

# **Sequenzielle Multiphotonen-Multichromophoren- Dissoziation an Peptiden**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Nadine Wolters**

aus Düsseldorf

Düsseldorf, August 2013

Aus dem Institut für Physikalische Chemie I  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Rainer Weinkauff  
Korreferent: Prof. Dr. Michael Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2013

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Promotion mit dem Thema

### **„Sequenzielle Multiphotonen-Multichromophoren-Dissoziation an Peptiden“**

am Institut für physikalische Chemie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Weinkauff selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, sowie in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe.

Es existierten keine vorherigen Promotionsversuche.

Düsseldorf, den 25.08.2013

---

(Nadine Wolters)



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physikalische Chemie I in der Abteilung für Lasermassenspektroskopie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Rainer Weinkauf angefertigt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Herrn Prof. Dr. Rainer Weinkauf für die freundliche, stets verlässliche und ausdauernde Betreuung von meiner Vertiefungsphase über die Diplomarbeit bis hin zur Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Michael Schmitt für die Übernahme des Korreferats,

den Herren Dr. Swen Siegert und Dr. Ferdinand Vogeler für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, die fröhliche Arbeitsatmosphäre und die stets unterhaltsamen Gespräche,

den Herren Stefan Vosskötter, Paul Konieczny und Andreas Wolters, die sich über Master- bzw. Diplom-Anwärter zu tollen Kollegen entwickelt haben, mit denen das Arbeiten in einem guten sowie entspannten Arbeitsklima möglich war und deren Gespräche ebenso unterhaltsam waren,

Frau Bettina Deckert für die Solidarität unter Frauen und den Rückhalt bei allen verwaltungstechnischen Problemen,

den vielen Menschen der PC I, die für mich besonders in der letzten Phase der Promotion eine gute Ablenkung vom Stress waren,

meinen Eltern und meinen Schwestern, die mich immer unterstützt haben ohne zu wissen „was ich da eigentlich genau mache“,

und besonders meinem Freund für die jahrelange Unterstützung und das Vertrauen.

## Kurzfassung

Durch die Entwicklung von sanften Ionisierungsmethoden wurden große, biologisch relevante Systeme wie Peptide oder Proteine auch der Massenspektrometrie zugänglich. Publierte Ergebnisse zeigten, dass durch Dissoziation dieser und einer anschließenden Fragmentanalyse eine Sequenzanalyse möglich ist. Jedoch nimmt die Wahrscheinlichkeit einer Dissoziation mit dem Größerwerden der zu untersuchenden Moleküle ab. Die Dissoziationswahrscheinlichkeit wird mit der Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus-Theorie beschrieben, die allerdings für so große Moleküle nur qualitativ angewendet werden kann. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird dabei in Abhängigkeit der Zustandsdichte eines Moleküls beschrieben. Da sowohl die zugeführte Energie als auch die Messzeit einer Fragmentierungsmethode im Massenspektrometer begrenzt ist, können größere Moleküle wie beispielsweise Proteine nur schwer fragmentiert und auf ihre Sequenz hin analysiert werden. Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine Methode getestet, die auf dem Prinzip der Multichromophoren-Anregung basiert. Durch die Verwendung der Laserwellenlänge von 193 nm kann jede Peptidbindung als Chromophor fungieren, sodass man bei einer längeren Peptidkette viele Chromophore erhält. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht das Molekül anregen zu können. Zusätzlich können auch durch die Intensität des Anregungslasers unterschiedlich viele Photonen in das Molekül gebracht werden, was ebenfalls die Dissoziationswahrscheinlichkeit steigern kann. In dieser Arbeit wurden verschieden lange Peptidketten, mit Kettenlängen zwischen vier und neun Aminosäuren, auf ihr Fragmentierungsverhalten hin untersucht. Neben den einfachprotonierten Systemen konnten die Moleküle auch mehrfachprotoniert im Massenspektrometer dargestellt werden, sodass dies die Untersuchung im Hinblick auf ein ladungsspezifisches Verhalten ermöglichte. Durch den Vergleich der Fragmentmassenspektren und der Mutterionenintensitätsabnahmen konnten nicht nur spezielle Fragmentierungsmechanismen aufgezeigt werden, sondern dass sich diese auch mit steigender Ladungszahl ändern. Weiterhin konnte man Rückschlüsse für die Gründe eines spezifischen Dissoziationsmechanismus Arginin-haltiger Peptide erhalten. Durch die Verwendung einer neuen kombinierten Stoß- und Laser-Fragmentierungsmethode war es möglich auch größere einfachgeladene Peptidketten zu dissoziieren und die Fragmente für eine Analyse zu nutzen. Um eine Vorstellung von der zugeführten Energie zu erhalten, die bei einem Molekül zu einer Dissoziation führt, wurde zudem eine Methode entwickelt, die eine Berechnung der jeweiligen Anregungsquerschnitte in einer Peptidkette zuließ. Mit dem Anregungsquerschnitt konnte dann eine iterative Berechnung der absorbierten Photonen erfolgen, welche auf die experimentellen Werte angewendet werden konnte. Dadurch konnte zum ersten Mal eine Abschätzung der Zahl der absorbierten Photonen eines Molekülensembles bis zur Dissoziation erhalten werden. Es zeigt sich, dass beispielsweise ein aus neun Aminosäuren bestehendes Arginin-haltiges Peptid fünf Photonen für eine Dissoziation benötigt, was hier einer Energie von 32 eV entspricht.

## Abstract

Since the development of soft ionization methods it is possible to analyze large biologically relevant molecules in a mass spectrometer. The dissociation of these molecules and the analysis of fragment ions lead to a sequence analysis for a better understanding of unknown biomolecules. Unfortunately the probability of dissociation decreases with increasing size of a molecule. The correlation of both can be described by the Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus theory, which is only qualitatively valid for larger molecules. Here the rate constant is correlated with the density of states. Caused by supplied energy and the limited time scale of a mass spectrometer it becomes more difficult to dissociate and analyze large molecules (e. g. proteins).

Therefore a new method, based on the principle of multi photons – multi chromophores excitation, was tested in this work. With the use of the wavelength 193 nm every peptide bond across the molecule can serve as a chromophore. So we will get more potential chromophores as the amino acid sequence gets larger and more chromophores in a sequence lead to a higher probability of excitation. In addition the probability of dissociation will get higher if the number of photons, which are absorbed by the molecule, can be increased. In this work the behavior of fragmentation for peptides with different chain lengths between four and nine amino acids was investigated. Next to single and double protonated systems also multi protonated systems could be detected in the mass spectrometer, which offered the opportunity to examine the fragmentation with regard to charge specific behavior. In comparison with the fragmentation spectra and the decrease of the parent ion intensities not only special fragmentation mechanisms could be shown but also the change of fragmentation mechanisms with regard to the number of charge. Moreover reasons for special dissociation mechanisms of arginine comprising peptides could be given. With the use of a new fragmentation method, combining collision induced and photo induced methods, it was possible to dissociate large single protonated peptides and to analyze the fragment ions in respect of their sequences. To evaluate the absorbed number of photons which leads to dissociation in a molecule, a method was also developed. Because of this the respective absorption cross section of an amino acid sequence could be described. With these cross sections an iterative calculation of the absorbed number of photons could be realized and compared to values from experiments. The first time an estimation of the number of absorbed photons which lead to a dissociation in an amino acid sequence could be predicted. It was shown that, e. g. a peptide of nine amino acids including an arginine, needs five photons to dissociate corresponding to an energy of 32 eV.

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	3
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	5
2.1	Massenspektrometrie .....	5
2.1.1	Aufbau des Elektrosprayionisations-Massenspektrometers (ESI-MS) .....	8
2.1.2	Molekülonen in der Paul-Falle und die Energetik von Stoßprozessen ...	18
2.2	Photoanregung von Molekülen – Das Jablonski-Schema .....	21
2.3	Die Rice-Ramsperger-Kassel- (RRK-) und die Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus-Theorie (RRKM-Theorie) .....	26
2.4	Das <i>ladder</i> - und das <i>ladder-switch</i> -Modell .....	29
2.5	Peptide .....	31
2.5.1	Aufbau und Nomenklatur .....	31
2.5.2	Fragmentierung von Peptiden.....	34
2.6	Fragmentierungsmethoden für biologische Systeme in Massenspektrometern.....	38
2.6.1	Stoßinduzierte Fragmentierungsmethoden .....	38
2.6.2	Photoinduzierte Fragmentierungsmethoden .....	44
2.7	Photoinduzierte Anregung .....	47
2.7.1	Die Lichtquelle Laser: Das Laserprinzip.....	47
2.7.2	Excimer-Laser .....	49
2.8	Konzeptionelle Überlegungen und erwartetes Verhalten für die Fragmentierung der zu untersuchenden Substanzen .....	51
<b>3</b>	<b>Experimentelles</b> .....	62
3.1	Die Zeitabläufe im ESI-MS.....	62
3.1.1	Synchronisation des Lasers mit dem ESI-Prozess.....	63
3.2	Reduzierung der Störsignale .....	67
3.3	Probenpräparation .....	72
3.3.1	ESI-MS-Messungen.....	72
3.3.2	Flüssigphasen-UV-VIS-Messungen .....	72
3.3.3	Gasphasen-UV-VIS-Messung an N-Methylacetamid .....	73



<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	74
4.1	Überprüfung der Absorption von N-Methylacetamid bei 193 nm .....	74
4.2	Untersuchungen an Aminosäuren und einfachgeladenen Peptidketten mittels photoinduzierter Anregung .....	77
4.2.1	Aminosäuren .....	77
4.2.2	Dipeptide .....	80
4.2.3	Tripeptide .....	85
4.2.4	Längerkettige Peptide.....	89
4.3	Untersuchungen an ein- und mehrfachgeladenen Peptidketten mittels Stoß- und Laserfragmentierung .....	92
4.3.1	Leu-Trp-Met-Arg .....	93
4.3.2	Bradykinin.....	104
4.3.3	Angiotensin II.....	118
4.3.4	Angiotensin I.....	129
4.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse aus stoß- und photoinduzierter Anregung.....	144
4.4	Auswirkung der Multiphotonenanregung – Bestimmung der Zahl an absorbierten Photonen.....	147
4.4.1	Aufklären von Absorptionsstellen bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 193 nm.....	147
4.4.2	Konzentrationsabhängige Untersuchung an Modellsubstanzen mit Hilfe von Flüssigphasen-UV-VIS-Spektroskopie.....	148
4.4.3	Bestimmung der Absorptionsstellen mittels ESI-MS .....	154
4.4.4	Berechnung des Anregungsquerschnitts $\sigma$ .....	159
4.4.5	Abschätzung der in einem Molekül absorbierten Photonenanzahl .....	163
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	177
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	180
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	197
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	200



# 1 Einleitung

Die Untersuchung biologischer Systeme ist seit jeher ein wichtiges Gebiet im Bereich der Naturwissenschaften. Durch die Entdeckung und Entwicklung von sanften Ionisierungsmethoden [1-6] wurden die biologischen Systeme auch für Untersuchungen in der Gasphase und somit für die Massenspektrometrie zugänglich, sodass mit deren Hilfe Analysen bezüglich der Zusammensetzung verschiedener Gemische durchgeführt werden konnten [7-9]. Ein weiteres wichtiges Feld der Massenspektrometrie ist bis heute die primäre Strukturaufklärung von biologisch relevanten Molekülen wie Peptiden und Proteinen [10-19]. Durch diese können beispielsweise Funktionsweisen von Enzymen entschlüsselt oder Zellvorgänge besser verstanden werden. Um die Primärstruktur von Peptiden oder Proteinen aufzuklären, wird den Molekülen so viel Energie zugeführt, dass sie dissoziieren. Die so entstehenden Fragmente werden anschließend im Massenspektrometer nachgewiesen. Für die Fragmentierung haben sich im Laufe der Jahre viele Methoden entwickelt [20-24]. Die Wahl der Fragmentierungsmethode hängt dabei allerdings von verschiedenen Faktoren ab [25,26]. Ein wichtiger Faktor ist die Größe des Moleküls. Es zeigt sich, dass durch theoretische Betrachtungen wie der Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus-Theorie [27-29] die Dissoziationswahrscheinlichkeit eines Moleküls mit der Anzahl der vorhandenen Schwingungen in Zusammenhang gebracht werden kann, über die das Molekül die zugeführte Energie verteilen kann. Die Anzahl der Schwingungen korreliert wiederum mit der Größe des Moleküls, sodass man sagen kann, dass große Moleküle prinzipiell mehr Energie zum Fragmentieren benötigen.

Im Rahmen dieser Promotion wurden mit Hilfe eines Elektrosprayionisations-Massenspektrometers verschiedene Fragestellungen der Molekülanregung und der Fragmentierung untersucht, die sich hauptsächlich in folgende Projekte aufteilen lassen:

- I. Anregung von sogenannten *caged compounds* mittels Laserenergie kurz vor oder während des Elektrosprühprozesses.
- II. Untersuchungen von verschiedenen Peptiden mit hochenergetischer UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 126 nm in der Gasphase.

In der vorliegenden Arbeit wurde sich allerdings ausschließlich auf ein drittes Projekt konzentriert:

- III. Die Untersuchung von Peptiden und Proteinen bezüglich ihrer Dissoziationswahrscheinlichkeit in der Paul-Falle.

Dabei wurde einerseits das Fragmentierungsverhalten von unterschiedlich großen Molekülen durch die Verwendung von verschiedenen Fragmentierungsmethoden untersucht. Diese waren:

- i. Stoßfragmentierung
- ii. Laserfragmentierung mittels Multiphotonen-Multichromophorenanregung
- iii. Eine gleichzeitige Kombination aus i. und ii.

Die Laserfragmentierung von Peptiden durch die Verwendung eines ArF-Excimer-Lasers mit der Wellenlänge 193 nm wurde schon früher verwendet [30,31]. In dieser Arbeit hat man sich allerdings für große Moleküle den Multiphotonen-Multichromophoren-Effekt zu Nutze machen wollen, um somit die Dissoziationswahrscheinlichkeit zu erhöhen. Zudem wurden die Moleküle auch in ihrer Ladungszahl variiert und miteinander verglichen. Dabei war die Frage zu klären, ob die Unterstützung durch die Coulombkraft eine Dissoziation von großen Peptidketten unterstützt. Durch die Variation in der Ladungszahl hat man sich zudem erhofft, Rückschlüsse sowohl auf die Struktur als auch auf die Fragmentierungsmechanismen zu erhalten.

Um eine Vorstellung von der zugeführten Energie zu erhalten, die bei einem Molekül zu einer Dissoziation führt, wurde zudem eine Möglichkeit gesucht, die eine Berechnung der jeweiligen Anregungsquerschnitte in einer Peptidkette zulässt. Dadurch hat man sich zum ersten Mal eine Abschätzung der Zahl der absorbierten Photonen eines Molekülensembles bis zur Dissoziation erhofft.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine der wichtigsten Methoden zur Analyse unbekannter Substanzen oder zur Qualitätskontrolle synthetisierter Stoffe. Das Prinzip, auf dem die Massenspektrometrie basiert, ist die Trennung von Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ -Verhältnis). Mit Entdeckung der Trennbarkeit von Massen entstanden im Laufe der Jahrzehnte unzählige Varianten von Massenspektrometern, die alle die Gemeinsamkeit besitzen, dass die zu untersuchenden Moleküle zunächst in die Gasphase überführt und ionisiert werden, bevor sie auf Grund ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnis analysiert werden können. Ein allgemeiner Aufbau ist in Abbildung 1 dargestellt.

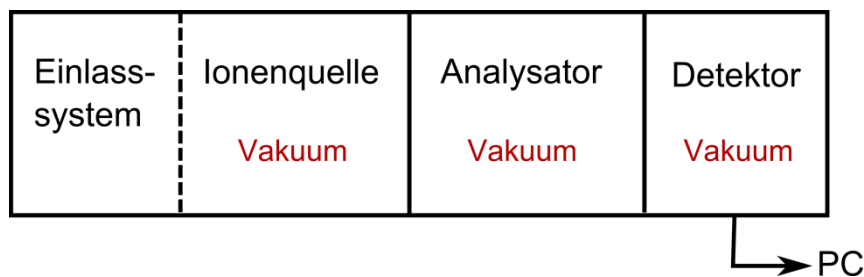


Abbildung 1: Aufbau eines Massenspektrometers im Allgemeinen. Es besteht aus einem Einlasssystem, bei dem die Moleküle in die Gasphase überführt werden, einer Ionenquelle, dem Analysator und dem Detektor. Das Signal vom Detektor wird dann an einen PC weitergegeben und dort analysiert. Die Grenze zwischen Einlasssystem und Ionenquelle ist nicht zwingend, da es auch Einlasssysteme gibt, die gleichzeitig Ionen generieren (Bsp.: Elektrosprayionisation).

Alle Massenspektrometer (MS) bestehen aus einem Einlasssystem, in dem die Moleküle in die Gasphase überführt werden, einer Ionenquelle, wo die Moleküle ionisiert werden, einem Analysator, der die Ionen ihrer Masse nach trennt und einem Detektor, der die Ionen detektiert und das aufgenommene Ionensignal an einen PC weitergibt, wo es dort mit Hilfe einer Software analysiert wird. Dabei ist die Trennung zwischen Einlasssystem und Ionenquelle nicht zwingend, da es auch Einlasssysteme gibt, die die Moleküle während der Überführung in die Gasphase auch ionisieren können. Beispiele hierfür sind das Elektrosprayionisations- (ESI) und das *matrix assisted laser desorption/ionisation* (MALDI) Verfahren.

Die Trennung der Ionen erfolgt, wie oben erwähnt, nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. Die Entdeckung dieses Phänomens ist auf J. J. Thomson zurückzuführen, der Ende des 19. Jahrhunderts erkannte, dass sich Partikel durch ein angelegtes

magnetisches oder elektrisches Feld auf ihrer Flugbahn beeinflussen lassen [32]. Für die Trennung der Ionen nach dem  $m/z$ -Verhältnis werden die sogenannten Massenanalytoren verwendet. Betrachtet man diese, so sind im Laufe der Jahre Analytoren entwickelt worden, die auf verschiedenen Trennverfahren basieren. Dabei kann die Trennung grob durch folgende Faktoren erfolgen:

- Die Flugzeit
- Ein angelegtes Magnetfeld
- Ein angelegtes elektrisches Feld
- Ein elektrisches Wechselfeld (Radiofrequenz)

Die Trennung von  $m/z$ -Verhältnissen mit Hilfe der Flugzeit wurde erstmals 1946 von W.E. Stephens konzipiert [33] und wenig später als kommerzielles Gerät entwickelt. Dabei basiert das Trennverfahren auf der unterschiedlichen Geschwindigkeit  $v$  der Ionen, die diese bei einer gegebenen feldfreien Flugstrecke und gleicher kinetischer Energie besitzen.

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 = z \cdot e \cdot U \quad (1)$$

Mit  $E_{kin}$  als kinetische Energie,  $m$  als Masse des Ions,  $z \cdot e$  als elektrische Ladung,  $U$  als angelegte Spannung.

Diese sogenannten *time-of-flight* Massenspektrometer (TOF-MS) erreichten gerade durch die Entwicklung von MALDI immer mehr an Bedeutung. Ihr Vorteil ist die quasi Unbegrenztheit des Massenbereiches, da die Trennung von Massen nur durch die Detektion begrenzt ist.

Da die Flugbahn eines Ions aber auch magnetfeldabhängig ist, wurden auch sogenannte Magnetsektorfeld-Massenspektrometer entwickelt. Ihr Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Ablenkung der Ionen in einem homogenen Magnetfeld [34]:

$$\frac{m}{z \cdot e} = \frac{r^2 B^2}{2U} \quad (2)$$

Mit  $r$  als Ablenkungsradius,  $B$  als angelegtes Magnetfeld und  $U$  als Spannung.

Obwohl bei diesen Geräten eine relativ hohe Massenaufösung gewährleistet ist, gelten diese heutzutage jedoch wegen ihrer geringen Transmission als eher veraltet. Eine Kombination aus elektrischen und magnetischen Feldern zur Analyse wird allerdings noch heute in den Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometern (FT-ICR-MS) verwendet. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass sich Ionen

unterschiedlicher Masse bei gleichem Magnetfeld auf unterschiedlichen Kreisbahnen befinden. Dies resultiert für unterschiedliche  $m/z$ -Verhältnisse in unterschiedlichen Umlaufzeiten. Die zugehörige Frequenz wird auch als Cyclotronfrequenz  $f_C$  bezeichnet:

$$f_C = \frac{z \cdot e \cdot B}{2\pi \cdot m} \quad (3)$$

Die Kreisbewegungen der Ionen erzeugen in einer Antenne wiederum einen kleinen Stromfluss, der detektiert werden kann, sodass durch Messen dieses Stromes auf das  $m/z$ -Verhältnis geschlossen werden kann.

Nur mit Hilfe eines elektrischen Feldes funktioniert die Massentrennung der sogenannten Orbitrap, die aus einer spindelförmigen waagerechten Elektrode besteht, deren Gegenelektrode sich fassförmig darum erschließt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes kreisen die Ionen sowohl um die Radialachse der Spindelelektrode als auch in deren Längsrichtung  $y$  periodisch hin und her. Dabei ist die Pendelfrequenz  $\omega_y$  in Längsrichtung massenabhängig und erzeugt einen Stromfluss, der detektiert und in ein  $m/z$ -Verhältnis umgewandelt werden kann [35].

$$\omega_y = \sqrt{k \frac{z \cdot e}{m}} \quad (4)$$

mit  $k$  als Feldkrümmung.

Ebenfalls kann eine Trennung der Ionen durch eine angelegte Radiofrequenz (RF) in einem elektrischen Feld erfolgen. Die ersten Analysatoren dieser Art waren die sogenannten linearen Quadrupol-Analysatoren, die aus vier parallel zueinander stehenden Stäben bestehen, an deren sich gegenüberliegenden Stäben jeweils dieselbe Spannung und an den anderen beiden Stäben die jeweils entgegengesetzte Spannung befindet. Fliegen die Ionen entlang der Längsachse der Stäbe, so können diese, durch zusätzliches Anlegen eines Wechselfeldes, auf ihrer Flugbahn beeinflusst werden. Wie in Formel 4 gesehen, ist das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis frequenzabhängig. Je nach Frequenz des angelegten Wechselfeldes können die Ionen die Stäbe passieren und detektiert oder aber von ihrer Flugbahn abgelenkt werden und den Detektor nicht erreichen. Durch die Variation der Frequenz können somit Ionen verschiedener  $m/z$  massenabhängig detektiert werden [36].

Neben den Quadrupol-Analysatoren wurden im Laufe der Jahre auch Analysatoren mit mehr Stäben, wie z.B. Hexapole mit sechs Stäben oder Oktopole mit acht Stäben, entwickelt, die ein komplizierteres elektrisches Feld generieren, welche eine bessere Ionentransmission und einen breiteren  $m/z$ -Bereich besitzen [37]. Sie werden deshalb

zum Führen der Ionen und nicht zur Massentrennung benutzt. Aber auch dreidimensionale RF-Analysatoren, sogenannte Ionenfallen, konnten aus den Vorgängermodellen entwickelt werden. Eine der bekanntesten ist die nach ihrem Erfinder benannte Paul-Falle, der dafür 1989 den Nobelpreis erhielt [38]. Auf die Funktionsweise der Paul-Falle wird noch in Kapitel 2.1.1.3 genauer eingegangen.

Durch die unterschiedlichsten Kombinationen zwischen Einlasssystem/Ionenquelle und dem Analysator wurden viele Möglichkeiten zur Untersuchung spezifischer Substanzen geschaffen. Allerdings ist es wichtig bei der Vielzahl der Massenspektrometer darauf zu achten, welche Methode für die zu analysierende Substanz geeignet ist. So eignen sich zum Beispiel Verdampfungsmethoden nicht gut für biologische Systeme, da diese beim Verdampfen zerstört werden können. Die bereits oben erwähnten Methoden ESI und MALDI sind hingegen sogenannte sanfte Ionisierungsmethoden, die auch empfindliche Moleküle in die Gasphase überführen können. Allerdings eignen sich diese beispielsweise nicht für Substanzen, die unlöslich sind oder keine Protonierungs- bzw. Deprotonierungsstelle besitzen.

Da in dieser Arbeit ausschließlich mit Peptiden und Proteinen gearbeitet wurde, ist die experimentelle Messmethode das ESI-MS mit Paul-Falle als Analysator gewesen, welches im Folgenden näher erläutert wird.

### **2.1.1 Aufbau des Elektrosprayionisations-Massenspektrometer (ESI-MS)**

Die Elektrosprayionisationsmethode wurde Anfang der 1980er Jahre von J.B. Fenn entwickelt [1,2,39], der dafür 2002 den Nobelpreis in Chemie erhielt [4], denn diese Methode zählt heute zu einer der wichtigsten Ionisierungsmethoden für biologische Systeme.

Das ESI-MS besteht wie alle Massenspektrometer aus einem Einlasssystem, welches gleichzeitig die Ionenquelle darstellt, einem Massenanalysator und einem Detektor. In diesem Fall wird die Probe durch das Elektrosprühverfahren in die Gasphase überführt und ionisiert. Anschließend werden die Ionen durch eine geheizte Glaskapillare hindurch zu den Oktopolen weitergeleitet, die sie wiederum zum Massenanalysator, der Paul-Falle, überführen. Anschließend erfolgt die Detektion mit Hilfe einer Dynode durch ein *channeltron* (Abbildung 2).



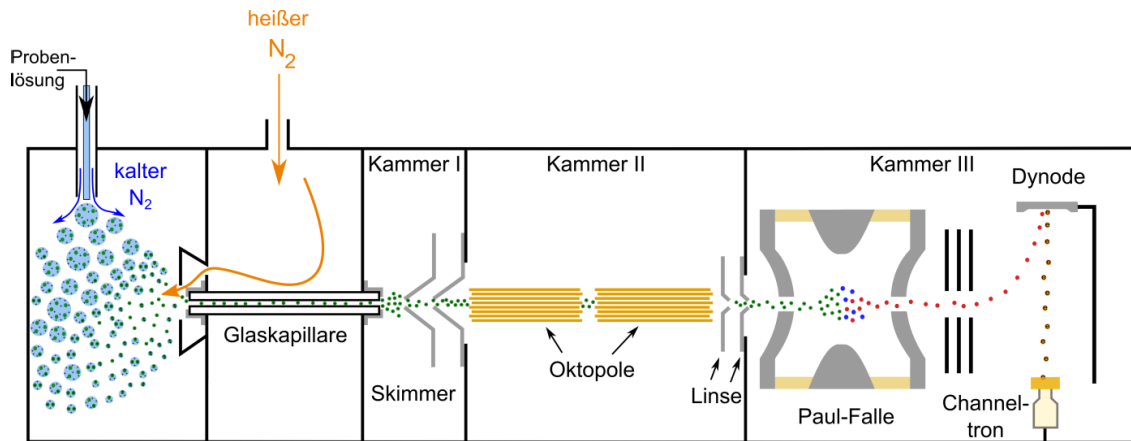


Abbildung 2: Aufbau des ESI-MS. Durch das Elektrosprühverfahren werden die Ionen in die Gasphase überführt und durch eine geheizte Glaskapillare in Kammer I überführt, wo der Ionenstrahl mit durch zwei Skimmer verschmälert und in Kammer II weitergeleitet wird. Dort können die Ionen durch zwei Oktopole vorselektiert werden, bevor sie in die Paul-Falle in Kammer III geleitet und dort analysiert oder auch fragmentiert werden. Anschließend werden sie ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis nach selektiert und durch ein *channeltron* mit Hilfe einer Dynode detektiert.

Zudem liegen die einzelnen Komponenten in verschiedenen Vakuumbereichen, welches die Analyse vereinfachen soll. So werden bei Normaldruck die Ionen erzeugt und durch eine Glaskapillare in den ersten Vakuumbereich von ca. 1 mbar eingeführt. Durch zwei Skimmer, die eine Druckreduzierung erlauben, wird die zweite Kammer von der ersten getrennt. In der zweiten Kammer befinden sich zwei Oktopole, wobei ein Vakuum von ca.  $1 \cdot 10^{-4}$  mbar vorliegt, damit die Ionengeschwindigkeit reduziert wird und die Oktopole die Ionen gut führen können. Durch zwei weitere Skimmer gelangen die Ionen in die dritte Kammer, in der sich die Ionenfalle und der Detektor befinden. Damit eine gute Massenselektion und Detektion erfolgen kann, besitzt diese Kammer ein Vakuum von ca.  $7 \cdot 10^{-6}$  mbar.

### 2.1.1.1 Das Elektrosprühverfahren

Beim ESI-MS ist das Einlasssystem gleichzeitig auch der Ort, an dem die Ionen produziert werden (Abbildung 3)

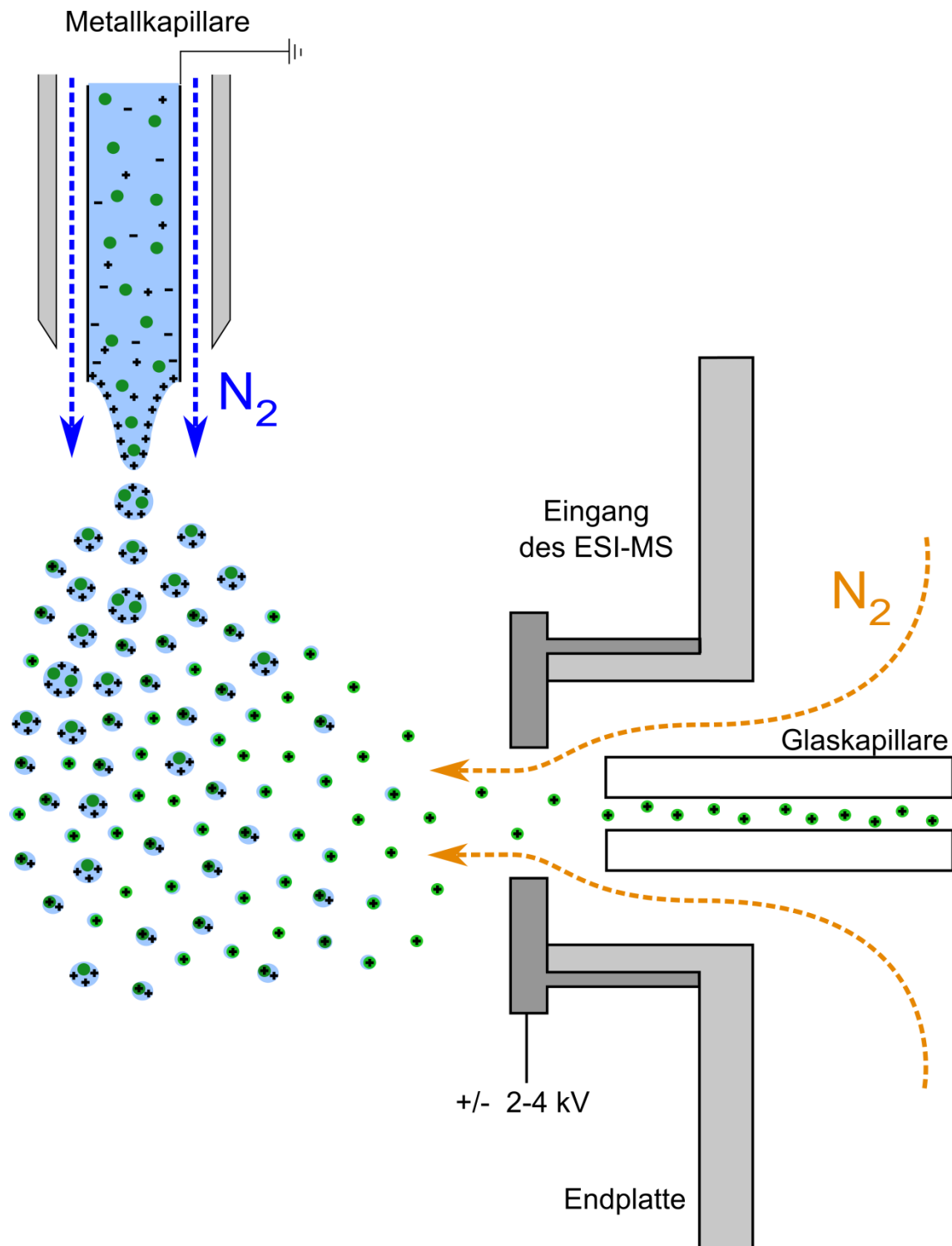


Abbildung 3: Das Elektrosprühverfahren: Durch eine angelegte Spannung am Eingang des ESI wird ein elektrisches Feld zwischen dem Eingang und der auf Masse liegende Metallnadel erzeugt. Die Ionen in der Probenlösung folgen dem elektrischen Feld und es entsteht an der Spitze der Nadel ein überwiegend positiv geladener Flüssigkeitskegel, der Taylorcone. Aus diesem heraus wird dann mit Hilfe von Stickstoff ein feines Aerosol mit überwiegend positiv geladenen Tropfen gebildet. Durch einen heißen Stickstoffgegenstrom verdunstet das Lösungsmittel aus dem Tropfen, wodurch sich dessen Volumen verringert. Wenn die Abstoßung der positiven Ionen größer wird als die Oberflächenspannung kommt es zur Coulombexplosion oder einer Tröpfchenejektion und es werden viele kleine Tropfen gebildet. Dieser Vorgang wiederholt sich solange bis das Molekül eine Ladung aufnimmt und getrocknet in das Massenspektrometer fliegt.

Durch eine Spritze wird die Lösung in eine Metallnadel überführt, die einen Durchmesser von ca. 200  $\mu\text{m}$  besitzt und auf Masse liegt. Der Eingang des ESI-MS ist von einem metallenen Ring umgeben, der bei Bedarf auf positive oder negative Spannung von bis zu 4000 V gesetzt werden kann. Dadurch, dass die Nadel nun auf Masse liegt, wird ein Spannungsgefälle erzeugt und so ein elektrostatisches Feld aufgebaut. Dieses Feld hat Auswirkungen auf die in der Metallnadel befindliche Lösung. Liegt an dem Ring eine negative Spannung an, so befinden sich aufgrund der elektrostatischen Anziehung mehrheitlich positiv geladene Ionen wie  $\text{H}^+$  oder  $\text{Na}^+$ , die sich neben der zu untersuchenden Probe in der Lösung befinden, an der Spitze der Nadel. Durch die kontinuierliche Zugabe von Lösung und mit Hilfe eines Stickstoffstroms, der die Spitze der Nadel umspült, entsteht so ein feines Aerosol aus überwiegend positiv geladenen Tropfen. Dabei wurde die Bildung der Tropfen von Taylor genauer untersucht [40]. Wegen des elektrischen Feldes werden die Ionen sowie das polare Lösungsmittel aus der Metallnadel herausgezogen. Es entsteht ein Lösungsmittelkegel, an dessen Spitze das elektrische Potential besonders groß ist und sich als Folge kleine Tropfen aus diesem Kegel lösen. Diese Tropfen führen mehrheitlich positiv geladene Ionen mit sich, da bei Entstehung des Kegels entlang dessen Oberfläche sich die positiven Ionen zunächst ansammeln und daraufhin bei Bildung des Tropfens mitgeführt werden (Abbildung 4)

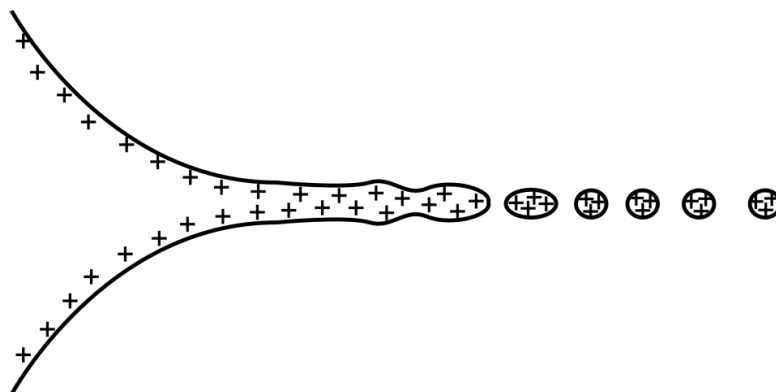


Abbildung 4: Bildung des Taylor-Kegels und Entstehung der geladenen Molekül/Solvat-Tropfen. Die Tropfen fliegen nun entlang des elektrischen Feldes auf den Eingang des ESI zu. Dabei ist ihnen ein heißer Luftstrom (meist Stickstoff) entgegengesetzt, der bewirkt, dass aus den Tropfen heraus das Lösungsmittel verdunstet und sich somit das Gesamtvolumen verringert. Die Ionen bleiben allerdings im Tropfen zurück, sodass sich der Tropfen beim Verdunstungsprozess der sogenannten Rayleigh-Grenze nähert [41]. Diese besagt, dass der Tropfen, solange die Oberflächenspannung größer ist als die Abstoßung der Ladungen, stabil bleibt. Dieser Zusammenhang wurde in Formel 5 [42] aufgezeigt.

$$Q_{Ry} = 8\pi\sqrt{\varepsilon_0\gamma R^3} \quad (5)$$

$Q_{Ry}$ : Ladung des Tropfens     $\varepsilon_0$ : Dielektrizitätskonstante     $\gamma$ : Oberflächenspannung  
 $R$ : Radius des Tropfens

Wird die Abstoßung der Ladungen untereinander größer als die Oberflächenspannung, so wird der Tropfen instabil und es kommt zur Coulombexplosion [26]. Dabei bilden sich aus dem Tropfen viele kleine Tropfen, die dann nach Trocknung jeweils wieder an ihre Rayleigh-Grenze gelangen. Dieser Vorgang wiederholt sich solange bis das zu untersuchende Probenmolekül ohne Lösungsmittel daliegt. Während der Tropfen kleiner wird, sammeln sich auch die positiven Ladungen wie z.B. Protonen um das Molekül und im Laufe des Schrumpfungsprozesses lagert sich eine Ladung am Molekül an. Somit wird das Molekül schonend in die Gasphase überführt und ionisiert. Hinter dem Eingang des ESIs beginnt der Vorvakuumbereich, der durch eine Glaskapillare mit dem Eingang des ESIs verbunden ist. Durch die Druckveränderung erfahren die Ionen eine Art Sogwirkung und werden in die Glaskapillare hineingeleitet. An dieser liegt zusätzlich noch eine Spannung an, sodass die Ionen zusätzlich angezogen und durch die Kapillare zum Vorvakuumbereich geleitet werden.

In unserem speziellen Fall steht die Metallnadel senkrecht zum Eingang des Massenspektrometers. Dieser Aufbau bewirkt, dass zu große Tropfen wegen ihrer Trägheit den Eingang nicht erreichen sondern unter diesem aufprallen oder aber weiter senkrecht nach unten fallen. Dies hat den Vorteil, dass nur Ionen in das Massenspektrometer geleitet werden, die lösungsmittelfrei sind. Würden diese großen Tropfen, wie bei einem parallelen Aufbau, auf den Eingang zufliegen, so würden die Flugstrecke und der heiße Gegenstrom nicht ausreichen um die in dem Tropfen befindlichen Probenmoleküle lösungsmittelfrei zu bekommen. Dies hätte ein komplexeres Massenspektrum zur Folge, in dem die Moleküle mit einer unterschiedlichen Anzahl von Aduktmolekülen zu sehen wären.

Im Rahmen dieser Promotion wurde neben dem Elektrosprühverfahren mittels einer Metallnadel auch ein Sprühverfahren entwickelt, welches mit Hilfe einer UV-durchlässigen Quarzglas Kapillare funktioniert. Ziel dieses Aufbaus war es, die zu untersuchenden Substanzen mit einem Laser direkt in der Kapillare oder im Spray zu bestrahlen, um die so entstehenden Photoprodukte anschließend zeitnah im Massenspektrometer untersuchen zu können. Ein Aufbau ist in Abbildung 5 zu sehen.

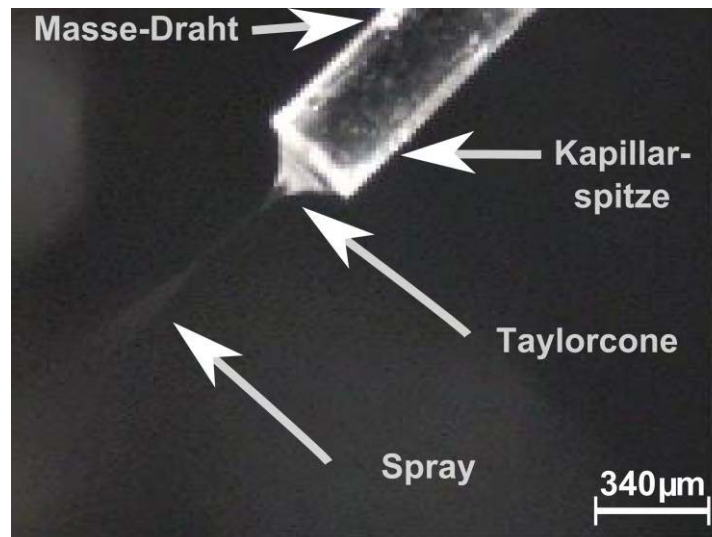


Abbildung 5: Sprühverhalten mit einer Quarzglaskapillare.

Die Quarzglaskapillare wurde mittels einer speziell angefertigten Halterung in einem Winkel von ca.  $45^\circ$  vor den Eingang des ESI positioniert und durch einen Platindraht geerdet. Dabei war es für das Sprühverfahren besonders wichtig, in welchem Abstand der Draht zur Spitze und in welchem Abstand die Spitze der Kapillare zum Eingang des ESI positioniert wurde. Wie in Abbildung 5 zu sehen, entstand dadurch ein Taylorcone, der ein Spray erzeugte. Dieses Sprühverfahren funktionierte allerdings so gut, dass zu viele Probenmoleküle in das ESI eingelassen wurden, sodass dieses schnell verdreckte. Dies war ein großer Nachteil dieses Verfahrens. Zudem brachte die Anregung im Spray keinen großen Erfolg.

Im weiteren Verlauf wurde sich deshalb wieder auf das herkömmliche Sprühverfahren und die Bestrahlung in der Gasphase konzentriert.

### 2.1.1.2 Der Vorvakuumbereich

Sobald die Ionen die Glaskapillare passieren, beginnt der Vorvakuumbereich. In der ersten Kammer, am Ende der Glaskapillare, herrscht ein Unterdruck von 1 mbar, sodass der Ionenstrom aus der Glaskapillare expandieren kann. Die Ionen werden mit Hilfe von zwei Skimmern, an denen jeweils eine Spannung angelegt ist, in Kammer zwei überführt. Ein Skimmer ist ein konisch geformtes Metall, an dessen Spitze sich eine Öffnung befindet, die einen Wanddurchmesser von wenigen  $\mu\text{m}$  besitzt, wodurch eine scharfe Kante entsteht. Fliegen die Ionen in einem durch das Expandieren konisch geratenen Strahl nun auf die Spitze des Skimmers zu, so können nur die Ionen durch den Skimmer hindurch fliegen, die sich auch im Bereich der Skimmeröffnung befinden. Alle anderen Ionen ober- oder unterhalb der Öffnung treffen auf den Skimmer und werden entladen. Man spricht daher auch von einem Ausschneiden des Ionenstrahls, wodurch dieser wieder eine parallele Form annimmt.

Hinter den Skimmern befinden sich in der zweiten Kammer zwei hintereinanderliegende Oktopole. Diese bestehen aus je acht parallel zueinander ausgerichteten Metallstäben und funktionieren genauso wie ein Quadrupol als zweidimensionale Ionenfalle. Die Oktopole dienen zum einen als Selektor und zum anderen als ein Art Massenspeicher. Um die dahinter angebrachte Ionenfalle nicht unnötig mit Ionen zu befüllen, ist eine Selektion wichtig. Darunter fallen die Massen, die zum Beispiel nicht in dem Scanbereich liegen. Diese sind für die spätere Detektion irrelevant und können so schon im Vorfeld von den Oktopolen ausgesondert werden. Durch zwei metallische Linsen, die hinter dem zweiten Oktopol angebracht sind, kann man diesen auch als eine Art Massenspeicher sehen. Durch unterschiedliche Beschaltung dieser Linsen wird verhindert, dass die Ionen kontinuierlich in die Ionenfalle hinein fliegen. Das würde den Vorgang des Ionenfangens und Detektierens der Falle erheblich stören. Deshalb werden die Ionen durch eine geeignete Spannung durch diese Linsen abgebremst und vor der Falle gehalten. Erst wenn die vorherigen Ionen aus der Falle hinausbefördert wurden, werden neue Ionen eingelassen. Um eine gute Funktionsweise der Oktopole zu bekommen, befindet sich in der Kammer zwei ein Vakuum von  $1 \cdot 10^{-4}$  mbar.

### 2.1.1.3 Die Paul-Falle

Die im Massenspektrometer befindliche Ionenfalle ist eine sogenannte dreidimensionale Ionenfalle und wurde nach ihrem Erfinder Paul genannt [43]. Sie besteht aus einer Ringelektrode und zwei hyperbolisch geformten Endkappen, die sich jeweils vor bzw. hinter dem Ring befinden. An den Endkappen liegt die gleiche Spannung an, während die Ringelektrode mit der jeweils entgegengesetzten Spannung beschaltet wird. Wird nun eine Wechselspannung mit einer entsprechenden Frequenz zwischen Ringelektrode und Endkappen angelegt, entsteht ein mittleres Potential, welches in alle drei Raumrichtungen harmonisch und attraktiv auf die Ionen wirkt, sodass die zu analysierenden Ionen in allen drei Raumrichtungen gefangen werden können. Da das Feld aber wegen der Wechselspannung ein alternierendes Verhalten besitzt, kehrt sich auch das Potential um, weshalb es in diesem Zusammenhang auch Pseudopotential genannt wird. Durch zusätzlich eingeleitetes Helium in die Falle wird dieser Einfangprozess unterstützt, da die Ionen durch Stöße mit den inerten Heliumatomen an kinetischer Energie verlieren und so das attraktive elektrische Feld der Falle erfahren und diesem folgen können, anstatt einfach durch die Falle hindurch zu fliegen. Nach Einfangen der Ionen können diese selektiert, fragmentiert und ihrer Masse nach aus der Falle hinausgeworfen werden. Für die Isolierung, Fragmentierung oder auch den Rauswurf aus der Falle wird an den Endkappen eine Hochfrequenzspannung angelegt um sich die massenabhängige Schwingungsfrequenz zu Nutze zu machen. In einem harmonischen Potential wird die Schwingungsenergie wie folgt beschrieben [44]:

$$E_{vib} = \left( v + \frac{1}{2} \right) \cdot \hbar \omega \quad \text{mit} \quad \omega = \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (6)$$

$E_{vib}$ : Schwingungsenergie                       $v$ : Frequenz                       $m$ : Masse

$\hbar$ : Planck-Konstante /  $2\pi$                        $k$ : Boltzmann-Konstante

Anhand der oben stehenden Formel erkennt man, dass die Schwingungsfrequenz auch von der Masse des Moleküls anhängig ist, sodass bei gleicher Energie Moleküle mit kleinerer Masse schneller schwingen als Moleküle größerer Masse. Für die Massenselektion bedeutet das, dass man anhand einer geeigneten Variation der Frequenz an den Elektroden Ionen mit den entsprechenden Massen in Schwingung versetzen kann. So erhalten die Ionen genug Energie um die Barriere des Potentialfeldes zu überwinden und aus der Falle hinaus geschüttelt zu werden. Auf diese Weise können die unterschiedlichen Ionen der Masse nach aufgetrennt und anschließend detektiert werden, was eine Massentrennung zur Folge hat, die sich im Massenspektrum wiederfindet.

Ein weiterer Vorteil, der sich ergibt, ist nun die Möglichkeit, einzelne Massen gezielt zu isolieren und zu fragmentieren. Beim Isolieren einer Masse werden die Frequenzen aller anderer sich in der Falle befindlichen Ionenmassen, bis auf einen kleinen Bereich rund um die zu isolierende Masse, angesprochen. Dadurch werden alle Ionen, die nicht für weitere Analysen zur Verfügung stehen müssen, aus der Falle hinaus geschüttelt. Die zu analysierende Masse liegt nun isoliert in der Ionenfalle vor und kann fragmentiert werden. Dabei wird das Ion wieder in Schwingung versetzt, wobei es mit den Heliumatomen stößt. Durch die Erhöhung der Bewegungsamplitude erfährt es immer mehr Energie, sodass es auch in die Nähe seiner Dissoziationsenergie gelangt. Weitere Stöße mit Heliumatomen können nun zu einem Bindungsbruch an den schwächsten Bindungen führen, sodass das Molekül fragmentiert. Anschließend werden alle Ionen aus der Falle hinaus geschüttelt und detektiert.

Wenn die Ionen die Falle verlassen, werden sie durch zwei Linsen beschleunigt und auf die Dynode gelenkt. Diese besteht aus einer kreisrunden Metallplatte, an welcher eine Spannung von 7 kV anliegt, sodass die positiven Ionen von dieser angezogen werden und beim Aufprall Elektronen aus der Wand schlagen. Die Elektronen werden von der anliegenden Spannung abgestoßen und fliegen zum Detektor, der der Dynode gegenüber angebracht ist. Dort wird das Elektronensignal vervielfältigt und das Signal vom Computer in ein Massenspektrum überführt.

Für die vorliegenden Experimente ist die Paul-Falle der Analysator der Wahl, da es durch das *trapping* möglich ist, gezielt viele Ionen mit einem Laserstrahl anzuregen. Dazu wurde in die Ringelektrode ein 3 mm großes Loch gebohrt, welches an der gegenüberliegenden Seite wiederholt wurde, damit der Laserstrahl möglichst die Falle auch wieder verlassen kann ohne auf die Metalloberfläche zu treffen.



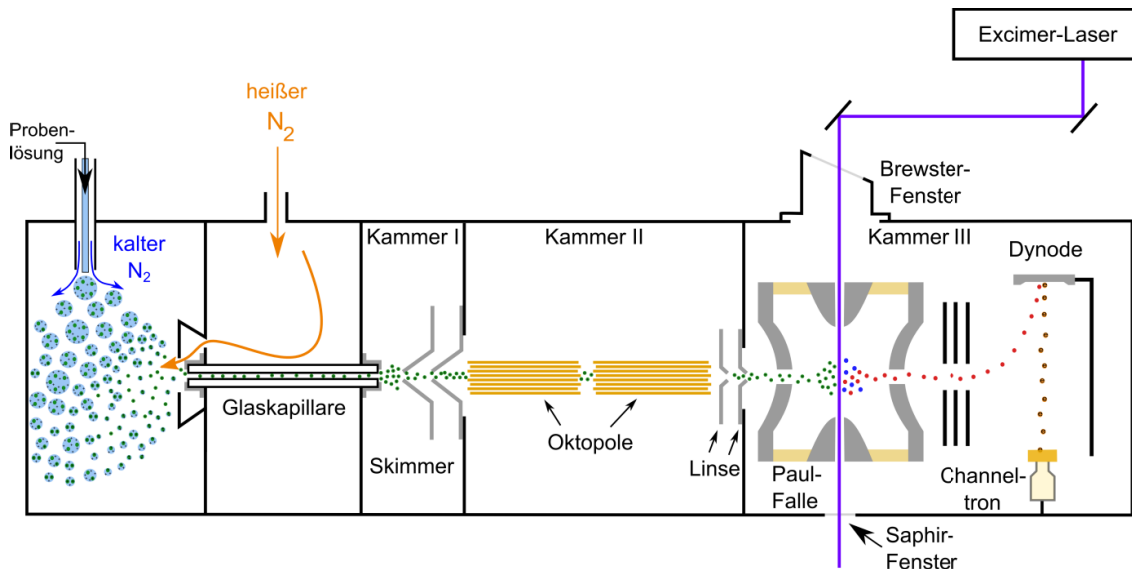


Abbildung 6: Aufbau des ESI-MS mit modifizierter Paul-Falle. Durch Bohrungen im Elektrodennetz kann der Laserstrahl senkrecht durch die Falle geleitet werden. Das Ein- und Auskoppeln des Lasers geschieht durch ein Brewster- bzw. ein Saphirfenster.

### 2.1.2 Molekülionen in der Paul-Falle und die Energetik von Stoßprozessen

Da in dieser Arbeit neben einfachgeladenen auch mehrfachgeladene Ionen mit Hilfe der Stoßfragmentierung untersucht wurden, muss man sich zunächst über die Prozesse und Effekte in der Paul-Falle im Allgemeinen und im Besonderen während der Stoßprozesse im Klaren sein.

#### Bewegung und Stöße der Ionen während des Einfangens in der Paul-Falle

Durch das ESI-Verfahren kann man davon ausgehen, dass die Moleküle in der Gasphase in etwa eine Energie besitzen, die bei Raumtemperatur liegt. Durch eventuelle Beschleunigung im Skimmerbereich kann es zu Stößen kommen, die die Moleküle aufheizen. Wenn die Skimmerspannung zu hoch ist, führt dies deshalb schon vor Eintritt in die Paul-Falle zur Fragmentierung bei schwachgebundenen Molekülionen. Die Ionen werden durch den mit Helium stoßinduzierten Einfangprozess in der Paul-Falle wieder abgebremst, sodass man annehmen kann, dass die Moleküle in der Falle einige Millisekunden nach dem Einfang eine innere Energie knapp über Raumtemperatur besitzen. Das Erreichen der Raumtemperatur oder tieferen Temperaturen ist allerdings nur durch Kühlen möglich. Durch das angelegte Wechselfeld zwischen Endkappen und Ring der Paul-Falle, kann man außerdem annehmen, dass sich die Ionen auf einer schlaufenförmigen Bahn hin und her bewegen [45]. Dabei werden sie auf ihrer Bahn stabil gehalten, wenn sie folgenden Bedingungen gehorchen (entnommen aus [45]):

$$a_z = -2a_r = -\frac{16e \cdot U_{\pm}}{m_i(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad (7)$$

und

$$q_z = -2q_r = -\frac{8e \cdot U_{\approx}}{m_i(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad (8)$$

mit  $e$ : Ladung;  $U_{\pm}$ : Gleichspannung;  $m_i$ : Masse;  $r_0$ : Radius der Ringelektrode;  $z_0$ : Abstand zu den Endkappen von der Mittelachse aus;  $\Omega=2\pi f$  mit  $f$  als Radiofrequenz der Falle;  $U_{\approx}$ : Radiofrequenzspannung,

wobei  $a_z$  die Ordinate in einem zeitinvarianten Feld und  $q_z$  die Abzisse in einem zeitvarianten Feld darstellt (bei definierter  $z$ -Achse) [46]. Bestimmend für das Speichern der Ionen in der Falle ist das  $a/q$ -Verhältnis bei einem gegebenem Gleich- bzw. RF-Spannungsverhältnis  $U_{\pm}/U_{\approx}$ . Ionen mit unterschiedlichem  $m/z$ -Verhältnis besitzen bei einem gegebenem  $U_{\pm}/U_{\approx}$  unterschiedliche Auslenkungen, welches mit dem Verhältnis  $a/q$  beschrieben werden kann. Je nach angelegtem  $U_{\pm}/U_{\approx}$ -Verhältnis werden die Ionen unterschiedlich stark ausgelenkt, wobei Ionen höherer  $m/z$ -

Verhältnisse näher in der Fallenmitte bleiben als Ionen kleinerer m/z-Verhältnisse. Wird jedoch ein bestimmtes a/q-Verhältnis überschritten, erfolgt ein Auswurf des Ions in axialer Richtung [46]. Die RF-Wechselfelder in der Paul-Falle erzeugen ein Pseudopotential, in dem normalerweise ein großer Bereich von m/z gefangen werden kann. Das Pseudo-Potential folgt aus den Formel 7 und 8 und lässt sich mit Hilfe von Formel 9 beschreiben:

$$D_z = \frac{mq_z^2 \Omega^2 z_0^2}{16 z \cdot e} \quad (9)$$

mit m: Masse;  $q_z$ : Abzisse im zeitvarianten Feld;  $\Omega=2\pi f$  mit f als Radiofrequenz der Falle;  $z_0$ : Abstand zu den Endkappen von der Mittelachse aus;  $z \cdot e$ : Ladung

Beim Isoliervorgang wird nur das gewünschte m/z-Verhältnis in der Falle behalten, alle anderen Ionen werden aus der Falle geworfen. Dies geschieht mit Hilfe einer Veränderung des Pseudo-Potentials D so, dass nur eine Masse stabil umläuft. Die zu isolierenden Ionen werden dabei durch Wechselfeldern an den Endkappen zunächst in ihrer Pendelbewegung in axialer Richtung stärker ausgelenkt bevor sie sich wieder in der Fallenmitte sammeln. Die Radialbewegung ändert sich allerdings bei diesem Vorgang nicht, da sie von der Axialbewegung in dem angelegten Feld unabhängig ist [47].

### Der Schüttelprozess

Zum Aufschaukeln der Ionen wird eine zusätzliche Wechselfeldern an den Endkappen angelegt. Da man die Frequenz dieser zusätzlichen Wechselfeldern konstant halten möchte, muss man die Eigenfrequenz der Masse anpassen. Dazu wird das Potential in der Paul-Falle geeignet angepasst: Die angelegte Fallenfrequenz wird immer gleich, die Amplitude am Ring jedoch unterschiedlich groß gewählt. Durch zusätzliches Anlegen der Schüttelfeldern an den Endkappen wird eine zusätzliche Axialbewegung erzeugt. Die mittlere kinetische Energie der Ionen hängt dabei von der angelegten Spannung U und der Anzahl der Ladungen  $z \cdot e$  des Ions ab

$$\bar{E}_{kin} \sim z \cdot e \cdot U \quad (10)$$

Diese zusätzliche Auslenkung der Ionen benutzt man nun in einer dreidimensionalen Quadrupolfalle, um eine Stoßfragmentierung zu erreichen [48]. Zu beachten ist, dass sich Ionen unterschiedlicher m/z-Verhältnisse nicht auf Bahnen mit gleicher Auslenkung befinden. Ionen mit höherem m/z besitzen eine kleinere Auslenkung und halten sich in der Nähe des Ursprungs auf während Ionen kleinerer m/z eine größere

Auslenkung besitzen [46]. Für den Vergleich von mehrfachgeladenen zu den einfachgeladenen Molekülen bedeutet dies nun ebenfalls eine unterschiedliche Auslenkung, da die Masse des Moleküls zwar gleich bleibt, die Ladung sich jedoch ändert und somit ein kleineres  $m/z$ -Verhältnis bildet.

Wenn man sich nun überlegt, dass die kinetische Energie von der Geschwindigkeit bestimmt wird und Ionen großer  $m/z$ -Verhältnisse nur eine kleine Auslenkung in axialer Richtung vollziehen während Ionen kleinerer  $m/z$  stärker oszillieren, so kann man annehmen, dass auch die kinetische Energie der beiden Ionen eine andere ist. Bei gleicher Amplitude der Anregung kann man also Formel 10 umschreiben und sagen, dass die Auslenkung  $X$  mit

$$X \sim z \cdot e \cdot U_{\text{Schüttel}} \quad (11)$$

korreliert, wobei  $z \cdot e$  die Ladung des Ions und  $U_{\text{Schüttel}}$  die Schüttelspannung ist. Da das elektrische Feld bei einer angelegten Spannung gleich ist, hängt nach Formel 10 und Formel 11 sowohl die Auslenkung als auch die kinetische Energie von der Ladung  $z \cdot e$  ab. Dies führt zu einem Problem beim Vergleich der Stoßfragmentierung von Molekülen gleicher Masse aber unterschiedlicher Ladung, da nun die innere Energie des Ions bei der Dissoziation mit der kinetischen Energie korreliert. Sowohl die Auslenkung als auch die Geschwindigkeit des beispielsweise Zweifachgeladenen muss dementsprechend doppelt so hoch sein. Durch die größere Amplitude des Zweifachgeladenen, die mit einer größeren Auslenkung einher geht, ist vermutlich die Dämpfung durch die Heliumstöße größer, sodass der Energieübertrag in Abhängigkeit der Formel 10 doppelt so groß wird und die interne Energie für das Doppeltgeladene um einen Faktor zwei größer wird als für das Einfachgeladene. Dies ist bei der Betrachtung der Stoßfragmentierungsergebnisse zu berücksichtigen.

## 2.2 Photoanregung von Molekülen – Das Jablonski-Schema

Schon 1933 stellte A. Jablonski fest, dass nach Anregung eines Moleküls in den höher liegenden Zustand  $S_1$  die zugeführte Energie auf verschiedenen Wegen wieder abgeführt werden kann und fertigte ein Schema an, das diese Mechanismen in Beziehung setzt [49,50]. Dieses sogenannte Jablonski-Schema entwickelte sich im Laufe der Jahre zum wichtigsten Diagramm für das Verständnis der Abregung von Molekülen nach elektronischer Anregung. Mit Hilfe weiterer Untersuchungen unter anderem vom M. Kasha [51,52] wurde das Schema ergänzt. In Abbildung 7 ist ein typisches Jablonski-Diagramm dargestellt, welches sich auf ein Molekül mit einem einzigen Chromophor bezieht. Es zeigt die wichtigsten Deaktivierungsprozesse und ist besonders auf Moleküle in Lösung zugeschnitten ist.

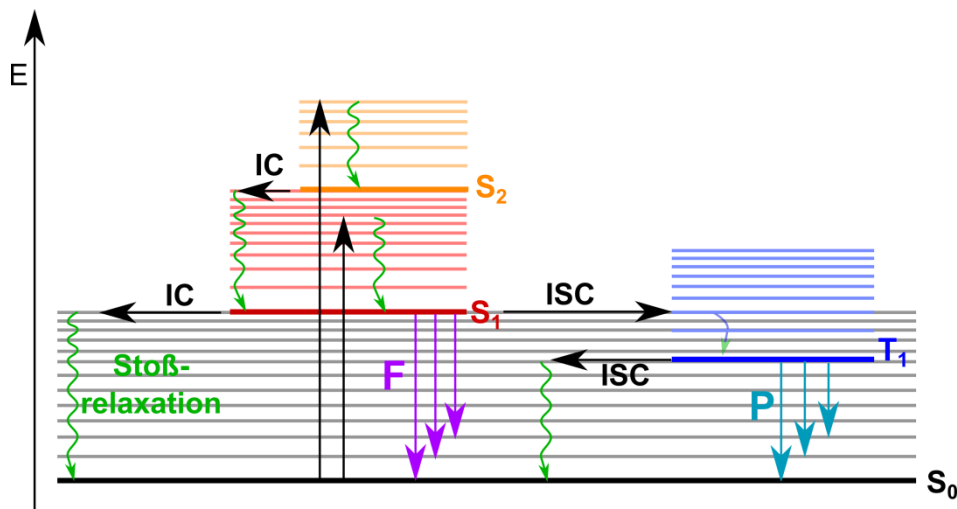


Abbildung 7: Jablonski-Diagramm für ein Molekül mit einem einzigen Chromophor in Lösung. Nach Photoabsorption (schwarze senkrechte Pfeile) in höher gelegene elektronische Zustände kann die zugeführte Energie auf verschiedenen Wegen wieder abgeführt werden, wobei die Stoßrelaxation einen der schnellsten Prozesse darstellt. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Wege kann dem Text entnommen werden.

Absorbiert ein Molekül ein Photon, so kann ein Elektron in höher gelegene Singulettzustände (auch S-Zustände genannt) angehoben werden. Aus dem Grundzustand des ersten angeregten Zustand  $S_1$  kann die Energie auf verschiedenen Wegen wieder abgeführt und das Molekül somit wieder in den Grundzustand  $S_0$  überführt werden. Zum einen kann dies direkt durch Lichtemission geschehen, welche man dann als Fluoreszenz (F) bezeichnet.

Ein strahlungsloser Übergang vom  $S_1$  in höher liegende Schwingungszustände des Triplettzustandes  $T_1$  nennt man *intersystem crossing* (ISC). Dabei wird der Spin des Elektrons umgedreht, sodass bei der analogen Rückführung von  $T_1$  in den  $S_0$  ebenfalls

wieder eine Spinumkehr stattfinden muss. Da das ISC allerdings zu den weniger erlaubten Übergängen gehört, sind die Triplettzustände generell schwierig zu erreichen. Werden sie jedoch besetzt, so sind sie langlebiger als die Singulettzustände. Dennoch ist wegen des ISC von  $T_1$  zu  $S_0$  die Wahrscheinlichkeit für die Photonenemission aus dem  $T_1$  klein. Sie wird als Phosphoreszenz (P) bezeichnet.

Allerdings kann die Energie vom  $S_1$  auch strahlungslos in die isoenergetischen hohen Schwingungszustände des  $S_0$  durch *internal conversion* (IC) umgewandelt werden. Dies ist typischerweise der Hauptprozess im Vergleich zur Fluoreszenz und zum ISC. Da man sich meist in Lösung befindet, wird die Energie dann nachfolgend mit Hilfe von Stößen an andere Moleküle direkt wieder abgeführt, was man demnach als Stoßrelaxation bezeichnet. Insbesondere ist es dem Molekül in Lösung möglich, die Schwingungsanregung in Pico- bis Nanosekunden an die Umgebung abzugeben, weshalb die Stoßrelaxation in einer Lösungsumgebung einer der schnellsten Prozesse zur Energieabführung ist. In großen Molekülen gibt es einen ähnlich schnellen Prozess, nämlich die intramolekulare Energieumverteilung zwischen Schwingungszuständen des Moleküls (*intramolecular vibrational energy redistribution*, kurz IVR). IVR wird jedoch in Lösung oft vernachlässigt.

Da in dieser Arbeit alle Untersuchungen an Molekülen in der Gasphase bzw. im Vakuum stattgefunden haben, muss das Jablonski-Schema angepasst werden. Besonders wichtig ist hierbei die Möglichkeit der strahlungslosen Energieabfuhr aus höheren elektronischen Zuständen in den Grundzustand  $S_0$ . Bei Molekülen in Lösung geschieht dies über IC und nachfolgend über Stoßrelaxation. Letztere ist in der Gasphase aufgrund der Restgasreduzierung durch das Vakuum ( $1 \cdot 10^{-5}$  mbar) sehr eingeschränkt und somit stark verlangsamt. Dadurch entsteht ein Zeitbereich, in dem das Molekül die Energie nicht direkt durch einen Stoß abführen kann. In dieser Zeit kann die Schwingungsenergie der Moleküle in der Gasphase bzw. im Vakuum über IVR umverteilt werden. Das bedeutet, dass nach dem IC-Übergang von  $S_1$  in die höheren Schwingungszustände des  $S_0$  eine Energieumverteilung in die vielen Molekülschwingungen bzw. deren Kombinationen stattfindet. In großen Molekülen bedeutet das IVR auch ein örtliches Verteilen der Energie im Molekül. Erst anschließend kann die Energie über die Stoßrelaxation oder durch Wärmestrahlung abgeführt werden, wodurch diese nun zu den langsamsten Prozessen gezählt werden können.

Da in dieser Arbeit die Dissoziation von Molekülen im Vordergrund steht und diese entweder durch Photonen hoher Energie oder durch niederenergetische Stöße hervorgerufen wird, haben Emissionsprozesse der Moleküle hier keine Bedeutung.

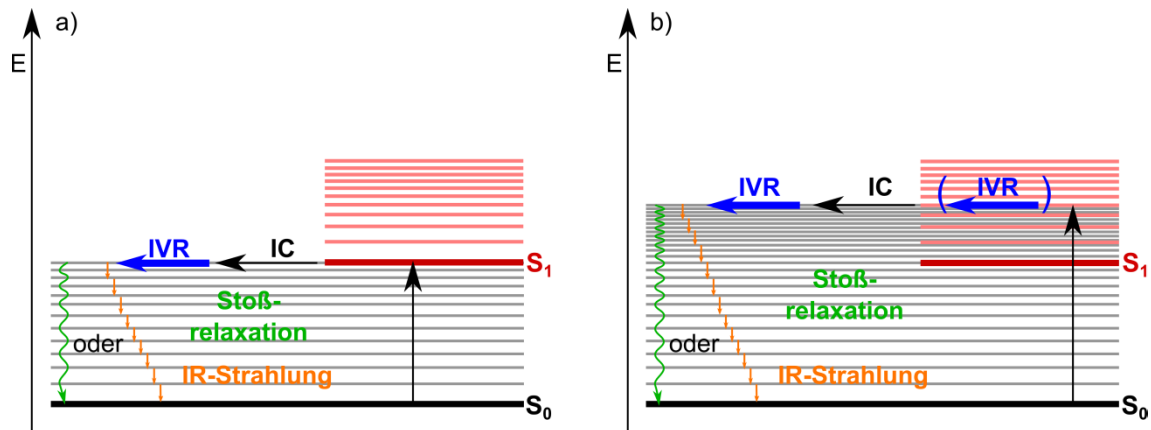


Abbildung 8: Angepasstes Jablonski-Schema für das Vakuum. a) Nach resonanter Anregung in den  $S_1$  kann die Energie nach *internal conversion* mittels IVR im Molekül umverteilt und anschließend erst durch Stoßrelaxation oder Wärmestrahlung abgeführt werden. b) Wird in die höheren Schwingungszustände des  $S_1$  angeregt, so kann möglicherweise zunächst eine Energieumverteilung stattfinden. Vergleichbar schnell kann die Energie in die höheren Schwingungsniveaus des  $S_0$  überführt werden. Dort kann diese dann durch IVR wieder umverteilt werden, bevor sie durch Stoßrelaxation oder Wärmestrahlung abgeführt wird. In beiden Fällen gehören die Stoßrelaxation und die Wärmestrahlung hier zu den langsamsten Prozessen.

Zudem kann bei der hier vorliegenden Arbeit angenommen werden, dass die Lebensdauer des bei der Anregung bevölkerten  $S_1$  kurzlebig ist. Die späteren Messungen zur Photofragmentierung zeigen keine lokalen Bindungsbrüche, die auf eine lokale 2-Photonenabsorption via einem langlebigen  $S_1$  hinweisen. Die zugeführte Energie wird also mit großer Wahrscheinlichkeit mittels IC in die höheren Schwingungen des lokalen  $S_0$  überführt bevor sie mittels IVR in andere Schwingungen des Moleküls übertragen werden kann. Für die Laseranregung bedeutet dies, dass nach jeder Laseranregung das IC und das IVR so schnell ist, dass es praktisch immer nur die gleiche elektronische Anregung aus den zunehmend höheren Schwingungsniveaus des  $S_0$  in den  $S_1$  gibt. Die Anregungsquerschnitte  $\sigma$  bleiben demnach für die nachfolgenden Photoanregungsschritte konstant.

## Multichromophorenanregung

Das Jablonski-Diagramm und viele andere Veröffentlichungen gehen davon aus, dass die Moleküle kompakt sind und nur einen Chromophor besitzen. Bestrahlt man jedoch eine Peptidkette mit der Wellenlänge 193 nm, so stellt jede Peptidbindung ein Chromophor dar [53] (siehe Kapitel 4.1 Überprüfung der Absorption von N-Methylacetamid bei 193 nm S.74f.). Dies unterscheidet eine Peptidkette von Molekülen mit nur einem Chromophor.

Besitzt das Molekül nun mehrere gleiche Absorptionsstellen für die einstrahlende Wellenlänge, so kann jede einzelne auch lokal angeregt werden. In diesem Fall hat jede Photonenanregung die gleiche Wahrscheinlichkeit. Dabei gehen wir davon aus, dass die lokalen  $S_{\pi\pi^*}$ -Zustände kurzlebig sind und schnell durch IC in die höheren Schwingungen des  $S_0$  umgewandelt werden, sodass eine elektronische Doppelanregung unwahrscheinlich ist. Wir gehen also davon aus, dass während der Lichtanregung IC stattfindet und wieder der  $S_0$ -Zustand vorliegt.

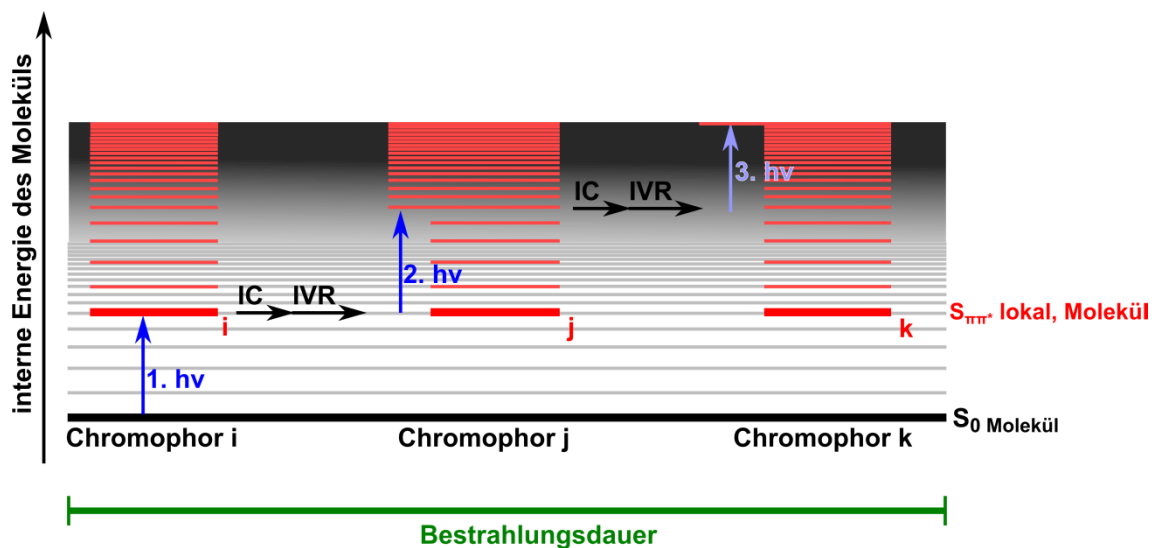


Abbildung 9: Anregungsschema für Moleküle mit mehreren Absorptionsstellen. Durch die Absorption eines Photons kann ein lokaler elektronischer Übergang in den  $S_{\pi\pi^*,\text{lokal } i}$  am Chromophor i stattfinden. Durch *internal conversion* wird die zugeführte Energie zunächst in die höheren Schwingungsniveaus des  $S_{0,\text{lokal}}$  überführt und daraufhin mittels IVR in andere Schwingungen des Moleküls verteilt. Anschließend kann eine weitere  $S_0$ - $S_{\pi\pi^*}$  Anregung in einer anderen (oder wieder der gleichen) Absorptionsstelle  $S_{\pi\pi^*,\text{lokal } j}$  stattfinden. Da durch die vorherige Energieumverteilung diese Absorptionsstelle nun eine höhere interne Energie besitzt, wird durch die nun folgende Absorption die molekulare, interne Energie weiter erhöht.



Zunächst findet also eine lokale Anregung vom  $S_0$  des Chromophors  $i$  in den höheren Energiezustand  $S_{\pi\pi^*,\text{lokal } i}$  statt. Da das Molekül innerhalb des Laserpulses weiterhin bestrahlt wird, kann nun wieder ein Photon aufgenommen werden. Wird nach Absorption des ersten Photons unmittelbar ein zweites Photon im angeregten Zustand aufgenommen, so findet eine lokale Anregung in höhere Singulett-Zustände dieses Chromophors statt. Eine Ionisierung ist hier nicht möglich, da es sich im Massenspektrometer schon um positiv geladene Moleküle handelt. Da die höheren Singulettzustände erfahrungsgemäß immer kurzlebig sind, werden diese kaskadenartig zum  $S_1$  zerfallen. Beachtet man aber, dass in der Gasphase die freigesetzte Schwingungsenergie erhalten bleibt, so hat der  $S_1$  dann beispielsweise 6 eV Schwingungsenergie. Bei dieser hohen Schwingungsanregung im  $S_1$  ist aber das IC sicher extrem schnell. Durch die gute Überschneidung der hohen Singulett-Zustände mit den höheren Schwingungen des  $S_0$  wird der IC sehr schnell vollzogen. Da der  $S_{\pi\pi^*}$  jedoch kurzlebig ist, kann die zugeführte Energie durch das erste Photon auch direkt durch *internal conversion* in den höheren Schwingungszustand  $S_0$  an dieser Stelle überführt werden bevor das zweite Photon absorbiert werden kann. Anschließend kann die Energie mittels IVR in andere Schwingungen des Moleküls weitergeleitet und damit örtlich verteilt werden. Bei einer großen Anzahl an verschiedenen lokalen Absorptionsstellen muss die Photonenenergie nicht dort aufgenommen werden, wo bereits das erste Photon absorbiert wurde, sondern kann von einer anderen Absorptionsstelle ( $S_{\pi\pi^*,\text{lokal } j}$ ) absorbiert werden. Durch das IVR besitzt diese schon eine höhere interne Energie, sodass die interne Energie des Moleküls bei der weiteren Anregung in den  $S_{\pi\pi^*,\text{lokal } j}$  mitgenommen wird. Dieser Vorgang kann sich innerhalb eines Laserpulses so lange wiederholen bis die Dissoziationsgrenze überschritten wird und das Molekül fragmentieren kann. Durch die Vielzahl an Chromophoren in einem Molekül kann also die Absorptionswahrscheinlichkeit und damit die Fragmentierungswahrscheinlichkeit erhöht werden.

### 2.3 Die Rice-Ramsperger-Kassel- (RRK-) und die Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus-Theorie (RRKM-Theorie)

Ob tatsächlich eine Dissoziation im Molekül stattfindet, hängt nicht nur von der zugeführten Energie ab, sondern von der Dissoziationsenergie und auch davon, ob oder wie schnell die Energie vom Ort der Anregung in das Molekül oder in die Umgebung abfließt. Würde die Energie lokal verbleiben, so würde hier immer ein Photon ( $h\nu = 6,4 \text{ eV}$ ) für die Dissoziation reichen. Jedoch kann in großen Molekülen die Energie örtlich sowohl im Nah- wie auch im Fernbereich verteilt werden. Es kommt zu verzögerten oder zu gar keinen Reaktionen. Mit diesem Problem haben sich O. K. Rice und H. C. Ramsperger sowie auch L. S. Kassel eingehend beschäftigt. Sie haben dazu eine Theorie entwickelt, die im Folgenden näher erläutert wird.

Um die unimolekulare Dissoziation eines Moleküls in der Gasphase zu verstehen, wurden schon Anfang des 19. Jahrhunderts theoretische Überlegungen angestellt [54-57]. Es wurde zunächst vermutet, dass die aufgenommene Energie durch Bewegungen aller Art abgeführt werden kann, es sei denn, sie übersteige einen bestimmten Wert, sodass es zu kritischen Bewegungen kommt, die dann in einer Dissoziation enden [56]. Auf Grundlage dieser Überlegungen entwickelten O. K. Rice und H. C. Ramsperger [27,28] zeitgleich mit L. S. Kassel [58,59] eine Theorie, die heute als klassische RRK-Theorie bekannt ist. Dabei wurden folgende Annahmen gemacht [60]:

- I. Es wird dem Molekül eine definierte Energie zugeführt, die nicht an die Umgebung abgegeben wird.
- II. Die Energie kann von einer Schwingungsbewegung zu anderen isoenergetischen Schwingungsbewegungen im Molekül umverteilt werden (IVR).
- III. Kritische Bewegungen korrelieren mit Schwingungen und Dissoziationskoordinaten.
- IV. Ein Molekül mit  $N$  Atomen besteht aus einer Ansammlung von  $3N-6$  klassischen Oszillatoren.
- V. Dissoziation erfolgt, wenn sich ausreichend viel Energie in einem Oszillator konzentriert.
- VI. Es findet weder vor noch nach der Dissoziation eine gravierende chemische Änderung anderer Molekülbereiche statt.

