{d^3V}{dx_i dx_j dx_k} \right) x_i x_j x_k + \dots \quad (3.14)$$

Der erste Term in Gleichung 3.13 ist konstant und wird (im S_0 -Zustand) gleich Null gesetzt. Der zweite Term ist ebenfalls Null, da die Reihe um ein Minimum entwickelt wurde. Der dritte Term ist der harmonische Beitrag und alle höheren Terme werden vernachlässigt, da keine anharmonischen Effekte berücksichtigt werden. Für die potentielle Energie folgt somit:

$$V(x_i) = \frac{1}{2} \sum_{i,j} \left(\frac{d^2V}{dx_i dx_j} \right)_0 x_i x_j = \frac{1}{2} \sum_{i,j} k_{i,j} x_i x_j \quad (3.15)$$

mit den Kraftkonstanten:

$$k_{i,j} = \left(\frac{d^2V}{dx_i dx_j} \right)_0 \quad (3.16)$$

Die Kenntnis von $3N$ kartesischen Kraftkonstanten $k_{i,j}$ führt dazu, dass die Bewegung eines N -atomigen Moleküls, mit Hilfe des zweiten Newtonschen Gesetzes durch ein einfaches System gekoppelter linearer Differentialgleichungen dargestellt werden kann:

$$m_i (x_i)'' + \sum_{j=1}^{3N} k_{ij} x_j = 0 \text{ mit } i = 1 \dots 3n \quad (3.17)$$

Mit dem Ansatz $x_i = A_i \sin(\omega_i t) \Rightarrow (x_i)'' = -\omega_i^2 x_i$ folgt:

$$\sum_{j=1}^{3N} (k_{ij} - \delta_{ij} m_i \omega_i^2) x_j = 0 \quad (3.18)$$

Führt man nun massengewichtete kartesische Koordinaten $q_i = x_i \sqrt{m_i}$ ein, dann wird das verallgemeinerte Eigenwertproblem $(F - \omega M) x = 0$ in das spezielle Eigenwertproblem $(F^* - \omega) q = 0$ überführt, wobei für die Kraftkonstanten gilt: $k_{i,j}^* = \frac{k_{i,j}}{\sqrt{m_i m_j}}$

Durch Diagonalisierung der F^* -Matrix werden die Quadrate der Kreisfrequenzen ω_i^2 und somit über $\nu_i = \frac{\sqrt{\omega_i^2}}{2\pi}$ direkt die Normalschwingungsfrequenzen ν_i erhalten. Da $3N$ Koordinaten für die Schwingungsanalyse verwendet wurden, aber nur $3N-6$ Schwingungen (für nicht lineare Moleküle) auftreten können, werden sechs Eigenwerte erhalten, die gleich Null sind und den Translations- und Rotationsbewegungen zuzuordnen sind.

Kapitel 4

Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der IR-UV- und UV-UV Doppelresonanzuntersuchungen an Trp enthaltenden Di- und Tripeptide vorgestellt. Diese und ähnliche Methoden sind in den letzten Jahren angewendet worden, um die verschiedenen Konformere von den isolierten Aminosäuren Trp,⁷¹⁻⁷⁴ Phe,^{75,76} Tyr⁷⁵ und deren Wassercluster,⁷⁷ geschützte Aminosäuren⁷⁸⁻⁸¹ und geschützten Peptiden⁸² zu untersuchen.

Die ersten UV-spektroskopischen Arbeiten mit Molekularstrahlen an Trp,^{71,72} Trp enthaltenden Di- und Tripeptiden^{26,28} sowie Trp-Derivaten⁸³⁻⁸⁵ wurden von der Arbeitsgruppe Levy bereits in den späten 80ziger Jahren durchgeführt. Sie enthalten Untersuchungen mit REMPI-, laserinduzierter Fluoreszenz- (LIF) sowie dispergierter Fluoreszenzspektroskopie (DF). Mit Hilfe der Sättigungstechnik und DF-Spektroskopie wurden zwei verschiedene Konformere von Gly-Trp im Molekularstrahl gefunden. Die Spektren von Trp-Gly und Trp-Gly-Gly zeigten jeweils im niederenergetischen Teil des Spektrums ein Konformer mit gut aufgelösten schmalen Banden und im höherenergetischen Teil des Spektrums breite Absorptionen, die nicht aufgelöst werden konnten. Letztere wurden übereinanderliegenden Ursprüngen weiterer Konformere zugeschrieben. Im allgemeinen wurde gefunden, dass die Spektren von tryptophanenthaltende Peptide mit einem N-terminalen Trp (z.B. Trp-Gly, Trp-Gly-Gly, Trp-Phe) um etwa 300 cm^{-1} rot zum Trp-Spektrum verschoben sind. Peptide mit Trp als C-terminale Aminosäure (z.B. Gly-Trp, Gly-Gly-Trp, Phe-Trp) sind hingegen nur um knapp 100 cm^{-1} rotverschoben.

Erst kürzlich veröffentlichte die Arbeitsgruppe Simons UV-UV- und IR-UV Doppelresonanzarbeiten an Trp⁷³ und dessen Wasserclustern⁷⁷ (Trp-W). Hierin wurde der Befund von Levy und Mitarbeitern,⁷¹ dass es 6 Konformere von Trp im Molekularstrahl gibt, bestätigt. Von Trp-W_n (n=1,2) wurden jeweils nur 2 verschiedene Konformere gefunden.

Zwier und Mitarbeiter veröffentlichten vor Kurzem Arbeiten an N-Acetyltryptophanamid (NATA) und N-Acetyltryptophanmethyramid (NATMA),^{80,81} worin zwei Grundzustandskonformere von NATA und drei von NATMA im Molekularstrahl gefunden wurden. Eines der Konformere von NATA und zwei von NATMA haben eine gestreckte Peptidrückgratstruktur, während das zweite Konformer von NATA und das dritte von NATMA jeweils durch eine NH...O=C Wasserstoffbrücke stabilisiert werden. Bislang sind noch keine Infrarotspektren von ungeschützten Dipeptiden in der Gasphase bzw. Doppelresonanzspektren veröffentlicht worden. Zunächst werden nun die UV-UV- und IR-UV Doppelresonanzuntersuchungen an Trp-Gly und Gly-Trp, gefolgt von denen an Trp-Gly-Gly, vorgestellt. Anschließend werden die UV-UV Doppelresonanzuntersuchungen an anderen Dipeptiden (Pro-Trp, Trp-Ser) und Trp-OEt und zuletzt das REMPI-Spektrum von Gly-Trp-Gly diskutiert.

4.1 Trp-Gly und Gly-Trp

4.1.1 UV-UV Doppelresonanzspektroskopie an Trp-Gly

Die REMPI- und UV-UV Doppelresonanzspektren von Trp-Gly sind in Abbildung 4.1 zu sehen. Die Spektren zeigen, dass es mindestens zwei verschiedene Konformere im Molekularstrahl gibt, die im untersuchten Frequenzbereich von 34450 bis 35100cm⁻¹ absorbieren. Für die Aufnahme des Doppelresonanzspektrums von Konformer *a* wurde der Analyselaser auf die Absorptionsbande bei 34522cm⁻¹, die im REMPI-Spektrum (erste Spur in Abbildung 4.1) mit *a* markiert ist, abgestimmt. Bei der Aufnahme des Doppelresonanzspektrums von Konformer *b* wurde der Analyselaser auf die Bande bei 34750cm⁻¹ die mit *b* markiert ist, abgestimmt. Die beiden Absorptionslinien im REMPI-Spektrum, die mit *c* und *d* markiert sind bei 34856 bzw. 34940cm⁻¹, konnten mit UV-UV Doppelresonanzspektroskopie zwei wei-

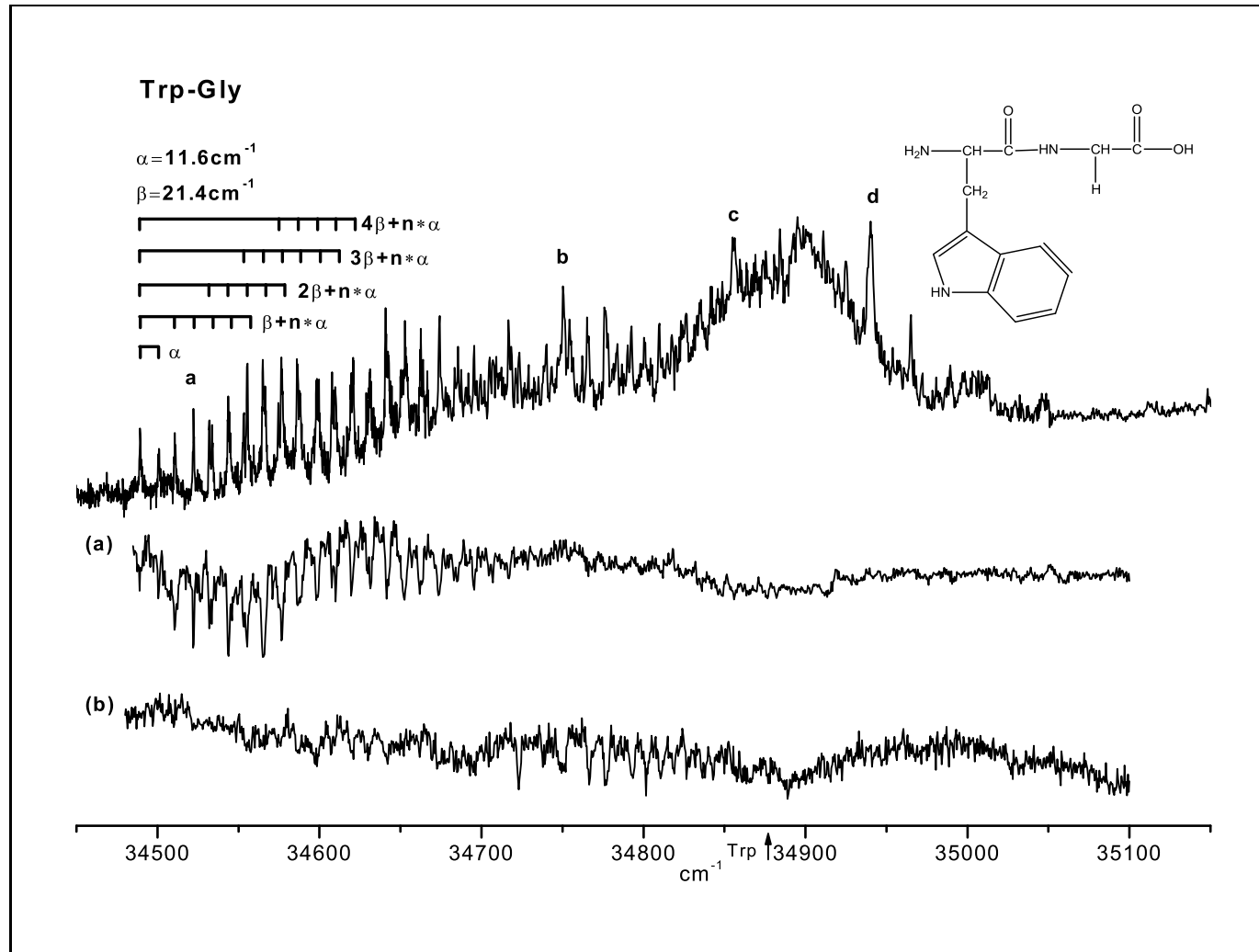


Abbildung 4.1: REMPI-Spektrum von Trp-Gly (erste Spur), was auf der Muttermasse von 261 Dalton aufgenommen wurde. Die Spuren (a) und (b) sind die UV-UV Doppelresonanzspektren, bei denen der Analyselaser auf die Banden abgestimmt wurde, die im REMPI-Spektrum mit a bzw. b bei 34613 bzw. 34761 cm^{-1} markiert sind. c und d sind Banden, die zu zwei weiteren Konformeren gehören. Aufgrund zu geringer Intensität sind deren Lochbrennspektren hier nicht dargestellt.

teren Konformeren zugeordnet werden. Ihre Lochbrennspektren werden hier nicht

Tabelle 4.1: Frequenzen der harmonischen Schwingungsprogressionen im UV-UV Doppelresonanzspektrum von Konformer *a* von Trp-Gly

Absorptions- bande (cm^{-1})	relative Frequenz (cm^{-1})	Abstände (cm^{-1})	Zuordnung
34489.3	0.0		0
34500.9	11.6		α
34510.7	21.4		β
34522.3	33.0	11.6	$\beta+\alpha$
34533.8	44.5	11.5	$\beta+2\alpha$
34545.3	56.0	11.5	$\beta+3\alpha$
34532.1	2·21.4		$2\cdot\beta$
34543.7	54.4	11.6	$2\cdot\beta+\alpha$
34555.4	66.1	11.7	$2\cdot\beta+2\alpha$
34566.9	77.6	11.5	$2\cdot\beta+3\alpha$
34578.4	89.1	11.5	$2\cdot\beta+4\alpha$
34553.4	3·21.4		$3\cdot\beta$
34565.2	75.9	11.8	$3\cdot\beta+\alpha$
34576.7	87.4	11.5	$3\cdot\beta+2\alpha$
34588.1	98.8	11.4	$3\cdot\beta+3\alpha$
34599.8	110.5	11.7	$3\cdot\beta+4\alpha$
34611.6	122.3	11.8	$3\cdot\beta+5\alpha$
34574.6	4·21.4		$4\cdot\beta$
34586.4	97.1	11.8	$4\cdot\beta+\alpha$
34598.2	108.9	11.8	$4\cdot\beta+2\alpha$
34609.8	120.5	11.6	$4\cdot\beta+3\alpha$
34621.5	132.2	11.7	$4\cdot\beta+4\alpha$
34607.6	118.3		γ
34619.2	129.9	11.6	$\gamma+\alpha$
34631.1	141.8	11.9	$\gamma+2\alpha$

gezeigt, da diese nur schwache Intensitäten aufweisen. Das REMPI-Spektrum wurde bis 35900cm^{-1} aufgenommen und auch in diesem Bereich wurden noch breite Absorptionen gefunden, die von weiteren Konformeren stammen können. Es war jedoch nicht möglich, Spektren mit scharfen Banden aufzunehmen, wenn der Analyselaser auf Bereiche mit breiten Absorptionen abgestimmt wurde. Die erste Absorptionsbande bei 34490cm^{-1} des Konformers, das im roten Bereich des Spektrums absorbiert (*a* in Abbildung 4.1), ist um 233.9cm^{-1} rot zu der ersten Absorptionsbande des zweiten Konformers (*b* in Abbildung 4.1) verschoben. Das Spektrum von Konformer

a ist deutlich intensiver als das Spektrum von Konformer *b*. Die auffallende Harmonizität des Spektrums von Konformer *a* wurde von der Arbeitsgruppe Levy²⁶ als eine lange, harmonische Schwingungsprogression mit 18 zugehörigen Banden angesehen. Es war nicht klar, ob die erste Bande im Spektrum dem Ursprung zugeordnet werden muss, oder ob sie ein höheres Mitglied der Schwingungsprogression ist und der Ursprung, aufgrund mangelnder Franck-Condon Überlaps der Grundzustand-potentialfläche und der Potentialfläche des elektronisch angeregten Zustands nicht zu sehen ist. Beim näheren Hinsehen fällt jedoch auf, dass einige der Banden der angeblichen Schwingungsprogression in zwei oder mehr Banden gespalten sind. Außerdem ist der Abstand zwischen den ersten beiden Banden nicht derselbe, wie der zwischen der zweiten und der dritten Bande (11.6 bzw. 9.8cm⁻¹). Schließlich ist die erste Bande ein wenig intensiver als die zweite. Aus diesen Gründen ordnen wir die erste Bande dem elektronischen Ursprung des Moleküls zu und die zweite Bande bei 11.6cm⁻¹ einer einzelnen Schwingungsbande. Es bauen sich jedoch harmonische Schwingungsprogressionen mit Abständen von 11.6cm⁻¹ auf einer weiteren Schwingungsbande bei 21.4 und deren Obertönen, n·21.4 (mit n=2,3,4; $\hat{=}$ 42.8, 64.1 und 85.3cm⁻¹) sowie auf der Schwingungsbande bei 118.3cm⁻¹, auf. Die Frequenzen der harmonischen Progressionen sind in Tabelle 4.1.1 zu sehen. Die Intensitätsverteilung unter den Mitgliedern jeder Progression entspricht einem typischen Franck-Condon Muster.

4.1.2 UV-UV Doppelresonanzspektroskopie an Gly-Trp

In Abbildung 4.2 sind das REMPI-Spektrum (erste Spur) und die UV-UV Doppelresonanzspektren von Gly-Trp abgebildet. Die Lochbrennspektren zeigen, dass zwei verschiedene Konformere von Gly-Trp im Molekularstrahl sind, die im untersuchten Spektralbereich von 34650cm^{-1} bis 35800cm^{-1} absorbieren. Beide Spektren haben ähnliche Intensität. Die erste Absorptionsbande des ersten Konformers (*a*) ist um 190cm^{-1} rot zu der ersten Bande des zweiten Konformers (*b*) verschoben. Wie die vibronischen Spektren der meisten Peptide^{26,43,44} weisen auch die Spektren von beiden Konformeren von Gly-Trp harmonische Schwingungsprogressionen auf. In den Spektren von Konformer *a* und *b* sind Progression mit Abständen von 38cm^{-1} bzw. 24cm^{-1} zu sehen. Die Beobachtung von zwei verschiedenen Konformeren von Gly-Trp stimmt mit der von Levy und Mitarbeitern überein, die sie mit Hilfe der Sättigungstechnik gemacht haben.²⁶

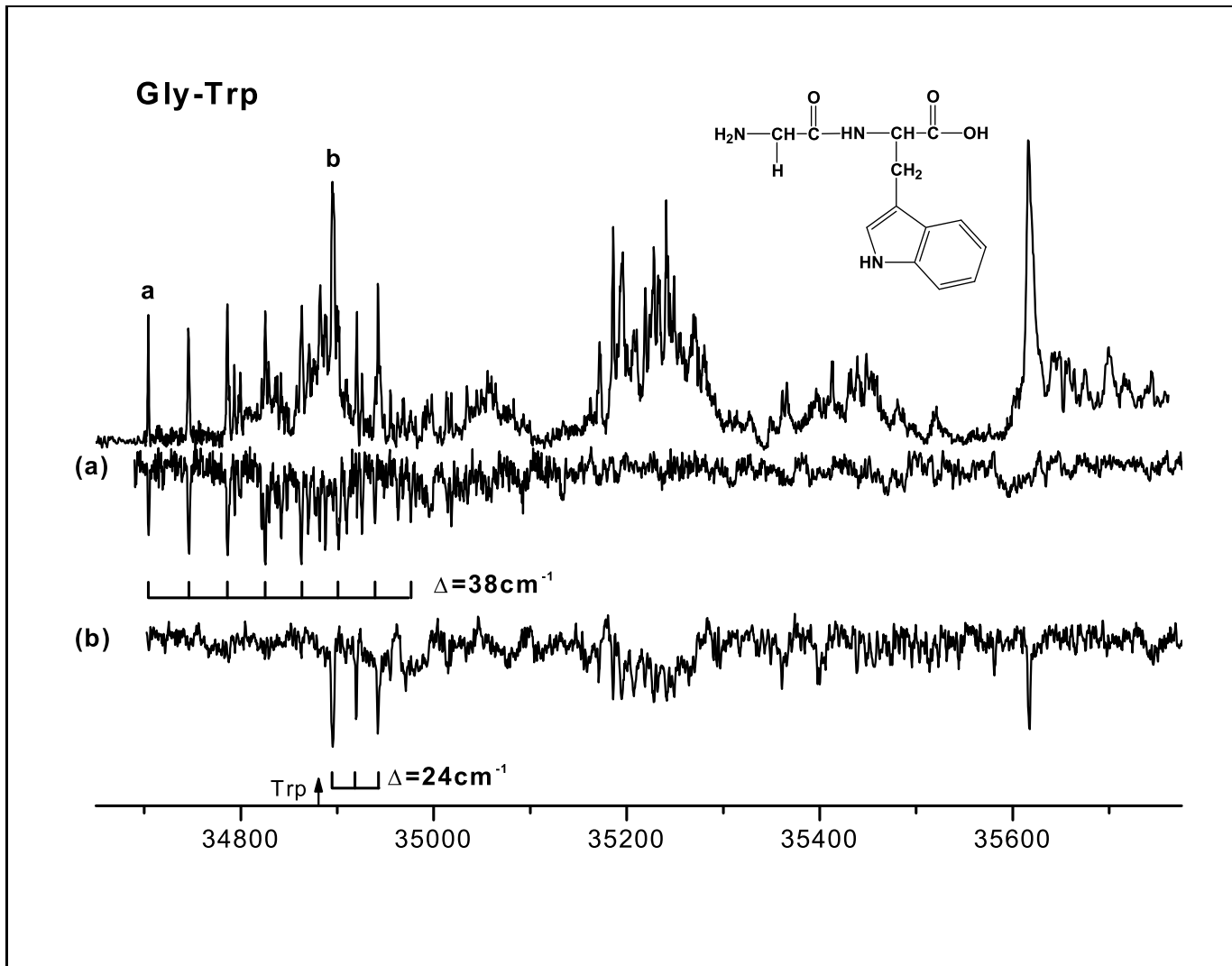


Abbildung 4.2: REMPI-Spektrum (erste Spur) von Gly-Trp, was auf der Muttermasse von 261 Dalton aufgenommen wurde. Die Spuren (a) und (b) sind die UV-UV Doppelresonanzspektren, bei denen der Analyselaser auf die Banden abgestimmt wurde, die im REMPI-Spektrum mit *a* bzw. *b* bei 34715.4 bzw. 34900.5 cm^{-1} markiert sind.

