

**Entwurf und Optimierung des
Elektrosprayionisationsmessplatzes für die
Photofragmentierung von Peptiden**

Inaugural-Dissertation

zur

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

Vorgelegt von

Shuokan Zhang

aus Shanghai

Düsseldorf

2006

Aus dem Institut für physikalische Chemie I, Abteilung für Lasermassenspektroskopie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. R. Weinkauf

Koreferent: PD Dr. M. Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung:

Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Shuokan Zhang

(Vorname Nachname)

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	7
2. Methoden der Massenspektrometrie	10
2.1. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI)	12
2.2. Elektrospray-Ionisation (ESI)	15
2.3. Massenanalysatoren	21
2.3.1. Flugzeit-Analysator (Time of Flight, TOF)	23
2.3.2. Lineares Quadrupol-Massenspektrometer	25
2.3.3. Paul-Falle	27
2.3.4. Fourier-Transform-Ionenzyklotron-Resonanz Spektrometer (FT-ICR)	30
2.4. Die Fragmentation: Versuch einer chemischen Analyse mit der Massenspektrometrie	32
2.4.1. Nomenklatur der Fragmentionen von Peptiden nach Roepstorff und Fohlmann	35
2.4.2. Fragmentierungsmechanismen der geladenen Peptide	37
2.4.3. Kollisionsinduzierte Fragmentation	39
2.4.4. Back Body infrared dissociation (Bird)	41
2.4.5. Dissoziation durch Elektroneneinfang (electron capture dissociation)	42
2.4.6. Photofragmentation durch elektronische Anregung	44
2.4.7. Die Ein- oder Mehrphotonenanregung mit UV-Licht	48
2.4.7.1. Die Chromophoren Gruppe	49
2.4.7.2. Die resonante Mehrphotonenanregung mit UV-Licht	57
2.4.7.3. Nichtresonante Laseranregung mit nahem IR: Fs-Laser-Pulsanregung bei 800 nm	59
3. Experimenteller Teil	61
3.1. Wahl des Einlasssystems	61
3.2. Untersuchte Molekülsysteme	64
3.2.1. Testmolekül für die apparative Entwicklung	64
3.2.2. Untersuchte Peptide	65
3.2.3. Probenvorbereitung für den ESI-Vorgang	66

3.2.4. Peptidensynthesen	67
3.3. Chemikalien und Lösungsmittel	75
3.4. Experimenteller Aufbau	77
3.4.1. Elektrospraykammer	80
3.4.2. Ionentransport und Fokussierungsregion	81
3.4.3. Paul-Falle	83
3.4.4. Ionendetektor	87
3.5. Modifikationen an der Hochvakuumkammer	88
3.6. Lasersysteme	92
3.6.1. Die piezoverstellbare Spiegelhalterung	97
3.7. Messelektronik und Datenaufnahme	99
3.7.1. Messelektronik	99
3.7.2. Datenaufnahme	102
4. Ergebnisse	106
4.1. Tryptophan	108
4.1.1. ESI-Massenspektrum von Tryptophan	112
4.1.2. Kollisionsinduzierte Fragmentation von protoniertem Tryptophan	115
4.1.3. Photofragmentation von Tryptophan mit Nanosekunden-Lasern	123
4.1.3.1. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 285 nm	123
4.1.3.2. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 266 nm	129
4.1.3.3. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 213,5 nm	131
4.1.4. Photofragmentation von Tryptophan mit fs-IR-Laserpulsen	132
4.2. Protoniertes NH ₂ -Leucin-Tryptophan-OH	135
4.2.1. Kollisionsinduzierte Fragmentierung von protoniertem NH ₂ -Leu-Trp-OH	136
4.2.2. Photofragmentierung von NH ₂ -Leu-Trp-OH mit UV Nanosekunden-Lasern	139
4.2.2.1. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 285 nm	139
4.2.2.2. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 266 nm	141
4.2.2.3. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 213,5 nm	142
4.2.3. Photofragmentierung von NH ₂ -Leu-Trp-OH mit fs-IR-Laserpulsen	143
4.3. Protoniertes NH ₂ -Leucin-Leucin-Tryptophan-OH	145