Wichtig für weitere Betrachtungen war dabei Punkt V dieser Annahmen, nämlich dass die Dissoziationswahrscheinlichkeit eines Moleküls nur erfolgen kann, wenn sich die benötigte Energie in einer einzigen Schwingung konzentriert.

Daraus ließ sich folgern, dass es mit steigender Größe des Moleküls (gleichbedeutend mit zunehmender Zahl der Schwingungsmoden) und der Möglichkeit der Energieverteilung über alle Schwingungen immer schwieriger wird, genügend Energie in eine einzelne Bindung zu bekommen. Da in einem großen Molekül die Energie auf die Oszillatoren verteilt werden kann, nimmt die Dissoziationsgeschwindigkeit somit für größer werdende Moleküle ab. Damit es dennoch in endlicher Zeit zu einer Dissoziation kommen kann, muss dem Molekül mehr Energie als die reine Dissoziationsenergie  $D_0$  zugefügt werden. Selbst bei Energien über  $D_0$  kommt es zu einer verzögerten Dissoziation. Man nennt dies einen Zerfall metastabiler Moleküle oder auch einen metastabilen Zerfall. Dies ist die Kernaussage der RRK-Theorie.

Aus den obigen Annahmen I-VI und der starken Vereinfachung, dass sich die  $3N-6$  unterschiedlichen Oszillatoren als  $3N-6$  Oszillatoren einer mittleren Frequenz  $\bar{\nu}$  beschreiben lässt, konnte eine Formel für die Reaktionsgeschwindigkeit einer unimolekularen Dissoziation entwickelt werden [61].

$$k(E) = \bar{\nu} \left( \frac{E-E_0}{E} \right)^{N-1} \quad (12)$$

Mit  $k$  als Geschwindigkeitskonstante,  $\nu$  als Frequenzfaktor,  $E$  als innere Energie des Moleküls,  $E_0$  als kritische Energie für die Dissoziation und  $N$  als Anzahl der Freiheitsgrade.

Wie man in Formel 12 sehen kann, wird als Frequenz eine mittlere Schwingung genommen. Da die Schwingungen aber sehr unterschiedliche Energien besitzen [62], liegt in dieser Annahme eine gewisse Willkür.

R. A. Marcus entwickelte diese Theorie dann in den 1950er Jahren weiter, indem nicht nur die mittlere Schwingung sondern alle Schwingungsfrequenzen explizit berücksichtigt wurden [29,63-65]. Dadurch erhält man eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, die über

$$k(E) = \frac{\sigma G^*(E-E_0)}{h \rho(E)} \quad (13)$$

mit  $k(E)$  als Geschwindigkeitskonstante einer gegebenen Energie  $E$ ,  $\sigma$  als Entartung des Reaktionswegs,  $h$  als Planck'sches Wirkungsquantum,  $G^*(E-E_0)$  als Summe der im Übergangszustand bei der Energie  $E-E_0$  möglichen Energieverteilungen zwischen

Translationen und Schwingungen ( $3N-7$ ) und  $\rho(E)$  als Dichte der Zustände im Molekül ( $3N-6$ ) bei der gegebenen Energie  $E$  beschrieben werden kann [66].

Da nun die Dichte aller Zustände betrachtet wird und besonders die Kombinationsmöglichkeiten dieser von der Summe aller unterschiedlichen vibronischen Zustände abhängt, hat dies Auswirkungen auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für unterschiedlich große Moleküle. Bei kleinen Molekülen ist die Dichte der Kombinationszustände der Schwingungen relativ klein, sodass die zugeführte Energie nach relativ kurzer Zeit in die Reaktionskoordinate der Dissoziation fließen kann. Wird das Molekül jedoch größer, steigt auch  $\rho(E)$  erheblich an. Da  $\rho(E)$  aber von  $3N-6$  Kombinationszuständen der Schwingungen abhängig ist, geht das Größerwerden der Zustandsdichte nicht linear mit der Größe des Moleküls einher, sondern steigt schneller an als die Molekülgröße vermuten lässt. Die Anzahl der Reaktionskoordinaten steigt jedoch nur linear mit der Größe. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich die gesamte, für die Dissoziation benötigte Energie in der Reaktionskoordinate der Dissoziation befindet, nimmt somit für größer werdende Moleküle ab. Da sich nach einer lokalen Anregung die Energie frei über das gesamte Molekül verteilt, kann man auch von einer Art eindimensionalem Wärmeleiter sprechen.

Die freie Energieverteilung über das gesamte Molekül ist allerdings nur bis zu einer gewissen Molekülgröße möglich. Für sehr große Moleküle fanden sowohl E.W. Schlag und R.D. Levine [67] wie auch L. L. Griffin und D.J. McAdoo [66] heraus, dass die Schwingungsrelaxation in einem sehr großen Molekül viel langsamer verläuft als in der RRKM-Theorie angenommen. Dies hat zur Folge, dass die eingebrachte Energie wahrscheinlich lokal in einem Teil des Moleküls verbleibt und sich nicht über das gesamte Molekül verteilen kann. Dadurch wird die effektive Zahl der Freiheitsgrade kleiner, sodass daraus eine schnellere Fragmentierung des Moleküls erfolgt als mit der RRKM-Theorie berechnet [66].

Für die Fragmentierung von Peptidketten in der Gasphase und somit für die Sequenzanalyse ist die Energiefluktuation im Molekül, welche durch die RRKM-Theorie beschrieben wird, ein Hindernis. Wird die Molekülkette zu groß, bleibt sie intakt. In dieser Arbeit wurde versucht einen Weg zu finden, längere Peptidketten trotz RRKM-Bedingungen fragmentieren zu können.

## 2.4 Das *ladder*- und das *ladder-swich*-Modell

Damit es zu einer Fragmentierung im Molekül kommen kann, muss dem Molekül mindestens so viel Energie zugeführt werden, dass seine Dissoziationsenergie überschritten werden kann. Wie im vorangegangenen Kapitel ausgeführt, muss man bei großen Molekülen eine deutlich höhere Energie zuführen als  $E_0$ , um in einer relativ kurzen Zeit eine Fragmentierung zu erhalten. Für eine Laseranregung bei Wiederholraten  $< 100$  Hz verläuft die Anregung des Moleküls in erster Linie durch die Absorption von Photonen während eines Laserpulses. Man kann auch im Vakuum ( $1 \cdot 10^{-5}$  mbar) davon ausgehen, dass die Moleküle bis zum nächsten Schuss wieder thermalisiert sind. Für diesen Photofragmentierungsvorgang bei einem Schuss wurden von Boesl et al. zwei mögliche Modelle beschrieben [68-71], die die Fragmentierung von Benzolderivaten beschreiben: Das *ladder*- und das *ladder-swich*-Modell. Für Benzol konnte man plausibel machen, dass es sich um das *ladder-swich*-Modell handelt.

### Das *ladder-swich*-Modell

Wie erwähnt wurde die Gültigkeit des *ladder-swich*-Modells an relativ kleinen Molekülen gezeigt. Ist der Laserpuls intensiv, so können viele Photonen in einer kurzen Zeit absorbiert werden. Sind die Moleküle klein, so ist es nur eine Frage der Photonenzahl bis die Geschwindigkeitskonstante der Fragmentierung kürzer als die Laserpulsdauer wird. Das Molekül fragmentiert und das Fragment kann, da der Laserpuls noch nicht aus ist, weiter absorbieren (Abbildung 10). Für große Moleküle erwartet man jedoch kleine Geschwindigkeitskonstanten, sodass dieses Modell nicht verwendbar scheint.

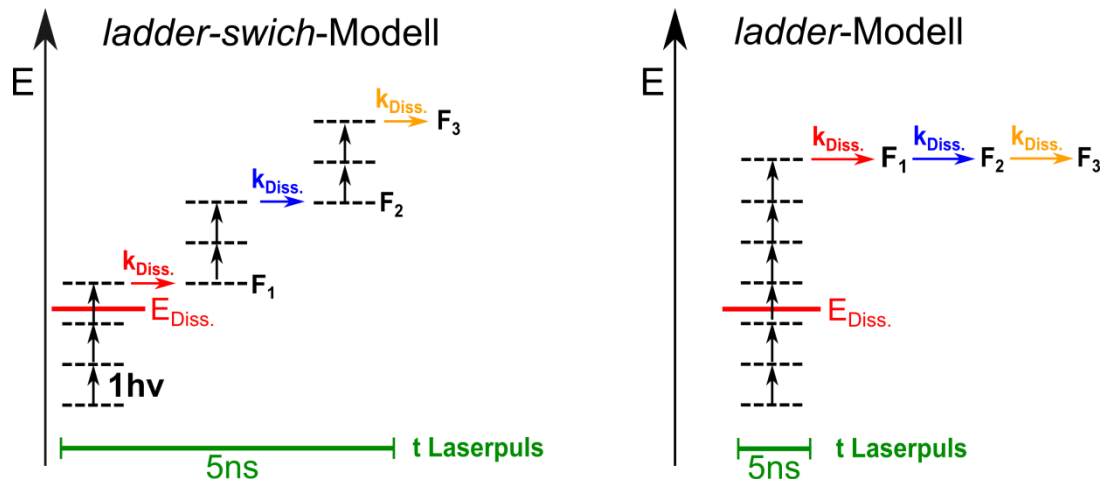


Abbildung 10: Schematische Darstellung des *ladder-* und *ladder-switch-*Modells. Im *ladder-switch-*Modell (linke Seite) zerfällt das Molekül nach Anregung schon während des Laserpulses, sodass die entstehenden Fragmentationen vom Rest des Laserpulses angeregt werden und weiter zerfallen können. Beim *ladder-*Modell (rechte Seite) kann das Molekül innerhalb eines Laserpulses mehrere Photonen aufnehmen (schwarze Pfeile), sodass es anschließend auch sequenziell in Fragment  $F_1$  und bei genügend Restenergie weiter in  $F_2$  bzw.  $F_3$  dissoziieren kann. Reicht die aufgenommene Energie nicht bis zur Dissoziationsgrenze  $E_{\text{Diss.}}$ , findet keine Fragmentierung statt.

### Das *ladder-*Modell

Das *ladder-*Modell beschreibt die sequenzielle Aufnahme von Photonen während eines Laserpulses mit anschließender Fragmentierung (Abbildung 10). Während des Laserpulses addieren sich die Energien der einzelnen Photonen (schwarze Pfeile), sodass die interne Energie des Moleküls um ein Vielfaches der Energie  $h\nu$  ansteigt. Mit dem Ende des Laserpulses besitzt das Molekül somit eine bestimmte interne Energie, sodass es, wenn diese die Dissoziationsgrenze überstiegen hat, zunächst in Fragment  $F_1$  zerfällt. Bei genügend Restenergie kann dieses dann weiter in die Fragmente  $F_2$  bzw.  $F_3$  zerfallen. Je nach Energieüberschuss in Bezug auf die Dissoziationsenergie kann die Fragmentierung dabei schnell (bei hohen Energien) oder langsam (bei kleinen Energien) geschehen.

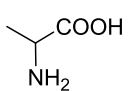
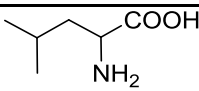
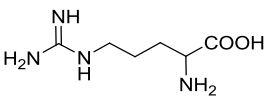
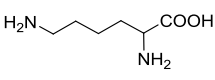
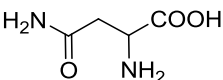
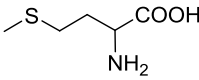
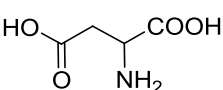
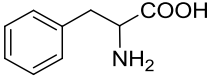
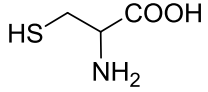
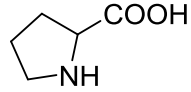
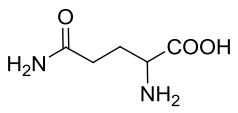
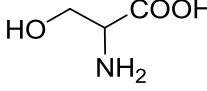
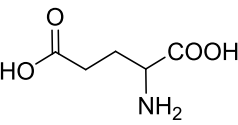
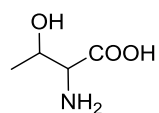
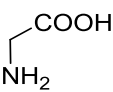
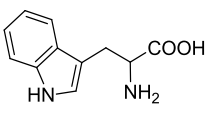
Da hier in der vorliegenden Arbeit allerdings mit relativ großen Molekülen und mit einem Laserpuls von nur 5 ns gearbeitet wurde, kann man annehmen, dass die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante länger ist als die Laserpulsdauer, sodass dieser quasi kurz erscheint. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Fragmentierung eher nach dem Prinzip des *ladder-*Modells funktioniert, sodass dieses für weitere Überlegungen verwendet wurde.

## 2.5 Peptide

### 2.5.1 Aufbau und Nomenklatur

Peptide bestehen aus Aminosäuren, die miteinander über eine Peptidbindung verknüpft sind. Eine Aminosäure besteht aus einer primären Aminogruppe, die mit einer CH-Gruppe verbunden ist, woran sich eine Säurefunktion anschließt. Dieser Aufbau bildet das sogenannte *backbone* und ist bei allen Aminosäuren (mit Ausnahme vom zyklisch aufgebauten Prolin) gleich. Der Unterschied zwischen den einzelnen Aminosäuren besteht nun in der Seitenkette, die sich an der CH-Gruppe befindetet. Je nach Art dieser Kette, besitzt die Aminosäure unterschiedliche Eigenschaften bezüglich ihrer Azidität und Basizität. In Tabelle 1 sind die wichtigsten natürlich vorkommenden Aminosäuren aufgelistet.

Tabelle 1: Die wichtigsten natürlich vorkommenden Aminosäuren mit Struktur und Klassifizierung

Name	Struktur	Klassifizierung	Name	Struktur	Klassifizierung
<b>Alanin</b> Ala (A)		neutral	<b>Leucin</b> Leu (L)		neutral
<b>Arginin</b> Arg (R)		basisch	<b>Lysin</b> Lys (K)		basisch
<b>Asparagin</b> Asn (N)		neutral	<b>Methionin</b> Met (M)		neutral
<b>Asparagin säure</b> Asp (D)		sauer	<b>Phenylalanin</b> Phe (F)		neutral
<b>Cystein</b> Cys (C)		neutral	<b>Prolin</b> Pro (P)		neutral
<b>Glutamin</b> Gln (Q)		neutral	<b>Serin</b> Ser (S)		neutral
<b>Glutamin- säure</b> Glu (E)		sauer	<b>Threonin</b> Thr (T)		neutral
<b>Glycin</b> Gly (G)		neutral	<b>Tryptophan</b> Trp (W)		neutral

Name	Struktur	Klassifizierung	Name	Struktur	Klassifizierung
<b>Histidin</b> His (H)		basisch	<b>Tyrosin</b> Tyr (Y)		neutral
<b>Isoleucin</b> Ile (I)		neutral	<b>Valin</b> Val (V)		neutral

Über eine Kondensationsreaktion kann man nun die verschiedenen Aminosäuren mit einander verknüpfen, wobei immer die Säuregruppe mit der Aminogruppe eine Peptidbindung eingeht (Abbildung 11).

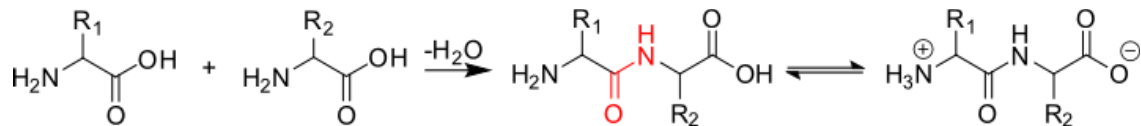


Abbildung 11: Entstehung einer Peptidbindung (rot) durch eine Kondensationsreaktion zweier Aminosäuren. Das entstandene Peptid kann in neutraler, polarer Lösung auch in einer zwitterionischen Form vorliegen.

So entstehen beliebig lange Peptidketten, die bei größeren Kettenlängen auch Proteine genannt werden. Bedingt durch den Aufbau einer solchen Peptidkette spricht man auch von einem N-Terminus und einem C-Terminus, um den Anfang bzw. das Ende einer Aminosäuresequenz zu klassifizieren. Da sowohl Aminosäuren, Peptide als auch Proteine die freie  $\text{NH}_2$ -Gruppe bzw. die Säuregruppe besitzen, können diese im Lösungsmittel in einer zwitterionischen Form vorliegen.

Durch die jahrzehntelange Untersuchung von Proteinen und Peptiden und der daraus resultierenden Fragmentierung hat man sich auf eine einheitliche Nomenklatur dieser Fragmente geeinigt, die die Herrn Roepstorff und Fohlmann entwickelt haben [72]. Da solche Peptidketten und deren Fragmente auch in Massenspektrometern nachgewiesen werden, müssen sowohl die Peptide als auch natürlich deren Fragmente eine Ladung enthalten, um detektiert werden zu können. Für die Fragmentierung von Einfachgeladenen bedeutet dies, dass meistens nur ein entstehendes Fragment diese Ladung trägt. Die Fragmentierung erfolgt meist an der Peptidbindung, wobei ein Bruch zwischen der C-C, C-N oder N-C-Bindung entsteht.



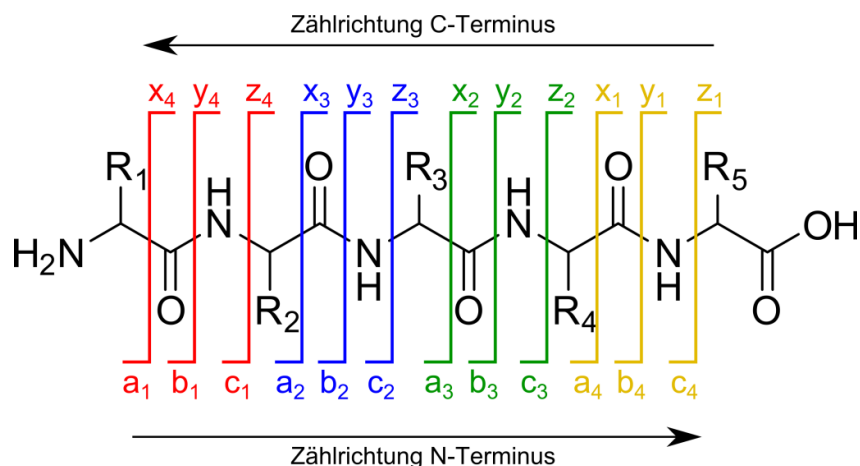


Abbildung 12: Fragmentierungsstellen einer Peptidkette nach Roepstorff und Fohlmann mit den daraus resultierenden Fragmentbezeichnungen. Entstehen geladene Fragmente, die den N-Terminus beinhalten, so spricht man je nach Bindungsbruch von a-, b- oder c-Fragmenten. Dabei werden die einzelnen Peptidbindungen einer Kette vom N-Terminus aus durchnummeriert und äußert sich im Index. Entstehen geladene Fragmente, die den C-Terminus enthalten, so spricht man von x-, y- oder z-Fragmenten. Die Nummerierung der jeweiligen Peptidbindung erfolgt von der C-terminalen Seite aus.

Abbildung 12 zeigt die daraus resultierende Nomenklatur. Entscheidend dafür ist die Position der Ladung. Liegt die Ladung am N-Terminus, so entstehen a-, b- oder c-Fragmente. Befindet sich diese in der Nähe des C-Terminus, werden x-, y- oder z-Fragmente gebildet. Die dahinter stehende Zahl bezieht sich auf die Peptidbindung in der Kette, die gebrochen wird. Dabei ist zu beachten, dass bei den a-, b- und c-Fragmenten die Nummerierung vom N-Terminus aus erfolgt, bei den x-, y- und z-Fragmenten allerdings von der C-terminalen Seite aus.

Mit weiteren Untersuchungen an Peptiden und deren Fragmentierung, hervorgerufen auch durch hochenergetische Prozesse, wurden weitere spezifische Fragmentmuster entdeckt. Biemann et. al. ergänzten die Nomenklatur der Fragmente durch die Definition von zusätzlichen d-, w- und v-Fragmenten [73]. Da meist ein homolytischer Bindungsbruch stattfindet, entstehen Radikalstellen, die dann, zugunsten der Molekülstabilität, durch Abspaltung weiterer Gruppen auch weiterreagieren können. Die hier definierten Fragmente entstehen, wenn zusätzlich zum Peptidbindungsbruch unter Ausbildung einer Doppelbindung entweder die Seitenkette (v-Fragmente) oder aber Wasserstoffradikale (d-/w-Fragmente) abgehen (Abbildung 13).

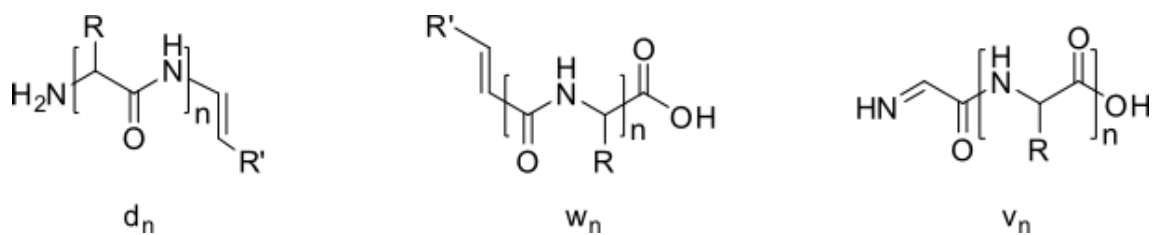


Abbildung 13: Allgemeine Struktur von d-, w- und v-Fragmenten. Durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms entsteht aus einem a-Fragment ein d-Fragment. Ebenfalls durch einen Wasserstoffverlust und Ausbildung einer C-C-Doppelbindung entsteht aus einem z-Fragment ein w-Fragment. Wird die C-N-Bindung gebrochen, kann zusätzlich durch Ausbildung einer Doppelbindung auch die Seitenkette abgehen.

## 2.5.2 Fragmentierung von Peptiden

In dieser Arbeit wurde mit einem ESI-MS gearbeitet, sodass man nur protonierte Peptidketten untersucht hat. Für protonierte Systeme ergeben sich mehrere Möglichkeiten um die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation zu erhöhen. Je nach Art der zugeführten Energie, thermisch oder photoinduziert, ergeben sich möglicherweise auch Unterschiede im jeweiligen Bindungsbruch und der Art der daraus resultierenden Fragmente.

Mit der wachsenden Bedeutung der Fragmente für die Identifikation bzw. Sequenzanalyse von Peptiden und Proteinen wurde auch versucht, einen einheitlichen Dissoziationsmechanismus für die Bildung der Fragmente von protonierten Peptiden zu finden. Allerdings gestaltete sich dies schwierig, denn im Verlauf vieler Studien fand man heraus, dass das Fragmentmuster von vielen Faktoren abhängt, wie beispielsweise [25,26]

- der Aminosäurezusammensetzung der Peptide
- der Größe bzw. Länge der Peptidkette
- der Anregungsmethode (*high-* oder *low-energy*, Stoß- oder Laseranregung)
- der Zeitskala der Stoßrelaxation
- der Ladungsstelle im Peptid
- der Ladungszahl

Bei den Studien hat sich ein Modell herauskristallisiert, welches im Folgenden genauer erläutert wird.

### 2.5.2.1 Ladungsgesteuerte Dissoziation - Das *mobile proton model*

Schon früh wurde die Vermutung geäußert, dass die Fragmentierung in protonierten Systemen in Zusammenhang mit einem intramolekularen  $H^+$ -Transfer stattfindet [74,75]. Erst auf Basis vieler weiterer Studien unter anderem durch Wysocki [76-78], Gaskell [79-82], Harrison [83,84] und Boyd [85,86] hat sich ein Modell entwickelt, welches *mobile Proton model* genannt wird. Die Kernaussage dieses Modells besteht darin, dass die Fragmentierung eines protonierten Peptids durch Wanderung und anschließender Lokalisation der Ladung an einer spezifischen Stelle im Molekül hervorgerufen werden kann [26]. Unterteilt man den Vorgang einer Dissoziation in drei konsekutive Prozesse, nämlich vor, während und nach der eigentlichen Dissoziation, so beschäftigt sich dieses Modell ausschließlich mit den Effekten vor einer Dissoziation wie den Protonentransferreaktionen und der Isomerie [25]. Neben den experimentellen Studien (auch auf Basis von Deuterium-Austauschreaktionen [74,83,87]) wurden zudem theoretische Rechnungen mit Hilfe der RRKM-Theorie angefertigt. Dabei wurde herausgefunden, dass durch Anlagerung des Protons an den Stickstoff einer Peptidbindung diese geschwächt wird [88,89]. Lagert sich das Proton allerdings an den Sauerstoff einer Peptidbindung an, so wird sie gestärkt. Jedoch kann man nicht allgemein sagen, dass sich das Proton deshalb nur an den Sauerstoff anlagert. Durch die energetische Anregung entsteht eine Tautomeren-Population, die auf allen Protonierungsstellen Beiträge hat, sodass es auch zur Anlagerung des Protons an den weniger bevorzugten Stellen des Stickstoffs einer Peptidbindung kommen kann. Neben der Energieabsenkung der Bindungsenergie ermöglicht die Anlagerung auch nucleophile Angriffe durch Seitenketten oder endständige Gruppen [25], welches dann über verschiedene Reaktionskanäle zur Dissoziation führen kann. Da bei hohen Energien die Anlagerung des Protons prinzipiell an jeder einzelnen Peptidbindung erfolgen kann, sind dementsprechend viele Reaktionskanäle möglich.

Die obigen Betrachtungen zu den Geschwindigkeitskonstanten zu verschiedenen Dissoziationsenergien legen nahe, dass nun nur noch eine proton-induzierte Fragmentierung beobachtet werden sollte. Ob die Protonenwanderung allerdings mit der direkten Dissoziation des Moleküls konkurrieren kann, hängt vom Molekül ab. Denn damit sich das Proton im Molekül bewegen kann, muss zunächst Energie zugeführt werden. Die Energie für die Protonenwanderung ist jedoch nicht immer gleich, da auf Grund der Gasphasenbasizität einzelner Aminosäuren das Proton in der Seitenkette unterschiedlich stark an sich gebunden wird. Je basischer eine Aminosäure ist, desto stärker ist auch die Bindung des Protons an diese, sodass eine Stufe für die Wanderung entsteht. Ausgehend von Arginin (benötigt am meisten Energie für eine Protonenwanderung) über Lysin bis hin zu den nicht basischen Aminosäuren nimmt

diese Stufe ab [77,90-92]. Die Gasphasenbasizität hat allerdings nicht nur Auswirkung auf die benötigte Energie sondern auch auf die Art der Fragmente. So können zum Beispiel nicht-sequenzielle Dissoziationen wie ein H<sub>2</sub>O- oder NH<sub>3</sub>-Verlust entstehen oder aber sequenzielle Fragmente, die durch einen Bindungsbruch am *backbone* definiert sind. Der genaue Ablauf dieser Mechanismen kann in Quelle [25] nachgelesen werden. Allgemein hängt also die Dissoziation eines Peptids von der kinetischen und energetischen Erreichbarkeit im Sinne der Reaktivität aktiver Stellen und von der Reaktionskonstante des Bindungsbruches mit und ohne Proton ab.

Das *mobile proton model* und die damit verbundene Protonenwanderung greift immer dann, wenn *low-energy* Methoden angewendet werden. Beim *low-energy* Prinzip wird das Molekül langsam z.B. durch thermisches Heizen an seine Dissoziationsschwelle herangeführt. Dabei konnten neben der Dissoziationsdynamik auch die Dissoziationsenergien für einzelne Systeme durch energieaufgelöste *collision induced dissociation* (CID) bzw. *surface induced dissociation* (SID) für kleine Moleküle [93,94] und *blackbody infrared dissociation* (BIRD) für mittlere bis große Moleküle [95] gemessen werden.

Wird die Energie über Photonen in das System eingebracht, befindet man sich auf einem *high-energy* Weg. Für *high-energy* Methoden konkurriert das *mobile proton model* mit neutralen Reaktionswegen, da es beispielsweise durch die Anregung mit hoher Energie zu relativ schnellen direkten Bindungsbrüchen kommen kann.

### 2.5.2.2 Die Dissoziation von mehrfachgeladenen Peptidketten

Trägt das Molekül mehrere Ladungen, so können weitere Reaktionskanäle angesprochen werden. Schaut man sich zunächst die Coulombabstoßung zwischen den Ladungen im Molekül an, so stellt man fest, dass diese der Flexibilität des Moleküls und somit die Konformerenvielfalt bezüglich der Biegeschwingungen eingeschränkt ist. Durch die Einschränkung kann die zugeführte Energie nun nicht mehr über diese Schwingungen und durch Konformerenumbildung zusätzlich abgeführt werden, sodass die Zustandsdichte  $\rho(E)$  kleiner wird und das Molekül somit schneller fragmentieren kann. Die Art und Intensität der Einschränkung hängt dabei allerdings stark von der Kettenlänge und der Anzahl der Ladungen ab. Ist die Peptidkette kurz und zweifach protoniert, verhält es sich starrer als ein zweifach protoniertes langkettiges Peptid.

Wenn man von Konformeren spricht, muss man sich auch die Sekundärstruktur eines Moleküls anschauen. Befindet sich eine Peptidkette in einer  $\alpha$ -helikalen Struktur, so besitzt es mehr Wasserstoffbrückenbindungen als sein nichtgefaltetes Pendant. Durch die zusätzlichen Wasserstoffbrücken liegt das  $\alpha$ -helikale Molekül mit seiner Dissoziationsenergie energetisch höher, da die Energie zusätzlich über diese verteilt werden kann. Das aufgefaltete Pendant besitzt zwar mehr Konformere, allerdings liegt es dennoch energetisch näher an der chemischen Dissoziationsgrenze.

Wegen der Coulombabstoßung entsteht auch eine Herabsenkung von  $E_0$  im Vergleich zum Einfachgeladenen. Die Energiedifferenz von  $E_0$  zwischen dem Einfach- und dem beispielsweise Zweifachgeladenen wird allerdings geringer, je größer das Molekül wird.

Weiterhin kann durch die Coulombabstoßung auch die Protonenwanderung innerhalb der Kette eingeschränkt werden. Dabei können manche Stellen in der Kette entweder nur langsam oder gar nicht mehr erreicht werden. Zudem kann die Anlagerung eines Protons durch *large amplitude motion* (also durch das Rückfalten der Kette zu sich selbst) ebenfalls durch die zweite Ladung behindert werden, sodass eine Protonübertragung an das *backbone* nicht mehr stattfinden kann.

In dieser Arbeit wurden sowohl einfach- als auch mehrfachgeladene Systeme anhand der oben genannten Aspekte untersucht. Dabei wurden auch die Kettenlängen variiert, um zu klären, welcher Effekt für die Dissoziation dominant ist und ob es durch diese Erkenntnisse eine Möglichkeit ergibt, eine Sequenzanalyse zu erhalten.

## **2.6 Fragmentierungsmethoden für biologische Systeme in Massenspektrometern**

Mit der Entwicklung der verschiedenen Ionisationsmethoden für die Massenspektrometrie stellte man schnell fest, dass die Moleküle nicht nur ionisiert sondern teilweise auch fragmentiert wurden. Erst McLafferty [23,96-98], Jennings [99] oder auch Beynon [100-103] erkannten, dass die Fragmentierung von Molekülen zu ihrer chemischen Strukturaufklärung beitragen konnte, sodass es fortan eine Möglichkeit der Identifikation unbekannter Substanzen in allen erdenklichen Bereichen gab [7-9,104,105].

Durch die Entwicklung der Tandem-Massenspektrometrie, bei der man nun einzelne m/z-Verhältnisse isolieren und fragmentieren konnte, und der Weiterentwicklung von Fragmentierungsmethoden entstanden viele unterschiedliche Möglichkeiten um eine Dissoziation hervorzurufen. Die Wahl der Methode hängt allerdings vom gewünschten Ergebnis ab, da je nach Methode auch unterschiedliche Fragmentierungsmuster entstehen oder aber, was bei der Identifikation essenziell ist, die Datenbanken nur auf Basis einer bestimmten Fragmentierungsmethode existieren. Heutzutage unterscheidet man bei den vielen verschiedenen Fragmentierungsmöglichkeiten grob zwischen stoß- und photoinduzierten Methoden, welche im Folgenden kurz erklärt werden.

### **2.6.1 Stoßinduzierte Fragmentierungsmethoden**

Wie die Überschrift schon impliziert, handelt es sich bei solchen Methoden um Fragmentierungen, die durch Stöße hervorgerufen werden. Dabei kann unterschieden werden zwischen den Begriffen [106]:

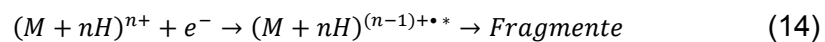
- Dissoziationsmethoden
- Aktivierungsmethoden

Bei Dissoziationsmethoden im Allgemeinen können Stöße auch zunächst die Ionen verändern, bevor diese in ihre Fragmente zerfallen. Formel 14 soll als Beispiel für einen solchen Dissoziationsverlauf dienen. Unter Aktivierungsmethoden versteht man eine spezielle Form der Dissoziationsmethode, da man den Ionentyp bei der Anregung durch Stöße nicht verändert.

Als Beispiele für die jeweiligen Methoden dienen die *electron capture dissoziation* (ECD) und die *collision-induced dissoziation* (CID), welche im Folgenden näher erläutert werden.

#### 2.6.1.1 electron capture dissoziation (ECD)

Unter *electron capture dissoziation* versteht man die Anlagerung von niederenergetischen Elektronen ( $\leq 0,2$  eV [107]) an positiv geladene Ionen, sodass Radikalkationen entstehen, die anschließend fragmentieren können (Formel 14 mit  $n$  als Anzahl der Ladung,  $e^-$  als Elektron und  $(M+nH)^{(n-1)+\bullet}$  als angeregtes Radikalkation) [106].

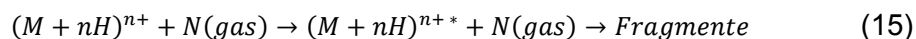


Durch genauere Untersuchung wurde ein Mechanismus postuliert, bei dem sich das Elektron an eine protonierte Stelle in der Peptidkette, wie der N-terminalen Aminogruppe, der Guanidin-Gruppe des Arginins oder dem Histidin [107], anlagert. Bei diesem Einfangen des Elektrons werden je nach Ladung des Moleküls 10-20 eV lokal frei. Es werden so Radikalintermediate bildet, die anschließend zu einem Bindungsbruch und somit einer Fragmentierung führen können [108-111].

Zudem wurde diese Art von Fragmentierung als nicht-statistische Dissoziation postuliert [20,111], was bedeutet, dass die Verteilung der aufgenommenen Energie langsamer verläuft als der Bindungsbruch an sich [112]. Dadurch erhöht sich die Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{Diss}}$ . Und es entstehen mehr Fragmente, was bei einer Sequenzanalyse oder einer Identifikation ein Vorteil sein kann. Mit Hilfe dieser Methode in Zusammenhang mit der FT-ICR-Methode können sogar Peptide bis zu einer Masse von 45 kDa fragmentiert werden [113].

#### 2.6.1.2 collision-induced dissoziation (CID)

Bei der CID stoßen die Ionen mit neutralen Atomen oder Molekülen, wobei es wichtig ist, dass die Stoßpartner inert sind, da es ansonsten zu unerwünschten Folgereaktionen mit den zu untersuchenden Ionen kommen könnte. Geht man bei solchen Stoßprozessen von inelastischen Stößen aus, so kann ein Energieübertrag vom Stoßpartner auf das Ion stattfinden, sodass es zu einer Energieanhebung in diesem kommt (Formel 15 [106] mit  $n$  als Anzahl der Ladung,  $N$  als Stoßpartner und  $(M+nH)^{n+}$  als angeregtes Ion).



Während in der klassischen Massenspektrometrie ein Stoß bei hoher Energie gemacht wurde, so wendet man bei der modernen Massenspektrometrie heutzutage viele Stöße bei niedriger Energie an. Durch weitere Stöße nimmt das Molekül dann immer mehr Energie auf, welche sich dann auch in der internen Temperatur des Moleküls wiederfindet. Man spricht dann davon, dass das Molekül immer heißer wird. Das bedeutet, dass die interne vibronische Energie des geschüttelten Moleküls immer weiter in Richtung Dissoziationsenergie angehoben wird. Schließlich ist die Grenze erreicht, bei der das Molekül statistisch genügend Energie in eine Bindung bekommt und dissoziiert.

Über die Jahre haben sich zwei verschiedene Arten der CID herauskristallisiert, die sich in ihrer Fragmentbildung unterscheiden.

#### 2.6.1.2.1 *high-energy CID*

Unter der *high-energy* CID-Methode versteht man Stoßprozesse, bei der meist Energien größer 1 keV benutzt werden [114]. Dabei kann schon bei einem Stoß so viel Energie übertragen werden, dass das Ion dissoziiert. Daraus können in Peptiden Fragmente aller Art resultieren, sowohl Fragmente durch Brüche am *backbone* als auch seitenkettenspezifische Fragmente [21,73]. Diese Methode erzeugt ähnliche Spektren wie die Elektronenstoßionisationsmethode (EI), die möglicherweise auf Grund einer vergleichbaren Energieverteilung und einem ähnlichen Zeitfenster bedingt sind [115]. Zu beachten ist jedoch, dass aus bisher unbekanntem Gründen mit Hilfe der EI keine Moleküle untersucht werden konnten, die thermisch instabil sind [116], sodass diese Methode für Peptide oder Proteine nicht relevant ist.

#### 2.6.1.2.2 *low-energy CID*

Im Gegensatz dazu steht die *low-energy* CID, bei denen der Stoßpartner eine Energie kleiner 100 eV besitzt [117]. Durch die niedrige Energie muss das Ion mehrfach kollidieren, bevor es genügend Energie besitzt um zu fragmentieren. Dabei entstehen vermehrt b- und y-Fragmente, aber auch Fragmente mit H<sub>2</sub>O-, NH<sub>3</sub>- oder CO-Verlust, welcher auch an den Seitenketten entstehen kann [114]. Zudem ist ebenfalls die Erzeugung von innerkettigen Fragmenten wegen den Multikollisionen möglich [79].



Dies ist allerdings nur eine vereinfachte Darstellung. Damit es zu einer Dissoziation kommen kann, muss noch auf andere Faktoren geachtet werden, wie beispielsweise

- auf den Druck des Stoßgases, der Einfluss auf die Häufigkeit der Stöße hat,
- die anfangs vorhandene Energie des Stoßgases sowie des zu untersuchenden Ions und
- auf Stöße, die einen Energierückübertrag vom Ion zum Stoßpartner machen können, welches einen Kühleffekt zur Folge hat.

Auf diese Faktoren wird in Kapitel 2.6.1.3 noch näher eingegangen.

Bei Untersuchungen mit verschiedenen neutralen Stoßpartnern (z.B. He, Ne, Ar) hat sich gezeigt, dass die Art des Stoßgases keinen Einfluss auf das Verhältnis der Fragmentintensitäten untereinander hat [98], sich jedoch die Ausbeute der Fragmente und der Wirkungsquerschnitt bei kleiner werdender Größe des neutralen Stoßpartners erhöht, sodass sich Helium als besonders geeignet heraus gestellt hat [115].

Die Vorteile bei einer CID sind, neben der kostengünstigen Anschaffung, generell ihre Effizienz und die universelle Einsetzbarkeit [106], sodass mit der CID schon viele unbekannte Strukturen identifiziert und Sequenzen von Biomolekülen analysiert werden konnten [22,118-120]. Zudem ist die maximal zugeführte Energie meist bekannt, sodass man Dissoziationsenergien abschätzen kann.

In dieser Arbeit wurde zur Fragmentierung von Peptidketten die *low-energy* CID mit Helium als Stoßpartner benutzt. Das häufige Stoßen der schnellen Ionen mit Helium und das damit einhergehende langsame Aufheizen des Moleküls können einen Hinweis auf die Dissoziationsenergie geben: Die minimale Schüttelamplitude, die angelegt wird um eine erste Fragmentierung zu erreichen, sollte zur Dissoziationsenergie korrelieren. Zudem wird die Sekundärstruktur der Peptidkette aufgebrochen, was für die Sequenzanalyse von Vorteil sein kann. Die Ergebnisse dieser Methode sind in Kapitel 4.3 zu sehen.

### 2.6.1.3 Heizen und Kühlen durch multiple Stoßprozesse

Wie schon oben erwähnt, hängt die durch Stöße hervorgerufene Dissoziation von unterschiedlichen Parametern ab, die in verschiedenen publizierten Arbeiten hinreichend untersucht wurde [47,121,122]:

- Die kinetische und innere Energie des Ions bzw. des Stoßgases
- Die Art des Stoßens (frontale Stöße, seitliche Stöße)
- Die Druckabhängigkeit (wie oft kann das Ion mit He stoßen?)
- Die Akkumulationszeit (wie lange ist das Ion den Stößen ausgesetzt?)

Wenn das Ion mit dem He-Atom stößt, kann es die kinetische Energie von diesem (teilweise) aufnehmen. Mit dieser dann höheren internen Energie trifft es nun auf ein weiteres He-Atom, wobei es wiederum Energie zugeführt bekommt.

Allerdings ist dieser Vorgang nicht so einfach. Denn wenn ein Ion auf seinen Stoßpartner trifft, kann es nicht nur Energie aufnehmen sondern auch abgeben. Man spricht dann von einem Kühleffekt, welcher schon vor langer Zeit untersucht wurde [122]. Ist die innere Energie des Ions hoch, so kann auch wieder Energie abgegeben werden. Bei konstanter Schüttelamplitude erreicht die innere Energie ein Gleichgewicht. Man muss also mit einer gemittelten Stoßenergie rechnen. Zudem ist herauszufinden, wie oft das Ion mit einem He-Atom stoßen kann. Dieses hängt zum Einen von der Anzahl der Heliumatome ab (Druck) und zum Anderen auch von der Geschwindigkeit, mit der sich beide Moleküle im Schwerpunktssystem bewegen. Außerdem ist die Dauer wichtig, in der die Ionen den vielen Stößen ausgesetzt sind. Eine Vorhersage der effektiven Temperatur der Ionen unter Berücksichtigung dieser Parameter wurde von McLuckey et. al. versucht [123].

Betrachtet man die Energetik eines Stoßvorgangs im Allgemeinen, so kann man sagen, dass beim Stoßen sowohl die rein kinetische ( $E_{kin}$ ) als auch die innere Energie ( $E_{int.}$ ) des Ions sowie des neutralen Stoßpartners Helium eine Rolle spielen. Da Helium einatomig ist, besitzt es nur kinetische Energie, sodass man den energetischen Zusammenhang zwischen Ion und Stoßpartner folgendermaßen zusammenfassen kann [47]:

$$E_{kin,0}^{Ion} + E_{int,0}^{Ion} + E_{kin,0}^{He} = E_{kin,f}^{Ion} + E_{int,f}^{Ion} + E_{kin,f}^{He} \quad (16)$$

$E_0$  stellt in diesem Zusammenhang die jeweilige Energie vor dem Stoß dar,  $E_f$  die finale Energie, die das Ion bzw. Heliumatom nach dem Stoß besitzt.

Ist ein Molekülion langsam und wird nicht durch Stöße sondern durch Photonen angeregt, so besitzt das Ion durch die Aufnahme eines Photons eine hohe interne

Energie. In Anwesenheit von Stoßpartnern kann es nun jedoch umgekehrt zu einem Kühleffekt kommen. Glish et al. haben herausgefunden, dass das Herunterkühlen eines Ions auf Raumtemperatur durch Stöße je nach Größe der internen Energie des Ions und je nach Stoßquerschnitt und Druck in einer Paul-Falle zwischen 2 und 20 ms liegen kann [47,121,122]. Dabei finden typischerweise ca. alle 1 – 10  $\mu$ s ein Stoß statt. Die interne Energie wird somit schrittweise abgebaut

Wegen dieses Kühleffekts wurden alle photoinduzierten Fragmentierungsversuche in dieser Arbeit sowohl mit Helium in der Falle als auch ohne Helium durchgeführt. Bei den Arbeiten ohne Helium in der Falle konnten allerdings aufgrund des Restgases, welches von vorne in die Falle eintreten kann, Stöße nicht vollständig verhindert werden. Dennoch wurden die Stöße durch das Blockieren der Heliumzuleitung so eingeschränkt, dass die Stoßzeit vermutlich verlängert wurde.

## 2.6.2 Photoinduzierte Fragmentierungsmethoden

Der Unterschied zwischen stoß- und photoinduzierten Fragmentierungsmethoden liegt in der lokalen Adressierbarkeit der Ionen. Während Fragmentierungen durch Stöße eher nicht-spezifisch verlaufen und deshalb universell einsetzbar sind [106], können durch photoinduzierte Fragmentierungsprozesse oft nur spezifische Bereiche, die bei der verwendeten Wellenlänge absorbieren, angeregt und somit wellenlängenabhängige Informationen von Molekülen gewonnen werden. So kann zum Beispiel durch 266 nm die aromatischen Seitenketten von Peptidverbindungen angeregt werden [124-127], während durch Infrarotstrahlung das Molekül mehrheitlich als Ganzes erwärmt wird bis es dissoziieren kann. Natürlich kann man die Hoffnung haben, dass eine lokale Anregung auch einen lokalen Bindungsbruch liefert und sich somit mit anderen Fragmentierungsmethoden ergänzt.

Generell kann man die photoinduzierten Fragmentierungsmethoden in zwei Gruppen unterteilen, die

- Infrarot-Multiphotonen-Dissoziation (IRMPD)
- Ultraviolett-Photodissoziation (UV-PD)

Wie bei der *low-energy* CID kann die IRMPD (auch eine *low-energy* Methode) als eine Art Heizmethode betrachtet werden, wobei hier Moleküle durch Infrarotstrahlung thermische Energie aufnehmen und so langsam zu ihrer Dissoziationsschwelle herangeführt werden. Als Beispiel kann die *blackbody infrared dissociation* (BIRD) angeführt werden, welche von Williams et al. entwickelt wurde [24]. Dabei werden die Kammerwände eines Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometers (FT-ICR-MS) geheizt, sodass die entstehende Infrarotstrahlung auf die Ionen in dieser Kammer übergehen kann. Durch Variation der Temperaturen können verschiedene Fragmentierungsmuster (Unterschiede in Fragmentintensität und/oder Fragmente) entstehen, sodass diese Methode Rückschlüsse auf die Energetik und Dynamik von Molekülen und deren Dissoziationen zulässt [95].

Die UV-PD spricht dagegen durch die Wahl der Wellenlänge gezielt Chromophore in der Peptidkette an, sodass diese angeregt werden können. Dabei variieren die bisher verwendeten Wellenlängen von 355 nm [124], über 266 nm [125,126] bis hin zu 193 nm [30,31,128] und 157 nm [129-131], wobei die ersteren eher die aromatischen Seitenketten ansprechen, während die beiden letzteren Wellenlängen auch die Peptidbindung anregen können [53,132,133]. Diese Bandbreite von Anregungen ermöglicht eine andere Art von Fragmentvariation als bei der CID oder ECD, sodass die UV-PD ebenfalls zur Strukturaufklärung im Sinne einer Sequenzanalyse genutzt

wird. Durch die Wahl der Wellenlänge und der dazugehörigen Energie kann dies auch als eine *high-energy* Methode betrachtet werden. Wird diese zur Fragmentierung von Peptidketten benutzt, so entstehen andere Fragmentierungsmuster wie bei einer *low-energy* Methode, da die C-C-Bindungsenergie in der Peptidbindung nach Anlagerung des Protons stark herabgesenkt wird und es so vermehrt zu a-Fragmenten kommt [134]. Bei den *low-energy* Methoden ist die C-N-Bindung nach Anlagerung eines Protons die schwächste Bindung, sodass dadurch vermehrt b- und y-Fragmente entstehen.

Vergleicht man die stoß- und photoinduzierten Methoden im Allgemeinen, so besitzen beide Vor- und Nachteile. *Low-energy* Methoden können statistische Fragmentierungen hervorrufen und für jede Art von Molekülen angewendet werden, wobei auch die Energetik und Dynamik von Molekülen untersucht werden kann. Allerdings braucht man für größere Moleküle aufgrund der Effekte durch die RRKM-Theorie mehr Energie als bei kleineren, sodass diese Methoden an ihre Grenzen kommen. Bei den *high-energy* Methoden können auch nicht-statistische und seitenkettenspezifische Fragmentierungen entstehen, sodass es eine größere Variation in den Fragmenten gibt und damit eine bessere Möglichkeit der Strukturaufklärung entsteht. Allerdings ist man auch hier durch das RRKM-Verhalten limitiert. Zudem entstehen Probleme bei der Identifizierung von Peptiden in einer Datenbank, wenn es zu mehreren gleichzeitigen Bindungsbrüchen innerhalb der Peptidkette kommt und somit viele sogenannte innerkettige Fragmente entstehen. Bei den photoinduzierten Methoden muss je nach Wellenlänge außerdem darauf geachtet werden, dass sich auch wellenlängenspezifische Chromophore in dem zu untersuchenden Molekül befinden, da ansonsten kaum eine Anregung möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden Fragmentierungen sowohl durch Stöße als auch durch Photonen hervorgerufen. Dabei konnte die Wahl der Fragmentierungsmethode unterschiedliche Rückschlüsse auf das Fragmentierungsverhalten des Moleküls zulassen. Während man durch die *low-energy* CID mehrheitlich die Dissoziationsenergie des Moleküls betrachten kann, so kann man durch die Photoanregung in einem kühlenden Restgas eher Rückschlüsse auf die Reaktionsgeschwindigkeit erhalten. Durch Messen sowohl mit Helium in der Falle während der Bestrahlung als auch ohne, hat man sich erhofft, sogar Fragmentierungskanäle, die aus verschiedenen Mechanismen stammen, zu erkennen.

Mit Hilfe von unterschiedlichen Fragmentierungsmethoden wurde schon früher versucht, durch Kombination der Fragmentspektren, Rückschlüsse auf den Aufbau der Peptidkette und somit eine Sequenzanalyse zu entwickeln [31]. Auch in dieser Arbeit

hat man beide Fragmentierungsmethoden verwendet, um Rückschlüsse auf die Sequenz von Peptiden zu erhalten. Neben Untersuchungen an Molekülen, bei denen immer nur eine bestimmte Gruppe abgespalten werden sollte (die sogenannten *caged compounds*), wurden hier auch Peptidketten mit Hilfe einer VUV-Lampe mit einer Wellenlänge von 126 nm untersucht. Da allerdings durch die harte UV-Strahlung und des breiten Lichtstrahls viel Untergrund gebildet wurde, hat man in dieser Arbeit den Fokus neben der *low-energy* Stoßfragmentierung auf die photoinduzierte Fragmentierung mit Hilfe von 193 nm Wellenlänge gelegt.

## 2.7 Photoinduzierte Anregung

### 2.7.1 Die Lichtquelle Laser: Das Laserprinzip

Mit Entdeckung der induzierten Emission von angeregten Atomen durch A. Einstein 1917 [135] wurde der Grundstein für die Entwicklung des Lasers gelegt. Das Wort Laser ist eigentlich eine Abkürzung für *light amplification by stimulated emission of radiation* (Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung), allerdings ist die Abkürzung in unserem Sprachgebrauch wegen der vielen Anwendungen heutzutage nicht mehr wegzudenken. Dabei versteht man unter Laserstrahlung energiereiche Strahlung einer Wellenlänge, die sowohl in Phase als auch in Ausbreitungsrichtung gleich sind.

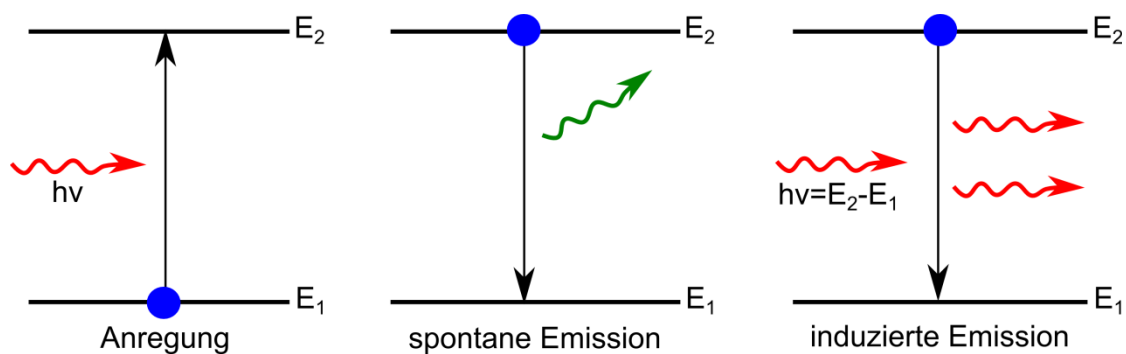


Abbildung 14: Vorgang der spontanen und induzierten Emission [136]. Nach Anregung in den Zustand E<sub>2</sub> kann durch Emission von Lichtquanten das Elektron wieder in den Grundzustand E<sub>1</sub> gelangen. Bei einer spontanen Emission handelt es sich um Lichtquanten, die unabhängig vom umgebenden Strahlungsfeld emittiert werden und inkohärent in Phase und Richtung sind. Beträgt die Energie des stimulierenden Photons allerdings  $E_2 - E_1$ , so sind die emittierten Lichtquanten sowohl richtungs- als auch phasengleich, sodass man von induzierter Emission spricht.

Durch Absorption, beispielsweise von Licht, wird ein Elektron vom Grundzustand E<sub>1</sub> in einen höher gelegenen Zustand E<sub>2</sub> angeregt. Um wieder in den Grundzustand E<sub>1</sub> zu gelangen, können verschiedene Wege bestritten werden. Neben den strahlungslosen Übergängen (siehe Kapitel 2.2) kann durch Emission von Lichtquanten der Grundzustand wieder erreicht werden. Dabei existieren zwei Arten der Emission, nämlich die spontane Emission und die induzierte Emission. Bei der spontanen Emission werden in einem Ensemble von Atomen bzw. Molekülen zu einem beliebigen Zeitpunkt Lichtquanten emittiert, die weder gerichtet noch in Phase sind, weshalb man auch von inkohärenter Strahlung spricht [137]. Allgemein kann man sagen, dass diese Emission aus Vakuumfluktuationen induziert wird und unabhängig von einem äußeren Strahlungsfeld ist. Sie wird gemeinhin als Fluoreszenz bezeichnet.

Die induzierte Emission ist allerdings abhängig vom umgebenden Strahlungsfeld, da durch Einstrahlung eines Photons der Energie  $h\nu=E_2-E_1$  das zuvor angehobene Elektron aus Zustand  $E_2$  in den Grundzustand  $E_1$  emittiert. Die daraus resultierende Emission ist gerichtet und phasengleich und somit kohärent zum eingestrahnten Photon, weshalb man auch von einer Verstärkung des eingestrahnten Lichts sprechen kann [138]. Im Allgemeinen kann man auch sagen, dass die induzierte Emission komplementär zur Absorption ist.

Neben der induzierten Emission ist eine Inversion des Besetzungszustandes für die Lasertätigkeit enorm wichtig. Betrachtet man die Änderung der Intensität  $dI$ , so hängt diese von der Absorption  $dI_A$  und von der induzierten Emission  $dI_I$  ab [139].

$$dI = dI_A + dI_I \quad (17)$$

Bezieht man die Änderung der Intensität auf die Besetzungsniveaus  $N_1$  (beim energetisch tieferen Zustand  $E_1$ ) bzw.  $N_2$  (beim energetisch höheren Zustand  $E_2$ ) bei gleichen Entartungsgraden  $g_1=g_2$ , so ergibt sich mit  $\sigma$  als Anregungsquerschnitt und  $d$  als Dicke des Mediums [139]:

$$\frac{I}{I_0} = e^{\sigma \cdot (N_2 - N_1) d} \quad (18)$$

Aus Formel 18 ist zu erkennen, dass das Verhältnis der Besetzungsniveaupopulation  $N_1$  und  $N_2$  die Verstärkung der Lichtintensität bestimmt. Um eine Verstärkung des Lichtes zu bekommen, muss gelten:

$$N_2 > N_1 \quad (19)$$

Das bedeutet, dass sich mehr Atome bzw. Moleküle im angeregten Zustand  $E_2$  befinden müssen als im tieferen Zustand  $E_1$ , was auch als Inversion bezeichnet wird. Für ein Zwei-Niveau-System ist durch eine Lichtanregung nur  $N_2 = N_1$  erreichbar. Bei den Systemen mit mehr Niveaus ist  $N_2 > N_1$  erreichbar.

Das Lasermedium (also die Atome bzw. Moleküle, die zur induzierten Emission genutzt werden können) bestimmt den Lasertyp, welcher als Lasermedium einen Festkörper, eine Flüssigphase oder auch aus Gasen bestehen kann. Je nach Art des Lasermediums kann zwischen einem Dreiniveau-Laser und einem Vierniveau-Laser unterschieden werden (Abbildung 15).



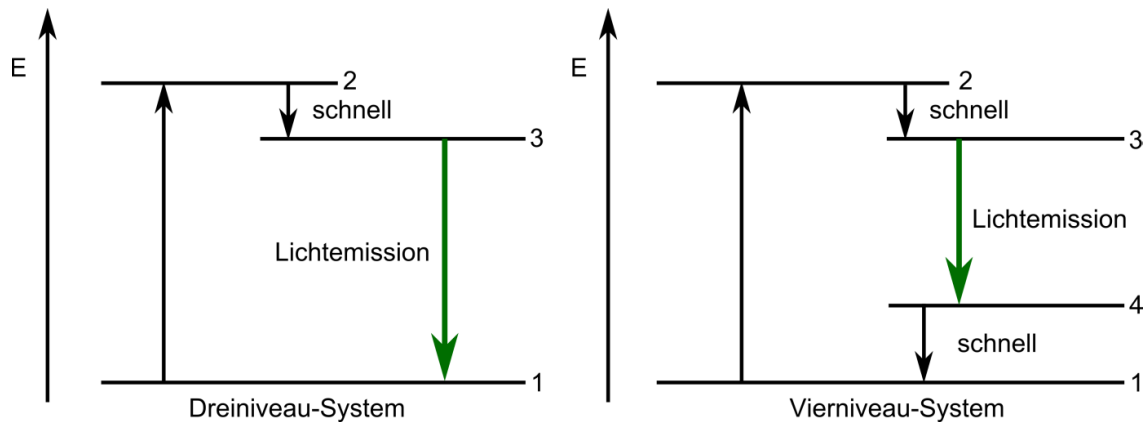


Abbildung 15: Energieschema eines Dreiniveau- und Vierniveau-Lasers.

Bei einem Dreiniveau-System gibt es nach Anregung in einen höheren Zustand 2 einen schnellen strahlungslosen Übergang in ein energetisch tieferes Niveau 3. Von dort gelangt das System durch Emission von Licht wieder in den Grundzustand 1. Dadurch, dass der zweite Übergang schnell ist, wird gewährleistet, dass sich möglichst viele Moleküle in Zustand 3 befinden und somit für die Laserstrahlung zur Verfügung stehen.

Beim Vierniveau-System ist zwar die Energiedifferenz zwischen dem Niveau 3 und dem nächsten energetisch tieferen Niveau 4 nicht so groß wie beim Dreiniveau-System. Allerdings liegt hier der Vorteil in der Schnelligkeit der Inversionsbesetzung. Durch den schnellen Übergang von 4 nach 1 ist gewährleistet, dass sich im Niveau 4 praktisch keine Population mehr befindet, sodass die Inversionsbesetzung zwischen den Zuständen 3 und 4 sehr groß ist. Da man beim Dreiniveau-System immer aus dem Grundzustand anregt und in diesen wieder zurückfällt, gibt es immer eine Population, die nicht angeregt wird und im Grundzustand bleibt. Somit bleibt dieses Niveau auch beim Übergang von 3 nach 1 immer teilweise besetzt, was eine kleinere Inversionsbesetzung als im Vierniveau-Laser bedeutet.

Im Folgenden wird einer der gängigsten Lasertypen vorgestellt, der im Rahmen dieser Dissertation verwendet wurde.

### 2.7.2 Exciplex-Laser

Exciplex ist die Kurzform für *excited complex* und beschreibt die Art der Laserstrahlerzeugung. Dabei handelt es sich um Komplexe, die nur im angeregten Zustand existieren, wie z.B. ArF oder XeCl. Durch Anregung von Ar in Anwesenheit von F<sub>2</sub> kommt es zu einer ionischen Bindung zwischen dem angeregtem Ar\* und F zu ArF\*. Durch Emission von Lichtquanten gelangt der Komplex in den Grundzustand, wobei

eine spezifische Wellenlänge emittiert wird (hier 193 nm). Da ArF im Grundzustand nicht existieren kann, wird daraus wieder  $F_2$  und Ar (Abbildung 16).

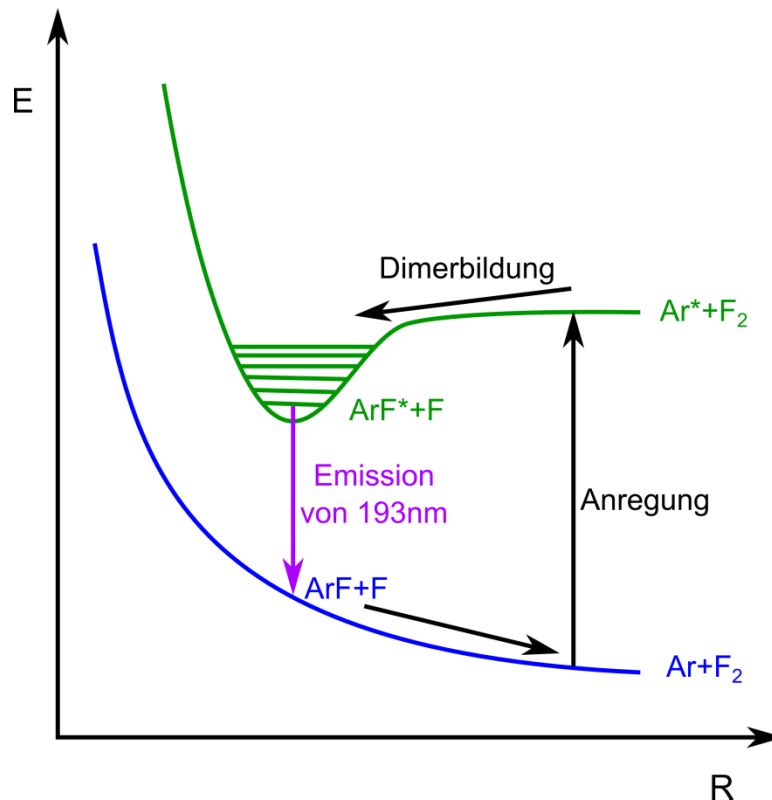


Abbildung 16: Vier-Niveau-Energiediagramm für ArF. Durch Anregung des Argons in Anwesenheit von Fluor können diese eine Bindung eingehen und  $ArF^*$  als Komplex bilden. Durch Emission von 193 nm gelangt der Komplex in den Grundzustand, wo er allerdings nicht beständig ist und wieder zu Ar und  $F_2$  wird.

Da der angeregte Komplex nur eine kurze Lebensdauer besitzt (meist nicht mehr als 10 ns [140]), besitzt auch die emittierte Wellenlänge eine nicht längere Pulsdauer. Zudem ist das Strahlprofil eines Exciplex-Lasers meist schärfer als das eines Festkörper-Lasers. Ein Nachteil liegt jedoch in der Handhabung. Da es sich meist um Korrosivgase handelt, altert das Gas mit der Zeit und es muss auf genauen Umgang beim Gasaustausch geachtet werden. Durch den Alterungsprozess verliert der Laserstrahl an Energie, sodass bei den Messungen immer die Laserenergie überprüft und gegebenenfalls nachreguliert werden muss.

In dieser Arbeit wurde ein ArF-Exciplex-Laser verwendet, da durch seine emittierte Wellenlänge von 193 nm explizit die Peptidbindungen eines Moleküls angesprochen werden können. Dies hat den Vorteil, dass es zunehmend mehr Chromophore besitzt je länger die Peptidkette wird. Durch die mit der Größe des Peptids zunehmende Anregungswahrscheinlichkeit kann dies den Effekten aus der RRKM-Theorie entgegen wirken.

## 2.8 Konzeptionelle Überlegungen und erwartetes Verhalten für die Fragmentierung der zu untersuchenden Substanzen

Wie in Kapitel 2.3 zur RRKM-Theorie beschrieben, ist es prinzipiell schwierig, große und sehr große Moleküle wie Peptide zu fragmentieren. Trotz hoher interner Energien werden die Zerfallskonstanten langsam. Bei der von uns verwendeten Photofragmentierungsmethode gibt es in unserem Analysegerät noch Stöße entweder durch das eingeleitete Helium oder aber durch das Restgas, sodass es eine Kühlung der Moleküle, wenn auch viel langsamer als in Lösung, gibt. Diese Kühlung stoppt den vorhandenen Reaktionsverlauf. Durch die für das Molekül verfügbare Stoßzeit wird also die Reaktionszeit der Moleküle limitiert, sodass man sagen kann, dass die Reaktionszeit für die Moleküle bei Messungen ohne zugeführtes Helium länger ist als bei den Messungen mit Helium. Nun stellt sich die Frage, wie diese beiden Schranken in Bezug zu den Zerfallskonstanten stehen.

Zunächst wird der Vorgang der Photofragmentierung betrachtet. Die zu fragmentierenden Moleküle besitzen eine gewisse interne Anfangsenergie  $E_0$ , die durch die Verteilung bei Raumtemperatur gegeben ist. Sie ist zwar nicht bei allen Molekülen gleich, jedoch ist die Streubreite gegenüber der zugeführten Photonenenergie  $h\nu$  gering. Es entsteht somit eine Anfangspopulationsverteilung der Ionen bei verschiedenen Energien. Werden die Ionen nun mit einem Laserpuls bestrahlt, der aus einer gewissen Anzahl an Photonen einer Energie  $h\nu$  besteht, so können Photonen absorbiert werden. Die Zahl der absorbierten Photonen hat dabei Auswirkungen auf die Reaktionszeit  $t$ . In Abbildung 17 ist schematisch die Absorption der Photonen gegen die Absorptionszeit  $t$  dargestellt.

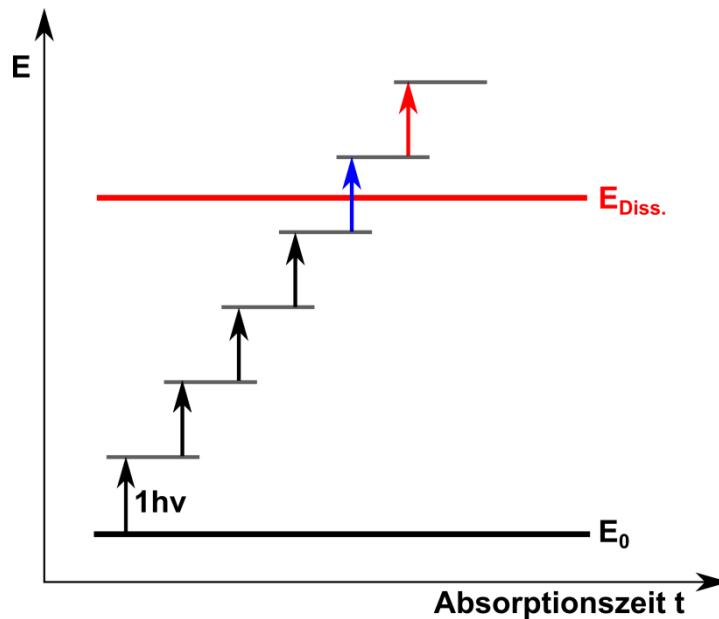


Abbildung 17: Energiezunahme durch das schrittweise Absorbieren von Photonen in einem Ion. Dabei ist die Zahl der absorbierten Photonen von der Absorptionszeit  $t$  abhängig. Wird die Dissoziationsschwelle durch ein Photon überschritten (blauer Pfeil), kann es zur Fragmentierung kommen, die allerdings durch eine langsame Zerfallsrate definiert ist. Werden mehr Photonen absorbiert, ist die überschüssige Energie in Bezug auf die Dissoziationsschwelle so groß, dass die Zerfallskonstante schnell wird und viele Ionen dissoziieren.

Zu Beginn eines Laserpulses kann das Ion zunächst ein Photon aufnehmen (dargestellt durch die senkrechten Pfeile), sodass es eine gewisse Energiezufuhr  $h\nu$  erhält. Durch weitere Aufnahme von Photonen während dieses Laserpulses nähert sich das Ion seiner Dissoziationsschwelle. Erst mit Überschreitung dieser durch mindestens ein weiteres Photon (blauer Pfeil), besitzt das Ion genügend Energie um eine Dissoziation einleiten zu können. Allerdings können die Moleküle unterschiedlich viele Photonen absorbieren. Ist ein Molekül mit seiner inneren Energie  $E_{\text{int}}$  unter der Dissoziationsenergie oder nur knapp darüber, so kann es im stoßfreien Zeitfenster nicht zerfallen. Sind Moleküle mit  $E_{\text{int}}$  um ein  $h\nu$  oder mehr über dieser Dissoziationsschwelle, so findet ein Zerfall statt.

Am Ende der Absorptionszeit  $t$  erhält man so eine Populationsverteilung der einzelnen Ionen, die man auf die einzelnen Energieinhalte  $h\nu$  beziehen kann (Abbildung 18).

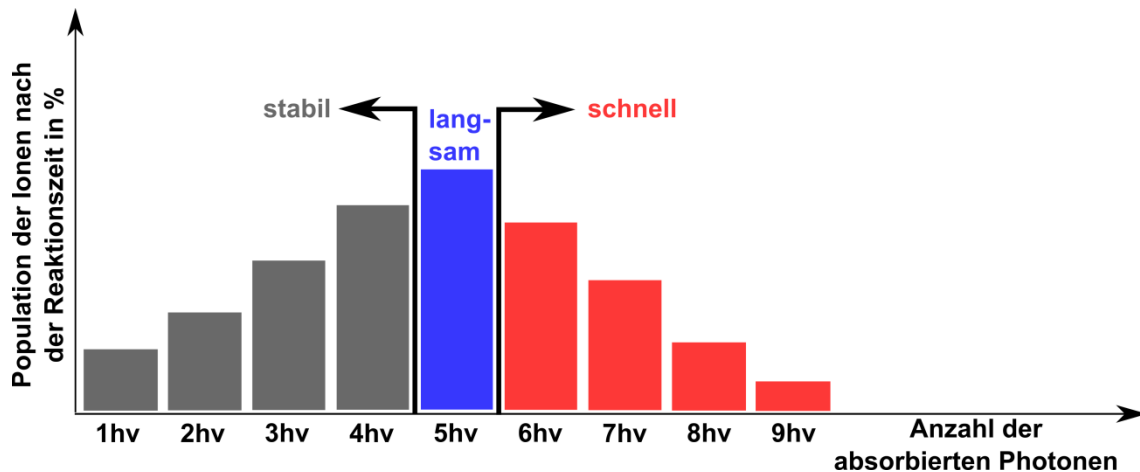


Abbildung 18: Populationsverteilung der Ionen bei verschiedenen Energieinhalten  $h\nu$  nach einer Anregungszeit  $t$ . Die Ionen, die innerhalb der Anregungszeit die Dissoziationsschwelle nicht erreicht haben, bleiben stabil (grauer Bereich) während die Ionen, die energetisch deutlich über der Schwelle liegen mit einer schnellen Zerfallskonstante fragmentieren können (roter Bereich). Die Anzahl der Ionen, die eine Photonenenergie über der Dissoziationsschwelle liegen (blauer Bereich), besitzen eine langsame Zerfallskonstante.

Anhand der so entstehenden Populationsverteilung kann man nun erkennen, bei welchen Energieinhalten die Ionen noch stabil sind und ab wann diese fragmentieren können. Dabei sind nun für das Ablaufen der Fragmentierung die Zerfallsgeschwindigkeit und die Stoßzeit entscheidend. Die Ionen mit einem Energieinhalt, der weit über der Dissoziationsschwelle liegt, fragmentieren schnell. Für die Messungen mit und ohne Helium bedeutet dies, dass bei einer kurzen Reaktionszeit (Messung mit Helium), die Ionen aufgrund ihrer schnellen Zerfallskonstante fast vollständig dissoziieren. Beim Vergleich der MS-Spektren mit und ohne Helium zueinander entsteht kein Unterschied in der Fragmentierung. Für die Ionen, die mit ihrem Energieinhalt nah an der Dissoziationsschwelle liegen, ist das durch Stöße definierte Zeitfenster für die Anzahl der fragmentierenden Ionen ausschlaggebend. Ist die Reaktionszeit wie bei den Messungen mit Helium kurz, so fragmentiert durch die langsame Zerfallskonstante nur eine geringe Anzahl an Ionen. Wird die Reaktionszeit durch die Minimierung der Stoßpartner verlängert (Messung ohne Helium), so können mehr Ionen dissoziieren. Es wird sich somit ein Unterschied beim Vergleich der Muttermassenintensitäten der Messungen mit und ohne Helium ergeben.

In Abbildung 19 ist der Effekt der langsamen und schnellen Zerfallskonstante auf die Intensität der Muttermasse in Bezug auf die Reaktionszeit während eines Laserschusses mit und ohne Helium einmal bildlich dargestellt. Die Kreuze markieren die jeweilige Intensität der Muttermasse im entstehenden Spektrum bei den jeweiligen Messungen.

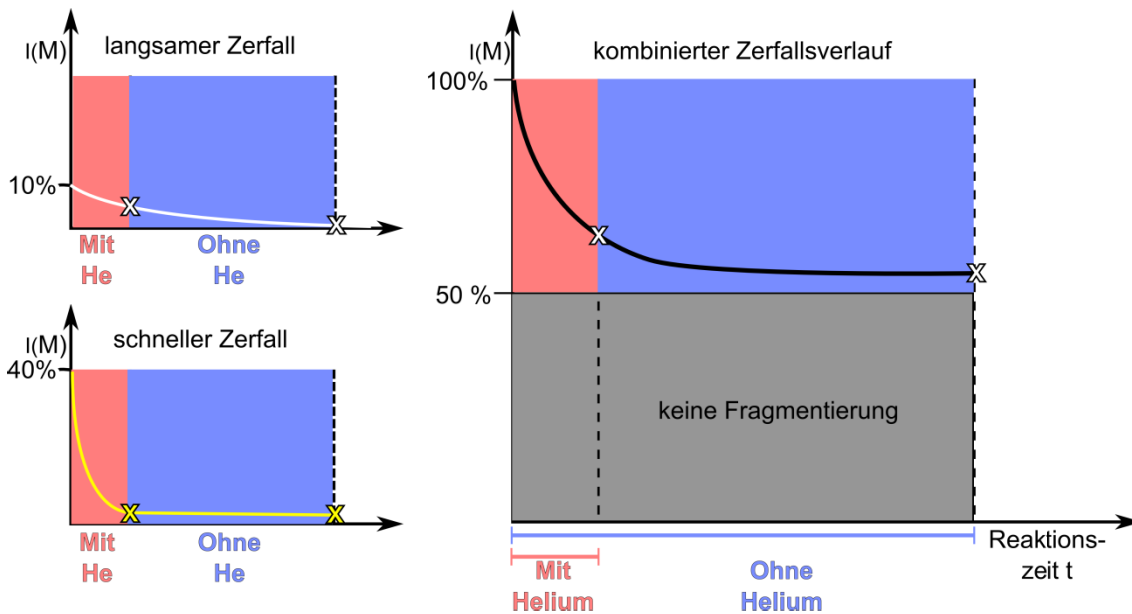


Abbildung 19: Beispielhafter zeitlicher Verlauf der schnellen und langsamen Zerfallskonstante in Bezug auf die Intensität der Muttermasse ( $I(M)$ ) gegen die Reaktionszeiten für die Messungen mit und ohne Helium. Neben einer bestimmten Prozentzahl, die nicht genügend Photonen für eine Fragmentierung erhalten, ist der Verlauf der schnellen und der langsamen Zerfallskonstante innerhalb der Reaktionszeit  $t$  zu sehen (rechte Seite). Die Kreuze verdeutlichen die jeweilige Intensität von  $M$  nach der jeweiligen Reaktionszeit. Dabei ist der Unterschied für schnelle Zerfallsprozesse im Vergleich zu den langsamen Prozessen gering.

Betrachtet man den Vorgang der *low-energy* Stoßfragmentierungsmethode, so kann man sagen, dass durch das Schütteln der Ionen in der Paul-Falle diese langsam an die Dissoziationsschwelle heran gehoben werden.

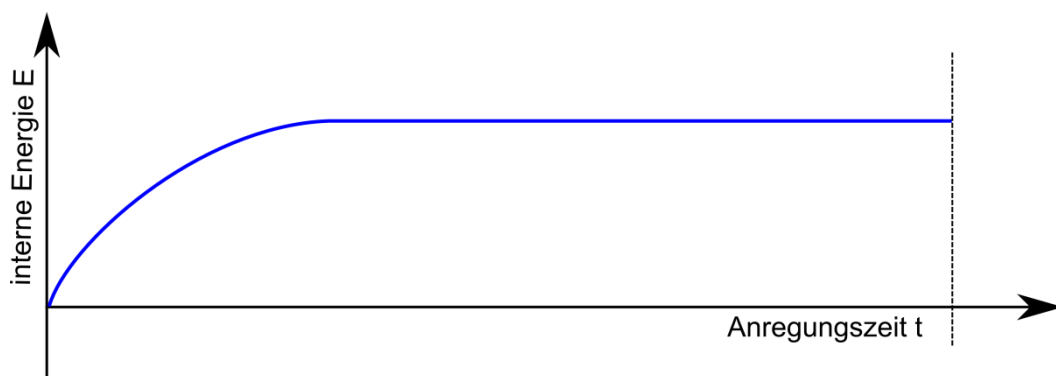


Abbildung 20: Zunahme der internen Energie der Ionen während der Stoßfragmentierung.

Da dem Molekülion beim Schütteln über eine relativ lange Zeit (bis 40 ms) Energie zugeführt wird, besitzt das Molekül immer genügend Zeit um zu fragmentieren falls es die Dissoziationsschwelle überschreitet. Wegen der langen Schüttelzeit ist also auch eine langsame Reaktionskonstante keine Engstelle mehr. Dadurch kann man

Rückschlüsse auf die Dissoziationsenergie erhalten. Da man schrittweise von Messung zu Messung die Energie erhöht bis die Fragmentierung einsetzt, werden bevorzugt die energetisch tiefsten Reaktionskanäle angesprochen. Mit Hilfe des Fragmentierungsmusters im Massenspektrum können diese Reaktionskanäle sogar bestimmt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Reaktionskanäle von Peptiden in ihren Massenspektren wiederzufinden. Zudem stellte sich die Frage, ob die Energieumverteilung in großen Molekülen verhindert werden kann, sodass auch große Peptidketten fragmentieren und somit zu einer Sequenzanalyse zur Verfügung stehen können.