4.1.3 IR-UV Doppelresonanzspektroskopie an Trp-Gly und Gly-Trp

Vorab: Eingrenzung der möglichen Strukturen

Selbst für so kleine und simple Peptide, wie Trp-Gly und Gly-Trp gibt es aufgrund der vielen frei drehbaren Bindungen eine große Zahl von Konformeren.

Die Peptidbindung (O=C-NH) hat jedoch Doppelbindungscharakter und ist planar. In Peptiden, wie sie in der Natur vorkommen, ist der Diederwinkel der Peptidbindung 180° , d.h. dass die NH-Bindung und die C=O-Bindung in entgegengesetzte Richtungen zeigen. Gerhards et al.⁷⁸ konnten mit Hilfe von *ab initio* Rechnungen zeigen, dass Konformere, in denen der Diederwinkel der Peptidbindung bei 0° liegt, eine um etwa 2000cm^{-1} höhere Energie haben als Konformere, bei denen der Diederwinkel 180° ist. Daher wird bei der Interpretation der Grundzustandsspektren der Peptide im folgenden Teil dieser Arbeit angenommen, dass alle Peptidbindungen einen Diederwinkel von 180° haben.

Einige theoretisch denkbare Konformationen der Peptide können mit Hilfe von chemischer Intuition ausgeschlossen werden. Zum Beispiel ist es sehr unwahrscheinlich, dass in einem Konformer zwei Atome mit partiellen negativen Ladungen, wie zum Beispiel zwei Sauerstoffatome in C=O Bindungen, nahe beieinander sind.

Auf der anderen Seite ist zu erwarten, dass Konformere mit Wasserstoffbrücken sehr stabil sind.

Wenn man diese drei Punkte im Hinterkopf behält, gibt es etwa 10 prinzipielle Anordnungen des Rückgrates für Trp-Gly und Gly-Trp, die in Abbildung 4.3 dargestellt sind. Jede dieser Strukturen, außer den Strukturen 5 und 10 in Abbildung 4.3 kann mit vielen unterschiedlichen Konfigurationen der Tryptophanseitenkette kombiniert werden. Das Rückgrat von Trp-Gly und Gly-Trp ist zu kurz, um Wasserstoffbrückenbindungen mit der NH-Gruppe des Indolrings auszubilden, und so können nur relativ schwache Wechselwirkungen mit dem aromatischen Ringsystem ausgebildet werden, wie in den Strukturen 5 und 10 in Abbildung 4.3 dargestellt.

Für die Strukturen 6 und 7 in Abbildung 4.3 von Gly-Trp wurde je ein Satz von 10 bzw. 9 *ab initio*-Rechnungen auf DFT B3LYP 6-31G(d,p) Niveau gemacht. Damit sollte die energetisch niedrigste Anordnung der Tryptophanseitenkette für diese

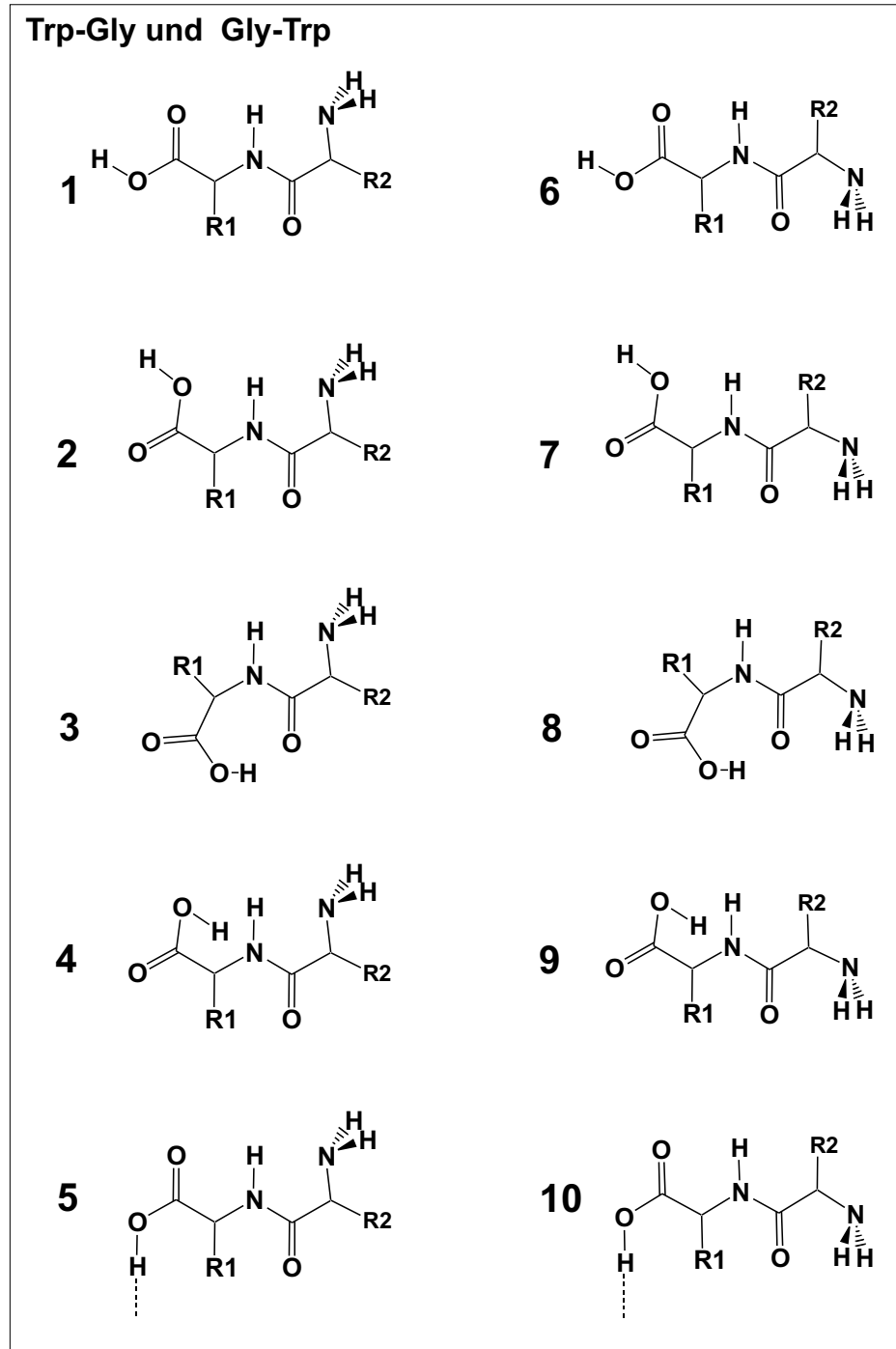


Abbildung 4.3: Mögliche Konformationen des Peptidrückgrates der beiden Dipeptide Trp-Gly (R₁=H, R₂=CH₂-Indol) und Gly-Trp (R₁=CH₂-Indol, R₂=H). π symbolisiert das π -Elektronensystem von R₁ oder R₂.

Anordnungen des Peptidrückgrates gefunden werden. Ferner sollten die Effekte, die die unterschiedlichen Anordnungen der Tryptophanseitenkette auf die berechneten Spektren haben, bestimmt werden. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Die COOH-Gruppe von Gly-Trp wurde in *syn*-Konformation fixiert. Die drei Diederwinkel der Bindungen $\text{IndCH}_2\text{-CHR}(\text{NH}_2)$, $\text{IndCH}_2\text{CHR-NH}_2$ und $\text{IndCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{-R}$ wurden jeweils zu 60° , 180° und 300° (gestaffelte Anordnungen) angenommen. Der Diederwinkel der Bindung, die den Indolring mit dem Rest des Moleküls verbindet, war entweder 90° oder -90° , da aus Berechnungen an Trp⁷³ und NATMA⁸⁰ bekannt ist, dass die energetisch günstigsten Strukturen diese Indolringanordnung haben. Die resultierenden $3^3 \cdot 2 = 54$ Konformere wurden sowohl auf HF 3-21G(d), als auch AM1 Niveau vollständig geometrioptimiert. 39 der 54 HF optimierten Konformere hatten unterschiedliche Strukturen und Energien. Davon wurden alle, deren relative Energie (bezogen auf die Energie des stabilsten Konformers in dem Satz aus 54 HF optimierten Strukturen) unter 1500cm^{-1} lag (13 Konformere), auf DFT B3LYP 6-31G(d,p) Niveau neu optimiert und mit Normalkoordinatenanalyse die Frequenzen berechnet. Ebenso wurde mit den Konformeren, die auf AM1 Niveau optimiert wurden vorgegangen. Hier gab es nach der Optimierung 26 Konformere mit unterschiedlichen Strukturen und Energien. Davon wurden die 16 mit den niedrigsten Energien auf DFT B3LYP 6-31G(d,p) Niveau neu optimiert. 19 der 46 Strukturen hatten unterschiedliche Energien und Strukturen.

10 der 19 resultierenden Konformere haben davon eine Konformer 6 in Abbildung 4.3 ähnliche Struktur. Abbildung 4.4 zeigt die optimierten Strukturen dieser 10 Konformere. Die Struktur mit der niedrigsten Energie (429cm^{-1}) ist in Abbildung 4.13 als Konformer C wiederzufinden. Abbildung 4.5 zeigt die übereinandergelegten, berechneten Spektren im Bereich der NH- und OH-Streckschwingungen. Die Frequenzen der indolischen NH-Streckschwingung von diesen 10 berechneten Strukturen liegen innerhalb von 5cm^{-1} . Die Frequenzen der OH-Streckschwingung der Carboxylgruppe und die NH-Streckschwingung der Peptidbindung liegen bei allen berechneten Spektren innerhalb von 10cm^{-1} .

Die restlichen 9 berechneten Strukturen sind ähnlich zu Konformer 7 in Abbildung 4.3. Die Strukturen werden in Abbildung 4.7 dargestellt, während Abbildung 4.6 die übereinandergelegten, berechneten Spektren zeigt. Die Frequenzen der indolischen NH-Streckschwingung von diesen 9 berechneten Strukturen liegen innerhalb von

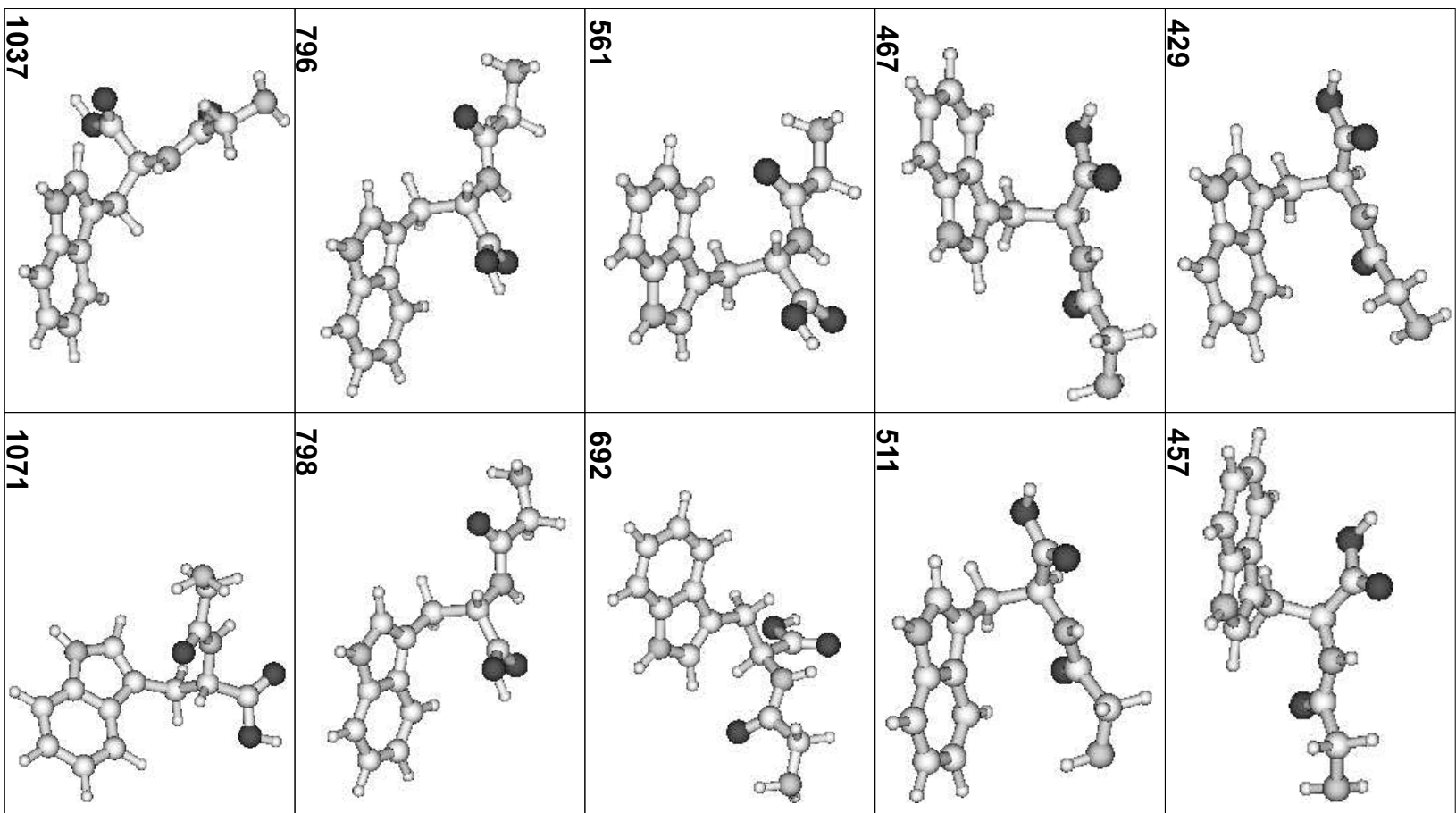


Abbildung 4.4: Strukturen der 10 berechneten (DFT B3LYP 6-31G(d,p)) Gly-Trp Konformere vom Typ 6 in Abbildung 4.3. Die Konformere sind nach relativen ZPE-korrigierten Energien geordnet, die jeweils in cm^{-1} angegeben sind. Der Bezugspunkt ist hierbei das Gly-Trp Konformer mit der niedrigsten Energie in Abbildung 4.13.

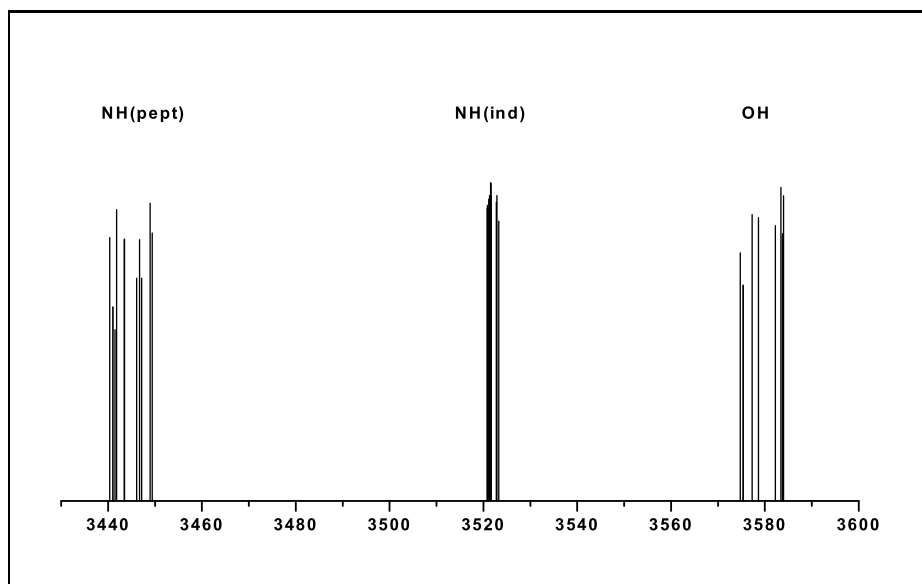


Abbildung 4.5: Berechnete (DFT B3LYP 6-31G(d,p)) Spektren der 10 Gly-Trp Konformere mit Peptidrückgraten ähnlich Konformation 6 in Abbildung 4.3. Die NH(ind) weichen maximal um 5 cm^{-1} voneinander ab. Die Frequenzen der OH und Peptid NH-Streckschwingung weichen maximal 10 cm^{-1} voneinander ab.

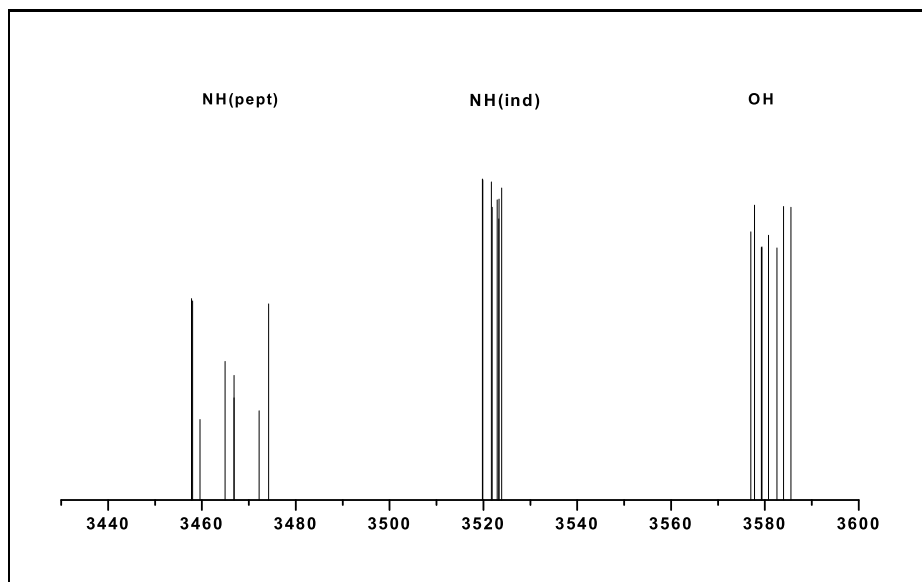


Abbildung 4.6: Berechnete (DFT B3LYP 6-31G(d,p)) Spektren der 9 Gly-Trp Konformere mit Peptidrückgraten ähnlich Konformation 7 in Abbildung 4.3. Die Frequenzen der $\nu(\text{NH}(\text{ind}))$ weichen maximal um 5 cm^{-1} , die der $\nu(\text{OH})$ um 10 cm^{-1} und der Peptid $\nu(\text{NH})$ um maximal 16 cm^{-1} voneinander ab.