4.3.1. Kollisionsinduzierte Fragmentierung von NH ₂ -Leu ₂ -Trp-OH	145
4.3.2. Photofragmentierung von NH ₂ -Leu ₂ -Trp-OH mit Nanosekunden-Lasern	147
4.3.2.1. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 285 nm	147
4.3.2.2. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 266 nm	150
4.3.2.3. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 213,5 nm	151
4.3.3. Photofragmentierung von NH ₂ -Leu ₂ -Trp-OH mit fs-IR-Laserpulsen	152
4.4. Protoniertes NH ₂ -Leucin-Leucin-Leucin-Tryptophan-OH	154
4.4.1. Kollisionsinduzierte Fragmentierung von NH ₂ -Leu ₃ -Trp-OH	154
4.4.2. Photofragmentierung von NH ₂ -Leu ₃ -Trp-OH mit Nanosekunden-Lasern	156
4.4.2.1. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 285 nm	156
4.4.2.2. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 266 nm	158
4.4.2.3. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 213,5 nm	159
4.4.3. Photofragmentierung von NH ₂ -Leu ₃ -Trp-OH mit fs-IR-Laserpulsen	160
4.5. Protoniertes NH ₂ -Leucin-Leucin-Leucin-Leucin-Tryptophan-OH	161
4.5.1. Kollisionsinduzierte Fragmentierung von NH ₂ -Leu ₄ -Trp-OH	161
4.5.2. Photofragmentierung von NH ₂ -Leu ₄ -Trp-OH mit Nanosekunden-Lasern	164
4.5.2.1. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 285 nm	164
4.5.2.2. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 266 nm	166
4.5.2.3. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 213,5 nm	167
4.5.3. Photofragmentierung von NH ₂ -Leu ₄ -Trp-OH mit fs-IR-Laserpulsen	168
4.6. Gramicidin A	169
4.6.1. Photofragmentierung von protoniertem Gramicidin A mit Nanosekunden-Lasern	169
4.6.1.1. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 266 nm	169
4.6.1.2. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 213,5 nm	171
4.6.2. Photofragmentierung von Gramicidin A mit fs-IR-Laserpulsen	172
4.7. Cytochrom C	174

5. Zusammenfassung und Ausblick	177
6. Literatur	183

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung:

FD	Felddesorption
FAB	<i>Fast Atom Bombardement</i>
SIMS	<i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i>
PD	^{252}Cf -Plasmadesorption
ESI	Electrospray-Ionization
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
M_r	Molekülmasse
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
bzw.	beziehungsweise
z.B.	zum Beispiel
u.a.	unter anderem
m/z	Masse/Ladung
TOF-MS	Flugzeit-Massenspektrometer
FT-ICR-MS	<i>Fourier-Transform-Ionenzklotron-Resonanz-Massenspektrometer</i>
LDI	Laser-Desorption/Ionisation
SIN	Sinapinsäure
DHB	2,5-Dihydroxy-benzoesäure
HCCA	α -Hydroxy-4-Cyanozimtsäure
R_{ry}	Rayleigh-Radius
Q	Ladung
ϵ_0 :	Dielektrizitätskonstante des Vakuums
γ :	Oberflächenspannung des Lösungsmittels
r_c	der äußere Radius der Kapillare
V_c	das angelegte elektrische Potential
d	der Abstand zwischen Kapillarspitze und Gegenelektrode
CRM	<i>charge residue modell</i>
U	Beschleunigungsspannung
m	Teilchenmasse
v	Geschwindigkeit
IEM	<i>ion evaporation modell</i>

U	Gleichspannung
ν	Frequenz
$\emptyset$	elektrisches Potential
FWHM	Full Width Half Maximum
B	Magnetfeldstärke
e	Elementarladung
CID	Kollisioninduzierte Dissoziation
RRKM-Theorie	Rice-Ramsberger-Kassel-Marcus-Theorie
REMPI	<i>Resonance Enhanced Multiphoton Ionisation</i>
GL	Gleichung
Gly	Glycin
Leu	Leucin
Val	Valin
Ala	Alanin
Trp	Tryptophan
PyCloP	Chlorotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
HBPYU	(Benzotriazol-1-yloxy)-dipyrrolidinocarbenium-hexafluorophosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N, N, N', N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
DIEA	Diisopropylethylamin
Pd	Palladium
DC	Dünnschichtchromatographie
He	Helium
Me	Methyl
MO	Molekülorbital
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
LUMO	<i>lower unoccupied molecular orbital</i>
DFT	<i>density functional theory</i>
MRCI	<i>multireference configuration interaction</i>
TZVP+R	<i>combination in triple zeta valence and Rydberg</i>

1. Einleitung

Aufgrund ihrer vielfältigen Einsatzmöglichkeiten erlangte die Massenspektrometrie mit neuem Probenmolekülsystem im Laufe der letzten Jahre eine herausragende Stellung in vielen Bereichen der Chemie, Biologie, Biochemie und Physik. Die Entwicklung der klassischen Massenspektrometrie geht auf die Arbeit von J. J. Thomson [1] (Nobelpreis in Physik 1906) im Jahre 1910 zurück, in der er zeigte, dass das Edelgas Neon aus einer Mischung von zwei Isotopen der Massen 20 und 22 besteht. Seit den Anfängen um 1900, als Iribarne und Thomson [2, 3] mit seinem Parabel-Massenspektrographen erstmals positive Ionenstrahlen untersuchten, hat sich die Massenspektrometrie zu einer der wichtigsten Analysemethoden der Chemie entwickelt. Sie ist eine Untersuchungstechnik für freie, gasförmige Ionen im Hochvakuum, wobei ein so genannter Massenanalysator einen Ionenstrahl hinsichtlich des Ladung/Masse Quotienten auf trennt. Die Methode zeichnet sich durch die schnelle und genaue Ermittlung der relativen Molekülmassen aus, auch wenn es sich um ein komplexes Gemisch handelt. Dabei sind nur geringe Mengen an Probe erforderlich, denn die Empfindlichkeit von massenspektrometrischen Verfahren reicht vom pmol- bis hin zum fmol-Bereich [4].