Basierend auf den oben beschriebenen Prinzipien für die Energiezunahme im Molekül, wurden nun zwei verschiedene Konzepte für die Fragmentierung von großen Molekülen ausgetestet.

### Die Multichromophorenanregung

Durch die Laserbestrahlung mittels 193 nm kann die Peptidbindung im Peptid angeregt werden. Da die Anregung lokal geschieht, steht dem Molekül prinzipiell jede einzelne Peptidbindung mit ähnlicher Wahrscheinlichkeit zur Anregung zur Verfügung.

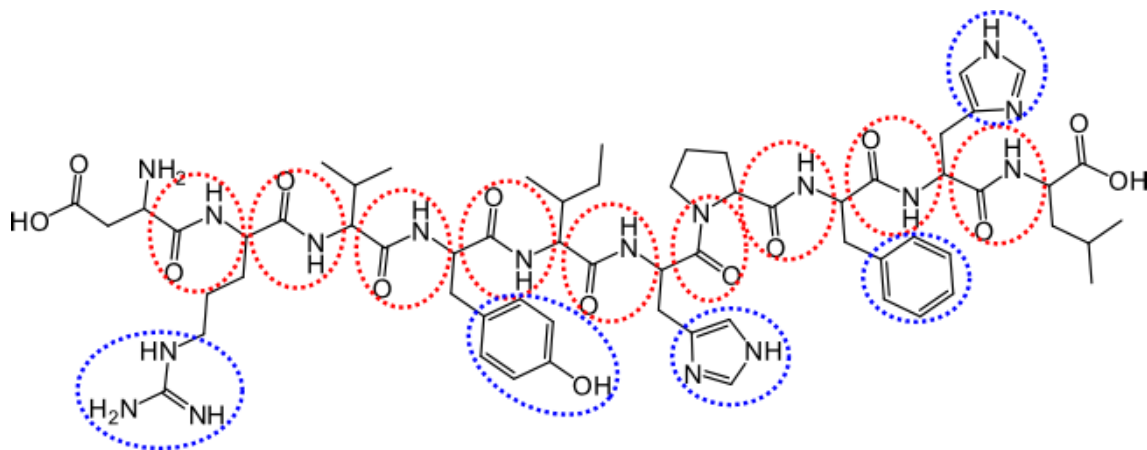


Abbildung 21: Darstellung von Multichromophoren am Beispiel des Angiotensin I. Rot eingefasst sind die Peptidbindungen zu sehen, die bei einer Wellenlänge von 193 nm als Chromophore zur Verfügung stehen, blau eingefasst sind die aromatischen Systeme, die ebenfalls absorbieren könnten.

Beim Größerwerden der Peptidkette stehen auch mehr Peptidbindungen und somit mehr Chromophore zur Verfügung, sodass auch die Wahrscheinlichkeit für eine Anregung größer wird. Da man hierbei aber immer nur vom  $S_0$  in den  $S_1$  anregt (siehe Kapitel 2.2), kann man annehmen, dass der Anregungsquerschnitt und somit die Summe der lokalen Anregungsquerschnitte  $\sigma$  für alle Photoanregungsschritte konstant bleibt.

## Die Gasphasenbasizität

Da die Aminosäuren unterschiedliche funktionelle Gruppen an den Seitenketten tragen, besitzen sie auch unterschiedlich große Affinitäten, ein Proton an sich zu binden. Diese kann mit der Gasphasenbasizität korreliert werden. In Tabelle 2 sind die berechneten Gasphasenbasizitäten aufgelistet, die aus der Literatur [141] entnommen wurden.

Tabelle 2: Berechnete Gasphasenbasizitäten der einzelnen Aminosäuren. Die Werte mit sind der Quelle [141] entnommen.

Aminosäure	kcal/mol	Aminosäure	kcal/mol
Gly	203,1	Ile	211,4
Cys	205,9	Asn	214,3
Ala	205,6	Phe	212,6
Glu	214,5	Met	213,2
Asp	210,3	Tyr	212,9
Ser	209,4	Pro	214,6
Val	210,2	Trp	215,7
Leu	210,9	Lys	222,3
Gln	214,2	His	223,8
Thr	211,4	<b>Arg</b>	<b>237,0</b>

Beim Vergleich der einzelnen Werte kann man erkennen, dass Arginin mit Abstand die größte Gasphasenbasizität besitzt. Für die Protonierung in einer Peptidkette bedeutet dies, dass in Anwesenheit von Arginin das Proton zuerst dort gebunden wird. Dies wirkt sich jedoch wahrscheinlich auf die Protonenwanderung aus. In Abbildung 22 ist dies einmal bildlich dargestellt. Durch die starke Bindung an die Guanidin-Gruppe des Arginins benötigt das Proton viel Energie um von dort aus über das *backbone* wandern zu können (dargestellt als roter Kasten). Dies hat wahrscheinlich wiederum Auswirkung auf die Dissoziationsenergie des Moleküls (rote Linie). Besitzt das Molekül statt eines Arginins beispielsweise ein Glycin, so verringert sich die Protonenaffinität an dieser Stelle. Da das Proton nun vermutlich zum Histidin wandern wird, welches eine geringere Gasphasenbasizität besitzt als das Arginin, wird somit wahrscheinlich auch die Dissoziationsenergie (blaue Linie) um diese Energie herabgesetzt im Vergleich zu der Dissoziationsenergie des Moleküls mit Arginin.



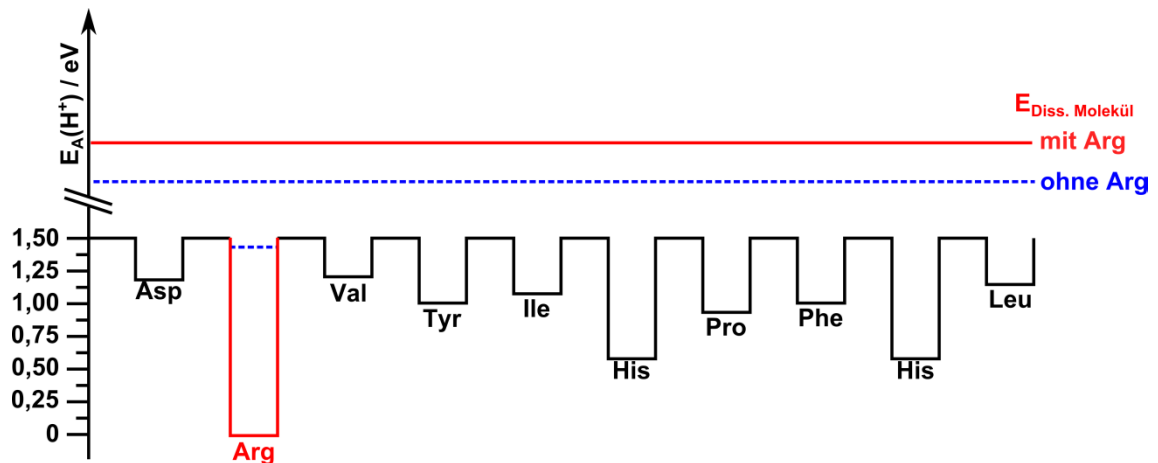


Abbildung 22: Auswirkung der Gasphasenbasizität auf die Protonenwanderung im Molekül einmal bildlich dargestellt. Beinhaltet das Molekül ein Arginin, so lagert sich das Proton an dieses an und benötigt viel Energie um sich von diesem wieder zu lösen (roter Kasten). Dies hat wahrscheinlich auch Auswirkung auf die Dissoziationsenergie des Moleküls (rote Linie). Wird statt des Arginins beispielsweise ein Glycin eingesetzt, so verringert sich die Protonenaffinität an dieser Stelle, sodass das Proton in diesem Fall wahrscheinlich zum Histidin wandern wird. Da dieses eine geringere Gasphasenbasizität besitzt als das Arginin, wirkt sich dies vermutlich auf die Dissoziationsenergie aus, welche dann im Vergleich zum Molekül mit Arginin geringer wäre (blaue Linie).

## Untersuchung von Mehrfachgeladenen

### 1. Coulomb-reduzierte Dissoziationsenergie

Ein zweiter Ansatz war die Untersuchung von mehrfachgeladenen Ionen. Durch die zusätzliche Coulombenergie, die zum Beispiel durch eine zweite Protonierung im Molekül entsteht, wird die Potentialkurve einer C-C-Bindung zwischen den Ladungen des Moleküls im Vergleich zum Einfachgeladenen um diese zusätzliche Energie modifiziert (Abbildung 23).

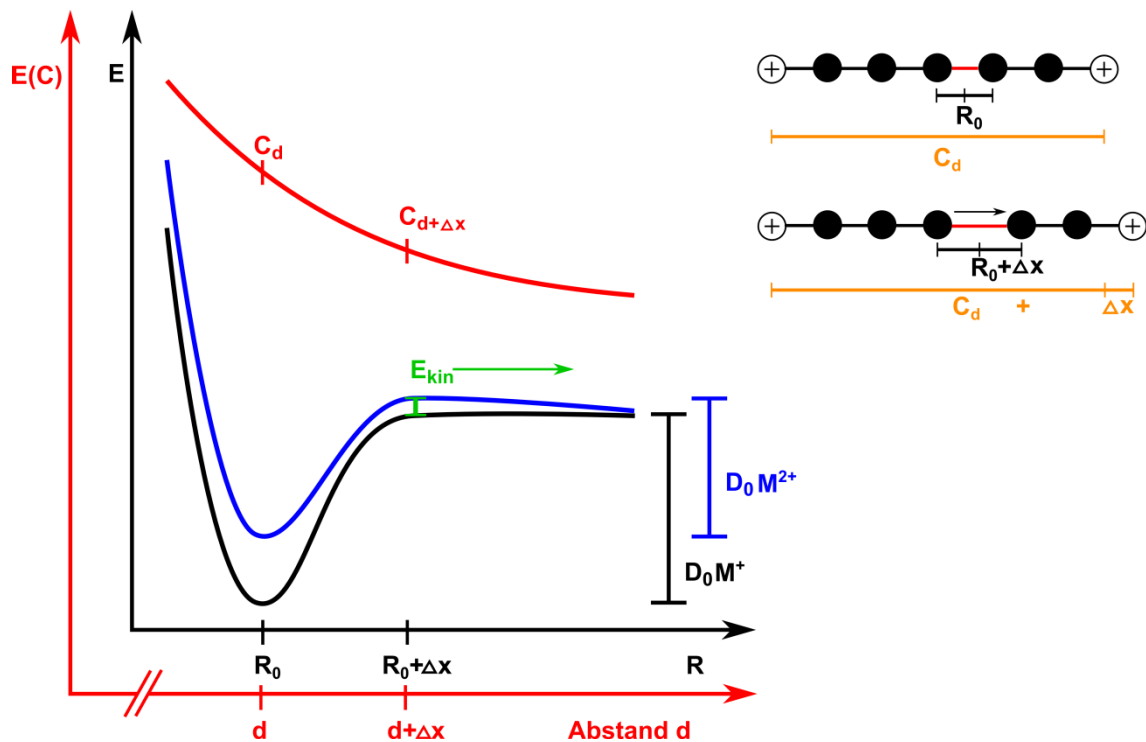


Abbildung 23: Schematische Potentialkurven einer C-C-Bindung des Einfachgeladenen (schwarze Kurve) und des Zweifachgeladenen (blaue Kurve) eines linearen Moleküls, bei dem sich die Ladungen an beiden Enden befinden. Durch die zusätzliche Coulombabstoßung ( $C$ ) wird die Potentialkurve des einfachgeladenen Moleküls an allen Bindungen zwischen den Ladungen um diese Energie (rote Kurve) modifiziert. Es resultiert eine Anhebung der Energie im Bereich des Abstandes  $R_0$  und eine kleinere Energieanhebung im Dissoziationsbereich  $R_0 + \Delta x$  (blaue Kurve). Da die Energiedifferenz im Bereich des Abstandes  $R_0$  größer ist als in  $R_0 + \Delta x$ , verringert sich somit auch die Dissoziationsenergie  $D_0$  für das Zweifachgeladene. Die zusätzliche Energie, die beim  $[M]^{2+}$  im Dissoziationsbereich  $R_0 + \Delta x$  entsteht (Coulombabstoßung der Fragmente), wird bei der Dissoziation als kinetische Energie zusätzlich frei.

Durch die Addition der Potentialkurve des Einfachgeladenen (schwarze Kurve) mit der Coulombenergiekurve (rote Kurve) resultiert die Potentialkurve des  $[M]^{2+}$  (blaue Kurve) unter der Annahme, dass sich die Ladungen an beiden Enden befinden. Es findet dabei eine Energieanhebung im Bereich des Abstandes  $R_0$  und eine geringere Energieanhebung im Dissoziationsbereich  $R_0 + \Delta x$  statt. Aufgrund der kleiner werdenden Coulombenergie im Dissoziationsbereich ist die Energieanhebung dort nicht so stark ausgeprägt wie im Abstandsbereich  $R_0$ , sodass die daraus resultierende Dissoziationsenergie  $D_0$  für  $[M]^{2+}$  insgesamt geringer ist als für  $[M]^+$ . Ein zusätzlicher Effekt ergibt sich für noch größere Abstände  $R$ : Die Ladungen der Fragmente stoßen sich ab, sodass durch das erhöhte Potential an der Stelle  $R_0 + \Delta x$  ein Energieüberschuss entsteht. Beim Fragmentieren wird diese Energie als kinetische Energie für die jeweiligen Fragmente frei (*kinetic energy release*). Dies kann zur Folge haben, dass die Fragmente dadurch so viel kinetische Energie erhalten, sodass sie das Pseudopotential in der Falle überwinden und vorzeitig aus der Falle fliegen können. Damit stehen sie für die Detektion nicht mehr zur Verfügung.

In unseren Laser-Fragment-Messungen wird in der Tat beobachtet, dass die Summe der Fragmentationen nicht den Verlust der Mutterionen widerspiegelt. Es ist jedoch unklar, ob dies auf die Glockenkurve der Transmission, die Nachweisgrenze für die kleinen Massen oder eben auf den *kinetic energy release* Effekt zurückzuführen ist.

## **2. Coulomb-reduzierte Zustandsdichte**

Durch die zusätzliche Ladung und der damit verbundenen Coulombabstoßung kommt es auch zu einer Konformereneinschränkung im Molekül. Dieses kann wegen der Ladungsabstoßung nicht mehr jede beliebige gefaltete Konformation einnehmen, sodass auch manche große Molekülschwingungen unterbunden werden. Durch diese Behinderung der Konformerenvielfalt wird die Zustandsdichte  $\rho(E)$  im Molekül zu kleineren Werten hin modifiziert. Der gleiche Effekt ist im Übergangszustand viel kleiner. Betrachtet man dies mit dem Hintergrund der RRKM-Theorie, so bedeutet eine kleinere Zustandsdichte im Molekül eine größere Wahrscheinlichkeit für das Molekül zu fragmentieren.

## **3. Eingeschränkter Protonentransfer**

Da wegen einer zusätzlichen Ladung im Molekül die Protonenwanderung ebenfalls eingeschränkt ist, kommt es zu einem zusätzlichen energetischen Effekt: Wenn die Protonen sich nicht mehr an eine Peptidbindung anlagern können, so können dort die Bindungsenergien nicht wie zuvor herabgesetzt werden (Abbildung 24). Dies hat zur Folge, dass Bindungsbrüche an neutralen Stellen stattfinden müssen und dafür viel mehr Energie benötigt wird als es mit Anlagerung der Fall gewesen wäre. Im Beispiel des Ala-Ala aus der Literatur [134] besitzt die C-C-Bindung bei einem Abstand von 3 Å eine Energie von ca. 4 eV. Durch die Anlagerung eines Protons an die Peptidbindung wird die Bindungsenergie auf ca. 0,75 eV herabgesenkt, was einer Absenkung von ungefähr 3,25 eV entspricht (siehe Abbildung 24).

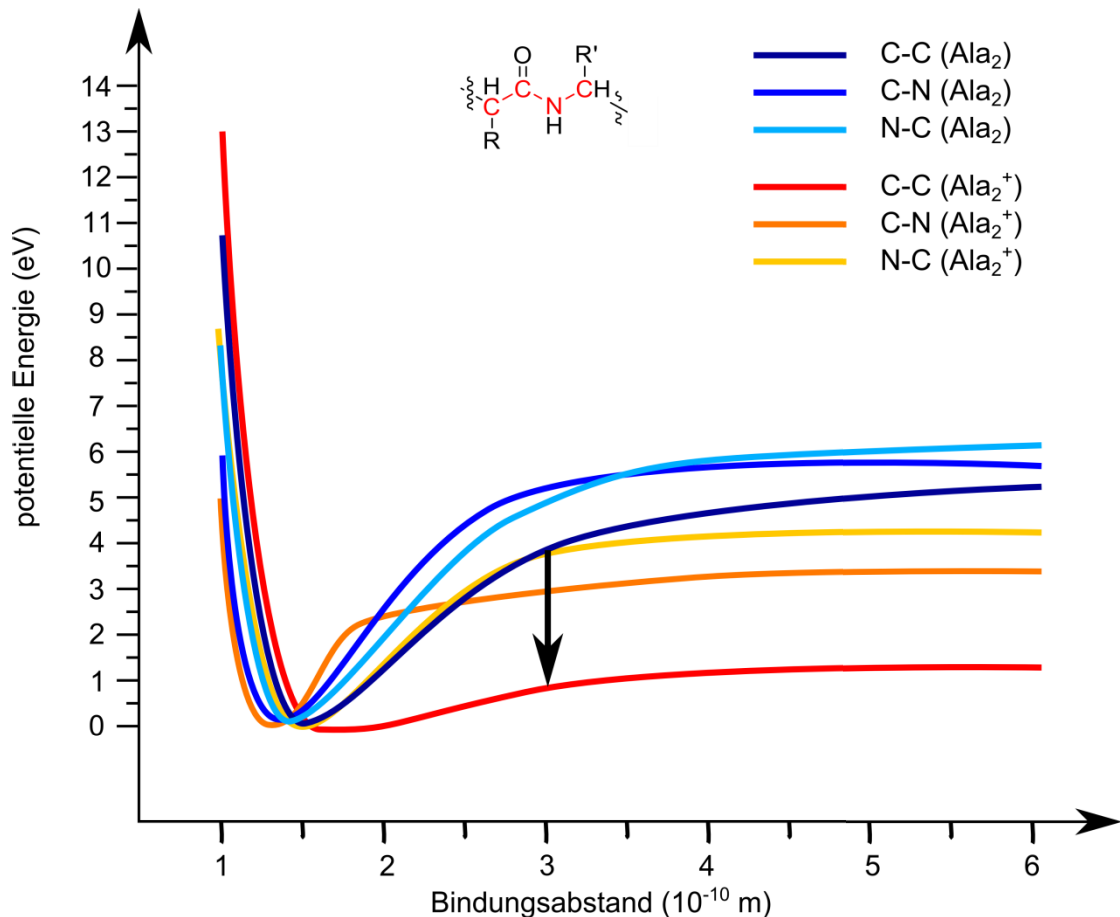


Abbildung 24: Neutrale Dissoziations- und proton-induzierte Dissoziationsenergiepotentialkurven für die Bindungen in der Nähe der Peptidbindung von Ala-Ala bezogen auf die Laseranregung, welche an Quelle [134] angelehnt ist. Die Bindungen mit der Bezeichnung Ala<sub>2</sub> (blaue Kurven) zeigen die potentiellen Energien der jeweiligen Bindung. Die Bindungen, die mit Ala<sub>2</sub><sup>+</sup> gekennzeichnet sind (rote bis gelbe Kurven), sollen die potentiellen Energien der jeweiligen Bindung zeigen, während sich das Proton an der Peptidbindung befindet. Wie man sieht, werden durch die Anlagerung eines Protons die Bindungsenergien in der Nähe der Peptidbindung stark abgesenkt. Dabei erfährt die C-C-Bindung die größte Energierniedrigung (schwarzer Pfeil), sodass diese eher brechen und somit a- bzw. x-Fragmente bilden kann.

Zusammengefasst existieren also verschiedene Theorien und Vorhersagen, die zu einer Änderung der Dissoziationsenergie in einem Molekül führen können.

Für eine Vereinfachung der Dissoziation stehen

- die Multichromophorenanregung
- die Coulomb-reduzierte Dissoziationsenergie (für Mehrfachgeladene)
- die Coulomb-reduzierte Zustandsdichte (für Mehrfachgeladene)
- das *mobile proton model*

Gegenläufig verhält sich allerdings das Konzept des

- eingeschränkten Protonentransfers

Bei letzterem wird die Bindungsenergie nicht durch die Protonenwanderung herabgesenkt und somit eine größere Dissoziationsenergie benötigt als im Fall der uneingeschränkten Protonenwanderung.

Aufgrund der aus der RRKM-Theorie resultierenden Zustandsdichte  $\rho(E)$  wird eine Fragmentierung für größer werdende Moleküle immer schwieriger. Wegen der zusätzlichen Abstoßung der Protonierungsstellen und der daraus resultierenden Herabsetzung der Dissoziationsenergie hat man sich eine bessere Fragmentierung für große Moleküle erhofft. Durch die Untersuchung der Mehrfachgeladenen soll nun ein Zugang für die Fragmentierung zu großen Molekülen gefunden werden, sodass die Moleküle auch für eine Sequenzanalyse zur Verfügung stehen. Zudem könnten durch die mehrfachgeladenen Ionen im Vergleich zueinander neue Fragmente entdeckt und ebenfalls für die Sequenzanalyse genutzt werden. Die Mehrfachgeladenen wurden dabei sowohl mittels Stoß- als auch Laserfragmentierung untersucht. Durch die zusätzliche gleichzeitige Kombination aus Stoß- und Laserfragmentierung hat man sich außerdem eine breitere Fragmentvariation erhofft, die für die Sequenzanalyse von Vorteil sein kann.

Um eine Vorstellung über die absorbierte Energie der verschiedenen Ionen zu bekommen, wurde zudem eine Methode entwickelt, um die Anregungsquerschnitte der möglichen Chromophore in einer Peptidkette zu bestimmen und somit eine Abschätzung der absorbierten Photonen zu erhalten.

### 3 Experimentelles

#### 3.1 Die Zeitabläufe im ESI-MS

Bevor man Stoß- oder Laserexperimente mit dem ESI-MS durchführen kann, ist es essenziell, den zeitlichen Ablauf im Massenspektrometer und in der Ionenfalle zu kennen. Die Paul-Falle fängt zunächst die Ionen ein, kann dann eine Masse isolieren und sogar stoßfragmentieren, bevor die Ionen und die Fragmente anschließend der Masse nach von klein zu groß herausgeschüttelt und nachgewiesen werden (siehe Kapitel 2.1.1.3). Dazu wird je nach Prozess in der Paulfalle die Amplitude der Radiofrequenz (RF) am Fallenring variiert. Dieses Signal haben wir störungsfrei abgegriffen. In Abbildung 25 ist nicht die Radiofrequenz selbst, sondern nur ein Signal, welches proportional zu der Amplitude der RF ist, gezeigt.

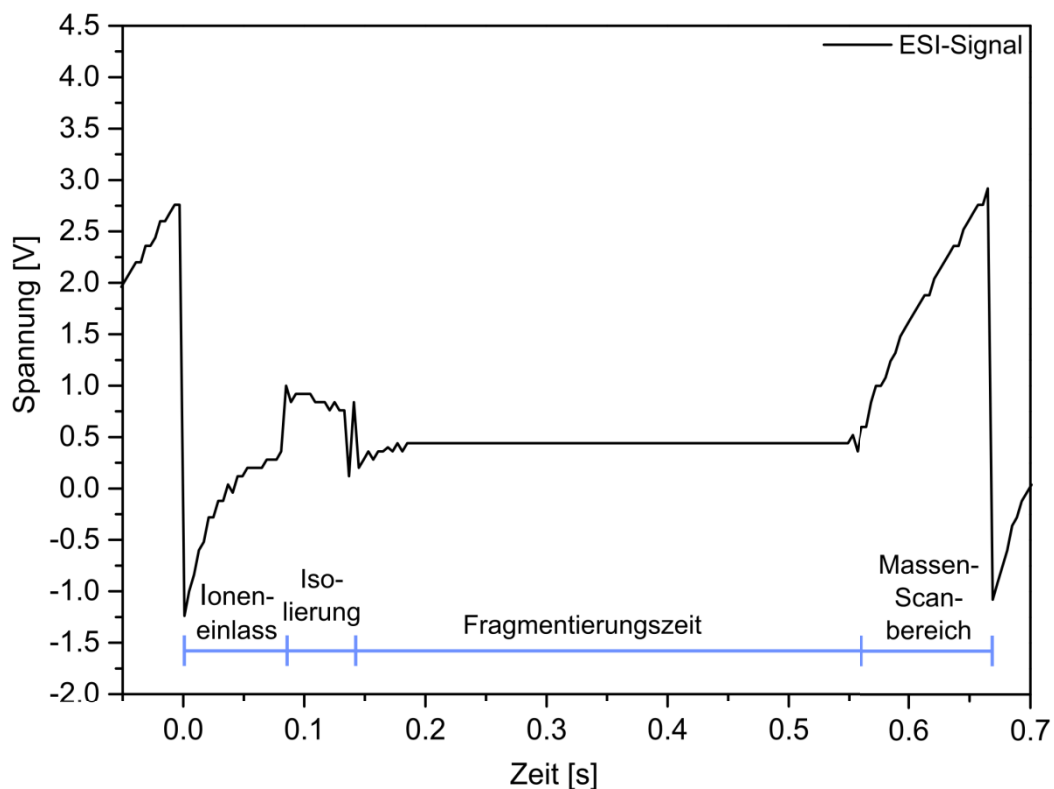


Abbildung 25: Oszilloskopsignal des Amplitudensignals der Radiofrequenz (RF) an der Falle. In einem Fallendurchlauf werden die Ionen zunächst in die Falle eingelassen. Um eine Masse zu isolieren, wird kurzzeitig die RF-Spannung erhöht. Daran schließt sich die hier lang gewählte Fragmentierungszeit an, bei der die Spannung gleichgehalten wird. Um die Ionen am Ende der Masse nach herauszuschütteln, wird die Spannung wieder stetig angehoben. Die Steigung und Breite dieses Scannens ist vom voreingestellten Massenbereich abhängig.

Nach dem Einfangen der Ionen kann eine Masse isoliert werden. Dabei wird eine bestimmte Frequenz angelegt, worauf die Ionen massenspezifisch reagieren. Nur diejenigen Ionen mit einem  $m/z$ -Verhältnis, welches mit dieser Frequenz stabil auf

seiner Flugbahn verbleibt, werden in der Falle gehalten. Die Flugbahnen aller anderen Massen werden instabil und sie werden somit aus der Falle geworfen. Diesen Vorgang kann man in Abbildung 25 an der Anhebung der RF-Amplitude erkennen.

An die Isolierung schließt sich die Fragmentierungszeit an, die in ihrer Zeitspanne manuell verändert werden kann. In dieser kann je nach Einstellung das isolierte Ion durch eine zusätzliche Spannung an den Endkappen aufgeschüttelt werden. Wird das Ion in Bewegung versetzt und auf seiner Flugbahn schneller, erfährt es eine Energiezufuhr bei den energetischen Stößen mit Helium. Dieses sogenannte Aufschaukeln der Massen bewirkt dann, bei genügend Energie, eine Fragmentierung der Ionen. Bei diesem Vorgang kann man sowohl die Zeit, in der energiereiche Stöße stattfinden, als auch die Stärke des Aufschüttelns durch das Anlegen einer geeigneten Schüttelamplitude an den Endkappen der Paulfalle steuern.

Im Anschluss an die Fragmentierungszeit erfolgt dann das schrittweise Herausschütteln der Ionen bzw. deren Fragmente und ihr Nachweis, was als Scannen bezeichnet wird. Dabei werden die Ionen wieder durch eine angelegte Frequenz an den Endkappen solange aufgeschaukelt, bis ihre Flugbahnen instabil werden und dadurch aus der Falle fliegen [142,143]. Bei diesem Aufschaukeln wird das Pseudopotential, in dem sich die Ionen befinden, so kontinuierlich verändert, dass alle Massen der Reihe nach von klein zu groß resonant werden. Dazu muss die Amplitude des RF-Feldes am Ring mit  $\sqrt{m}$  zunehmen. Je nach Eingabe des Massenbereichs wird auch die Zeitspanne des Scanvorgangs größer oder kleiner und der zu sehende Spannungsanstieg in Abbildung 25 höher oder niedriger.

### **3.1.1 Synchronisation des Lasers mit dem ESI-Prozess**

Da die Ionenfalle verschiedene Phasen durchläuft, muss der Laserpuls natürlich zur richtigen Zeit eingekoppelt werden.

Um die Ionen durch den Laserpuls fragmentieren und anschließend detektieren zu können, muss der Laserzugriff während der Fragmentierungszeit erfolgen. Möchte man nur mit dem Laser anregen, so setzt man die Schüttelspannung gleich null. In dieser Zeit befinden sich die Ionen also in einer Art Warteposition bevor sie anschließend zum Massennachweis aufgeschüttelt und detektiert werden.

Die Synchronisation von Laser und ESI-MS erfolgt durch eine Reihe von Geräten, deren Funktions- und Zeitschema in Abbildung 26 aufgezeigt ist.

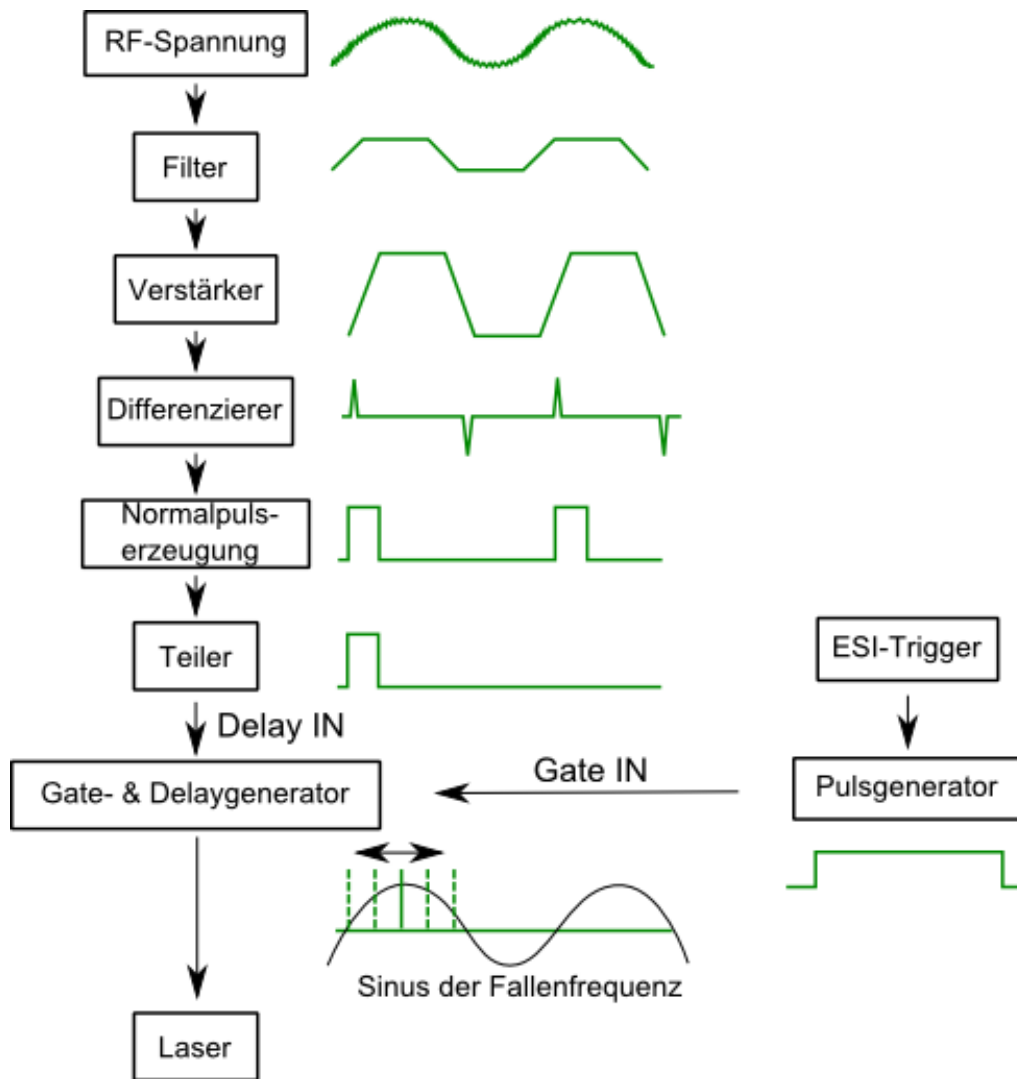


Abbildung 26: Synchronisation des Lasers auf das Fallensignal. Dazu muss die bipolare RF-Spannung der Falle zunächst durch einen Filter geglättet und durch einen Verstärker intensiviert werden. Durch einen Glätter werden die Signale schärfer und anschließend mit Hilfe eines Normpulsers in positive Rechtecksignale überführt. Durch das Zwischenschalten eines Teilers kann man den Abstand der Signale (Wiederholrate des Lasers) zueinander variieren. Dieses wird dann im Anschluss in einen Gate- und Delaygenerator eingespeist. Das Gate wird von einem Pulsgenerator, der mit dem ESI-Triggersignal synchronisiert ist, vorgegeben.

Damit der Laser einen Schuss absetzen kann, braucht er ein positives Rechtecksignal mit einer gewissen Spannung (größer 5 V). Um ihn mit der Fallenfrequenz perfekt zu synchronisieren, muss das bipolare sinusförmige RF-Signal der Falle zunächst durch einen Filter geglättet und anschließend bis in die Sättigung verstärkt werden. Damit die Flanken des Signals herausgefiltert werden, wird ein Differenzierer dahinter geschaltet. Durch eine Normalpuls-erzeugung werden positive Spitzen in Rechteckimpulse umgewandelt. Mit Hilfe eines Teilers wird der Abstand der positiven Signale zueinander variiert, sodass man eine kleine angepasste Wiederholrate erhält. Diese Variation ist nötig, damit man eine definierte Anzahl von Laserschüssen einkoppeln kann. Dieses Signal wird nun in einen Gate- und Delaygenerator eingespeist. Dieser bewirkt, dass



das Signal nur dann an den Laser weitergegeben wird, wenn es in einem bestimmten Zeitfenster (dem sogenannten Gate) liegt. Dieses ist besonders wichtig, da man hiermit erreicht, dass nur während der Fragmentationszeit einen Laserpuls abgegeben werden kann. Das Gate wird von einem Pulsgenerator durch ein positives Rechtecksignal erzeugt, welches auf ein digitales, software-ansteuerbares ESI-Signal getriggert ist. Das Signal wird zusätzlich in den Gate- und Delaygenerator eingespeist, sodass der Laser nur ein dann sein Signal bekommt, wenn sich die Falle im Fragmentationszyklus und der richtigen Phase der RF-Spannung befindet. Durch die Dauer des Gates kann nun wie gesagt die Anzahl der Schüsse variiert werden. In Abbildung 27 ist das Ergebnis dieser Synchronisation zu sehen.

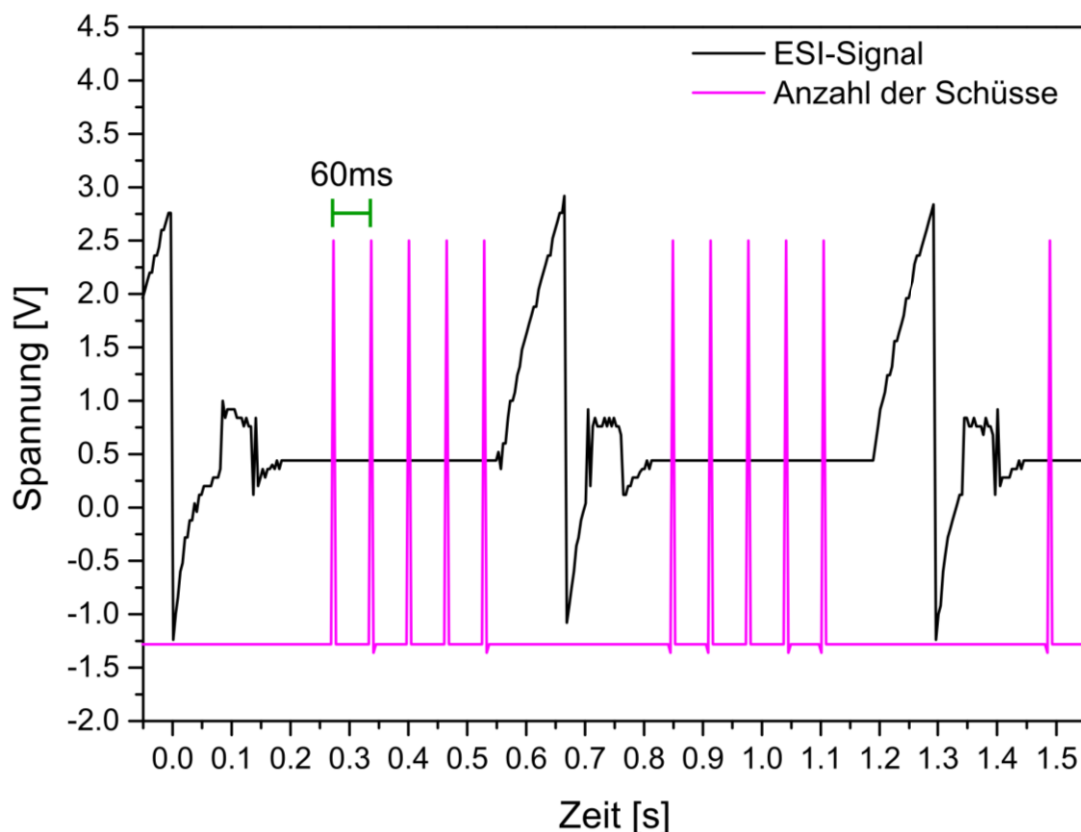


Abbildung 27: Synchronisation des Lasers auf die Fallenfunktion. Durch Anlegen eines Gates unterschiedlicher Länge wird der Laserzugriff zur richtigen Zeit gemacht und die Schusszahl variiert. Als Beispiel sind hier 5 Laserschüsse zu sehen. Zudem regelt der Teiler den Abstand der Schüsse zueinander. Bei einer Fragmentationszeit von 400ms und einer Schusszahl von 5 beträgt der Abstand der Schüsse zueinander ca. 60ms.

Bei den Laserexperimenten wollte man während der Fragmentierung einerseits Helium in der Falle haben, andererseits aber auch Experimente ohne Helium durchführen. Um dies zu ermöglichen wurden die Ventile, die das Helium in die Falle hineinlassen, extern angesteuert um die Schließ- und Öffnungszeit zu variieren. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Typ Edwards) wurde zusätzlich das Volumen der Heliumvorkammer ausgepumpt, damit beim Schließen des Ventils aus dem dahinter befindlichen

Volumen anschließend auch kein weiteres Helium in die Falle diffundieren konnte. Durch das vorhandene Vakuum in Kammer 3 wird das neutrale Helium innerhalb von Millisekunden aus der Falle abgeführt, sodass man davon ausgehen kann, dass sich kein Helium mehr in der Falle befindet. Wie schon in Kapitel 2.1.1.3 erwähnt, ist das Helium aber für die Funktionsweise der Ionenfalle essenziell. Deshalb darf das Helium nur während der Fragmentationszeit fehlen. Dazu wird auch hier eine Zeitdauer durch Anlegen eines Pulses aus dem Delaygenerator vorgegeben, die fast der Dauer der Fragmentation entspricht aber schon vorher beginnt (Abbildung 28).

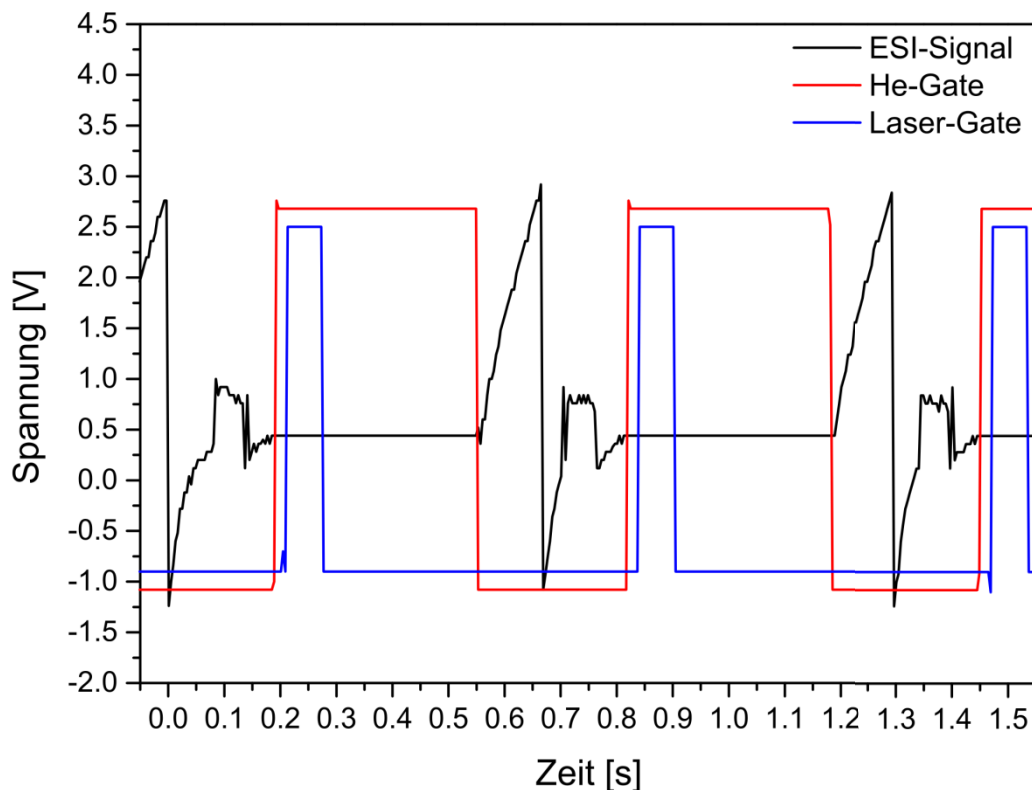


Abbildung 28: Synchronisation der Heliumventile auf die Fallenfunktion. Das angelegte Signal (rot) bewirkt ein Schließen der Heliumventile, sodass während des Laserpulses kein weiteres Helium mehr in die Falle gelassen wird. Innerhalb dieses Gates wird dann das Lasergate mit einer bestimmten Verzögerung gelegt, sodass die Ionen durch den Laser angeregt aber durch das fehlende Helium nicht abgekühlt werden können.

## 3.2 Reduzierung der Störsignale

Durch Benutzung des Ar/F-Lasers mit seinen energiereichen Photonen einer Wellenlänge von 193 nm kam es zu Signalen im Massenspektrum, die nicht der Substanz zuzuordnen waren aber in jedem MS-Spektrum auftraten. Es wurde herausgefunden, dass diese Signale durch die Ionisation von neutralen Molekülen stammen, die sich als Verunreinigung in der Fallenkammer befanden und nicht entfernt werden konnten. Allerdings konnte man sie in zwei Kategorien unterteilen und eine davon zumindest vollständig minimieren. Die eine Hälfte der Störsignale entsteht, wenn die neutralen Moleküle direkt durch den Laser angeregt und ionisiert werden. Zu dieser Kategorie gehören Moleküle mit einem Ionisierungspotential unterhalb der Laserenergie ( $< 6,4$  eV) oder konjugierte Moleküle, die resonant über den  $S_1$  mit zwei Photonen ionisiert werden. Diese wurden als Phthalate identifiziert. Dieses Signal kann man jedoch nicht reduzieren.

Die zweite Kategorie an Störsignalen entsteht, wenn der Laser nicht senkrecht durch die Ringelektrode trifft sondern Elektronen aus diesem herausgeschlagen werden, die wiederum neutrale Moleküle ionisieren oder geladene Ionen neutralisieren bzw. fragmentieren können. Diese Art von Störsignalen können aber minimiert werden. An der Ringelektrode liegt eine bipolare RF-Spannung an, sodass es beim Laserschuss dazu kommen kann, dass sich die Ringelektrode gerade auf negativer Spannung befindet. Dies hat zur Folge, dass die durch Photonen ausgelösten Elektronen wegen der Abstoßung von der Elektrode beschleunigt werden. Dabei können die schnellen Elektronen Neutralteilchen ionisieren. Besonders gut funktioniert die Ionisation bei Molekülen mit geringer Ionisationsenergie. Solche Moleküle können zum Beispiel Di- oder Triamine sein.

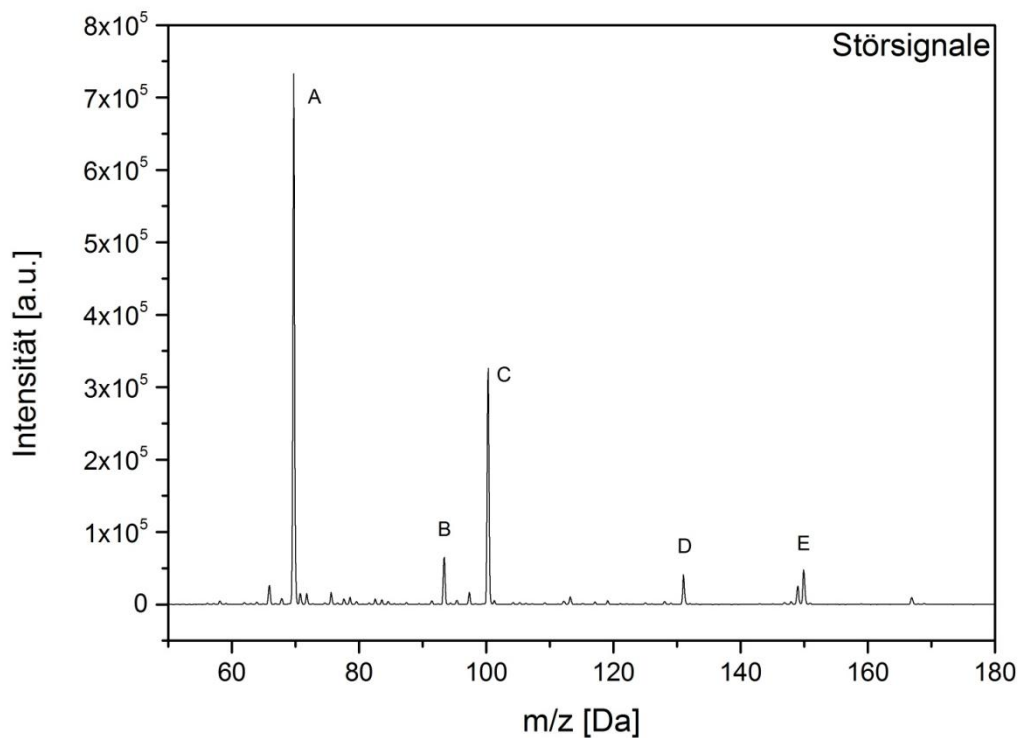


Abbildung 29: Störsignale im Massenspektrum, erzeugt durch die Photoelektronen aus der Wand der Paulfalle.

In Abbildung 29 sind die Störsignale zu sehen, die während der Laserbestrahlung entstehen. Wie man leicht sehen kann, sind diese ziemlich intensiv und stören somit die Interpretation von Fragmentspektren stark.

Die Idee zur Reduktion des Störsignals war es nun, den Laserpuls so zu steuern, dass man während des Nulldurchgangs der Sinusfunktion der RF-Spannung durch die Ringelektrode trifft. Die ausgelösten Elektronen haben dann eine Energie nahe null und können nicht mehr ionisieren. Dazu wurde auf das Signal, welches den Laser ansteuert, ein ns-Delay gegeben und die Störsignale zeitabhängig untersucht. In Abbildung 30 ist die Intensität der Störsignale auf einer logarithmischen Skala gegen die Zeitverschiebung aufgetragen. Der Delaygenerator besaß zwei Zeiteinstellungen von 0-1,1  $\mu\text{s}$  und 0-11  $\mu\text{s}$  Delay. Da die Ringelektrode eine Radiofrequenz von ca. 780 KHz besitzt, ergibt sich für die Sinusfunktion eine Periodendauer von 1,282  $\mu\text{s}$ . Deshalb konnte nicht die gesamte Sinusfunktionsabhängigkeit im Spektrum dargestellt werden.

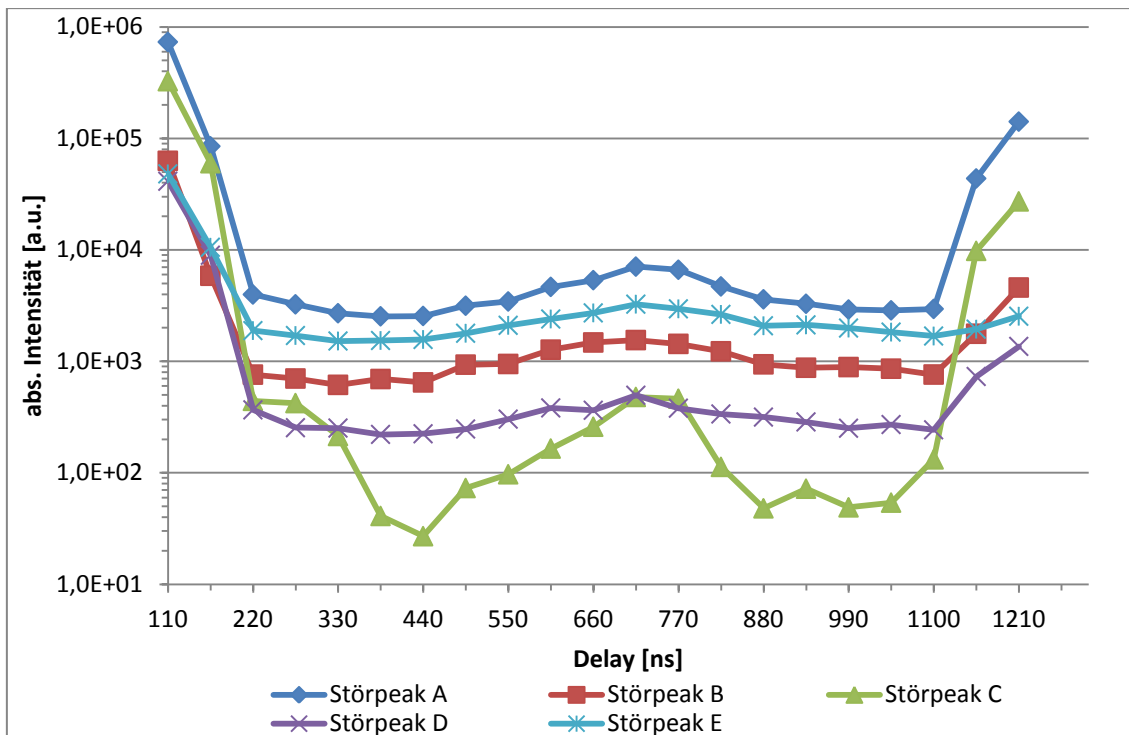


Abbildung 30: Intensitätsvariation in Abhängigkeit der Fallenfrequenz (Nulldurchgang) zur Minimierung des Elektronenstoßes.

Anhand der Abbildung kann man erkennen, dass es einen dramatischen Einbruch des Störsignals bei 440 ns und um die 990 ns gibt. Daraus kann man schließen, dass sich an diesen Punkten der Nulldurchgang der Sinusfunktion befindet. Anhand der beiden Minima ergibt sich eine Differenz von 550 ns, was in etwa  $\tau/2$  der Sinusfunktion entspricht. Der Bereich zwischen den beiden Tiefpunkten ist deshalb der positive Bereich der Sinuskurve. Die hohe Intensität am Anfang und der starke Anstieg am Ende der Kurven deuten somit auf den Beginn (bzw. das Ende) der negativen Polarität hin.

Es wurde für die weiteren Laserexperimente somit ein Delay von 440 ns eingestellt.

In Abbildung 31 ist zum Vergleich zur Abbildung 29 (gleiche y-Skala) das Massenspektrum bei 440 ns Delay gezeigt, der die Störsignalreduzierung deutlich macht.

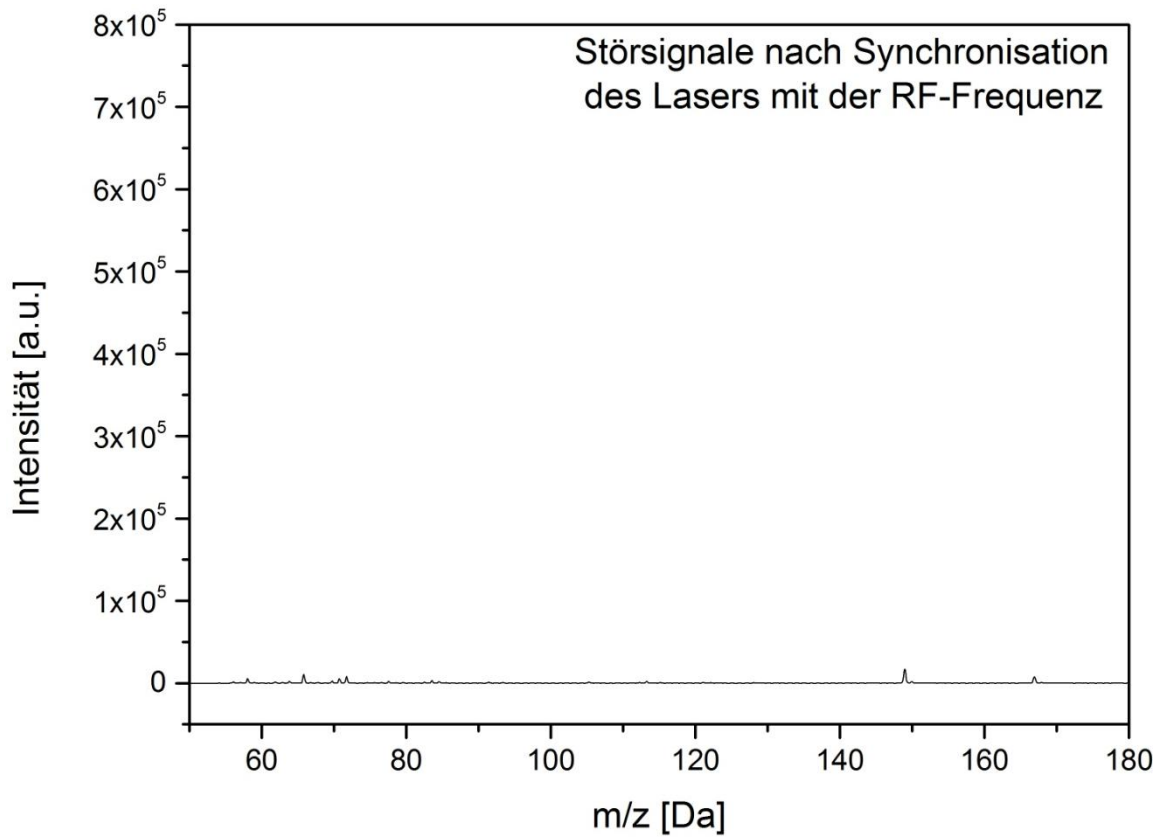


Abbildung 31: Massenspektrum der Störsignale nach Reduzierung bei 440 ns Delay. Zur Veranschaulichung des Signaleinbruchs wurde der gleiche Intensitätsbereich wie in Abbildung 29 gewählt.

Allerdings erkennt man nun, wenn auch klein, noch die Störsignale, die photoinduziert sind und leider nicht reduziert werden können. Diese befinden sich bei den Massen 149 Da und 167 Da sowie im kleineren Massenbereich unter 100 m/z (Abbildung 32).

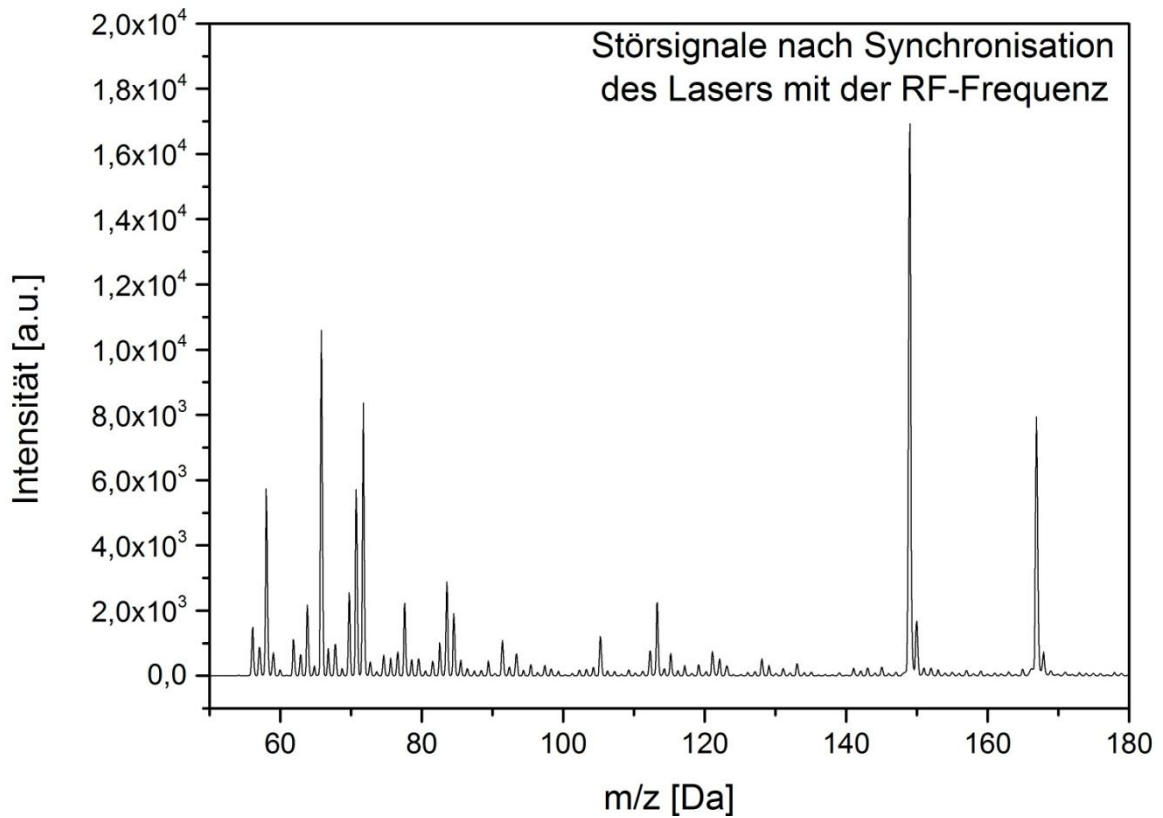


Abbildung 32: Gleiches Massenspektrum aus Abbildung 31, jedoch diesmal mit vergrößerter y-Skala zur Veranschaulichung der reinen photoinduzierten Störsignale bei 440 ns Delay.

Diese Störsignale besitzen zwar eine relativ kleine Intensität, jedoch können sie immer noch die Interpretation von Fragmentspektren stören, wenn zum Beispiel Fragmente mit gleichem m/z-Verhältnis wie die Störsignale auftreten. Deshalb wurden zu allen Messungen mit Probe jeweils noch Untergrundmessungen, also Messungen ohne Probe, aufgenommen um anschließend diese von den Messungen mit Probe zu subtrahieren und somit die Störsignale heraus zurechnen.

### 3.3 Probenpräparation

#### 3.3.1 ESI-MS-Messungen

Alle Proben, die mit ESI-MS-Messungen untersucht wurden, wurden in 1 ml eines Acetonitril-Wasser-Gemisches (Verhältnis 2:1) gelöst und gegebenenfalls mit 5, 10 oder 20 µl Essigsäure versetzt, um die Löslichkeit zu erhöhen oder die Intensität der Mehrfachgeladenen durch Protonierung zu steigern.

Die Einstellungen im ESI-MS-Gerät wurden probenspezifisch durchgeführt. Das bedeutet, dass für jede vermessene Substanz die optimale Einstellung bezüglich Kapillar- und Skimmerspannung, aber auch für die Akkumulationszeit und die Falle gesucht und bestmöglich eingestellt wurde.

#### 3.3.2 Flüssigphasen-UV-VIS-Messungen

Alle Flüssigphasen-UV-VIS-Messungen wurden mit einem CARY 4000 der Firma Varian durchgeführt. Im Folgenden sind die einzelnen Probenpräparationen beschrieben.

##### 3.3.2.1 Arginin-Arginin-Dipeptid (Arg-Arg)

Es wurde eine Lösung aus destilliertem Wasser und Arg-Arg mit einer Konzentration von 145,5 µmol/l angesetzt, woraus immer 100 µl entnommen und auf 3 ml mit H<sub>2</sub>O und der entsprechenden Säure- bzw. Laugenmenge (Salzsäure mit 1 M bzw. Natronlauge mit 0,1 M) für die verschiedenen pH-Wert-Einstellungen aufgefüllt wurden, wobei man somit eine Konzentration von 0,42 µmol/l erhält.

##### 3.3.2.2 Glycin

Wie bei Arg-Arg wurde hier ebenfalls eine Lösung aus Glycin und Wasser mit einer Konzentration von 933 µmol/l angesetzt, jeweils 100 µl daraus entnommen und auf 3 ml mit H<sub>2</sub>O und der entsprechenden Säure- bzw. Laugenmenge aufgefüllt. Dabei entstand eine Probenkonzentration von 32,2 µmol/l.

##### 3.3.2.3 Methylamin

Aus einer 40%igen Methylamin-Lösung wurden 5 µl entnommen und auf 5 ml Wasser gegeben, sodass eine Konzentration von 57,9 mmol/l unter Berücksichtigung der Dichte (1,07g/l) entstand. Aus diesem Ansatz wurden 100 µl entnommen und wie bei den vorherigen Substanzen auf 3 ml Wasser mit Säure- oder Laugenzusatz gegeben. Dadurch erhielt man eine Konzentration von 2 mmol/l.



### **3.3.3 Gasphasen-UV-VIS-Messung an N-Methylacetamid**

Für die Untersuchung an N-Methylacetamid wurde eine Gasphasen-UV-VIS-Messung durchgeführt. Es wurde ein Cary 4 UV-VIS-Spektrometer der Firma Varian benutzt, welches mit einer selbstgebauten Zelle für Gasphasenmessungen ausgestattet und von Herrn Rolf Linder zur Verfügung gestellt wurde. Diese Zelle besitzt zwei beheizbare UV-durchlässige Fenster und es kann zudem einen Unterdruck von ca. 1mbar angelegt werden. In einem Vorratsbehälter wird die Probe zunächst erhitzt, sodass sie in die Gasphase übergeht. Anschließend wird sie durch den Unterdruck in die Zelle überführt. Damit keine Kristallisation speziell an den Fenstern entsteht, können diese beheizt werden, sodass das Licht ungehindert durch die Zelle gelangt und tatsächlich nur die Absorption der Gasphasenmoleküle detektiert wird.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Überprüfung der Absorption von N-Methylacetamid bei 193 nm

Obwohl der Absorptionsbereich einer Peptidbindung schon mehrmals berechnet und auch in flüssigen Medien untersucht wurde [53,132,133], so wurde aber bisher nach unserem Wissen noch nicht ihre Absorption in der Gasphase experimentell analysiert. Die Peptidbindung, die man als Amid mit jeweils einem Rest am N und einem Rest am C sehen kann, besitzt mehrere wellenlängenspezifische Übergänge. Ein erster Singulett-Übergang entsteht durch einen  $n\pi^*$ -Übergang zwischen ungefähr 215 und 230 nm [133,144,145]. Zusätzlich existiert ein starker  $\pi\pi^*$ -Singulett-Übergang zwischen ca. 185 und 200 nm [53,144,145]. Ein zweiter, schwächerer  $\pi\pi^*$ -Übergang, hervorgerufen durch die Carboxylgruppe, befindet sich bei 156 nm [133].

Für die hier zu Grunde liegenden Experimente sollte zunächst experimentell untersucht werden, ob eine Peptidbindung auch in der Gasphase bei 193 nm absorbiert. Dazu wurde N-Methylacetamid als Molekül gewählt, da es mit seinen Methylgruppen am Stickstoff und am Kohlenstoff das kleinste Modell einer Peptidbindung darstellt.

In Abbildung 33 sind die Gasphasen-UV-VIS-Absorptionsspektren von N-Methylacetamid bei verschiedenen Temperaturen gezeigt. Die Intensivierung der Absorption bei steigender Temperatur ist darauf zurückzuführen, dass sich bei höherer Temperatur auch mehr Moleküle in der Gasphase befinden, die dann auch zur Absorption beitragen können. Allerdings wurde versucht in der Nähe der Raumtemperatur zu bleiben um sicherzustellen, dass sich das Molekül nicht chemisch verändern kann.

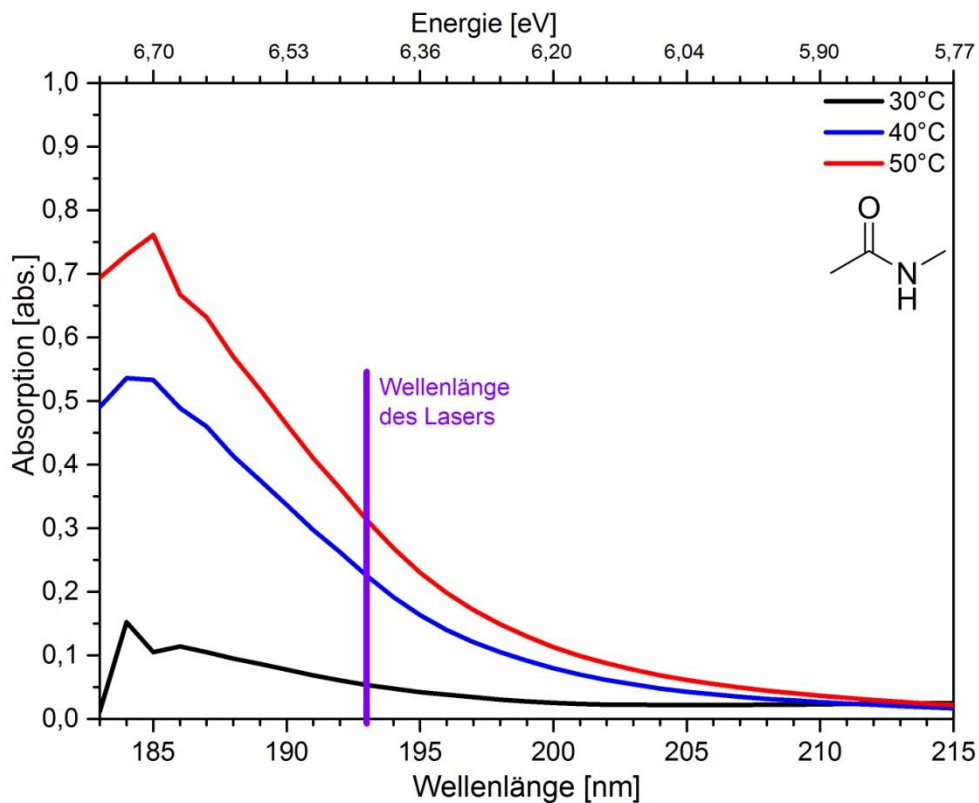


Abbildung 33: Gasphasenabsorptionsspektren von N-Methylacetamid bei verschiedenen Temperaturen. Die Zunahme der Intensität mit der Temperatur ist auf die wachsende Teilchenzahl in der Gasphase zurückzuführen. Es ist zu beachten, dass die Spektren breit sind (siehe Text). Die Wellenlänge des Lasers liegt in der ansteigenden Flanke und kann somit für die Anregung benutzt werden.

Wie man sieht, befindet sich der Laser mit seinen 193 nm noch in der ansteigenden Flanke der Absorption und eignet sich somit für die Anregung von Peptiden.

Das Spektrum ist zudem energetisch breit und praktisch strukturlos. Ein breites Spektrum resultiert entweder aus einer starken Geometrieverschiebung beim Übergang oder einer Lebensdauerverkürzung des angeregten  $\pi\pi^*$ -Zustandes. Nach Prof. Michael Schmitt (Institut für Physikalische Chemie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) gab es Versuche zur resonanten Zweiphotonen-Ionisation (1+1 R2PI), die allerdings nicht erfolgreich waren. Man vermutete daraus, dass der  $S_1$ -Zustand der Peptidbindung kurzlebig ist. Theoretische Rechnungen zeigen, dass der angeregte  $\pi\pi^*$ -Zustand vermutlich ein höherer Singulett-Zustand ist [146]. Für diese ist wohl bekannt, dass sie begrenzte Lebensdauer besitzen. Dies unterstützt unsere These einer kurzen Lebensdauer des  $\pi\pi^*$ -Zustandes.

Ein elektronischer Übergang vom angeregten  $\pi\pi^*$ -Singulett-Zustand mittels *intersystem crossing* in den energetisch tieferliegenden  $n\pi^*$ -Triplet-Zustand [144] ist zwar prinzipiell möglich. Jedoch wurde dies nie zuvor durch Phosphoreszenz beobachtet [147].

Vergleicht man die gemessenen Gasphasenabsorptionsspektren mit dem berechneten Spektrum von L. Clark [53], so findet man eine sehr genaue Übereinstimmung des Absorptionsbereiches beider Spektren bis 185 nm. Da wegen der Eigenschaften unseres Spektrometers das Gasphasenspektrum nicht weiter zu kleineren Wellenlängen aufgenommen werden konnte, ist in unserem Spektrum der zweite  $\pi\pi^*$ -Übergang bei 156 nm nicht mehr zu sehen.

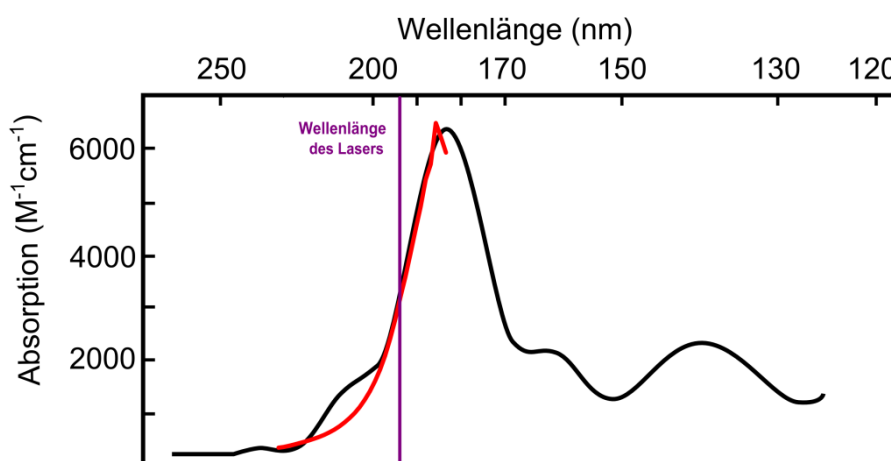


Abbildung 34: Vergleich des gemessenen Gasphasenabsorptionsspektrum von N-Methylacetamid (rote Kurve) mit dem Absorptionsspektrum aus der Literatur [53]. Die Kurve aus Ref. [53] entstand durch das Mitteln über verschiedene Acetamid-Substanzen (schwarze Kurve). Eine vollständige Übereinstimmung ist deshalb nicht möglich.

## 4.2 Untersuchungen an Aminosäuren und einfachgeladenen Peptidketten mittels photoinduzierter Anregung

Im Folgenden werden die Photofragmentierungsergebnisse, die an den untersuchten Aminosäuren und Peptiden erzielt wurden, dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass für die Lasermessungen jeweils ein Spektrum mit Substanz aufgenommen wurde und eines ohne Substanz (hier Untergrundspektren genannt). Damit werden die Störsignale ermittelt und dann heraus gerechnet. Dazu wurden die Untergrundspektren der jeweiligen Schusszahl von dem Spektrum des dazugehörigen Pendants mit Substanz abgezogen. Zudem wurden in dieser Arbeit die jeweiligen Massenangaben den jeweiligen Probenflaschenetiketten entnommen. Die Substanzdatenblätter können bei den jeweiligen Herstellerfirmen zusätzlich eingesehen werden.

Für die Untersuchungen von längeren und mehrfachgeladenen Peptidketten war es zunächst wichtig zu wissen, wie sich die Peptide generell bei einer Photoanregung verhalten. Deshalb wurden zunächst Aminosäuren und kleine Peptide untersucht.

### 4.2.1 Aminosäuren

Bevor man längere Peptidketten untersuchen konnte, musste zunächst geklärt werden, ob die verwendete Wellenlänge von 193 nm auch Einfluss auf die einzelnen Aminosäuren hat oder ob diese tatsächlich nur die Peptidbindung anregt. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Aminosäuren auf ihre Fragmentierung durch die Wellenlänge von 193 nm hin untersucht (Tabelle 3), wobei zwischen aromatischen und nicht-aromatischen Aminosäuren unterschieden wurde.

Tabelle 3: Untersuchte Aminosäuren

Aminosäure	Molare Masse [g/mol]	aromatisch
Gly	75.07	Nein
Leu	131.18	Nein
Glu	147.13	Nein
His	155.2	Ja
Phe	165.19	Ja
Trp	204.23	Ja
Lys	146.19	Nein
Arg	174.2	Nein

Die verwendete Photonenenergie entsprach 6,4 eV. Die Dissoziationsenergie einer typischen C-C-Bindung entspricht ca. 3,8 eV [148]. Da die Aminosäuren im Sinne der RRKM-Theorie noch nicht groß sind und ohne Helium in der Falle den Ionen mindestens einige 10-100  $\mu\text{s}$  zum Zerfall bis zur Kühlung zur Verfügung stehen, kann man davon ausgehen, dass alle Ionen nach der Absorption eines Photons zerfallen. Die Zerfallswahrscheinlichkeit und die Absorptionswahrscheinlichkeit liegen hier also so nahe beieinander, dass man sie gleichsetzen kann.

In Abbildung 35 ist die prozentuale Abnahme der einzelnen Aminosäuren nach einem Laserschuss und ohne Helium in der Falle in Bezug auf das jeweilige Spektrum ohne Bestrahlung dargestellt. Dabei wurden die Spektren ohne Bestrahlung jeweils als 100 % angesehen und auf diese normiert.

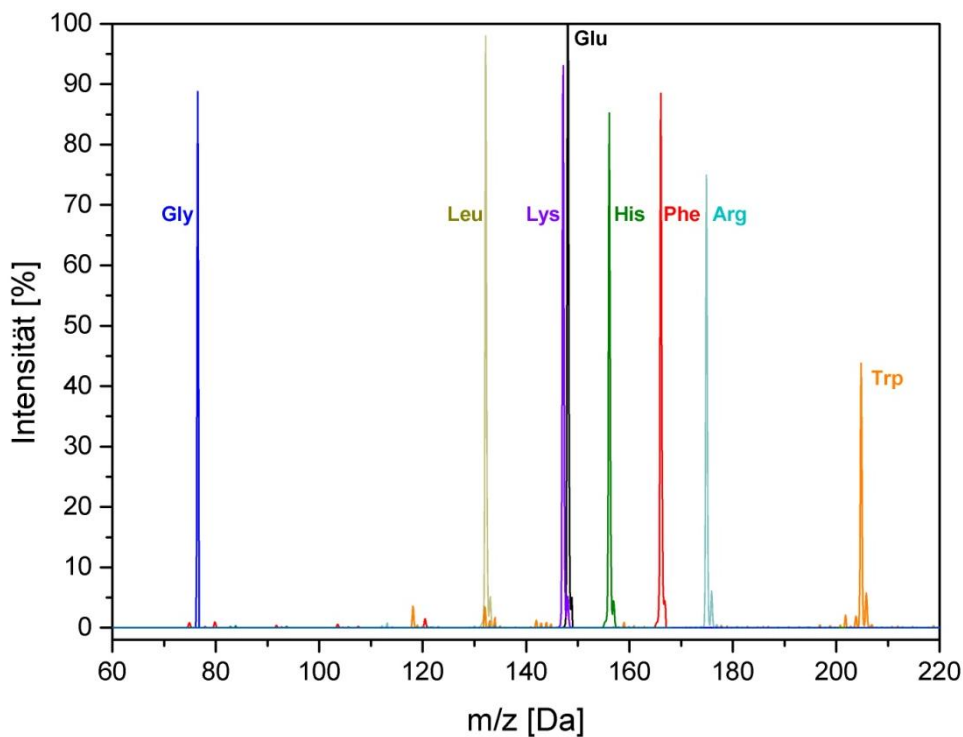


Abbildung 35: Normierte Muttermassenabnahme der verschiedenen Aminosäuren nach Bestrahlung mit einem Laserpuls ( $0.33 \text{ mJ/mm}^2$  bei 193 nm). 100% entsprechen dem Signal ohne Laseranregung.

Wie man erkennen kann, nehmen zum einen die nicht-aromatischen Aminosäuren kaum ab. Eine Ausnahme scheint Arginin zu sein, welches auf 74% abfällt. Die aromatischen Aminosäuren verlieren nach einem Laserschuss generell etwas mehr an Intensität als die nicht-aromatischen Systeme. Mit obiger Annahme, dass alle kleinen Aminosäuren nach einem Photon bei 193 nm fragmentieren, kann man dieses Ergebnis auf den Anregungsquerschnitt zurückführen. Dies bedeutet, dass die nicht-aromatischen Aminosäuren einen kleineren Anregungsquerschnitt bezüglich der

verwendeten Wellenlänge besitzen als die aromatischen Aminosäuren. Da die aromatischen Systeme stärker absorbieren, muss man diese bei 193 nm – Anregung neben der Peptidbindung natürlich ebenfalls als Chromophor betrachten. Für längere Peptidketten ist dies ein Vorteil, da durch die zusätzlichen Chromophore eine größere Wahrscheinlichkeit besteht, Laserenergie in Form vieler Photonen in das Molekül zu bringen und es dadurch zu fragmentieren.

Betrachtet man das Arginin, so stellt man fest, dass es sich untypisch verhält und besser wie beispielsweise Phenylalanin absorbiert, weshalb dieses Verhalten genauer untersucht werden muss.

#### 4.2.1.1 Sonderstellung des Arginins

Durch seine Gasphasenbasizität wird das Arginin mehrheitlich an der Guanidin-Gruppe und nicht am N-Terminus protoniert [78]. Betrachtet man nur die Protonierung an dieser Gruppe, so können dabei mehrere Tautomere innerhalb dieser Guanidin-Gruppe entstehen, wie in Abbildung 36 zu sehen ist [149].