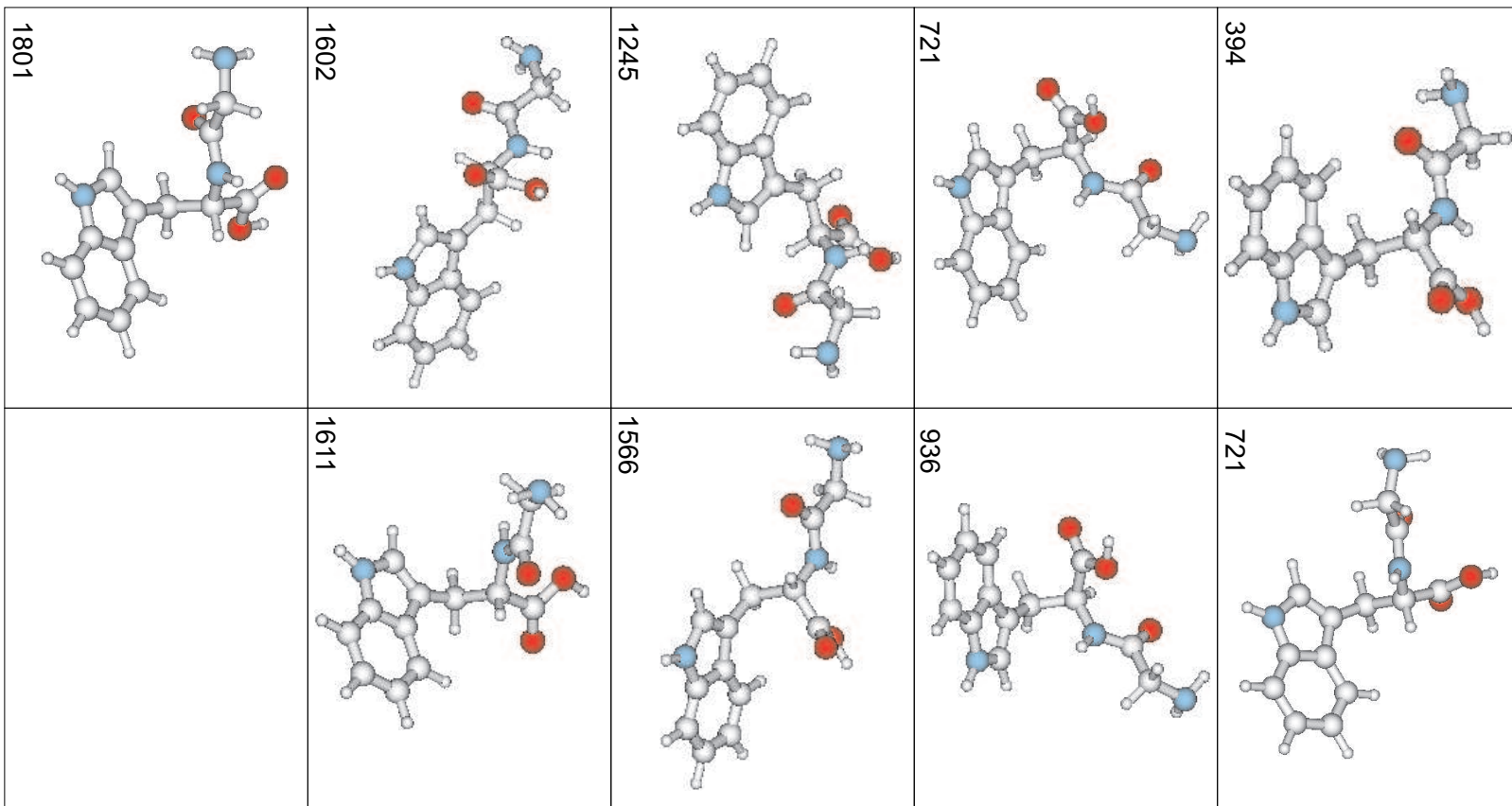


Abbildung 4.7: Strukturen der 9 berechneten (DFT B3LYP 6-31G(d,p)) Gly-Trp Konformere vom Typ 7 in Abb. 4.3. Die Konformere sind nach relativen, ZPE-korrigierten Energien geordnet, die in cm^{-1} angegeben sind. Der Bezugspunkt ist das Gly-Trp Konformer mit der niedrigsten Energie in Abbildung 4.13.

5cm^{-1} . Die Frequenzen der OH-Streckschwingung der Carboxylgruppe liegen bei allen berechneten Spektren innerhalb von 10cm^{-1} . Die NH-Streckschwingung der Peptidbindung liegt bei allen Konformeren dieser Art innerhalb von 16cm^{-1} .

Hier fällt auf, dass die Peptid $\nu(\text{NH})$ Schwingungen der "7er"Konformere etwas weiter auseinander liegen als die der "6er"Konformere. Dies könnte daran liegen, dass die $(\text{NH})\text{-C-C=O}(\text{OH})$ bzw. $(\text{NH})\text{-C-C}(\text{OH})(=\text{O})$ Einheit des Peptidrückgrates bei den "6er"Konformeren immer planar ist, während sie bei den "7er"Konformeren unterschiedliche Winkel einnimmt.

Sowohl die symmetrischen, als auch die asymmetrischen NH_2 -Streckschwingungen haben in allen der 19 berechneten Spektren eine Intensität von nahezu Null.

Diese Rechnungen zeigen, dass die Anordnung der Tryptophanseitenkette im Allgemeinen keinen großen Effekt auf die Frequenzen der NH- und der OH-Streckschwingungen haben, es sei denn diese Gruppen haben eine explizite, Wechselwirkung mit dem aromatischen Ringsystem. Für die Zuordnung der experimentellen Spektren im untersuchten Frequenzbereich ist daher die Anordnung der Tryptophanseitenkette bei den meisten Konformeren unwichtig. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die Spezies, die im Experiment beobachtet werden, Konformere mit niedrigen relativen Energien sind und die Tryptophanseitenkette so angeordnet ist, wie in Struktur C in Abbildung 4.13 oder mit einem um 180° herumgedrehten Indolring. Ausschlaggebend für das Erscheinungsbild des Spektrums ist in den meisten Fällen nur die Konformation des Rückgrates. Erwähnenswert ist, dass es keine Struktur mit einer $\text{OH}\dots\text{NH}_2$ Wasserstoffbrücke in Abbildung 4.3a gibt. Rechnungen zeigten jedoch, dass es auf dem verwendeten Niveau der Theorie, keine Minimumstruktur mit solchen Wasserstoffbrücken gibt.

Die Strukturen 1 bis 5 in Abbildung 4.3 haben alle eine $\text{NH}\dots\text{NH}_2$ Wasserstoffbrückenbindung gemeinsam, während es in den Strukturen 6 bis 10 eine $\text{NH}_2\dots\text{O}=\text{C}$ Wechselwirkung gibt. Jede dieser beiden Anordnungen der NH_2 -Gruppe kann mit fünf unterschiedlichen Konfigurationen der Carboxylgruppe kombiniert werden. Diese kann entweder in syn-Konfiguration sein (Strukturen 1, 2, 6 und 7 in Abbildung 4.3) oder in einer Wasserstoffbrücke mit der Carbonylgruppe der Peptidbindung gebunden sein (Strukturen 3 und 8). Als dritte Möglichkeit kann die OH-Gruppe in eine schwache Wechselwirkung mit dem freien Elektronenpaar des Stickstoffatoms der Peptidbindung (Strukturen 4 und 9) oder mit den π -Elektronen des aromati-

schen Indolrings (Strukturen 5 und 10) einbezogen sein.

Trp-Gly

Abbildung 4.8 zeigt das IR-UV-Spektrum von Trp-Gly. In der Abbildung ist lediglich das Spektrum von Konformer *a* zu sehen, da von Konformer *b* nur eine sehr intensitätschwache Absorptionsbande bei 3519.5cm^{-1} gefunden wurde. Es ist möglich, dass das Verhältnis von Signal zu Rausch zu klein war, um weitere Absorptionsbanden zu finden.

Für Konformer *a* wurde der Bereich von 2800 bis 3600cm^{-1} untersucht. Zwischen 3200 und 3250cm^{-1} war die Leistung des IR-Lasers allerdings zu schwach um hier Spektren aufzunehmen. Im IR-Spektrum von Konformer *a* von Trp-Gly sind vier Absorptionsbanden zu sehen: Die niederfrequenteste Bande bei 3069cm^{-1} ist sehr schwach und kann einer C-H-Streckschwingung zugeordnet werden. Die anderen drei Absorptionsbanden sind um etwa den Faktor 5 intensiver und erscheinen bei 3420cm^{-1} , 3519.5cm^{-1} und 3588cm^{-1} . Die Absorptionsbande bei 3519.5cm^{-1} kann sehr einfach der Streckschwingung der NH-Gruppe des Indolrings zugeordnet werden. Im Indol selbst wurde diese Bande von Carney et al.⁸⁶ bei 3525cm^{-1} beobachtet. In Tryptophan wurde die gleiche Schwingung von Snoek et al.⁷³ je nach Konformer zwischen 3521cm^{-1} und 3524cm^{-1} gemessen.

Die Bande bei 3588cm^{-1} wird der OH-Streckschwingung der Carboxylgruppe in *syn*-Konfiguration zugeordnet, die gewöhnlich bei ähnlichen Frequenzen beobachtet wird. Dies ist ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Snoek und Mitarbeitern,⁷³ die diese Schwingung in Tryptophan je nach Konformer zwischen 3576cm^{-1} und 3579cm^{-1} beobachteten.

Die Absorptionsbande bei 3420.0cm^{-1} wird der NH-Streckschwingung der Peptidbindung zugeordnet. Alle Rechnungen, die von den hier untersuchten Peptiden gemacht wurden, zeigten, dass die Intensitäten für die NH_2 -Streckschwingungen nahezu Null sind. Da es lediglich eine Bande neben der indolischen NH- und der carboxyl-OH-Streckschwingung im Spektrum von Trp-Gly gibt, wird daher davon ausgegangen, dass diese Bande nicht von der NH_2 -Gruppe stammt.

Die freie Peptid-NH-Streckschwingung in NATMA wurde von Dian und Mitarbeitern⁸⁰ je nach Konformer bei 3466cm^{-1} bzw. 3454cm^{-1} gefunden. Die Absorptions-

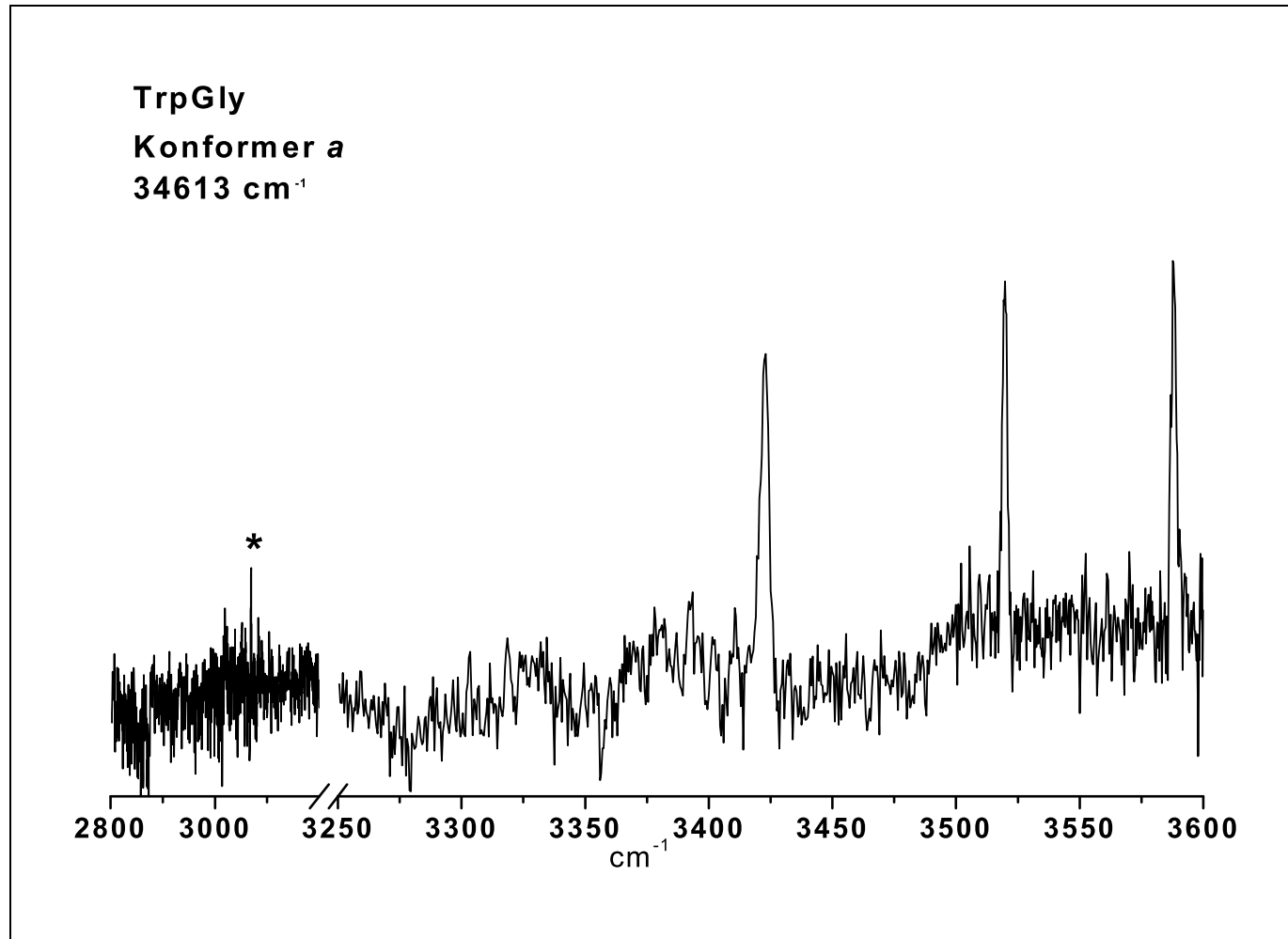


Abbildung 4.8: IR-UV Doppelresonanzspektrum von Konformer *a* von Trp-Gly. Zur Aufnahme dieses Spektrums wurde der Analyselaser auf die Bande im REMPI-Spektrum bei 34613cm^{-1} abgestimmt. Die Lücke im Spektrum zwischen 3200cm^{-1} und 3250cm^{-1} entsteht dadurch, dass der Farbstofflaser im entsprechenden Bereich nur sehr wenig Leistung emittiert, da dieser Bereich in den Randbereichen von Styryl 8 und Styryl 9 liegt.

bande von NATMA ist also relativ zu der Peptid-NH-Streckschwingung in Trp-Gly um 46cm^{-1} bzw. 34cm^{-1} zu höheren Frequenzen verschoben. Es ist danach sehr wahrscheinlich, dass die NH-Bindung in Trp-Gly in einer Wasserstoffbrückenbindung gebunden ist. Vergleicht man mit den Spektren beider Gly-Trp Konformere (hier erscheint die Peptid $\nu(\text{NH})$ bei 3337cm^{-1} für Konformer *a* und bei 3395cm^{-1} für Konformer *b*, vergl. Abbildung 4.11) so fällt auf, dass die Peptid $\nu(\text{NH})$ von Trp-Gly keineswegs besonders stark zu niederen Frequenzen verschoben ist, sondern lediglich mittelmäßig.

In den Strukturen, die in Abbildung 4.3 vorgeschlagen werden, gibt es drei verschiedene Möglichkeiten, wie Elektronendichte von der NH-Bindung abgezogen werden und damit ihre Schwingungsfrequenz zu niederen Frequenzen verschoben werden kann: Die größte Verschiebung wird dann erwartet, wenn die OH-Gruppe mit dem freien Elektronenpaar des Stickstoffatoms in der Peptidbindung wechselwirkt, wie das in den Strukturen 4 und 9 in Abbildung 4.3 der Fall ist, oder wenn sich eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Peptid-NH-Gruppe und der NH_2 -Gruppe ausbildet ($\text{NH}\dots\text{NH}_2$), wie in den Strukturen 1 bis 5 in Abbildung 4.3. Eine kleinere, aber dennoch sichtbare Rotverschiebung ist zu erwarten, wenn die C=O-Gruppe an einer starken Wasserstoffbrücke beteiligt ist, so dass Elektronendichte zum Sauerstoffatom der C=O-Gruppe hin und von der NH-Bindung weggezogen wird. Diese Effekte werden sich addieren, wenn sie gleichzeitig auftreten.

Für die Strukturen 3 und 8 in Abbildung 4.3 wird eine starke Rotverschiebung der $\nu(\text{OH})$ erwartet, während für die Strukturen 4, 5, 9 und 10 eine kleinere aber dennoch sichtbare Rotverschiebung zu erwarten ist. Das liegt daran, dass die OH-Gruppe in den Strukturen 3 und 8 in einer starken Wasserstoffbrücke gebunden ist, während sie in den Strukturen 4, 5, 9 und 10 nur durch eine wesentlich schwächere Wechselwirkung beeinflusst wird. Im experimentellen Spektrum von Trp-Gly ist die OH-Streckschwingung überhaupt nicht verschoben. Aus diesem Grund können alle 6 Strukturen (3, 4, 5, 8, 9, und 10) ausgeschlossen werden.

Man würde erwarten, dass die Peptid-NH-Streckschwingung in den Strukturen 6 und 7 in Abbildung 4.3 im wesentlichen unbeeinflusst wäre und bei einer Frequenz wie die Peptid-NH-Bindung in NATMA absorbieren würde. Für die Strukturen 1 und 2 dagegen würde man eine solche Rotverschiebung, wie sie beobachtet wird, erwarten, da die Peptid-NH-Gruppe hier in eine Wasserstoffbrücke mit der NH_2 -Gruppe involviert ist. Daher kann die prinzipielle Anordnung des Peptidrückgrates von Konformer *a* im Molekularstrahl nur eine der beiden Strukturen 1 und 2 in

Abbildung 4.3 sein.

Diese Überlegungen werden auch von den Rechnungen, die von Trp-Gly durchgeführt wurden, unterstützt. In Abbildung 4.9 ist das experimentelle Spektrum von Trp-Gly im Vergleich zu den berechneten Spektren, die nach relativen Energien geordnet sind, dargestellt. Die entsprechenden Strukturen sind in Abbildung 4.10 zu sehen. Es ist zu beachten, dass auf diesem Niveau der Theorie ein Basissatzüberlappungsfehler (BSSE: basis set superposition error) und ein Elektronenkorrelationsfehler auftreten und die relativen Energien daher nicht verlässlich sind. Um die relativen Energien der Strukturen besser miteinander vergleichen zu können, wurde für alle berechneten Konformere dieselbe Konfiguration der Tryptophanseitenkette relativ zu dem Peptidrückgrat gewählt. Diese Konfiguration entspricht der mit der geringsten relativen Energie, die in dem Satz von 19 Rechnungen der Strukturen 6 und 7 in Abbildung 4.3 gefunden wurden. Die berechneten Spektren wurden mit einem Faktor von 0.9546 skaliert. Die Spektren, die am besten zu dem experimentellen Spektrum passen, sind mit Pfeilen markiert. Dies sind die Strukturen B und C, die den Strukturen 1 und 2 in Abbildung 4.3 ähnlich sind.

Eines der beiden Konformere B und C könnte also auch das Konformer sein, das zu dem vibronischen Spektrum mit den langen Progressionen führt (vgl. Abbildung 4.1 Konformer *a*). Ein Vergleich der experimentell gefundenen, niederfrequenten Schwingungsmoden mit den berechneten im Grundzustand von Konformer B (unskaliert) zeigt, dass die Werte in relativ guter Übereinstimmung sind (exp: 11.6/21.4cm⁻¹, gerechnet: 10.3/21.3cm⁻¹). Es ist jedoch zu beachten, dass die Grundzustandsschwingungsmoden von denen im elektronisch angeregten Zustand abweichen können. Dennoch ist es möglich, dass das Konformer *a* auch im elektronisch angeregten Zustand ähnliche Schwingungen wie die folgenden hat:

1. Die Schwingung bei 10.3cm⁻¹ ist eine Torsionsschwingung von der CH₂COOH Einheit gegen den restlichen Teil des Moleküls um die (HOOC)CH₂-NHCOR Bindung. Der aromatische Ring und CH₂COOH bewegen sich dabei aufeinander zu und voneinander weg.
2. Die Schwingung bei 21.3cm⁻¹ ist eine Torsionsschwingung des aromatischen Systems um die ArCH₂-CH₂R Bindung. Gleichzeitig schwingt CH₂NH auf den Ring zu

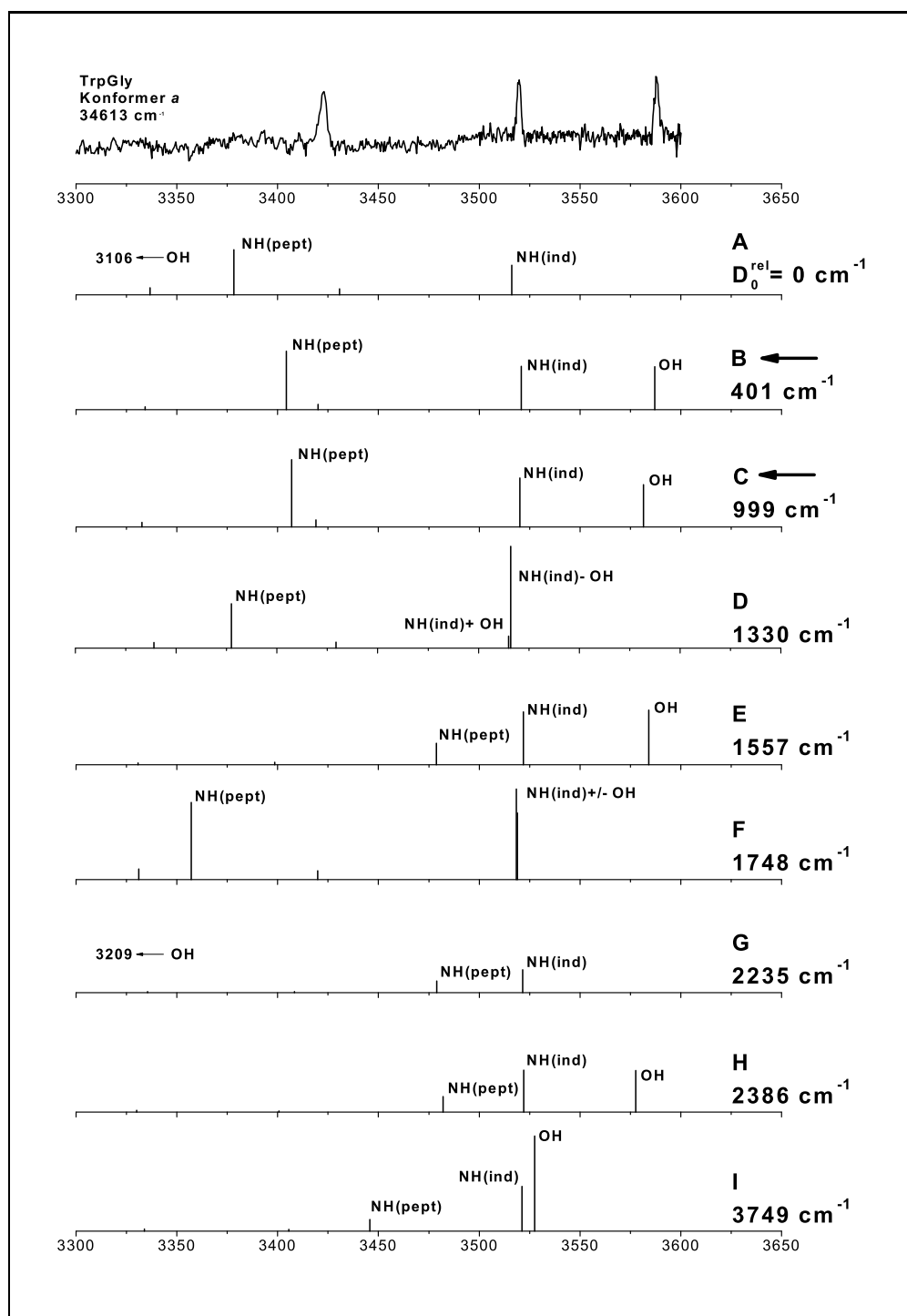


Abbildung 4.9: IR-UV Doppelresonanzspektrum von Konformer *a* von Trp-Gly im Vergleich mit den harmonischen Frequenzen von neun verschiedenen Konformeren, die auf DFT B3LYP 6-31G(d,p) Niveau berechnet wurden. Die zugehörigen Strukturen sind in Abbildung 4.10 zu sehen. Die Spektren sind nach den relativen Energien D_0^{rel} der Konformere geordnet. Alle D_0^{rel} sind ZPE korrigiert. Die harmonischen Frequenzen wurden mit einem Skalierungsfaktor von 0.9546 angepaßt. Diejenigen Spektren, die das experimentelle Spektrum am besten wiedergeben, sind mit Pfeilen markiert.