Große biologisch relevante Moleküle sind typischerweise polar, thermisch instabil und haben extrem kleine Dampfdrücke. Nur einige Aminosäuren [5, 6, 7] und drei der vier Nucleinsäurebasen [8] lassen sich durch thermische Verdampfung in die Gasphase bringen. Es ist generell ein Problem, die polaren und thermisch labilen Moleküle, die intakt in einer komplexen Matrix flüssig oder fest vorliegen, in die zur massenspektrometrischen Analyse notwendigen freien gasförmigen Ionen zu überführen, ohne dass es zu einer starken oder gar vollständigen Zerstörung dieser Moleküle kommt. Deshalb sind mehrere neue Einlass- und Ionisierungsmethoden für die massenspektrometrische Analyse thermisch labiler Biomoleküle entwickelt worden. Dazu zählen u. a. Felddesorption (FD) [9], *Fast Atom Bombardement* (FAB) [11,12] oder *Secondary Ion Mass Spectrometry* (SIMS) [13,14] und ^{252}Cf -Plasmadesorption (PD) [15]. Die letzten beiden Methoden deponieren große Energien im Probenmolekül, so dass es insbesondere bei großen, labilen Molekülen zu einer verstärkten Fragmentierung kommt. In den letzten 19 Jahren entwickelten sich die Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI)) [10,16] und Elektrospray-Ionisation (ESI) [17, 18, 19, 20] zu Standardmassen-spektrometrieverfahren

für biologisch und medizinisch relevante Systeme. Ihre Stärken bestehen darin, dass sie routinemässig Analysen von biologisch relevanten Substanzen bis zu Massen weit über 100.000 Dalton erlauben [21]. Beide Verfahren zeigen extrem hohe Ionisierungsleistungen, d. h. einen sehr hohen Quotienten von erzeugten und nachgewiesenen Molekülionen zu eingesetzten Molekülen. Die stoßinduzierte Fragmentierung mit einer nachfolgenden Tandem-MS-Analyse in Kombination mit einer vorausgehenden enzymatischen Verdauung wurde erfolgreich zur Proteinsequenzierung eingesetzt. Die Verdauung ist notwendig, da große Moleküle auch bei hohen intern Energie sehr langsam dissoziieren. Bisher ist es nicht möglich Proteinen eine massenspektrometrische Sequenzanalyse zu erstellen. Ziel diese Arbeit ist durch die Kombination von Massenspektrometer und Laser Fragmentierungsmethode zu finden, die massenspektrometrische Sequenzanalyse näher zu kommen.

In dieser Arbeit wird ein ESI-Massenspektrometer eingesetzt, welches eine Elektrosprayquelle mit einer von W. Paul im Jahr 1958 entwickelten Falle, in der die Ionen durch elektrische Wechselfelder eingefangen werden [24], kombiniert. Die linearen und zyklischen (Paul-Falle) Quadrupolfallen waren in den Hintergrund verdrängt wurden, da sie eine obere Massengrenze besitzen. In der Arbeitsgruppe vom J.B. Fenn wurde eine Elektrosprayionenquelle mit einer linearen Quadrupol-Ionenfalle kombiniert wurde [18, 19] (Nobelpreis für Chemie 2002). Durch die hohe Ladungszahl bei ESI-Ionen beträgt das m/z -Verhältnis typischerweise 800 bis 2000, ein Bereich, der noch gut mit Quadrupolgeräten zugänglich ist. Seither gewann die ESI-MS stark an Bedeutung, so dass sie heute neben MALDI als eine der wichtigsten massenspektrometrischen Methoden gilt.

In Lösung und *in vivo* kommen Aminosäuren, Peptide, Nucleinbasen und Nucleotide oft in protonierter oder deprotonierter Form vor. Protonierte Systeme spielen deshalb im alltäglichen Leben eine wichtige Rolle. Ist das Proton nicht direkt am Chromophor, so kann man in Lösung annehmen, dass die Absorptionsspektren der Chromophore von der entfernten Protonierung und Deprotonierung wegen der Abschirmung im Lösungsmittel kaum beeinflusst sind. In der Gasphase erwartet man jedoch eine starke Verschiebung der S_0 - S_1 -Übergänge. Diese Verschiebung wird sehr stark von der Struktur bzw. dem Abstand zwischen dem Chromophor und der Ladung abhängen. An protonierten Molekülen gibt es bisher nur wenige Untersuchungen, hauptsächlich an kleinen Molekülen und Clustern. In den 70er Jahre wurde erstmals Photofragmentierungsspektren von Kationen in einer Ionenfalle aufgezeichnet [22]. Das erste UV-Spektrum einer protonierten Substanz in der Gasphase wurde durch chemische Ionisation aufgenommen [23]. Im Unterschied zu modernen Ionenfallen wurde hier eine Falle verwendet, in der die elektrischen und magnetischen Felder statisch waren.