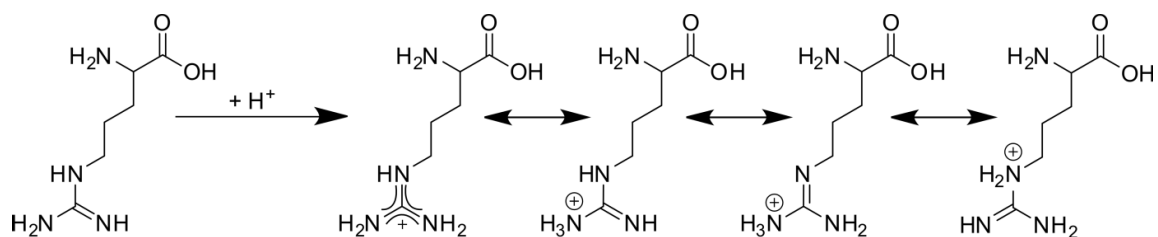


Abbildung 36: Tautomere der Guanidin-Gruppe des protonierten Arginins.

Durch Umlagerung des Wasserstoffatoms kommt es zu einer Delokalisation der Ladung innerhalb dieser Gruppe. Vergleicht man diese mit den anderen untersuchten Aminosäuren, so ähnelt das Arginin mit seiner Delokalisationsmöglichkeit mehr den aromatischen als den nicht-aromatischen Systemen. Durch die vermehrten Protonierungsmöglichkeiten aufgrund der vermehrten NH-Gruppen kann man davon ausgehen, dass die Möglichkeit der Absorption und somit offensichtlich auch der Anregungsquerschnitt größer wird.

### 4.2.2 Dipeptide

Bei der Untersuchung der Dipeptide wurde der Fokus bei der Photofragmentierung darauf gelegt, wie gut das Dipeptid dissoziiert und welche Fragmente entstehen. In Tabelle 4 sind die untersuchten Substanzen aufgelistet.

Tabelle 4: Untersuchte Dipeptide

Dipeptid	Molare Masse [g/mol]
Leu-Leu	245
Leu-Phe	279
Phe-Leu	280
His-Trp	341
Arg-Arg	330

Betrachtet man die prozentuale Abnahme der Muttermasse in Bezug auf die eingestrahlte Energie, so erkennt man eine stärkere Abnahme für die Dipeptide mit aromatischen Seitenketten im Vergleich zu Leu-Leu (Abbildung 37).

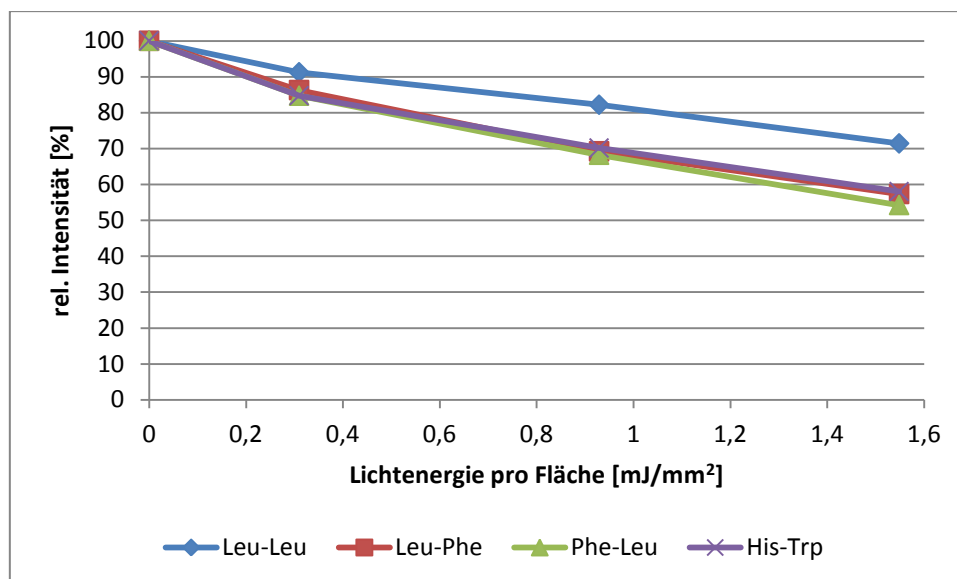


Abbildung 37: Prozentuale Abnahme der Muttermasse der verwendeten Dipeptide.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den oben gemachten Beobachtungen, denn durch den Zusatz einer Aminosäure mit aromatischem Rest kann ein größerer Anregungsquerschnitt erreicht werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass Energie in das Molekül fließt und somit dissoziieren kann, höher ist.



Betrachtet man nun jedes Massenspektrum der obigen Dipeptide einzeln, so stellt man Fragmentierungsmuster fest, welche auch durch andere *high-energy* Methoden entstehen und sich mit den Ergebnissen von Reilly et al. [134] decken.

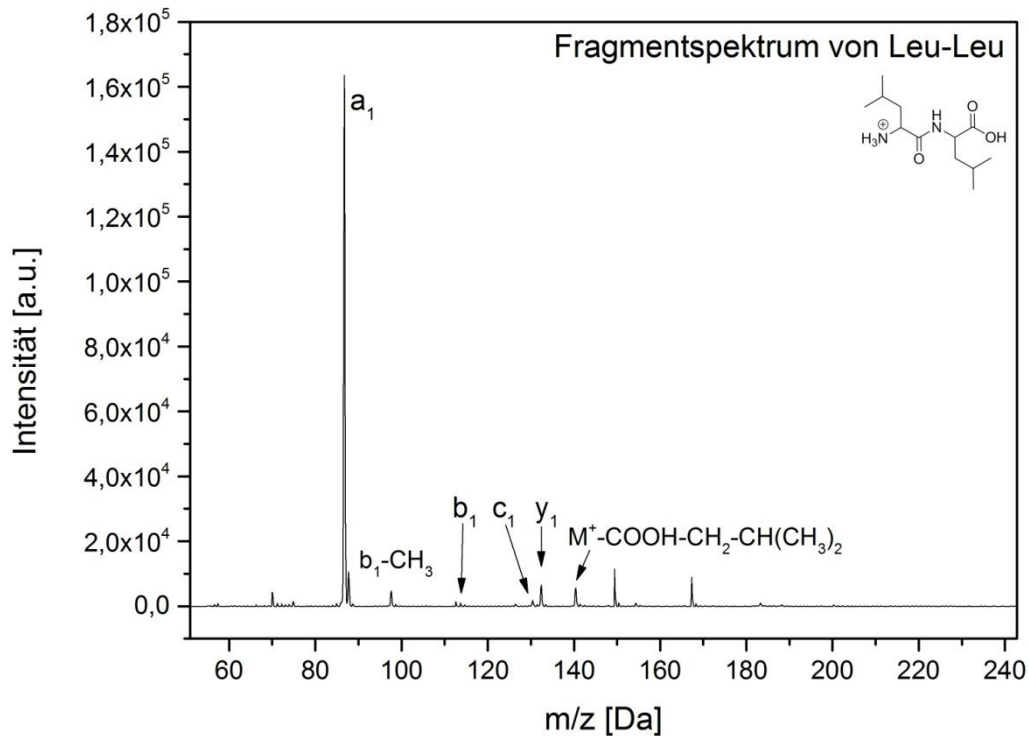


Abbildung 38: Fragmentspektrum von Leu-Leu bei einer Laserenergie pro Fläche von 1,55 mJ/mm<sup>2</sup>. Um die Fragmente besser sehen zu können, wurde das Muttermassensignal bei 246 m/z aus dem Bildausschnitt herausgenommen.

In Abbildung 38 ist das Fragmentspektrum von Leu-Leu bei einer zugeführten Energie von 1,55 mJ/mm<sup>2</sup> (entspricht drei Laserschüssen) zu sehen. Durch die Photoanregung wird bevorzugt das a<sub>1</sub>-Fragment gebildet, während die b<sub>1</sub>-, c<sub>1</sub>- und y<sub>1</sub>-Fragmente hingegen kaum gebildet werden. Zu sehen sind aber auch Fragmente, bei denen mehrere Bindungen gebrochen werden mussten, wie das b<sub>1</sub>-CH<sub>3</sub> - Fragment oder das Fragment, bei dem die Carboxylgruppe und die Seitenkette des Leucins abgespalten wurde. Solche Fragmente entstehen meist nur bei hochenergetischen Prozessen, was zeigt, dass das Dipeptid sehr viel Energie aufgenommen haben muss.

Im Vergleich dazu ist in Abbildung 39 das Fragmentspektrum von Leu-Phe dargestellt.

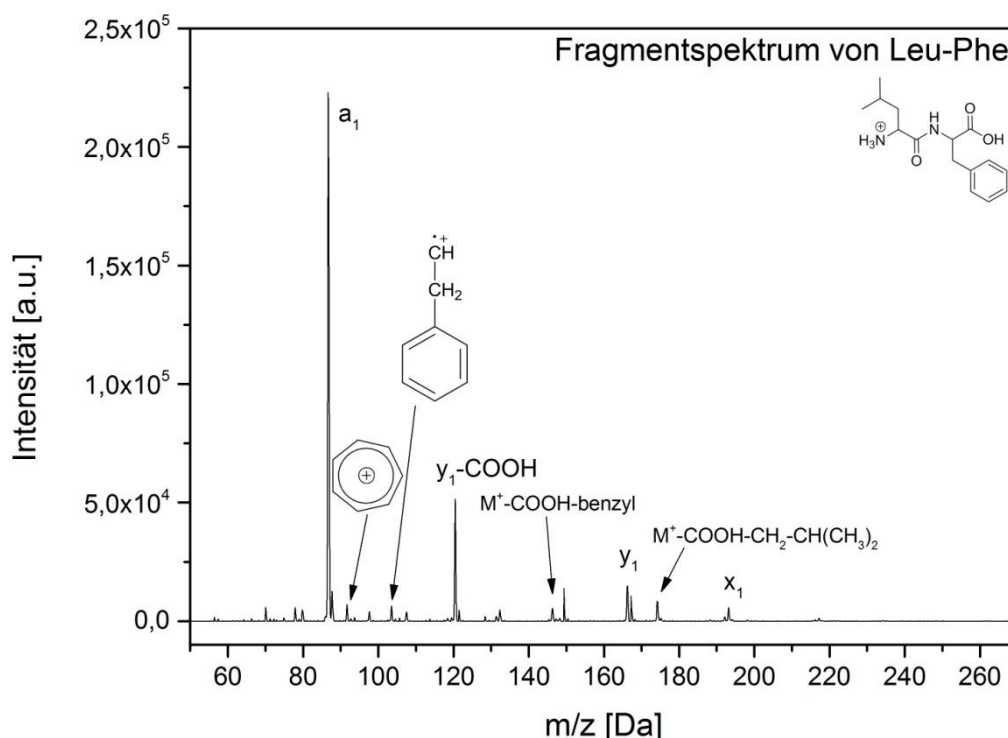


Abbildung 39: Fragmentspektrum von Leu-Phe nach einer Anregung von 1,55 mJ/mm<sup>2</sup>.

Auch hier ist das  $a_1$ -Fragment wieder das mit Abstand intensivste Fragment, während ebenfalls wieder innerkettige Fragmente (also Fragmente, die durch mehrere Brüche innerhalb des *backbones* gebildet werden) entstehen. Gerade bei aromatischen Aminosäuren kann es bei hochenergetischen Prozessen auch zu einer Fragmentbildung an der Seitenkette kommen [150,151]. Die Existenz radikalischer Fragmente des Phenylchromophors legt sogar eine Ionisation neutraler Bereiche durch eine 1+1-Ionisation nahe.

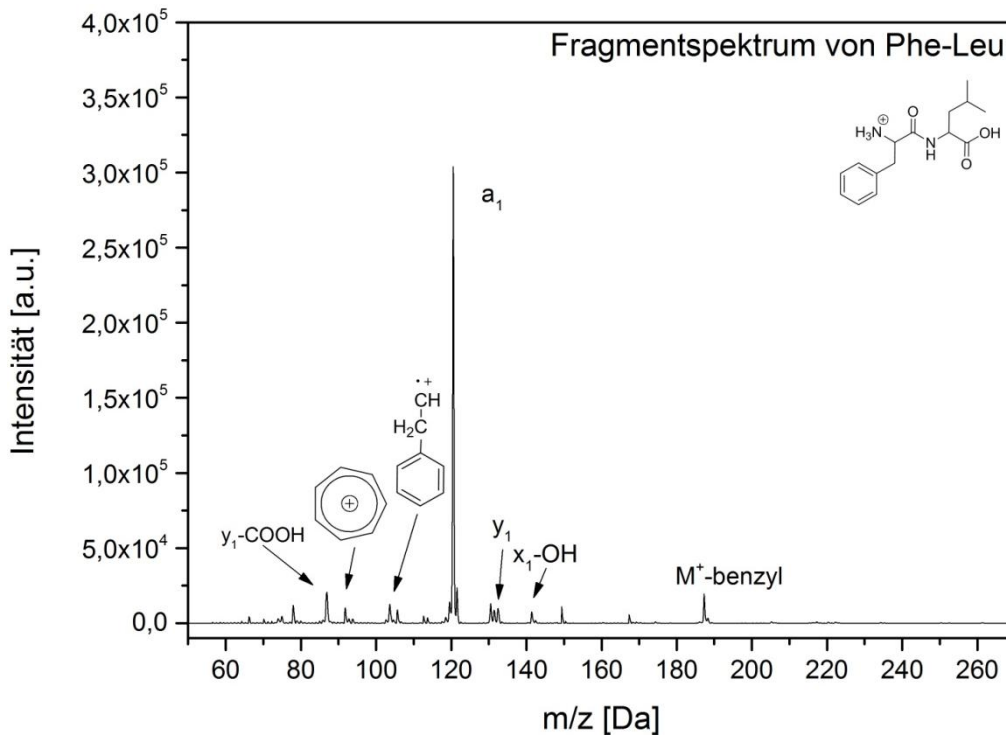


Abbildung 40: Fragmentspektrum von Phe-Leu bei einer Laserenergie von 1,55 mJ/mm<sup>2</sup>.

Betrachtet man das Fragmentspektrum von Phe-Leu, also des vertauschten Dipeptids, so ist auch hier das a<sub>1</sub>-Fragmentsignal der Intensivste. Im Vergleich zu Leu-Phe ist dieser jedoch im Verhältnis des anderen Fragments etwas intensiver. Ebenfalls entstehen hier wieder Fragmente der Seitenkette und auch Fragmente, bei denen einzelne Gruppen zusätzlich abgespalten wurden, wie das [x<sub>1</sub>-OH]- oder das [M<sup>+</sup>-benzyl]-Ion.

Bei der Fragmentierung von His-Trp gibt es wegen der beiden aromatischen Aminosäuren ziemlich viele Fragmentierungen, bei denen die aromatischen Seitenketten abgespalten werden.

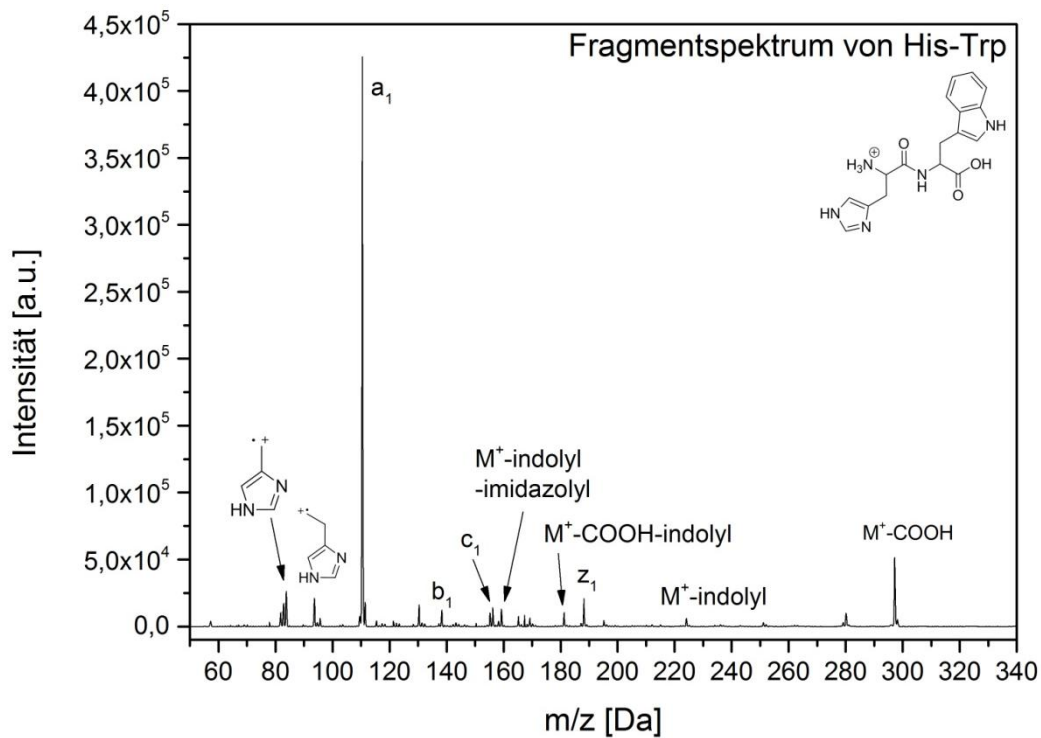


Abbildung 41: Fragmentspektrum von His-Trp bei einer zugeführten Laserenergie von 1,55 mJ/mm<sup>2</sup>.

Vergleicht man die Spektren der untersuchten Dipeptide miteinander, so kann man sagen, dass die Bildung des a<sub>1</sub>-Fragments bei allen Substanzen der dominante Fragmentierungskanal ist. Da die Stelle des Bindungsbruchs und die Stelle der Absorption bei einer Fragmentierung unter RRKM-Bedingungen nicht notwendigerweise korrelieren, zeigen die Photofragment-Massenspektren, dass die C-C-Bindung in der Peptidbindung offensichtlich die schwächste Bindung im Molekül ist. Dies deckt sich gemäß Reilly et al. [134] mit dem Modell des photoinduzierten Zerfalls.

### 4.2.3 Tripeptide

Stellvertretend für die Tripeptide wurden vier Substanzen untersucht, wobei neben Tripeptiden mit aromatischen Aminosäuren auch Leu<sub>3</sub> verwendet wurde (Tabelle 5).

Tabelle 5: Untersuchte Tripeptide.

Tripeptid	Molare Masse [g/mol]
Leu-Leu-Leu	358
Leu-Leu-Phe	392
Leu-Trp-Met	449
Trp-Gly-Gly	319

Betrachtet man zunächst die prozentuale Abnahme der Muttermasse nach der Photoanregung, so stellt man fest, dass die Tripeptide im Vergleich zu den Dipeptiden stärker fragmentiert wurden.

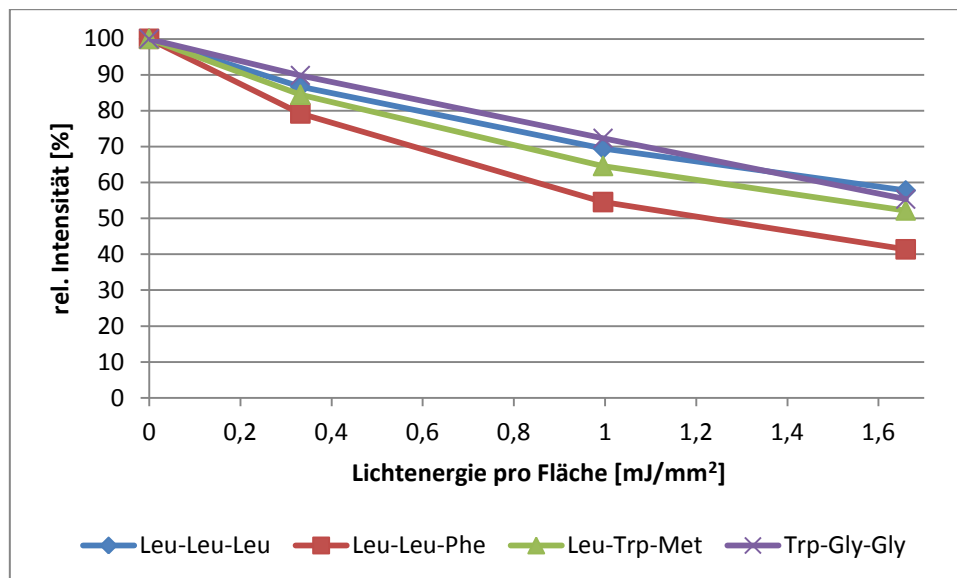


Abbildung 42: Prozentuale Abnahme der Muttermasse von jedem verwendeten Tripeptid.

Dieses Verhalten deckt sich mit der Vermutung, dass durch das Hinzukommen eines weiteren Chromophors, nämlich der zweiten Peptidbindung, die Anregungswahrscheinlichkeit im Molekül steigt und somit mehr Moleküle die Möglichkeit zum Fragmentieren besitzen. Das heißt, für die Tripeptide ist der Effekt der Zunahme des Anregungsquerschnitts stärker als der Effekt der Verhinderung des verlangsamten Zerfalls nach RRKM durch Stöße mit Restgas.

Analysiert man die Fragmentspektren, so sind zumindest für Leu<sub>3</sub> und Leu<sub>2</sub>-Phe die a-Fragmente wieder die intensivsten. Dazu kommen jetzt allerdings auch Fragmente, bei denen nur kleine Gruppen, wie beispielsweise die Carboxylgruppe, abgespalten werden.

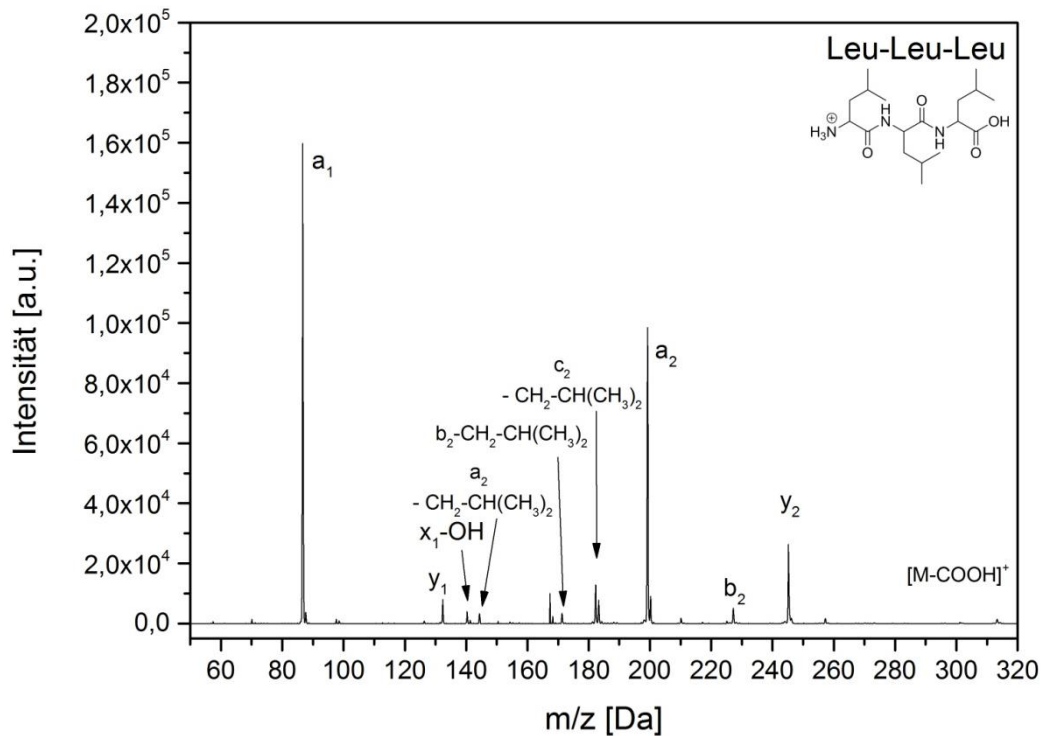


Abbildung 43: Fragmentspektrum von Leu<sub>3</sub> bei einer zugeführten Laserenergie von 1,66 mJ/mm<sup>2</sup>.

Im Fragmentmassenspektrum von Leu<sub>2</sub>-Phe ist weiterhin auffällig, dass die Seitenkettenfragmente, wie die des Phenylalanins, im Gegensatz zu den Dipeptiden nur kaum vorhanden sind. Dies kann zum einen an der Dominanz der beiden a-Fragmente liegen. Zum anderen sind beim Tripeptid nun auch noch b- und y-Fragmente zu erkennen, sodass wahrscheinlich durch die Protonenwanderung am *backbone* schnellere Fragmentierungskanäle angesprochen werden. Da die Protonenwanderung auch über Biegeschwingungen bis zur Rückfaltung ablaufen kann, könnte dieser Mechanismus im flexiblen Tripeptid stärker werden.

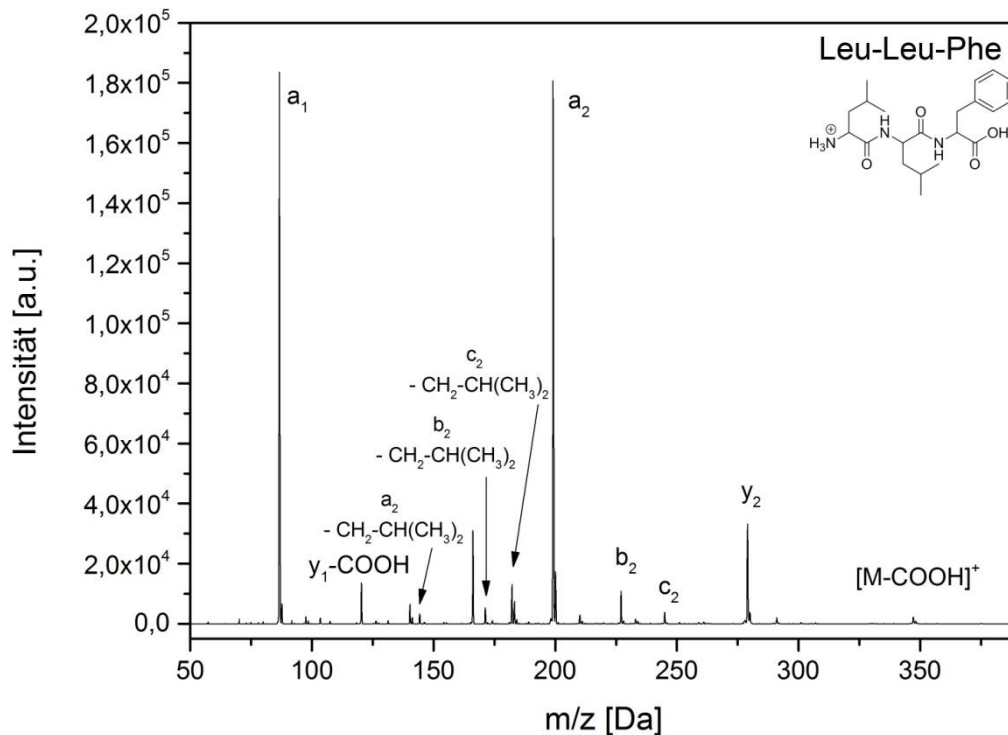


Abbildung 44: Fragmentspektrum von Leu<sub>2</sub>-Phe bei einer zugeführten Laserenergie von  $1,66 \text{ mJ/mm}^2$ .

Im Vergleich dazu verhalten sich die hier untersuchten tryptophanhaltigen Tripeptide etwas anders. Bei Leu-Trp-Met beispielsweise ist das intensivste Signal das  $a_2$ -Fragment mit abgespaltener Tryptophanseitenkette. Das Signal des intakten  $a_2$ -Fragments dagegen besitzt nur eine relativ geringe Intensität. Generell entstehen bei Leu-Trp-Met und bei Trp-Gly-Gly viel mehr Fragmente, bei denen auch die Tryptophanseitenkette abgespalten wurde. Dass diese Fragmente zu sehen sind, kann daran liegen, dass durch einen 2-Photonenschritt das Indol ionisiert wird und es somit zur Abspaltung kommt.

Durch die innerkettige Abspaltung werden die Spektren außerdem komplexer, da es durch die Entstehung von Radikalstellen zu Folgereaktionen in Form von H-Abspaltung kommt. Dies kann man zum Beispiel im Bereich um  $145 \text{ m/z}$ ,  $130 \text{ m/z}$  oder aber auch  $115 \text{ m/z}$  in den beiden Spektren gut erkennen. Dort befinden sich zusätzlich Signale mit je nur einem  $m/z$ -Unterschied.

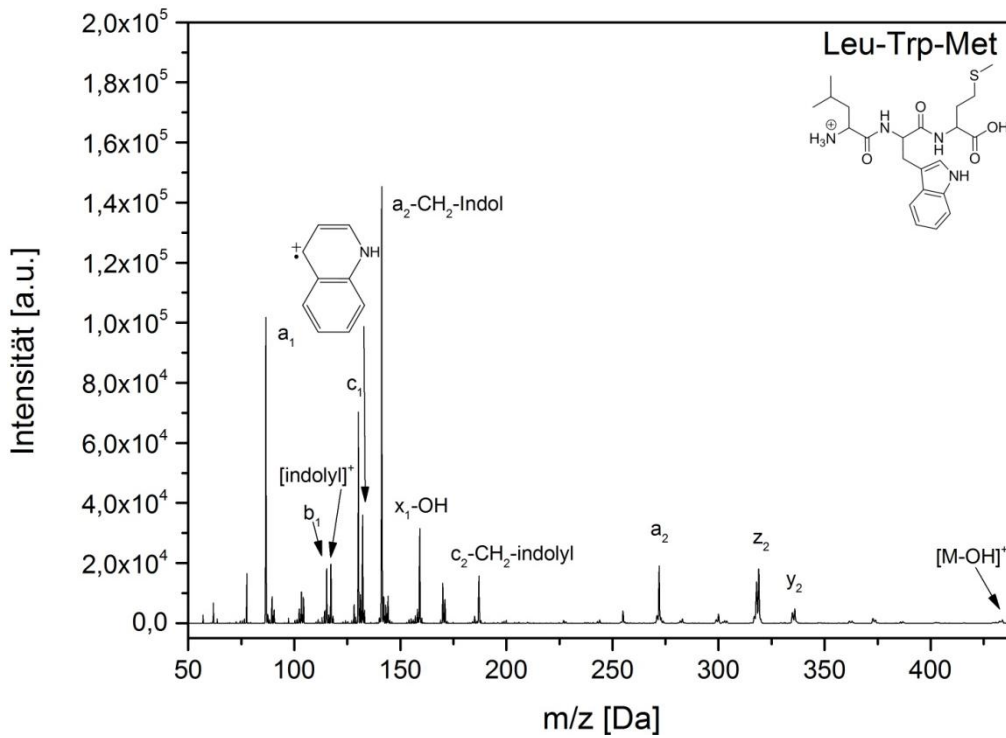


Abbildung 45: Fragmentspektrum von Leu-Trp-Met bei einer zugeführten Laserenergie von  $1,66 \text{ mJ/mm}^2$ .

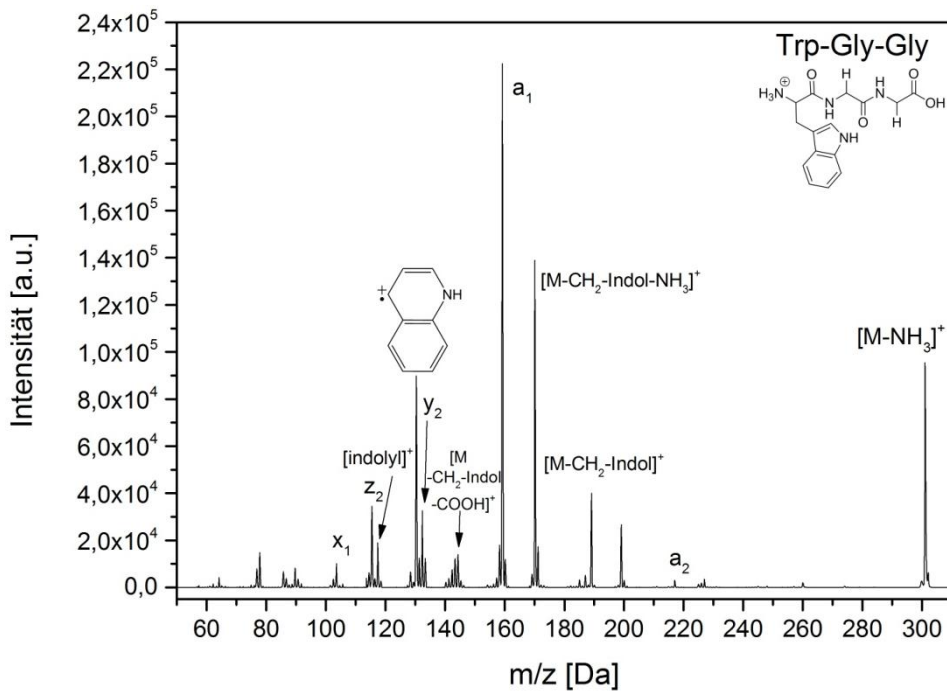


Abbildung 46: Fragmentspektrum von Trp-Gly-Gly bei einer zugeführten Laserenergie von  $1,66 \text{ mJ/mm}^2$ .



#### 4.2.4 Längerkettige Peptide

Um einen guten Übergang zu den langkettigen Peptiden zu bekommen, wurden viele Peptide mit einer Kettenlänge zwischen vier und sieben Aminosäuren vermessen. Exemplarisch sollen hier aber nur zwei Peptide gezeigt (Tabelle 6) und auf ihr Fragmentierungsverhalten hin untersucht werden. Diese wurden ausgesucht, da sie das beste Fragmentierungsverhalten zeigen.

Tabelle 6: Die hier verwendeten längerkettigen Peptide.

Sequenz	Molare Masse [g/mol]
Ala <sub>3</sub> -Tyr	394
Leu <sub>4</sub> -Tyr	633

Schaut man sich zunächst die prozentuale Abnahme der Muttermasse an (Abbildung 47), so erkennt man eine starke Fragmentierung nach nur einem Laserschuss. Dies scheint zunächst überraschend, da bei den kleineren Peptidketten nach dem ersten Laserschuss nur 20% fragmentiert wurden. Allerdings kommen durch das Längerwerden der Peptidkette wieder neue Chromophore hinzu, was die Absorptionswahrscheinlichkeit erhöht.

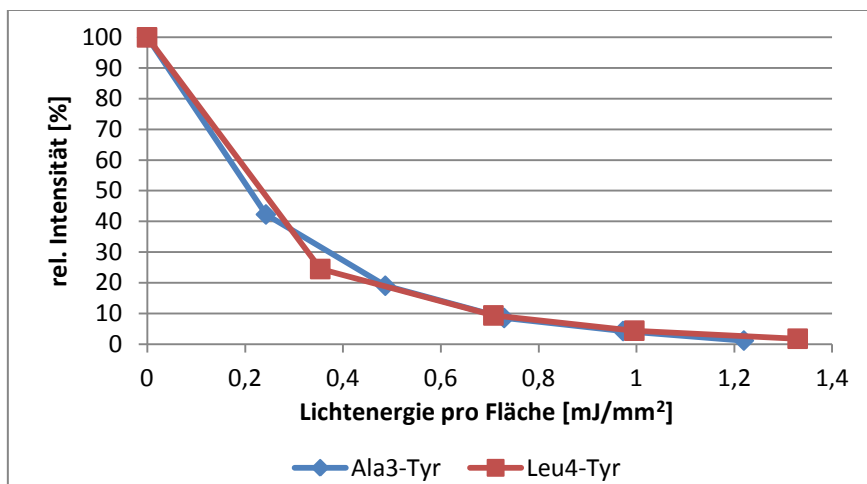


Abbildung 47: Prozentuale Abnahme der Muttermasse von Ala<sub>3</sub>-Tyr und Leu<sub>4</sub>-Tyr, aufgetragen gegen die Lichtenergie pro Fläche.

Für die Interpretation der Fragmentspektren wurden hier nur jeweils die beiden Spektren verwendet, die nach Bestrahlung mit einem Laserschuss entstanden sind. Da bei der weiteren Bestrahlung die Fragmente ebenfalls Photonen absorbieren können, können daraus erneut Fragmente entstehen, sodass das Spektrum verfälscht wird.

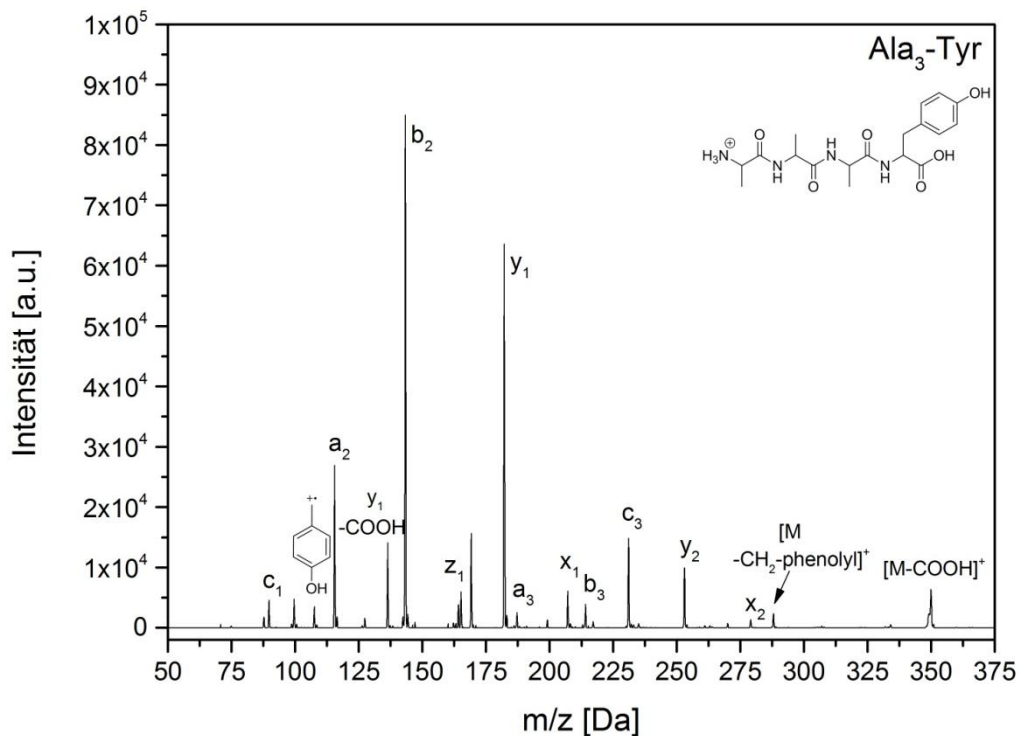


Abbildung 48: Fragmentspektrum von Ala<sub>3</sub>-Tyr bei einer Laserenergie von 0,243 mJ/mm<sup>2</sup>.

In Abbildung 48 ist das Fragmentspektrum von Ala<sub>3</sub>-Tyr dargestellt. Nun sind die a-Fragmente nicht mehr die intensivsten Signale sondern das b<sub>2</sub>- und y<sub>1</sub>-Fragment. Wegen der Limitierung durch die untere Massengrenze, kann das eventuell entstehende a<sub>1</sub>-Fragment aber nicht angezeigt werden. Auffällig ist auch, dass hier sehr wenig innerkettige Fragmente entstehen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass durch die ansteigende Größe des Moleküls die zugeführte Energie für einen zweiten schnellen Bindungsbruch nicht reicht. Dieses Spektrum ist atypisch für die Photofragmentierung, da in allen anderen Spektren immer die gesamte a-Fragmentreihe zu beobachten war und die a-Fragmente generell am dominantesten waren, was den Beobachtungen von Reilly et al. entsprach [134]. Jedoch muss man bei dieser Peptidkette darauf achten, dass das a<sub>1</sub>-Fragment nur ein m/z-Verhältnis von 45 besitzt und somit unterhalb der Massennachweisgrenze des Massenspektrometers liegt.

Beim Fragmentspektrum von Leu<sub>4</sub>-Tyr kann man dieses Verhalten ebenfalls erkennen. Interessant hierbei ist allerdings, dass es eine fast vollständige Reihe von a-, b- und y-Fragmenten gibt, jedoch keine c-, x- oder z-Fragmente.

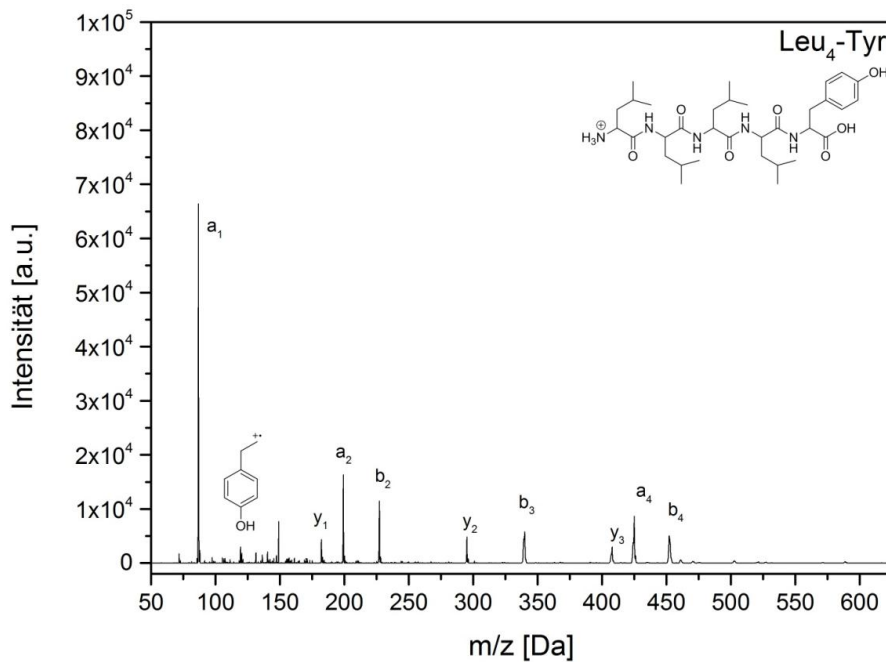


Abbildung 49: Fragmentspektrum von Leu<sub>4</sub>-Tyr bei einer Laserenergie von 0,354 mJ/mm<sup>2</sup>.

Wenn man fortführt, dass a-Fragmente vermehrt durch *high-energy* Methoden und b-/y-Fragmente eher bei *low-energy* Methoden entstehen, so sieht das für dieses Spektrum eher nach einer Konkurrenzreaktion zwischen diesen beiden Fragmentierungswegen aus. RRKM-bedingt muss die Energie für eine Dissoziation mit der Größe des Moleküls immer größer werden, um eine Dissoziation in endlicher Zeit zu erreichen. Wird das Ion nun bestrahlt, kommt es möglicherweise zur Protonenwanderung am *backbone*. Wandert das Proton schnell an eine Peptidbindung, so kann diese unter *high-energy* Bedingungen dissoziieren und es kommt zur Bildung von a-Fragmenten. Wandert das Proton allerdings an eine Peptidbindung während das Molekül schon Energie durch Schwingungen abführt, so besitzt es für die Dissoziation weniger Energie, die dennoch ausreicht, um unter *low-energy* Bedingungen b- bzw. y-Fragmente zu bilden.

Für die weiteren Untersuchungen ist es interessant zu sehen, wie sich die größeren Ionen unter Photoanregung verhalten.

### 4.3 Untersuchungen an ein- und mehrfachgeladenen Peptidketten mittels Stoß- und Laserfragmentierung

Durch die Verlängerung der Peptidkette kann es in Oligopeptiden zu einer mehrfachen Protonierung kommen und es somit mehrfachgeladene Ionen geben. Die Untersuchung dieser mehrfachgeladenen Ionen, zusätzlich zu den einfachgeladenen Molekülen, eröffnet nun neue Möglichkeiten zum einen für die Sequenzanalyse und zum anderen für die Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens solcher Moleküle. Da sich aufgrund der RRKM-Theorie größere Moleküle im Vergleich zu kleinen Molekülen schwierig bis kaum fragmentieren lassen, hat man sich erhofft, dass durch die Mehrfachladung die Dissoziationsenergie wegen der Coulombabstoßung erniedrigt wird und so die großen Moleküle doch noch dissoziieren können (vgl. Kapitel 2.8).

Besonderes Augenmerk wurde bei der Untersuchung auf die Moleküle gelegt, die in Tabelle 7 aufgelistet sind. Dabei wurden die hier verwendeten Moleküle nicht nur photoinduziert sondern auch stoßinduziert fragmentiert, um einen Vergleich der beiden Fragmentierungsmuster zu erhalten.

Tabelle 7: Verwendete Moleküle für die Untersuchung von Mehrfachgeladenen.

Name	Anzahl der Aminosäuren	Molare Masse [g/mol]	Maximale Ladungszahl
Leu-Trp-Met-Arg	4	604	2
Angiotensin II	8	1046	3
Bradykinin	9	1060	2
Angiotensin I	10	1296	4

### 4.3.1 Leu-Trp-Met-Arg

Leu-Trp-Met-Arg, kurz LWMR, ist das kleinste Peptid, das sowohl einfach- als auch zweifachgeladen dargestellt werden konnte. Dabei kann eine Protonierung sowohl an der Guanidin-Gruppe des Arginins, am N-Terminus oder dem Indolring des Tryptophans stattfinden (Abbildung 50).

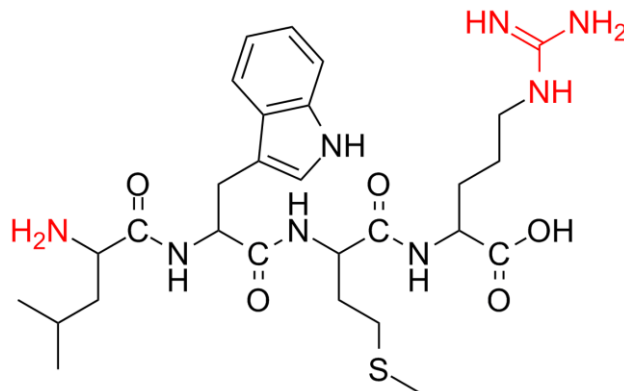


Abbildung 50: Molekülstruktur des LWMR-Tetrapeptids. In rot dargestellt sind die wahrscheinlichsten Protonierungsstellen im Molekül.

Wie in Kapitel 2.5.2.1 beschrieben, hängt die Protonierungsstelle von der Gasphasenbasizität der einzelnen Aminosäuren ab. Weil Arginin die größte Basizität besitzt [91], lagert sich das erste Proton mit großer Wahrscheinlichkeit an die Argininseitenkette an. Kommt ein weiteres Proton hinzu, so kann sich dieses entweder an das Indol des Tryptophans oder an den N-Terminus anlagern. Da sich die beiden positiven Ladungen allerdings elektrostatisch abstoßen, wird das zweite Proton wahrscheinlich den am weitesten von der Guanidin-Gruppe entfernt liegenden N-Terminus protonieren.

Wenn man das einfach- und das zweifachgeladene LWMR miteinander vorab vergleicht, so erwartet man beim Zweifachgeladenen aufgrund der kurzen Kettenlänge eine große Coulombabstoßung und eine starke Konformereneinschränkung. Da sich beides auf die Dissoziationsenergie auswirkt, sollte  $[M]^{2+}$  generell besser fragmentieren als  $[M]^+$ .

#### 4.3.1.1 Die Stoßfragmentierung des LWMR

Es wurde sowohl für das einfachgeladene LWMR ( $[M]^+$ ) als auch für das zweifachgeladene Molekül ( $[M]^{2+}$ ) das Fragmentierungsverhalten während der stoßinduzierten Anregung untersucht. Dazu wurde die jeweilige Muttermasse in der Paul-Falle isoliert und anschließend durch das Anlegen einer Spannungsamplitude an den Endkappen aufgeschüttelt, sodass die Ionen mit dem in der Falle befindlichen Helium hochenergetisch stoßen können. Durch das Schütteln der Ionen und den daraus resultierenden energetischen Stößen mit den Heliumatomen nehmen die Ionen nach und nach Energie bis zu einem Maximalwert, der mit der Schüttelamplitude korreliert, auf. Dabei kann die Dauer dieses Vorganges variiert und auf bis zu 40 ms ausgedehnt werden. Man kann also auch auf der Zeitskala der Moleküle von einem langsamen Vorgang sprechen.

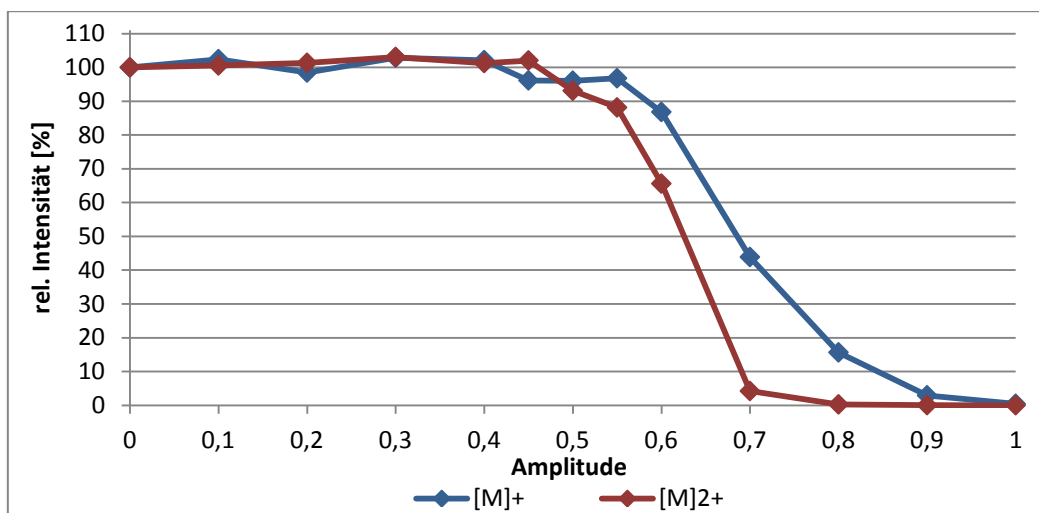


Abbildung 51: Stoßfragmentierung von LWMR. Zu sehen ist die prozentuale Abnahme von  $[M]^+$  und  $[M]^{2+}$  bei Variation der Schüttelamplitude.

In Abbildung 51 ist die prozentuale Veränderung der Mutterionen von  $LWMR^+$  und  $LWMR^{2+}$  für die Stoßfragmentierung dargestellt. Die relative Intensität der Mutterionen ist gegen die variierte Schüttelamplitude aufgetragen. Man kann annehmen, dass die kinetische und dann die interne Energie der Moleküle proportional zu dieser Amplitude ist. Bei Größerwerden der Amplitude wird also auch die interne Energie des Moleküls größer. Wie in Kapitel 2.1.2 erklärt, hängt die mittlere kinetische Energie eines beschleunigten Ions auch von seiner Ladung ab, sodass hier angenommen werden muss wenn das Ion eine zweite Ladung trägt, dass diese doppelt so groß wird als beim Einfachgeladenen. Dies wurde bei der oben dargestellten Abbildung noch nicht berücksichtigt. Wenn die Schüttelamplitude proportional zur internen Energie des Moleküls ist und diese beim Zweifachgeladenen doppelt so groß wird, so muss auch

die dargestellte Kurve des doppelt geladenen Moleküls um den Faktor 2 verschoben werden.

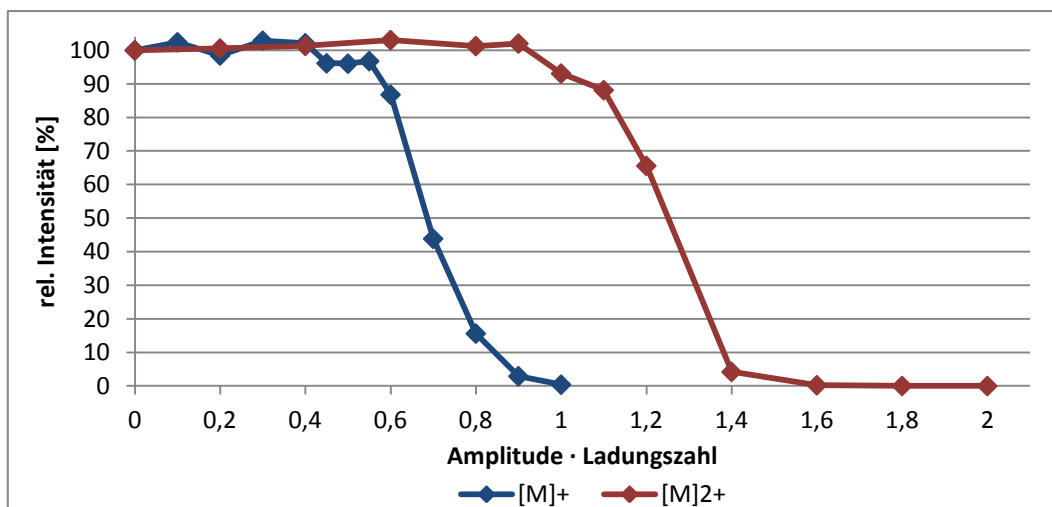


Abbildung 52: Angepasstes Diagramm für die prozentuale Abnahme der Muttermassen in Bezug auf die angelegte Schüttelamplitude, multipliziert mit der Ladungszahl z.

Wie man im so angepassten Diagramm (Abbildung 52) sehen kann, fängt  $[M]^{2+}$  bei höheren Amplituden an zu fragmentieren als  $[M]^+$ . Obwohl sowohl die Dissoziationsenergie als auch die Zustandsdichte des zweifachgeladenen Ions durch das Hinzukommen der zweiten Ladung vermutlich erniedrigt wurde, benötigt es erstaunlicherweise mehr Energie zum Fragmentieren. Dies verhält sich entgegen den Erwartungen. Ein Grund dafür kann im eingeschränkten Protonentransfer gefunden werden. Beim einfachgeladenen LWMR befindet sich das Proton an der Guanidin-Gruppe [92], sodass es auf Grund dessen hoher Gasphasenbasizität viel Energie erfordert, um dieses zum Wandern in die Peptidkette zu bringen. Bei hohen Energien und unterstützt von Selbstsolvatation könnte das Proton allerdings schon auf das *backbone* gelangen, sodass dann eine direkte Dissoziation eingeleitet werden kann. Alternativ kann auch eine neutrale Dissoziation ohne Beteiligung des Protons stattfinden. Bei  $[M]^{2+}$  könnte zwar statt dem ersten stark gebundenen Proton das zweite Proton, welches am N-Terminus liegt, wandern, da aufgrund der geringeren Gasphasenbasizität die energetische Stufe zum *backbone* nicht so groß ist. Jedoch ist nun die  $H^+$ -Wanderung aufgrund der Coulombabstoßung der Ladungen in diesem kurzen zweifachgeladenen Molekül stark eingeschränkt. Somit wird mehr Energie benötigt um ein Proton zu einer Wanderung an das *backbone* zu bewegen. Befindet sich somit kein Proton an einer Peptidbindung, muss mehr Energie zur Dissoziation dieser aufgewendet werden als bei einer protonierten Peptidbindung (vgl. Kapitel 2.5.2.1). Als Resultat fragmentiert  $[M]^{2+}$  bei höheren Energien als  $[M]^+$ .

In Abbildung 53 sind zwei Massenspektren, erzeugt mit der He-Stoßfragmentierung, zu sehen, welche jeweils auf  $[M]^+$  bzw.  $[M]^{2+}$  normiert wurden. Dabei wurde für  $[M]^+$  das Spektrum bei einer Schüttelamplitude von 0,7 und für  $[M]^{2+}$  das Spektrum bei einer Amplitude von 1,2 gewählt. Die Intensität des jeweiligen Mutterions liegt bei diesen Werten in der abfallenden Flanke des oben gezeigten Diagramms (Abbildung 52). Es ist somit gewährleistet, dass Fragmente und Muttermasse im Massenspektrum gut zu erkennen sind.

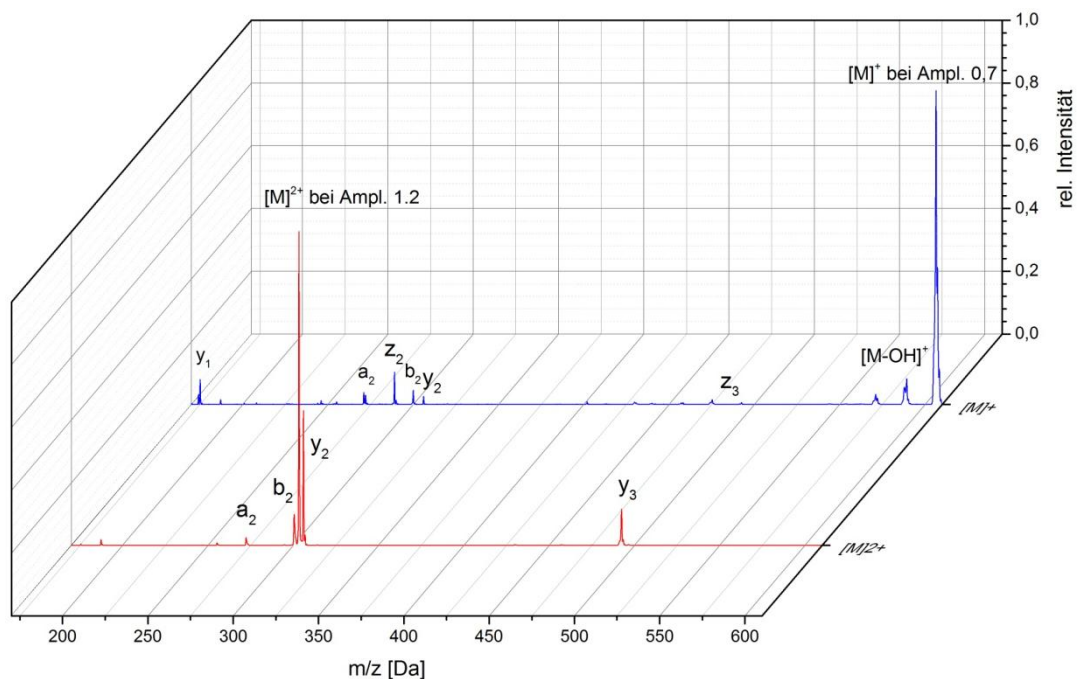


Abbildung 53: Massenspektrum von  $[M]^+$  bei einer Schüttelamplitude von 0,7 und  $[M]^{2+}$  bei einer Amplitude von 1,2. Beide Spektren wurden auf die Intensität der jeweiligen Muttermasse normiert.

Auf den ersten Blick findet man beim einfachgeladenen LWMR mehr Fragmente. Neben dem b- und dem y-Fragment gibt es auch a- und z-Fragmente, wobei hier  $z_2$  das intensivste Signal ist. Bei  $[M]^{2+}$ , dessen Masse-zu-Ladung-Verhältnis bei 303 m/z liegt, befindet sich das intensivste nun einfachgeladene Fragmentsignal direkt rechts neben der Muttermasse bei 306 m/z. Zudem liegt noch ein Signal bei 301 m/z vor. Diese beiden Signale können dem  $b_2$ - und dem  $y_2$ -Fragment zugeordnet werden. Ihr starkes Auftreten legt nahe, dass die Coulombabstoßungskraft im Molekül wegen seiner kurzen Aminosäurekette so groß ist, dass es zu einem bevorzugten Bindungsbruch in der Kettenmitte kommt. Das dritte Signal bei 492 m/z entspricht dem  $y_3$ -Fragment.



Diese stark unterschiedlichen Fragmentierungsmuster unterstützt die Vermutung, dass in beiden Fällen ein eingeschränkter Protonentransfer existiert. Das Proton kann wegen der eingeschränkten Beweglichkeit die Bindungsenergien der Hauptkette nicht erreichen und dort nicht herabsetzen.

#### 4.3.1.2 Die Laserfragmentierung des LWMR

Die photoinduzierte Anregung wurde mit Hilfe des ArF-Excimer-Lasers durchgeführt, der eine Wellenlänge von 193 nm besitzt (6,42 eV). Dabei wurden zum einen die Ionen angeregt, während sich Helium in der Paul-Falle befand, aber es fand auch eine Anregung ohne Helium in der Paul-Falle statt. Hauptziel dieses Experimentes war es, die Reaktionsgeschwindigkeit der einzelnen Fragmentierungskanäle zu analysieren.

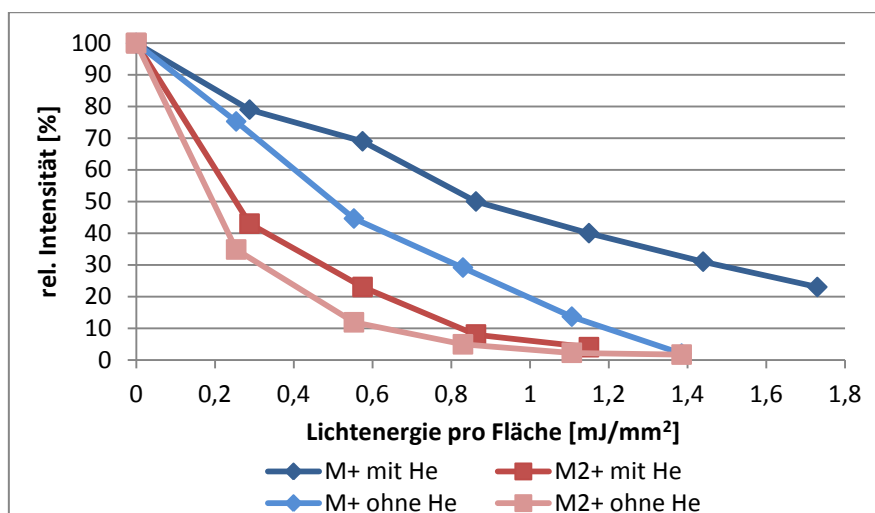


Abbildung 54: Prozentuale Abnahme von  $[M]^+$  und  $[M]^{2+}$  gegen die Lichtenergie/Fläche sowohl mit Helium in der Paul-Falle als auch ohne.

In Abbildung 54 ist die prozentuale Abnahme von  $[M]^+$  bzw.  $[M]^{2+}$  sowohl mit Helium in der Paul-Falle als auch ohne dargestellt. Im Vergleich zu der Stoßfragmentierung nimmt hier  $[M]^{2+}$  stärker ab als  $[M]^+$ . Da durch die verwendete Wellenlänge die Peptidbindungen nun direkt angesprochen und ihnen somit direkt Energie zugeführt werden kann, ist die Dissoziation nicht mehr ausschließlich von der Protonenwanderung abhängig. Hier greift offensichtlich die Theorie der Coulomb-reduzierten Dissoziationsenergie bzw. der Coulomb-reduzierten Zustandsdichte. Zudem kann man noch erkennen, dass das LWMR ohne Helium generell stärker fragmentiert als bei den Messungen mit Helium.

Vergleicht man die einzelnen Spektren miteinander, so findet man bei den Messungen ohne Helium mehr Fragmente als bei den Messungen mit Helium. Dies deutet auf langsame Zerfallsprozesse hin.

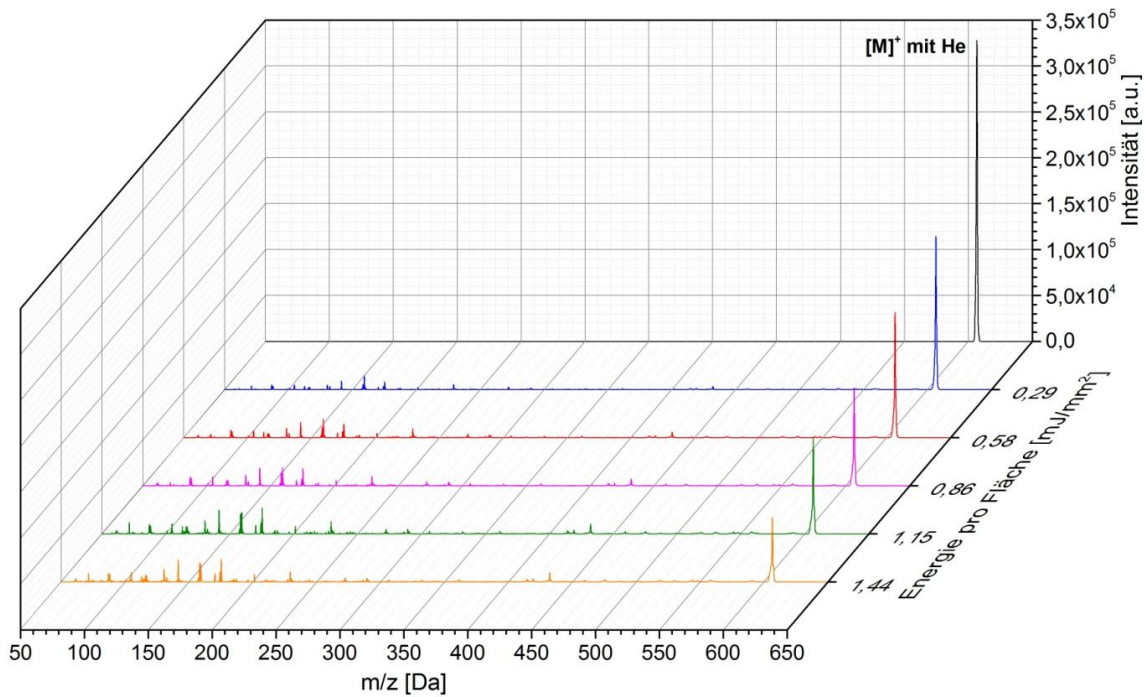


Abbildung 55: Laserfragmentierung vom einfachgeladenen LWMR mit Helium bei verschiedenen Energien.

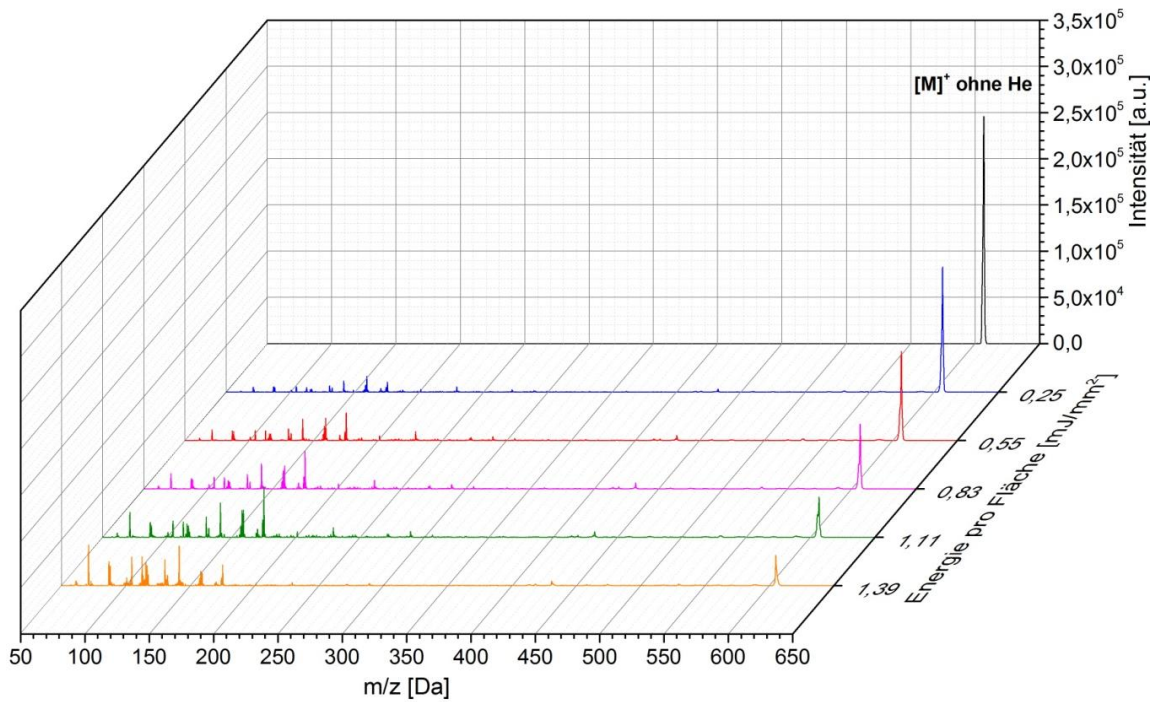


Abbildung 56: Laserfragmentierung vom einfachgeladenen LWMR ohne Helium bei verschiedenen Energien.

Der Unterschied in der Art und Intensität der Fragmente bei den Messungen mit und ohne Helium ist beim zweifachgeladenen LWMR nicht so groß, was vermutlich daran liegt, dass das Molekül schon bei der Anregung unter starker Spannung steht und die Stoßzeit mit Helium viel länger im Vergleich zur Dissoziationszeit ist, sodass der Kühleffekt mit Helium kaum eintreten kann. Dies kann man auch an dem  $y_3$ -Fragment bei 490 m/z erkennen, da sich dieses schon ohne Bestrahlung bildet.

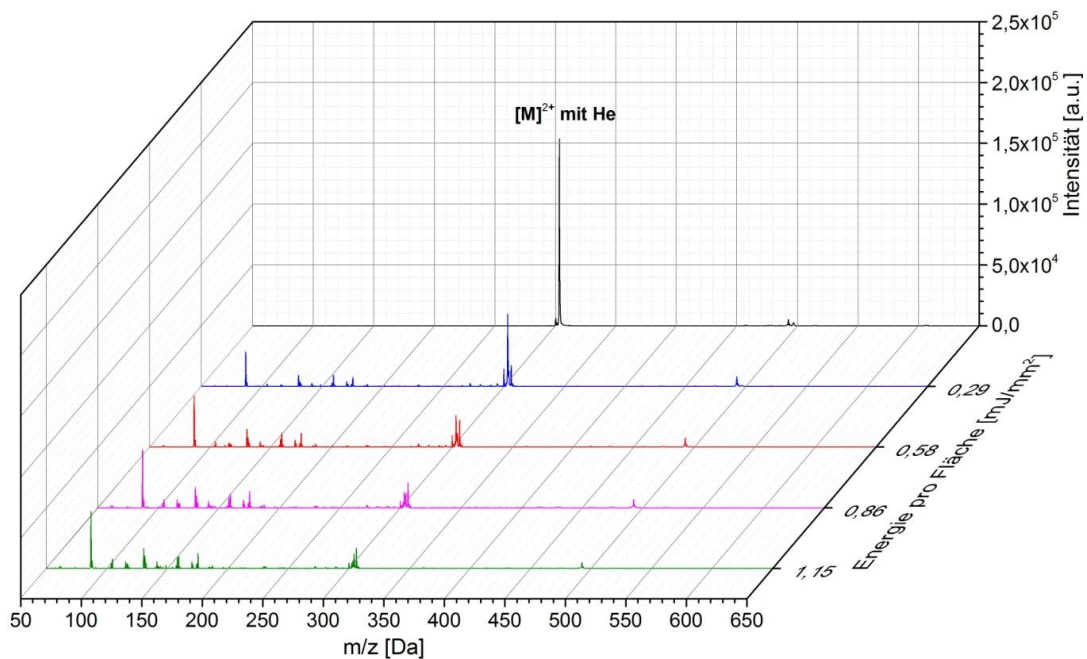


Abbildung 57: Laserfragmentierung von  $[LWMR]^{2+}$  mit Helium bei verschiedenen Energien.

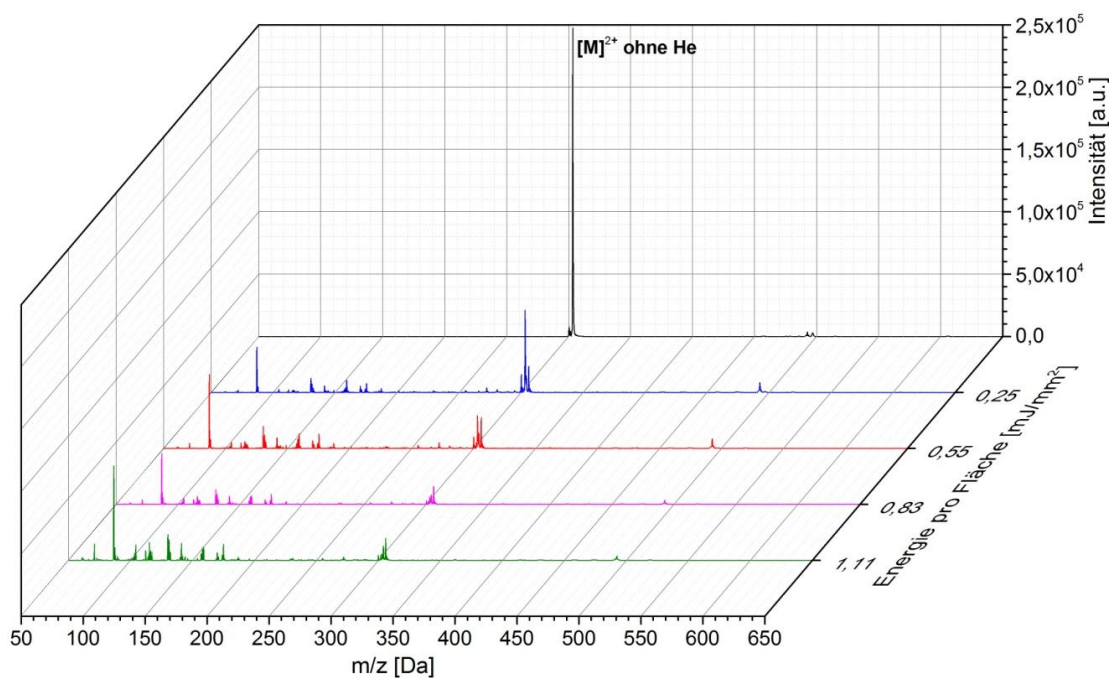


Abbildung 58: Laserfragmentierung von  $[LWMR]^{2+}$  ohne Helium bei verschiedenen Energien.

Die Fragmentanalyse zeigt, dass bei der Messung von  $[M]^+$  ohne Helium vermehrt kleinere Fragmente gebildet werden, was bedeutet, dass die Bildung von kleinen Fragmenten eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit besitzt. Allerdings darf man nicht vergessen, dass man mit jedem weiteren Laserschuss auch die Fragmente anregen kann, welche wiederum fragmentieren können. Diese fragmentieren dann ohne Helium stärker als mit Helium und sind deshalb im vergleichbaren Spektrum intensitätsschwächer. Durch die Verwendung von mehreren Laserschüssen können wir also künstlich eine Fragmentierung nach dem *ladder-swich*-Modell erreichen.

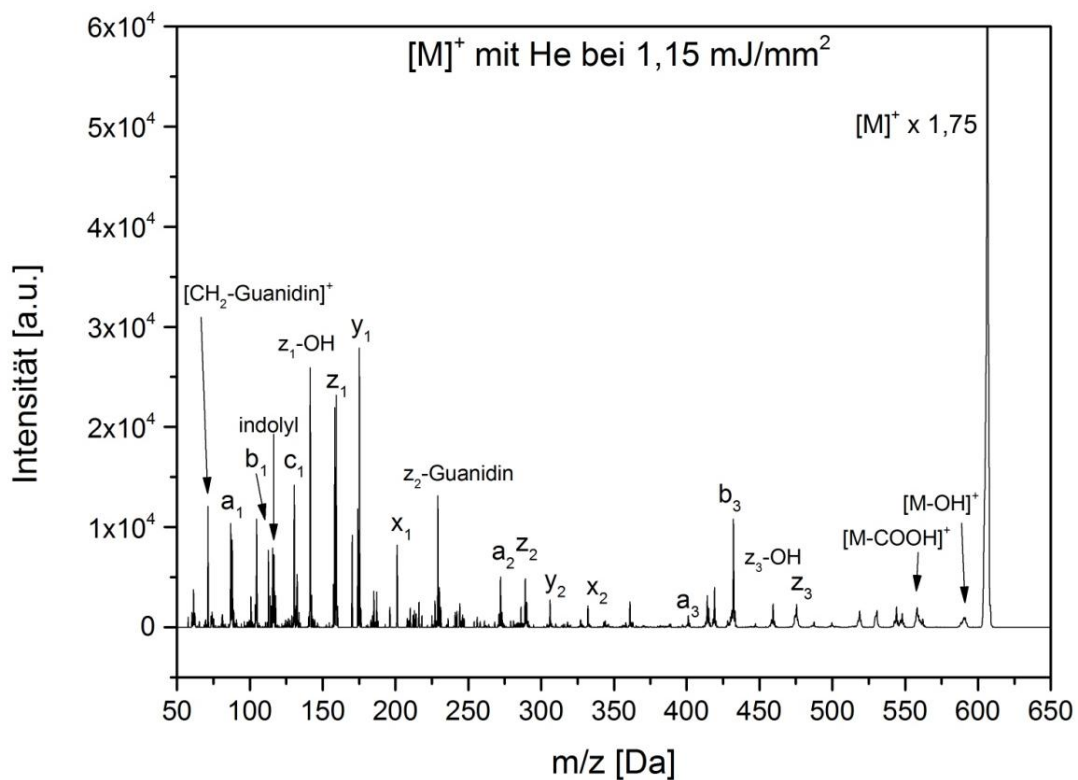


Abbildung 59: Fragmentspektrum von  $LWMR^+$  mit He bei  $1,15 \text{ mJ/mm}^2$ . Es handelt sich um das gleiche Spektrum wie in Abbildung 55, jedoch wurde die y-Achse gespreizt, um die Fragmente besser sehen zu können.

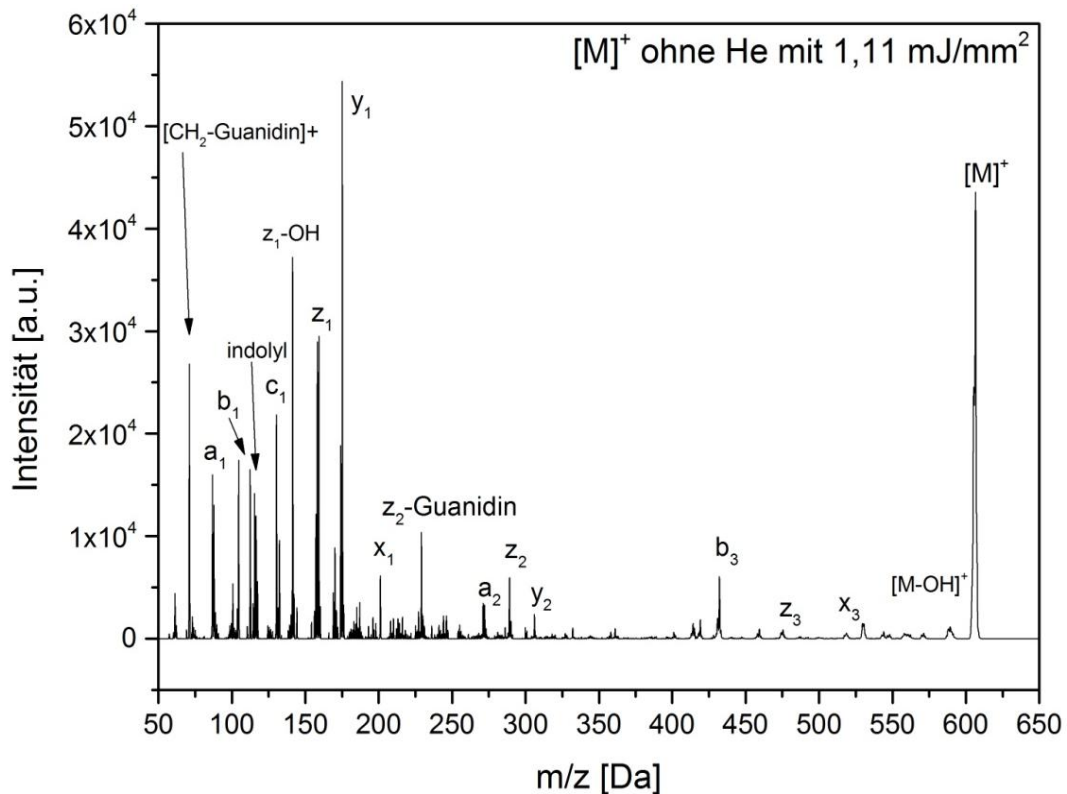


Abbildung 60: Fragmentspektrum von LWMR<sup>+</sup> ohne He bei 1,11 mJ/mm<sup>2</sup>. Es handelt sich um das gleiche Spektrum wie in Abbildung 56, jedoch wurde die y-Achse gespreizt, um die Fragmente besser sehen zu können.