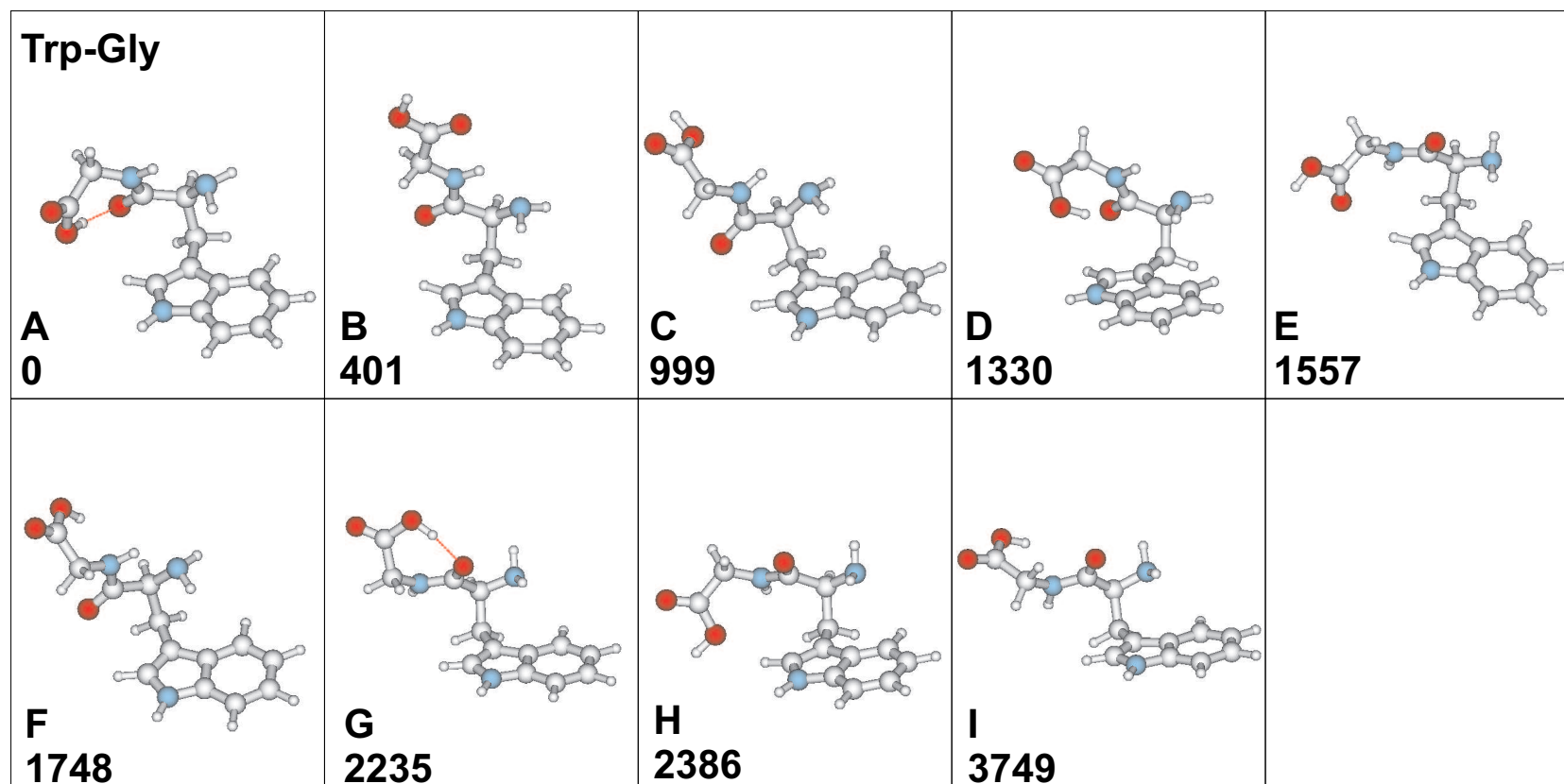


Abbildung 4.10: Strukturen von Trp-Gly auf DFT B3LYP 6-31G(d,p) Niveau geometrieoptimiert. Neben den Strukturen sind die relativen Energien D_0^{rel} gegeben, die um die Nullpunktenergie korrigiert wurden.

und weg, was durch Verdrillungen um die $(\text{HOOC})\text{CH}_2\text{-NHCOR}$ und die $\text{ArCH}_2\text{-CH}_2\text{R}$ Bindung ermöglicht wird.

Gly-Trp

Die IR-UV Doppelresonanzspektren von Konformer *a* und *b* im untersuchten spektralen Bereich sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Im Spektrum von Konformer *a* sind zwei Absorptionsbanden bei 3520.0cm^{-1} und bei 3337.0cm^{-1} vorhanden. Die Bande bei 3520.0cm^{-1} kann der NH-Streckschwingung des Indolrings zugeordnet werden (vgl. Trp-Gly, Abschnitt 4.1.3). Die OH-Streckschwingung der Carboxylgruppe in syn-Konfiguration fehlt im Spektrum. Daher kann angenommen werden, dass die OH-Gruppe in einer Wechselwirkung gebunden ist und alle Strukturen in Abbildung 4.3, in denen die COOH-Gruppe eine syn-Konfiguration hat, können ausgeschlossen werden: Strukturen 1, 2, 6 und 7. Die Streckschwingung der NH-Gruppe der Peptidbindung ist im Vergleich zu der $\nu(\text{NH})$, die von Dian et al.⁸⁰ gefunden wurde, um 121cm^{-1} zu niedrigeren Frequenzen verschoben; zu der $\nu(\text{NH})$ in Trp-Gly ist sie um 83cm^{-1} rotverschoben. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass hier neben einer schwachen OH Wechselwirkung bzw. einer OH...O=C Wasserstoffbrücke eine weitere NH...NH₂ Wechselwirkung vorliegt. Solch eine Wasserstoffbrückenbindung liegt in den Strukturen 3, 4 und 5 in Abbildung 4.3, jedoch nicht in den Strukturen 8, 9 und 10, die also vernachlässigt werden können. Wenn die OH-Gruppe in einer starken Wasserstoffbrücke gebunden ist, wie in der Struktur 3 in Abbildung 4.3, ist zu erwarten, dass sie sehr weit rotverschoben ist. Außerdem ist sie in diesem Fall sehr breit und damit experimentell leicht zu übersehen. Eine OH-Gruppe, die dagegen an einer schwachen Wechselwirkung beteiligt ist, wie in den Strukturen 4 und 5, würde nicht so weit rotverschoben und wesentlich schmaler sein. Die Struktur, die das Spektrum von Konformer *a* am besten erklärt, ist also die Struktur 3 in Abbildung 4.3.

Im IR-UV Doppelresonanzspektrum von Konformer *b* von Gly-Trp (s. Abbildung 4.11) sind drei Absorptionslinien bei 3582.5cm^{-1} , 3522.5cm^{-1} und 3396.0cm^{-1} zu sehen. Die OH Streckschwingung der Carboxylgruppe ist nicht verschoben, womit die Strukturen 3-5 und 8-10 in Abbildung 4.3 ausgeschlossen werden können. Die NH-Streckschwingung der Peptidgruppe ist verglichen mit der freien $\nu(\text{NH})$ in NAT-MA⁸⁰ um 62cm^{-1} rotverschoben. Die NH-Bindung ist also sehr wahrscheinlich an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt, und die Strukturen, die hierfür in Frage kommen, sind die Strukturen 1 und 2 in Abbildung 4.3 mit einer NH...NH₂ Wechselwirkung. Nichtsdestotrotz muss es einen weiteren Effekt geben, der die $\nu(\text{NH})$,

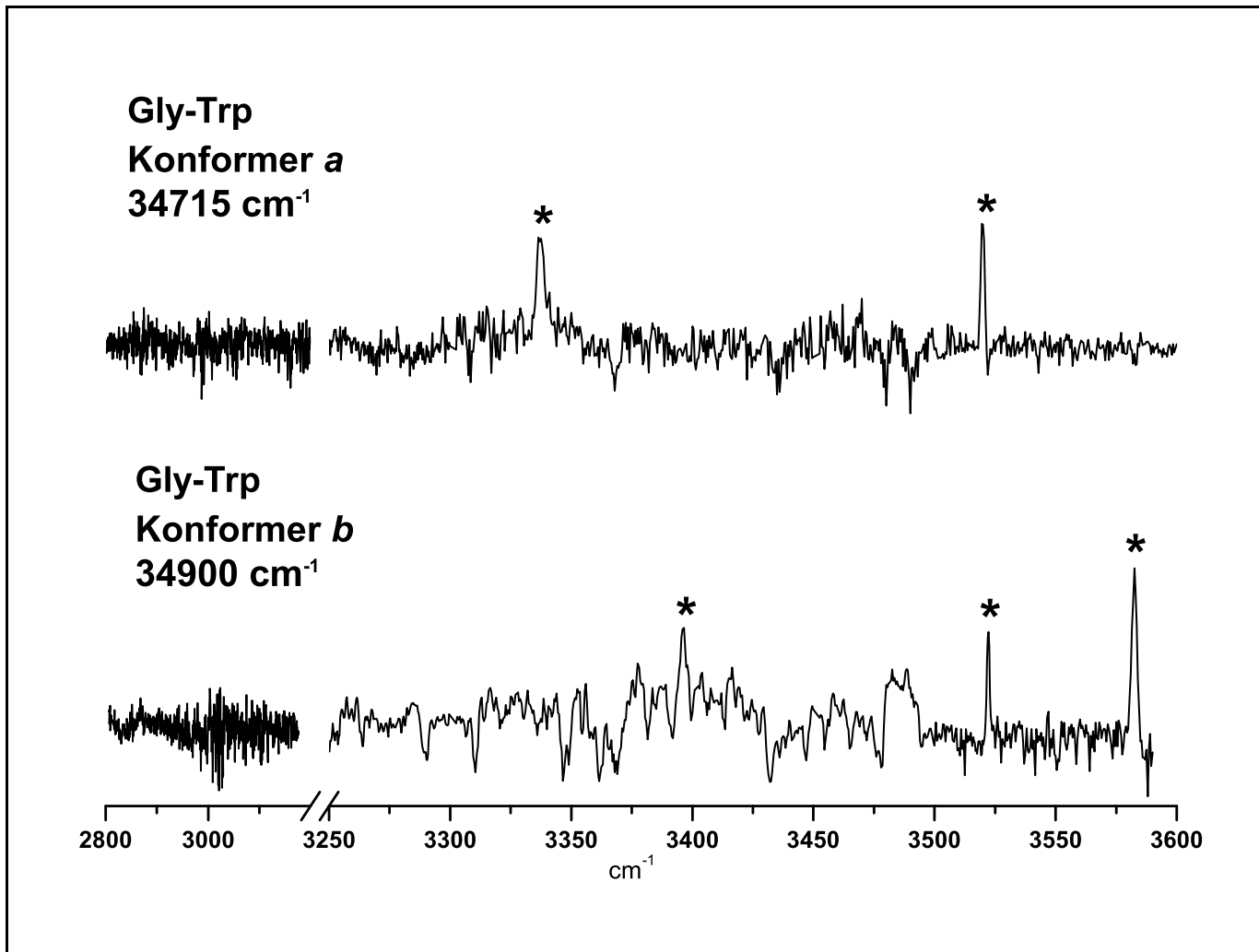


Abbildung 4.11: IR-UV Doppelresonanzspektrum von Konformer *a* und *b* von Gly-Trp. Zur Aufnahme des Spektrums von Konformer *a* wurde der Analyselaser auf die Bande im REMPI-Spektrum bei 34715.5cm^{-1} abgestimmt. für das Spektrum von Konformer *b* wurde er auf die Bande bei 34900.5cm^{-1} abgestimmt. Die Lücke im Spektrum zwischen 3200cm^{-1} und 3250cm^{-1} entsteht dadurch, dass der Farbstofflaser im entsprechenden Bereich nur sehr wenig Leistung emittiert, da dieser Bereich in den Randbereichen von Styryl 8 und Styryl 9 liegt.

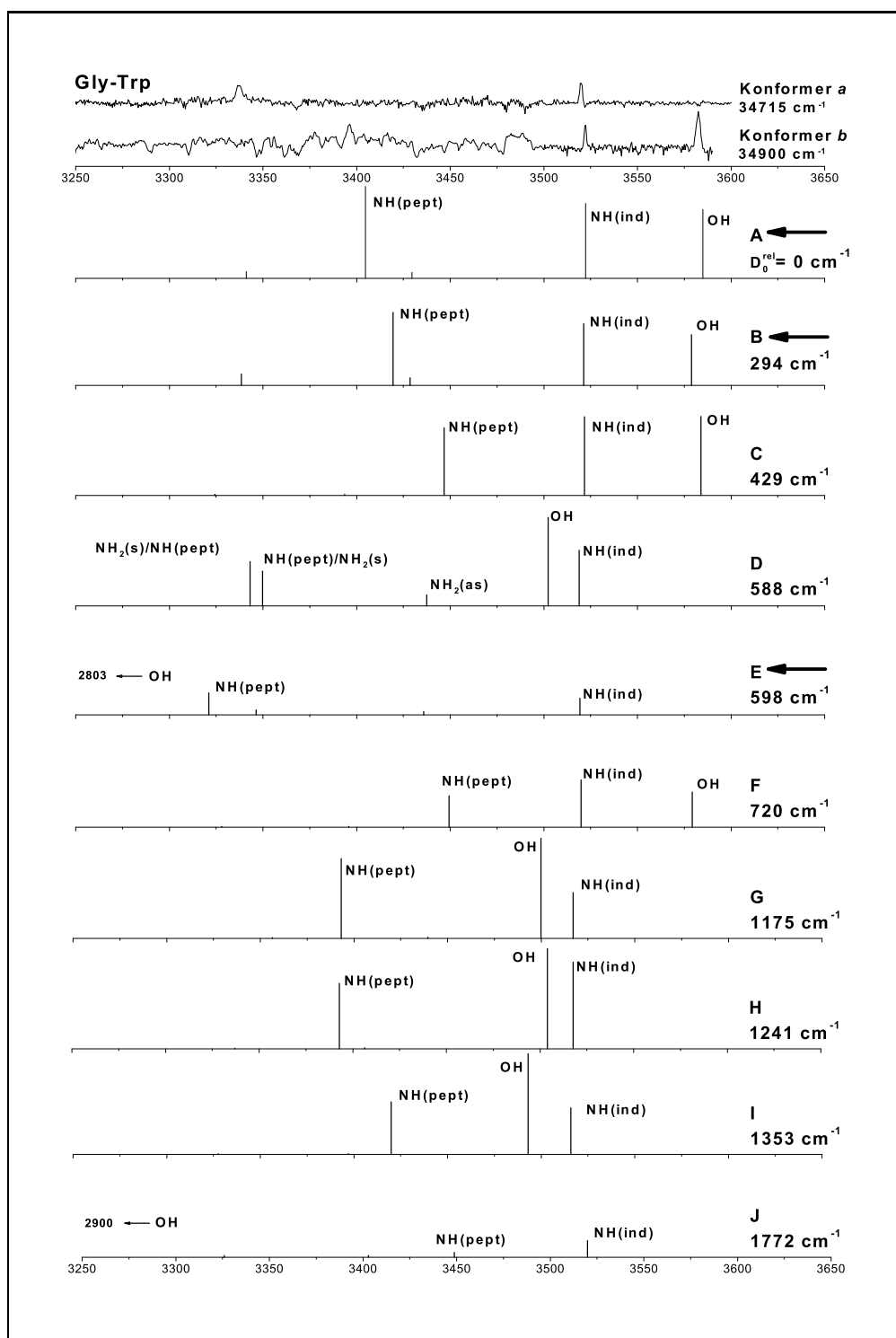


Abbildung 4.12: IR-UV Doppelresonanzspektren von Gly-Trp im Vergleich mit den harmonischen Frequenzen von zehn verschiedenen Konformeren, die auf DFT B3LYP 6-31G(d,p) Niveau berechnet wurden. Die zugehörigen Strukturen sind in Abbildung 4.13 zu sehen. Die Spektren sind nach den relativen Energien D_0^{rel} der Konformere geordnet. Alle D_0^{rel} sind ZPE korrigiert. Die harmonischen Frequenzen wurden mit einem Skalierungsfaktor von 0.9546 angepaßt. Die berechneten Spektren, die am besten die experimentellen Spektren wiedergeben, sind mit Pfeilen markiert.