In dieser Arbeit wird eine Apparatur vorgestellt, mit der routinemäßig protonierte Moleküle in der Gasphase durch UV-Licht fragmentiert werden können. Dazu wurde ein kommerzielles Elektrospray-Massenspektrometer so verändert, dass mit einem Laser direkt in die Paul-Falle auf das Ionenensemble geschossen werden kann. Mit diesem Aufbau ist es möglich mit einer Laseranregung eine Photofragmentation in der Gasphase auszuführen, um damit Einblicke in die Photofragmentierungsmechanismen von protonierten Peptiden zu erhalten. Eine mögliche Anwendung wäre zum Beispiel eine Sequenzanalyse an Hand der durch die Photodissoziation erzeugten Fragmente.

Generell unterscheidet man eine statistische Fragmentierung und eine nicht-statistische Fragmentierung. Die statistische Fragmentierung erfolgt nach einer vollständigen Gleichverteilung der Energie im Molekül durch eine statistische Fluktuation in eine Reaktionskoordinate.

Man versteht unter einem "nicht-statistischen Dissoziationsverhalten" eine lokale Fragmentierung, die einer lokalen Anregung, meist einer Photoanregung an gleicher Stelle, folgt. In einem solchen Prozess ist nur eine lokale Gruppe des Moleküls an der Energieumverteilung und an der Fragmentierung beteiligt. In der angeregten lokalen funktionellen Gruppe ist dann eine hohe Energie vorhanden, die zum lokalen Bindungsbruch führt.

Die in ersten Modellexperimenten zu untersuchenden Systeme sollen oberhalb der Dissoziationsgrenze gut absorbieren und leicht protonierbar sein. Peptide, die Tryptophan als Aminosäure enthalten, erfüllen beide Bedingungen und werden deshalb hier untersucht und diskutiert. Vorteilhaft ist insbesondere der große Anregungsquerschnitt des Tryptophans. Mit dem experimentellen Aufbau kann man die Photofragmentierungsmassenspektren von protonierten Verbindungen in der Gasphase aufnehmen und ausführlich diskutieren.

2. Methoden der Massenspektrometrie

Ein Massenspektrometer besteht aus den Funktionseinheiten Probeneinlasssystem, Ionenquelle, Massenanalysator, Detektor und Datensystem (für die Systemsteuerung, die Datendokumentation und die Datenanalyse). Ionenquelle und Analysator stehen unter Vakuum, so dass die Ionen zwischen Quelle und Detektor typischerweise keine weiteren Stöße erfahren, es sei denn, es wird zum Fangen der Ionen oder zur weiteren Fragmentierung absichtlich eine Stoßaktivierung mit Neutralgasen herbeigeführt.

Man unterscheidet heute im Wesentlichen drei Möglichkeiten, Substanzen in ein Massenspektrometer einzuführen:

- Die Probe ist flüchtig oder wird thermisch verdampft und in einem zweiten Schritt ionisiert;
- Ionen werden mit einem Laser aus einer kondensierten Phase in die Gasphase überführt. Dabei können neutrale Moleküle nachionisiert bzw. die direkt entstehenden Ionen genutzt werden;
- Die gelöste Probe wird zu einem feinen Nebel bestehend aus geladenen Tröpfchen zerstäubt. Die Tröpfchen werden dann durch Verdampfen des Lösungsmittels bei Normaldruck so lange geschrumpft bis einzelne Molekülonen vorliegen.

Für die Mehrzahl der biochemischen Applikationen liegt ein Gemisch vor und es ist vor das Probeneinlasssystem ein Gas- oder ein Flüssigkeitschromatograph geschaltet. Damit erhält man eine ausreichend hohe Selektivität, die es erlaubt, auch komplex zusammengesetzte Proben gut und automatisiert zu analysieren.

Massenspektrometrische Analysemethoden setzen voraus, dass die zu untersuchende Substanz verdampft und ionisiert werden kann. Bei Biopolymeren handelt es sich jedoch in der Regel um polare, hochmolekulare und damit nichtflüchtige Substanzen. Aufgrund ihrer thermischen Labilität können diese Moleküle nicht durch einfaches Aufheizen intakt in die Gasphase überführt werden. Heutzutage haben sich zwei am häufigsten angewendete Ionisationstechniken für die Analyse von biologisch relevanten Molekülen bewährt. Zum einen die Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie (ESI-MS) und zum anderen die *Matrix Assistierte Laser-Desorption/Ionisation* Massenspektrometrie (MALDI-MS). Beide Methoden sind unten ausführlich beschrieben Mit diesen schonenden Ionisierungsverfahren ist der zugängliche Massenbereich mehr und mehr nach oben erweitert worden. Mit der

MALDI-Methode gelang es, Biomoleküle bis 100.000 Da [10] und darüber intakt zu desorbieren, zu ionisieren. Möglich wurde dies durch den Einsatz einer Matrix, die verschiedene Funktionen erfüllen muss.