Vergleicht man die Fragmentspektren des Einfachgeladenen mit und ohne Helium miteinander, so erkennt man eine Intensitätszunahme der kleineren Fragmente ( $y_1$ ,  $z_1$  etc.) im Spektrum ohne Helium. Die Intensitätsunterschiede sind bei den Fragmenten größerer Massen im Vergleich weniger stark ausgeprägt. Da der Unterschied der beiden Messungen nur in der längeren Reaktionszeit für die Messung ohne Helium liegt und die Tendenz zur Bildung kleinerer Massen für diese Messung größer ist, kann man sequenzielle Fragmentierungsprozesse nach der Laseranregung vermuten. Wir interpretieren das so, dass die Ionen in einem Laserschuss mehr als ein Photon absorbieren und dann nach der Laseranregung sequenziell in viele kleine Fragmente zerfallen. Dies ist ein klares Zeichen für die Existenz eines Mechanismus, der dem *ladder*-Modell [68] (siehe Kapitel 2.4) folgt.

Im Fall des zweifachgeladenen LWMR zeigt sich beim Vergleich der Fragmentspektren mit und ohne Helium (Abbildung 61 und Abbildung 62), dass die Intensitäten großer Fragmente fast identisch sind. In beiden Fällen zeigt das  $a_1$ -Fragment das intensivste Signal. Dies bestätigt die Vermutung, dass sich das zweite Proton am N-Terminus und nicht am Tryptophan befindet. Dabei wird es bei Bestrahlung ohne Helium stärker

gebildet als bei der Messung mit Helium, was wieder auf einen sequenziellen Zerfall schließen lässt. Alle anderen Fragmente sind bei der Messung ohne Helium nur etwas stärker ausgeprägt, sodass man sagen kann, dass die Zeitverkürzung durch die Heliumstöße, wie zuvor schon vermutet, beim zweifachgeladenen LWMR keinen nennenswerten Effekt zeigt. Es handelt sich hier also um schnelle Fragmentierungsprozesse.

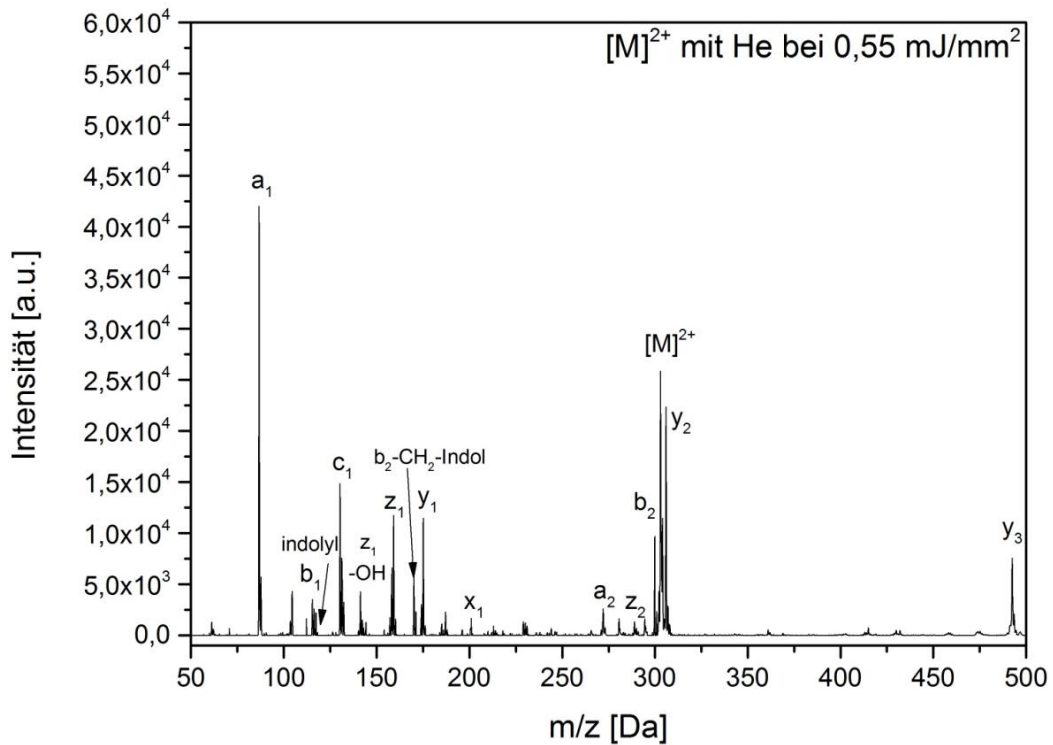


Abbildung 61: Fragmentspektrum von LWMR<sup>2+</sup> mit He bei einer Photonenenergie pro Fläche von 0,55 mJ/mm<sup>2</sup>. Es handelt sich um das gleiche Spektrum wie in Abbildung 57, jedoch wurde die y-Achse gespreizt, um die Fragmente besser sichtbar zu machen.

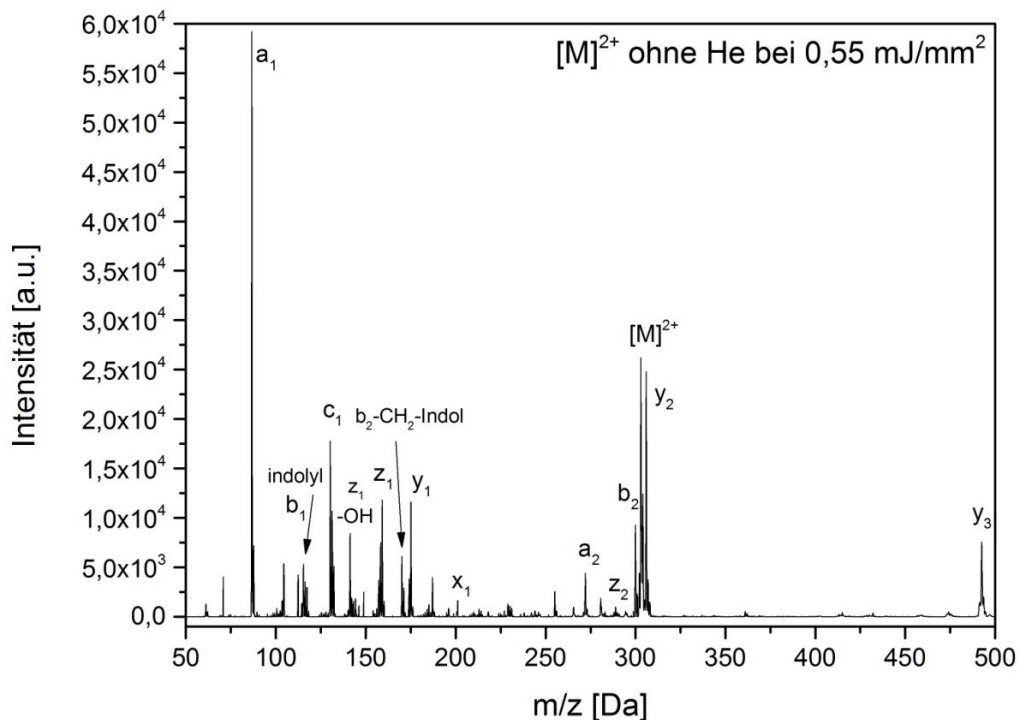


Abbildung 62: Fragmentspektrum von  $\text{LWMR}^{2+}$  ohne He bei einer Energie pro Fläche von  $0,55 \text{ mJ/mm}^2$ . Es handelt sich um das gleiche Spektrum wie in Abbildung 58, jedoch wurde die y-Achse gespreizt, um die Fragmente besser herauszuarbeiten.

Vergleicht man die Ergebnisse der Laserfragmentierung mit denen der Stoßfragmentierung, so kann man feststellen, dass sich bei der Laseranregung grundsätzlich mehr und vor allem kleinere Fragmente bilden als bei der Stoßfragmentierung. Dies liegt vermutlich an der hohen internen Energie bei Laseranregung und dem daraus folgendem *ladder*-Mechanismus mit verzögerter nachfolgender sequenzieller Dissoziation der Fragmente. Die Bildung kleiner Fragmente kann für eine Sequenzanalyse von Vorteil sein. Für den Vergleich zwischen dem einfachgeladenen und zweifachgeladenen LWMR zeigt sich ein anderes energetisches Verhalten bei der Stoß- bzw. Photofragmentierung. Braucht das  $[\text{M}]^{2+}$  bei der Stoßfragmentierung, wegen des eingeschränkten Protonentransfers, mehr Energie um eine Bindung zu brechen, so überwiegen bei der photoinduzierten Fragmentierung die Effekte der Coulomb-reduzierten Dissoziationsenergie und der Coulomb-reduzierten Zustandsdichte. Beim Vergleich der Fragmente kann man sowohl bei der Laserfragmentierung als auch bei der Stoßfragmentierung erkennen, dass beim Zweifachgeladenen weniger Fragmente gebildet werden, jedoch auch weniger Fragmenttypen auftreten. Für dieses kleine Molekül kann dies ein Hinweis auf den Effekt des *kinetic energy release* (siehe Kapitel 2.8) sein, der beim Mehrfachgeladenen stark ausgeprägt sein sollte. Was bedeutet, dass die beiden geladenen Fragmente im Falle einer Dissoziation durch die starke Coulombabstoßung im Ion kinetische Energie erhalten und aus der Falle hinausfliegen können bevor das Scannen beginnt.

### 4.3.2 Bradykinin

Bradykinin ist mit seinen zwei Argininen ein interessantes Molekül, da sich diese in der Aminosäuresequenz endständig befinden, einmal am N-Terminus und einmal am C-Terminus. Durch diese Argininseitenketten sind auch zwei gute Protonierungsstellen vorhanden, sodass sich das Molekül sowohl einfach- als auch zweifachgeladen darstellen lässt.

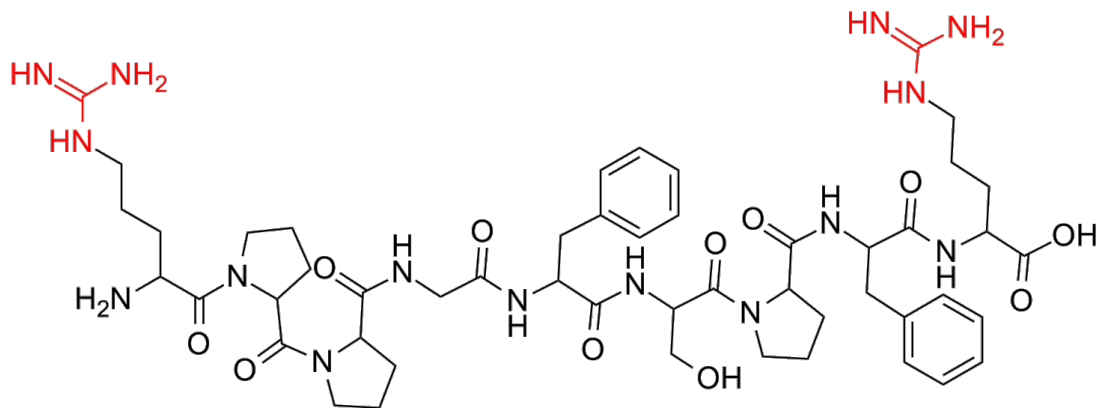


Abbildung 63: Struktur des Bradykinins, bestehend aus Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg.

Bei der Untersuchung von Bradykinin mittels BIRD fanden Williams et al. heraus, dass beim Einfachgeladenen die Arginine (also Guanidin- $H^+$  mit Guanidin) miteinander interagieren können und daraus ein schneller  $NH_3$ -Verlustkanal entsteht [95]. Allerdings kann im einfachgeladenen Molekül durch Selbstsolvatation eine Solvatation der Ladung mit anderen Gruppen desselben Moleküls erfolgen, sodass das Molekül im Vergleich zum nicht-solvatisierten Molekül energetisch abgesenkt wird. Bei diesen Untersuchungen [95] wurde auch gezeigt, dass beim Zweifachgeladenen wegen der Coulombabstoßung der dann geladenen Arginine der Fragmentierungskanal, der das Abspalten von  $NH_3$  verursacht, unmöglich ist. Zudem wird wegen der hohen Gasphasenbasizität von Arginin die Protonenwanderung am *backbone* reduziert, sodass bevorzugt neutrale Dissoziationswege erwartet werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit für eine Dissoziation im Ion sollte deshalb langsamer sein als beim Einfachgeladenen.



#### 4.3.2.1 Die Stoßfragmentierung des Bradykinins

Wie frühere Untersuchungen [95,152] zeigen, kann man mit der Stoßfragmentierung sowohl für das Einfachgeladene als auch für das Zweifachgeladene einen detaillierten Einblick in das Fragmentierungsverhalten bekommen.

Für  $[M]^+$  kann man aus den vorherigen Vermutungen erwarten, dass

- durch die Ladungssolvatation die Dissoziationsenergie erhöht wird.
- das Proton zunächst am Arginin bleibt, da es viel Energie benötigt um an das *backbone* übertragen zu werden.
- allerdings im einfachgeladenen Peptid der für dieses Molekül charakteristische schnelle  $NH_3$ -Verlustkanal existiert.

Für  $[M]^{2+}$  kann man prognostizieren, dass

- wegen der Coulombabstoßung der Ladungen eine Reduzierung sowohl der Dissoziationsenergie als auch der Zustandsdichte stattfindet und die Ladungen vom Molekül nicht mehr solvatisiert werden.
- das Zweifachgeladene keinen  $NH_3$ -Verlustkanal mehr besitzt, sodass sich die Dissoziation auf das *backbone* verlagert und komplexer und langsamer wird.

In Abbildung 64 ist die prozentuale Abnahme von  $[M]^+$  bzw.  $[M]^{2+}$  gegenüber der Schüttelamplitude multipliziert mit der Ladungszahl  $z$  aufgetragen.

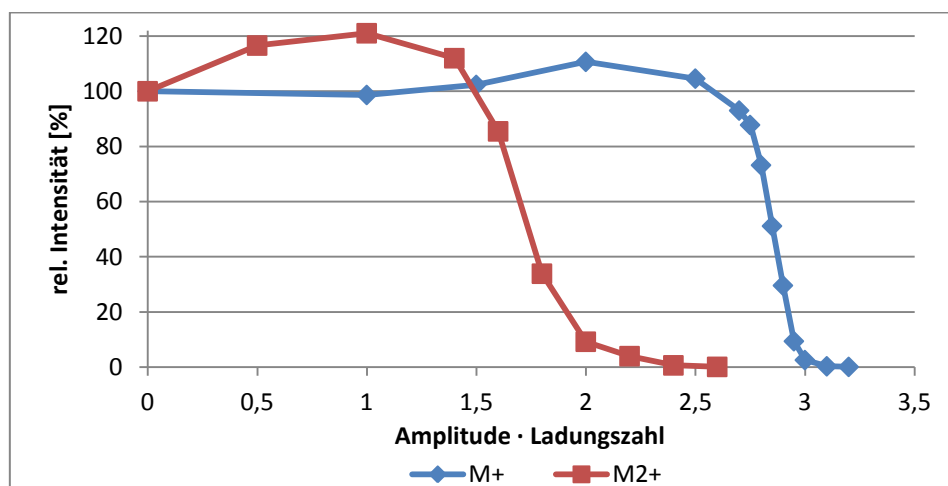


Abbildung 64: Angepasstes Diagramm für die Stoßfragmentierung von Bradykinin. Dargestellt ist die prozentuale Abnahme von  $[M]^+$  bzw.  $[M]^{2+}$  gegenüber der Schüttelamplitude, multipliziert mit der Ladungszahl.

Die Intensität des Zweifachgeladenen nimmt hier bei kleineren Schüttelspannungen ab als die des Einfachgeladenen. Im Vergleich zu LWMR ist dies überraschend, sodass hier nur vermutet werden kann. Dies als die reine Auswirkung für die Coulomb-reduzierte Dissoziationsenergie aber auch für die Coulomb-reduzierte Zustandsdichte, welche sich in der Geschwindigkeitskonstante äußert, zu deuten, wäre mit Betrachtung des Fragmentierungsverhaltens von LWMR nicht gerade plausibel. LWMR besitzt nur eine halb so lange Peptidkette, sodass die Auswirkungen der Coulombenergie dort deutlicher zu sehen wäre, was aber nicht zutrifft. Was man als Grund für die Dissoziation des  $[M]^{2+}$  bei niedrigeren Energien vermuten könnte, ist die vermutlich eingeschränkte Protonenwanderung bei  $[M]^+$ . Durch die besondere Konstellation der Arginin-Seitenketten an beiden Enden des Moleküls könnte das Proton von beiden Guanidin-Gruppen gebunden werden, sodass keine Rückfaltung zum *backbone* stattfindet. Durch die zusätzliche Bindung an die zweite Guanidin-Gruppe benötigt das Proton zudem vermutlich mehr Energie um zum *backbone* zu wandern als ein Proton, welches nur an einer Guanidin-Gruppe gebunden ist. Dadurch könnten dann vermutlich die Bindungsenergien der Peptidbindung nicht herabgesetzt werden und somit würde  $[M]^+$  mehr Energie für eine Dissoziation benötigen. Zu erwähnen ist noch der Anstieg der Kurven bevor die Ionen anfangen zu dissoziieren. Dies ist ein typisches Artefakt der ESI-Messungen, da alles immer auf die Messung bei Amplitude null bezogen wurde und es ab und zu vorkam, dass die Intensität während der Messung dann doch noch gestiegen ist.

Betrachtet man die Fragmentspektren von  $[M]^+$  und  $[M]^{2+}$ , so fällt einem die sehr geringe Intensität der wenigen vorhandenen Fragmente von  $[M]^+$  im Vergleich zu  $[M]^{2+}$  auf. Trotz der starken Abnahme der Muttermasse um 50% finden wir im zugänglichen Massenspektrum kaum Fragmente. Da jedoch auch das Fragment  $[M-NH_3]^+$  nur eine sehr geringe Intensität aufweist, bedeutet dies offensichtlich, dass nicht nur neutrales  $NH_3$  abgespalten wird sondern auch  $NH_4^+$ . Dieses Fragment liegt jedoch unterhalb der Massennachweisgrenze der Paul-Falle und wird in unserem ESI-MS nicht detektiert. Das größere Gegenstück ist neutral, sodass beide Fragmente für den Experimentator unsichtbar bleiben. Dadurch reduziert sich die Intensität der Muttermasse ohne dass ein Fragment auftritt. Zusätzlich zu dieser Massengrenze wird noch, je nach Masse des Mutterions, ein sogenannter *CutOff* generiert, der im Falle des Bradykinin<sup>+</sup> bei 294 m/z und bei Bradykinin<sup>2+</sup> bei 148 m/z liegt. Dies ist eine vom Gerät generierte untere Massengrenze, die für die Stoßfragmentierung essenziell ist und kann auch nicht zu kleineren Massen hin verändert werden, da ansonsten die Muttermasse nicht mehr richtig isoliert werden kann und somit ein dramatischer Signaleinbruch stattfindet.

Deshalb können auch leider die Fragmente, die unterhalb dieser Grenze liegen und eventuell entstehen, nicht gesehen werden.

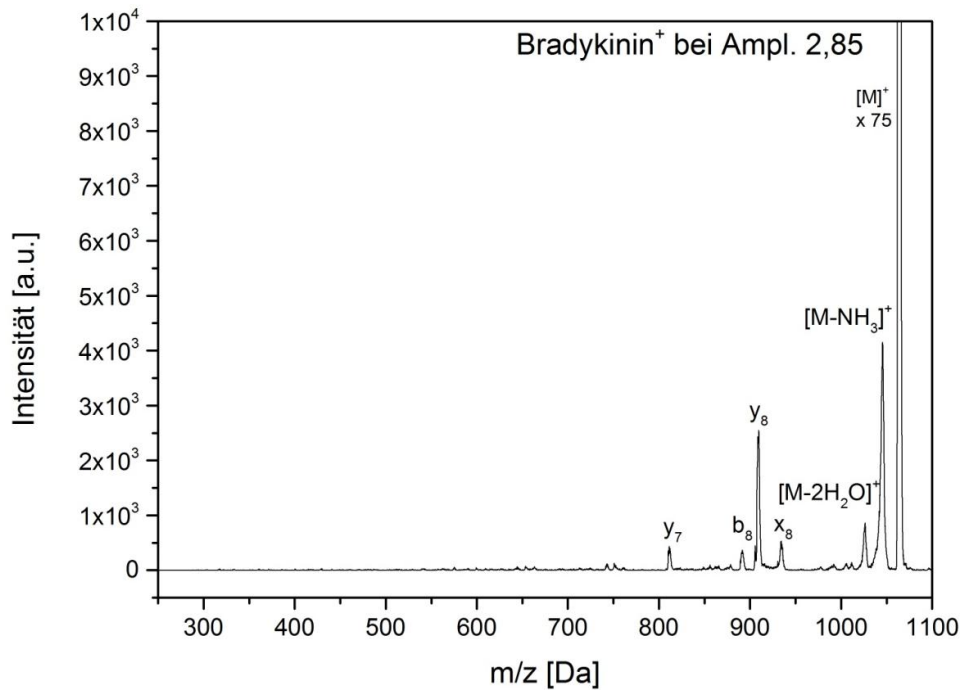


Abbildung 65: Fragmentspektrum der Stoßfragmentierung vom einfachgeladenen Bradykinin bei einer Schüttelamplitude von 2,85. Beim Spektrum wurde die y-Achse stark aufgespreizt, um die Fragmente deutlicher hervorzuheben.

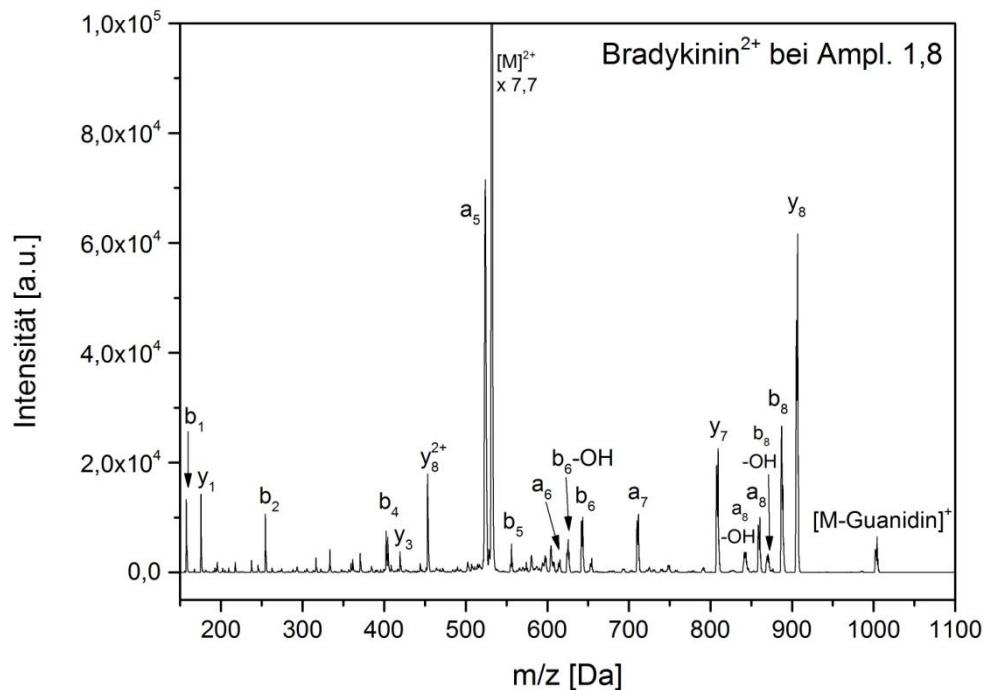


Abbildung 66: Fragmentspektrum der Stoßfragmentierung vom zweifachgeladenen Bradykinin bei einer Amplitude von 1,8. Beim Spektrum wurde die y-Achse stark aufgespreizt, um die Fragmente deutlicher hervorzuheben.

Im Fragmentspektrum von  $[M]^{2+}$  erkennt man im Gegensatz zu Abbildung 65 fast alle a-, b- und y-Fragmente, was für eine, wenn auch energetisch ungünstige, Protonenwanderung am *backbone* spricht. Dabei werden bevorzugt das  $a_5$ - und das  $y_8$ -Fragment gebildet. Aufgrund der fehlenden Flexibilität, verursacht durch die Ladungsabstoßung, die durch die zwei benachbarten Proline in der Nähe des N-Terminus zusätzlich verstärkt wird, entstehen vermehrt langkettige Fragmente wie die intensiven  $y_8$ - ,  $b_8$ - und  $y_7$ - Fragmente. Das  $a_5$ -Fragment ist dabei eine Ausnahme. Es kann durch den Angriff sowohl vom N- als auch vom C-ständigen Arginin auf das *backbone* gebildet werden und besitzt somit im Spektrum die höchste Intensität der Fragmente.

#### 4.3.2.2 Die Laserfragmentierung des Bradykinins

Aus den aufgestellten Vermutungen für das Verhalten von  $[M]^+$  und  $[M]^{2+}$  bei der Stoßfragmentierung kann man für die Laserfragmentierung nun ein ähnliches Verhalten erwarten, da die Effekte durch das Hinzukommen der zweiten positiven Ladung methodenunabhängig sind. So kann  $[M]^+$  durch Selbstsolvatation seine Dissoziationsenergie erhöhen und durch die Ladung am Arginin mehr Energie für die Protonenwanderung zum *backbone* benötigen. Allerdings besitzt es den schnellen  $NH_3$ -Verlustkanal. Bei  $[M]^{2+}$  wird durch die Coulombabstoßung der Ladungen die Dissoziationsenergie und auch die Zustandsdichte reduziert. Jedoch gibt es hier keinen schnellen  $NH_3$ -Verlustkanal und auch die Protonenwanderung zum *backbone* wird komplizierter und eingeschränkter. Allerdings können bei der Laseranregung nun hohe Energien zugeführt werden, sodass bei dieser Methode wahrscheinlich die Geschwindigkeitskonstante  $k_{Diss.}$  der bestimmende Schritt für eine Dissoziation sein wird.

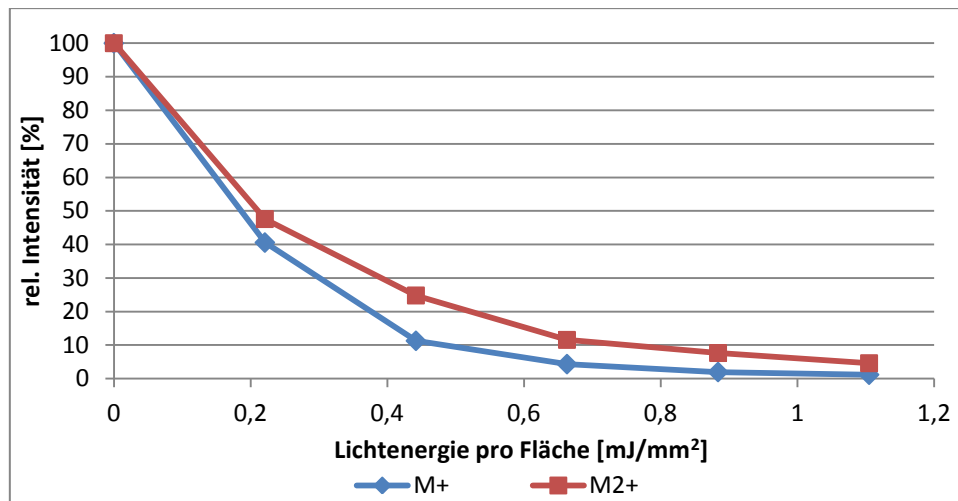


Abbildung 67: Laserfragmentierung von Bradykinin ohne Helium. Dargestellt ist die prozentuale Abnahme von  $[M]^+$  sowie  $[M]^{2+}$  gegen die Lichtenergie pro Fläche.

Trägt man nun die prozentuale Abnahme von  $[M]^+$  bzw.  $[M]^{2+}$  sowohl für die Messungen ohne Helium (Abbildung 67) als auch für die Messungen mit Helium (Abbildung 68) gegen die Lichtenergie pro Fläche auf, so erkennt man in beiden Fällen eine stärkere Abnahme pro Laserschuss für das Einfachgeladene. Dies ist überraschend, da die Stoßfragmentierung von Bradykinin gezeigt hat, dass  $[M]^{2+}$  bei niedrigeren Energien fragmentiert wurde als  $[M]^+$ . Zudem hat man bei der Laserfragmentierung von LWMR ebenfalls eine stärkere Abnahme von  $[M]^{2+}$  gefunden. Dass hier das Einfachgeladene stärker fragmentiert, liegt vermutlich daran, dass durch die Laserfragmentierung nun eine schnelle Fragmentierungsmethode bevorzugt wird. Die Protonen können wegen der Gasphasenbasizität des Arginins schlechter zum *backbone* wandern um dort eine Dissoziation hervorzurufen. Die Bindungsenergie der Peptidbindung ist deshalb nicht durch das  $H^+$  herabgesetzt, weshalb möglicherweise nur eine neutrale Dissoziation stattfindet. Der  $NH_3$ -Verlustkanal beim  $[M]^+$  ist hingegen ein schneller Fragmentierungskanal, sodass dieser zur Dissoziation führt.

Kommt während der Bestrahlung der Kühleffekt des Heliums hinzu, so ist der Effekt noch deutlicher.

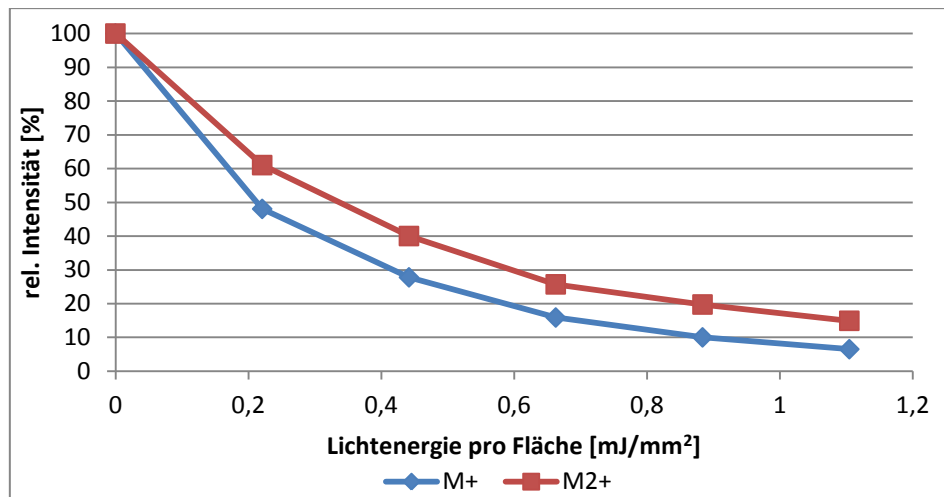


Abbildung 68: Laserfragmentierung von Bradykinin mit Helium: Dargestellt ist die prozentuale Abnahme von  $[M]^+$  sowie  $[M]^{2+}$  gegen die Lichtenergie pro Fläche.

Auch bei der Laserfragmentierung ohne Helium ist der Unterschied in den Fragmentenspektren von  $[M]^+$  und  $[M]^{2+}$  deutlich. Die Intensität der Fragmente ist beim  $[M]^{2+}$  viel größer als beim  $[M]^+$ , was wieder auf den nicht detektierbaren  $NH_4^+$ -Verlust zurückzuführen ist. Allerdings entstehen beim Einfachgeladenen bei der Photoanregung mehr Fragmente als bei seiner Stoßfragmentierung, was vermutlich an der hohen zugeführten Energie liegt. Was bei beiden Spektren gut zu erkennen ist, ist die vollständige a-Fragmentreihe sowohl bei  $[M]^+$  als auch bei  $[M]^{2+}$ . Dies zeigt, dass ein Fragmentierungsmechanismus unter *high-energy* Bedingungen gute Sequenzanalysen liefern kann.

Damit das Fragmentspektrum des  $[M]^{2+}$  nicht zu unübersichtlich ist, wurden die vielen innerkettigen Fragmente, die sich zwischen 150 m/z und 300 m/z gebildet haben, nicht benannt. Es handelt sich dabei um Fragmente, die meist durch Bindungsbrüche zwischen den ersten oder den letzten zwei bis drei Aminosäuren entstanden sind. Dass sie entstehen, ist ein Zeichen für die hohe zugeführte Energie. Da die zugeführte Energie aber bei  $[M]^+$  und  $[M]^{2+}$  gleich war, sich die innerkettigen Fragmente aber nur beim Zweifachgeladenen zeigen, bedeutet es, dass die Dissoziationsenergie beim Zweifachgeladenen schon geringer war als beim Einfachgeladenen. Somit können beim Zweifachgeladenen durch die zugeführte Energie höher liegende Fragmentierungskanäle angesprochen werden.

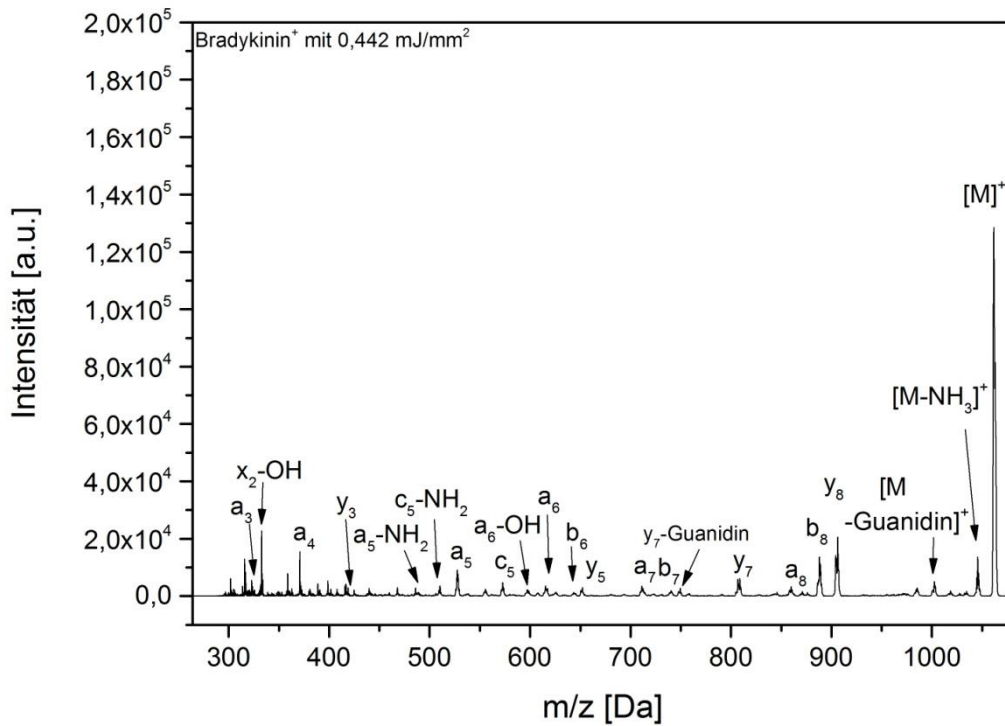


Abbildung 69: Fragmentspektrum vom einfachgeladenen Bradykinin ohne Helium bei einer Energie pro Fläche von  $0,442 \text{ mJ/mm}^2$ . Beim Spektrum wurde die y-Achse stark aufgespreizt, um die Fragmente deutlicher hervorzuheben.

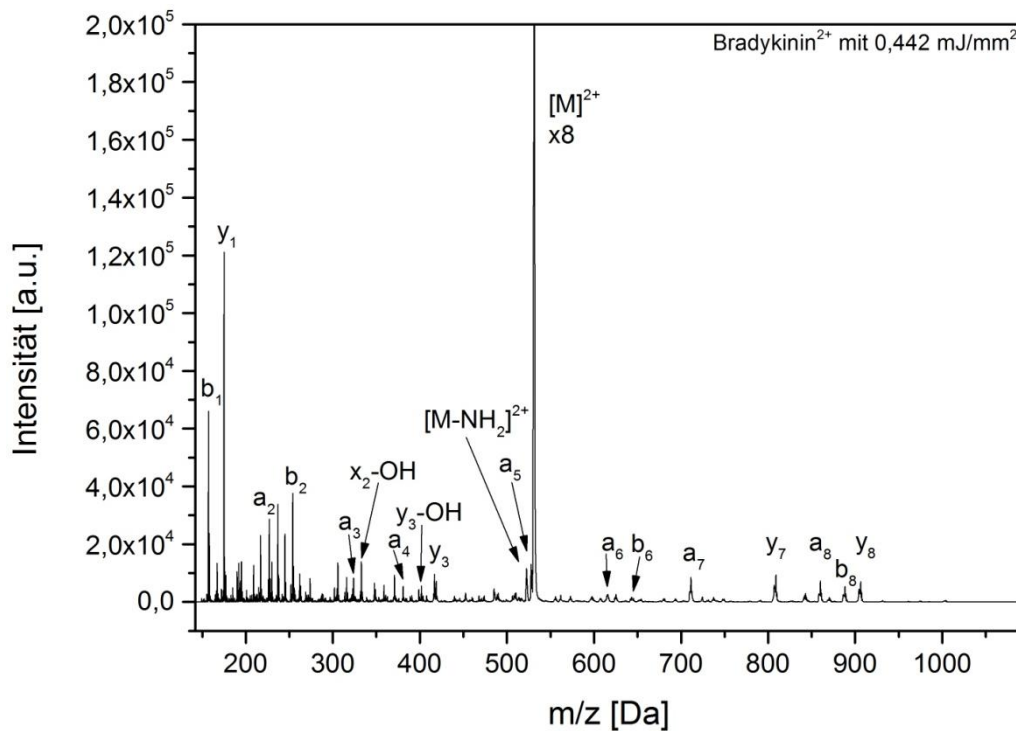


Abbildung 70: Fragmentspektrum vom zweifachgeladenen Bradykinin ohne Helium bei einer Energie pro Fläche von  $0,442 \text{ mJ/mm}^2$ . Beim Spektrum wurde die y-Achse stark aufgespreizt, um die Fragmente deutlicher hervorzuheben.

Beim Fragmentspektrum vom  $[M]^+$  mit Helium ist das dominanteste Signal das  $y_8$ -Fragment. Das ist ungewöhnlich, da bei der Stoßfragmentierung als auch bei der Laserfragmentierung ohne Helium das  $y_8$ -Fragment zwar etwas intensiver als die anderen Signale war, jedoch nicht so dominant. Die Bildung dieses Fragments ist scheinbar neben dem  $NH_3$ -Verlustkanal der bevorzugte Fragmentierungskanal. Dieser wird deutlicher, wenn der Kühleffekt vom Helium eintritt und dem Molekül weniger Zeit für eine Dissoziation zur Verfügung steht. Erhält das Molekül wie bei der Messung ohne Helium mehr Zeit für eine Dissoziation, so scheinen Folgereaktionen nach dem *ladder*-Modell stattzufinden (siehe Kapitel 4.3.1.2). Das  $y_8$ -Fragment kann dabei in kleinere Fragmente zerfallen, weshalb dieses zum einen dann schwächer im Spektrum erscheint und zum anderen die kleinen Fragmente dadurch dominanter werden.

Auch hier findet man in beiden Spektren die komplette a-Fragmentreihe, was wie bei der Fragmentierung ohne Helium für den *high-energy* Mechanismus spricht und für eine Sequenzanalyse genutzt werden kann.

Beim Zweifachgeladenen sieht man im Vergleich zum Fragmentspektrum ohne Helium eine andere Signalverteilung. Während bei der Laserbestrahlung ohne Helium die kleineren Fragmente bevorzugt gebildet werden, so verteilt sich die Intensität hier auf alle Fragmente relativ gleich. Durch das Helium wird die zugeführte Energie also soweit wieder abgeführt, dass das Proton wandern kann und die Energie noch für die Dissoziation reicht. Ohne Helium ist die interne Energie offenbar so hoch, dass das Proton, sobald es sich am *backbone* befindet, die direkte schnelle Dissoziation einleitet. Auch die Folgereaktionen werden durch die Anwesenheit des Heliums gedämpft, weshalb auch die Möglichkeit größere Fragmente zu erhalten bei den Messungen mit Helium größer ist.

Für eine vollständige Sequenzanalyse sind sowohl die großen als auch die kleinen Fragmente nützlich, sodass man in der Vergangenheit Versuche unternommen hat, durch die Verwendung und Ergänzung von zwei verschiedenen Fragmentierungsmethoden Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz zu erhalten [153,154]. Wir kombinieren hier die Laserfragmentierung und die Stoßfragmentierung, um direkt experimentell ein vollständiges Fragmentspektrum zu erhalten.



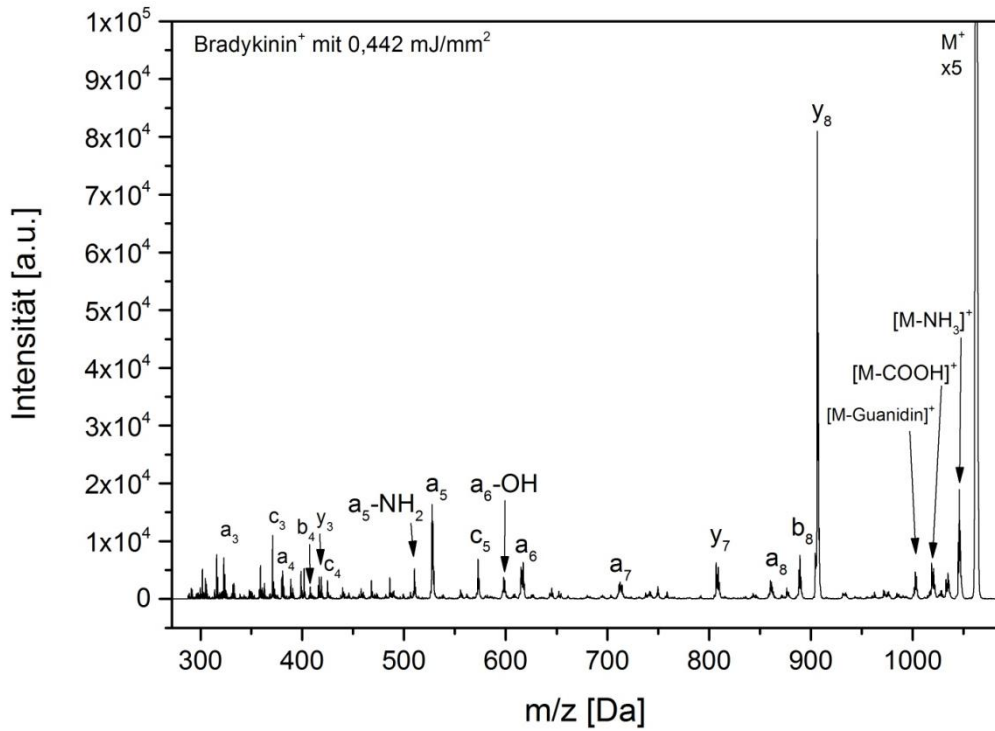


Abbildung 71: Fragmentspektrum vom einfachgeladenen Bradykinin mit Helium bei einer Energie pro Fläche von 0,442 mJ/mm<sup>2</sup>. Beim Spektrum wurde die y-Achse stark aufgespreizt, um die Fragmente deutlicher hervorzuheben.

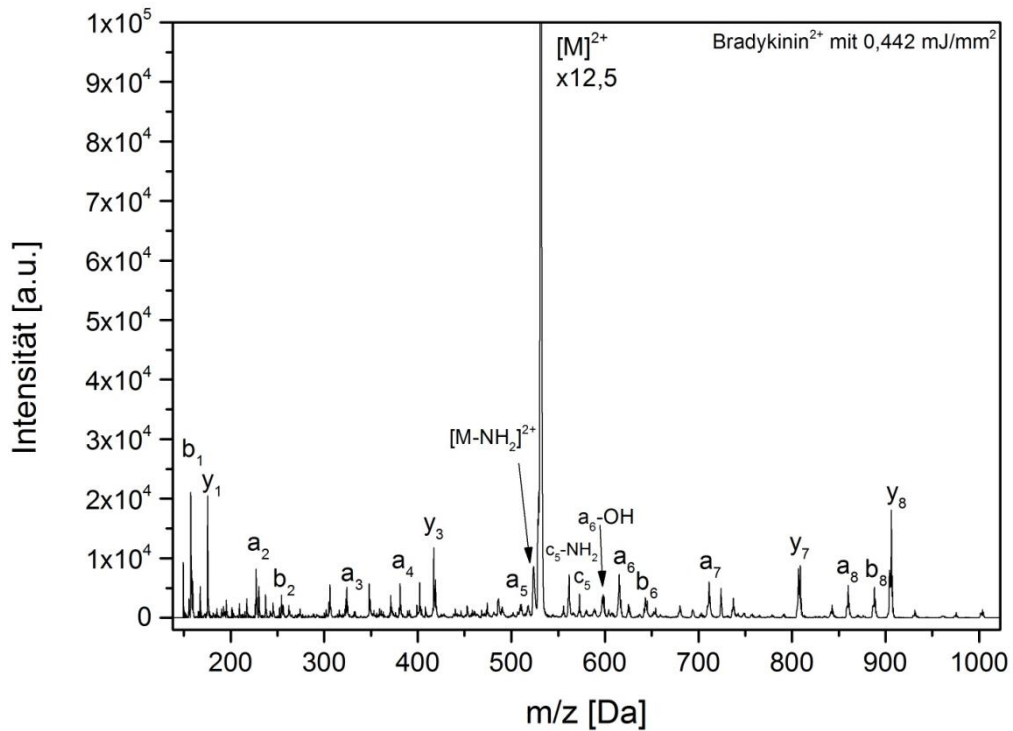


Abbildung 72: Fragmentspektrum vom zweifachgeladenen Bradykinin mit Helium bei einer Energie pro Fläche von 0,442 mJ/mm<sup>2</sup>. Beim Spektrum wurde die y-Achse stark aufgespreizt, um die Fragmente deutlicher hervorzuheben.

Für eine vollständige Sequenzanalyse sind sowohl die großen als auch die kleinen Fragmente nützlich, sodass man in der Vergangenheit Versuche unternommen hat, durch die Verwendung und Ergänzung von zwei verschiedenen Fragmentierungsmethoden Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz zu erhalten [153,154]. Wir kombinieren hier die Laserfragmentierung und die Stoßfragmentierung, um direkt experimentell ein vollständiges Fragmentspektrum zu erhalten.

#### 4.3.2.3 Die kombinierte Laser- und Stoßfragmentierung des Bradykinins

Die Kombination aus Stoß- und Laserfragmentierung diente dem Zweck, die Sekundär- und Tertiärstruktur eines länger-kettigen Moleküls zunächst durch Stöße aufzubrechen um dann durch Laseranregung eine Fragmentierung zu erzeugen. Dadurch hat man sich erhofft, die entstehenden Fragmente auch aus den nicht-kovalenten Bindungssituationen herauszuholen und auch sichtbar zu machen. Denn wenn bei sehr großen Peptiden oder Proteinen eine Tertiärstruktur beispielsweise in Form eines Knäuels vorliegt, könnten die sich bildenden Fragmente von diesem in der Struktur gefangen werden, sodass sie nicht detektiert werden können. Da man durch die Stoßfragmentierung eher die großen Fragmente und bei der Laserfragmentierung eher die kleinen Fragmente erhält, hat man sich durch die Kombination beider Methoden außerdem erhofft, dass man alle Standardfragmente eines Peptids erhält, was eine Sequenzanalyse erheblich vereinfachen würde.

Zusammengefasst ergeben sich für die Kombination beider Methoden also folgende Motivationen:

- I. Man kann beide Fragmenttypen der verschiedenen Methoden erhalten.
- II. Man benötigt nicht so viele Photonen zum Fragmentieren, was im Endeffekt mehr Fragmente bedeutet.
- III. Das Peptid wird vor der Fragmentierung aufgefalted, was einen besseren Zugang zu den verschiedenen Fragmenten bietet.

Zu diesem Zweck wurde das Ion zunächst durch eine angelegte Amplitude aufgeschüttelt, sodass sich die Energie des Ions schon in der Nähe der Dissoziationsgrenze befand. Anschließend wurde während des Schüttelns mit dem Laser zugegriffen, um die Dissoziation zu induzieren.

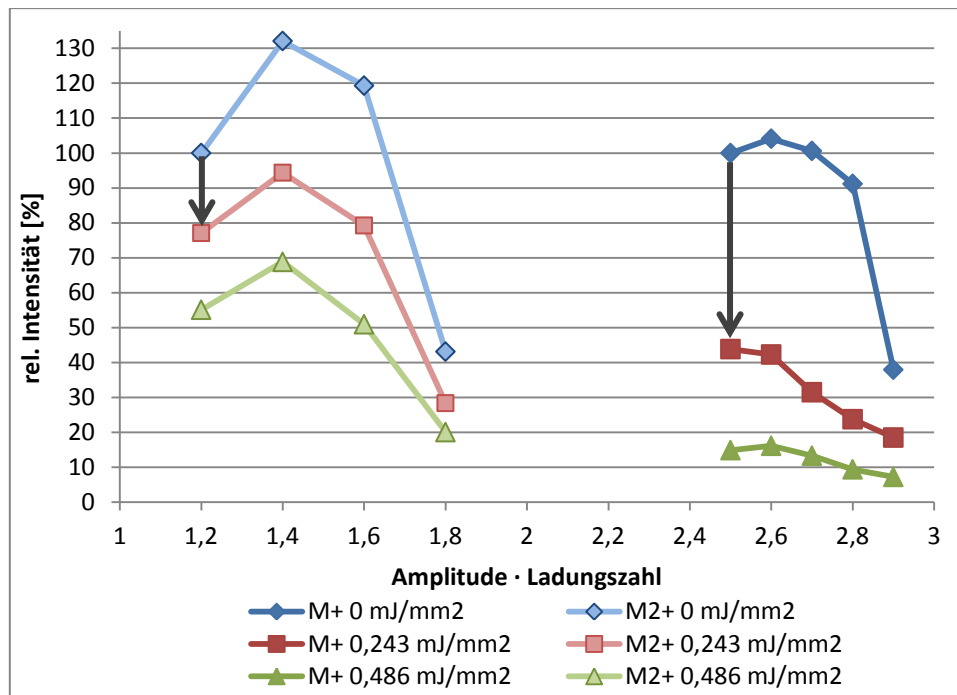


Abbildung 73: Kombinierte Laser- und Stoßfragmentierung von Bradykinin<sup>+</sup> und Bradykinin<sup>2+</sup>. Zu jeder Amplitude wurde mit einem und auch mit zwei Laserschüssen angeregt, sodass hier die prozentualen Abnahmen der jeweiligen Muttermasse gegen die Amplitude multipliziert mit der Ladungszahl für jeden Schritt zu sehen ist.

In Abbildung 73 ist die prozentuale Abnahme von  $[M]^+$  und  $[M]^{2+}$  bei der jeweiligen Amplitude multipliziert mit der Ladungszahl und ohne Laseranregung bzw. mit einem oder mit zwei Laserschüssen zu sehen. Vergleicht man die Wirkung der Laseranregung mit der reinen Laserfragmentierung mit Helium (Abbildung 68), so erkennt man hier für  $[M]^{2+}$  eine weniger starke Abnahme des Mutterions als bei der reinen Laserfragmentierung.  $[M]^+$  verhält sich bei einer Amplitude von 2,5 nach Laseranregung ähnlich wie bei der reinen Laserfragmentierung. Auch hier fragmentiert die Muttermasse um knapp 60%. Dies stimmt mit den bisherigen Überlegungen zum schnellen  $NH_3$ -Verlustkanal überein. Kommt eine weitere Stoßanregung hinzu, so fällt die Intensität des Mutterions auf sogar nur 15% des Anfangswertes ab. Dies zeigt, dass sich durch das Aufschütteln tatsächlich mehr Ionen kurz vor der Dissoziationsgrenze befinden, sodass durch die zweite Laseranregung mehr Ionen fragmentieren können. Im Vergleich dazu betrug die Abnahme von  $[M]^{2+}$  bei der Laserfragmentierung mit Helium beim zweiten Schuss nur 28%.

Die Intensität von  $[M]^{2+}$  nimmt bei einer Amplitude von 1,2 nach einem Laserschuss von 100% auf nur 80% ab, was einer Abnahme von 20% entspricht. Bei der reinen Laserfragmentierung mit Helium war es eine Abnahme von 40%. Obwohl man also mit der Amplitude kurz vor der Dissoziationsgrenze liegt, kommt es nach der Laser-

anregung zu einer schlechteren Fragmentation. Dies kann zum einen auf eine stärkere Energieabführung durch die Heliumstöße hinweisen, da sich durch das Anlegen der Schüttelamplitude die Stoßzahl erhöht, wobei sich dann ein Gleichgewicht zwischen den energiezuführenden und energieabführenden Stößen einstellt. Wird dem Ion nun durch den Laser mehr Energie zugeführt, wirken die He-Stöße energieabführend. Erst bei der Amplitude von 1,4 besitzt das Ion durch das Aufschütteln so viel Energie, dass der Kühleffekt kleiner wird und es durch die Anregung von 193 nm zu einer Abnahme von ca. 40% kommt. Bei einer Amplitude von 1,6 beginnt das Ion allein durch die Heliumstöße zu fragmentieren, sodass sich nun eine große Population der Ionen an der Dissoziationsgrenze befindet und durch den Zusatz von der Laseranregung eine Abnahme von 60% entsteht. Durch einen weiteren Laserschuss wird die Fragmentierungsrate natürlich zusätzlich erhöht. Eine weitere mögliche Erklärung für die geringe Intensitätsabnahme nach einem Laserschuss kann in dem Schüttelprozess gefunden werden. Während  $[M]^+$  trotz Schüttelns im Fokus des Lasers liegt, erfährt  $[M]^{2+}$  allein durch die zusätzliche Ladung eine stärkere Auslenkung. Wenn die Ionen nun zusätzlich noch aufgeschaukelt werden, kommt es möglicherweise zu einer so großen Auslenkung, dass sich die Ionen nicht mehr im Fokus des Lasers befinden und deshalb nicht angeregt werden können.

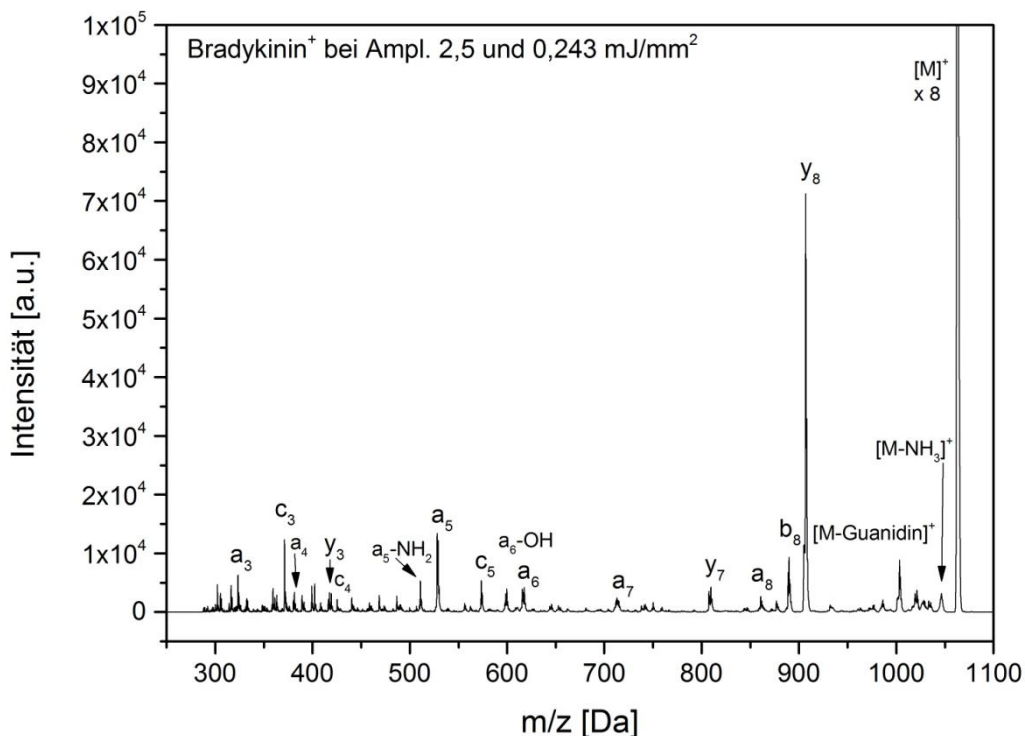


Abbildung 74: Fragmentspektrum vom einfachgeladenen Bradykinin bei einer Amplitude von 2,5 und einer Laserenergie pro Fläche von 0,243 mJ/mm<sup>2</sup>. Beim Spektrum wurde die y-Achse stark aufgespreizt, um die Fragmente deutlicher hervorzuheben.

Betrachtet man die Bildung der Fragmente, so kann man keinen großen Unterschied im Vergleich zu den Fragmentspektren der Laserfragmentierung mit Helium erkennen. Es werden vorzugsweise die gleichen Fragmente gebildet. Das erhoffte gleichzeitige Auftreten der typischen Fragmente beider Methoden ist hier leider nicht vorhanden.

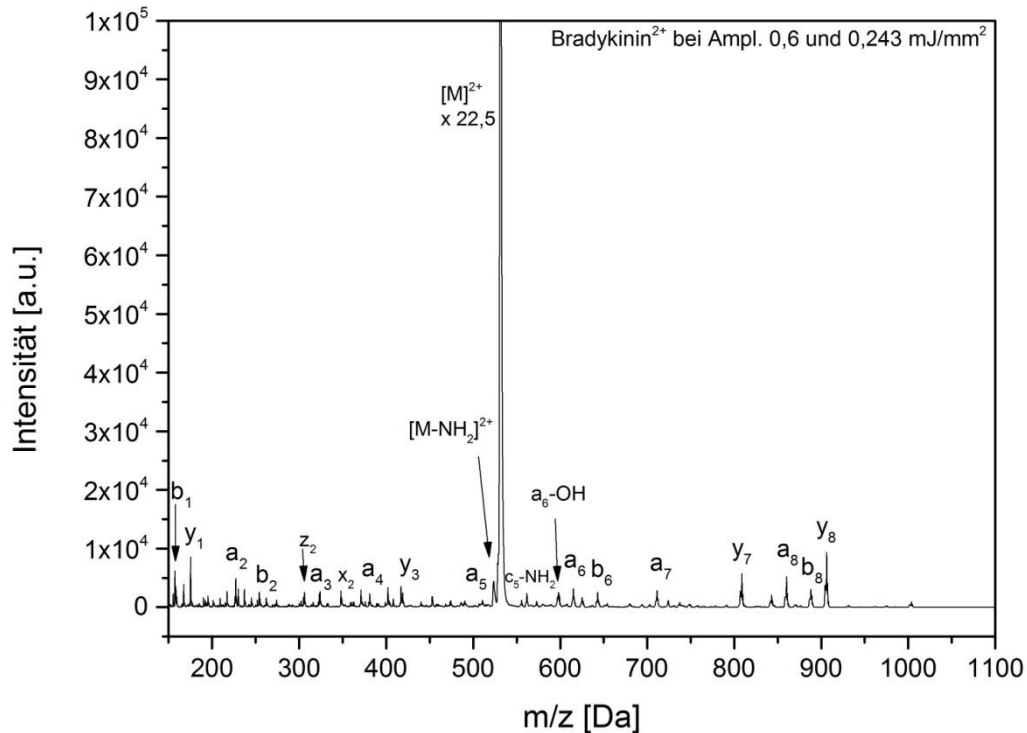


Abbildung 75: Fragmentspektrum vom zweifachgeladenen Bradykinin bei einer Amplitude von 1,2 und einer Laserenergie pro Fläche von  $0,243 \text{ mJ/mm}^2$ . Beim Spektrum wurde die y-Achse stark aufgespreizt, um die Fragmente deutlicher hervorzuheben.

Die Kettenlänge des Bradykinins ist für die Ausbildung einer Sekundär- bzw. Tertiärstruktur vermutlich zu kurz um etwaige Auffaltungseffekte sehen zu können. Beim Einfachgeladenen wird zwar wahrscheinlich eine Rückfaltung im Ion stattfinden, sodass die Ladung solvatisiert ist, allerdings wird wahrscheinlich nicht noch zusätzlich eine stark gebundene Tertiärstruktur ausgebildet sein. Durch die zweite Protonierungsstelle steht das  $[M]^{2+}$  schon unter Spannung, sodass es vermutlich auch keine gefaltete Sekundärstruktur ausbilden kann.

Um eine genauere Aussage über den Wert einer Fragmentanalyse mit dieser Kombinationsmethode treffen zu können, muss also ein Molekül mit größerer Kettenlänge verwendet werden.

### 4.3.3 Angiotensin II

Angiotensin II besitzt im Vergleich zu Bradykinin zwar eine Aminosäure weniger, trägt jedoch ebenfalls die Aminosäure Arginin, allerdings nur einmal. Angiotensin II lässt sich neben dem Einfach- und Zweifachgeladenen auch dreifachgeladen darstellen. In Abbildung 76 sind die drei wahrscheinlichsten Protonierungsstellen im Molekül rot unterlegt.

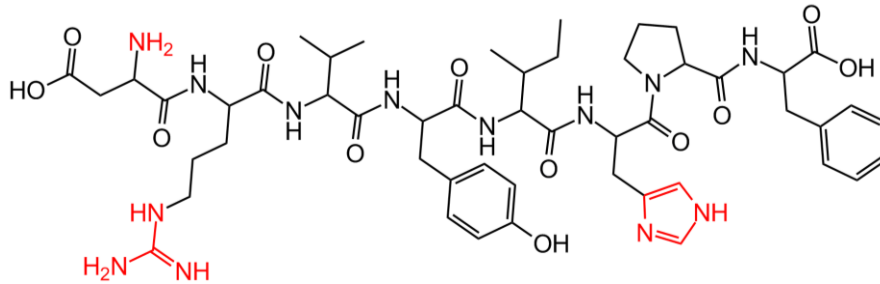


Abbildung 76: Angiotensin II, bestehend aus der Sequenz Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe. Rot markiert sind die drei wahrscheinlichsten Protonierungsstellen im Molekül.

Wenn man für den Vergleich des ein-, zwei- und dreifachgeladenen Angiotensin II eine Vorhersage für die benötigte Energie zur Einleitung der Dissoziation machen möchte, so muss man sich zunächst für die einzelnen Ionen die möglicherweise auftretenden Effekte überlegen. Kurz zusammengefasst bedeutet dies

für  $[M]^+$  :

- Die erste Ladung befindet sich am Arginin, was die Protonenwanderung im einfachgeladenen Ion erschwert. Es wird deshalb für den Bindungsbruch innerhalb der Kette mehr Energie benötigt.

für  $[M]^{2+}$  :

- Die erste Ladung befindet sich am Arginin während die Zweite entweder am Histidin oder am N-Terminus positioniert ist. Beide Stellen sind energetisch gegenüber der Peptidbindung in der Kette nicht wesentlich stabilisiert. Dadurch kann dieses Proton bei Energiezufuhr vermutlich besser über das Molekül wandern, was eine Dissoziation am *backbone* begünstigt.
- Die Bildung der rückgefalteten Konformere wird durch die zweite Ladung eingeschränkt, was eine reduzierte Zustandsdichte im Molekülion zur Folge hat.

für  $[M]^{3+}$  :

- Wegen der dritten Ladung und der damit verbundenen größeren Coulombabstoßung ist  $[M]^*$  sterisch noch eingeschränkter als das  $[M]^{2+}$ , sodass sowohl die Dissoziationsenergie als auch die Zustandsdichte weiter reduziert werden.
- Allerdings wird durch die Coulombabstoßung die Ladungswanderung eingeschränkt, sodass für die Dissoziation mehrheitlich neutrale Fragmentierungswege genutzt werden müssen.

Alle drei Ionen wurden sowohl durch Stoß- als auch durch Laseranregung auf ihr Fragmentierungsverhalten untersucht. Auf die Untersuchung mit der kombinierten Laser- und Stoßfragmentierung wurde in diesem Fall, wegen der kürzeren Kettenlänge im Vergleich zum Bradykinin, verzichtet.

#### 4.3.3.1 Die Stoßfragmentierung des Angiotensin II

Für die Stoßfragmentierung wurde bei allen Ionen zunächst vorab das Fragmentierungsverhalten bei verschiedenen Schüttelamplitudeneinstellungen getestet, um den Bereich, in dem die Fragmentierung beginnt, einzuschränken. Aus diesem Grund wurden beispielsweise bei  $[M]^+$  bis Amplitude 2 nur alle 0,5 Einheiten eine Messung aufgezeichnet.

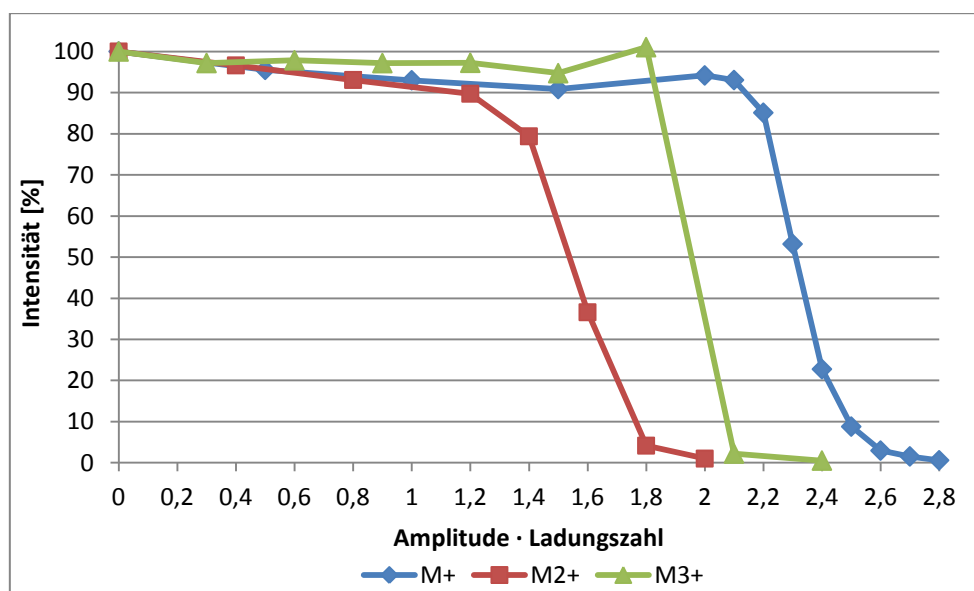


Abbildung 77: Angepasstes Diagramm der prozentualen Abnahme von  $[M]^+$ ,  $[M]^{2+}$  bzw.  $[M]^{3+}$  des Angiotensin II bei verschiedenen Schüttelamplituden mal Ladungszahl bei der Stoßfragmentierung.

Betrachtet man zunächst die prozentuale Abnahme der verschiedenen geladenen Angiotensin II-Ionen, so benötigt  $[M]^+$  die meiste Energie um zu fragmentieren, da die Intensität der Muttermasse erst bei einer Amplitude von 2,2 abnimmt. Bezieht man die Ladungszahl in die Auswertung mit ein, so beginnt die Fragmentierung bei  $[M]^{2+}$  schon bei Amplitude 1,2, für  $[M]^{3+}$  allerdings erst bei 1,9. Die Schwankung in den Intensitäten vor den abfallenden Flanken ist gerätebedingt und ließ sich nicht eliminieren, jedoch ist das Einsetzen der Fragmentierung deutlich an der starken Intensitätsabnahme zu erkennen. Wie vorhergesagt, benötigt  $[M]^+$  die meiste Energie um dissoziieren zu können. Interessant ist die Tatsache, dass  $[M]^{3+}$  mehr Energie für einen Zerfall benötigt als  $[M]^{2+}$ , obwohl die Dissoziationsenergie durch die Coulombabstoßung beim Dreifachgeladenen kleiner sein müsste. Dieses abweichende Verhalten ist möglicherweise durch eine starke Einschränkung der Protonenwanderung im dreifachgeladenen Molekül zu erklären. Wie auch schon bei der Stoßfragmentierung vom LWMR muss die Coulombabstoßung mit Hilfe der Energiezufuhr überwunden werden damit die Protonen längs der Kette wandern können. Ist die Protonenwanderung unterbunden, muss mehr Energie in die Peptidbindung eingebracht werden, um diese zu brechen, da diese ohne die Protonierung energetisch höher liegt (siehe Kapitel 2.6.2).

In Abbildung 78 sind die Fragmentmassenspektren von  $[M]^+$ ,  $[M]^{2+}$  und  $[M]^{3+}$  jeweils bei derjenigen Amplitude zu sehen, bei denen die Muttermasse schon fast vollständig fragmentiert wurde. Dabei wurden zum besseren Vergleich die Spektren auf das jeweils höchste Signal normiert.



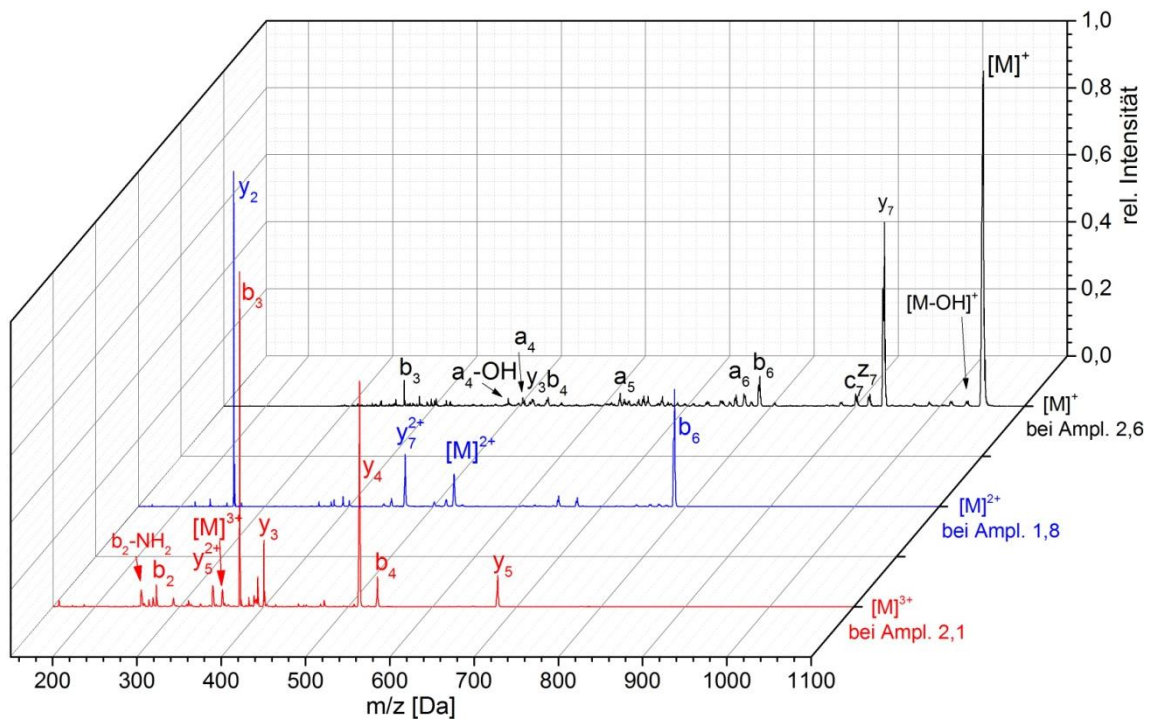


Abbildung 78: Fragmentspektren vom ein-, zwei- und dreifachgeladenen Angiotensin II. Dabei wurden jeweils die Spektren ausgesucht, bei der die Muttermasse schon fast vollständig fragmentiert ist.

Obwohl bei  $[M]^+$  die Muttermasse fast schon vollständig fragmentiert wurde, ist sie im Fragmentspektrum immer noch das intensivste Signal. Das lässt vermuten, dass Fragmentationen erzeugt werden, die wir nicht beobachten wie z.B. Massen unter der jeweiligen Nachweisgrenze. Dazu müsste die Fragmentierung von  $[M]^+$  bevorzugt über Kanäle stattfinden, bei denen das größere Fragment neutral ist und das kleinere Fragment die Ladung trägt. Beim Bradykinin war dies der  $\text{NH}_3$ -Verlustkanal, bei dem auch  $\text{NH}_4^+$  abgespalten werden konnte, welches unter der Massengrenze lag. Das korrespondierende große Fragment ist neutral und damit nicht detektierbar. Angiotensin II hat durch das Fehlen eines zweiten Arginins diesen Kanal zwar nicht, jedoch kann es beispielsweise die geladene Guanidin-Gruppe abspalten. Durch die vorgegebene untere Massengrenze von 290 m/z beim Einfachgeladenen ist die protonierte Guanidin-Gruppe mit einer Masse von 59 m/z leider nicht zu sehen. Das Fragment mit der größten Intensität, welches beobachtet wird, ist das  $y_7$ . Alle anderen Fragmente sind nur sehr schwach ausgeprägt.

Beim Zweifachgeladenen korrespondieren die intensivsten Signale mit dem  $y_2$ - und  $b_6$ -Fragment. Diese sind auch ein Fragmentpaar, was zeigt, dass ein Proton am Arginin bleibt während das zweite Proton vermutlich die Dissoziation am *backbone* induziert

und dabei das entstehende zweite Fragment protoniert. Interessant ist auch zu sehen, dass ein zweifachgeladenes Fragmention entsteht ( $y_7^{2+}$ ).

$[M]^{3+}$  zeigt ebenfalls korrespondierende Fragmentpaare ( $b_3$  und  $y_5$  bzw.  $b_4$  und  $y_4$ ). Allerdings sind das  $b_3$ - und  $y_4$ -Fragment sehr viel intensiver als ihr Gegenfragment, sodass davon ausgegangen werden kann, dass bei der Bildung beider Fragmente eines weiter in kleinere Fragmente zerfällt und die Intensität des ursprünglichen Fragments somit geschwächt wird. Allerdings kann es bei hochgeladenen Ionen auch sein, dass während der Dissoziation die entstehenden Fragmente durch die Coulombabstoßung so viel kinetische Energie erhalten, dass sie nicht mehr dem angelegten Pseudopotential folgen und vorzeitig aus der Falle herausfliegen.

Es stellt sich die Frage, ob sich für die Laserfragmentierung ein ähnliches Verhalten wie bei der He-Stoßfragmentierung ergibt.

#### 4.3.3.2 Die Laserfragmentierung des Angiotensin II

Mit Blick auf die vorherigen Interpretationen zum Stoßfragmentierungsverhalten der unterschiedlich geladenen Ionen wurden diese ebenfalls mit der Laserfragmentierungsmethode, sowohl mit als auch ohne Helium, untersucht. Da die Laserfragmentierung zu den hochenergetischen Fragmentierungsmethoden gehört, stellt sich die Frage, ob man hierbei Unterschiede in der Art der Fragmentbildung und der Fragmentierungswahrscheinlichkeit, im Vergleich zur niederenergetischen Stoßfragmentierung, finden kann.

In Abbildung 79 ist die Effizienz der Laserfragmentierung ohne Helium für  $[M]^+$ ,  $[M]^{2+}$  und  $[M]^{3+}$  in Abhängigkeit der Laserintensität dargestellt.

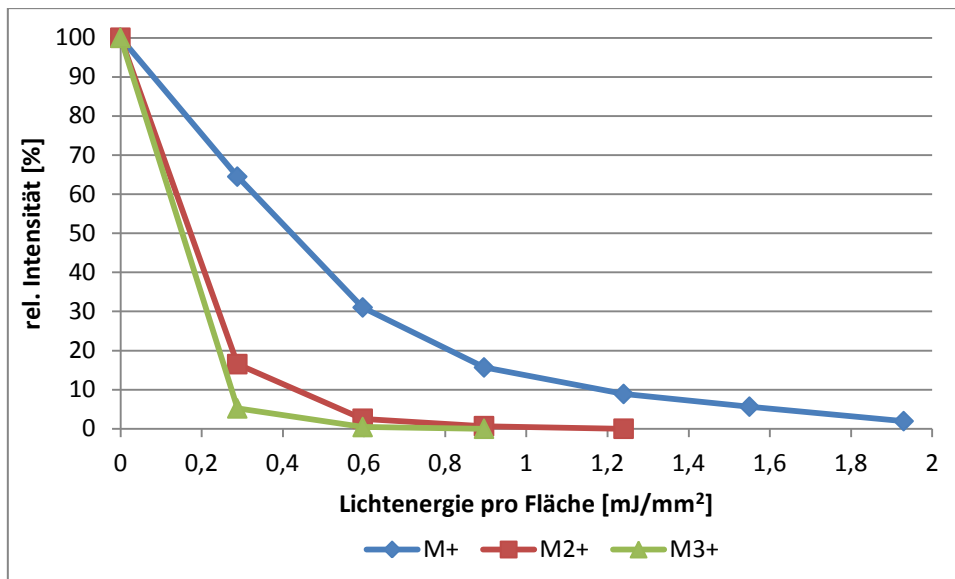


Abbildung 79: Laserfragmentierung vom ein-, zwei- und dreifachgeladenen Angiotensin II ohne Helium.

Die Intensitäten der zwei- und dreifachgeladenen Molekülonen nehmen bei der Photofragmentierung schon nach zwei Laserschüssen fast vollständig ab, während das Einfachgeladene sechs Laserschüsse benötigt. Da wir immer davon ausgehen, dass die Protonierung keinen wesentlichen Einfluss auf den gesamten Absorptionsquerschnitt besitzt, müssen dies ladungskorrelierende Effekte sein. Beim Einfachgeladenen ist die prozentuale Abnahme zwischen den einzelnen Schüssen nicht sehr groß, was bedeutet, dass die zugeführte Energie im Molekül nur bedingt ausreicht um eine Bindung zu brechen. Dies kann mit der Protonierung am Arginin begründet werden, da das Proton dort stark gebunden ist und mehr Energie benötigt um wandern zu können. Deshalb kann die Bindungsenergie in der Peptidbindung am *backbone* durch das Proton nicht herabgesetzt werden und somit wird mehr Energie zum neutralen Bindungsbruch benötigt.