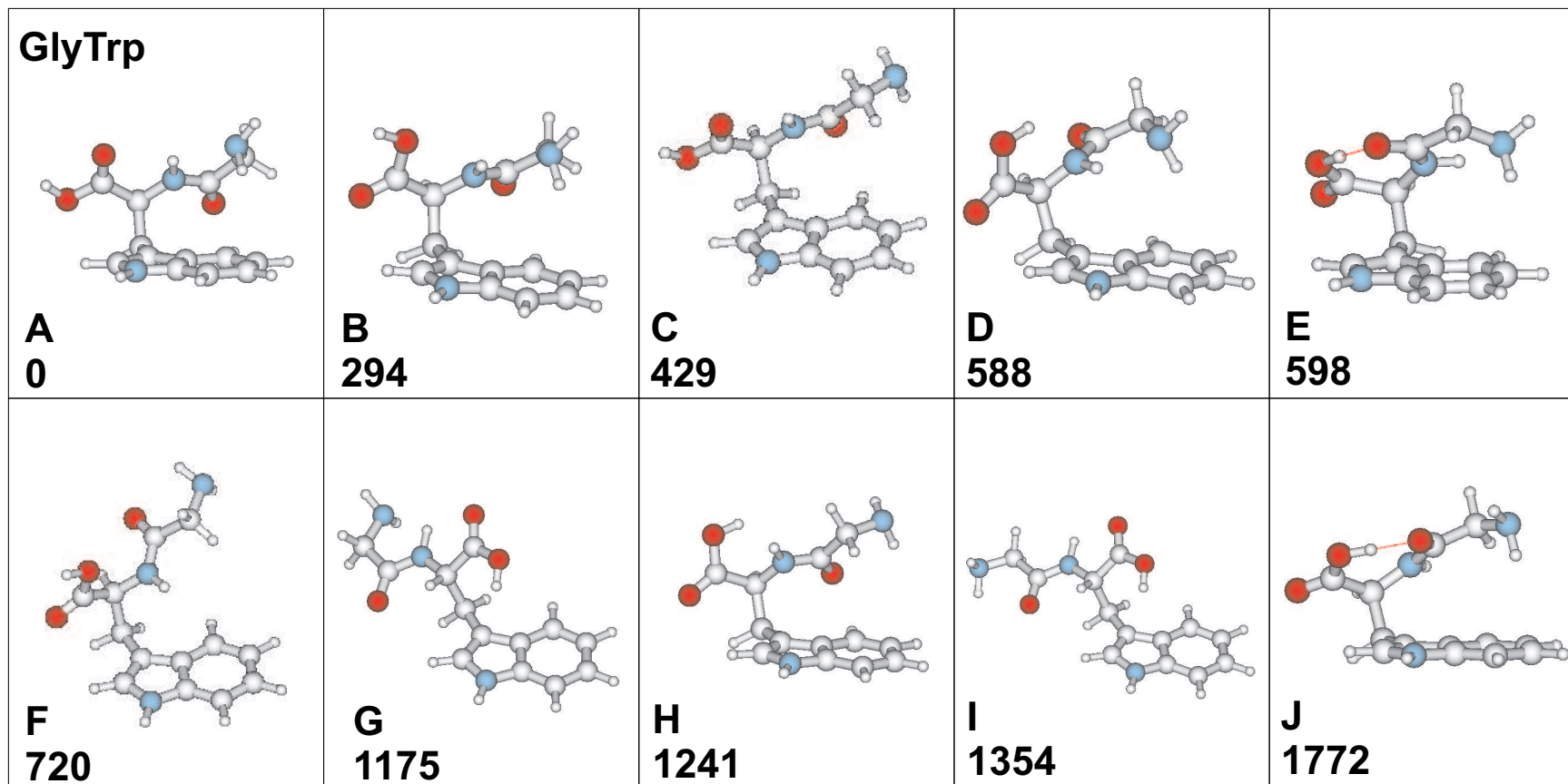


Abbildung 4.13: Strukturen von Gly-Trp auf DFT B3LYP 6-31G(d,p) Niveau gerechnet. Neben den Strukturen sind die relativen Energien D_0^{rel} gegeben, die um die Nullpunktenergie korrigiert wurden.

verglichen mit der gleichen Schwingung in Trp-Gly, um 24cm^{-1} rotverschiebt, da für beide Strukturen eine von den beiden Strukturen 1 und 2 in Abbildung 4.3 gefunden wurde. Diese Verschiebung kann zum Beispiel durch eine zusätzliche Wechselwirkung mit dem π -Elektronensystem des Indolrings hervorgerufen werden.

In Abbildung 4.12 sind die experimentellen Spektren beider Gly-Trp Konformere und die berechneten Spektren 10 unterschiedlicher Konformere zum Vergleich untereinander dargestellt. Die Strukturen der 10 berechneten Konformere sind den Strukturen, die in Abbildung 4.3 vorgeschlagen wurden, ähnlich. Abbildung 4.13 enthält die Strukturen der Konformere, die zu den berechneten Spektren gehören. Das Spektrum von der berechneten Struktur E paßt am besten zu dem experimentellen Spektrum von Konformer *a*. Struktur E hat eine OH...O=C und eine NH...NH₂ Wasserstoffbrückenbindung, wie die Struktur 3 in Abbildung 4.3. Die berechneten Spektren, die am besten zu dem experimentellen Spektrum von Konformer *b* passen, sind die von den Strukturen A und B. Diese entsprechen den Strukturen 1 und 2 in Abbildung 4.3. Auf dem verwendeten Niveau der Theorie und mit dem limitierten Satz an IR Daten, kann jedoch nicht entschieden werden, welche von den beiden Strukturen im Molekularstrahl beobachtet wird.

Abbildung 4.14 enthält einen Überblick über die Schwingungsfrequenzen der Peptid-NH-Streckschwingung in den soeben analysierten Peptiden Trp-Gly und Gly-Trp und den bislang bekannten, geschützten Peptiden bzw. Aminosäuren N-Acetyltryptophanmethylamid⁸⁰ (NATMA), Acetylphenylalaninmethylester (Ac-Phe-OMe) und dessen Clustern^{78,87} Acetylvalinphenylalaninmethylester⁸² (Ac-Val-Phe-OMe)

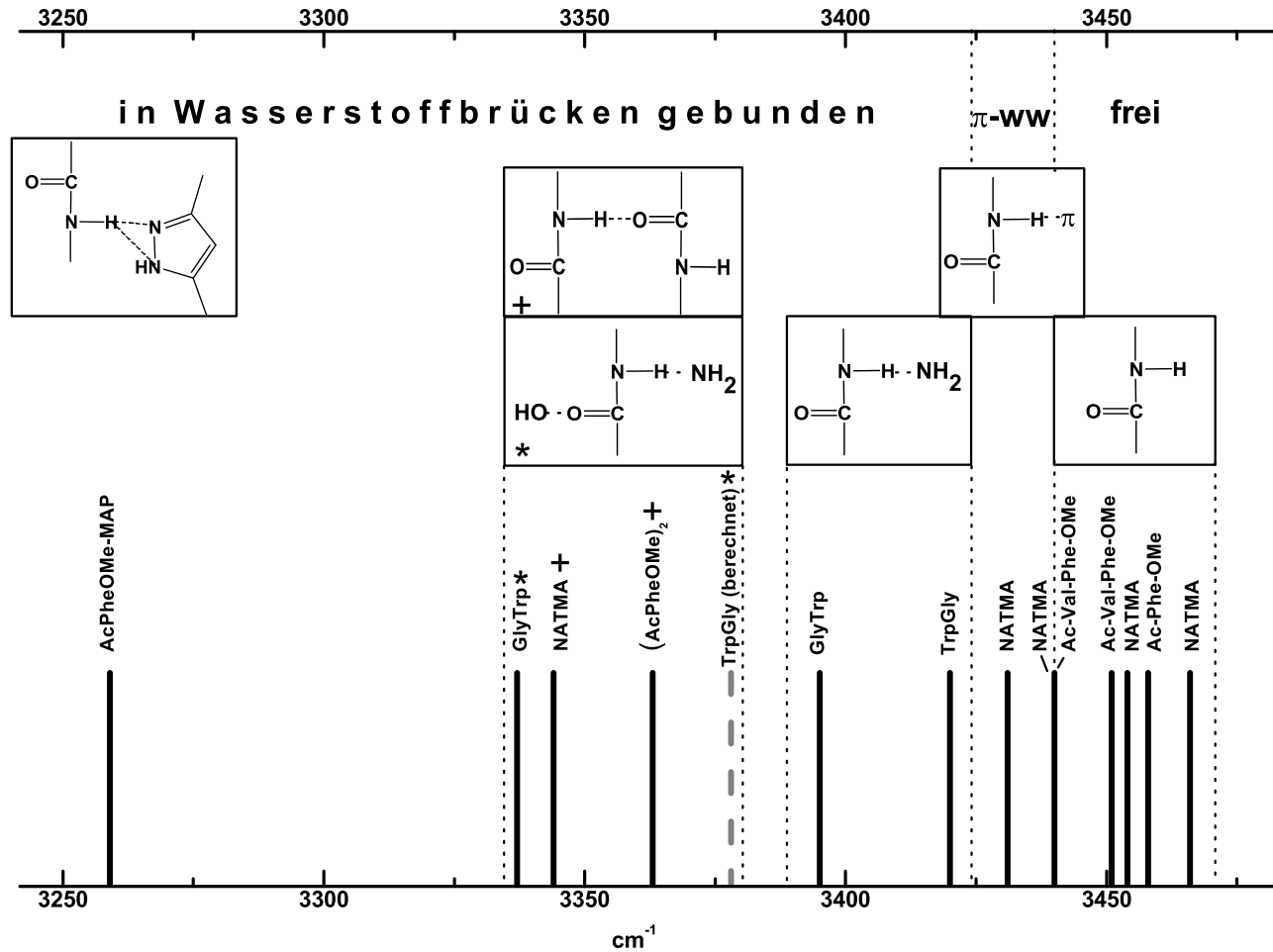


Abbildung 4.14: Überblick über die Schwingungsfrequenzen der Peptid-NH-Streckschwingungen in tryptophanenthaltenden Peptiden und geschützten Peptiden in unterschiedlichen Umgebungen. Die Frequenzen von NATMA sind aus Referenz,⁸⁰ die von Ac-Phe-OMe aus Referenzen^{78,87} und die von Ac-ValPhe-OMe aus Referenz⁸²

4.2 Trp-Gly-Gly

4.2.1 UV-UV Doppelresonanzspektroskopie an Trp-Gly-Gly

In Abbildung 4.15 sind das REMPI- und die Lochbrennspektren von Trp-Gly-Gly zu sehen. Die Spektren zeigen, dass es mindestens zwei verschiedene Konformere von Trp-Gly-Gly im Molekularstrahl gibt, die im untersuchten Spektralbereich von 34500cm^{-1} bis 35000cm^{-1} absorbieren. Es könnten jedoch Absorptionen von weiteren Konformeren unter den breiten Absorptionsbanden bei 34750cm^{-1} und 34800cm^{-1} liegen. Wenn der Analyselaser auf eine dieser Banden abgestimmt wurde, ließen sich jedoch keine scharfen UV-UV Doppelresonanzspektren aufnehmen. Die Bande mit der niedrigsten Frequenz erscheint bei 34535.5cm^{-1} und gehört zu Konformer *a* (s. Abbildung 4.15). Die Bande mit der niedrigsten Frequenz von Konformer *b* ist um 328cm^{-1} dazu blau verschoben. Das Spektrum von Konformer *a* hat eine lange, harmonische Progression mit Abständen von $26.1\pm 0.3\text{cm}^{-1}$ und zwei Schwingungsbanden bei 68.5cm^{-1} und 74.1cm^{-1} , auf denen sich diese Progression mit Kombinationsbanden aufbaut. Die Frequenzen der Progressionen sind in Tabelle 4.2.1 aufgelistet. Da die erste Bande im Spektrum einer relativ langen Progression angehört, kann diese Bande nicht klar dem elektronischen Ursprung zugeordnet werden.

4.2.2 IR-UV Doppelresonanzspektroskopie an Trp-Gly-Gly

Die IR-UV Doppelresonanzspektren von den beiden Konformeren *a* und *b* von Trp-Gly-Gly sind in Abbildung 4.16 dargestellt. Beim Vergleich der beiden Spektren fällt als erstes auf, dass sowohl die NH-Streckschwingung des Indolrings als auch die freie OH-Streckschwingung der Carboxylgruppe in dem Spektrum von Konformer *a* fehlt, während beide im Spektrum von Konformer *b* vorhanden sind. Beide Bindungen müssen also in Konformer *a* an Wechselwirkungen beteiligt sein. Dies kann nur dann sein, wenn die OH-Bindung der Carboxylgruppe eine Wasserstoffbrücke innerhalb des Peptidrückgrates ausbildet, während das Peptidrückgrat zum Indolring gefaltet ist und eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Indol-NH-Bindung und der C=O-Bindung der Carboxylgruppe besteht. Die Strukturen 1 und

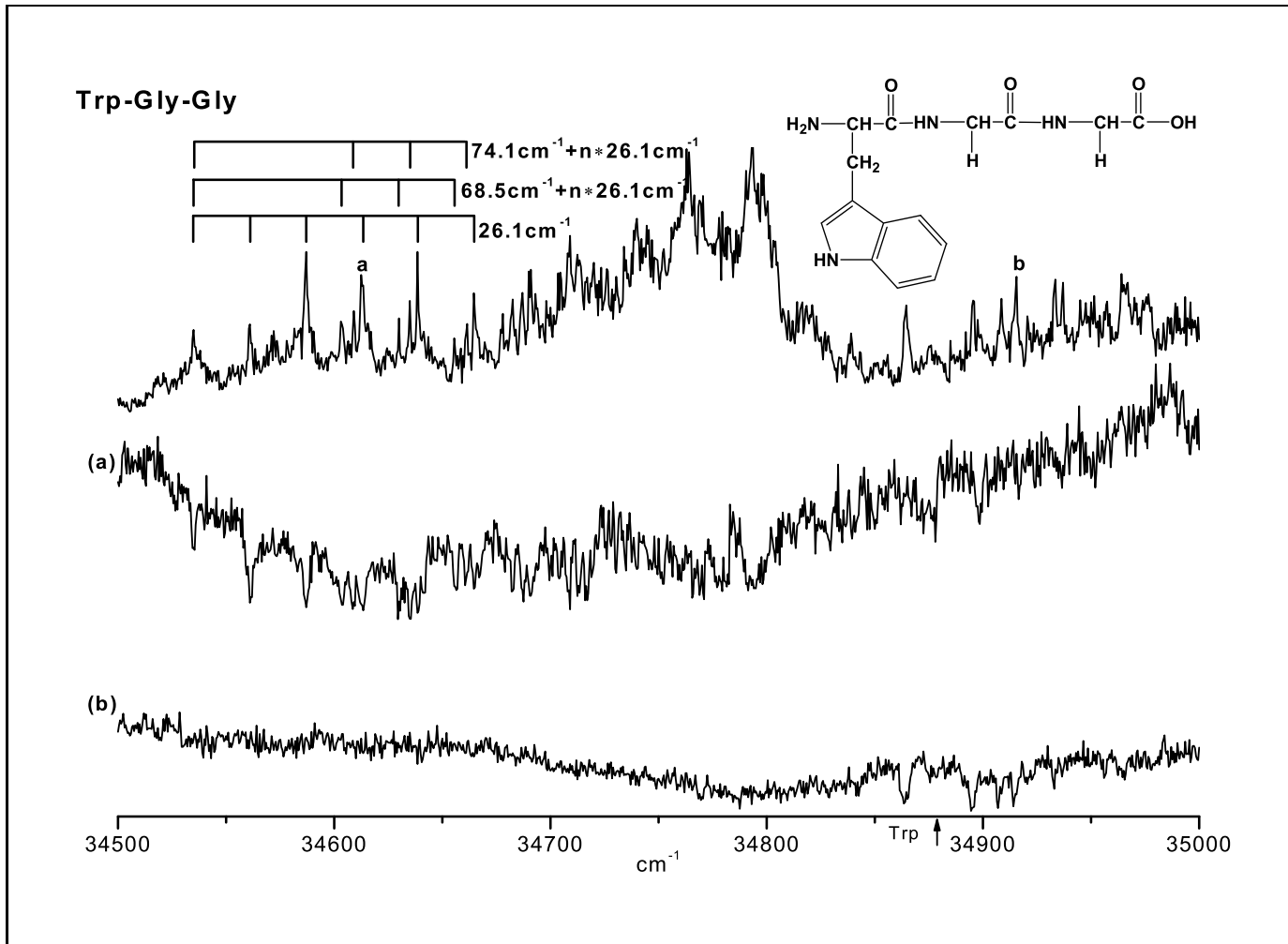


Abbildung 4.15: REMPI-Spektrum von Trp-Gly-Gly, das auf der Muttermasse von 318 Dalton aufgenommen wurde. Die Spuren (a) und (b) sind die UV-UV Doppelresonanzspektren, bei denen der Analyselaser auf die Banden abgestimmt wurde, die im REMPI-Spektrum mit a bzw. b bei 34651cm^{-1} bzw. 34870cm^{-1} markiert sind.

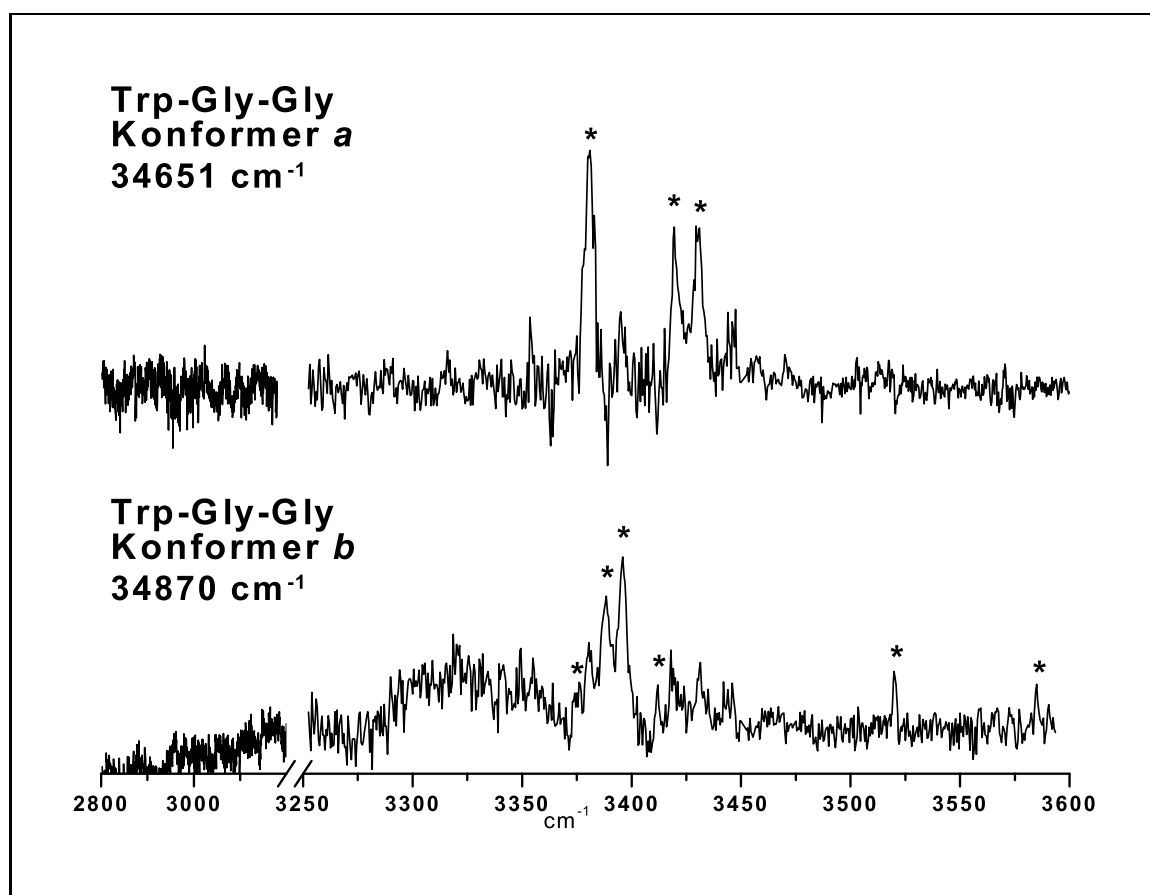


Abbildung 4.16: IR-UV Doppelresonanzspektrum von Konformer *a* und *b* von Trp-Gly-Gly. Zur Aufnahme des Spektrums von Konformer *a* wurde der Analyselaser auf die Bande im REMPI-Spektrum bei 34651cm⁻¹ abgestimmt. Für das Spektrum von Konformer *b* wurde er auf die Bande bei 34870cm⁻¹ abgestimmt. Die Lücke im Spektrum zwischen 3200cm⁻¹ und 3250cm⁻¹ entsteht dadurch, dass der Farbstofflaser im entsprechenden Bereich nur sehr wenig Leistung emittiert, da dieser Bereich in den Randbereichen von Styryl 8 und Styryl 9 liegt. Die Sterne markieren die Infrarotbanden, die dem jeweiligen Konformer zugeordnet werden. Die nichtmarkierten Banden im Spektrum von *b* sind wahrscheinlich ein schwacher Beitrag von *a*

Tabelle 4.2: Frequenzen der harmonischen Schwingungsprogressionen im UV-UV Doppelresonanzspektrum von Konformer *a* von Trp-Gly-Gly

Absorptionsbande (cm^{-1})	relative Frequenz (cm^{-1})	Abstände (cm^{-1})	Zuordnung
34534.9	0.0		0
34561.0	26.1	26.1	α
34587.0	52.1	26.0	2α
34613.0	78.1	26.0	3α
34638.8	103.9	25.8	4α
34665.0	130.1	26.2	5α
34603.4	68.5		β
34629.8	94.9	26.4	$\beta+\alpha$
34655.9	121.0	26.1	$\beta+2\alpha$
34609.0	74.1		γ
34635.0	100.1	26.0	$\gamma+\alpha$
34661.3	126.4	26.3	$\gamma+2\alpha$

2 in Abbildung 4.17 zeigen die zwei Konformationen des Rückgrates des Tripeptides, die für eine solche Anordnung in Frage kommen. Aufgrund der Asymmetrie des Indolrings, können beide Strukturen auf zwei verschiedene Arten zum Indolring gefaltet werden. Aus sterischen Gründen kann in einer gefalteten Struktur weder eine H-Brücke zwischen der NH_2 -Gruppe und der benachbarten $\text{C}=\text{O}$ Bindung noch zwischen der NH_2 -Gruppe und der benachbarten Peptid-NH-Bindung ausgebildet werden. Im Spektrum von Konformer *a* sind drei verschiedene Absorptionsbanden bei 3430.5cm^{-1} , 3419.5cm^{-1} und 3380.5cm^{-1} vorhanden. Alle Banden liegen in einem Frequenzbereich, in dem die $\nu(\text{NH})$ der Peptidbindungen vorkommen können. Daher können zwei der drei Absorptionsbanden den NH-Streckschwingungen der Peptidbindungen zugeordnet werden, da Trp-Gly-Gly zwei Bindungen dieser Art hat. Wenn man davon ausgeht, dass die OH-Gruppe an einer starken Wasserstoffbrücke beteiligt ist und daher sehr breit und sehr weit rotverschoben ist, wie in Konformer *a* von Gly-Trp, kann die letzte Bande im Spektrum von Konformer *a* von Trp-Gly-Gly nur die indolische NH-Streckschwingung sein, die durch eine relativ schwache Wasserstoffbrückenbindung etwas rotverschoben ist. Es ist unwahrscheinlich, dass es sich bei der dritten Bande um die asymmetrische oder symmetrische $\nu(\text{NH}_2)$ handelt, da diese in allen Rechnungen, die an Trp-Gly-Gly (und auch an den Dipeptiden) gemacht wurden, Intensitäten von nahezu Null haben. Es ist jedoch an diesem Punkt nicht möglich eine genaue Zuordnung der Banden zu treffen.