Um ein Massenspektrum zu erhalten, müssen die gebildeten Ionen nach ihrem Masse / Ladungs- Verhältnisses (m/z) getrennt und anschließend detektiert werden. Das erhaltene Massen-spektrum gibt das Verhältnis m/z in Verbindung mit der Ionen-Häufigkeit wieder. Dazu dienen Massenanalysatoren, wie der Quadrupol-Massenanalysator, das Flugzeit-Massenspektrometer (TOF-MS) und das Fourier-Transform-Ionenzyklotron-Resonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS). Es werden im Folgenden die wichtigsten Desorption-ionisationsmethoden und Massenanalysatoren kurz erläutert.

2.1. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI)

Die MALDI-Massenspektrometrie ist aus der in den 70er Jahren verbreiteten Laser Desorption/Ionisation (LDI) (Hillenkamp 1983) hervorgegangen. Bei der LDI wird die auf eine Metalloberfläche aufgebrachte Probe direkt mit einem Photonenpuls bestrahlt. Die ersten Massenspektren waren charakterisiert durch geringe Intensitäten und hohe Fragmentierung. So konnten im Allgemeinen nur Moleküle bis zu mehreren kDa nachgewiesen werden.

Die Verwendung einer festen Matrix (z. B. Nikotinsäure) ist die Grundlage der bis heute angewendeten MALDI-MS (Karas et al. 1987) [10]. Der Matrix kommen beim MALDI-Verfahren mehrere wichtige Funktionen zu:

- Sie besitzt eine hohe Absorption bei der eingestrahlten Desorptionwellenlänge und nimmt die Energie aus dem Laserpuls auf.
- Sie hat einen relativ niedrigen Siedepunkt, so dass sie durch den vom Laser erzeugten Temperatursprung verdampft wird.
- Sie hat einen geringen Dampfdruck, so dass sie im Vakuum stabil ist.
- Sie stellt die für die Ionisierung notwendigen Protonen zur Verfügung oder nimmt Protonen auf.
- Sie ist „Lösungsmittel“ und reduziert die Wechselwirkung der Probenmoleküle untereinander sowie mit der Oberfläche des „Emitters“.

Typischerweise wird die Probe mit einem großen molaren (ca. 1.000 – 10.000 fachen) Überschuss der gelösten Matrixsubstanz auf einen Emitter gebracht, so dass nach Verdunstung des Lösungsmittels Matrix und Probenmoleküle kokristallisieren. Wegen des großen Matrixüberschusses werden die komplexen intermolekularen Bindungen zwischen den Probenmolekülen (Man bedenke, dass sich Seitenketten der Probenmoleküle ineinander verschränken und verhaken können) durch Bindungen zu Matrixmolekülen ersetzt.

Die Matrix wird so gewählt, dass sie die verwendete Laserwellenlänge absorbiert. Desorption und Ionisierung der Probe erfolgt durch den Beschuss der trockenen Probe-Matrix-Mischung mit Laserlicht. Die Energie des gepulsten und intensiven Lasers wird in der Matrix deponiert. Dies führt zu einer sehr schnellen Erhitzung der Oberfläche auf Temperaturen oberhalb von 500 Grad C. Die Matrix verdampft explosionsartig und reißt Probenmoleküle mit. Bei dieser

Explosion werden viele Bindungen gebrochen, so dass bereits eine Abkühlung einsetzt. Die Probe liegt dann als isoliertes Teilchen in der Gasphase vor. Durch Kollisionen mit den inzwischen abgekühlten Matrixmolekülen kann die Probe zudem interne Energie abgeben. Durch dieses schnelle Aufheizen (in ns) und wieder Abkühlen (in einigen 10 μ s), bleibt die Mehrzahl der Probenmoleküle intakt. Bei Stößen von Probenmolekülen mit elektronisch angeregten Matrixmolekülen kann dann ein Proton übertragen werden.