Bei  $[M]^{2+}$  kann man annehmen, dass das zweite Proton mobil ist, sodass es bei einer größeren Population der Ionen die Bindungsenergie an der Kette durch Anlagern herabsenken kann und so die Dissoziation effizienter macht. Im Vergleich zur Stoßfragmentierung dissoziiert  $[M]^{3+}$  bei Photoanregung stärker als  $[M]^{2+}$ . Die Laserbestrahlung bringt viel Energie ins Molekül, sodass nun ein Proton wandern kann und die Dissoziation unterstützt. Die reduzierte Dissoziationsenergie bzw. Zustandsdichte lässt das Dreifachgeladene hier im Endeffekt doch effizienter fragmentieren als das Zweifachgeladene.

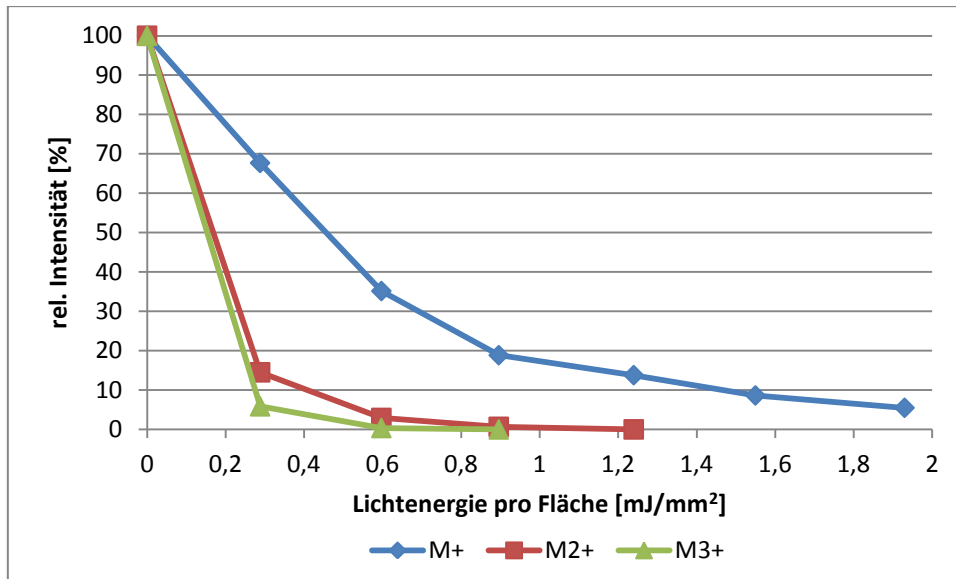


Abbildung 80: Laserfragmentierung des ein-, zwei- und dreifachgeladenen Angiotensin II mit Helium.

Für die Messungen mit Helium ändert sich bei der Laserfragmentierung wenig im Vergleich zu den Messungen ohne Helium. Nur  $[M]^+$  fragmentiert in diesem Fall um fünf Prozent schlechter, die Kurven von  $[M]^{2+}$  und  $[M]^{3+}$  ändern sich kaum. Für den Dissoziationsmechanismus vom zwei- und dreifachgeladenen Angiotensin II bedeutet dies, dass es schnelle Prozesse sind, die nicht durch die Energieabfuhr der Heliumstöße unterbunden werden können. Bindungen können also, sei es durch Protonenwanderung oder Laseranregung, direkt gebrochen werden bevor die Ionen mit Helium stoßen können.

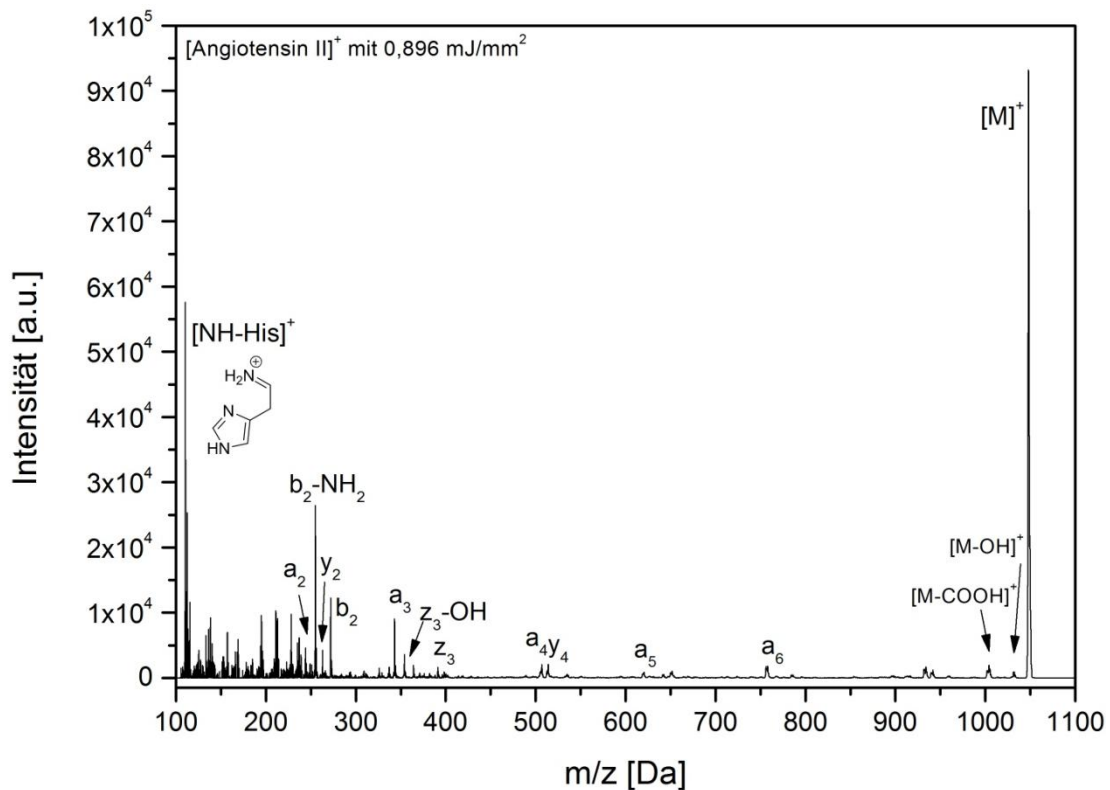


Abbildung 81: Fragmentspektrum von  $[\text{Angiotensin II}]^+$ , entstanden durch Laseranregung ohne Helium bei einer Energie von  $0,896 \text{ mJ/mm}^2$ .

Betrachtet man zunächst für die verschiedenen Ladungszustände die dazugehörigen Fragmentmassenspektren ohne Helium (Abbildung 81, Abbildung 82 und Abbildung 83), so kann man bei allen fast die gesamte a-Fragmentreihe erkennen. Dies war wegen des *high-energy* Dissoziationsmechanismus auch zu erwarten (vgl. Kapitel 2.6.2). Was allerdings auffällt, sind die vielen Fragmentensignale im Bereich zwischen 100 und 300  $m/z$  sowohl beim Einfach- als auch beim Dreifachgeladenen. Bei  $[\text{M}]^{2+}$  sind zwar auch in diesem Bereich Fragmente vertreten, allerdings sind es nicht so viele. Betrachtet man diese  $m/z$ -Verhältnisse beim  $[\text{M}]^{3+}$  genauer, so stellt man fest, dass es sich um innerkettige Fragmente handelt bei denen alle Variationen von Bindungsbrüchen zu finden sind. Am *backbone* werden dabei sowohl vor, zwischen als auch hinter der Peptidbindung die Bindungen gebrochen. Zudem finden sich auch viele Fragmente bei denen die Seitenketten abgespalten wurden. Aus Platzgründen und der Übersicht halber wurden diese Fragmente nicht im Spektrum benannt. Einzig das  $[\text{NH-His}]^+$  ist zu sehen, weil dieses Fragment das intensivste Signal erzeugt.

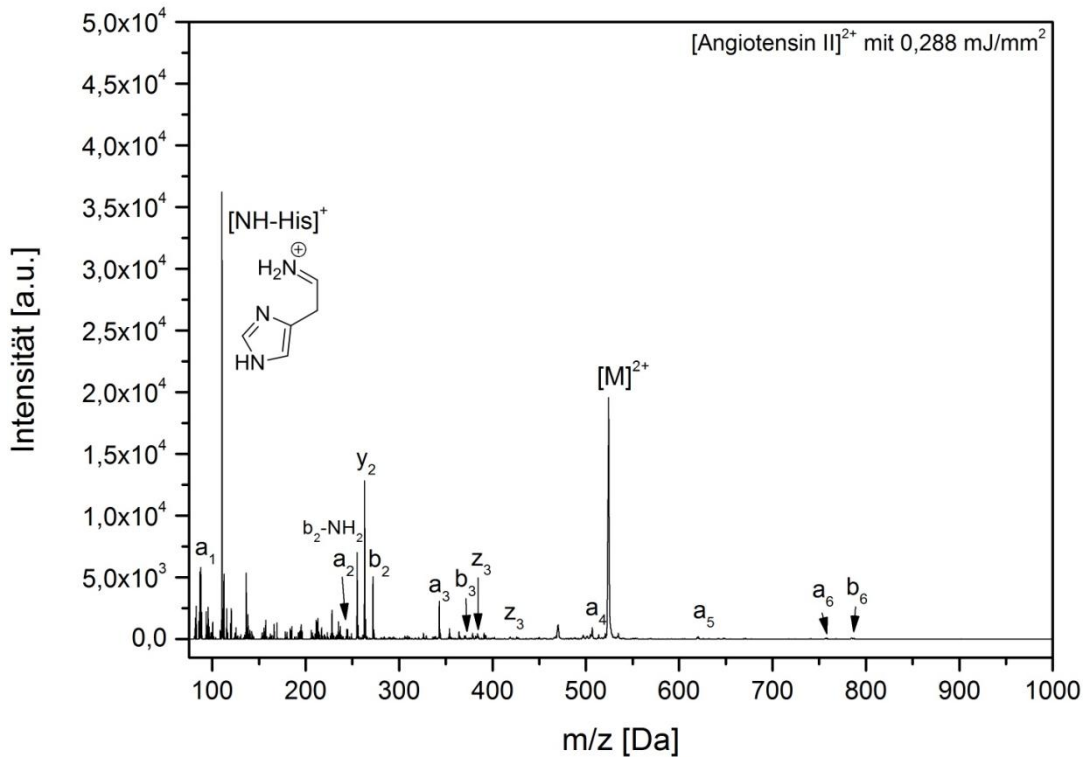


Abbildung 82: Fragmentspektrum von  $[\text{Angiotensin II}]^{2+}$ , entstanden durch Laseranregung ohne Helium bei einer Energie von  $0,288 \text{ mJ/mm}^2$ .

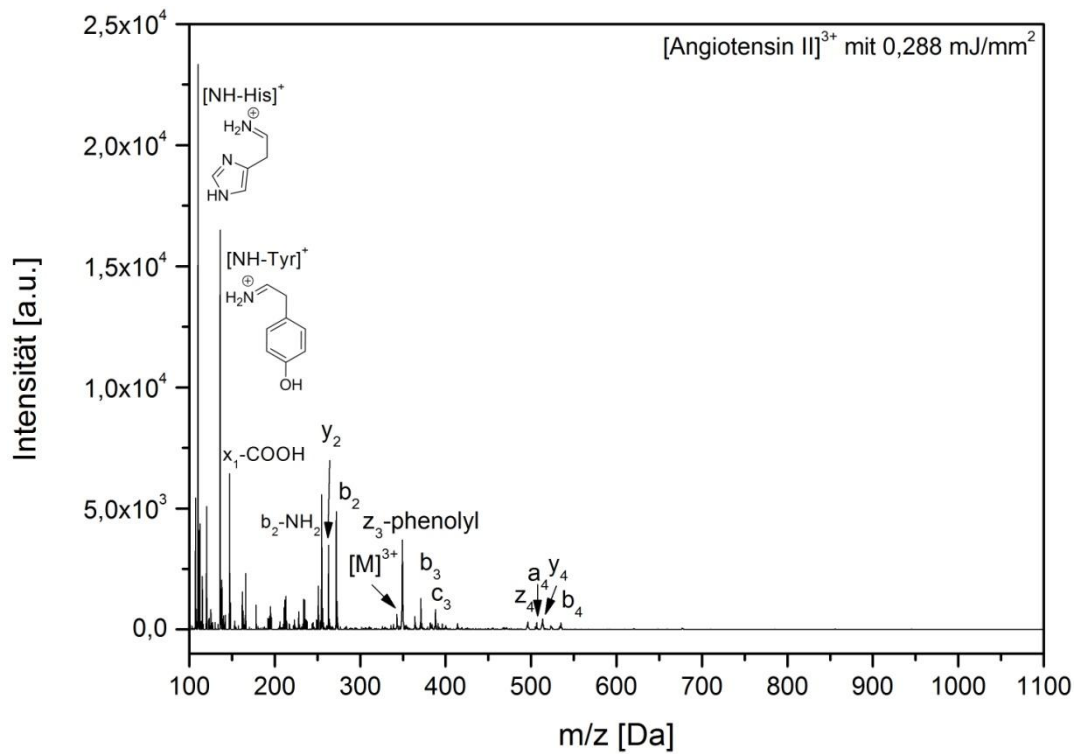


Abbildung 83: Fragmentspektrum von  $[\text{Angiotensin II}]^{3+}$ , entstanden durch Laseranregung ohne Helium bei einer Energie von  $0,288 \text{ mJ/mm}^2$ .

Interessant ist die Tatsache, dass man nun bei  $[M]^{2+}$  diese Vielfalt der innerkettigen Fragmente nicht beobachtet. Der interessante Unterschied zwischen  $[M]^{2+}$  und  $[M]^+$  sowie  $[M]^{3+}$  liegt offensichtlich in der Protonenmobilität. Beim Zweifachgeladenen bleibt das erste Proton vermutlich am Arginin, jedoch kann das zweite Proton wandern und so Dissoziationen hervorrufen. Bei den anderen beiden Ionen ist diese wegen der Gasphasenbasizität des Arginins bzw. der Coulombabstoßung der weiteren Ladungen gehindert. Deshalb werden bei diesen auch scheinbar vermehrt wahllos Bindungen gebrochen, wobei es sich vermutlich um neutrale Bindungsbrüche handelt.

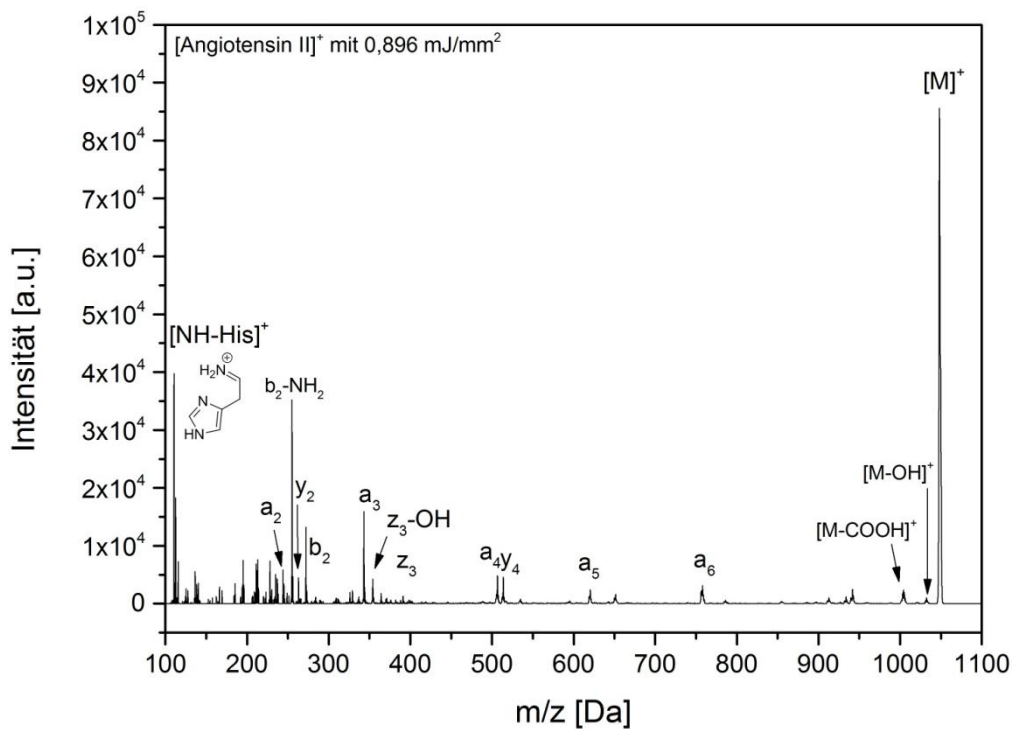


Abbildung 84: Fragmentspektrum von  $[\text{Angiotensin II}]^+$ , entstanden durch Laseranregung mit Helium bei einer Energie von  $0,896 \text{ mJ/mm}^2$ .

Betrachtet man im Gegensatz dazu die Spektren, die mit Helium in der Falle aufgenommen wurden (Abbildung 84, Abbildung 85 und Abbildung 86), so erkennt man bei  $[M]^+$  und  $[M]^{2+}$  die starke Abnahme der vielen kleinen Fragmente. Dies zeigt, dass durch das Helium die durch die Photonen zugeführte Energie schon soweit wieder abgeführt wird, sodass sie nicht mehr für alle innerkettigen Fragmentierungskanäle, die vermutlich sequenzielle Bindungsbrüche benötigen, ausreicht. Einzig bei  $[M]^{3+}$  sieht man kaum eine Änderung im Vergleich zum Spektrum ohne Helium. Bei  $[M]^{3+}$  ist die Absenkung der Dissoziationsenergie und der Zustandsdichte durch die Coulombabstoßung allerdings schon so groß, dass durch die zusätzliche Anregungsenergie die energetisch höher liegenden Fragmentierungskanäle schnell angesprochen werden ohne dass der Kühleffekt des Heliums Einfluss darauf hat. Deshalb gibt es kaum einen Unterschied zwischen dem Spektrum ohne Helium und dem Spektrum mit Helium.

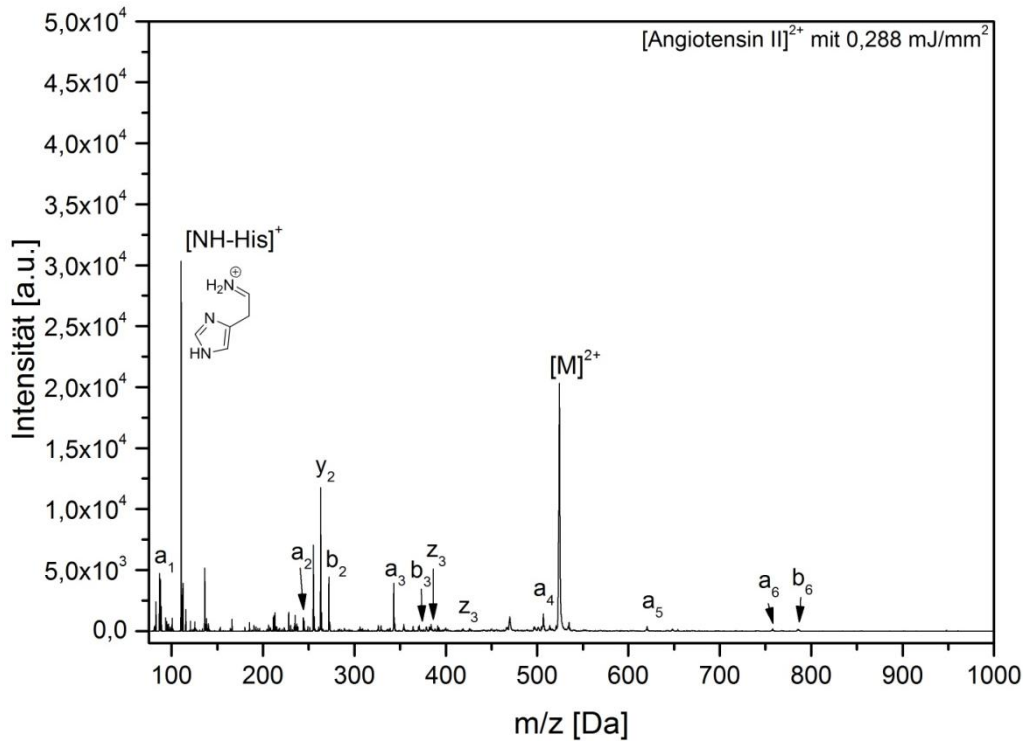


Abbildung 85: Fragmentspektrum von  $[\text{Angiotensin II}]^{2+}$ , entstanden durch Laseranregung mit Helium bei einer Energie von  $0,288 \text{ mJ/mm}^2$ .

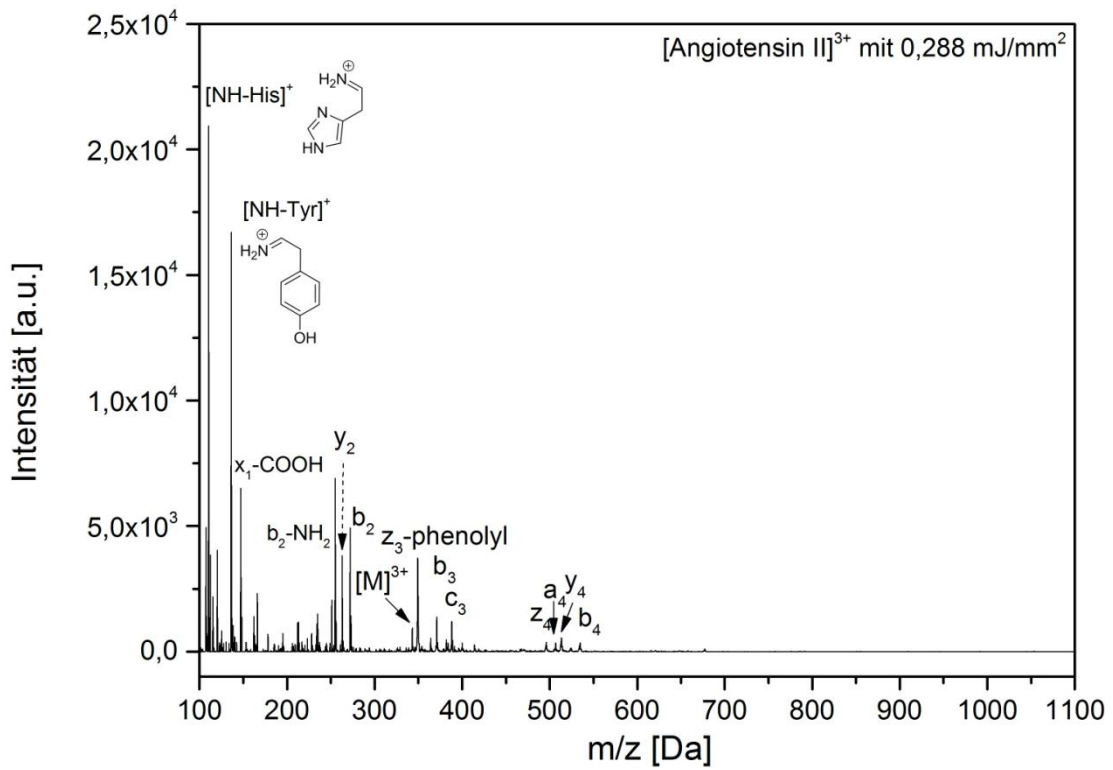


Abbildung 86: Fragmentspektrum von  $[\text{Angiotensin II}]^{3+}$ , entstanden durch Laseranregung mit Helium bei einer Energie von  $0,288 \text{ mJ/mm}^2$ .



#### 4.3.4 Angiotensin I

Angiotensin I ist im Vergleich zu Angiotensin II um zwei Aminosäuren länger und besitzt wegen des zusätzlichen Histidins eine weitere Protonierungsstelle, sodass es sich auch vierfachgeladen darstellen lässt.

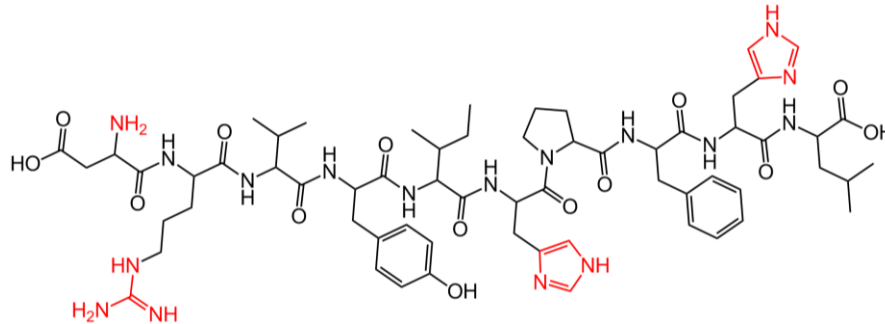


Abbildung 87: Angiotensin I, bestehend aus der Sequenz Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu. Rot markiert sind die vier wahrscheinlichsten Protonierungsstellen.

In Bezug auf die Energetik besitzt es ähnliche Voraussetzungen wie das Angiotensin II. Noch einmal zusammengefasst bedeutet dies

für  $[M]^+$ :

- Die Ladung liegt am Arginin, sodass das Proton kaum wandern kann.
- Das Molekül ist flexibel und kann rückfalten.

für  $[M]^{2+}$ :

- Eine Ladung bleibt am Arginin, die andere kann vermutlich wandern.
- Die Protonenwanderung ist jedoch etwas eingeschränkt.
- Durch die zusätzliche Ladung werden die Dissoziationsenergie und die Zustandsdichte reduziert.

für  $[M]^{3+}$ :

- Wegen der Coulombabstoßung ist  $[M]^{3+}$  sterisch eingeschränkter als  $[M]^{2+}$ , sodass die Dissoziationsenergie und die Zustandsdichte weiter reduziert werden.
- Die Ladung kann aufgrund der Coulombabstoßung weniger wandern.

für  $[M]^{4+}$ :

- Die Ladungswanderung ist hier noch eingeschränkter als bei  $[M]^{3+}$ .
- Die Dissoziationsenergie und Zustandsdichte wird durch den Coulombeffekt weiter reduziert.

Zu erwarten wäre also bei gleicher Anregung eine Dissoziationswahrscheinlichkeit von folgender Reihenfolge (mit  $I_F(M)$  als Intensität der Fragmente aus den jeweiligen geladenen Mutterionen):

$$I_F(M^{4+}) > I_F(M^{3+}) > I_F(M^{2+}) > I_F(M^+)$$

Alle Ionen wurden sowohl mit Hilfe von Stößen, dem Laser und auch durch die Kombination aus Stoß und Laser fragmentiert und so ihr Fragmentierungsverhalten untersucht.

#### 4.3.4.1 Die Stoßfragmentierung des Angiotensin I

Bei der Untersuchung der einzelnen Ionen mit Hilfe der Stoßfragmentierung ist man auf ein ungewöhnliches Verhalten der Mehrfachgeladenen gestoßen, sodass alle Messungen zur Überprüfung mehrmals durchgeführt wurden. In Abbildung 88 ist eine Auswahl der Messungen gegen die Schüttelamplitude multipliziert mit der Ladungszahl dargestellt, wobei allerdings zunächst nur der Unterschied vom Einfachgeladenen zu den Mehrfachgeladenen gezeigt werden soll.

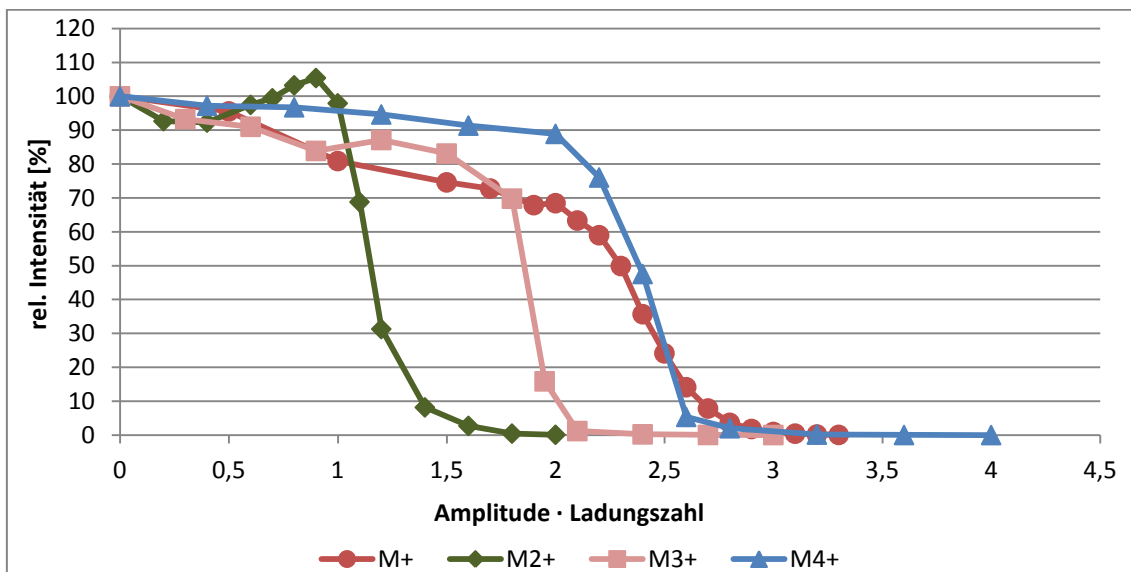


Abbildung 88: Prozentuale Abnahme der Einfach- und Mehrfachgeladenen während der Stoßfragmentierung. Hier soll allerdings nur der Vergleich vom  $[M]^+$  zu den Mehrfachgeladenen aufgezeigt werden.

Wie man in Abbildung 88 sehen kann, fragmentiert sowohl das Einfach- als auch das Vierfachgeladene erst bei hohen internen Energien. Das Zweifachgeladene hingegen fragmentiert am effizientesten, wobei sich  $[M]^{3+}$  zwischen den Messungen von  $[M]^{2+}$  und  $[M]^+$  befindet. Einen so deutlichen Effekt hat es zuvor noch nicht gegeben. Wie bei den anderen Probenmolekülen schon vermutet, ist die Fragmentierung während des

Stoßprozesses bevorzugt von der Protonenwanderung abhängig. Werden die Protonen an ihrer Wanderung durch die Coulombabstoßung gehindert, so muss entweder mehr Energie aufgewendet werden um diese energetische Barriere zu überwinden oder die Bindung muss ohne die Anwesenheit eines Protons gebrochen werden, was ebenfalls viel Energie kostet. Dies kann man an dem Dissoziationsverhalten von  $[M]^{4+}$  im Vergleich zu  $[M]^+$  erkennen. Das Vierfachgeladene müsste durch die Abstoßung eine stark reduzierte Dissoziationsenergie im Vergleich zum Einfachgeladenen besitzen, benötigt aber überraschenderweise dennoch eine genauso große Schüttelamplitude um zu fragmentieren.

Betrachtet man die Dissoziationskurven der geladenen Ionen separat und etwas genauer, so kann man das Problem mit der Protonenwanderung auch dort erkennen.

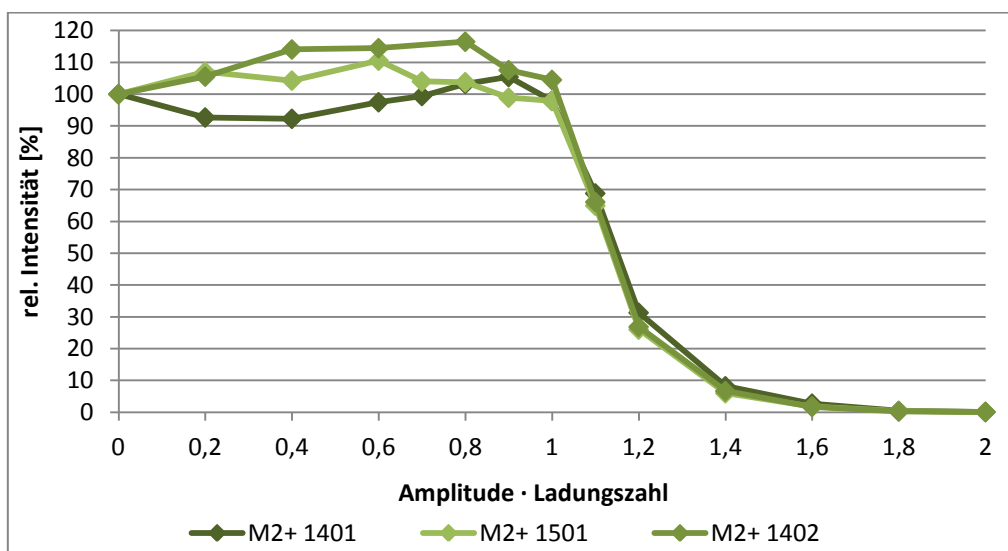


Abbildung 89: Prozentuale Abnahme von  $[M]^{2+}$  aufgetragen gegen die Schüttelamplitude, multipliziert mit der Ladungszahl, während der Stoßfragmentierung. Dabei wurde die Messung mehrmals wiederholt, wobei sich die Zweifachgeladenen hier in Bezug auf den Beginn der Fragmentierung in beiden Fällen gleich verhält.

Außer bei  $[M]^{2+}$  finden wir eine große Variation in der Schüttelamplitude um den Beginn der Fragmentierung zu erreichen. Während das Zweifachgeladene bei den verschiedenen Messungen immer bei der Amplitude von 1,0 anfängt zu fragmentieren und wiederholbar das gleiche abfallende Kurvenverhalten zeigt, ist leider bei den Messungen an dem Drei- und Vierfachgeladenen die Streubreite größer.

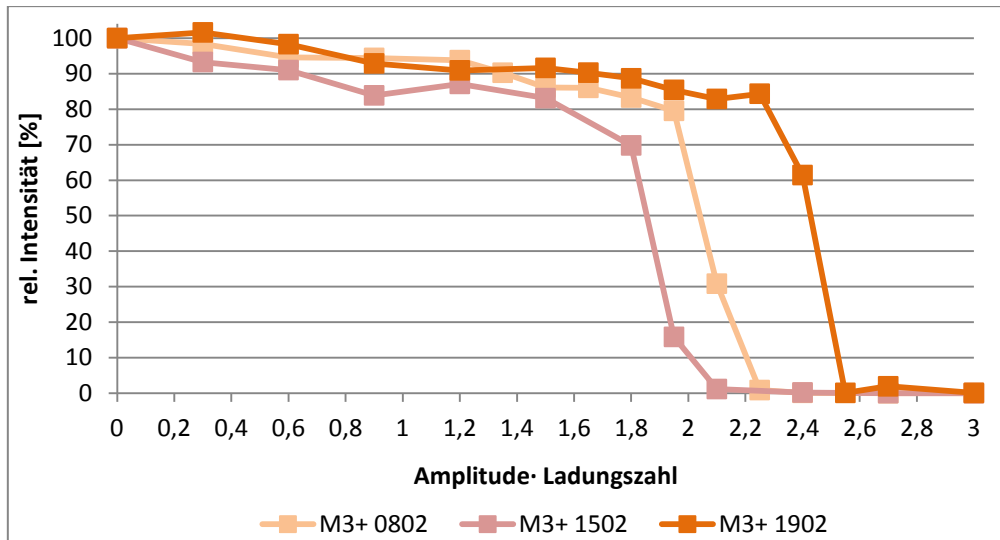


Abbildung 90: Prozentuale Abnahme von  $[M]^{3+}$  aufgetragen gegen die Schüttelamplitude, multipliziert mit der Ladungszahl, während der Stoßfragmentierung. Dabei wurde die Messung mehrmals wiederholt, wobei sich hier in Bezug auf den Beginn der Fragmentierung das Dreifachgeladene unterschiedlich verhält. Bei den gezeigten Messungen schwankt der Beginn der Fragmentierung zwischen der Schüttelamplitude 1,8 und 2,3.

Gerade bei  $[M]^{3+}$  sieht man eine deutliche Schwankung für den Beginn der Fragmentierung, der zwischen 1,8 und 2,3 zu erkennen ist. Beim Vierfachgeladenen beginnt die Fragmentierung beide Male bei 2,0, allerdings ist der Bereich, in dem die Fragmentierung stattfindet, leicht unterschiedlich (Abbildung 91). Dieser unterscheidet sich in der Differenz zwischen 0,8 und 1,0.

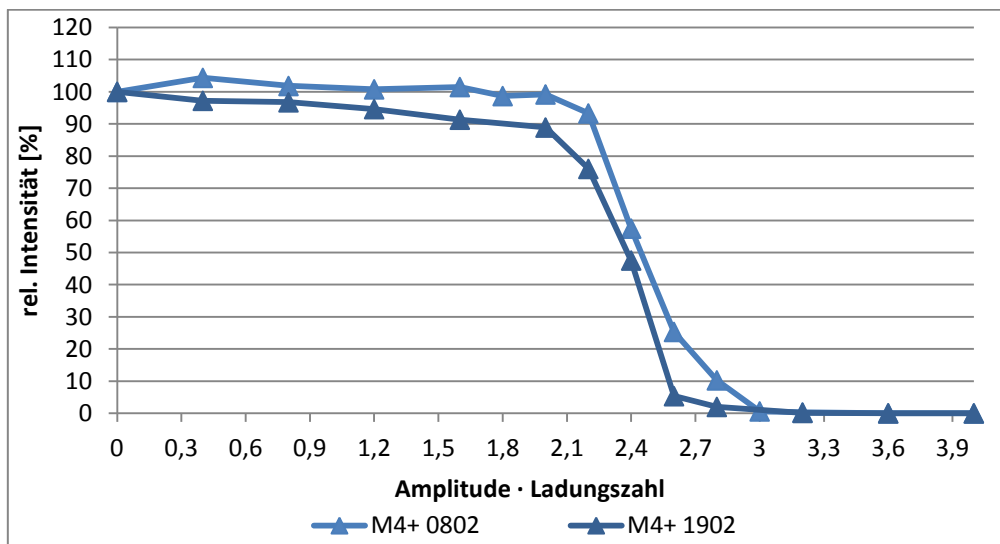


Abbildung 91: Prozentuale Abnahme von  $[M]^{4+}$  aufgetragen gegen die Schüttelamplitude, multipliziert mit der Ladungszahl, während der Stoßfragmentierung. Dabei wurde die Messung mehrmals wiederholt. Es werden exemplarisch zwei sehr unterschiedliche Ergebnisse gezeigt. In Bezug auf den Bereich der Fragmentierung verhält sich das Vierfachgeladene leicht unterschiedlich. Während bei der einen Messung das Ion zwischen 1,8 und 2,0 fast vollständig fragmentiert, ist dieser Bereich bei der anderen Messung leicht größer (0,8-1,0).

Man könnte jetzt vermuten, dass diese Variation gerätebedingt ist, da die Messungen nicht alle am selben Tag durchgeführt wurden. Denn durch thermische Effekte in der Elektronik können diese Spannungsschwankungen ausgelöst werden. Eine mögliche Fehlerquelle könnte ebenfalls ein unterschiedlicher Restgasdruck von  $N_2$ ,  $O_2$  oder  $H_2O$  sein. Allerdings würde dies dann auch für  $[M]^{2+}$  gelten, welches jedoch immer das gleiche Verhalten zeigte. Jedoch muss man auch dazu sagen, dass sich ein vermeintlicher Messfehler bei der Spannung für die höher geladenen Ionen vervielfacht, sodass dieser Effekt hier erst einmal nicht eindeutig erklärbar ist.

Versucht man die Dissoziationskurven des Angiotensin I mit denen des Angiotensin II zu vergleichen, so ergibt sich kein einheitliches Bild. Das zweifachgeladene Angiotensin I fragmentiert bei niedrigerer Energie als das des Angiotensin II, während das Einfachgeladene des Angiotensin I erst bei höherer Energie dissoziiert. Jetzt kann man sich fragen, wieso es einen Unterschied gibt, obwohl das Angiotensin II nur zwei Aminosäuren weniger besitzt. Aber genau diese beiden Aminosäuren geben den Unterschied, denn das zweifachgeladene Angiotensin II unterscheidet sich bezüglich der Protonierungsstellen vom zweifachgeladenen Angiotensin I. Da gleiche Ladungen sich abstoßen, suchen sich die Protonen die am weitesten entfernten Protonierungsstellen im Molekül. Beim Angiotensin II sind dies das Arg<sup>2</sup> und das His<sup>6</sup>, während beim Angiotensin I das Arg<sup>2</sup> und das His<sup>9</sup> gewählt werden können. Auch beim Dreifachgeladenen kann sich das Proton beim Angiotensin I entweder an das His<sup>6</sup> oder an den N-Terminus anlagern. Damit ändern sich die Ladungsabstände und dementsprechend die von der Coulombkraft verursachten Effekte. Da beim Angiotensin II die Ladungsstellen für die Mehrfachgeladenen aber klar definiert sind, ist die Stoßfragmentierung auch eindeutig.

In Abbildung 92 sind die Stoß-Fragmentmassenspektren der Moleküle in seinen vier Ladungszuständen gezeigt, die jeweils auf das höchste Signal normiert wurden.

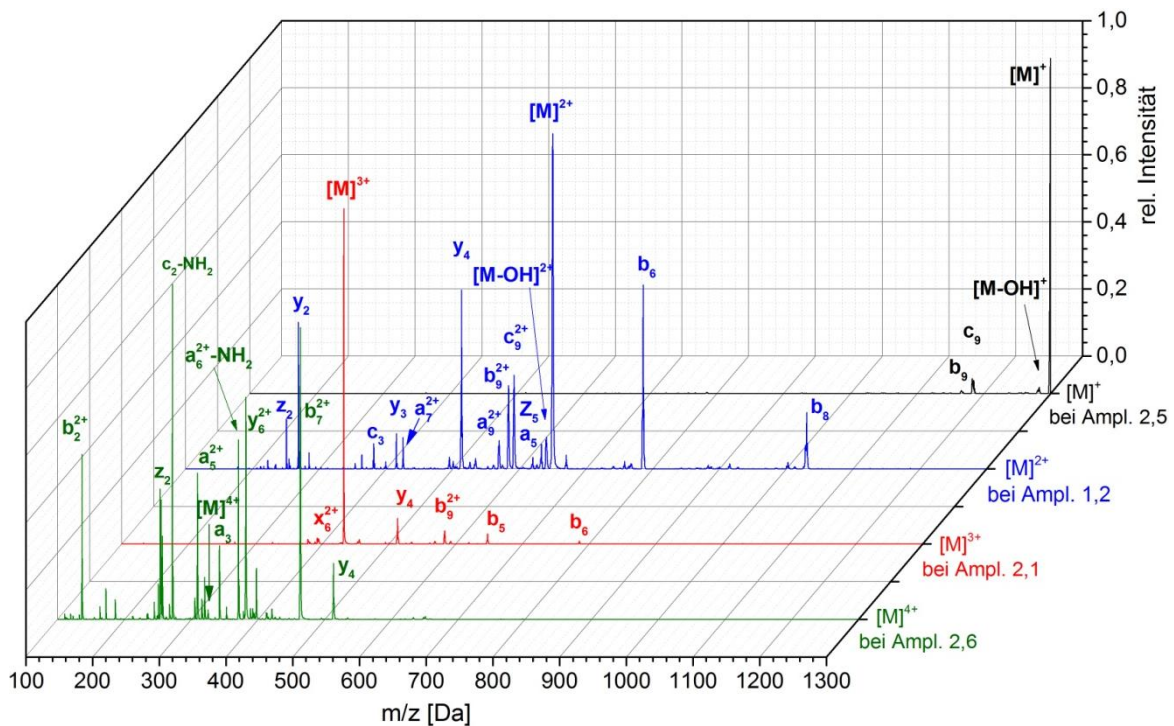


Abbildung 92: Fragmentspektren von  $[M]^+$ ,  $[M]^{2+}$ ,  $[M]^{3+}$  sowie  $[M]^{4+}$  des Angiotensin I bei einer gegebenen Amplitude (Messung 1401 für  $[M]^{2+}$ , 0802 für  $[M]^{3+}$  und 0802 für  $[M]^{4+}$ ). Zum besseren Vergleich wurde darauf geachtet, dass das Mutterion jeweils schon um ca. 70% fragmentiert war. Die Spektren wurden jeweils auf das höchste Fragment normiert.

Während das Einfachgeladene im Nachweisbereich wie erwartet kaum geladene Fragmente zeigt, was wahrscheinlich auf die Abspaltung der Guanidin-Gruppe und der Nachweisgrenze zurückzuführen ist, findet man bei den Mehrfachgeladenen sogar doppeltgeladene Fragmente. Beim  $[M]^{2+}$  kann man außerdem das komplementäre Fragmentpaar  $y_4$ - $b_4$  erkennen. Da die Intensitäten der beiden Fragmente gleich hoch sind, kann man davon ausgehen, dass diese auch gleichzeitig beim Brechen der Peptidbindung sechs entstanden sind. Zudem besitzen diese Fragmentensignale die höchste Intensität, was vermuten lässt, dass das zweite Proton wie erwartet am His<sup>9</sup> lokalisiert ist. Das zweite Fragmentpaar ist das  $y_2$  und das  $b_8$ , allerdings wird hier bevorzugt das  $y_2$  gebildet. Erstaunlich ist, dass auch hier schon zweifachgeladene Fragmente wie das  $a_9^{2+}$ ,  $b_9^{2+}$  und das  $c_9^{2+}$  gebildet werden. Aufgrund der Coulomb-abstoßung kann sich das Proton vom Histidin auch an die Peptidbindung 9 anlagern und dort eine Fragmentierung herbeiführen.

$[M]^{3+}$  zeigt im Gegensatz zu  $[M]^{2+}$  und  $[M]^{4+}$  kaum Fragmente, was verwunderlich ist und an dieser Stelle leider nicht erklärt werden kann. Beim  $[M]^{4+}$  treten wiederum viele Fragmente auf, wobei auch darauf hinzuweisen ist, dass das  $[M]^{4+}$  fast vollständig verschwindet. Das Molekül steht scheinbar so unter Spannung, dass es bei zugeführter Energie sofort fragmentiert. Dabei wird aber meist nur eine Bindung im Molekül gebrochen, sodass viele zweifachgeladene Fragmente zu finden sind.

Für die Untersuchung der Laserfragmentierung stellt sich die Frage, ob man die gleichen Fragmente findet und ob der Unterschied zwischen den Mehrfachgeladenen ähnlich ist.

#### 4.3.4.2 Die Laserfragmentierung des Angiotensin I

Da die Photoanregung ein hochenergetischer und deshalb schneller Prozess ist, kann man durch die Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens einen qualitativen Überblick über die Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Fragmentierungskanäle bekommen.

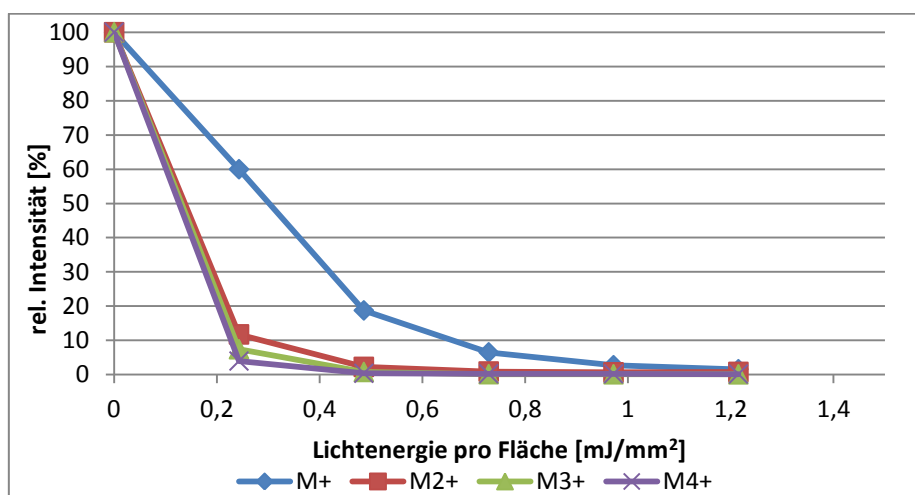


Abbildung 93: Laserfragmentierung von Angiotensin I ohne Helium. Dargestellt sind die prozentualen Abnahmen der unterschiedlich geladenen Muttermassen gegen die Lichtenergie pro Fläche.

In Abbildung 93 ist die prozentuale Abnahme der einzelnen Muttermassen bei verschiedenen Laserpulsenergien pro Fläche ohne Helium dargestellt. Wie vorher vermutet, fragmentiert  $[M]^+$  am schlechtesten von allen Ionen. Ziemlich nah beieinander liegen die Mehrfachgeladenen, wobei das Zweifachgeladene entgegen dem Fragmentierungsverhalten während der Stoßfragmentierung ein wenig schlechter fragmentiert als das Dreifachgeladene. Das Vierfachgeladene fragmentiert von allen am besten. Wie bei den vorherigen Probenmolekülen schon gezeigt, hängt hier die Dissoziationswahrscheinlichkeit nicht mehr nur von der Protonenwanderung ab, sondern ebenfalls von der Anregungswahrscheinlichkeit des Moleküls. Obwohl Angiotensin I zwei Aminosäuren mehr trägt als Angiotensin II, fragmentiert es bei der Laseranregung ohne Helium genauso gut. Durch die zwei zusätzlichen Aminosäuren wird zum einen die Zustandsdichte erhöht. Zum anderen besitzt es auch zwei zusätzliche Peptidbindungen, die den Absorptionsquerschnitt im Molekül erhöhen.

Dass die Fragmentierung beider Moleküle vergleichbar ist zeigt, dass die Strategie der Multichromophorenanregung erfolgreich ist.

Betrachtet man nun das Ergebnis der Messungen mit Helium, so stellt man fest, dass das Einfachgeladene nach einem Laserschuss zunächst sehr viel weniger fragmentiert als bei der Messung ohne Helium. Außerdem fragmentieren das Drei- und Vierfachgeladene nun langsamer als das Zweifachgeladene.

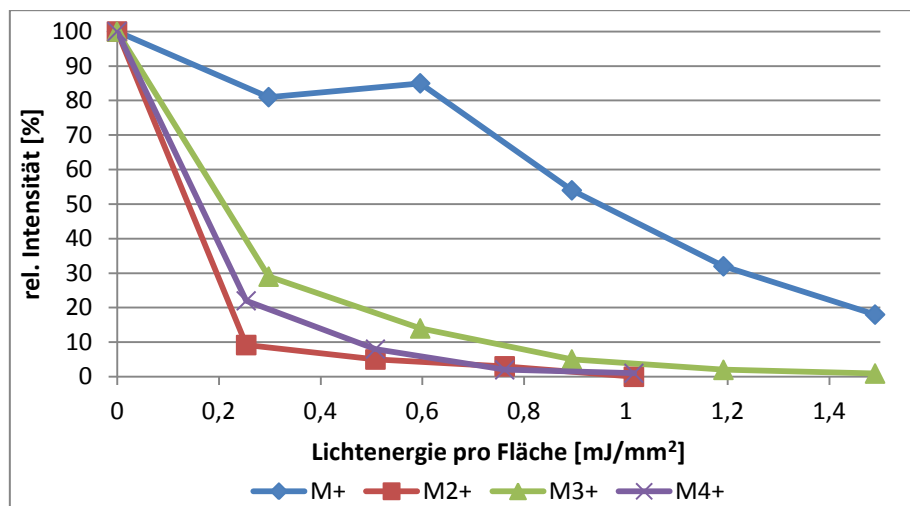


Abbildung 94: Laserfragmentierung von Angiotensin I mit Helium. Dargestellt sind die prozentualen Abnahmen der unterschiedlich geladenen Muttermassen gegen die Lichtenergie pro Fläche.

Da nun durch die Heliumstöße die zugeführte Energie im Molekül schneller abgeführt werden kann als bei der Laserfragmentierung ohne Helium, steht dem Molekül weniger Zeit zum Fragmentieren zur Verfügung. Deshalb spielen nun vermutlich nicht mehr nur die Coulomb-reduzierte Dissoziationsenergie und die Zustandsdichte eine Rolle, sondern auch die Fragmentierungsmechanismen. Sind diese komplizierter, so benötigen sie mehr Zeit um eine Fragmentierung herbeizuführen. Wie man anhand des Vergleichs zwischen den Messungen mit und ohne Helium erkennen kann, verändert sich das Fragmentierungsverhalten des  $[M]^{2+}$  kaum. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die protoneninduzierte Dissoziation durch Protonenwanderung am *backbone* recht unkompliziert und deshalb ein schneller Prozess ist. Da die Protonenwanderung aufgrund der Coulombabstoßung beim Drei- und Vierfachgeladenen gehindert ist, fallen die Fragmentierungsmechanismen vermutlich komplizierter und damit langsamer aus, sodass durch die zusätzlichen Heliumstöße die Dissoziationsinduzierung gehemmt wird und so weniger Ionen im Vergleich zu den Messungen ohne Helium fragmentieren.

Vergleicht man die jeweiligen Spektren miteinander, die durch die Bestrahlung mit einem Laserschuss entstanden sind, so stellt man fest, dass bei den Spektren ohne



Helium wieder viele kleine innerkettige Fragmente entstanden sind. Aufgrund der hohen Energie finden sequenzielle Fragmentierungen statt und es bilden sich innerkettige Fragmente, die sonst durch Anwesenheit des Helium verhindert werden. Dieses Verhalten deckt sich mit den zuvor vorgestellten Ergebnissen in Bezug auf die Laserfragmentierung ohne Helium.

Betrachtet man zunächst das Photo-Fragmentmassenspektrum des einfachgeladenen Angiotensin I (Abbildung 95), so kann man bei He-Zugabe deutlich die Abnahme der Fragmente, sowohl der innerkettigen als auch der normalen Fragmente, im Vergleich zu der Messung ohne Helium erkennen. Zudem findet man auch hier fast nur a-Fragmente.

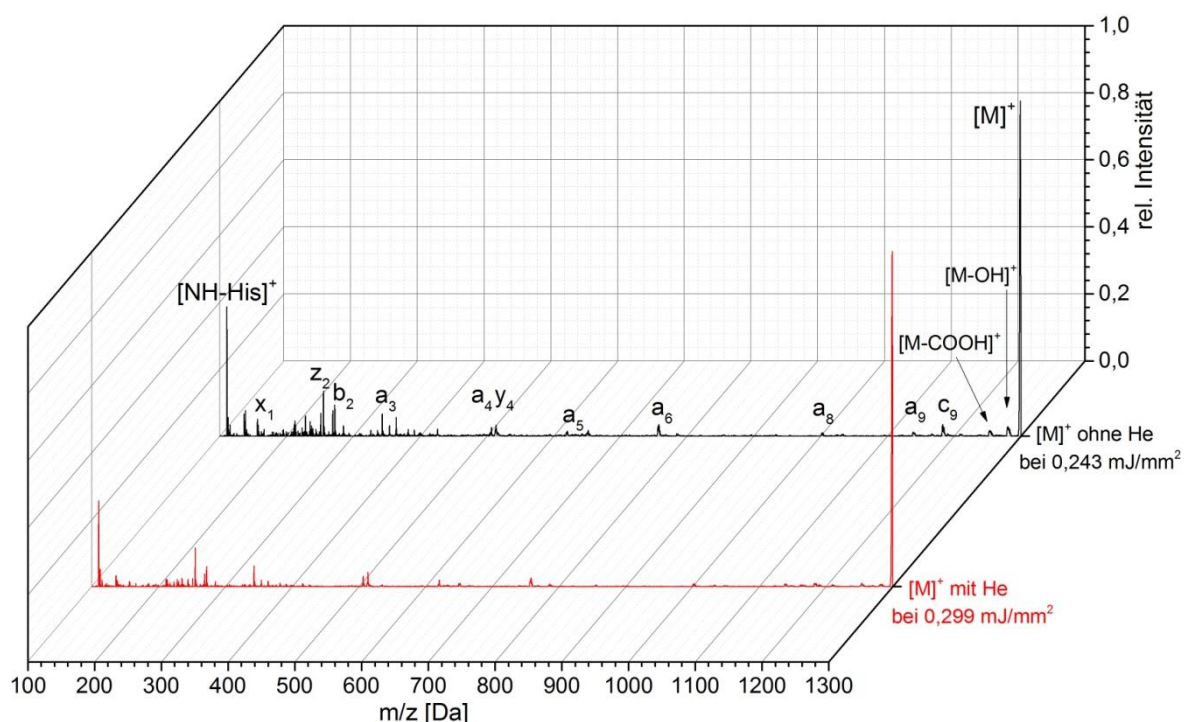


Abbildung 95: Laserfragmentierung von  $[\text{Angiotensin I}]^+$  mit und ohne Helium bei jeweils einem Laserschuss. Die Spektren wurden jeweils auf  $[\text{M}]^+$  normiert.

Bei  $[\text{M}]^{2+}$  hingegen treten im Spektrum mit Helium neue Fragmente auf, die im Spektrum ohne Helium nicht zu sehen sind. Diese sind das  $a_9^{2+}$  und  $b_9^{2+}$  sowie das  $y_3$ -Fragment. Besonders das Vorhandensein der zweifachgeladenen Fragmente im Spektrum mit Helium lässt vermuten, dass die Weiterfragmentierung nach dem *ladder*-Modell durch das Helium unterbunden wird. Während der Fragmentierungskaskade kann das Ion weiter durch das Helium gekühlt werden, weshalb das zweifachgeladene Fragment durch den Kühleffekt am weiteren Zerfall gehindert wird. Interessant ist die Tatsache, dass die prozentuale Abnahme der Muttermasse relativ gleich bleibt, was zeigt, dass die erste Fragmentierung schnell ist und erst die Nachfolgenden langsam.

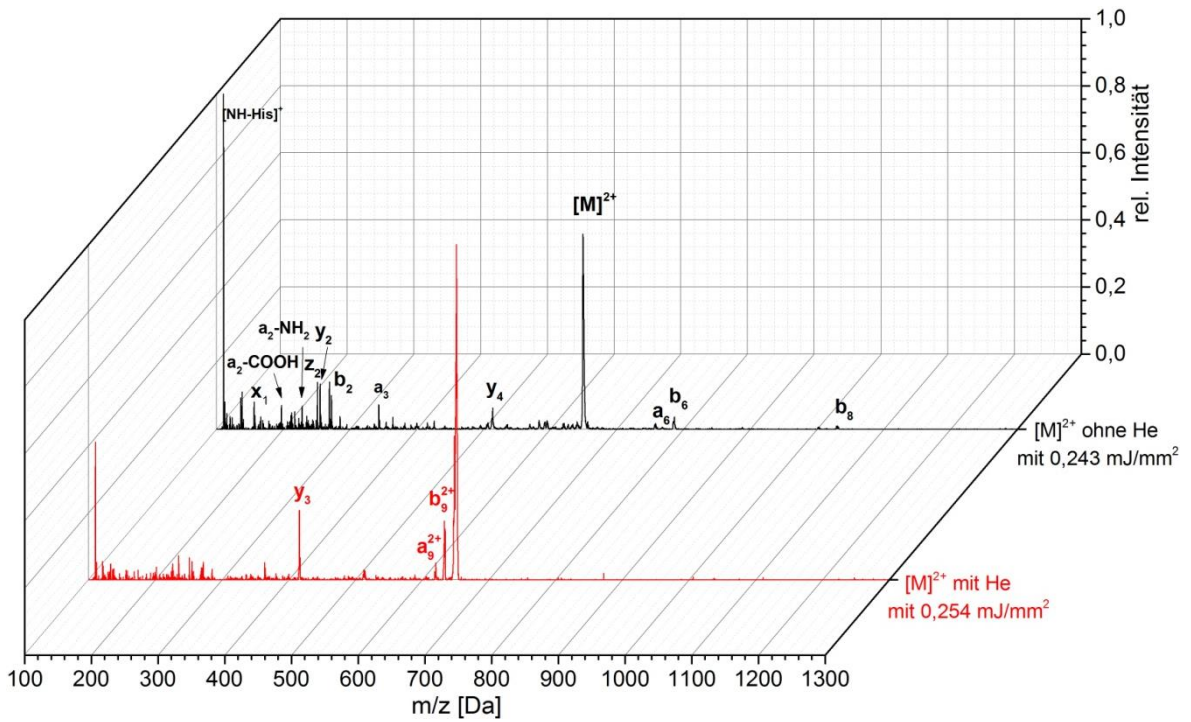


Abbildung 96: Laserfragmentierung von [Angiotensin I]<sup>2+</sup> mit und ohne Helium bei jeweils einem Laserschuss. Die Spektren wurden auf das jeweils höchste Signal normiert.

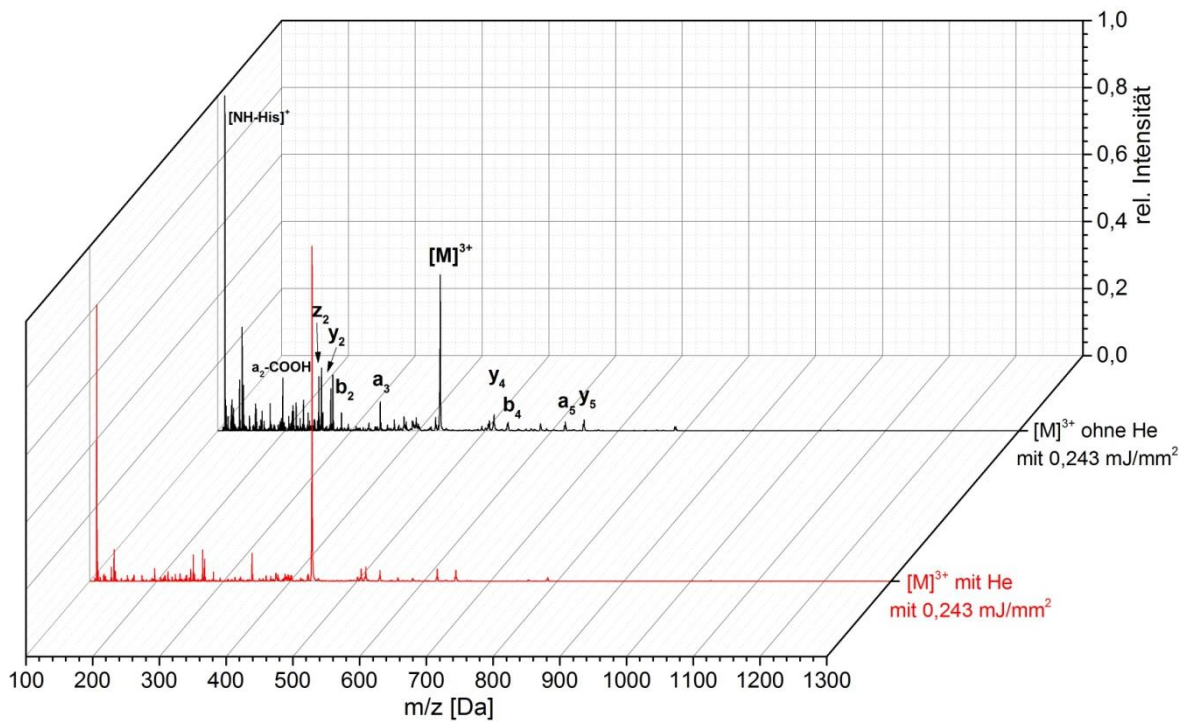


Abbildung 97: Laserfragmentierung von [Angiotensin I]<sup>3+</sup> mit und ohne Helium bei jeweils einem Laserschuss. Die Spektren wurden auf das jeweils höchste Signal normiert.

Die Muttermasse beim Dreifachgeladenen nimmt bei der Messung ohne Helium deutlich mehr ab als bei der Messung mit Helium. Dies bedeutet, dass ein Teil der primären Zerfälle langsam ist. Zudem ist beim Dreifachgeladenen unter beiden Messbedingungen die Art der Fragmente gleich, wobei die Intensitäten dieser bei der Messung mit Helium deutlich niedriger sind.

Auch beim Vierfachgeladenen nimmt die Muttermasse deutlich stärker bei der Messung ohne Helium ab als bei der Messung mit Helium. Auch hier gibt es also Zerfälle, die verzögert ablaufen. Was dort auffällt, ist die Bildung von neuen Fragmenten bei der Messung mit Helium. Dies deutet wieder auf Fragmentierungsmechanismen hin, die bei gegebener Energie in einer kurzen Zeit ablaufen können. Ist die Zeit bis zur Kühlung länger, so wie es bei der Messung ohne Helium der Fall ist, kann eine Dissoziation auch durch die komplizierteren Fragmentierungsmechanismen entstehen oder aber die Fragmente weiter fragmentieren.

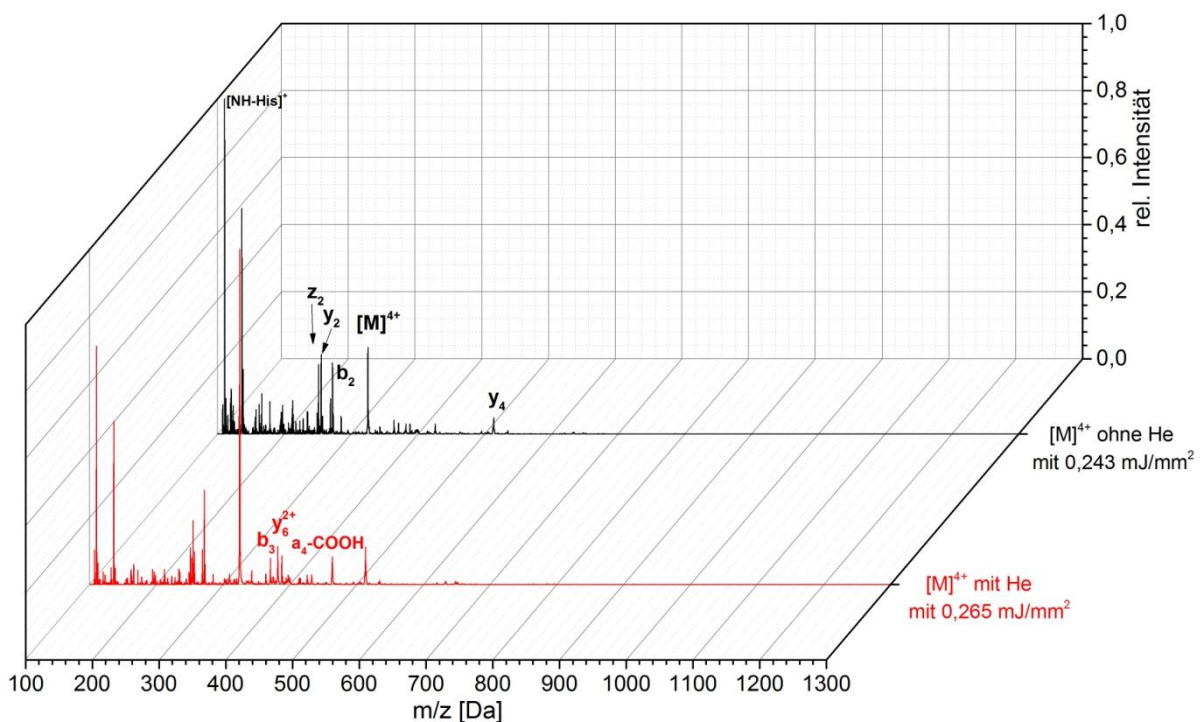


Abbildung 98: Laserfragmentierung von  $[Angiotensin I]^{4+}$  mit und ohne Helium bei jeweils einem Laserschuss. Die Spektren wurden auf das jeweils höchste Signal normiert.

Im Vergleich der Fragmente zwischen den einzelnen Ionen kann man ein zusätzliches Muster erkennen. Werden bei  $[M]^+$  überwiegend die a-Fragmente gebildet, so kommen bei  $[M]^{2+}$  zusätzlich b-Fragmente hinzu. Im Spektrum des Dreifachgeladenen werden die a-Fragmente weniger und die b- und y-Fragmente treten in den Vordergrund. Beim  $[M]^{4+}$  kann man kein Muster mehr erkennen, da sich trotz Helium auch viele innerkettige Fragmente bilden. Diesen Trend zeigt sich im Übrigen auch beim Angiotensin II und zeugt von den komplizierter werdenden Fragmentierungskaskaden.

#### 4.3.4.3 Die Kombinierte Laser- und Stoßfragmentierung des Angiotensin I

Führt man eine kombinierte Laser- und Stoßfragmentierung durch, so wirkt sich dies besonders stark auf das einfachgeladene Angiotensin I aus.

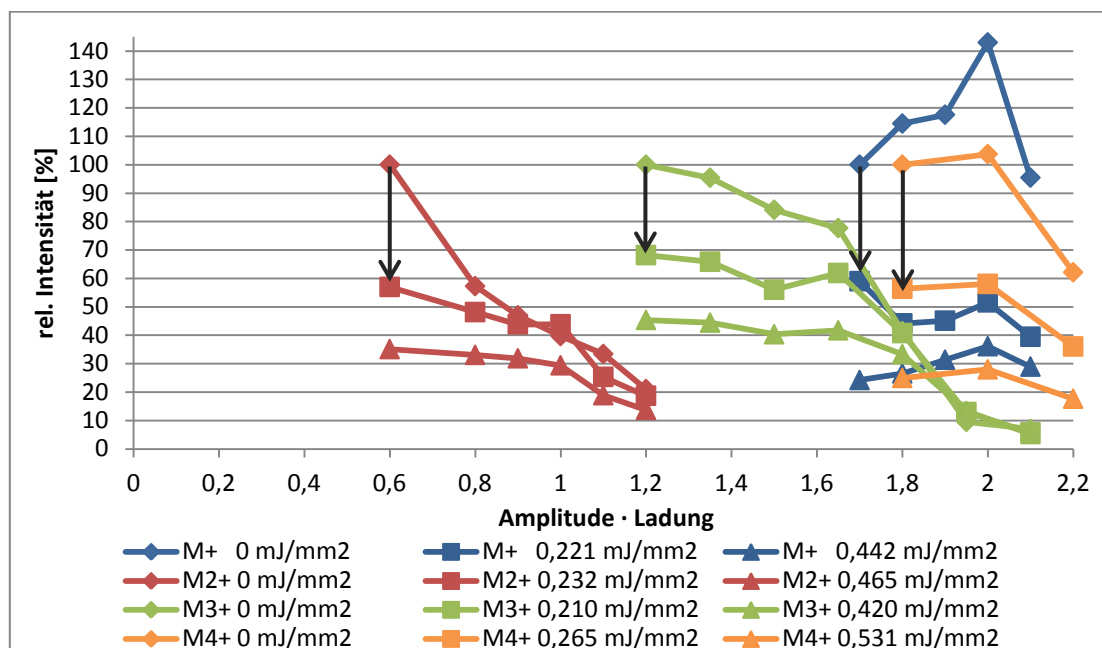


Abbildung 99: Prozentuale Abnahme der einzelnen Muttermassen bei der jeweiligen Amplitude und ohne, mit einem oder mit zwei Laserschüssen zusätzlich.

Schon bei einer Amplitude von 1,8, bei der  $[M]^+$  unter normalen Stoßfragmentierungsbedingungen kaum fragmentiert, findet nach der Laseranregung eine Abnahme der Muttermasse um 40% statt. Bei der Laserfragmentierung mit Helium waren es gerade einmal 20% der Ionen. Auch beim zweiten Laserschuss fragmentieren wieder fast 40% von den verbleibenden Ionen. Dies zeigt deutlich, dass diese Methode für die Dissoziation von großen einfachgeladenen Molekülen gut funktioniert. Für die Mehrfachgeladenen ist der Kombinationseffekt nicht zu erkennen, da die prozentuale Abnahme bei nur 40% liegt. Bei der Lasermessung mit Helium waren es 70-90%. Dies kann möglicherweise durch einen stärkeren Kühleffekt durch die Erhöhung der Stoßzahl des Heliums mit dem Ion für die Mehrfachgeladenen verursacht werden. Andererseits könnte es auch sein, dass durch das Schütteln die Ionen so stark ausgelenkt werden, sodass sie sich nicht mehr im Fokus des Lasers befinden und somit einfach nicht mehr getroffen werden. Eine systematische Benachteiligung höherer Ladungszahlen ist aber hier nicht erkennbar, sodass eher der stärker werdende Kühleffekt dafür verantwortlich ist. Für die höher geladenen Moleküle ist diese Kombinationsmethode deshalb nicht besonders gut geeignet, da sie keine Vorteile zeigt.

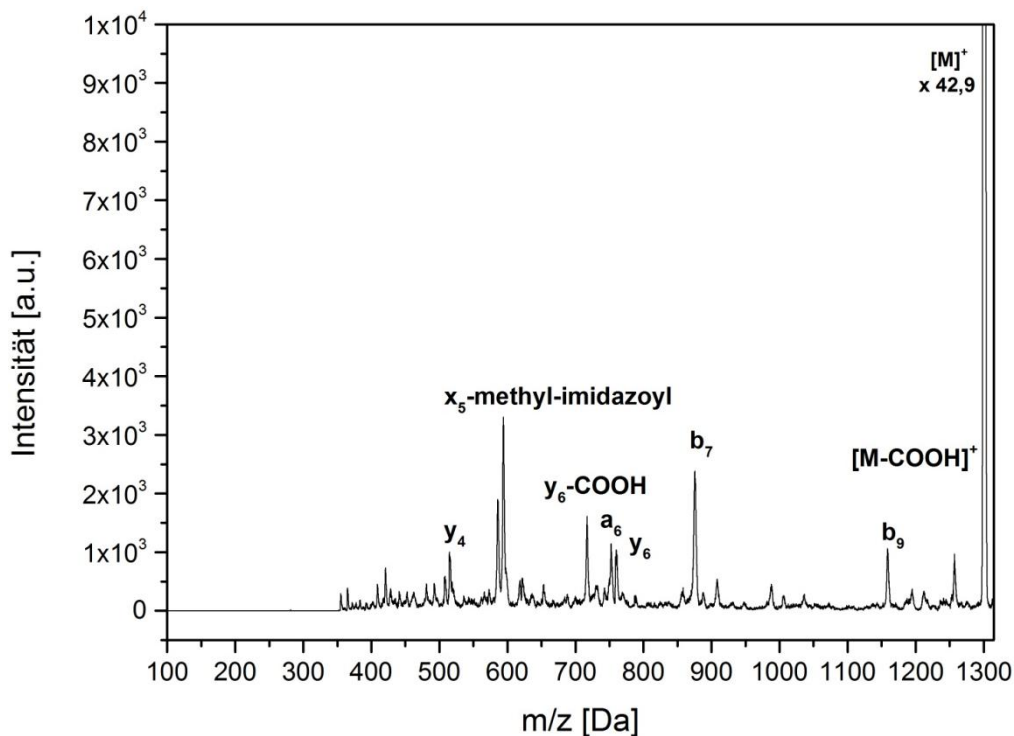


Abbildung 100: Kombinierte Laser- und Stoßfragmentierung vom einfachgeladenen Angiotensin I. Das Spektrum zeigt die Fragmentierung bei einer Amplitude von 1,7 und einer Laserenergie von  $0,221 \text{ mJ/mm}^2$  (bei einem Schuss).

In Abbildung 100 ist das Spektrum der kombinierten Laser-Stoßfragmentierung vom einfachgeladenen Angiotensin I bei einer Amplitude von 1,7 und einem Laserschuss zu sehen. Im Vergleich zur reinen Laserfragmentierung mit Helium sind hier nicht die a-Fragmente die bevorzugt gebildeten Fragmente. Es entsteht eher eine Kombination aus b- und y-Fragmenten. Entgegen der Vermutung, dass durch die kombinierte Laser- und Stoßfragmentierung ein größeres Spektrum an Fragmenttypen entsteht, sieht man hier zwar andere Fragmente als bei der Laserfragmentierung mit Helium, allerdings sind diese in ihrer Intensität sehr schwach. Obwohl der Vergleich der prozentualen Abnahmen der Muttermasse bei der Laserfragmentierung mit Helium und bei der kombinierten Laser- und Stoßfragmentierung einen deutlichen Vorteil für die kombinierte Laser- und Stoßfragmentierung gezeigt hat, bestätigt sich dies in der Vielfalt des Fragmentspektrums leider nicht. Allerdings darf nicht vergessen werden, dass bei jeder Art von Stoßfragmentierung eine untere Massengrenze angelegt werden muss, damit diese zu isolierende Masse auf ihrer Flugbahn noch stabil bleibt. Diese liegt beim Angiotensin I bei  $350 \text{ m/z}$ . Für die kleineren Fragmente, die entstehen können, bedeutet dies, dass sie wegen ihres  $m/z$ -Verhältnisses nicht detektiert werden. Deshalb kann es durchaus sein, dass die sich bildenden kleinen Fragmente bei der Laser-Stoß-Fragmentierung nicht beobachtet werden können. Dies ist ein großer Nachteil für die Sequenzanalyse mit dieser Methode.

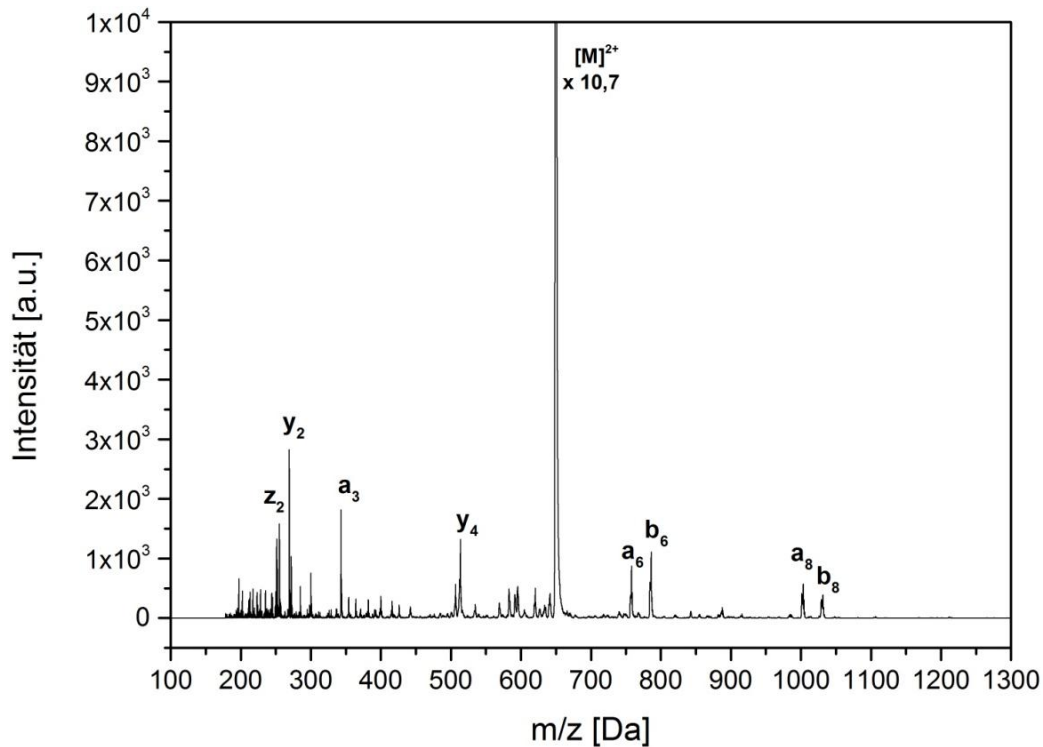


Abbildung 101: Kombinierte Laser- und Stoßfragmentierung vom zweifachgeladenen Angiotensin I. Das Spektrum zeigt die Fragmentierung bei einer Amplitude von 1,2 und einer Laserenergie von  $0,232 \text{ mJ/mm}^2$  (bei einem Schuss).