In dem Spektrum von Konformer *b* sind neun Absorptionslinien zu finden. Die Banden bei 3585.0cm^{-1} und 3520.0cm^{-1} können der OH-Streckschwingung der Carboxylgruppe in *syn*-Konfiguration bzw. der freien NH-Streckschwingung des Indolrings zugeordnet werden. Es gibt jedoch sieben weitere Absorptionsbanden, wobei lediglich zwei erwartet werden, da ja die Schwingungen der NH_2 -Gruppe wahrscheinlich keine Intensität haben. Beim genauen Hinsehen fällt auf, dass die sehr schwachen Absorptionsbanden bei 3430.5cm^{-1} , 3419.5cm^{-1} und 3380.5cm^{-1} bei den selben Frequenzen erscheinen, wie die Banden, die bei Konformer *a* beobachtet wurden. Als das Spektrum von Konformer *b* aufgenommen wurde, war der Analyselaser auf die Bande bei 34870cm^{-1} abgestimmt. Hier ist im UV-UV Doppelresonanzspektrum von Konformer *a* eine sehr schwache, breite Absorption zu erkennen (s. Abbildung 4.15). Es ist also möglich, dass die drei oben beschriebenen Banden ein schwacher Beitrag von Konformer *a* zu dem IR-Spektrum von Konformer *b* ist. Unter den verbleibenden vier Absorptionsbanden sind zwei intensive Banden bei 3388cm^{-1} und 3395cm^{-1} und zwei intensitätschwache Banden bei 3375.5cm^{-1} und 3411.5cm^{-1} zu erkennen. Die beiden intensiven Banden werden den beiden Peptid-NH-Streckschwingungen zugeordnet. Die sehr ähnlichen Frequenzen dieser beiden Banden weisen auf eine ähnliche chemische Umgebung im Molekül hin. Es sind zwei mögliche Interpretationen der beiden intensitätschwachen Banden denkbar: entweder sind sie die Peptid-NH-Streckschwingungen von einem weiteren Konformer, das ebenfalls bei 34870cm^{-1} eine schwache Absorption hat, oder es könnten die ersten Obertöne der Peptid-C=O-Streckschwingungen sein, die zwar normalerweise schwach sind, durch eine Fermiresonanz mit der $\nu(\text{NH})$ aber an Intensität gewinnen. Im unteren Teil in Abbildung 4.17 sind acht stark vereinfachte Konfigurationen eines Peptidrückgrates von Trp-Gly-Gly dargestellt, denen eine Carboxylgruppe in *syn*-Konfiguration gemeinsam ist. In den Strukturen 5, 6, 9 und 10 geht die NH-Bindung der ersten Peptidgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit der C=O Bindung der zweiten Peptidbindung ein. Ansonsten unterscheiden sich die Strukturen lediglich durch die genaue Anordnung der COOH-Gruppe und der NH_2 -Gruppe. Eine Wasserstoffbrückenbindung wie in den Strukturen 5, 6, 9 und 10 in Abbildung 4.17 würde bedeuten, dass die beiden Peptid-NH-Bindungen in deutlich unterschiedlicher chemischer Umgebung sind und daher unterschiedlichere Frequenzen aufweisen würden, als das beobachtet wird. Die Frequenzen der NH-Streckschwingungen der Peptidbindungen von Konformer *b* erscheinen im selben Frequenzbereich, wie die Peptid NH-Streckschwingungen der beiden Dipeptide Trp-Gly und Gly-Trp. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass

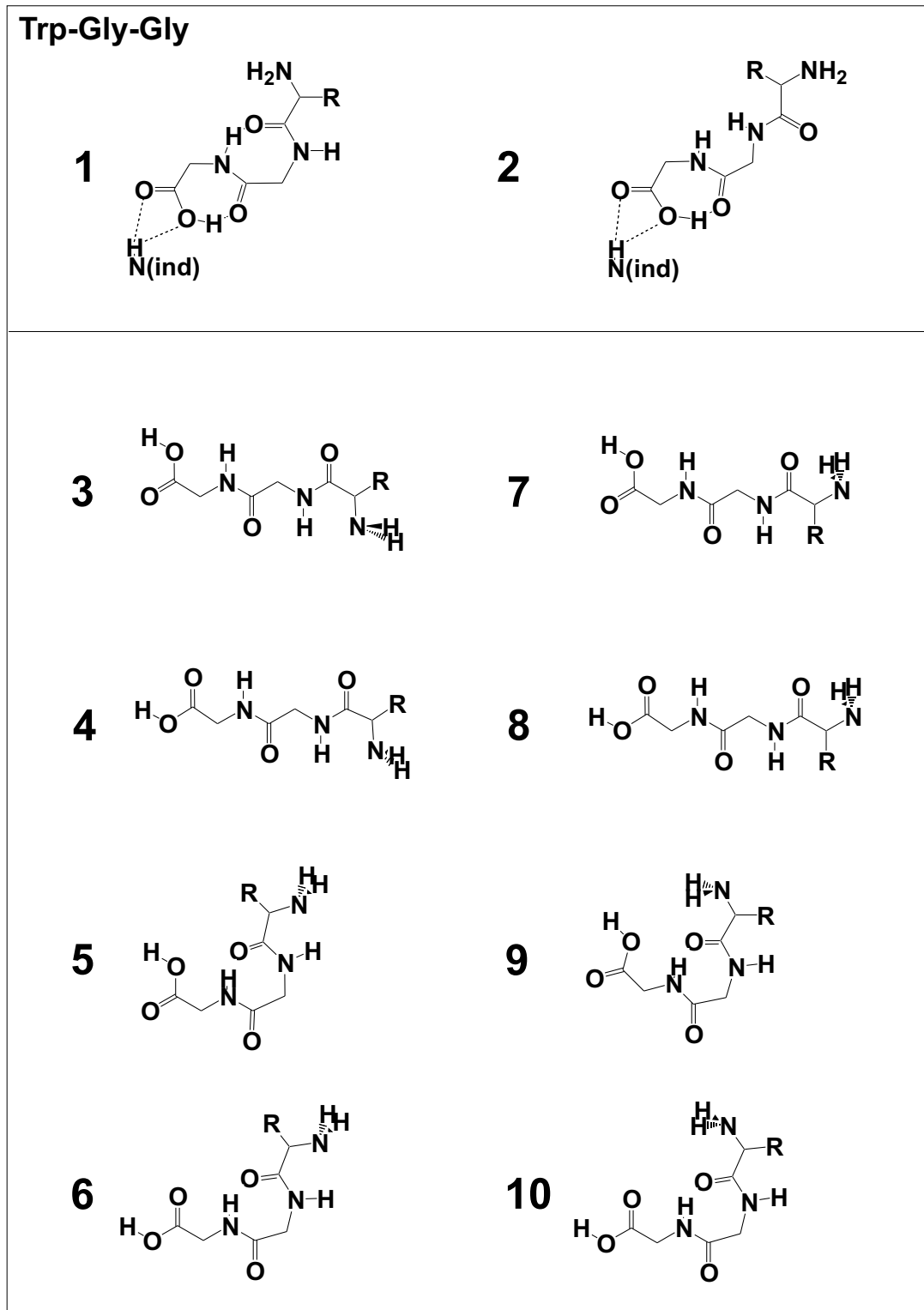


Abbildung 4.17: Mögliche Konformationen des Peptidrückgrates Von Trp-Gly-Gly (R=CH₂-Indol).

die Peptid-NH-Bindung, die nahe dem N-terminalen Ende ist, (NH(1) in Abbildung 4.19) in einer Wasserstoffbrücke mit der NH₂-Gruppe gebunden ist (NH...NH₂), wie das auch in Trp-Gly und Gly-Trp der Fall ist. Die zweite NH-Bindung (NH(2) in Abbildung 4.19) könnte an einer Wechselwirkung mit dem Indolring beteiligt sein und ihre Schwingung daher eine ähnliche, aber etwas schwächere Rotverschiebung als die NH(1)-Streckschwingung erfahren. In Abbildung 4.18 werden die experimentellen Spektren von Konformer *a* und *b* mit den berechneten Spektren von 8 verschiedenen Konformeren verglichen. Die zugehörigen, berechneten Strukturen sind in Abbildung 4.19 dargestellt. Die Peptidrückgrate der berechneten Strukturen ähneln denen der Strukturen, die in Abbildung 4.17 vorgestellt wurden. Die Strukturen A, B, E und H haben alle eine Rückfaltung der Tryptophanseitenkette zum Peptidrückgrat und eine Bindung zwischen der NH-Bindung des Indolrings und der COOH-Gruppe gemeinsam. Die berechneten Spektren der Strukturen B, E und H sind dem experimentellen Spektrum von Konformer *a* ähnlich. Dennoch ist es auch nach einem Vergleich zwischen den berechneten und den experimentellen Spektren nicht möglich, eine eindeutige Zuordnung der beobachteten Absorptionsbanden zu treffen. Im Fall von Konformer *b* passen die berechneten Spektren der Strukturen D und G am besten zu dem experimentellen Spektrum. Beide Strukturen sind gestreckt. Es ist jedoch auch hier nicht möglich zu entscheiden, ob eine der beiden Strukturen im Molekularstrahl beobachtet werden kann, oder ob es eine ähnliche dritte Struktur ist.

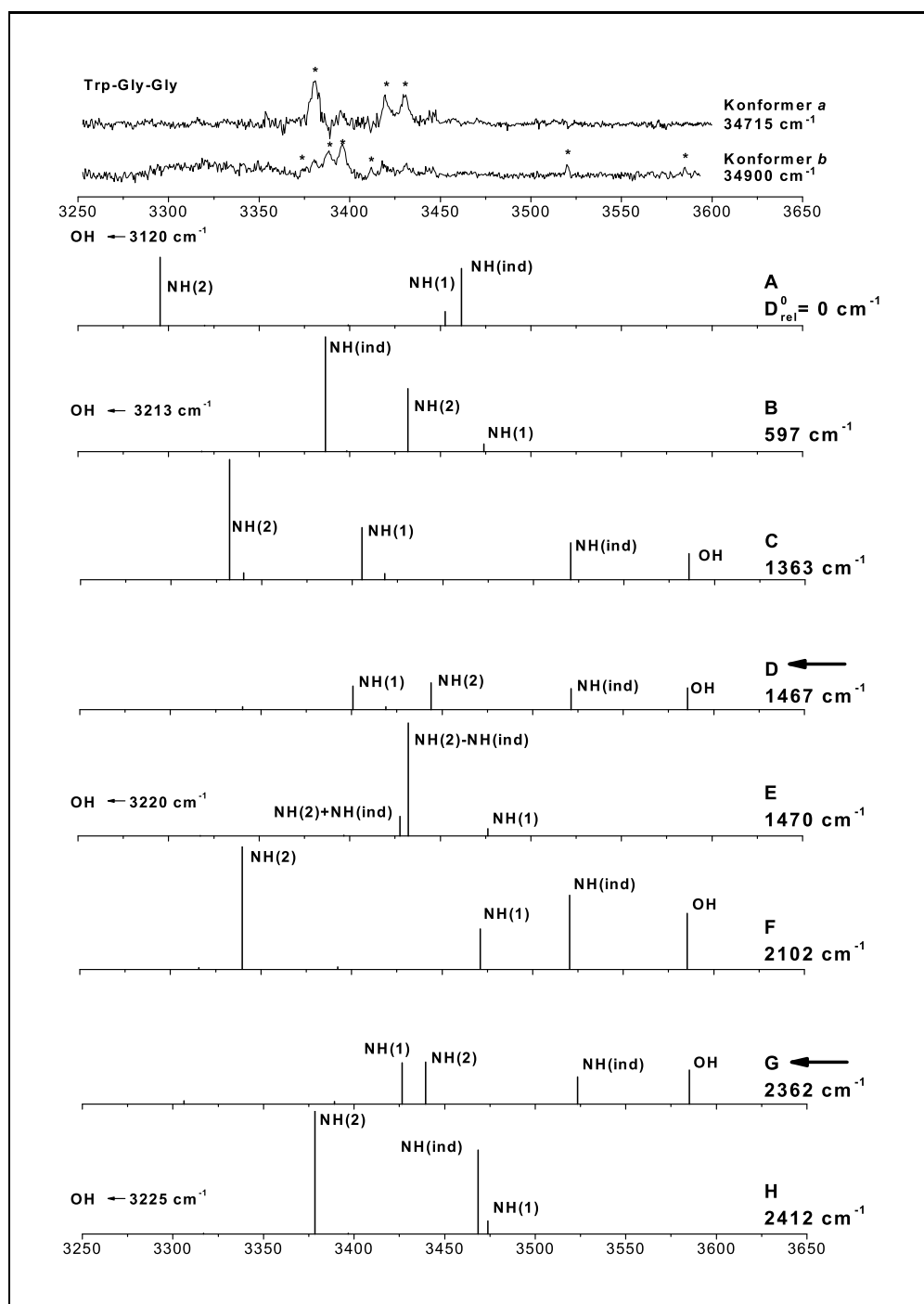


Abbildung 4.18: IR-UV Doppelresonanzspektren von Trp-Gly-Gly im Vergleich mit den harmonischen Frequenzen von acht verschiedenen Konformeren, die auf DFT B3LYP 6-31G(d,p) Niveau berechnet wurden. Die zugehörigen Strukturen sind in Abbildung 4.19 zu sehen. Die Spektren sind nach den relativen Energien D_0^{rel} (ZPE korrigiert) der Konformere geordnet. Die harmonischen Frequenzen wurden mit einem Skalierungsfaktor von 0.9546 angepaßt. Die berechneten Spektren, die am besten das experimentelle Spektrum von Konformer *b* wiedergeben, sind mit Pfeilen markiert.

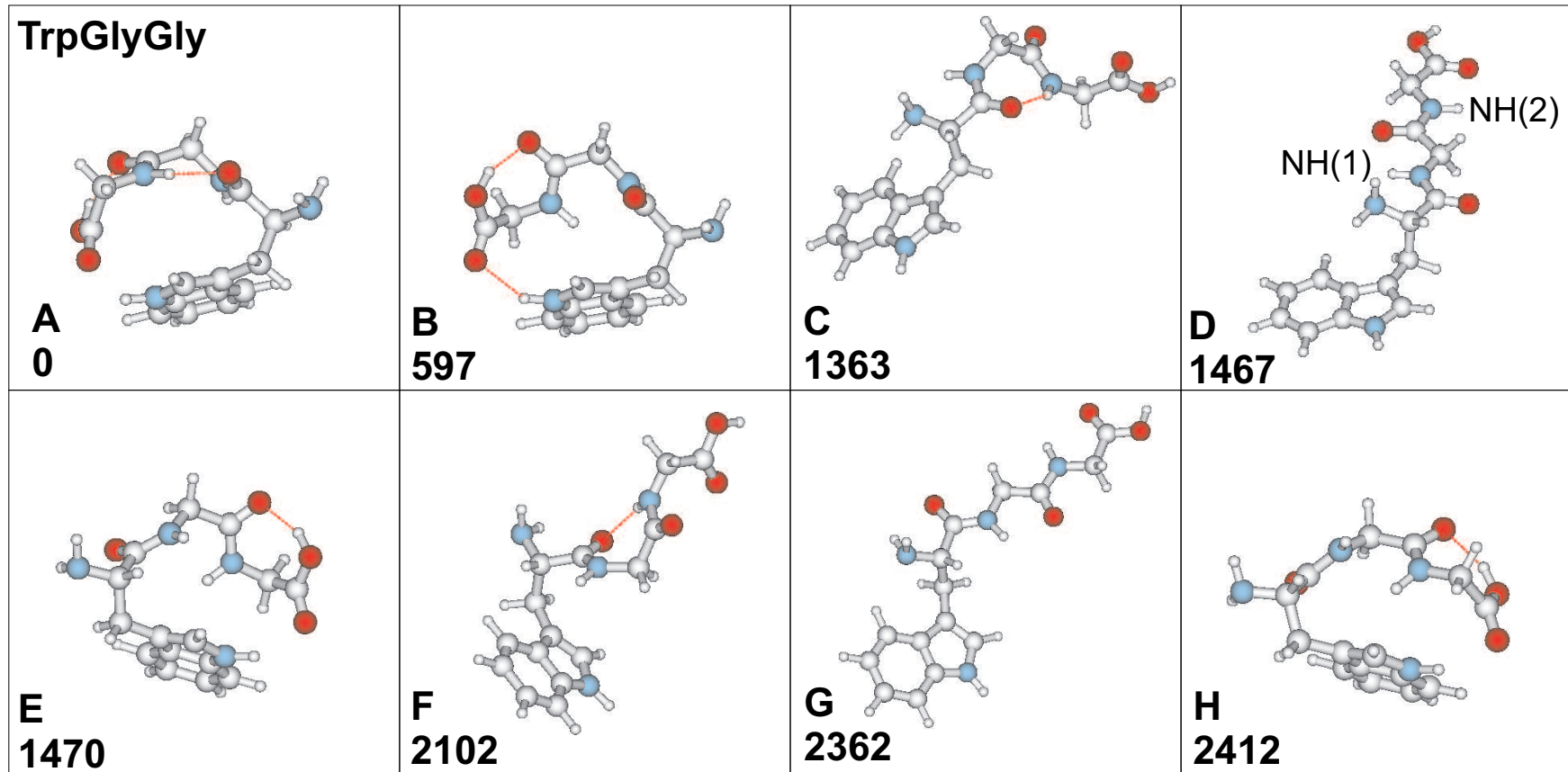


Abbildung 4.19: Strukturen von Trp-Gly-Gly auf DFT B3LYP 6-31G(d,p) Niveau gerechnet. Neben den Strukturen sind die relativen Energien D_0^{rel} gegeben, die um die Nullpunktenergie korrigiert wurden.

4.3 Trp-OEt

Das REMPI-Spektrum und die UV-UV Doppelresonanzspektren von Trp-OEt sind in Abbildung 4.20 dargestellt. Die Spektren zeigen, dass es drei verschiedene Konformere im Molekularstrahl gibt, die im untersuchten Spektralbereich von 34300 bis 35600 cm^{-1} absorbieren. Das Spektrum des ersten Konformers ist am intensivsten und beginnt bei 34808 cm^{-1} . Die ersten Banden des zweiten und dritten Konformers sind um 72 cm^{-1} (Abb. 4.20, Spur *b*) bzw. 101 cm^{-1} (Abb. 4.20, Spur *c*) blau dazu verschoben. Die Spektren der ersten beiden Konformere zeigen eine kurze harmonische Progression mit 33 cm^{-1} Abständen. Konformer *a* hat weitere, niederfrequente Schwingungen bei 54 und 70 cm^{-1} , Konformer *b* bei 43 cm^{-1} und Konformer *c* bei 23 und 50 cm^{-1} . Solche Schwingungen resultieren aus einer Torsion des Indolsystems gegen die Seitenkette.