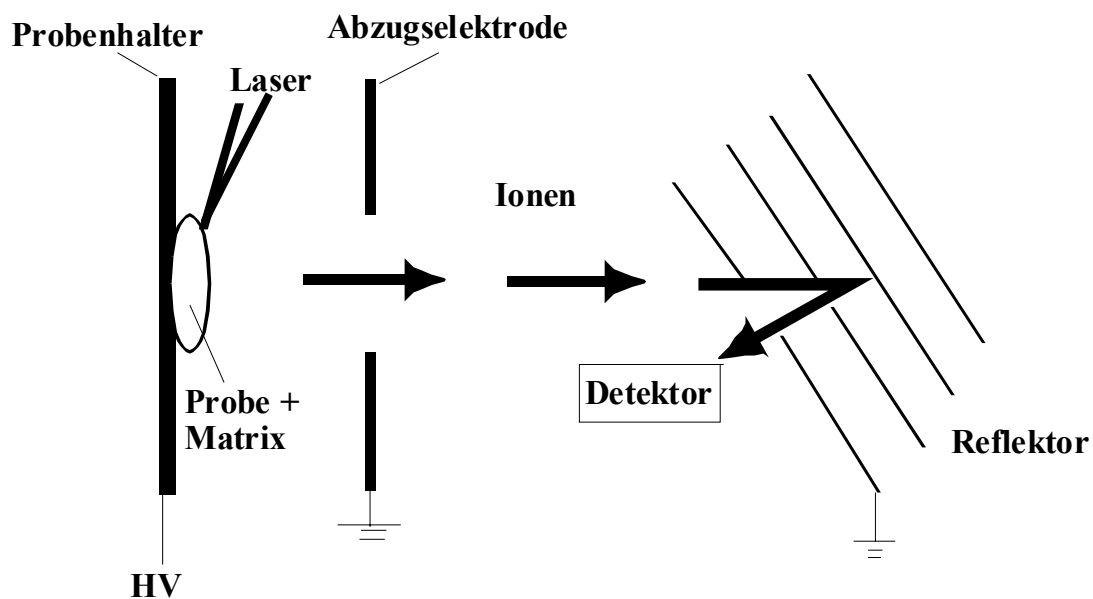


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des MALDI-Flugzeit-Massenspektrometers mit Reflektor[10]. Ein Laser desorbiert Probe und Matrix. Während der Desorption wird die Probe ionisiert. Entstandene Ionen werden mit Hilfe der Abzugselektrode über den Reflektor zum Detektor hin beschleunigt.

Im Gegensatz zu anderen massenspektrometrischen Verfahren wie *Fast Atom Bombardement* (FAB)[11, 12], *Secondary Ion Mass Spectrometry* (SIMS) [13, 14] oder ^{252}Cf -Plasma Desorption (^{252}Cf -PD) [15] wird bei MALDI die Energie nicht direkt dem Probenmolekül zugeführt, sondern dessen Umgebung, der Matrix. Diese verdampft schlagartig und reißt die Probenmoleküle mit, die dabei ionisiert werden.

Die Matrix soll eine hohe spektrale Absorption im Wellenlängenbereich des eingestrahnten Lasers besitzen. Typischerweise werden kostengünstige und einfach bedienbare N_2 -Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm (UV-Bereich) eingesetzt. Aus diesem Grund werden

hauptsächlich aromatische Karbonsäuren wie Sinapinsäure (SIN), Ferulasäure, 2,5-Dihydroxy-benzoesäure (DHB), α -Hydroxy-4-Cyanozimtsäure (HCCA) oder 2,4,6-Trihydroxyaceto-phenon als Matrix verwendet.

MALDI liefert im Gegensatz zu ESI (siehe Kap. 2.1.2.) meist einfach geladene Ionen. Bei großen Molekülen können auch mehrfach geladene Ionen beobachtet werden. Die Stärke dieser Methode liegt im großen zugänglichen Massenbereich bis mindestens 250.000 Da [16] ohne Einschränkungen in der Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur¹. Die Methode toleriert außerdem relativ große Mengen an Verunreinigungen organischer und anorganischer Substanzen. Bevorzugt wird MALDI mit Flugzeit-Massenspektrometern kombiniert (siehe Abb. 2.1), da diese u.a. über einen theoretisch unbegrenzten Massenbereich einsetzbar sind.

Die Nachteile von MALDI liegen u.a. in der mäßigen Massenauflösung der Spektren, im sogenannten „junk hill“ im unteren Spektrenbereich, im Auftreten von Oligomeren und gelegentlich auch mehrfach geladenen quasi-Molekülionen (Adduktionen mit Na^+ , K^+ und anderen Ionen). Darüber hinaus werden auch spezifische Effekte beobachtet, wie die Abspaltung kleiner Gruppen (Wasser, Ammoniak, Methanol), die ein *Peak-Tailing* zu kleineren Massen und eine Verschiebung des Massenschwerpunkts verursachen. Außerdem werden häufig zu hohe Massenwerte mit MALDI gemessen. Dies wird auf nichtkovalente Adduktbildung oder Photoadduktbildung mit Matrixmolekülen zurückgeführt. Kritisch ist bei MALDI die aufwändige Probenpräparation, da das Probenmolekül in eine für das Probenmolekül geeignete Matrix eingebracht werden muss. Die Suche der Matrix und das Erstellen der Matrix/Probenmischung sind sehr zeitaufwendig.