Beim Zweifachgeladenen kann man im Massenspektrum mit Laser-Stoßfragmentierung schon mehr Fragmente im Vergleich zur Laserfragmentierung mit Helium erkennen, allerdings ist auch hier die Intensität dieser Fragmente klein. Da die untere Massengrenze hier bei  $180 \text{ m/z}$  liegt und das Zweifachgeladene bei der kombinierten Laser- und Stoßfragmentierung generell viel schlechter fragmentiert als bei der reinen Laserfragmentierung mit Helium, ist die relativ niedrige Fragmentintensität in Abbildung 101 vermutlich auf die hohe Stoßfrequenz des Heliums und damit dem größeren Kühleffekt zurückzuführen.

Ein ähnliches Verhalten kann man bei  $[M]^{3+}$  und  $[M]^{4+}$  erkennen. Allerdings steigt hier die Intensität der Fragmente im Vergleich zum Zweifachgeladenen an, da wegen der geringeren Dissoziationsenergiebarriere durch die Coulombabstoßung auch die Fragmentierungsrate größer wird, sodass der Kühleffekt nicht mehr so stark wirkt.

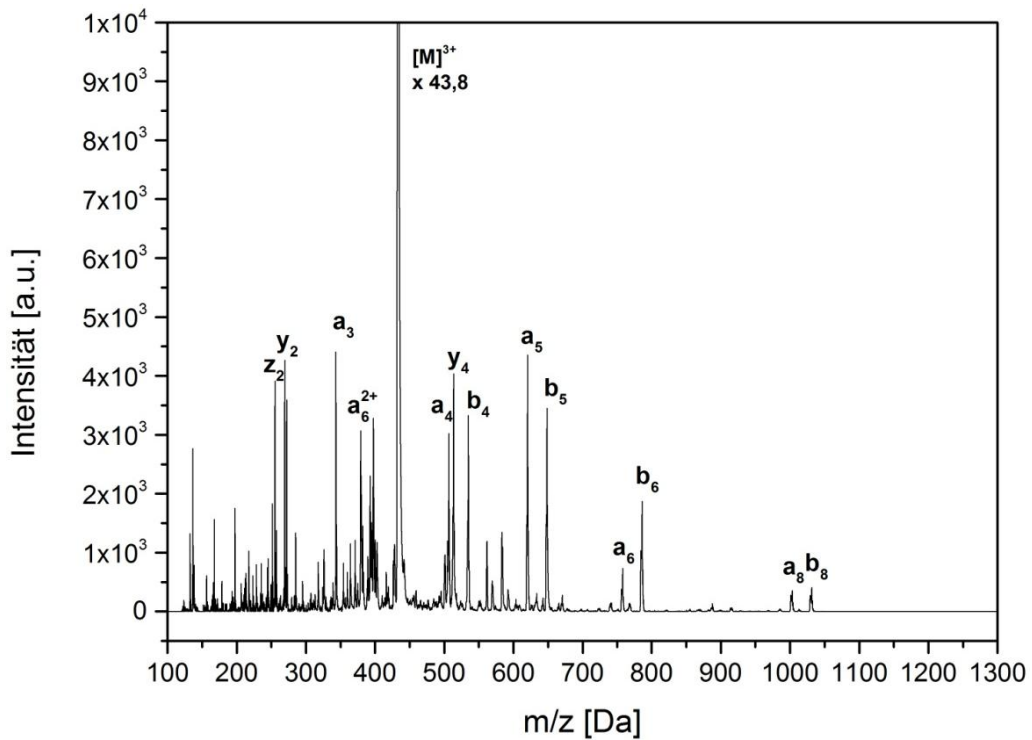


Abbildung 102: Kombinierte Laser- und Stoßfragmentierung vom dreifachgeladenen Angiotensin I. Das Spektrum zeigt die Fragmentierung bei einer Amplitude von 1,2 und einer Laserenergie von  $0,21 \text{ mJ/mm}^2$  (bei einem Schuss).

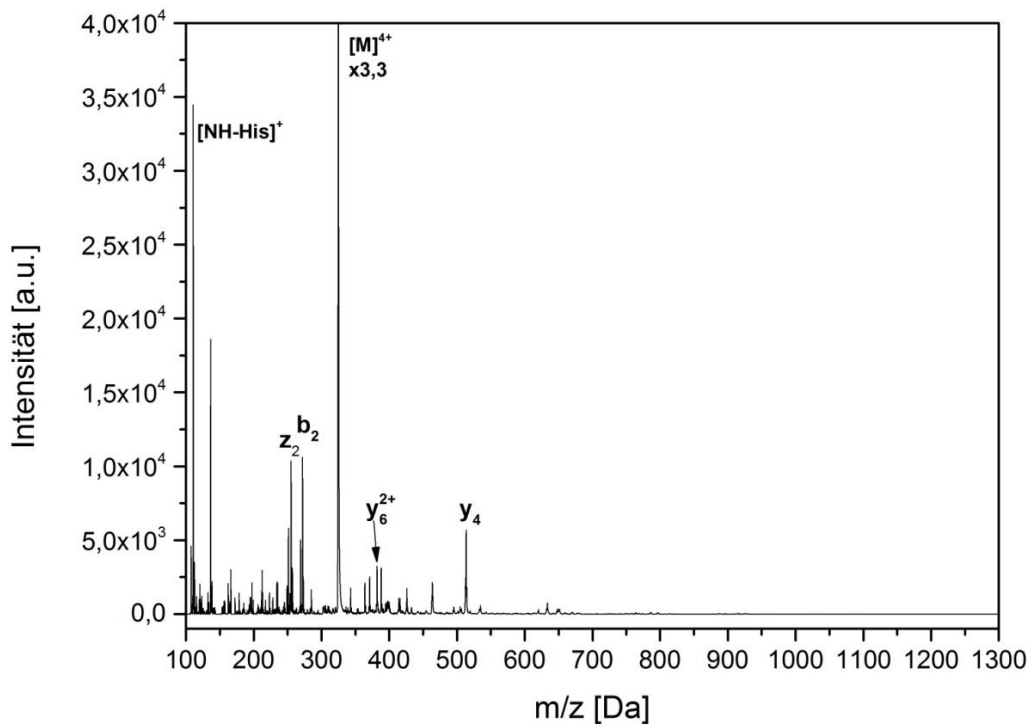


Abbildung 103: Kombinierte Laser- und Stoßfragmentierung vom vierfachgeladenen Angiotensin I. Das Spektrum zeigt die Fragmentierung bei einer Amplitude von 1,8 und einer Laserenergie von  $0,265 \text{ mJ/mm}^2$  (bei einem Schuss).

#### 4.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus stoß- und photoinduzierter Anregung

Zusammengefasst kann man durch den Vergleich der verschieden geladenen Muttermassen eines Moleküls zueinander sowohl für die Stoß- als auch für die Laserfragmentierung die Hintergründe für die relativen Dissoziationseffekte finden.

Bei der Stoßfragmentierung kann die Reihenfolge der Dissoziation bei fast allen hier untersuchten Substanzen mit dem mehr oder minder eingeschränkten Protonentransfer erklärt werden (Tabelle 8). Da die Ionen durch den Schüttelmechanismus langsam an ihre Dissoziationsschwelle herangeführt werden, spielt die durch die Coulombabstoßung herabgesenkte Zustandsdichte zunächst keine Rolle. Jedoch ist diese Methode sensitiv für die energetischen Stufen, die das Proton wegen der verschiedenen Gasphasenbasizitäten der Aminosäuren überwinden muss. Die Absenkung der Bindungsenergie um ca. 3,2 eV durch die Anlagerung eines Protons (Abbildung 24, S.60) scheint ebenfalls einen großen Effekt zu machen. Wird das Proton in seiner Wanderung durch die Coulombkraft oder aber durch die große Gasphasenbasizität des Arginins gehindert, so findet keine Herabsetzung der Bindungsenergie in der Peptidbindung statt und somit wird mehr Energie zur Fragmentierung benötigt. Bei Angiotensin II fragmentieren zwar die Mehrfachgeladenen gegenüber dem Einfachgeladenen besser, jedoch fragmentiert  $[M]^{3+}$  im Vergleich zu  $[M]^{2+}$  schlechter. Bei Angiotensin I ist dieser Effekt noch deutlicher. Es lässt sich auch bei den Ladungseffekten keine Reihung finden. Trotz der vier Ladungen im Molekül benötigt  $[M]^{4+}$  ungefähr genauso viel Energie wie  $[M]^+$ . Eine Ausnahme ist die Reihenfolge der Ladungseffekte im Bradykinin. Bei diesem Molekül fragmentiert  $[M]^{2+}$  bei niedrigerer Energie, was vermutlich nur durch die starke Bindung des Protons an beide Guanidin-Gruppen beim Einfachgeladenen erklärt werden kann.

Für die photoinduzierte Fragmentierung steht sowohl bei den Messungen ohne Helium als auch mit Helium die Coulomb-reduzierte Dissoziationsenergie und die Reduktion der Zustandsdichte als Fragmentierungsgrund im Vordergrund (Tabelle 8). Da mit 193 nm-Anregung innerhalb eines Laserpulses mehrere Photonen in das Molekül gebracht werden können, kann das Molekül am Ende dieses Laserpulses so viel Energie erhalten, dass es deutlich über der Dissoziationsschwelle liegt und schnell fragmentiert. Dadurch ist diese *high-energy* Methode nicht empfindlich gegenüber den energetischen Stufen der Gasphasenbasizität, sodass der dadurch eingeschränkte Protonentransfer kein Hindernis darstellt. Zudem kann durch die Absorption der Peptidbindung die Energie statistisch in die Peptidbindungen eingebracht werden. Eine Ausnahme bildet hierbei Bradykinin, da dieses aufgrund des schnellen  $NH_3$ -Verlust-



kanals beim Einfachgeladenen auch bei niedriger Energie fragmentieren kann als das Zweifachgeladene. Bei der Messung von Angiotensin I mit Helium kann man den Grund für die Reihenfolge der Mehrfachgeladenen ( $I_F(M^{2+}) > I_F(M^{4+}) > I_F(M^{3+})$ ) nicht mehr eindeutig zuordnen. Wahrscheinlich fragmentieren  $[M]^{4+}$  und  $[M]^{3+}$  aufgrund der gehemmteren Protonenwanderung schlechter als  $[M]^{2+}$ . Dass  $[M]^{4+}$  aber besser fragmentiert als  $[M]^{3+}$  liegt vermutlich dann an der durch die Coulombabstoßung stark reduzierten Dissoziationsenergie bzw. der stark reduzierten Zustandsdichte.

Bei der Betrachtung der entstehenden Fragmente konnte der sequenzielle Zerfall von Fragmenten nach dem *ladder*-Modell eindeutig aufgezeigt werden. Am Beispiel des Bradykinins wurde dies für das  $y_8$ -Fragment sehr deutlich (Abbildung 69, S.111 und Abbildung 71, S.113). Dieses bildete sich bei den Messungen mit Helium. Ohne den Kühleffekt des Heliums ist das  $y_8$ -Fragment offensichtlich weiterfragmentiert. Den gleichen Effekt kann man auch bei LWMR für das  $z_3$ -Fragment (Abbildung 59 und Abbildung 60, S.100f.) in kleinerem Ausmaß erkennen.

Tabelle 8: Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse. Gezeigt sind die Reihenfolgen der relativen Intensitätsabnahmen der verschiedenen geladenen Mutterionen eines Moleküls zueinander sowohl für die Stoß- als auch für die Lasermessungen. Zusätzlich ist noch einmal der Grund für dieses Verhalten aufgeführt.

<b>Molekül</b>	<b>Reihenfolge Stoßfragmentierung</b>	<b>Grund</b>
LWMR	$I_F(M^+) > I_F(M^{2+})$	Eingeschränkter Protonentransfer
Bradykinin	$I_F(M^{2+}) > I_F(M^+)$	Coulomb-reduzierte Dissoziationsenergie
Angiotensin II	$I_F(M^{2+}) > I_F(M^{3+}) > I_F(M^+)$	Eingeschränkter Protonentransfer
Angiotensin I	$I_F(M^{2+}) > I_F(M^{3+}) > I_F(M^{4+}) \approx I_F(M^+)$	Eingeschränkter Protonentransfer

<b>Molekül</b>	<b>Reihenfolge Laserfragmentierung ohne Helium</b>	<b>Grund</b>
LWMR	$I_F(M^{2+}) > I_F(M^+)$	Coulomb-reduzierte Dissoziationsenergie/Zustandsdichte
Bradykinin	$I_F(M^+) > I_F(M^{2+})$	Schneller $NH_3$ -Verlustkanal
Angiotensin II	$I_F(M^{3+}) > I_F(M^{2+}) > I_F(M^+)$	Coulomb-reduzierte Dissoziationsenergie/Zustandsdichte
Angiotensin I	$I_F(M^{4+}) > I_F(M^{3+}) > I_F(M^{2+}) > I_F(M^+)$	Coulomb-reduzierte Dissoziationsenergie/Zustandsdichte

<b>Molekül</b>	<b>Reihenfolge Laserfragmentierung mit Helium</b>	<b>Grund</b>
LWMMR	$I_F(M^{2+}) > I_F(M^+)$	Coulomb-reduzierte Dissoziationsenergie/Zustandsdichte
Bradykinin	$I_F(M^+) > I_F(M^{2+})$	Schneller $NH_3$ -Verlustkanal
Angiotensin II	$I_F(M^{3+}) > I_F(M^{2+}) > I_F(M^+)$	Coulomb-reduzierte Dissoziationsenergie/Zustandsdichte
Angiotensin I	$I_F(M^{2+}) > I_F(M^{4+}) > I_F(M^{3+}) > I_F(M^+)$	Eingeschränkter Protonentransfer

## **4.4 Auswirkung der Multiphotonenanregung – Bestimmung der Zahl an absorbierten Photonen**

Da man davon ausgehen kann, dass besonders bei den großen Molekülen die Absorption von nur einem Photon nicht mehr für eine Dissoziation ausreicht, stellte sich die Frage, ob man die Anzahl an absorbierten Photonen, die für eine Dissoziation benötigt werden, experimentell bestimmen kann. Dazu musste allerdings zunächst geklärt werden, welche und wie viele Stellen in einer Peptidkette durch die verwendete Wellenlänge absorbieren können.

### **4.4.1 Aufklären von Absorptionsstellen bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 193 nm**

Die Gasphasenmessung von N-Methylacetamid (vgl. Kapitel 4.1) legt nahe, dass die Peptidbindung im Wellenlängenbereich von 193 nm absorbiert. Bei Anregung einer Peptidkette, die mehrere Peptidbindungen besitzt, liegt also ein Multichromophorensystem vor. Allerdings weiß man zunächst nicht, wie groß die Anregungswahrscheinlichkeit einer Peptidbindungsstelle ist. Was ebenfalls geklärt werden muss, ist die Frage, ob es neben den Peptidbindungsstellen noch weitere Absorptionsstellen in einer Peptidkette gibt und man somit zusätzliche Chromophore erhält. Da eine Peptidkette neben der Peptidbindungsstelle beispielsweise auch aromatische Seitenketten tragen kann, muss überprüft werden, ob diese auch bei 193 nm absorbieren können. Frühere Untersuchungen mittels Flüssigphasen-UV-VIS-Spektroskopie von Tryptophan und Tyrosin deuten zwar auf eine Absorption in diesem Wellenlängenbereich hin [155], jedoch wurde dies für die Wellenlänge 193 nm noch nicht explizit gemessen. Weiterhin wurde noch nicht geklärt, ob durch die Protonierung die Moleküleigenschaften dahingehend verändert werden, sodass die Protonierungsstelle ebenfalls als Chromophor dienen könnte. Dies ist besonders für mehrfachprotonierte Systeme wichtig. Falls diese Stellen ebenfalls absorbieren können, stellt sich auch hier die Frage, wie groß ihre Anregungswahrscheinlichkeiten sind, ob sie sich bei einer Protonierung ändern und wie groß diese Werte im Vergleich zur Absorption der Peptidbindung stehen.

Da eine solche Untersuchung für protonierte Systeme aus der Literatur nicht bekannt ist, musste hier zunächst eine geeignete Methode für die Untersuchung gefunden werden.

#### **4.4.2 Konzentrationsabhängige Untersuchung an Modellsubstanzen mit Hilfe von Flüssigphasen-UV-VIS-Spektroskopie**

Da man mit dem Gasphasenexperiment aus Kapitel 4.1 nur Neutrale untersuchen kann, wurde zunächst versucht, durch pH-Wert-abhängige Flüssigphasen-UV-VIS-Messungen eine Aussage über die Absorption von Protonierungsstellen und aromatischen Seitenketten bei 193 nm zu erlangen.

Allerdings muss gerade bei der zu untersuchenden Wellenlänge auf einiges geachtet werden, damit mehrheitlich nur die Probe absorbiert:

- Die verwendeten Küvetten müssen im UV-Bereich unter 200 nm noch durchlässig sein.
- Das Lösungsmittel muss in diesem Bereich UV-durchlässig sein.
- Die verwendeten Säuren und Laugen dürfen in diesem Bereich nicht absorbieren.

Für die Differenzmessungen wurde ein angepasstes Paar an Küvetten aus Quarzglas mit 10 mm Durchgang gewählt. Als Lösungsmittel hat nur Wasser eine gute Transmission in dem vorgegebenen UV-Bereich. Da ein Zweistrahl-Spektrometer verwendet wurde, kann die Restabsorption des Wassers durch die entsprechende Referenz subtrahiert werden.

Da eine pH-Wert-abhängige Messreihe gemacht werden muss, müssen auch die verschiedenen Säuren und Laugen auf ihre Absorption untersucht werden. Um größere Ionen aus der Lösung fernzuhalten, wurde Natronlauge (0,1M) bzw. Salzsäure (1M) verwendet. Die Absorptionsspektren der verdünnten Lösungen bei pH 1,25 und pH 10,68 sind in Abbildung 104 gezeigt, wobei für alle pH-Messungen ein pH-Meter pH 330 von der Firma WTW benutzt wurde.

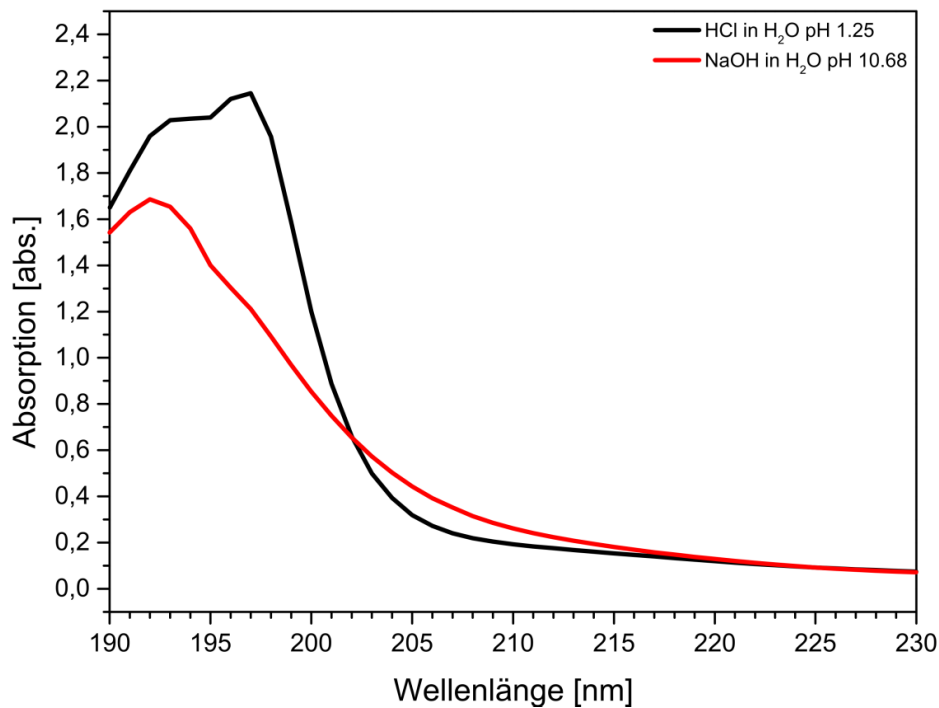


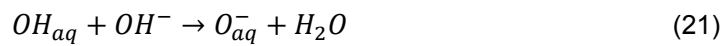
Abbildung 104: Blindproben von HCl und NaOH in Wasser. Für die Messungen wurde der pH-Wert mit HCl oder NaOH eingestellt und als Referenz Wasser verwendet.

Wie man erkennen kann, absorbieren sowohl Salzsäure als auch Natronlauge ab 205 nm zu kleineren Wellenlängen hin. Da sich in der Lösung neben H<sub>2</sub>O nur H<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> bzw. Na<sup>+</sup> und OH<sup>-</sup> befinden, stellt man bei genauerer Betrachtung fest, dass eine Absorption vermutlich nur durch die anwesenden Anionen hervorgerufen werden kann. In polaren Lösungsmitteln kann durch Photoanregung ein kurzlebiger *charge-transfer-to-solvent*-Zustand (CTTS-Zustand) generiert werden, bei dem kurzzeitig ein Elektron des Anions auf das solvatisierende Molekül übertragen wird [156]. Dabei bewegt sich die Übertragung des Elektrons in einem Zeitbereich von mehreren Femto- bis Picosekunden [157]. Die CTTS-Zustände wurden erstmals in den 1960er Jahren entdeckt, jedoch aufgrund von fehlenden technischen Voraussetzungen nur für Wellenlängen größer als 350 nm untersucht [158,159]. Im Laufe der Jahre und durch die verbesserte Technik konnte gefunden werden, dass gerade Halogenide und Hydroxid-Ionen diesen Zustand bei Wellenlängen von 200 nm oder aber auch 193 nm erreichen können [156,157,160,161].

Für OH<sup>-</sup>-Ionen wurden beispielsweise folgende Reaktionsmechanismen gefunden [156]:



Für Lösungen mit einem pH-Wert größer 10 können noch zusätzlich zur Rückreaktion Konkurrenzreaktionen auftreten:



Für die weiteren Messungen bedeutet dies, dass man versuchen muss, die Konzentration der Anionen klein zu halten und/oder durch die entsprechende Cl<sup>-</sup>- bzw. OH<sup>-</sup>-Konzentration in der Referenzprobe die Absorption der Anionen zu differenzieren.

Für die Untersuchung der Absorptionsstellen mittels UV-VIS-Spektroskopie wurden neben Glycin auch Methylamin und das Dipeptid Arg-Arg als Modellsubstanzen verwendet. Ziel dieser Messungen war es, einen Unterschied in den Absorptionsspektren bei verschiedenen pH-Werten zu entdecken und somit Rückschlüsse auf eine Veränderung der Anregungswahrscheinlichkeit durch das Proton zu erhalten.

Arg-Arg wurde als Modellsubstanz gewählt, da es insgesamt drei Protonierungsstellen besitzt und man sich erhofft hat, einen Unterschied zwischen einer und zwei Protonierungen im UV-VIS-Spektrum zu erkennen. Arg besitzt seinen isoelektrischen Punkt bei pH 10,76 und drei pK<sub>s</sub>-Werte bei pH 2,17, pH 9,04 und pH 12,84 (Guanidin-Gruppe) [162]. In diesem Experiment entstand durch das Lösen des Arg-Arg in Wasser ein pH-Wert von 6,0. Ausgehend von diesem Wert wurden die Lösungen für die pH-Wert-Messungen anschließend angesäuert oder mit Lauge versetzt um den gewünschten pH-Wert zu erhalten.

Um möglichst nur die Absorption der Protonierungsstelle zu erhalten, wurde Glycin als Modellsubstanz gewählt. Es ist neutral und sein isoelektrischer Punkt liegt bei pH 5,97, wobei es seine pK<sub>s</sub>-Werte bei pH 2,34 und pH 9,60 hat [162]. In reinem Wasser entstand durch Zugabe des Glycins ein pH-Wert von 5,9.

Als drittes wurde Methylamin als Testsubstanz gewählt, da es nur eine NH<sub>2</sub>-Gruppe trägt und es somit entweder nur protoniert oder neutral vorliegen kann. Ohne Zusatz von Säure oder Lauge besaß die Lösung einen pH-Wert von 10,4.

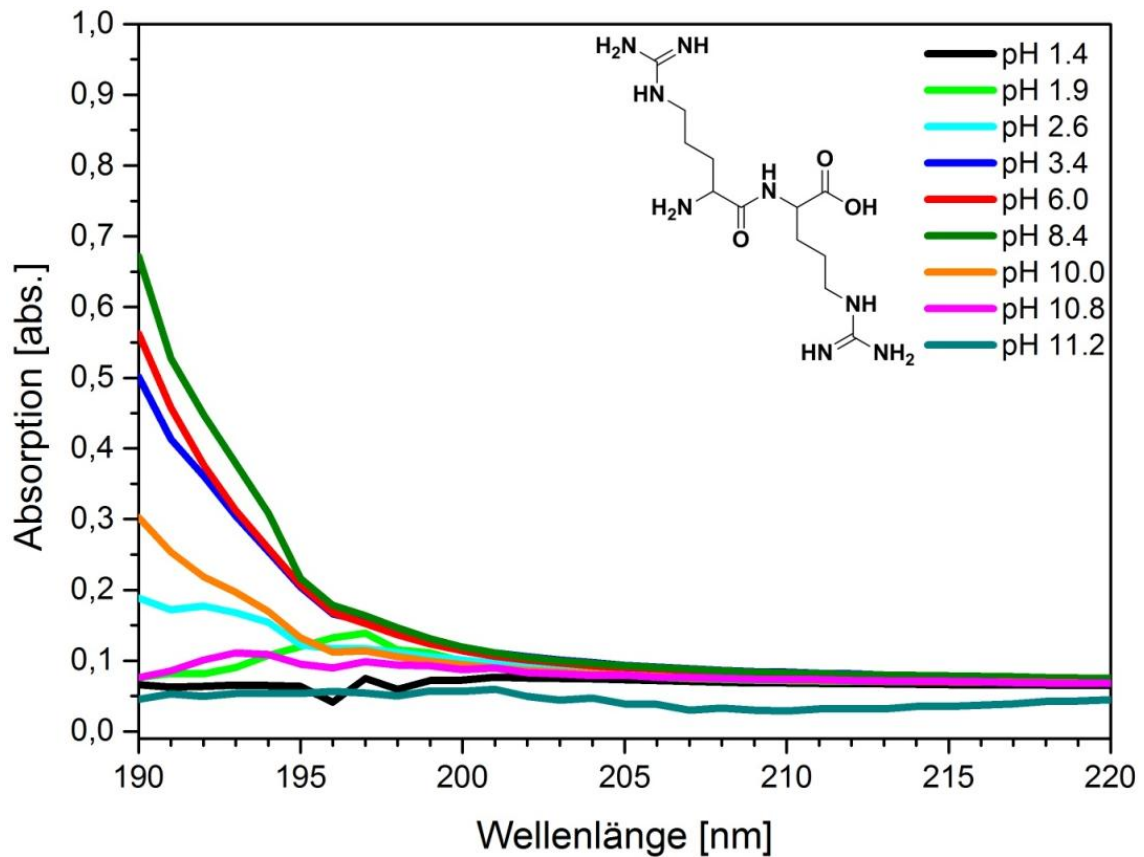


Abbildung 105: UV-VIS-Spektren von Arg-Arg in Wasser bei unterschiedlichen pH-Werten. Ohne Zusatz von Säure oder Lauge besaß die Lösung einen pH-Wert von 6,0. Von diesem Wert ausgehend wurde für die weiteren pH-Wert-Messungen Säure oder Lauge hinzugegeben. Je weiter man sich vom pH-Wert 8,4 entfernt, desto geringer wird die Absorption in beiden Richtungen. Dieser Effekt ist allerdings auf die Absorption der Säure bzw. Lauge zurückzuführen, die die Absorption des Peptids überlagert und durch die Referenz heraus gerechnet wird.

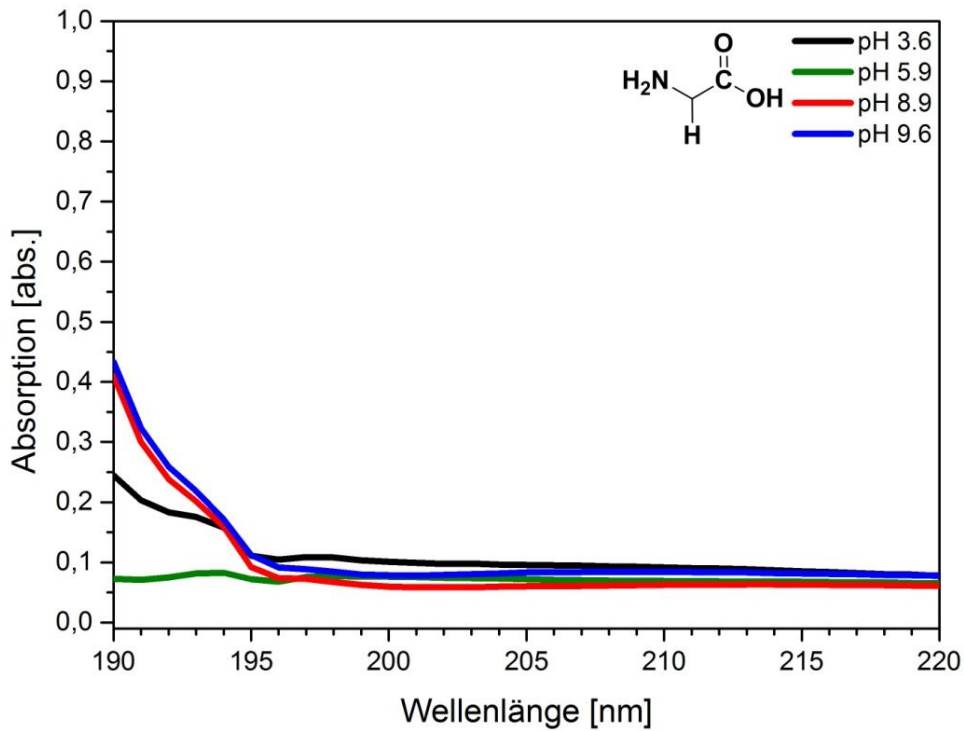


Abbildung 106: UV-VIS-Spektren von Glycin bei unterschiedlichen pH-Werten. Glycin zeigt ohne Zusatz von Säure oder Lauge bei pH 5,9 fast keine Absorption, während bei allen anderen pH-Werten, bei denen Säure oder Lauge hinzugegeben wurde, eine Absorption zu erkennen ist.

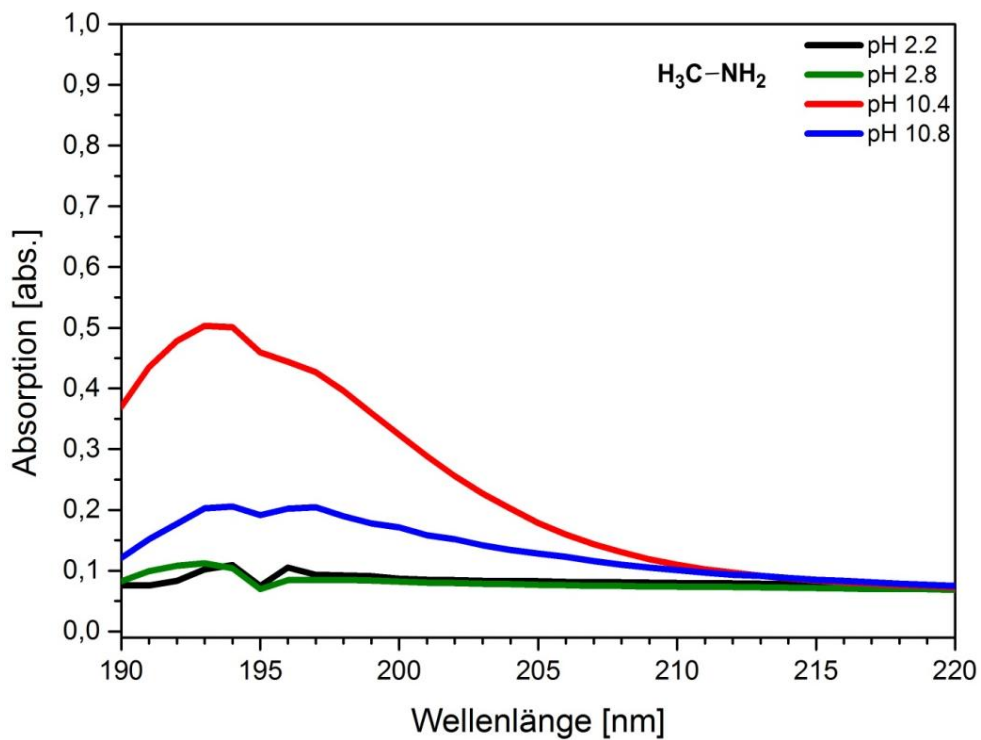


Abbildung 107: UV-VIS-Spektren von Methylamin bei unterschiedlichen pH-Werten. Auch hier ist die Absorption ohne Zusatz von Säure oder Lauge bei pH 10,4 am stärksten, während sie bei den übrigen pH-Werten abnimmt.



In Abbildung 105 sind die UV-VIS-Spektren von Arg-Arg bei verschiedenen pH-Werten gezeigt. Man kann erkennen, dass eine Absorption im untersuchten Wellenlängenbereich um den Bereich von pH 6 am intensivsten ist und sowohl Richtung pH 0 als auch Richtung pH 14 abnimmt. Da für die sauren Lösungen HCl und für die alkalischen Lösungen NaOH hinzugegeben wurde, für die Lösung bei pH 6 aber kein Zusatz erfolgte, muss dieser Effekt an der Absorption der  $\text{Cl}^-$ - bzw.  $\text{OH}^-$ -Ionen liegen. Je mehr von der Säure bzw. der Lauge hinzugegeben wurde, desto stärker wurde deren Absorption, sodass sich diese mit der Absorptionen des Peptids vermutlich überlagert und durch die Referenzprobe nicht nur die Ionenabsorption sondern auch die Peptidabsorption mit heraus gerechnet wurde. Diesen Effekt kann man auch bei den Messungen für Glycin (Abbildung 106) und Methylamin (Abbildung 107) erkennen. Somit sehen wir keine Möglichkeit, andere mögliche Chromophore im Peptid in diesem Wellenlängenbereich durch UV-VIS-Spektroskopie zu entdecken.

#### 4.4.3 Bestimmung der Absorptionsstellen mittels ESI-MS

Um dennoch eine Aussage über weitere mögliche Absorptionsstellen in der Peptidkette machen zu können, wurde ein Gasphasenexperiment entwickelt, welches mit Hilfe des ESI-MS durchgeführt werden konnte und auf die Messung einer direkten Absorption verzichtet, sondern diese indirekt über die Fragmentierung nachweist.

Da man durch den Aufbau des Strahlengangs sowohl die Fläche des fokussierten Laserstrahls in der Mitte der Ionenfalle als auch die Pulsenergie des Lasers kennt, kann man die Ionen in der Falle anregen und anschließend die Abnahme der Muttermassenintensität messen. Um diese dann in ein Verhältnis zur Absorptionswahrscheinlichkeit zu setzen, müssen allerdings einige Bedingungen erfüllt werden:

- Alle sich in der Falle befindlichen Ionen müssen vom Laser getroffen werden (die Ionenwolke darf vom Durchmesser her nicht größer sein als die Fläche des Lasers).
- Der Laserstrahl muss ungehindert die Falle passieren, sodass man immer von der berechneten Energie und Fläche ausgehen kann.
- Das Probenmolekül muss nach Absorption eines Photons dissoziieren (dies ist für kleine, lineare Moleküle bei 6,4 eV zu erwarten).
- Die Testsubstanzen müssen so gewählt werden, dass sie nur eine definierte Protonierungsstelle und definierte Chromophore besitzen.
- Die Energie des Laserpulses muss bei allen Messungen für verschiedene Testsubstanzen gleich sein.

Da man sich in der Gasphase befindet, liegen alle hier untersuchten Moleküle in protonierter Form vor, sodass im weiteren Verlauf neben der Absorption der Peptidbindung und der möglichen Absorption von Seitenketten auch die Möglichkeit der Absorption durch protonierte Stellen in Betracht gezogen werden muss.

#### **Bestimmung der Ionenwolkengröße**

Zunächst einmal muss sichergestellt sein, dass alle sich in der Falle befindlichen Ionen vom Laserstrahl getroffen werden. Dazu wurde Leu-Leu als Testsubstanz gewählt und die Abnahme der Muttermasse bei verschiedenen Akkumulationszeiten bestimmt. Durch die Variation der Akkumulationszeit kann man den Einlass der Ionen in die Falle und somit die Anzahl der Ionen steuern. Allerdings die Größe der Ionenwolke nicht

allein von der Akkumulationszeit abhängig, sodass man bei den Spektren auch auf die Intensität des jeweiligen Moleküls achten sollte.

Durch die Veränderung der Ionenzahl zeigt sich ein weiterer Effekt. Da die Ionen alle dieselbe Polarität besitzen, stoßen sie sich in der Falle untereinander ab. Gelangen nun mehr Ionen in die Falle so entsteht ein Raumladungseffekt und die Ionenwolke wird größer. Das verändert wiederum die Dichte der Ionenwolke. Diese ist jedoch so gering, dass die Abnahme der Intensität in der Ionenwolke vernachlässigbar ist. Wird die Ionenwolke allerdings vom Durchmesser her zu groß, so kann es sein, dass nicht mehr alle Ionen getroffen werden.

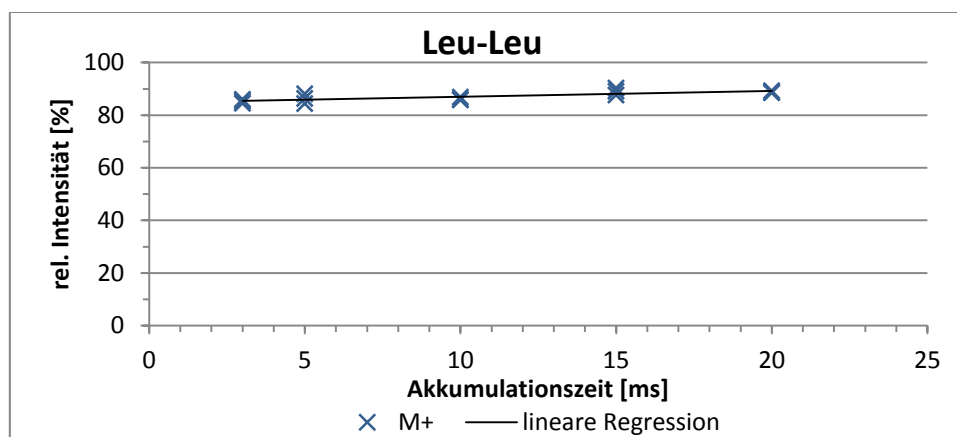


Abbildung 108: Auftragung der relativen photoinduzierten Abnahme der Muttermasse von Leu-Leu in Abhängigkeit der Akkumulationszeit, die mit der Ionenzahl korreliert werden kann. Durch die lineare Regression kann man einen leichten Anstieg der relativen Intensität von 85,2 auf 89,0% erkennen. Die Messungen wurden je dreimal wiederholt.

In Abbildung 108 ist die relative photoinduzierte Abnahme der Muttermasse von Leu-Leu im Verhältnis zur Akkumulationszeit dargestellt. Die Akkumulationszeit kann man hier mit der Anzahl der Ionen in der Falle korrelieren, sodass eine hohe Zeit auch eine große Anzahl an Ionen bedeutet. Die lineare Regression zeigt einen leichten Anstieg von 85,2 auf 89,0%. Das bedeutet, dass auch bei längerem Einlass der Ionen die Ionenwolke zwar größer wird, dennoch vom Laserstrahl praktisch vollständig getroffen wird. Die Zeit wurde nur bis zu einem Wert von 20 ms variiert, da für alle anderen Messungen nie ein größerer Wert eingestellt worden ist.

Bei der Variation der Akkumulationszeit wurde gleichzeitig auf die Intensität der Ionen geachtet. Dabei zeigte sich, dass ab einem Wert von ungefähr  $1 \cdot 10^6$  (a.u.) die Ionenwolke zu groß wurde und somit nicht mehr alle Ionen vom Laser getroffen werden konnten. Bei dem oben genannten und den nun folgenden Experimenten wurde deshalb darauf geachtet, dass die Intensität der Ionen nie zu groß wurde.

## Experimentelle Bestimmung der möglichen Absorptionsstellen

Da man nun eine Abschätzung über die Ionenwolkengröße machen kann, kann man durch weitere Experimente auch Aufschluss über die Anregungsquerschnitte erhalten.

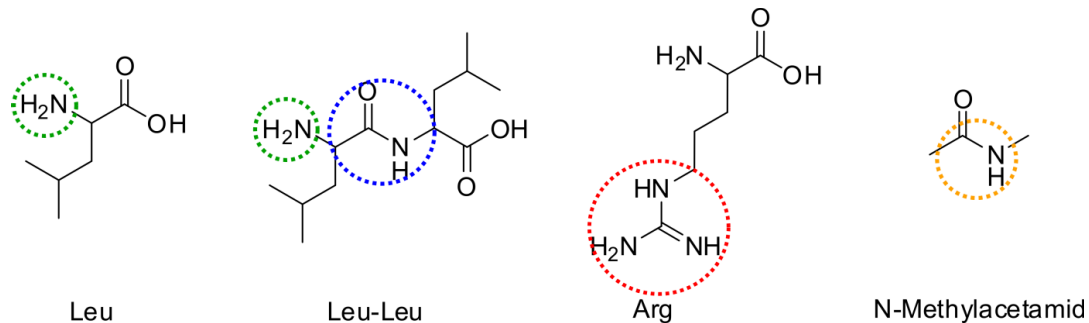


Abbildung 109: Modellsubstanzen für die Messungen von Anregungsquerschnitten. Jeweils grün, rot und gelb umrandet sind die Protonierungsstellen im Molekül, wobei der blaue Kreis die Peptidbindung ohne Protonierung zeigt. Leucin dient als Beispiel für die Absorption einer N-ständiger Protonierung, mit Leu-Leu erhält man die Summe aus der Absorption von N-ständiger Protonierung und der Peptidbindung, Arginin dient als Beispiel für eine Protonierung an der Seitenkette und N-Methylacetamid soll die Absorption einer protonierten Peptidbindung veranschaulichen.

In Abbildung 109 sind die hier verwendeten vier Modellsubstanzen dargestellt, die die möglichen chromophoren Stellen in einer Peptidkette repräsentieren können:

- Der N-Terminus (hier dargestellt durch Leucin)
- Die Peptidbindung (Leu-Leu)
- Die protonierte Peptidbindung (durch mobile Protonen, dargestellt durch N-Methylacetamid)
- Die Guanidin-Seitenkette (Arginin)

Wenn man eine Vorstellung von der Größe der Absorption einer Substanz mit N-ständiger Protonierungsstelle bekommt, so kann man die Absorption einer Peptidbindung mit zusätzlicher N-ständiger Protonierungsstelle in ein Verhältnis zueinander setzen. Ebenso kann man dann auch durch Vergleich der Intensitätsabnahme bei Protonierungen an der Seitenkette oder aber an der Peptidbindung diese in ein Verhältnis zueinander setzen. Im Folgenden geht es aber um die Bestimmung von absoluten Anregungsquerschnitten.

Tabelle 9: Intensitäten der Muttermassen nach einem Laserschuss ( $16,8 \text{ mJ/cm}^2$ ) im Vergleich zu Messungen ohne Bestrahlung. Die Messungen wurden je dreimal wiederholt.

	Leu	Leu-Leu	N-Methylacetamid	Arg
	91,05 %	85,94 %	85,70 %	83,94 %
	95,70 %	85,25 %	98,31 %	81,29 %
	99,56 %	84,49 %	99,42 %	81,68 %
Durchschnitt:	<b>95,44 %</b>	<b>85,23 %</b>	<b>94,48 %</b>	<b>82,31 %</b>

In Tabelle 9 sind die durchschnittlichen Intensitätsabnahmen der protonierten Systeme gezeigt. Sowohl für den protonierten N-Terminus (Leu) als auch für die protonierte Peptidbindung (N-Methylacetamid) findet kaum eine Fragmentierung statt. Es gibt nur eine Reduzierung der Mutterionen um 5%. Wenn man die 5% zu den 85% des N-ständig protonierten Leu-Leu mit benachbarter Peptidbindung dazu zählt, so ergibt sich für die isolierte, neutrale Peptidbindung eine Absorption mit anschließender Fragmentierung von 10%. Im Vergleich bedeutet das, dass die Peptidbindung doppelt so stark absorbiert wie die N-ständige Protonierungsstelle. Die protonierte Peptidbindung absorbiert deutlich weniger als die neutrale Peptidbindung.

Die Messungen wurden ein zweites Mal durchgeführt, wobei statt Leucin die Modellsubstanz Glycin sowohl für die einzelne Aminosäure als auch für das Dipeptid benutzt wurde. Zudem wurde noch Tryptophan vermessen, um diesmal eine aromatische Seitenkette auf eine Anregungswahrscheinlichkeit hin zu untersuchen. Sowohl N-Methylacetamid als auch Arginin wurden dabei zum besseren Vergleich ebenfalls noch einmal mit vermessen.

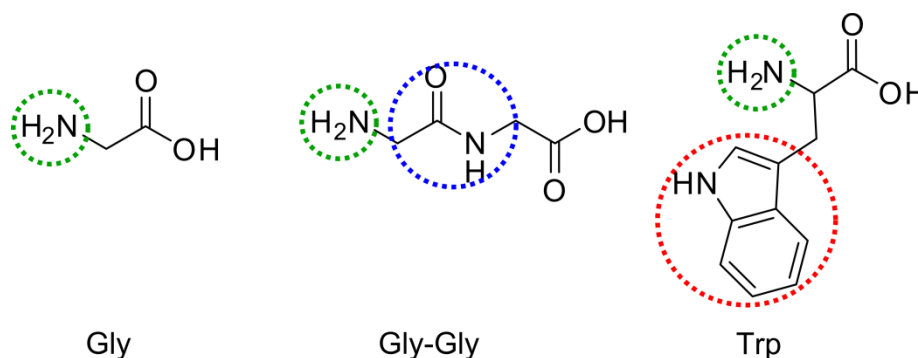


Abbildung 110: Weitere vermessene Substanzen zur Quantifizierung der Absorptionen.

In Tabelle 10 sind die Intensitäten der jeweiligen Muttermasse nach einem Schuss dargestellt. Die Messungen wurden fünfmal wiederholt um einen Durchschnitt zu erhalten.

Tabelle 10: Intensitäten der Muttermassen nach einem Laserschuss (14,9 mJ/cm<sup>2</sup>) im Vergleich zu Messungen ohne Bestrahlung. Die Messungen wurden je fünfmal wiederholt.

	<b>Gly</b>	<b>Gly-Gly</b>	<b>N-Methylacetamid</b>	<b>Arg</b>	<b>Trp</b>
	79,55%	69,66%	83,48%	74,83%	42,15%
	88,95%	80,62%	92,89%	71,99%	44,75%
	90,02%	76,45%	91,10%	74,94%	43,79%
	88,57%	67,96%	91,77%	76,43%	45,35%
	98,24%	59,21%	93,17%	76,59%	43,69%
Durchschnitt:	<b>89,07%</b>	<b>70,78%</b>	<b>90,48%</b>	<b>74,96%</b>	<b>43,95%</b>

Im Vergleich zu den Werten aus Tabelle 9 nimmt die Intensität von N-Methylacetamid und Arginin bei diesem Experiment um 5% mehr ab, was an einer noch genaueren Justierung des Lasers liegen kann. Was auffällt, ist die große Streubreite bei den kleinen Molekülen (N-Methylacetamid: 10%, Gly und Gly-Gly jeweils sogar 20%). Sowohl Glycin als auch sein Dipeptid absorbieren stärker im Vergleich zu Leucin und Leu-Leu, was zum Einen an der besseren Justage aber auch an der kleineren Molekülgröße und der damit zusammenhängenden Reduzierung der Zustandsdichte (siehe RRKM-Theorie Kapitel 2.3) liegen kann.

Arginin besitzt hier bei der Anregung scheinbar eine Sonderposition, da es am stärksten fragmentiert. Dies kann daran liegen, dass sich das Guanidin und die Peptidbindung im Aufbau sehr ähneln und es deshalb bei dieser Wellenlänge absorbiert.

Dies zeigt, dass man bei den ganzen Absorptionsmessungen natürlich die Seitenketten der Aminosäuren nicht ganz außer Acht lassen kann. Neben Arginin können auch andere Aminosäuren mit beispielsweise aromatischen Seitenketten gut absorbieren. Allerdings ist das Verhältnis zwischen der Anzahl der Aminosäuren mit anregbarer Seitenkette und der Anzahl der Peptidbindungen in einem natürlich vorkommenden Protein sehr klein, sodass es meistens mehr Peptidbindungen als anregbare Seitenketten im Protein existieren.

Für die weitere Berechnung wurden die Werte aus Tabelle 10 verwendet, da bei diesen Tryptophan untersucht wurde und als Beispiel für eine aromatische Seitenkette dient. Dabei ist zu beachten, dass bei der Aminosäure Tryptophan das Proton am N-Terminus lokalisiert ist und nicht an der Seitenkette [163-165]. Deshalb muss der experimentell bestimmte Wert, genau wie für die Peptidbindung, mit der prozentualen Abnahme des N-Terminus verrechnet werden.

#### 4.4.4 Berechnung des Anregungsquerschnitts $\sigma$

Mit Hilfe der durchschnittlichen Intensitätsabnahme der Proben, kann nun ein Zusammenhang zu den Anregungsquerschnitten der einzelnen chromophoren Stellen hergestellt werden. Dazu nutzt man den mathematischen Zusammenhang in Formel 23.

$$\Delta N_1 = - \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot N_0 \cdot I \cdot \Delta t \quad (23)$$

$\Delta N_1$  sei die Anzahl der Moleküle, die angeregt wurden,  $N_0$  die Gesamtzahl an Molekülen,  $\sigma$  der Anregungsquerschnitt und  $I$  die Intensität des Lasers mit der Pulsdauer  $\Delta t$ , in der die Moleküle angeregt werden können.

Unter der Annahme, dass die Änderung  $dN$  klein ist, kann die Formel vereinfacht werden zu

$$\frac{\Delta N_1}{N_0} = - \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot \Delta t \quad (24)$$

mit  $\Delta N_1$  als Abnahme der Moleküle zum Zeitpunkt  $t$  und  $N_0$  als Anzahl der Moleküle zum Zeitpunkt 0 (vor dem Laserschuss). Sowohl die Intensität als auch die Abnahme der Ionen nach jeweils einem Laserschuss ist bekannt, sodass man die Formel 24 nach  $\sigma$  umstellen kann und somit für jede vermeintliche Absorptionsstelle sein  $\sigma$  errechnen kann.

Bei großer Änderung von  $dN$  muss jedoch die integrierte Form gewählt werden (Formel 25)

$$\int_{N_0}^{N_t} \frac{dN}{N} = - \int_0^t \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot dt \quad (25)$$

Durch Lösen erhält man die Abnahme der Intensität, die einem exponentiellen Verlauf nach folgender Formel folgt

$$\frac{N(t)}{N(0)} = e^{-\sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot t} \quad (26)$$

bzw.

$$\ln \left( \frac{N(t)}{N(0)} \right) = - \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot t \quad (27)$$

Mit  $N(t)$  als Anzahl der Moleküle zum Zeitpunkt  $t$  und  $N(0)$  als Anzahl der Moleküle zum Zeitpunkt 0, sowie  $I \cdot t$  als Intensität des Lasers mit der Pulsdauer  $t$ .

In Tabelle 11 sind die prozentualen Abnahmen der einzelnen chromophoren Stellen noch einmal aufgelistet. Dabei ist zu beachten, dass die Abnahme für die Peptidbindung und für das Tryptophan wegen des protonierten N-Terminus noch mit der Abnahme von diesem subtrahiert wurde.

Tabelle 11: Prozentuale Abnahme der Intensitäten. Sowohl bei der Peptidbindung als auch bei Tryptophan wurde die experimentell bestimmte Abnahme mit der Abnahme des N-Terminus zusätzlich subtrahiert.

Absorptionsstelle	$N_{(t)}/N_{(0)}$ nach 5 ns [%]	$\Delta N$ nach 5 ns [%]
N-Terminus	89	11
Peptidbindung	82	18
protonierte Peptidbindung	90,5	9,5
Seitenkette Arginin	75	25
Seitenkette Tryptophan	55	45

Setzt man nun diese Werte zusammen mit der jeweiligen Intensität zum Vergleich sowohl in Formel 24 für die Annahme eines linearen Verlaufes als auch in Formel 27 für die Annahme eines exponentiellen Verlaufes ein, erhält man die spezifischen Anregungsquerschnitte  $\sigma$  (Tabelle 12).

Tabelle 12: Anregungsquerschnitt  $\sigma$  in Abhängigkeit der Intensität für die jeweiligen Absorptionsstellen, die bei  $14,9 \text{ mJ/cm}^2$  ermittelt wurden. Dieser wurde sowohl unter der Annahme eines linearen Verlaufes (Formel 25) wie auch eines exponentiellen Verlaufes (Formel 27) ermittelt. Zusätzlich wurde für einen besseren Vergleich das Verhältnis der einzelnen Werte, bezogen auf den jeweiligen Wert der Peptidbindung, gebildet.

Absorptionsstelle	Anregungsquerschnitt $\sigma$ (exponentiell)	Anregungsquerschnitt $\sigma$ (linear)	Verhältnis zur Peptidbindung (exponentiell)
N-Terminus	$8,05 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2$	$7,60 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2$	0,59
Peptidbindung	$1,37 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$	$1,24 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$	1,00
protonierte Peptidbindung	$6,90 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2$	$6,56 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2$	0,50
Arginin-Seitenkette	$1,99 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$	$1,73 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$	1,45
Tryptophan-Seitenkette	$4,13 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$	$3,11 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$	3,01



Die berechneten Anregungsquerschnitte unterscheiden sich durch ihre lineare oder exponentielle Berechnung nur gering. Da man jedoch davon ausgehen kann, dass ein exponentieller Verlauf der Muttermassenintensitätsabnahme eine bessere Annahme darstellt, werden im weiteren Verlauf die exponentiell bestimmten Anregungsquerschnitte verwendet.

Da die Anregungsquerschnitte für die Wellenlänge 193 nm und die hier gezeigten Stellen im Peptid zuvor noch nie bestimmt wurden, gibt es auch keine Literatur mit der man die hier ermittelten Werte direkt vergleichen könnte. Vergleicht man diese Werte jedoch mit anderen Anregungsquerschnitten, wie beispielsweise dem verbotenen Übergang des aromatischen Benzols ( $2,7 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$ ) oder des Toluols ( $6,0 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2$ ) [166], so liegen die hier berechneten Anregungsquerschnitte in derselben Größenordnung.

Schaut man sich die relative Zuordnung der einzelnen Querschnitte bezogen auf das  $\sigma$  der Peptidbindung an, so kann man die einzelnen Absorptionsstellen zueinander gewichten. Aus Tabelle 12 geht hervor, dass die Peptidbindung im Vergleich zu ihrer protonierten Form (Messung mit N-Methylacetamid) und dem N-Terminus doppelt so gut absorbiert.

Tryptophan absorbiert bei 193 nm dreimal besser im Vergleich zu der Peptidbindung, während der Wert von Arginin bei 1,4 liegt.

Unter Berücksichtigung der Streubreite bei den experimentell bestimmten  $N_{(t)}/N_{(0)}$ -Werten wurden diese für die Simulation zusätzlich in einem Bereich von -5, +5 bzw. +10 % variiert (Tabelle 13) und daraus wiederum neue  $\sigma$ -Werte bestimmt (Tabelle 14). Dieses Verfahren dient einer späteren Empfindlichkeitsanalyse bei den Berechnungen für die Absorption der Photonen der einzelnen Peptide.

Tabelle 13: Variation der experimentell bestimmten  $N_{(t)}/N_{(0)}$ -Werte nach 5 ns. Variiert wurde von -5% bis +10%.

Absorptionsstelle	-5%	Ermittelte Werte [%]	+5%	+10%
N-Terminus	94	89	84	79
Peptidbindung	87	82	77	72
protonierte Peptidbindung	96,5	91,5	86,5	81,5
Arginin-Seitenkette	80	75	70	64
Tryptophan-Seitenkette	60	55	50	45

Tabelle 14: Neu berechnete  $\sigma$ -Werte, die durch die Variation der  $N_{(t)}/N_{(0)}$ -Werte in Tabelle 13 entstehen.

Absorptionsstelle	$\sigma$ -Wert bei -5% [ $\text{cm}^2$ ]	$\sigma$ -Wert bei ermittelten Werten [ $\text{cm}^2$ ]	$\sigma$ -Wert bei +5% [ $\text{cm}^2$ ]	$\sigma$ -Wert bei +10% [ $\text{cm}^2$ ]
N-Terminus	$4,14 \cdot 10^{-18}$	$7,60 \cdot 10^{-18}$	$1,11 \cdot 10^{-17}$	$1,45 \cdot 10^{-17}$
Peptidbindung	$8,98 \cdot 10^{-18}$	$1,24 \cdot 10^{-17}$	$1,59 \cdot 10^{-17}$	$1,93 \cdot 10^{-17}$
protonierte Peptidbindung	$3,11 \cdot 10^{-18}$	$6,56 \cdot 10^{-18}$	$1,00 \cdot 10^{-17}$	$1,35 \cdot 10^{-17}$
Arginin-Seitenkette	$1,38 \cdot 10^{-17}$	$1,73 \cdot 10^{-17}$	$2,07 \cdot 10^{-17}$	$2,42 \cdot 10^{-17}$
Tryptophan-Seitenkette	$3,53 \cdot 10^{-17}$	$4,13 \cdot 10^{-17}$	$4,79 \cdot 10^{-17}$	$5,52 \cdot 10^{-17}$

Gerade durch die Variation der Werte für die relativ kleine Muttermassenabnahme von den Ionen, die stellvertretend für den N-Terminus, die Peptidbindung und die protonierte Peptidbindung stehen, ändert sich der daraus berechnete  $\sigma$ -Wert um mehr als eine Zehnerpotenz. Es stellt sich die Frage, wie sich diese Änderung auf die Bestimmung der Photonenzahl auswirkt.

#### 4.4.5 Abschätzung der in einem Molekül absorbierten Photonenzahl

Da die Anregungsquerschnitte der möglichen Absorptionsstellen berechnet wurden, kann man nun auch eine erste Abschätzung der absorbierten Photonen geben.

Wenn man einen Laserpuls in beliebig kleine Schritte unterteilt, kann man davon ausgehen, dass im ersten Schritt eine bestimmte Anzahl der Mutterionen den Energieinhalt eines Photons ( $1 \cdot h\nu$ ) besitzt. Im zweiten Schritt kann wieder eine Anregung der Ionen mit dem Energieinhalt von null Photonen ( $0 \cdot h\nu$ ) nach  $1 \cdot h\nu$  erfolgen, allerdings können die Ionen, die schon den Energieinhalt  $1 \cdot h\nu$  besitzen, durch ein weiteres Photon weiter angeregt werden, sodass eine neue Population mit dem Energieinhalt  $2 \cdot h\nu$  entsteht.

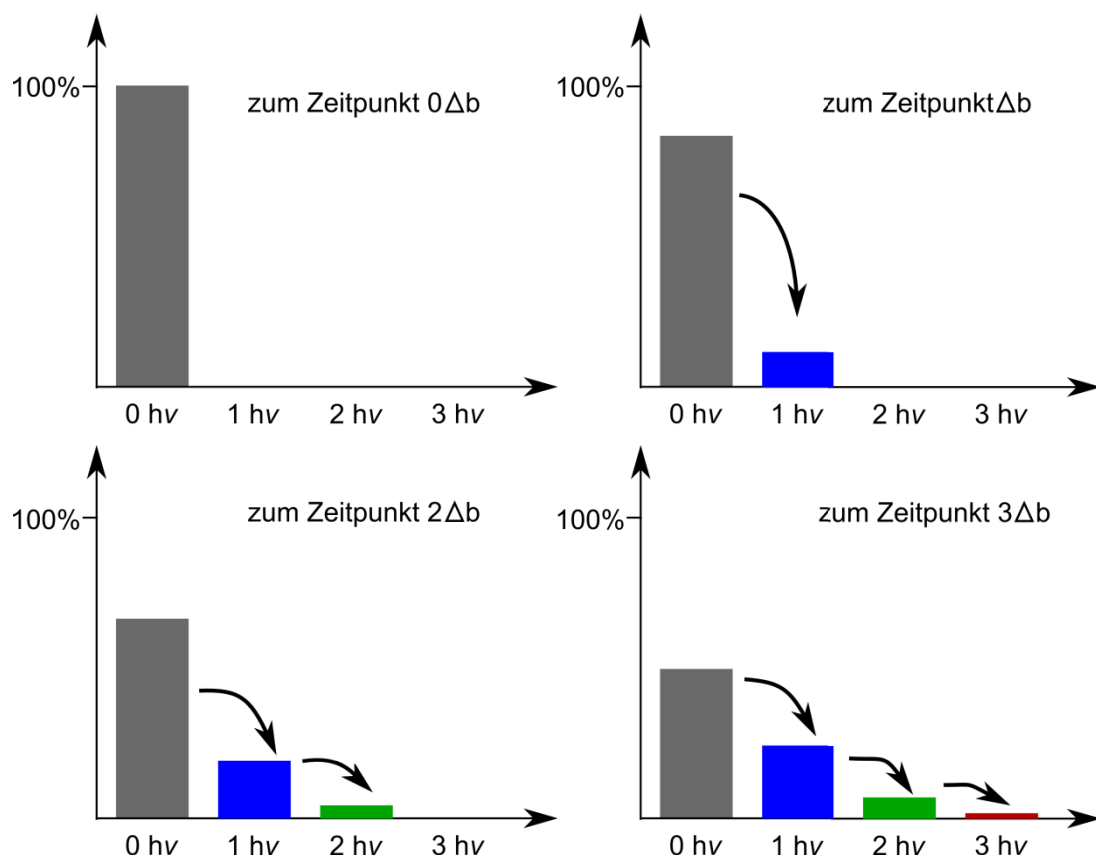


Abbildung 111: Populationsumverteilung während eines Laserpulses. Die Höhe der Balken steht dabei für die jeweilige Anzahl an Molekülen in diesem Zustand.

Mit jedem weiteren Schritt können die Ionen wieder neue Energieinhalte besitzen, sodass am Ende des Laserpulses eine Populationsverteilung zwischen den verschiedenen Energieinhalten entsteht. Dabei steht jeder Energieinhalt für die aufgenommene Photonenzahl, sodass man am Ende des Laserpulses die prozentuale Besetzung der Ionen mit jedem einzelnen Energieinhalt erhält.

Aus diesen Überlegungen wäre eigentlich das folgende gekoppelte Differentialgleichungssystem zu lösen:

$$\frac{dN_{0hv}}{dt} = - \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot N_{0hv} \quad (28)$$

bzw.

$$\frac{dN_{1hv}}{dt} = - \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot N_{1hv} + \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot N_{0hv} \quad (29)$$

Daraus folgt also für  $n > 1$ :

$$\frac{dN_{n \cdot hv}}{dt} = - \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot N_{n \cdot hv} + \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot N_{(n-1)hv} \quad (30)$$

Mit  $N_{n \cdot hv}$  als Anzahl der Moleküle mit dem Energieinhalt  $n \cdot hv$ .

Da diese Differentialgleichung analytisch nicht einfach lösbar ist, wird eine iterative Lösung durchgeführt. Dazu wird der Laserpuls mit einer Schrittweite  $\Delta b$  unterteilt. Bei  $n$  Unterteilungen folgt

$$\Delta b = \frac{\Delta t_{\text{Laser}}}{n} \quad (31)$$

Multipliziert man die Summe aller  $\sigma_i$  eines Peptids mit der Laserintensität  $I$  und dem Zeitintervall  $\Delta b$ , so erhält man den prozentualen Faktor für die Abnahme der Muttermasse für einen Laserschuss (siehe Formel 24). Multipliziert man dessen Pulsbreite mit einer Schrittweite  $\Delta b$ , so kann man die prozentuale Abnahme der Muttermasse  $N_{0hv}(\Delta b)$  für den jeweiligen Iterationsschritt  $\Delta b$  bestimmen. Aus Formel 23 ist zu erkennen, dass man die Abnahme des Mutterions für den jeweiligen Schritt dann erhält, wenn man die Abnahme des vorherigen Schrittes  $N_{0hv}(0 \cdot \Delta b)$  mit berücksichtigt:

$$N_{0hv}(\Delta b) = N_{0hv}(0 \cdot \Delta b) - N_{0hv}(0 \cdot \Delta b) \cdot \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot \Delta b \quad (32)$$

Wenn die Population in  $N_{0hv}$  im ersten Zeitintervall der Iteration um einen prozentualen Anteil abnimmt, so findet sich dieser in  $N_{1hv}$  wieder:

$$N_{1hv}(\Delta b) = N_{0hv}(0 \cdot \Delta b) \cdot \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot \Delta b \quad (33)$$

Jedoch gilt dies immer nur für das erste Zeitintervall. Da im zweiten Iterationsschritt für die Besetzung des Energieinhaltes  $N_{1hv}$  sowohl ein Teil der Population in  $N_{2hv}$  übergeht aber auch eine Anzahl an Ionen aus  $N_{0hv}$  hinzu kommt, kann dieses durch die Formel

$$N_{1hv}(2\Delta b) = N_{0hv}(\Delta b) \cdot \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot \Delta b + N_{1hv}(\Delta b) - N_{1hv}(\Delta b) \cdot \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot \Delta b \quad (34)$$

berechnet werden.

Für das nächste Zeitintervall  $N_{1hv}(3 \cdot \Delta b)$  können wieder die Populationen der Energieinhalte des vorherigen Schrittes von  $N_{0hv}$ , multipliziert mit dem prozentualen Faktor, und  $N_{1hv}$  addiert werden. Auch diesmal muss die vorherige Population  $N_{1hv}(2\Delta b)$ , multipliziert mit dem prozentualen Faktor, noch zusätzlich abgezogen werden.

$$N_{1hv}(3\Delta b) = N_{0hv}(2\Delta b) \cdot \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot \Delta b + N_{1hv}(2\Delta b) - N_{1hv}(2\Delta b) \cdot \sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot \Delta b \quad (35)$$

Nach dieser Formel können nun auch alle Besetzungen für die nachfolgenden Zeitintervalle für den Energieinhalt  $N_{1hv}$  berechnet werden. Zudem gelten die Formeln nicht nur für die Besetzungen  $N_{1hv}$  sondern auch für alle weiteren Besetzungen mit höheren Energieinhalten, wobei man jedoch beachten muss, dass der nächsthöhere Zustand immer erst bei  $(n+1) \cdot \Delta b$  im Vergleich zu seinem niedrigeren Zustand  $n \cdot \Delta b$  erstmals Populationen bekommt. Ein Beispiel ist in Abbildung 112 gegeben.

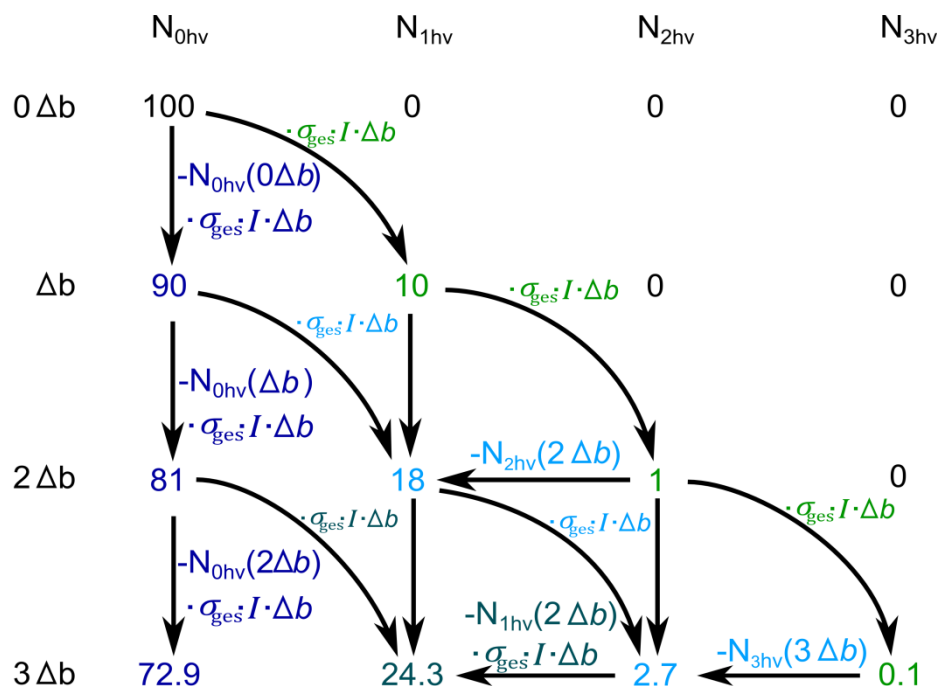


Abbildung 112: Rechenbeispiel für die prozentuale Besetzung der einzelnen Zustände während eines Zeitabschnitts  $\Delta b$  einmal bildlich dargestellt. Die dunkelblauen Werte ergeben sich durch Subtraktion des vorherigen Wertes multipliziert mit  $\sigma_{ges} \cdot I \cdot \Delta b$ . Die grünunterlegten Werte werden aus der Multiplikation von  $\sigma_{ges} \cdot I \cdot \Delta b$  mit  $N_{(n-1)hv}((n-1)\Delta b)$  gebildet. Die Werte in hellblau entstehen aus der Addition von  $N_{(n-1)hv}((n-1)\Delta b)$  und  $N_{nhv}((n-1)\Delta b)$ , wobei noch der entstehende Anteil an  $N_{(n+1)hv}(n\Delta b)$  abgezogen werden muss. Im nächsten Schritt (petrolfarben) wird der Wert aus der Addition von  $N_{(n-1)hv}((n-1)\Delta b)$  und  $N_{nhv}((n-1)\Delta b)$  berechnet, wobei jetzt zusätzlich noch  $N_{nhv}((n-1)\Delta b)$  abgezogen werden muss.

Da der Laserpuls eine Dauer von 5 ns besitzt, kann man die Schrittweite bei den Rechnungen auf diese anpassen. Dabei gehen wir vereinfachend davon aus, dass der Laser eine zeitliche und örtliche Rechteckform besitzt. Je kleiner die Schrittweite gewählt wird, desto genauer werden die Berechnungen. In Abbildung 113 ist die graphische Darstellung der Populationsverteilung während eines Laserpulses zu sehen.

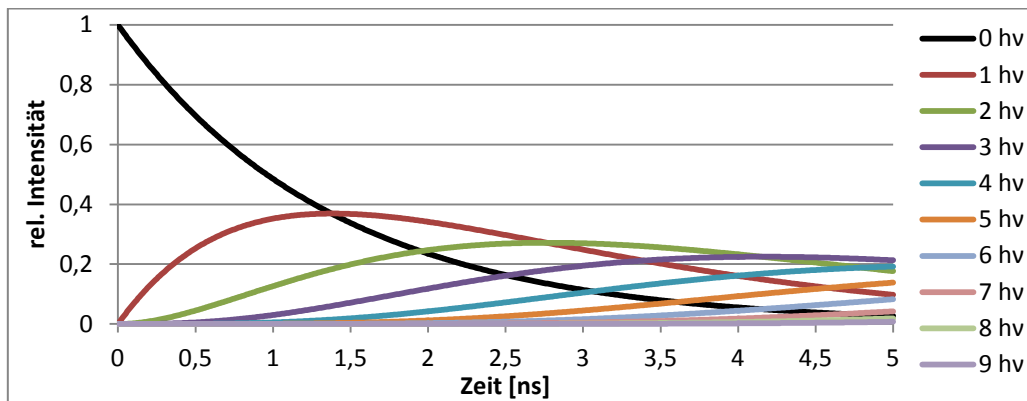


Abbildung 113: Graphische Darstellung der theoretischen Populationsverteilung mit den einzelnen Energieinhalten während eines Laserpulses mit 5 ns Zeitdauer. Als Beispiel wurde hier Angiotensin I dargestellt. Wie man sieht, nimmt die Population mit dem Energieinhalt 0-hv exponentiell ab, während die Population mit 1-hv schnell besetzt wird, jedoch durch die Umverteilung in die höheren Energien im Laufe der Zeit wieder abnimmt. Die Verteilung der höheren Energien wird immer breiter und flachen auch immer weiter ab.

Die Population des Mutterions mit dem Energieinhalt 0-hv nimmt exponentiell während des Laserpulses ab. Gleichzeitig nimmt die Anzahl der Ionen, die sich durch die Absorption eines ersten Photons in  $N_{1hv}$  befinden, zunächst stark zu. Sobald sich eine neue Population mit höheren Energieinhalten aufbaut, nimmt auch die Population in  $N_{1hv}$  mit der Zeit wieder ab. Die weiteren Populationsverteilungen werden zunehmend breiter aber nicht mehr so intensiv wie die Population in  $N_{1hv}$ . Je nach Größe der Summe der Anregungsquerschnitte verhalten sich die Verteilungen unterschiedlich. Ist die Summe der Querschnitte groß, gelangen viele Ionen durch das erste Photon in  $N_{1hv}$  und auch dementsprechend wiederum viele in Populationen mit höheren Energieinhalten, sodass sich am Ende des Laserpulses die größte Population bei höheren Energieinhalten befindet. Absorbiert das Ion jedoch schlecht, so ist die Summe der Anregungsquerschnitte klein, was sich wiederum auf die Populationsverteilung auswirkt. Diese verschiebt sich so, dass am Ende des Laserpulses die größte Ionenpopulation kleine Energieinhalte besitzt.

Als Rechenbeispiel sollen hier die Ergebnisse von Angiotensin I dienen. Angiotensin I besteht aus

- 9 Peptidbindungen
- 1 Arginin (bevorzugte Protonierungsstelle)
- 4 aromatischen Seitenketten

Für den Anregungsquerschnitt der aromatischen Seitenketten wird hier stellvertretend der Anregungsquerschnitt für Tryptophan benutzt. In Abbildung 114 sind die prozentualen Anteile der Besetzung bei den einzelnen Energieinhalten nach 5 ns für verschiedene Schrittweiten aufgelistet.

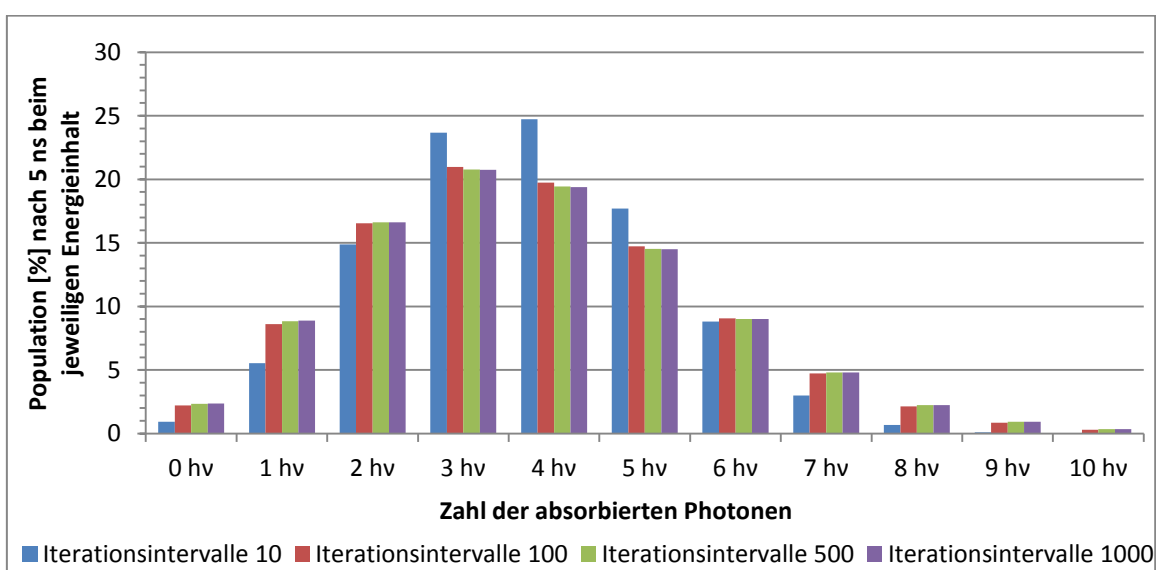


Abbildung 114: Iterativ berechnete Population der jeweiligen Energieinhalte von Angiotensin I nach 5 ns bei verschiedenen Iterationsintervallen.

Wie man erkennen kann, verändern sich die Werte bei größer werdender Zahl von Iterationsintervallen nicht mehr. Deshalb ist es sinnvoll, die weiteren Berechnungen stets mit einer relativ großen Schrittzahl durchzuführen. Hier wurde für alle Moleküle stets eine Iterationszahl von 1000 verwendet.

Da man nun weiß, wie der prozentuale Anteil der Population am Ende eines Laserpulses bei den jeweiligen Energieinhalten ist, kann man diese mit der experimentell bestimmten Restintensität der jeweiligen Moleküle nach einem Laserschuss vergleichen. Die Anzahl der Photonen, die zur Fragmentierung gebraucht wurden, ergibt sich, wenn man die Endwerte der jeweiligen Besetzungen der Energieinhalte, beginnend bei den niedrigsten Energieinhalten, so lange addiert bis sie mit der experimentell bestimmten Restintensität des Mutterions nach der Laseranregung übereinstimmt. Als Beispiel dient wieder Angiotensin I. Der experimentelle Wert betrug

beim Einfachgeladenen ohne Helium 60%. Vergleicht man dies mit den Werten aus Abbildung 114, so stellt man fest, dass erst nach Addition der Populationen 0 hv bis 4 hv die 60% erreicht sind. Das bedeutet, dass gemäß der Simulation die ersten drei Photonen nicht zur Fragmentierung führen und erst ab dem vierten zugeführten Photon die Energie für eine Dissoziation ausreicht.

In Tabelle 15 sind für die verschiedenen untersuchten Moleküle die Zahl der absorbierenden Stellen noch einmal aufgeführt. Mit diesen wurde die Summe der Anregungsquerschnitte gebildet und die Simulation durchgeführt. Da in allen Molekülen mit Ausnahme von Gramacidin A mindestens ein Arginin befindet, wurde die Absorption des protonierten N-Terminus nicht mit einbezogen. Gramacidin A protoniert am N-Terminus, sodass dieser hier mit einbezogen werden muss.