Simons et al.⁷³ haben mit Hilfe von UV-UV- und IR-UV Doppelresonanzspektroskopie gezeigt, dass von Tryptophan sechs Konformere im Molekularstrahl existieren. Zwei davon zeigen eine Stabilisierung durch eine OH \rightarrow NH₂ Wechselwirkung und zeigen rot verschobene, breite OH Streckschwingungen der OH...N Wasserstoffbrücke, während die anderen vier Konformere unter anderem durch eine verzweigte NH₂ \rightarrow O-Bindung stabilisiert sind und eine freie OH-Streckschwingung bei hohen Frequenzen aufweisen. Eines dieser vier Konformere ist jedoch sehr intensitätsschwach und nur schwer zu identifizieren.

In Trp-OEt ist die OH \rightarrow NH₂ Wechselwirkung durch die Ethylsubstitution blockiert und die entsprechenden Konformere sollten daher nicht zu dem Trp-OEt REMPI-Spektrum beitragen. Die drei Konformere sind also wahrscheinlich Anordnungen, die durch NH₂ \rightarrow C=O und/oder NH₂ \rightarrow O-Et Wechselwirkungen stabilisiert werden und in denen die Seitenkette über dem Fünfring des aromatischen Systems oder dem Sechsring angeordnet ist.

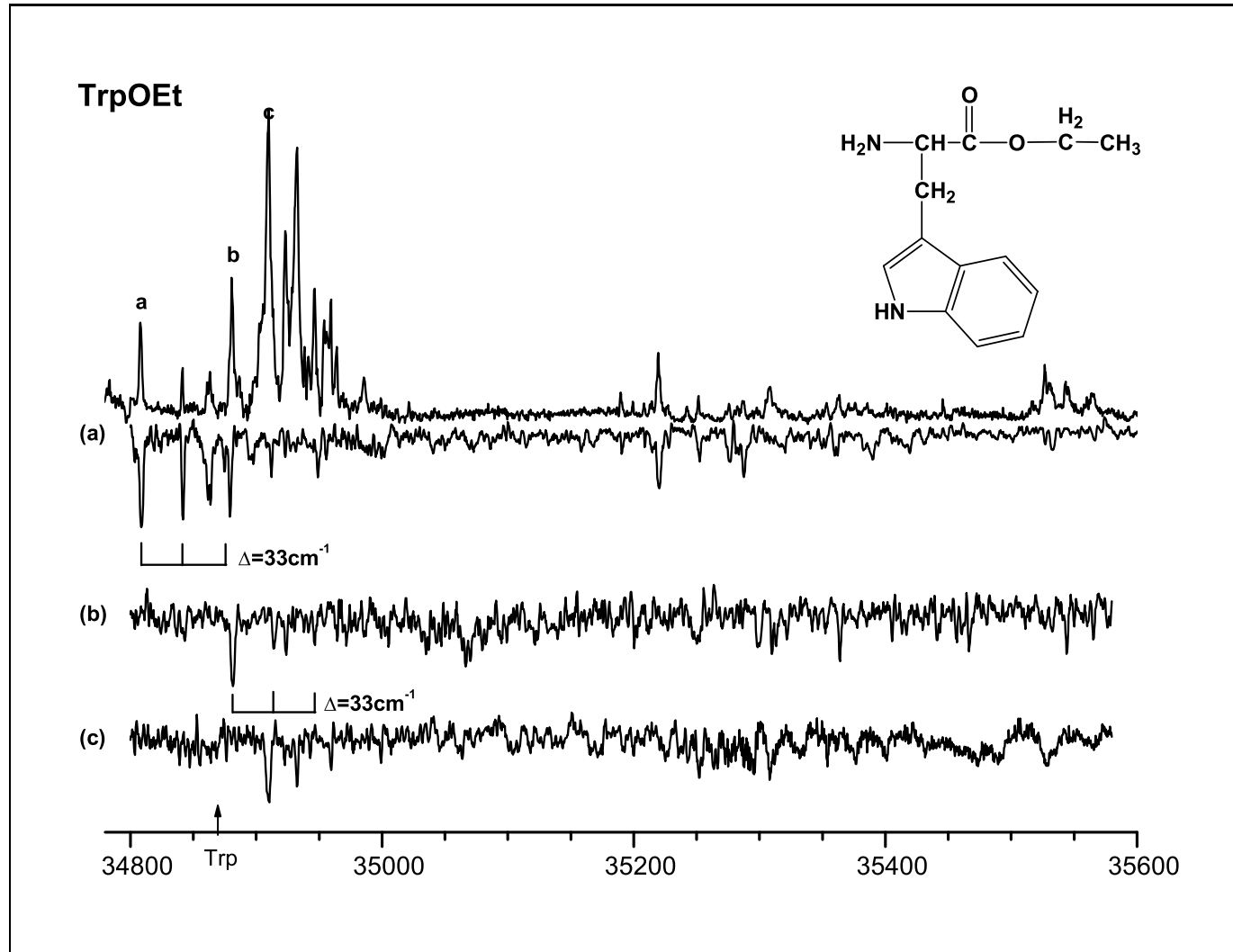


Abbildung 4.20: REMPI-Spektrum von Trp-OEt, was auf der Muttermasse von 232 Dalton aufgenommen wurde. Die Spuren (a) (b) und (c) sind die UV-UV Doppelresonanzspektren, bei denen der Analyselaser auf die Banden abgestimmt wurde, die im REMPI-Spektrum mit *a*, *b* bzw. *c* bei 34809cm^{-1} , 34881cm^{-1} bzw. 34911cm^{-1} markiert sind.

4.4 Andere Peptide

4.4.1 UV-UV Doppelresonanzspektroskopie an Trp-Ser

Die niederfrequente Bande im REMPI-Spektrum von Trp-Ser (Abbildung 4.21) erscheint bei 34549cm^{-1} . Dies entspricht dem typischen Verhalten eines tryptophanenthaltenden Peptides mit N-Terminus, was von Levy und Mitarbeitern^{26,28} für Trp-Gly und Trp-Gly-Gly gefunden wurde. Die UV-UV-SHB-Spektren, Spuren *a* und *b* in Abbildung 4.21 zeigen, dass es zwei verschiedene Konformere im Molekularstrahl gibt, die im untersuchten Frequenzbereich von $34300\text{-}35000\text{cm}^{-1}$ absorbieren. In beiden Konformerspektren sind harmonische Schwingungsprogressionen vorhanden, die im ersten Konformer 27cm^{-1} Abstände haben (Spur *a* in Abbildung 4.21) und 17cm^{-1} im zweiten Konformer. Die beiden Konformerspektren sind um 154cm^{-1} zueinander verschoben.

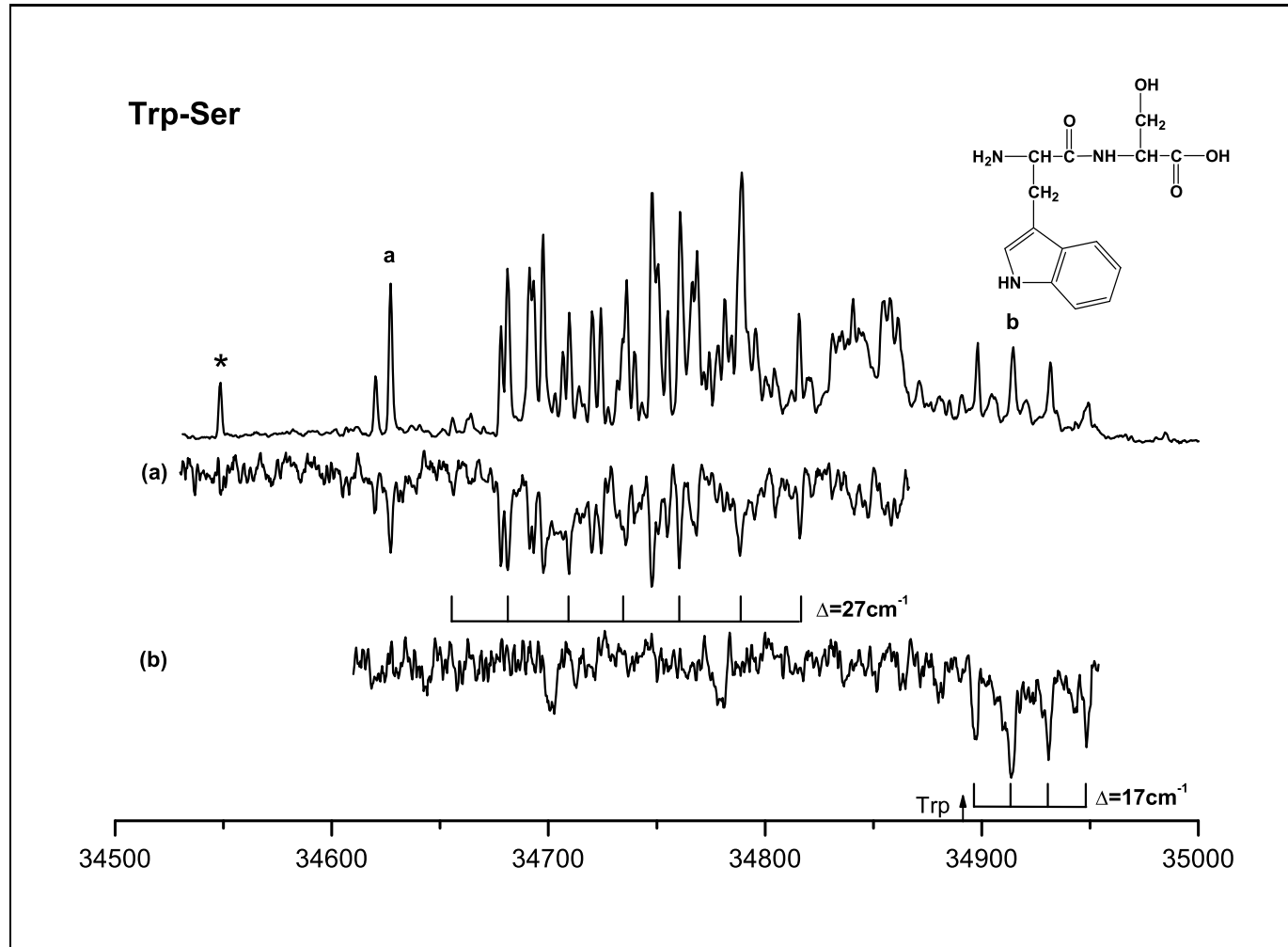


Abbildung 4.21: REMPI-Spektrum von Trp-Ser, das auf der Muttermasse von 291.3 Dalton aufgenommen wurde. Die Spuren (a) und (b) sind die UV-UV Doppelresonanzspektren, bei denen der Analyselaser auf die Banden abgestimmt wurde, die im REMPI-Spektrum mit *a* bzw. *b* bei 34549 bzw. 34703 cm⁻¹ markiert sind. Die Bande, die mit einem Stern markiert ist, gehört zu Konformer *a*.

4.4.2 UV-UV Doppelresonanzspektroskopie an Pro-Trp

Das REMPI-Spektrum und die UV-UV-SHB-Spektren von Pro-Trp, die in Abbildung 4.22 dargestellt sind, zeigen, dass es zwei verschiedene Konformere im Molekularstrahl gibt, die im untersuchten Wellenzahlenbereich von $34650\text{-}35100\text{cm}^{-1}$ absorbieren. Die niederfrequenteste Bande von Konformer *a* ist bei 34693cm^{-1} , während die von Konformer *b* um 164cm^{-1} zu 34857cm^{-1} verschoben ist. Das Spektrum von Konformer *a* enthält eine Schwingungsprogression mit 20cm^{-1} Abständen.

Alles in allem ist eine starke Abnahme der Anzahl an Konformeren im Molekularstrahl zu beobachten, wenn man von Trp (6 Konformere) über Trp-OEt (drei Konformere) zu Dipeptiden (zwei Konformere bei Trp-Ser, Gly-Trp und Trp-Ser) geht, abgesehen von der Ausnahme Trp-Gly, das mindestens vier Konformere im Molekularstrahl hat.

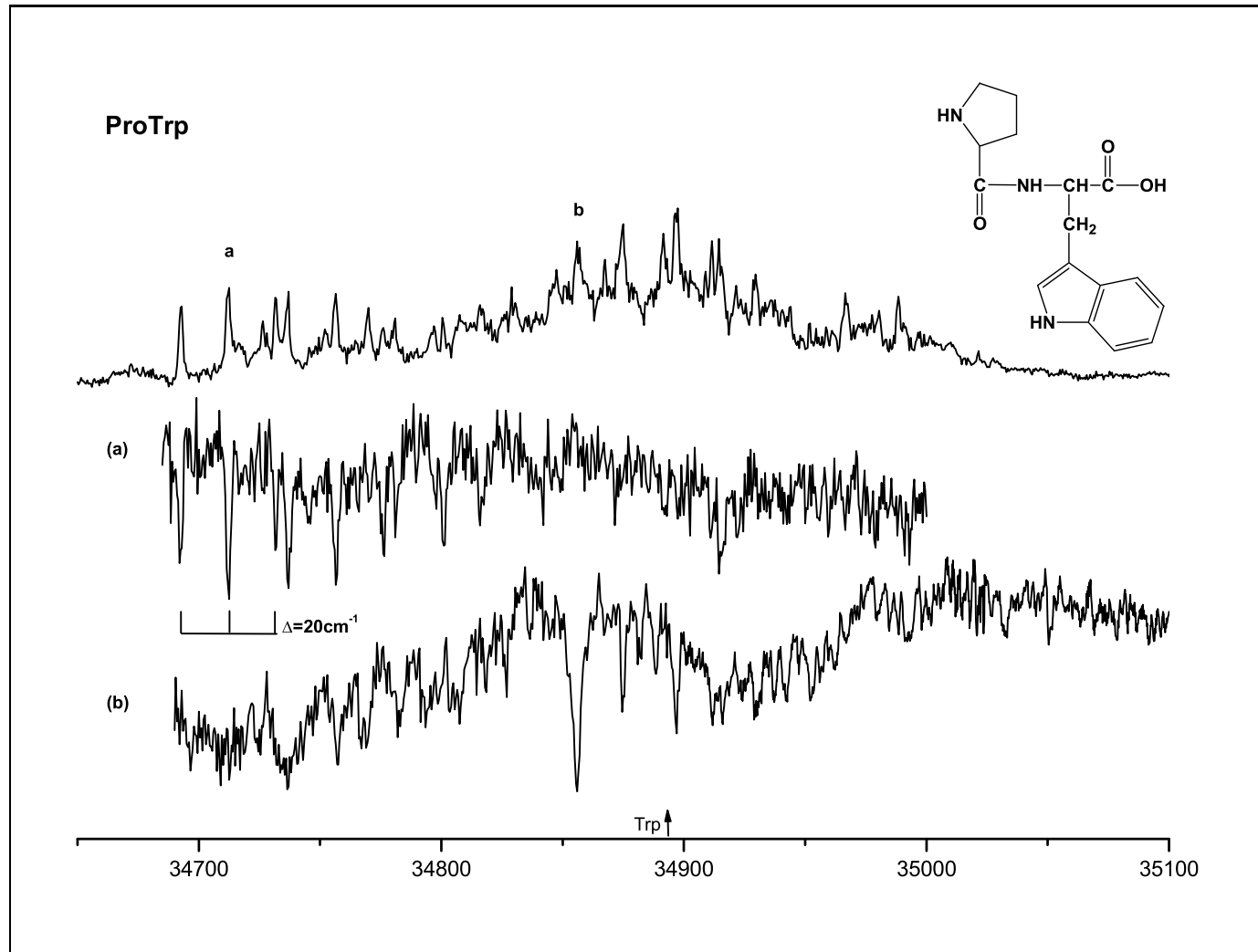


Abbildung 4.22: REMPI-Spektrum von Pro-Trp, das auf der Muttermasse von 301 Dalton aufgenommen wurde. Die Spuren (a) und (b) sind die UV-UV Doppelresonanzspektren, bei denen der Analyselaser auf die Banden abgestimmt wurde, die im REMPI-Spektrum mit *a* bzw. *b* bei 34693 bzw. 34857 cm⁻¹ markiert sind.

4.4.3 REMPI-Spektroskopie an Gly-Trp-Gly

Gly-Trp-Gly ist das einzige der untersuchten Peptide, in dem das Tryptophan weder N-Terminus, noch der Säure-Terminus des Peptides ist. Im allgemeinen wird beobachtet, dass die vibronischen Spektren von Peptiden, bei denen das Tryptophan am N-terminalen Ende ist (Trp-X), im Vergleich zum Spektrum von Trp eine Rotverschiebung aufweisen. So sind die ersten Absorptionsbanden von Trp-Gly, Trp-Gly-Gly und Trp-Ser bei 34490, 34549 bzw. 34535 cm^{-1} , während die von Trp bei 34873 cm^{-1} ⁷³ liegt. Dahingegen sind die Spektren der Peptide, bei denen das Tryptophan säureterminal (X-Trp) ist, nur wenig rot verschoben. So haben zum Beispiel Gly-Trp und Pro-Trp bei 34715 bzw. 34693 cm^{-1} ihre ersten Absorptionsbanden. Gly-Trp-Gly, dessen erste Absorptionsbande bei 34720 cm^{-1} ist (vgl. Abbildung 4.23), verhält sich also diesbezüglich wie ein Peptid, dessen Tryptophan nicht N-terminal ist. Desweiteren weist das vibronische Spektrum von Gly-Trp-Gly ein Merkmal auf, welches typisch für tryptophanenthaltende Peptide ist: Es gibt eine harmonische Schwingungsprogression von 19 cm^{-1} , die auch im Spektrum eingezeichnet ist.

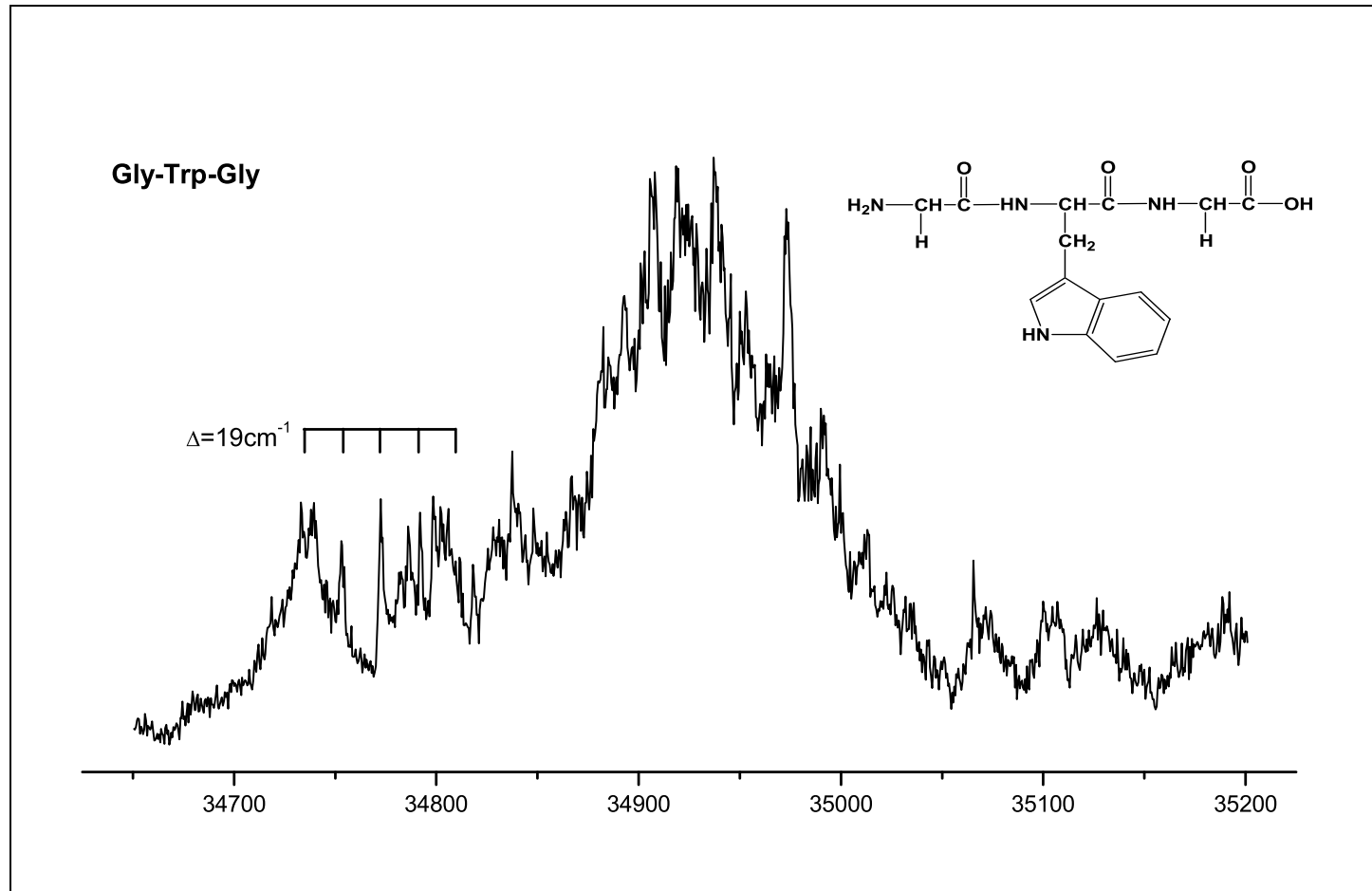


Abbildung 4.23: REMPI-Spektrum vom Tripeptid Gly-Trp-Gly

Kapitel 5

Zusammenfassung

Das Kernthema dieser Arbeit war es eine neue Laserdesorptionsquelle aufzubauen und in die im Institut bestehenden Molekularstrahlapparaturen mit Flugzeitmassenspektrometern zu integrieren. Die erfolgreichste der erprobten Methoden war dabei die Laserdesorption mit der Fundamentalen eines Nd:YAG Lasers (1064nm) von einer harten Graphitoberfläche. Mit diesem Konzept wurde eine Schuss-zu-Schussstabilität von 80% und eine gute Langzeitstabilität erreicht. Zahlreiche vibronische Spektren sowie IR-UV Doppelresonanzspektren zeigten, dass die Kühlung der laserdesorbierten Moleküle durch den Molekularstrahl sehr gut war. Beispielsweise betragen sowohl die Linienbreite der Übergänge im Grundzustand (NH- und OH-Streckschwingungen), als auch die der vibronischen Übergänge von Trp-Gly 2cm^{-1} .