¹ Als Primärstruktur bezeichnet man die Aminosäuresequenz der Polypeptidkette. Die Sekundärstruktur ist die lokale räumliche Anordnung der Polypeptidkette ohne Berücksichtigung der Seitenketten. Unter Tertiärstruktur versteht man die dreidimensionale Struktur des gesamten Polypeptids. Die Quartärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung der Untereinheiten eines Proteins, die entweder über nichtkovalente Wechselwirkungen oder mittels Disulfidbrücken miteinander assoziiert sind.

2.2. Elektrospray Ionisation

Die in dieser Arbeit verwendete Elektrospray-Ionisation ist wie MALDI eine noch sehr junge Technik zur Erzeugung von Ionen. Die Ursprünge dieser Ionisationsmethode gehen auf Dole et al. [17] zurück, die bereits 1968 kleine geladene Flüssigkeitströpfchen erzeugten und deren Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) untersuchten. Dole et. al. postulierten schon damals, dass die Bildung und das Verhalten hochgeladener Tropfen aus Lösungen nichtflüchtiger Substanzen die Möglichkeit aufbietet, intakte Ionen der betroffenen Substanz in der Gasphase zu erzeugen. Die Idee beruhte im Grunde auf der Ausnutzung der Prozesse beim Verdampfen des Lösungsmittels aus einem geladenen Tropfen. Dieses Verhalten wurde schon 1882 von Rayleigh erkannt [25]. Beim Verdampfen des Lösungsmittels verringert sich der Tropfenradius, wobei der Tropfen solange stabil bleibt, so lange die Oberflächenspannung die Abstoßung der Ladungen ausgleicht. Der Zusammenhang wird durch die Rayleigh-Gleichung (siehe Gl. 1) beschrieben. Wird der kritische Radius (Rayleigh-Stabilitätsgrenze) unterschritten, kommt es durch die Coulomb-Abstoßung der gleichen Ladungen zur Destabilisierung des Tropfens und führt zu einem Auseinanderbrechen (Coulomb-Explosion) unter Bildung von vielen kleinen Tröpfchen. Erst sehr viele Jahre später gelangen unabhängig voneinander Fenn et al.[18, 19] (Nobelpreis für Chemie 2002) und Alexandrov et al.[20] die Gerätekopplung von einer Elektrospray-Ionenquelle mit einer linearen Quadrupol-Ionenfalle. In den folgenden Jahren erfolgten einerseits zahlreiche Weiterentwicklungen in der Gerätetechnik und andererseits die detaillierten mechanistischen Untersuchungen der Ionenbildung. Heutzutage gilt die ESI-MS, neben dem MALDI-MS, als schonendste aller massenspektrometrischen Techniken und damit als eine der wichtigsten Ionisierungsarten für Biomoleküle [26].

$$R_{\text{Ry}} = 3 \sqrt{q^2 / (8\pi\epsilon_0\gamma)} \quad (1)$$

Mit R_{Ry} : Rayleigh-Radius

q : Ladung

ϵ_0 : Dielektrizitätskonstante des Vakuums

γ : Oberflächenspannung des Lösungsmittels

Die Elektrospray-Ionisationsquelle besteht im Wesentlichen aus einer sehr dünnen Kapillare (typischer Außendurchmesser 20-200 μm), bestehend aus einem Metall (Platin, Edelstahl). Durch diese Kapillare wird eine Lösung eines Analyten bei Atmosphärendruck mit geringer kontinuierlicher Flussrate (in der Regel 100-200 $\mu\text{l/h}$) geleitet. Da die Kapillare mit einer Hochspannung V_c von 3-6 kV belegt ist, bildet sich zwischen der Spitze der Kapillare und einer gegenüberstehenden, zylindrischen Elektrode ein sehr hohes elektrisches Feld E_c (10^{-3} bis 10^{-6} V/m) aus, das annähernd nach folgender Gleichung berechnet werden kann [29, 33].

$$E_c = 2V_c / (r_c \ln (4d / r_c)) \quad (2)$$

Dabei ist r_c der äußere Radius der Kapillare, V_c das angelegte elektrische Potential und d der Abstand zwischen Kapillarspitze und Gegenelektrode. Die dort austretende Flüssigkeit wird unter dem Einfluss des elektrischen Feldes so stark elektrostatisch aufgeladen, dass kleine hoch geladene Flüssigkeitströpfchen abgestoßen werden. Hierdurch entsteht eine besonders feine Vernebelung der Analytlösung. Makroskopisch betrachtet entsteht wegen der Viskosität und der Oberflächenspannung am Ende der Kapillare eine charakteristische Wölbung der Flüssigkeitsoberfläche, die Taylorcone genannt wird. Die Bildung dieses Taylorcone wurde 1967 von G.I. Taylor postuliert [27]. Von der an die ESI-Kapillare angelegten Polarität der Hochspannung wird das Vorzeichen der Ladung der entstehenden Tropfen bestimmt. Bei angelegter positiver Spannung tragen die Tropfen einen Überschuss an positiver Ladung (Kationen), entsprechend umgekehrt bei negativer Spannung einen Überschuss an negativer Ladung (Anionen). Die Ladungen werden in Form von einem Protonenüber- oder Unterschuss auf die Tröpfchen aufgebracht. Typischerweise werden geeignete Protonenliefernde (Säuren) oder -ziehende (Basen) der Lösung zu Unterstützung beigelegt. Der gesamte Vorgang ist in Abbildung 2.2 grafisch dargestellt.