Tabelle 15: Anzahl der absorbierenden Stellen für die jeweiligen Moleküle. Diese werden für die Berechnung der Photonenzahl benötigt (vgl. Formel 27).

Peptid	m/z	Anzahl der		
		Peptidbindung	Arg	aromat. Seitenkette
Leu-Trp-Met-Arg	606	3	1	1
Bradykinin	1060	8	2	2
Angiotensin II	1046	7	1	3
Angiotensin I	1296	9	1	4
Gramacidin A	1882	14	0	4
[Insulin B] <sup>3+</sup>	1165	29	1	7
[Insulin B] <sup>4+</sup>	874	29	1	7

In Tabelle 16 sind die iterativ berechneten Populationen mit dem jeweiligen Energieinhalt hv nach 5 ns für die verschiedenen untersuchten Moleküle aufgelistet. Die genauen Berechnungen sowie die Tabellen der Populationen finden sich im Anhang.



Tabelle 16: Iterativ berechnete Population in % nach 5 ns mit dem jeweiligen Energieinhalt  $h\nu$  für die verschiedenen hier vermessenen Peptide.

	0h $\nu$	1h $\nu$	2h $\nu$	3h $\nu$	4h $\nu$	5h $\nu$	6h $\nu$	7h $\nu$	8h $\nu$	9h $\nu$	10h $\nu$
LWMR	22,1	33,4	25,2	12,6	4,8	1,4	0,4	0,1	0,0	0,0	0,0
Brad.	7,3	19,1	25,0	21,9	14,3	7,5	3,3	1,2	0,4	0,1	0,0
Ang. II	2,7	9,9	17,8	21,3	19,1	13,7	8,2	4,2	1,9	0,7	0,3
Ang. I	2,4	8,9	16,6	20,7	19,4	14,5	9,0	4,8	2,2	0,9	0,3
Gram.A	0,1	0,6	2,0	4,8	8,6	12,3	14,6	14,9	13,3	10,5	7,5
In. B	0,0	0,0	0,2	0,7	1,8	3,6	6,1	8,8	11,1	12,5	12,6

Mit Vergleich der Intensitäten der jeweiligen Mutterionen nach einem Laserschuss kann man nun die Anzahl der Photonen bestimmen, die zu einer Fragmentierung mindestens benötigt wurden.

Tabelle 17: Anzahl der berechneten Photonen für die jeweiligen Peptide, die zur Dissoziation benötigt werden, bei Betrachtung der Mutterionenrestintensität nach einem Laserschuss ohne Helium. Die gestrichelte Linie grenzt die nur mehrfachgeladen darstellbaren Molekülen von den einfachgeladen darstellbaren Molekülen ab.

Peptid	Restintensität nach einem Laserschuss ohne He (experimentell)	Anzahl der berechneten Photonen
Leu-Trp-Met-Arg	75,3%	2
Bradykinin	40,6%	2
Angiotensin II	64,5%	4
Angiotensin I	60,0%	4
Gramicidin A	76,6%	9
[Insulin B] <sup>3+</sup>	65,0%	11
[Insulin B] <sup>4+</sup>	62,3%	11

Durch die berechneten Anregungsquerschnitte kann man nun zum ersten Mal eine Abschätzung der Zahl der absorbierten Photonen geben. Was deutlich zu sehen ist, ist die relativ geringe Anzahl an Photonen, die benötigt wird, um eine Fragmentierung z.B. von Bradykinin herbeizuführen. Vergleicht man LWMR mit Bradykinin, so benötigt das Bradykinin, welches fast doppelt so groß ist wie das LWMR, gleich viele Photonen um zu fragmentieren. Aufgrund des schnellen NH<sub>3</sub>-Verlustkanals des Bradykinins ist dies aber auch durchaus plausibel. Angiotensin II, welches in etwa genauso groß ist wie

das Bradykinin, braucht wiederum vier Photonen, da es eben nicht diesen schnellen Verlustkanal besitzt. Interessant hierbei ist, dass die Photonenzahl nicht proportional zur Größe des Moleküls einhergeht. Gerade bei den größeren Molekülen wie Insulin B macht sich dies bemerkbar. Insulin B benötigt als Vierfachgeladenes ohne Helium 11 Photonen. Dies zeigt zum Einen, dass durch die Vielzahl an Chromophoren im Molekül die Wahrscheinlichkeit für eine Anregung steigt. Das bedeutet aber auch, dass die Anzahl der absorbierten Photonen mit der Molekülgröße steigt. Die Tatsache, dass die minimale Photonenzahl zur Fragmentierung jedoch nicht direkt mit der Größe des Moleküls steigt, gibt Hoffnung auch sehr große Systeme dissoziieren zu können.

Da die experimentelle Bestimmung der Absorptionsquerschnitte eine gewisse Streubreite besaß, wurde diese auch bei der daraus resultierenden Berechnung der Anregungsquerschnitte mitberücksichtigt. Damit erhält man eine Art Empfindlichkeitsanalyse bezüglich Fehlern.

In Tabelle 18 ist die Photonenzahl für die jeweiligen Moleküle unter Berücksichtigung der prozentualen Abweichung in den Rohdaten der Fragmentierung bei der  $\sigma$ -Bestimmung dargestellt. Zum Vergleich wurden noch einmal die gemessenen Zahlen mit abgebildet. Die genaue prozentuale Verteilung sowie die Berechnung können dem Anhang entnommen werden.

Tabelle 18: Bestimmung der Photonenzahl für die jeweiligen Moleküle unter Berücksichtigung der prozentualen Abweichung.

Peptid	Restintensität (experimentell)		Anzahl der berechneten Photonen mit			
	Ohne He	-5% Abweichung	ermittelten Werten	+5% Abweichung	+10% Abweichung	
Leu-Trp-Met-Arg	75,3%	2	2	3	3	
Bradykinin	40,6%	2	2	3	3	
Angiotensin II	64,5%	3	4	5	6	
Angiotensin I	60,0%	3	4	5	6	
Gramicidin A	76,6%	7	9	11	13	
[Insulin B] <sup>3+</sup>	65,0%	9	11	14	16	
[Insulin B] <sup>4+</sup>	62,3%	9	11	13	16	

Vergleicht man die Photonenzahlen miteinander, so erkennt man für die kleinen Moleküle nur eine kleine Schwankung. So unterscheidet sich LWMR lediglich durch ein Photon im gesamten Abweichungsbereich. Bradykinin braucht für die Fragmentierung bei einer Abweichung von plus 10% gerade einmal ein Photon mehr, Angiotensin I und II gerade einmal zwei Photonen. Zu größeren Massen hin wird die Abweichung größer. So beträgt der Unterschied bei Gramacidin A im Extremfall sechs Photonen und bei Insulin B sieben Photonen mehr.

Um herauszufinden, welche iterativ berechneten  $\sigma$ -Werte nun den wahren Werten der Moleküle am nächsten kommen, wurden die verschiedenen Populationen bei der jeweiligen Abweichung gegen den Energieinhalt  $h\nu$  aufgetragen. Anschließend wurde der experimentell bestimmte Wert an der Stelle eingetragen, die durch Addition der einzelnen Energieinhalte, beginnend bei 0  $h\nu$ , ungefähr die gleiche Prozentzahl ergibt. Somit dient der experimentelle Wert als Grenze zwischen nicht-fragmentierten und fragmentierten Mutterionen (Abbildung 115 und Abbildung 116). Um die Diagramme übersichtlicher zu halten, wurde auf das Auftragen von  $[\text{Insulin}]^{3+}$  und  $[\text{Insulin}]^{4+}$  verzichtet.

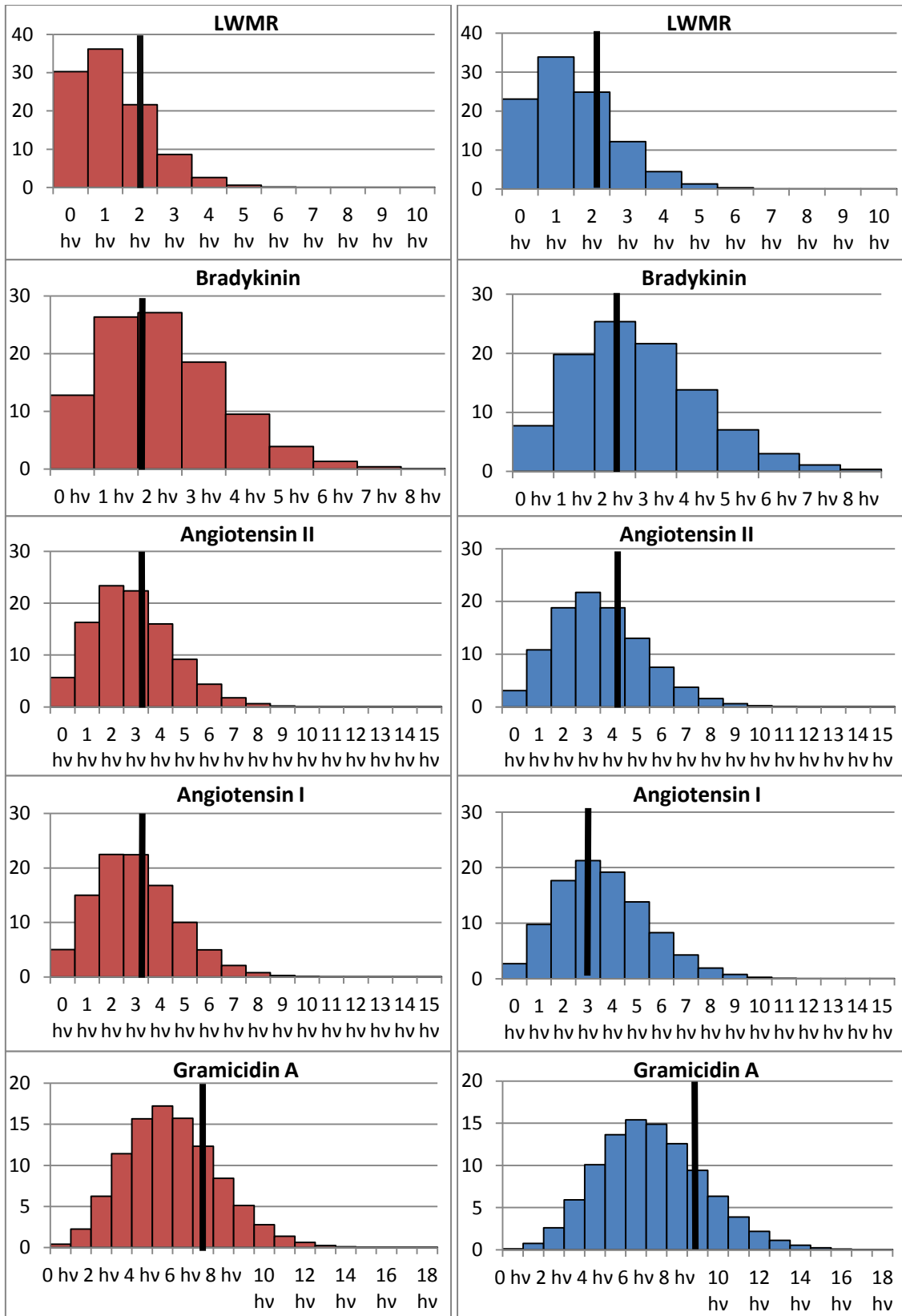


Abbildung 115: Prozentuale Auftragung der iterativ berechneten Populationen in % mit den jeweiligen Energiewerten hv. Die roten Diagramme zeigen die Berechnungen, die durch die -5% Variation der  $N(t)/N(0)$ -Werte entstanden sind. Die blauen Diagramme zeigen die Population ohne Abweichung. Die senkrechte Linie soll den prozentualen experimentellen Wert verdeutlichen, die Position kommt durch die Addition der einzelnen Energieinhalte zustande.

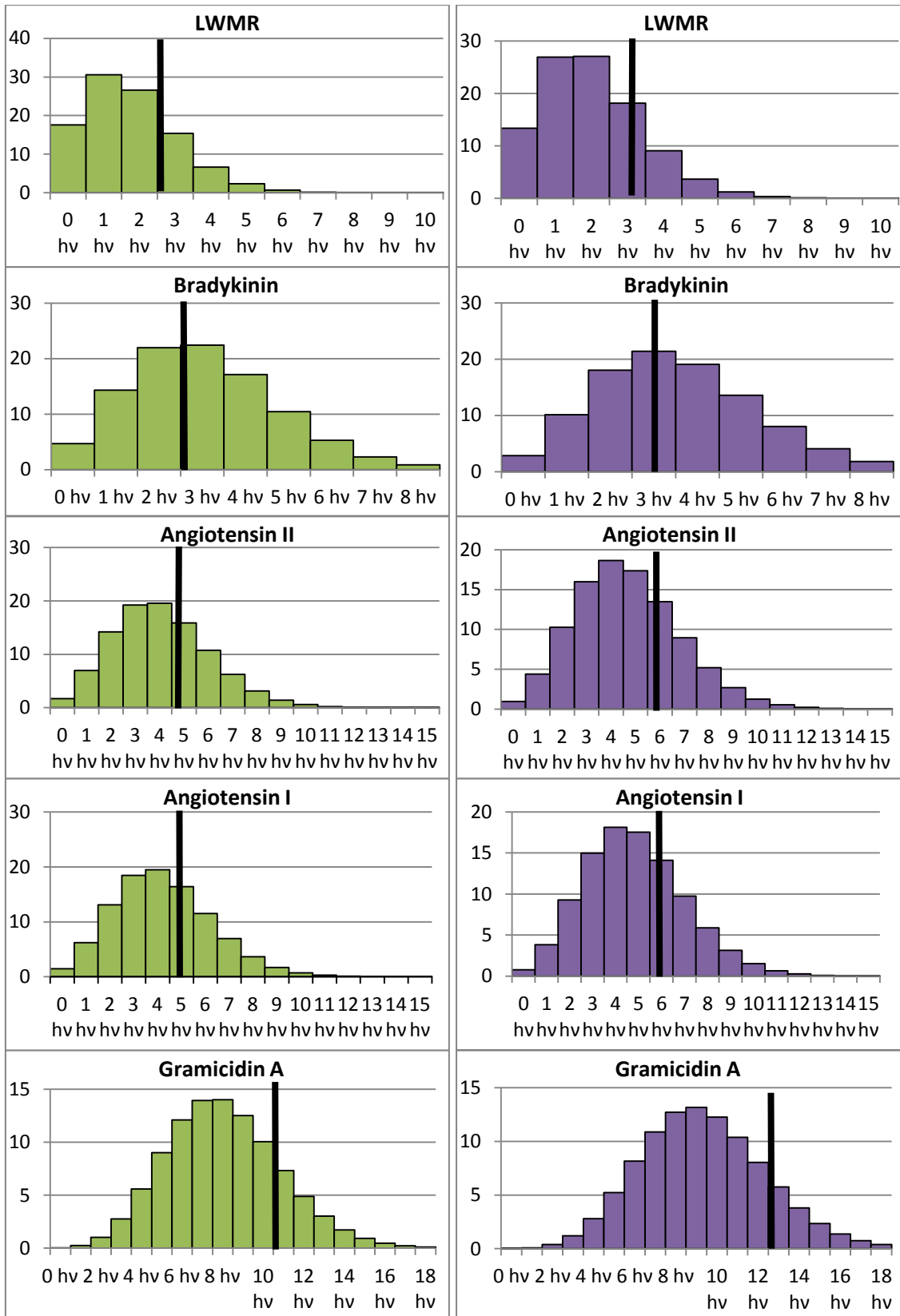


Abbildung 116: Prozentuale Auftragung der iterativ berechneten Populationen in % mit den jeweiligen Energiewerten hv. Die grünen Diagramme zeigen die Berechnungen, die durch die +5% Variation der  $N(t)/N(0)$ -Werte entstanden sind. Die lila Diagramme zeigen die Population bei einer Variation von +10%. Die senkrechte Linie soll den prozentualen experimentellen Wert verdeutlichen, die Position kommt durch die Addition der einzelnen Energieinhalte zustande.

Beim Vergleich der Diagramme zueinander fällt auf, dass der experimentelle Wert bei fast allen Messungen mit der Abweichung von +5% (grüne Diagramme) immer am äußersten Rand eines Energieinhaltes liegt. Bei allen anderen Messungen kommt es vor, dass der experimentell bestimmte Wert mehr als zweimal in der Mitte eines Energieinhaltes zu finden ist. Wenn man sich nun überlegt, dass die Energie immer als ganzzahliges  $h\nu$  vom Molekül absorbiert wird und diese dann entweder zur Dissoziation ausreicht oder nicht, so ist es am plausibelsten, dass die Moleküle direkt zu Beginn eines neuen Energieinhaltes (oder kurz davor) dissoziieren. Dieses Verhalten zeigt sich bei der Berechnung der Photonenzahl mit +5% Abweichung. Besonders wichtig sind hierbei die Vergleiche der Simulation mit den experimentellen Werten von LWMR und Bradykinin. Da es sich bei diesen um kleine Moleküle handelt, übt die Absorption eines Photons einen großen Effekt aus. Die experimentellen Werte stimmen bei diesen Messungen besonders gut mit der Simulation überein, sodass angenommen werden kann, dass die Berechnung der Photonenzahl mit +5% Abweichung den wahren  $\sigma$ -Werten am nächsten kommt. Diese Annahme ist auch nicht unwahrscheinlich, da bei der experimentellen Bestimmung der einzelnen  $\sigma$ -Werte für den Laserfokus ein örtliches Rechteckprofil angenommen wurde. Die Mehrheit der Ionen sieht also eine zu geringe Intensität. Höhere Photonenanregungen enden aber auch in einer Fragmentierung. In Tabelle 19 sind nun die wahrscheinlichsten Anregungsquerschnitte der einzelnen Absorptionsstellen in einer Peptidkette noch einmal aufgeführt.

Tabelle 19: Wahrscheinlichste Anregungsquerschnitte der einzelnen Absorptionsstellen im Peptid.

Absorptionsstelle	$\sigma$ -Wert bei +5% Abweichung der ermittelten $N_{(t)}/N_{(0)}$ -Werte
N-Terminus (protoniert)	$1,11 \cdot 10^{-17} \text{ [cm}^2\text{]}$
Peptidbindung (neutral)	$1,59 \cdot 10^{-17} \text{ [cm}^2\text{]}$
Peptidbindung (protoniert)	$1,00 \cdot 10^{-17} \text{ [cm}^2\text{]}$
Arginin-Seitenkette (protoniert)	$2,07 \cdot 10^{-17} \text{ [cm}^2\text{]}$
Tryptophan-Seitenkette (neutral)	$4,79 \cdot 10^{-17} \text{ [cm}^2\text{]}$

Für die Mehrfachgeladenen können nun ebenfalls die Anzahl der Photonen bestimmt werden, wobei dazu nun die  $\sigma$ -Werte aus Tabelle 19 benutzt werden.

Tabelle 20: Anzahl der Photonen für die Mehrfachgeladenen beim Vergleich der Intensitäten der Messungen ohne Helium.

Peptid	Ladung	Intensität (experimentell)	Photonenzahl
Leu-Trp-Met-Arg	[M] <sup>+</sup>	75,3%	2
	[M] <sup>2+</sup>	34,8%	1
Bradykinin	[M] <sup>+</sup>	40,6%	3
	[M] <sup>2+</sup>	47,6%	3
Angiotensin II	[M] <sup>+</sup>	64,5%	5
	[M] <sup>2+</sup>	16,5%	2
	[M] <sup>3+</sup>	5,2%	1
Angiotensin I	[M] <sup>+</sup>	60,0%	5
	[M] <sup>2+</sup>	11,7%	2
	[M] <sup>3+</sup>	7,4%	2
	[M] <sup>4+</sup>	4,0%	1
Insulin	[M] <sup>3+</sup>	65,0%	14
	[M] <sup>4+</sup>	62,3%	13

Wie man aus Tabelle 20 erkennen kann, nimmt die Anzahl der Photonen mit zunehmender Ladung ab. Das bedeutet, dass die effektive Dissoziationsenergie für kleinere Peptidketten, wie bei den vorherigen Experimenten schon vermutet, mit steigender Ladungszahl immer weiter abnimmt. Am Beispiel des Insulins sieht man allerdings, dass die Energieerniedrigung durch die zusätzlichen Ladungen und der einhergehenden Coulombabstoßung bei großen Peptidketten nur noch bedingt bei der gegebenen Fragmentierungsmethode ausreicht, um diese zu fragmentieren.

Da der Unterschied der hier berechneten absorbierten Photonenzahlen zwischen den einfach- und mehrfachprotonierten Systemen sehr groß ist, könnte man vermuten, dass die Absenkung der Dissoziationsenergie und der Zustandsdichte durch die Coulombenergie einen sehr großen Effekt haben müsste. Dies wäre ein überraschendes Ergebnis.

Zur Überprüfung der richtigen Berechnung der Photonenzahl für die Mehrfachgeladenen wurde jeweils ein Anregungsquerschnitt bei der Berechnung modifiziert. Trägt die Peptidkette eine weitere Ladung, kann es durchaus sein, dass sich dort, wo die zweite Ladung sitzt, der Anregungsquerschnitt zu größeren Werten hin ändert. Deshalb wurden die Berechnungen zum einen mit einem doppelt so großen  $\sigma$ -Wert für die protonierte Arginin-Seitenkette durchgeführt. Dieser wurde gewählt, weil sich an dieser wegen der Gasphasenbasizität eine der Ladungen befinden muss. Zusätzlich wurde bei der Berechnung für alle Moleküle der Anregungsquerschnitt des protonierten N-Terminus hinzuaddiert, da sich gerade bei den Höhergeladenen dort auch ein Proton befinden sollte.

Tabelle 21: Änderung der Population in den jeweiligen Energieinhalten bei Vergrößerung der Summe der Anregungsquerschnitte am Beispiel des Angiotensin I. Zum einen wurde zu der bestehenden Summe zusätzlich der  $\sigma$ -Wert des N-Terminus hinzuaddiert. Durch Verdoppelung des  $\sigma$ -Wertes der Arg-Seitenkette wurde die Summe aller  $\sigma$  ebenfalls vergrößert.

Angiotensin I	0 hv [%]	1 hv [%]	2 hv [%]	3 hv [%]	4 hv [%]	5 hv [%]
Ohne Variation	1,088	4,928	11,155	16,816	18,993	17,144
Mit $\sigma$ des protonierten N-Terminus	0,944	4,412	10,300	16,014	18,655	17,368
Mit $\sigma$ des N-Terminus und doppeltem $\sigma$ der Arg Seitenkette	0,725	3,580	8,831	14,511	17,865	17,578

Durch die Änderung der Summe entstehen nur geringe Unterschiede in der Besetzung der einzelnen Energieinhalte, sodass insgesamt die wenigen proton-modifizierten Chromophore nur wenig Effekt verursachen können. Vergleicht man diese mit den experimentell ermittelten Werten für die Mehrfachgeladenen, so ändert sich an der Anzahl der Photonen im Vergleich zu der Berechnung ohne vergrößerte Anregungsquerschnitte nichts. Somit können die Populationszustände der einzelnen Energieinhalte für die Mehrfachgeladenen auch durch die Näherung der lokalen, sich nicht ändernden  $\sigma$ -Werte beschrieben werden.

Durch diese Experimente ist es zum ersten Mal gelungen eine Abschätzung der in die Fragmentierung eingehenden Photonenzahlen zu erhalten, die trotz Berücksichtigung von eventuellen Messungenauigkeiten noch recht klein ausfallen.



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden verschiedene Untersuchungen an protonierten Aminosäuren und Peptiden mit unterschiedlichen Kettenlängen in der Gasphase durchgeführt und sowohl ihre Dissoziationswahrscheinlichkeit als auch ihr Fragmentierungsverhalten betrachtet. Dabei wurde besonders auf folgende Fragestellungen geachtet:

- Ist es möglich, größer werdende Peptidketten trotz der vielen internen Freiheitsgrade, über die sich die Energie verteilen kann, zu fragmentieren?
- Wie verhalten sich die unterschiedlichen Moleküle bei unterschiedlichen Anregungsmethoden?
- Kann man durch die Betrachtung von Massenspektren Fragmentierungsmechanismen erkennen und vorhersagen?
- Wie verhalten sich die unterschiedlichen Moleküle bei unterschiedlichen Ladungszahlen?
- Kann man eine Vorstellung davon erhalten, wie viel Energie zum Fragmentieren benötigt wird?

Durch die Verwendung eines ArF-Excimer-Lasers, der bei 193 nm emittiert, konnten die Peptidbindungen der Moleküle angeregt werden, da diese bei dieser Wellenlänge absorbieren. Mit Hilfe des neuen Ansatzes der Multiphotonen-Multichromophoren-anregung hat sich gezeigt, dass bei größer werdender Anzahl der Peptidbindungen und somit steigender Kettenlänge die Absorptionswahrscheinlichkeit und damit die Fragmentierungswahrscheinlichkeit erhöht werden konnte. Dies ist ein Durchbruch, da es mit zunehmender Molekülgröße immer mehr Energie für die Beobachtung der Fragmentierung bedarf.

Beim Vergleich der photoinduzierten Fragmentierung, sowohl mit als auch ohne Helium als zusätzlichen Stoßpartner, mit der *low-energy* Stoßfragmentierungsmethode konnten Rückschlüsse auf die Fragmentierungsmechanismen erhalten werden. Dies war besonders wichtig für die Untersuchung an mehrfachgeladenen Molekülen. Dabei hat sich gezeigt, dass Fragmentierungskanäle durch eine oder mehrere zusätzliche Ladungen blockiert werden können und das Molekül kompliziertere oder neutrale Dissoziationswege eingehen muss.

Durch die Untersuchung an mehrfachprotonierten Molekülsystemen konnten neben den Fragmentierungsmechanismen auch ladungsabhängige Mechanismen untersucht werden. Einen relativen energetischen Überblick über die verschiedenen geladenen Ionen eines Molekülsystems konnte durch den Vergleich zueinander ebenfalls erhalten werden.

Darüber hinaus wollte man der Frage nachgehen, wie viel Energie nun tatsächlich wegen den Bedingungen basierend auf der RRKM-Theorie für die Dissoziation eines längerkettigen Peptids benötigt wird. Da dies aufgrund der ungeklärten Energetik bei Stoßprozessen in der Paul-Falle mit der Stoßfragmentierungsmethode nicht durchführbar war, hat man sich für die Laserfragmentierungsmethode entschieden. Dabei wurde ein Experiment entwickelt, bei dem man die Anregungsquerschnitte der einzelnen chromophoren Stellen in einer Peptidkette bestimmen konnte. Mit der experimentellen Bestimmung fast aller Anregungsquerschnitte konnte nun zum ersten Mal eine Abschätzung der Anzahl der absorbierten Photonen in einem Molekülion bis zur Dissoziation erfolgen. Dabei wurden die Populationen der einzelnen Energieinhalte innerhalb eines Laserpulses zunächst mathematisch abgeschätzt. Die prozentuale Anzahl der Ionen, die sich am Ende eines Laserpulses bei einem Energieinhalt mit einer bestimmten Photonenzahl befand, wurde anschließend mit den experimentell bestimmten Werten der Ionen verglichen. Die Anzahl der Photonen erhielt man, indem man die einzelnen Populationen, beginnend mit dem Energieinhalt bei null Photonen, so lange aufaddierte, bis die Summe dem experimentellen Wert entsprach. Für das einfachgeladene Angiotensin I, was ein Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 1296 Da besitzt, ergab sich beispielsweise für die Dissoziation eine Anzahl von 5 absorbierten Photonen, was einer Energie von 32 eV entspricht.

Durch diese Berechnung ist es zum ersten Mal gelungen, eine Abschätzung der benötigten Photonen und somit der benötigten Energie für die Dissoziation einer Peptidkette zu machen.

Für die Zukunft ist zu prüfen, ob die bisherigen verwendeten Messmethoden auch auf Moleküle mit noch größerer Masse angewendet werden können. Zudem sollte geklärt werden, ob sich diese Methoden noch verbessern lassen, um noch genauere Ergebnisse zu erhalten. Es sollten weiterhin auch andere Messmethoden zur Überprüfung dieser Ergebnisse verwendet werden.

Da es sich bei der Berechnung der Photonenzahl nur um eine Abschätzung handelt, ist zu klären, ob diese noch exakter vorgenommen werden kann. Eine Möglichkeit dafür ist die Untersuchung von weiteren Absorptionsstellen. In dieser Arbeit wurden exemplarisch nur fünf verschiedene Anregungsquerschnitte bestimmt. Durch die Untersuchung von weiteren Absorptionsstellen und der Berechnung dieser Anregungsquerschnitte kann die Abschätzung der Photonenzahl noch genauer erfolgen. Dazu sollten auch eventuell entstandene Fehler bereinigt werden.

Zudem ist die Berechnung der Photonenzahl für die Mehrfachgeladenen genauer zu untersuchen. Da sich die Photonenzahl mit höherer Ladungszahl stark reduziert hat, ist zu klären, ob sich die Photonenzahl durch die exaktere Bestimmung der Anregungsquerschnitte ändert. Ist diese Überprüfung erfolgt, so können auch große Moleküle mit einem  $m/z$ -Verhältnis größer 6000 Da in Bezug auf die für eine Dissoziation benötigten absorbierten Photonen hin untersucht werden. Dies ist besonders wichtig, da man mit dem ESI-MS große Molekülsysteme nur mehrfachgeladen darstellen kann.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Yamashita, M. and Fenn, J. B.: Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme *The Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88* (20), 4451-4459.
- [2] Yamashita, M. and Fenn, J. B.: Negative ion production with the electrospray ion source *The Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88* (20), 4671-4675.
- [3] Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.;...: Elektrospray ionization-principles and practice *Mass Spectrometry Reviews* **1990**, *9* 37-70.
- [4] Fenn, J. B.: Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture) *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42* (33), 3871-3894.
- [5] Tanaka, K.: The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture) *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42* (33), 3860-3870.
- [6] Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.;...: Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, *2* (8), 151-153.
- [7] Hughey, C. A.; Rodgers, R. P. and Marshall, A. G.: Resolution of 11 000 Compositionally Distinct Components in a Single Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrum of Crude Oil *Analytical Chemistry* **2002**, *74* (16), 4145-4149.
- [8] Mühlberger, F.; Wieser, J.; Ulrich, A. and Zimmermann, R.: Single Photon Ionization (SPI) via Incoherent VUV-Excimer Light: Robust and Compact Time-of-Flight Mass Spectrometer for On-Line, Real-Time Process Gas Analysis *Analytical Chemistry* **2002**, *74* (15), 3790-3801.
- [9] Fenselau, C.; Caprioli, R.; Nier, A. O.;...: Mass spectrometry in the exploration of Mars *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38* (1), 1-10.
- [10] Loo, J. A.: Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry *Mass Spectrometry Reviews* **1997**, *16* (1), 1-23.
- [11] Smith, R. D.; Loo, J. A.; Edmonds, C. G.;...: New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization *Analytical Chemistry* **1990**, *62* (9), 882-899.

- [12] Han, X. and Gross, R. W.: Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics *Journal of Lipid Research* **2003**, *44* (6), 1071-1079.
- [13] Przybylski, M. and Glocker, M. O.: Electrospray Mass Spectrometry of Biomacromolecular Complexes with Noncovalent Interactions—New Analytical Perspectives for Supramolecular Chemistry and Molecular Recognition Processes *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35* (8), 806-826.
- [14] Siuzdak, G.: The emergence of mass spectrometry in biochemical research *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, *91* (24), 11290-11297.
- [15] Cornett, D. S.; Reyzer, M. L.; Chaurand, P. and Caprioli, R. M.: MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems *Nat Meth* **2007**, *4* (10), 828-833.
- [16] Humphery-Smith, I.; Cordwell, S. J. and Blackstock, W. P.: Proteome research: Complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds *ELECTROPHORESIS* **1997**, *18* (8), 1217-1242.
- [17] Mann, M.; Hendrickson, R. C. and Pandey, A.: ANALYSIS OF PROTEINS AND PROTEOMES BY MASS SPECTROMETRY *Annual Review of Biochemistry* **2001**, *70* (1), 437-473.
- [18] Fenselau, C. and Demirev, P. A.: Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry *Mass Spectrometry Reviews* **2001**, *20* (4), 157-171.
- [19] Heck, A. J. R. and van den Heuvel, R. H. H.: Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry *Mass Spectrometry Reviews* **2004**, *23* (5), 368-389.
- [20] Cooper, H. J.; Håkansson, K. and Marshall, A. G.: The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, *24* (2), 201-222.
- [21] Biemann, K. and Martin, S. A.: Mass spectrometric determination of the amino acid sequence of peptides and proteins *Mass Spectrometry Reviews* **1987**, *6* (1), 1-75.

- [22] Hopper, S.; Johnson, R. S.; Vath, J. E. and Biemann, K.: Glutaredoxin from rabbit bone marrow. Purification, characterization, and amino acid sequence determined by tandem mass spectrometry *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264* (34), 20438-20447.
- [23] McLafferty, F. W.; Kornfeld, R.; Haddon, W. F.;...: Metastable ion characteristics. XXIV. Application of collisional activation spectra to the elucidation of organic ion structures *Journal of the American Chemical Society* **1973**, *95* (12), 3886-3892.
- [24] Price, W. D.; Schnier, P. D. and Williams, E. R.: Tandem Mass Spectrometry of Large Biomolecule Ions by Blackbody Infrared Radiative Dissociation *Analytical Chemistry* **1996**, *68* (5), 859-866.
- [25] Paizs, B. and Suhai, S.: Fragmentation pathways of protonated peptides *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, *24* (4), 508-548.
- [26] Boyd, R. and Somogyi, Á.: The Mobile Proton Hypothesis in Fragmentation of Protonated Peptides: A Perspective *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, *21* 1275-1278.
- [27] Rice, O. K. and Ramsperger, H. C.: THEORIES OF UNIMOLECULAR GAS REACTIONS AT LOW PRESSURES *Journal of the American Chemical Society* **1927**, *49* (7), 1617-1629.
- [28] Rice, O. K. and Ramsperger, H. C.: THEORIES OF UNIMOLECULAR GAS REACTIONS AT LOW PRESSURES. II *Journal of the American Chemical Society* **1928**, *50* (3), 617-620.
- [29] Marcus, R. A. and Rice, O. K.: The Kinetics of the Recombination of Methyl Radicals and Iodine Atoms *The Journal of Physical Chemistry* **1951**, *55* (6), 894-908.
- [30] Moon, J. H.; Yoon, S. H. and Kim, M. S.: Photodissociation of singly protonated peptides at 193 nm investigated with tandem time-of-flight mass spectrometry *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19* (22), 3248-3252.
- [31] Morgan, J. and Russell, D.: Comparative studies of 193-nm photodissociation and TOF-TOFMS analysis of bradykinin analogues: The effects of charge site(s) and fragmentation timescales *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17* (5), 721-729.

- [32] Griffiths, I. W.: J. J. Thomson — the Centenary of His Discovery of the Electron and of His Invention of Mass Spectrometry *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, 11 (1), 2-16.
- [33] Gross, J. H.: *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*; 1. dt. ed.; Springer-Verlag, 2011; (ISBN: 978-3-8274-2980-3), p 132.
- [34] Gross, J. H.: *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*; 1. dt. ed.; Springer-Verlag, 2011; (ISBN: 978-3-8274-2980-3), p 154.
- [35] Makarov, A.: Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis *Analytical Chemistry* **2000**, 72 (6), 1156-1162.
- [36] Paul, W. and Raether, M.: Das elektrische Massenfilter *Z. Physik* **1955**, 140 (3), 262-273.
- [37] Gross, J. H.: *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*; 1. dt. ed.; Springer-Verlag, 2011; (ISBN: 978-3-8274-2980-3), p 169.
- [38] Paul, W.: Elektromagnetische Käfige für geladene und neutrale Teilchen (Nobel-Vortrag) *Angewandte Chemie* **1990**, 102 (7), 780-789.
- [39] Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M. and Fenn, J. B.: Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers *Analytical Chemistry* **1985**, 57 (3), 675-679.
- [40] Taylor, G.: Disintegration of Water Drops in an Electric Field *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* **1964**, 280 (1382), 383-397.
- [41] Rayleigh, J. W. S.: On the Equilibrium of Liquid *London, Edinburgh and Dublin philosophical magazine and journal of science* **1882**, 14 (Series 5), 184-186.
- [42] Kebarle, P. and Tang, L.: From ions in solution to ions in the gas phase - The mechanism of Elektrospray Mass Spectrometry *Analytical Chemistry* **1993**, 65 (22), 972-986.
- [43] Paul, W.; Steinwedel, H. and Naturforsch, Z.: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld *Zeitschrift für Naturforschung* **1953**, A8 448.

- [44] Atkins, P. W. and de Paula, J.: *Physikalische Chemie*; 4. dt. ed.; Wiley-VCH, 2006; (ISBN: 3-527-31546-2), p 333.
- [45] Wuerker, R. F.; Shelton, H. and Langmuir, R. V.: Electrodynamic Containment of Charged Particles *Journal of Applied Physics* **1959**, 30 (3), 342-349.
- [46] Gross, J. H.: *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*; 1. dt. ed.; Springer-Verlag, 2011; (ISBN: 978-3-8274-2980-3), p 184.
- [47] Remes, P. M. and Glish, G. L.: On The Time Scale of Internal Energy Relaxation of AP-MALDI and nano-ESI Ions in a Quadrupole Ion Trap *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, 20 (10), 1801-1812.
- [48] Gross, J. H.: *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*; 1. dt. ed.; Springer-Verlag, 2011; (ISBN: 978-3-8274-2980-3), p 475.
- [49] Jabłoński, A.: Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes *Nature* **1933**, 131 (3319), 839-840.
- [50] Jabłoński, A.: Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren *Z. Physik* **1935**, 94 (1-2), 38-46.
- [51] Kasha, M.: Phosphorescence and the Role of the Triplet State in the Electronic Excitation of Complex Molecules *Chemical Reviews* **1947**, 41 (2), 401-419.
- [52] Kasha, M.; Rawls, H. R. and Ashraf El-Bayoumi, M.: The exciton model in molecular spectroscopy *Pure and applied Chemistry* **1965**, 11 (3-4), 371-392.
- [53] Clark, L. B.: Polarization Assignments in the Vacuum UV Spectra of the Primary Amide, Carboxyl, and Peptide Groups *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117 (30), 7974-7986.
- [54] Perrin, J.: Matter and light: An essay toward formulation of the mechanism of chemical reactions *Annals of Physics* **1919**, 11 (9), 5-108.
- [55] Langmuir, I.: RADIATION AS A FACTOR IN CHEMICAL ACTION *Journal of the American Chemical Society* **1920**, 42 (11), 2190-2205.
- [56] Lindemann, F. A.; Arrhenius, S.; Langmuir, I.;...: Discussion on "the radiation theory of chemical action" *Transactions of the Faraday Society* **1922**, 17 (0), 598-606.



- [57] Hinshelwood, C. N.: On the Theory of Unimolecular Reactions *Proceedings of the Royal Society of London. Series A* **1926**, 113 (763), 230-233.
- [58] Kassel, L. S.: STUDIES IN HOMOGENOUS GAS REACTIONS I *Journal of Physical Chemistry* **1928**, 32 225-242.
- [59] Kassel, L. S.: STUDIES IN HOMOGENOUS GAS REACTIONS II INTRODUCTION OF QUANTUM THEORY *Journal of Physical Chemistry* **1928**, 32 1065-1079.
- [60] Green, N. J. B. In *Comprehensive Chemical Kinetics*; Green, N. J. B., Ed.; Elsevier: 2003; Vol. Volume 39, p 1-53.
- [61] McKeown, P. J. and Johnston, M. V.: Ion Decomposition versus Molecular Size Probed by Vacuum Ultraviolet Photoionization *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1991**, 2 (2), 103-107.
- [62] Schlag, E. W. and Levine, R. D.: Ionization, charge separation, charge recombination, and electron transfer in large systems *The Journal of Physical Chemistry* **1992**, 96 (26), 10608-10616.
- [63] Marcus, R. A.: Unimolecular Dissociations and Free Radical Recombination Reactions *The Journal of Chemical Physics* **1952**, 20 (3), 359-364.
- [64] Marcus, R. A.: Dissociation and Isomerization of Vibrationally Excited Species. III *The Journal of Chemical Physics* **1965**, 43 (8), 2658-2661.
- [65] Marcus, R. A.: Erratum: Dissociation and Isomerization of Vibrationally Excited Species *The Journal of Chemical Physics* **1970**, 52 (2), 1018-1018.
- [66] Griffin, L. L. and McAdoo, D. J.: The effect of ion size on rate of dissociation: RRKM calculations on model large polypeptide ions *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, 4 (1), 11-15.
- [67] Schlag, E. W. and Levine, R. D.: On the unimolecular dissociation of large molecules *Chemical Physics Letters* **1989**, 163 (6), 523-530.
- [68] Boesl, U.; Neusser, H. J. and Schlag, E. W.: Visible and UV multiphoton ionization and fragmentation of polyatomic molecules *The Journal of Chemical Physics* **1980**, 72 (8), 4327-4333.

- [69] Boesl, U.; Neusser, H. J. and Schlag, E. W.: Secondary excitation of ions in a multiphoton mass spectrometer *Chemical Physics Letters* **1982**, 87 (1), 1-6.
- [70] Dietz, W.; Neusser, H. J.; Boesl, U.;...: A model for multiphoton ionisation mass spectroscopy with application to benzene *Chemical Physics* **1982**, 66 (1-2), 105-127.
- [71] Boesl, U.; Weinkauf, R.; Walter, K.;...: Tandem time of flight techniques and multiphoton mass spectrometry: the ladder switching in benzene *The Journal of Physical Chemistry* **1990**, 94 (23), 8567-8573.
- [72] Roepstorff, P. and Fohlman, J.: Letter to the editors *Biological Mass Spectrometry* **1984**, 11 (11), 601-601.
- [73] Johnson, R. S.; Martin, S. A. and Biemann, K.: Collision-induced fragmentation of (M + H)<sup>+</sup> ions of peptides. Side chain specific sequence ions *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1988**, 86 (0), 137-154.
- [74] Mueller, D. R.; Eckersley, M. and Richter, W. J.: Hydrogen transfer reactions in the formation of "Y + 2" sequence ions from protonated peptides *Organic Mass Spectrometry* **1988**, 23 (3), 217-222.
- [75] Kenny, P. T. M.; Nomoto, K. and Orlando, R.: Fragmentation studies of peptides: The formation of Y ions *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1992**, 6 (2), 95-97.
- [76] Jones, J. L.; Dongre, A. R.; Somogyi, A. and Wysocki, V. H.: Sequence Dependence of Peptide Fragmentation Efficiency Curves Determined by Electrospray Ionization/Surface-Induced Dissociation Mass Spectrometry *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116 (18), 8368-8369.
- [77] Dongré, A. R.; Jones, J. L.; Somogyi, Á. and Wysocki, V. H.: Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118 (35), 8365-8374.
- [78] Wysocki, V. H.; Tsaprailis, G.; Smith, L. L. and Brechi, L. A.: Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35 (12), 1399-1406.

- [79] Burlet, O.; Yang, C.-Y. and Gaskell, S. J.: Influence of cysteine to cysteic acid oxidation on the collision-activated decomposition of protonated peptides: evidence for intraionic interactions *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1992**, 3 (4), 337-344.
- [80] Cox, K. A.; Gaskell, S. J.; Morris, M. and Whiting, A.: Role of the site of protonation in the low-energy decompositions of gas-phase peptide ions *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1996**, 7 (6), 522-531.
- [81] Summerfield, S. G.; Cox, K. A. and Gaskell, S. J.: The promotion of d-type ions during the low energy collision-induced dissociation of some cysteic acid-containing peptides *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, 8 (1), 25-31.
- [82] Summerfield, S. G.; Whiting, A. and Gaskell, S. J.: Intra-ionic interactions in electrosprayed peptide ions *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1997**, 162 (1-3), 149-161.
- [83] Tsang, C. W. and Harrison, A. G.: Chemical ionization of amino acids *Journal of the American Chemical Society* **1976**, 98 (6), 1301-1308.
- [84] Harrison, A. G. and Yalcin, T.: Proton mobility in protonated amino acids and peptides *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1997**, 165 339-347.
- [85] Tang, X.-J.; Boyd, R. K. and Bertrand, M. J.: An investigation of fragmentation mechanisms of doubly protonated tryptic peptides *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1992**, 6 (11), 651-657.
- [86] Tang, X. J.; Thibault, P. and Boyd, R. K.: Fragmentation reactions of multiply-protonated peptides and implications for sequencing by tandem mass spectrometry with low-energy collision-induced dissociation *Analytical Chemistry* **1993**, 65 (20), 2824-2834.
- [87] Johnson, R. S.; Krylov, D. and Walsh, K. A.: Proton mobility within electrosprayed peptide ions *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, 30 (2), 386-387.

- [88] McCormack, A. L.; Somogyi, A.; Dongre, A. R. and Wysocki, V. H.: Fragmentation of protonated peptides: surface-induced dissociation in conjunction with a quantum mechanical approach *Analytical Chemistry* **1993**, *65* (20), 2859-2872.
- [89] Somogyi, Á.; Wysocki, V. H. and Mayer, I.: The effect of protonation site on bond strengths in simple peptides: Application of ab initio and modified neglect of differential overlap bond orders and modified neglect of differential overlap energy partitioning *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1994**, *5* (8), 704-717.
- [90] Bull, H. B. and Breese, K.: Surface tension of amino acid solutions: A hydrophobicity scale of the amino acid residues *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1974**, *161* (2), 665-670.
- [91] Gorman, G. S.; Speir, J. P.; Turner, C. A. and Amster, I. J.: Proton affinities of the 20 common .alpha.-amino acids *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (10), 3986-3988.
- [92] Laskin, J.; Yang, Z.; Song, T.;...: Effect of the Basic Residue on the Energetics, Dynamics, and Mechanisms of Gas-Phase Fragmentation of Protonated Peptides *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (45), 16006-16016.
- [93] Klassen, J. S. and Kebarle, P.: Collision-Induced Dissociation Threshold Energies of Protonated Glycine, Glycinamide, and Some Related Small Peptides and Peptide Amino Amides *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (28), 6552-6563.
- [94] Laskin, J.; Denisov, E. and Futrell, J.: A Comparative Study of Collision-Induced and Surface-Induced Dissociation. 1. Fragmentation of Protonated Dialanine *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (40), 9703-9714.
- [95] Schnier, P. D.; Price, W. D.; Jockusch, R. A. and Williams, E. R.: Blackbody Infrared Radiative Dissociation of Bradykinin and Its Analogues: Energetics, Dynamics, and Evidence for Salt-Bridge Structures in the Gas Phase *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (30), 7178-7189.

- [96] Haddon, W. F. and McLafferty, F. W.: Metastable ion characteristics. VII. Collision-induced metastables *Journal of the American Chemical Society* **1968**, *90* (17), 4745-4746.
- [97] Haddon, W. F. and McLafferty, F. W.: Metastable ion characteristics. Measurements with a modified time-of-flight mass spectrometer *Analytical Chemistry* **1969**, *41* (1), 31-36.
- [98] McLafferty, F. W.; Bente, P. F.; Kornfeld, R.;...: Metastable ion characteristics. XXII. Collisional activation spectra of organic ions *Journal of the American Chemical Society* **1973**, *95* (7), 2120-2129.
- [99] Jennings, K. R.: Collision-induced decompositions of aromatic molecular ions *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **1968**, *1* (3), 227-235.
- [100] Ast, T.; Beynon, J. H. and Cooks, R. G.: Long-lived states of rare gas ions. Ion kinetic energy study *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94* (19), 6611-6621.
- [101] Beynon, J. H.; Caprioli, R. M. and Ast, T.: A simple modification of mass spectrometer for the study of collision-induced fragmentations *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **1971**, *7* (1), 88-92.
- [102] Cooks, R. G.; Beynon, J. H. and Ast, T.: Stripping reactions of gaseous ions in the mass spectrometer *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94* (3), 1004-1006.
- [103] Keough, T.; Beynon, J. H. and Cooks, R. G.: -E Mass spectra *Journal of the American Chemical Society* **1973**, *95* (5), 1695-1697.
- [104] Beverly, M. B.; Voorhees, K. J. and Hadfield, T. L.: Direct mass spectrometric analysis of Bacillus spores *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13* (23), 2320-2326.
- [105] Glish, G. L. and Vachet, R. W.: The basics of mass spectrometry in the twenty-first century *Nature Reviews. Drug Discovery* **2003**, *2* (2), 140-150.

- [106] McLuckey, S. A. and Mentinova, M.: Ion/Neutral, Ion/Electron, Ion/Photon, and Ion/Ion Interactions in Tandem Mass Spectrometry: Do we need them all? Are they enough? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**, *22* (1), 3-12.
- [107] Syrstad, E. A. and Tureček, F.: Toward a general mechanism of electron capture dissociation *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16* (2), 208-224.
- [108] Kruger, N. A.; Zubarev, R. A.; Carpenter, B. K.;...: Electron capture versus energetic dissociation of protein ions *International Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *182–183* (0), 1-5.
- [109] McLafferty, F. W.; Horn, D. M.; Breuker, K.;...: Electron capture dissociation of gaseous multiply charged ions by fourier-transform ion cyclotron resonance *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2001**, *12* (3), 245-249.
- [110] Zubarev, R.; Haselmann, K.; Budnik, B.;...: Account: Towards an understanding of the mechanism of electron-capture dissociation: a historical perspective and modern ideas *European Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *8* (5), 337-349.
- [111] Zubarev, R. A.: Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase *Mass Spectrometry Reviews* **2003**, *22* (1), 57-77.
- [112] Bakhtiar, R. and Guan, Z.: Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry in Characterization of Peptides and Proteins *Biotechnology Letters* **2006**, *28* (14), 1047-1059.
- [113] Ge, Y.; Lawhorn, B. G.; ElNaggar, M.;...: Top Down Characterization of Larger Proteins (45 kDa) by Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (4), 672-678.
- [114] Papayannopoulos, I. A.: The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides *Mass Spectrometry Reviews* **1995**, *14* (1), 49-73.
- [115] Levsen, K. and Schwarz, H.: Stoßaktivierungsmassenspektrometrie - eine neue Sonde zur Strukturbestimmung von Ionen in der Gasphase *Angewandte Chemie* **1976**, *88* (18), 589-599.

- [116] Hesse, M.; Meier, H. and Zeeh, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; 7. ed. ed.; Thieme Verlag, 2005; (ISBN: 3-13-576107-X), p 282.
- [117] McLuckey, S. A.: Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1992**, 3 (6), 599-614.
- [118] Hamidane, H. B.; Chiappe, D.; Hartmer, R.;...;: Electron Capture and Transfer Dissociation: Peptide Structure Analysis at Different Ion Internal Energy Levels *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, 20 (4), 567-575.
- [119] Duprè, M.; Cantel, S.; Verdiè, P.;...;: Sequencing Lys-N Proteolytic Peptides by ESI and MALDI Tandem Mass Spectrometry *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**, 22 265-279.
- [120] Seidler, J.; Zinn, N.; Boehm, M. E. and Lehmann, W. D.: De novo sequencing of peptides by MS/MS *Proteomics* **2010**, 10 (4), 634-649.
- [121] Black, D. M.; Payne, A. H. and Glish, G. L.: Determination of Cooling Rates in a Quadrupole Ion Trap *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, 17 (7), 932-938.
- [122] Remes, P. M. and Glish, G. L.: Collisional cooling in a quadrupole ion trap at sub-ambient temperatures *International Journal of Mass Spectrometry* **2007**, 265 (2-3), 176-181.
- [123] Goeringer, D. E. and McLuckey, S. A.: Relaxation of internally excited high-mass ions simulated under typical quadrupole ion trap storage conditions *International Journal of Mass Spectrometry* **1998**, 177 (2-3), 163-174.
- [124] Wilson, J. J. and Brodbelt, J. S.: MS/MS Simplification by 355 nm Ultraviolet Photodissociation of Chromophore-Derivatized Peptides in a Quadrupole Ion Trap *Analytical Chemistry* **2007**, 79 (20), 7883-7892.
- [125] Andersen, J. U.; Cederquist, H.; Forster, J. S.;...;: Photodissociation of protonated amino acids and peptides in an ion storage ring. Determination of Arrhenius parameters in the high-temperature limit *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, 6 (10), 2676-2681.

- [126] Oh, J. Y.; Moon, J. H. and Kim, M. S.: Sequence- and site-specific photodissociation at 266 nm of protonated synthetic polypeptides containing a tryptophanyl residue *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18* (22), 2706-2712.
- [127] Agarwal, A.; Diedrich, J. K. and Julian, R. R.: Direct Elucidation of Disulfide Bond Partners Using Ultraviolet Photodissociation Mass Spectrometry *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (17), 6455-6458.
- [128] Hettick, J. M.; McCurdy, D. L.; Barbacci, D. C. and Russell, D. H.: Optimization of Sample Preparation for Peptide Sequencing by MALDI-TOF Photofragment Mass Spectrometry *Analytical Chemistry* **2001**, *73* (22), 5378-5386.
- [129] Thompson, M. S.; Cui, W. and Reilly, J. P.: Fragmentation of Singly Charged Peptide Ions by Photodissociation at  $\lambda=157$  nm *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43* (36), 4791-4794.
- [130] Fung, Y. M. E.; Kjeldsen, F.; Silivra, O. A.;...: Facile Disulfide Bond Cleavage in Gaseous Peptide and Protein Cations by Ultraviolet Photodissociation at 157 nm *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (39), 6399-6403.
- [131] Kjeldsen, F.; Silivra, O. A. and Zubarev, R. A.: Zwitterionic States in Gas-Phase Polypeptide Ions Revealed by 157-nm Ultra-Violet Photodissociation *Chemistry – A European Journal* **2006**, *12* (30), 7920-7928.
- [132] Peterson, D. L. and Simpson, W. T.: Polarized Electronic Absorption Spectrum of Amides with Assignments of Transitions<sup>1</sup> *Journal of the American Chemical Society* **1957**, *79* (10), 2375-2382.
- [133] Woody, R. W. and Koslowski, A.: Recent developments in the electronic spectroscopy of amides and  $\alpha$ -helical polypeptides *Biophysical Chemistry* **2002**, *101–102* (0), 535-551.
- [134] Parthasarathi, R.; He, Y.; Reilly, J. P. and Raghavachari, K.: New Insights into the Vacuum UV Photodissociation of Peptides *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (5), 1606-1610.
- [135] Radloff, W.: *Laser in Wissenschaft und Technik*; Spektrum Akademischer Verlag, 2010; (ISBN: 978-3-8274-2427-3), p 1.



- [136] Eichler, J. and Eichler, H. J.: *Laser - Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*; 7. ed.; Springer-Verlag, 2010; (ISBN: 978-3-642-10461-9), p 2.
- [137] Kneubühl, F. K. and Sigrist, M. W.: *Laser*; 7. ed.; Vieweg+Teubner, 2008; (ISBN: 978-8351-0145-6), p 34.
- [138] Eichler, J. and Eichler, H. J.: *Laser - Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*; 7. ed.; Springer-Verlag, 2010; (ISBN: 978-3-642-10461-9), p 32f.
- [139] Eichler, J. and Eichler, H. J.: *Laser - Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*; 7. ed.; Springer-Verlag, 2010; (ISBN: 978-3-642-10461-9), p 34.
- [140] Meschede, D.: *Optik, Licht und Laser*; 3. ed.; Vieweg+Teuber, 2008; (ISBN: 978-3-8351-0143-2), p 277.
- [141] Harrison, A. G.: The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides *Mass Spectrometry Reviews* **1997**, *16* (4), 201-217.
- [142] Creaser, C. S. and Stygall, J. W.: A comparison of overtone and fundamental resonances for mass range extension by resonance ejection in a quadrupole ion trap mass spectrometer *International Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *190–191* (0), 145-151.
- [143] Splendore, M.; Lausevic, M.; Lausevic, Z. and March, R. E.: Resonant Excitation and/or Ejection of Ions Subjected to DC and RF fields in a Commercial Quadrupole Ion Trap *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11* (2), 228-233.
- [144] Serrano-Andrès, L. F., M. P.: Theoretical Study of the electronic Spektroskopy of Peptides. 1. The peptidic Bond: Primary, Secondary and Tertiary Amids *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* 12190-12199.
- [145] Hirst, J. D. H., D. M.; Brooks III, C. L.: Multireference Configuration Interaction Calculations of Elektronic States of N-Methylformamide, Acetamide and N.Methylacetamide *Journal of Physical Chemistry* **1997**, *101* 4821-4827.
- [146] Robin, M. B.: *Higher Excited States of Polyatomic Molecules*; Academic Press, 1975; Vol. II p 121-140.
- [147] Robin, M. B.: *Higher Excited States of Polyatomic Molecules*; Academic Press, 1975; Vol. II p 139.

- [148] Atkins, P. W. and de Paula, J.: *Physikalische Chemie*; 4. dt. ed.; Wiley-VCH, 2006; (ISBN: 3-527-31546-2), p 425.
- [149] Csonka, I. P.; Paizs, B. and Suhai, S.: Modeling of the gas-phase ion chemistry of protonated arginine *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, 39 (9), 1025-1035.
- [150] Mukkamala, D.; Zhang, Y. and Oldfield, E.: A Solid State <sup>13</sup>C NMR, Crystallographic, and Quantum Chemical Investigation of Phenylalanine and Tyrosine Residues in Dipeptides and Proteins *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (23), 7385-7392.
- [151] Simon, E.; Papoulias, P. and Andrews, P.: Gas-phase fragmentation characteristics of benzyl-aminated lysyl-containing tryptic peptides *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, 21 (9), 1624-1632.
- [152] Wyttenbach, T.; von Helden, G. and Bowers, M. T.: Gas-Phase Conformation of Biological Molecules: Bradykinin *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118 (35), 8355-8364.
- [153] Wiedemann, S.; Metsala, A.; Nolting, D. and Weinkauff, R.: The dipeptide cyclic(glycyltryptophanyl) in the gas phase: A concerted action of density functional calculations, S<sub>0</sub>-S<sub>1</sub> two-photon ionization, spectral UV/UV hole burning and laser photoelectron spectroscopy *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, 6 (10), 2641-2649.
- [154] Nolting, D.; Schultz, T.; Hertel, I. V. and Weinkauff, R.: Excited state dynamics and fragmentation channels of the protonated dipeptide H<sub>2</sub>N-Leu-Trp-COOH *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, 8 (44), 5247-5254.
- [155] Lakowicz, J. R.: *Prinziples of Fluorescence Spektroskopie*; 2. ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers (KA/PP), 1999; (ISBN: 0-306-46093-9), p 16.
- [156] Crowell, R. A.; Lian, R.; Shkrob, I. A.;...: Ultrafast dynamics for electron photodetachment from aqueous hydroxide *The Journal of Chemical Physics* **2004**, 120 (24), 11712-11725.
- [157] Sauer, M. C.; Crowell, R. A. and Shkrob, I. A.: Electron Photodetachment from Aqueous Anions. 1. Quantum Yields for Generation of Hydrated Electron by 193 and 248 nm Laser Photoexcitation of Miscellaneous Inorganic Anions† *The Journal of Physical Chemistry A* **2004**, 108 (25), 5490-5502.

- [158] Matheson, M. S.; Mulac, W. A. and Rabani, J.: FORMATION OF THE HYDRATED ELECTRON IN THE FLASH PHOTOLYSIS OF AQUEOUS SOLUTIONS1 *The Journal of Physical Chemistry* **1963**, 67 (12), 2613-2617.
- [159] Devonshire, R. and Weiss, J. J.: Nature of the transient species in the photochemistry of negative ions in aqueous solution *The Journal of Physical Chemistry* **1968**, 72 (11), 3815-3820.
- [160] Sauer, M. C.; Shkrob, I. A.; Lian, R.;...; Electron Photodetachment from Aqueous Anions. 2. Ionic Strength Effect on Geminate Recombination Dynamics and Quantum Yield for Hydrated Electron *The Journal of Physical Chemistry A* **2004**, 108 (47), 10414-10425.
- [161] Lian, R.; Oulianov, D. A.; Crowell, R. A.;...; Electron Photodetachment from Aqueous Anions. 3. Dynamics of Geminate Pairs Derived from Photoexcitation of Mono- vs Polyatomic Anions† *The Journal of Physical Chemistry A* **2006**, 110 (29), 9071-9078.
- [162] Jakubke, H.-D. and Jeschkeit, H.: *Aminosäuren, Peptide, Proteine*; Verlag Chemie, 1982; (ISBN: 3-527-25892-2), p 40.
- [163] Lioe, H.; O'Hair, R. A. J. and Reid, G. E.: Gas-phase reactions of protonated tryptophan *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, 15 (1), 65-76.
- [164] El Aribi, H.; Orlova, G.; Hopkinson, A. C. and Siu, K. W. M.: Gas-Phase Fragmentation Reactions of Protonated Aromatic Amino Acids: Concomitant and Consecutive Neutral Eliminations and Radical Cation Formations *The Journal of Physical Chemistry A* **2004**, 108 (17), 3844-3853.
- [165] Mino, W. K.; Gulyuz, K.; Wang, D.;...; Gas-Phase Structure and Dissociation Chemistry of Protonated Tryptophan Elucidated by Infrared Multiple-Photon Dissociation Spectroscopy *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2011**, 2 (4), 299-304.
- [166] Boesl, U.: *Resonante Laseranregung und Massenspektrometrie*; Habilitationsschrift, 1987; p 43.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

[M] <sup>x+</sup>	Mutterion x-fach positive geladen
Ang.	Angiotensin
BIRD	<i>black body infrared dissociation</i>
Brad.	Bradykinin
Bsp.	Beispiel
bzw.	Beziehungsweise
C	Coulombkraft
CID	<i>collision induced dissociation</i>
CTTS	<i>charge transfer to solvent</i>
ECD	<i>electron capture dissociation</i>
ESI	<i>elektrospray ionisation</i>
Excimer	<i>excited dimer</i>
F	Fluoreszenz
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz
F <sub>x</sub>	Fragment x
Gram. A	Gramicidin A
IC	<i>internal conversion</i>
I <sub>F</sub> (M <sup>x+</sup> )	Intensitätsabnahme
In. B	Insulin B
IRMPD	Infrarot-Multiphotonen-Dissoziation
ISC	<i>intersystem crossing</i>
IVR	<i>intramolecular vibrational energy redistribution</i>
LASER	<i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LWMR	Tetrapeptid Leucin-Tryptophan-Methionin-Arginin
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
MS	Massenspektrometer
P	Phosphoreszenz
R2PI	Resonante Zwei-Photonen-Photoionisation
Ref.	Referenz
rel.	Relativ
RF	Radiofrequenz
RRK	Rice-Ramsperger-Kassel-Theorie
RRKM	Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus-Theorie

SID	<i>solid induced dissociation</i>
t	Zeit
ToF	<i>time of flight</i>
UV	Ultraviolet
UV-PD	Ultraviolett-Photodissoziation
VIS	<i>visible</i>
VUV	Vakuum-ultraviolet
z.B.	Zum Beispiel

### **Einheiten**

cm	Zentimeter
mm	Millimeter
µm	Micrometer
nm	Nanometer
Å	Ångström ( $1 \cdot 10^{-10}$ Meter)
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
ms	Millisekunde
µs	Microsekunde
ns	Nanosekunde
eV	Elektronenvolt
keV	Kiloelektronenvolt
hν	Energie eines Photons
mbar	Millibar
V	Volt
kV	Kilovolt
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Microliter
g	Gramm
°C	Grad Celsius
mJ	Millijoule

## **Aminosäuren**

Ala (A)	Alanin
Arg (R)	Arginin
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Asparaginsäure
Cys (C)	Cystein
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutaminsäure
Gly (G)	Glycin
His (H)	Histidin
Ile (I)	Isoleucin
Leu (L)	Leucin
Lys (K)	Lysin
Met (M)	Methionin
Phe (F)	Phenylalanin
Pro (P)	Prolin
Ser (S)	Serin
Thr (T)	Threonin
Trp (W)	Tryptophan
Tyr (Y)	Tyrosin
Val (V)	Valin

## 8 Anhang

### Berechnung der Populationsverteilungen

In Tabelle I sind die  $\sigma$ -Werte der einzelnen Anregungsstellen noch einmal aufgelistet.

Anregungsstelle	$\sigma$ -Wert
N-Terminus	$7,60 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2$
Peptidbindung	$1,24 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$
protonierte Peptidbindung	$6,56 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2$
Arg	$1,73 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$
Trp	$4,13 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$

Am Beispiel des LWMR soll hier einmal exemplarisch die Berechnung der Zahl der absorbierten Photonen gezeigt werden.

#### LWMR

Mit 3 Peptidbindungen, einem Arginin, einem Tryptophan, einer Intensität von  $1,57189 \cdot 10^{16}$  Photonen/cm<sup>2</sup> und einem Intervall  $\Delta b$  von 1/1000 ergibt sich

$$\sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot \Delta b = (3 \cdot \sigma_{\text{Peptidbindung}} + \sigma_{\text{Arg}} + \sigma_{\text{Trp}}) \cdot 1,57189 \cdot 10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2} \cdot \frac{1}{1000} = 0,00150697$$

Mit diesem Wert führt man anschließend die Berechnungen der einzelnen Iterationsschritte gemäß der Formeln 32 – 35 (S. 164 f.) durch. Um die Berechnung zu vereinfachen wird die Anzahl der Moleküle mit dem Energieinhalt  $0h\nu$ , welche bei  $0 \Delta b$  zunächst 100% entsprechen, als 1 gesetzt und erst am Ende der Rechnung die Werte in Prozent umgerechnet. Für LWMR ergeben sich dann folgende Werte:

Iterations- schritt	$N_{0h\nu}$	$N_{1h\nu}$	$N_{2h\nu}$	$N_{3h\nu}$	$N_{4h\nu}$	$N_{5h\nu}$	$N_{6h\nu}$
0 $\Delta b$	1	0	0	0	0	0	0
1 $\Delta b$	$9,98 \cdot 10^{-01}$	$1,51 \cdot 10^{-03}$	0	0	0	0	0
2 $\Delta b$	$9,97 \cdot 10^{-01}$	$3,01 \cdot 10^{-03}$	$2,27 \cdot 10^{-06}$	0	0	0	0
3 $\Delta b$	$9,95 \cdot 10^{-01}$	$4,51 \cdot 10^{-03}$	$6,80 \cdot 10^{-06}$	$3,42 \cdot 10^{-09}$	0	0	0
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
1000 $\Delta b$	$2,21 \cdot 10^{-01}$	$3,34 \cdot 10^{-01}$	$2,52 \cdot 10^{-01}$	$1,26 \cdot 10^{-01}$	$4,76 \cdot 10^{-02}$	$1,43 \cdot 10^{-02}$	$3,58 \cdot 10^{-03}$
%	<b>22,1</b>	<b>33,4</b>	<b>25,2</b>	<b>12,6</b>	<b>4,8</b>	<b>1,4</b>	<b>0,4</b>



Da LWMR eine Restintensität von 75,3% im Laserexperiment ohne Helium besaß, kann man diesen Wert mit der Summe aus der iterativ bestimmten Populationsverteilung vergleichen. Dabei ergibt sich durch die Addition der Werte  $N_{0hv}$  und  $N_{1hv}$  nur eine Prozentzahl von 55,5%. Erst durch das weitere Addieren des  $N_{1hv}$ -Wertes werden die 75,3% des Experimentalwertes überschritten (80,2%). Für die Dissoziation bedeutet dies, dass erst durch die Absorption eines zweiten Photons das Molekül genügend Energie besitzt um zu fragmentieren.

Für die restlichen hier verwendeten Substanzen wurde die Berechnung analog zu dieser durchgeführt.

### Bradykinin

Mit 8 Peptidbindungen, zwei Argininen, zwei Aromaten sowie einer Intensität von  $1,20914 \cdot 10^{16}$  Photonen/cm<sup>2</sup> und einem Intervall  $\Delta b$  von 1/1000 ergibt sich

$$\sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot \Delta b = (8 \cdot \sigma_{\text{Peptidbindung}} + 2 \cdot \sigma_{\text{Arg}} + 2 \cdot \sigma_{\text{Trp}}) \cdot 1,20914 \cdot 10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2} \cdot \frac{1}{1000} = 0,0026191$$

Iterations-schritt	$N_{0hv}$	$N_{1hv}$	$N_{2hv}$	$N_{3hv}$	$N_{4hv}$	$N_{5hv}$	$N_{6hv}$
0 $\Delta b$	1	0	0	0	0	0	0
1 $\Delta b$	$9,97 \cdot 10^{-01}$	$2,62 \cdot 10^{-03}$	0	0	0	0	0
2 $\Delta b$	$9,95 \cdot 10^{-01}$	$5,22 \cdot 10^{-03}$	$6,86 \cdot 10^{-06}$	0	0	0	0
3 $\Delta b$	$9,92 \cdot 10^{-01}$	$7,82 \cdot 10^{-03}$	$2,05 \cdot 10^{-05}$	$1,80 \cdot 10^{-08}$	0	0	0
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
1000 $\Delta b$	$7,26 \cdot 10^{-02}$	$1,91 \cdot 10^{-01}$	$2,50 \cdot 10^{-01}$	$2,19 \cdot 10^{-01}$	$1,43 \cdot 10^{-01}$	$7,48 \cdot 10^{-02}$	$3,26 \cdot 10^{-02}$
%	<b>7,3</b>	<b>19,1</b>	<b>25,0</b>	<b>21,9</b>	<b>14,3</b>	<b>7,5</b>	<b>3,3</b>
Exp. Wert	40,6%						

## Angiotensin II

Mit 7 Peptidbindungen, einem Arginin, drei Aromaten sowie einer Intensität von  $1,57189 \cdot 10^{16}$  Photonen/cm<sup>2</sup> und einem Intervall  $\Delta b$  von 1/1000 ergibt sich

$$\sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot \Delta b = (7 \cdot \sigma_{\text{Peptidbindung}} + 1 \cdot \sigma_{\text{Arg}} + 3 \cdot \sigma_{\text{Trp}}) \cdot 1,57189 \cdot 10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2} \cdot \frac{1}{1000}$$

$$= 0,00358712$$

Iterations- schritt	N <sub>0hv</sub>	N <sub>1hv</sub>	N <sub>2hv</sub>	N <sub>3hv</sub>	N <sub>4hv</sub>	N <sub>5hv</sub>	N <sub>6hv</sub>
0 $\Delta b$	1	0	0	0	0	0	0
1 $\Delta b$	$9,96 \cdot 10^{-01}$	$3,59 \cdot 10^{-03}$	0	0	0	0	0
2 $\Delta b$	$9,93 \cdot 10^{-01}$	$7,15 \cdot 10^{-03}$	$1,29 \cdot 10^{-05}$	0	0	0	0
3 $\Delta b$	$9,89 \cdot 10^{-01}$	$1,07 \cdot 10^{-02}$	$3,85 \cdot 10^{-05}$	$4,62 \cdot 10^{-08}$	0	0	0
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
1000 $\Delta b$	$2,75 \cdot 10^{-02}$	$9,90 \cdot 10^{-02}$	$1,78 \cdot 10^{-01}$	$2,13 \cdot 10^{-01}$	$1,91 \cdot 10^{-01}$	$1,37 \cdot 10^{-01}$	$8,19 \cdot 10^{-02}$
<b>%</b>	<b>2,7</b>	<b>9,9</b>	<b>17,8</b>	<b>21,3</b>	<b>19,1</b>	<b>13,7</b>	<b>8,2</b>
Exp. Wert	64,5%						

## Angiotensin I

Mit 9 Peptidbindungen, einem Arginin, vier Aromaten sowie einer Intensität von  $1,2696 \cdot 10^{16}$  Photonen/cm<sup>2</sup> und einem Intervall  $\Delta b$  von 1/1000 ergibt sich

$$\sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot \Delta b = (9 \cdot \sigma_{\text{Peptidbindung}} + 1 \cdot \sigma_{\text{Arg}} + 4 \cdot \sigma_{\text{Trp}}) \cdot 1,2696 \cdot 10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2} \cdot \frac{1}{1000}$$

$$= 0,00373735$$

Iterations- schritt	N <sub>0hv</sub>	N <sub>1hv</sub>	N <sub>2hv</sub>	N <sub>3hv</sub>	N <sub>4hv</sub>	N <sub>5hv</sub>	N <sub>6hv</sub>
0 $\Delta b$	1	0	0	0	0	0	0
1 $\Delta b$	$9,96 \cdot 10^{-01}$	$3,74 \cdot 10^{-03}$	0	0	0	0	0
2 $\Delta b$	$9,93 \cdot 10^{-01}$	$7,45 \cdot 10^{-03}$	$1,40 \cdot 10^{-05}$	0	0	0	0
3 $\Delta b$	$9,89 \cdot 10^{-01}$	$1,11 \cdot 10^{-02}$	$4,17 \cdot 10^{-05}$	$5,22 \cdot 10^{-08}$	0	0	0
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
1000 $\Delta b$	$2,37 \cdot 10^{-02}$	$8,87 \cdot 10^{-02}$	$1,66 \cdot 10^{-01}$	$2,07 \cdot 10^{-01}$	$1,94 \cdot 10^{-01}$	$1,45 \cdot 10^{-01}$	$9,02 \cdot 10^{-02}$
<b>%</b>	<b>2,4</b>	<b>8,9</b>	<b>16,6</b>	<b>20,7</b>	<b>19,4</b>	<b>14,5</b>	<b>9,0</b>
Exp. Wert	60,0%						

## Gramicidin A

Mit 14 Peptidbindungen, vier Aromaten, dem protonierten N-Terminus sowie einer Intensität von  $2,05554 \cdot 10^{16}$  Photonen/cm<sup>2</sup> und einem Intervall  $\Delta b$  von 1/1000 ergibt sich

$$\sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot \Delta b = (14 \cdot \sigma_{\text{Peptidbindung}} + 4 \cdot \sigma_{\text{Trp}} + \sigma_{\text{N-Terminus}}) \cdot 2,05554 \cdot 10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2} \cdot \frac{1}{1000}$$

$$= 0,00713007$$

Iterations- schritt	N <sub>0hv</sub>	N <sub>1hv</sub>	N <sub>2hv</sub>	N <sub>3hv</sub>	N <sub>4hv</sub>	N <sub>5hv</sub>	N <sub>6hv</sub>
0 $\Delta b$	1	0	0	0	0	0	0
1 $\Delta b$	$9,93 \cdot 10^{-01}$	$7,13 \cdot 10^{-03}$	0	0	0	0	0
2 $\Delta b$	$9,86 \cdot 10^{-01}$	$1,42 \cdot 10^{-02}$	$5,08 \cdot 10^{-05}$	0	0	0	0
3 $\Delta b$	$9,79 \cdot 10^{-01}$	$2,11 \cdot 10^{-02}$	$1,51 \cdot 10^{-04}$	$3,63 \cdot 10^{-07}$	0	0	0
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
1000 $\Delta b$	$7,80 \cdot 10^{-04}$	$5,61 \cdot 10^{-03}$	$2,01 \cdot 10^{-02}$	$4,80 \cdot 10^{-02}$	$8,60 \cdot 10^{-02}$	$1,23 \cdot 10^{-01}$	$1,47 \cdot 10^{-01}$
<b>%</b>	<b>0,1</b>	<b>0,6</b>	<b>2,0</b>	<b>4,8</b>	<b>8,6</b>	<b>12,3</b>	<b>14,6</b>

Iterations- schritt	N <sub>7hv</sub>	N <sub>8hv</sub>	N <sub>9hv</sub>	N <sub>10hv</sub>	N <sub>11hv</sub>	N <sub>12hv</sub>	N <sub>13hv</sub>
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
1000 $\Delta b$	$1,49 \cdot 10^{-01}$	$1,33 \cdot 10^{-01}$	$1,05 \cdot 10^{-01}$	$7,50 \cdot 10^{-02}$	$4,85 \cdot 10^{-02}$	$2,87 \cdot 10^{-02}$	$1,57 \cdot 10^{-02}$
<b>%</b>	<b>14,9</b>	<b>13,3</b>	<b>10,5</b>	<b>7,5</b>	<b>4,8</b>	<b>2,9</b>	<b>1,6</b>

Exp. Wert 76,6%

Wie man an dieser Berechnung erkennt, reicht es hier nicht mehr nur die Besetzungen mit den ersten 6 Energieinhalten zu zeigen.

## Insulin B

Mit 29 Peptidbindungen, einem Arginin, sieben Aromaten sowie einer Intensität von  $1,51143 \cdot 10^{16}$  Photonen/cm<sup>2</sup> und einem Intervall  $\Delta b$  von 1/1000 ergibt sich

$$\sum_{i=1}^n \sigma_i \cdot I \cdot \Delta b = (29 \cdot \sigma_{\text{Peptidbindung}} + 7 \cdot \sigma_{\text{Trp}} + \sigma_{\text{Arg}}) \cdot 1,51143 \cdot 10^{16} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2} \cdot \frac{1}{1000}$$

$$= 0,01008043$$

Iterations- schritt	N <sub>0hv</sub>	N <sub>1hv</sub>	N <sub>2hv</sub>	N <sub>3hv</sub>	N <sub>4hv</sub>	N <sub>5hv</sub>	N <sub>6hv</sub>
0 $\Delta b$	1	0	0	0	0	0	0
1 $\Delta b$	$9,90 \cdot 10^{-01}$	$1,01 \cdot 10^{-02}$	0	0	0	0	0
2 $\Delta b$	$9,80 \cdot 10^{-01}$	$2,00 \cdot 10^{-02}$	$1,02 \cdot 10^{-04}$	0	0	0	0
3 $\Delta b$	$9,70 \cdot 10^{-01}$	$2,97 \cdot 10^{-02}$	$3,02 \cdot 10^{-04}$	$1,02 \cdot 10^{-06}$	0	0	0
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
1000 $\Delta b$	$3,98 \cdot 10^{-05}$	$4,05 \cdot 10^{-04}$	$2,06 \cdot 10^{-03}$	$6,98 \cdot 10^{-03}$	$1,77 \cdot 10^{-02}$	$3,60 \cdot 10^{-02}$	$6,07 \cdot 10^{-02}$
<b>%</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,2</b>	<b>0,7</b>	<b>1,8</b>	<b>3,6</b>	<b>6,1</b>

Iterations- schritt	N <sub>7hv</sub>	N <sub>8hv</sub>	N <sub>9hv</sub>	N <sub>10hv</sub>	N <sub>11hv</sub>	N <sub>12hv</sub>	N <sub>13hv</sub>
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
1000 $\Delta b$	$8,78 \cdot 10^{-02}$	$1,11 \cdot 10^{-01}$	$1,25 \cdot 10^{-01}$	$1,26 \cdot 10^{-01}$	$1,15 \cdot 10^{-01}$	$9,67 \cdot 10^{-02}$	$7,48 \cdot 10^{-02}$
<b>%</b>	<b>8,8</b>	<b>11,1</b>	<b>12,5</b>	<b>12,6</b>	<b>11,5</b>	<b>9,7</b>	<b>7,5</b>

Exp. Wert

[M]<sup>3+</sup> 65,0%

[M]<sup>4+</sup> 62,3%