Mit Hilfe der neuen Laserdesorptionsquelle wurden die IR-UV Doppelresonanzspektren der Dipeptide Trp-Gly, Gly-Trp und des Tripeptides Trp-Gly-Gly im Bereich der OH und NH-Streckschwingungen aufgenommen. Anhand des Vergleichs mit den Spektren von Tryptophan und NATMA im gleichen Wellenlängenbereich konnten die Schwingungsbanden zugeordnet werden. Mit Hilfe von *ab initio*-Rechnungen auf DFT B3LYP 6-31G(d,p) Niveau konnten die Strukturen der Peptidrückgrate bestimmt oder weitgehend eingegrenzt werden.

Von Trp-Gly gab es mindestens vier Konformere im Molekularstrahl, jedoch konnte nur von einem, nämlich von Konformer *a*, ein genügend intensives IR-UV Doppelresonanzspektrum aufgenommen werden. Das Rückgrat dieses Konformers wies eine

NH...NH₂ Wasserstoffbrücke auf und hatte abgesehen davon eine gestreckte Struktur. Von Gly-Trp wurden zwei verschiedene Konformere im Molekularstrahl beobachtet. Das Rückgrat von Konformer *b* war abgesehen von einer NH...NH₂ Wasserstoffbrückenbindung gestreckt, während das Rückgrat von Konformer *a* von Gly-Trp eine starke OH...O=C Wasserstoffbrücke zeigte. In einem der beiden Konformere von Trp-Gly-Gly, die im Molekularstrahl beobachtet wurden, war die OH-Gruppe der Carboxylgruppe in einer starken Wasserstoffbrücke mit einer Peptid-C=O-Gruppe gebunden. Außerdem war die Indol-NH-Bindung an einer Wechselwirkung mit der COOH-Gruppe beteiligt, so dass das Peptidrückgrat zum Indol hin gefaltet war. Das zweite Konformer von Trp-Gly-Gly war weitgehend ungefaltet, es wies jedoch, wie alle Konformere von Gly-Trp und Trp-Gly auch, eine NH...NH₂ Wasserstoffbrücke auf.

Die REMPI- und UV-UV Doppelresonanzspektren von Trp-Gly, Gly-Trp, Trp-Ser und Pro-Trp wurden im Bereich von 34400 bis 35000cm⁻¹ aufgenommen. Das REMPI-Spektrum von Trp-Gly wurde dabei mit höherer Auflösung aufgenommen, als es der Arbeitsgruppe von Levy in den achtziger Jahren möglich war. Diese und die neu gewonnene Information aus den UV-UV Doppelresonanzspektren ermöglichten es, die niederfrequenten, harmonischen Schwingungsprogressionen des Moleküls neu zu interpretieren und den Ursprung des Konformers zuzuordnen.

Die neu gefundenen Spektren von Trp-Ser und Pro-Trp zeigten, dass es jeweils zwei verschiedene Konformere von beiden Peptiden im Molekularstrahl gab. Das REMPI-Spektrum von Trp-Ser war typisch für Trp-enthaltende Peptide, bei denen das Trp in der N-terminalen Position (Trp-X) ist: Die niederfrequenteste Bande von Trp-Ser war etwa 200cm⁻¹, im Vergleich zum Ursprung des Konformers A von Trp, rotverschoben. Das REMPI-Spektrum von Pro-Trp hingegen war nur wenige Wellenzahlen zum Ursprung von Tryptophan verschoben, was typisch für das Spektrum eines Di-peptides mit Tryptophan in der C-terminalen Position (X-Trp) ist.

Literaturverzeichnis

- [1] L. P. Levine, J. F. Ready, and E. Bernal G. Gas desorption produced by a giant pulse laser. *J. Appl. Phys.*, 38(1):331–336, 1967.
- [2] M. A. Posthumus, P. G. Kistemaker, and H. L. C. Meuzelaar. Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules. *Anal. Chem.*, 50:985–991, 1978.
- [3] M.Karas und D.Bachmann und U.Bahr und F.Hillenkamp. *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes*, 78:53, 1987.
- [4] R.J.Levis. *Annu. Rev. Chem.*, 45:483, 1994.
- [5] P.A.Limbach. *Spectroscopy*, 13:16, 1998.
- [6] J.Gross and K. Strupat. *Trend. Anal. Chem.*, 17:470, 1998.
- [7] K.J.Wu and R.W.Odom. *Anal. Chem.*, 70:456A, 1998.
- [8] H.D.Beckey. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, 2:500, 1969.
- [9] B. Lindner and U. Seydel. *Anal. Chem.*, 57:895, 1985.
- [10] R.D.Macfarlane. Particle-induced desorption mass spectrometry of large involatile biomolecules: surface chemistry in high-energy-short-time domain. *Acc. Chem. Res.*, 15:268, 1982.
- [11] M.Yamashita and J.B.Fenn. *J. Phys. Chem*, 88:4451, 1984.
- [12] C.H.Blakeley and M.V.Vastal. *Anal. Chem.*, 55:750, 1983.
- [13] D. S. Nagra, J-Y Zhang, and Liang Li. Pulsed rapid heating method for volatilization of biological molecules in multiphoton ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 63:2188–2193, 1991.

- [14] D. S. Nagra, J-Y Zhang, and Liang Li. Multiphoton ionization study of water and ammonia elimination from dipeptides with pulsed rapid heating and laser desorption for sample vaporization. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 116:127, 1992.
- [15] T. G. Diez, M. A. Duncan, D. E. Powers, and R. E. Smalley. Laser production of supersonic metal cluster beams. *J. Chem. Phys.*, 74:6511–6512, 1981.
- [16] V. E. Bondybey and J. H. English. Laser induced fluorescence of metal clusters produced by laser vaporization: Gas phase spectrum of pb_2 . *J. Chem. Phys.*, 74:6978–6979, 1981.
- [17] H. v. Weyssenhoff, H. L. Selzle, and E. W. Schlag. Laser-desorbed large molecules in a supersonic jet. *Z. Naturforsch. A*, 40:674–676, 1985.
- [18] H.L.Selzle and E.W.Schlag. BRD Patent nr. P32. 24 801.6-09, 1886.
- [19] J. Grotemeyer, U. Boesl, K. Walter, and E. W. Schlag. Biomolecules in the gas phase. 1. Multiphoton-ionization mass spectrometry of native chlorophylls. *J. Am. Chem. Soc.*, 108:4233–4234, 1986.
- [20] J. Grotemeyer, U. Boesl, K. Walter, and E. W. Schlag. Biomolecules in the gas phase. 2. Multiphoton-ionization mass spectrometry of angiotensin. *Org. Mass Spectr.*, 21:595–597, 1986.
- [21] J. Grotemeyer, U. Boesl, K. Walter, and E. W. Schlag. A general soft ionization method for mass spectrometry: resonance enhanced multi-photon ionization of biomolecules. *Org. Mass Spectr.*, 21:645–653, 1986.
- [22] J. Grotemeyer and E. W. Schlag. Die Multiphotonen-Ionisations (MUPI)-Massenspektrometrie. *Angew. Chem.*, 100:461–474, 1988.
- [23] J. Grotemeyer and E. W. Schlag. Biomolecules in the gas phase: Multiphoton ionization mass spectrometry. *Acc. Chem. Res.*, 22:399–406, 1989.
- [24] R. Tembreull and D. M. Lubman. Resonant two-photon ionization of small peptides using pulsed laser desorption in supersonic beam mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 59:1003–1006, 1987.
- [25] R. Tembreull and D. M. Lubman. Pulsed laser desorption with resonant two photon ionization detection in supersonic beam mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 58:1299, 1986.
- [26] J. R. Cable, M. J. Tubergen, and D. H. Levy. Electronic spectroscopy of small tryptophan peptides in supersonic molecular beams. *J. Am. Chem. Soc.*, 110:7349–7355, 1988.

- [27] J. R. Cable, M. J. Tubergen, and D. H. Levy. Laser desorption molecular beam spectroscopy: the electronic spectra of tryptophan peptides in the gas phase. *Chem. Phys. Lett.*, 110:7349–7355, 1988.
- [28] J. R. Cable, M. J. Tubergen, and D. H. Levy. The electronic spectra of small peptides in the gas phase. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 86:143–152, 1988.
- [29] L. Liang and D. M. Lubman. Pulsed laser desorption method for volatilizing thermally labile molecules for supersonic jet spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, 59(4):557–561, 1988.
- [30] E. Nir, E. Hunziker, and M. S. de Vries. Fragment-free mass spectrometric analysis with jet cooling/VUVphotoionization. *Anal. Chem.*, 71:1674–1678, 1999.
- [31] E. Nir, K. Kleinermanns, L. Grace, and M. S. de Vries. Pairing of isolated nucleic-acid bases in the absence of the DNA backbone. *Nature*, 408:949–951, 2000.
- [32] E. Nir, L. Grace, K. Kleinermanns, and M. S. de Vries. On the photochemistry of purine nucleobases. *J. Phys. Chem. A*, 105(21):5106–5110, 2001.
- [33] E. Nir, P.Imhof, K. Kleinermanns, and M. S. de Vries. Guanine tautomerism revealed by uv hole burning spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, 115:4604, 2001.
- [34] E. Nir, C.Plützer, K. Kleinermanns, and M. S. de Vries. Properties of isolated dna bases, base pairs and nucleosides examined by laser spectroscopy. *Eur. Phys. J. D*, 20:317, 2002.
- [35] E. Nir, Chr.Janzen, P.Imhof, K. Kleinermanns, and M. S. de Vries. Pairing of the nucleobase guanine studied by ir-uv double-resonance spectroscopy and ab initio calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4:732, 2002.
- [36] E. Nir, Chr.Janzen, P.Imhof, K. Kleinermanns, and M. S. de Vries. Pairing of the nucleobase guanine and cytosine in the gas phase studied by ir-uv double-resonance spectroscopy and ab initio calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4:740, 2002.
- [37] E. Nir, I.Hünig, K. Kleinermanns, and M. S. de Vries. The nucleobase cytosine and the cytosine dimer investigated by double resonance laser spectroscopy and ab initio calculations. *submitted to J. Chem. Phys.*
- [38] E. Nir, I.Hünig, K. Kleinermanns, and M. S. de Vries. Conformers of guanosines and their vibrations in the electronic ground and excited state revealed by double resonance spectroscopy and ab initio calculations. *submitted to J. Am. Chem. Soc.*

- [39] E. Nir, P. Imhof, K. Kleineremanns, and M. S. de Vries. REMPI spectroscopy of laser desorbed guanosines. *Chem. Phys. Lett.*, 1998.
- [40] M. S. de Vries. Two step laser mass spectrometry. *Rev. Anal. Chem.*, 19(3-4):269–287, 2000.
- [41] F. Piuzzi, I. Dimicoli, M. Mons, B. Tardivel, and Q. Zhao. A simple laser vaporization source for thermally fragile molecules coupled to a supersonic expansion: application to the spectroscopy of tryptophan. *Chem. Phys. Lett.*, 320:282–288, 2000.
- [42] R. Weinkauff, P. Schanen, A. Metsala, E. W. Schlag, M. Bürgle, and H. Kessler. Highly efficient charge transfer in peptide cations in the gas phase: Threshold Effects and Mechanism. *J. Phys. Chem.*, 100:18567–18585, 1996.
- [43] R. Cohen, B. Brauer, E. Nir, L. Grace, and M. S. de Vries. Resonance-enhanced multiphoton ionization spectroscopy of dipeptides. *J. Phys. Chem.*, 104:6351–6355, 2000.
- [44] I. Hünig, K. Seefeld, and K. Kleineremanns. REMPI and UV-UV double resonance spectroscopy of tryptophan ethylester and the dipeptides tryptophan-serine, glycine-tryptophan and proline-tryptophan. *Chem. Phys. Lett.*, 369:173, 2003.
- [45] S. Nettesheim and R. Zenobi. Pulsed laser heating of surfaces: nanosecond timescale temperature measurement using black body radiation. *Chem. Phys. Lett.*, 255:39–44, 1996.
- [46] G. Meijer, M. S. de Vries, H. E. Hunziker, and H. R. Wendt. *Appl. Phys. B*, 51:395–403, 1990.
- [47] F. L. Plows and A. C. Jones. Laser-desorption supersonic jet spectroscopy of phthalocyanines. *J. Mol. Spectrosc.*, 194:163–170, 1999.
- [48] R. R. Lucchese and J. C. Tully. Laser induced thermal desorption from surfaces. *J. Chem. Phys.*, 81(12):6313–6319, 1984.
- [49] Conzemius and Cappelán. *Int. J. Mass. Spectr. Ion Phys.*, 34:197, 1980.
- [50] R. N. Zare and R. D. Levine. Mechanism for bond-selective processes in laser desorption. *Chem. Phys. Lett.*, 136(6):593–599, 1987.
- [51] M. Handshuh, S. Nettesheim, and R. Zenobi. Is laser heating advantageous for thermal desorption of large polar molecules? *J. Chem. Phys.*, 107:2603–2610, 1997.
- [52] M. Handschuh, S. Nettesheim, and R. Zenobi. Picosecond laser desorption kinetics of poly-(ethylene glycol). *Chem. Phys. Lett.*, 275:93–97, 1997.

- [53] J.C.Tully. *Surf. Sci.*, 299:667, 1994.
- [54] R. B. Hall. Pulsed-laser-induced desorption studies of the kinetics of surface reactions. *J. Phys. Chem.*, 91:1007–1015, 1987.
- [55] R.Weinkauff. private communication.
- [56] W. Demtröder. *Laserspektroskopie: Grundlagen und Techniken*. Springer-Verlag, dritte Auflage, 1993.
- [57] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery Jr., R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, A.G. Baboul, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, and E.S. Replogle und J.A. Pople. Gaussian 98, revision a.7. *Gaussian Inc*, 1998. Pittsburgh PA.
- [58] W. Kohn P. Hohenberg. Inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev.*, 136(3B):B864–B871, 1964.
- [59] B.O.Roos and P.O.Widmark. *European Summerschool of Quantum Chemistry 2003*. Lund University, 2003.
- [60] L.J. Sham W. Kohn. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Phys. Rev.*, 140(4A):A1133–A1138, 1965.
- [61] P.W. Atkins and R.S. Fiedman. *Molecular Quantum Mechanics, Third Edition*. Oxford University Press, 1997.
- [62] A.D. Becke. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A*, 38(6):3098–3100, 1988.
- [63] W. Yang und R.G. Parr C. Lee. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, 37(2):785–789, 1988.
- [64] R. Colle and O.Salvetti. *Theor. Chim. Acta*, 37:329, 1975.
- [65] S.J. Vosko, L. Wilk, and M. Nusair. *Can. J. Phys.*, 58:1200, 1980.

- [66] M.W. Schmidt, K.K. Baldrige, J.A. Boatz, J.H. Jensen, S. Koseki, M.S. Gordon, K.A. Nguyen, and T.L. Windus und S.T. Elbert. Berny optimization. *QCPE Bulletin*, 10:52–62, 1990.
- [67] M. Gerhards. Struktur und Schwingungen von Hydroxyaromaten und deren wasserstoffbrückengebundenen Clustern. *Dissertation*, 1995. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [68] J. D. Greybeal. *Molecular Spectroscopy*. 1988.
- [69] P. A. Gorry. *BASIC molecular spectroscopy*. 1985.
- [70] J.W. Ochterski. Vibrational analysis in gaussian. <http://www.gaussian.com>, 1999.
- [71] T. R. Rizzo, Y. D. Park, L. A. Peteanu, and D. H. Levy. The electronic spectrum of the amino acid tryptophan in the gas phase. *J. Chem. Phys.*, 84(5):2534–2541, 1986.
- [72] L. A. Philips, S. P. Webb, S. J. Martinez 111, G. R. Fleming, and D. H. Levy. Time-resolved spectroscopy of tryptophan conformers in a supersonic jet. *J. Am. Chem. Soc.*, 110:1352–1355, 1988.
- [73] L. C. Snoek, R. T. Kroemer, M. R. Hockridge, and J. P. Simons. Conformational landscapes of aromatic amino acids in the gas phase: infrared and ultraviolet ion dip spectroscopy of tryptophan. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3(10):1819–1826, 2001.
- [74] A. Lindinger, J. P. Toennies, and A. F. Vilesov. High resolution vibronic spectra of the amino acids tryptophan and tyrosine in 0.38 k cold helium droplets. *J. Chem. Phys.*, 110(3):1429–1436, 1999.
- [75] S. J. Martinez, J. C. Alfano, and D. H. Levy. The electronic spectroscopy of the amino acids tyrosine and phenylalanine in a supersonic jet. *J. Mol. Spec.*, 156:421–430, 1992.
- [76] L. C. Snoek, E. G. Robertson, R. T. Kroemer, and J. P. Simons. Conformational landscapes in amino acids: Infrared and ultraviolet ion-dip spectroscopy of phenylalanine in the gas phase. *Chem. Phys. Lett.*, 321:49–56, 2000.
- [77] L. C. Snoek, R. T. Kroemer, and J. P. Simons. A spectroscopic and computational exploration of tryptophan-water cluster structures in the gas phase. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4:2130–2139, 2002.
- [78] M. Gerhards and C. Unterberg. Structures of the protected amino acid Ac-Phe-OMe and its dimer: A beta-sheet model system in the gas phase. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4(10):1760–1765, 2002.

- [79] M. Gerhards, C. Unterberg, and A. Gerlach. Structure of a beta-sheet model system in the gas-phase: Analysis of the c=O stretching vibration. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4:5563, 2002.
- [80] Brian C. Dian, A. Longarte S. Mercier, D.A. Evans, D.J. Wales, and Timothy S. Zwier. The infrared and ultraviolet spectra of single conformations of methyl-capped dipeptides: NATMA and NATA. *J. Chem. Phys.*, 117(23):10688, 2002.
- [81] Brian C. Dian, Asier Longarte, and Timothy S. Zwier. Hydride stretch infrared spectra in the excited electronic states of indole and its derivatives: Direct evidence for the $\pi\sigma^*$ state. *J. Chem. Phys.*, 118(6):2696, 2003.
- [82] C. Unterberg, A. Gerlach, T. Schrader, and M. Gerhards. Structures of the protected dipeptide ac-val-phe-ome in the gas phase: towards a beta-sheet model system. *J. Chem. Phys.*, 118:8296, 2003.
- [83] Y. D. Parker, T. R. Rizzo, L. A. Peteanu, and D. H. Levy. Electronic spectroscopy of tryptophan analogs in supersonic jets: 3-indole acetic acid, 3-indole propionic acid, tryptamine and N-acetyl tryptophan. *J. Chem. Phys.*, 84(12):6539–6549, 1986.
- [84] L. A. Peteanu and D. H. Levy. Spectroscopy of complexes of tryptamine and 3-indolepropionic acid with various solvents. *J. Phys. Chem.*, 92:6554, 1988.
- [85] M. J. Tubergen, J. R. Cable, and D. H. Levy. Substituent effects on the electronic spectroscopy of tryptophan derivatives in jet expansions. *J. Chem. Phys.*, 92(1):51–60, 1990.
- [86] J. R. Carney and T. S. Zwier. Infrared and ultraviolet spectroscopy of water containing clusters of indole, 1-methylindole, and 3-methylindole. *J. Phys. Chem. A*, 103:9943–9957, 1999.
- [87] C. Unterberg, A. Gerlach, T. Schrader, and M. Gerhards. Clusters of a protected amino acid with pyrazole derivatives: beta-sheet model systems in the gas phase. *Eur. Phys. J. D*, 20:543, 2002.