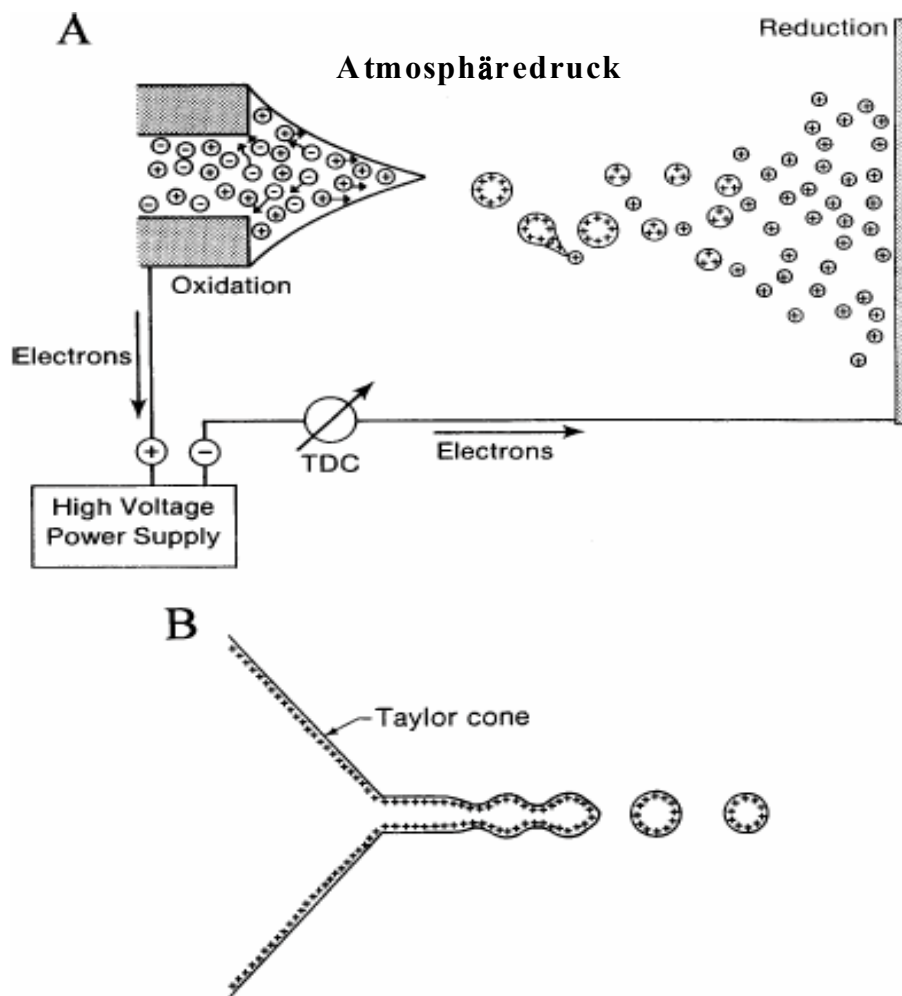


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Ionenbildung bei der Elektrospray-Ionisierung. Das hohe elektrische Feld bewirkt entsprechend der Polarität der Spannungsquelle die Anreicherung der positiv geladenen Elektrolytionen am Ende der ESI-Kapillare. An der austretenden Flüssigkeit bildet sich ein Flüssigkeitskegel (Taylorcone), von dem sich wiederum ein feines Flüssigkeitsfilament ausbildet. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels verringern die Tröpfchen des Filamentes ihre Größe bis sie schließlich aufgrund von Coulombexplosionen zerfallen. Der Ladungsfluss wird über die elektrochemischen Oxidationsreaktionen an der mit der Lösung in Kontakt stehenden positiven Elektrode (Anode) aufrechterhalten.

Die geladenen Flüssigkeitströpfchen fliegen aufgrund des Potentialgefälles in Richtung des Massenspektrometers, wobei die Größe der Tröpfchen aufgrund der Verdampfung (Desolvatisierung) des Lösungsmittels abnimmt. In unserem ESI-Massenspektrometer wird

zur angelegten Spannung noch ein Stickstoffstrom eingesetzt, der die Kapillare umhüllt und so die Ausbildung und das Ablösen der Tröpfchen unterstützt. Zudem wird ein trockener, beheizbarer Inertgasstrom (z.B. Stickstoff) im Gegenstrom so eingelassen, dass die von der Gegenelektrode angezogenen geladenen Tröpfchen gerade noch angezogen und desolvatisiert werden aber das in die Gasphase freigesetzte Lösungsmittel aus dem System entfernt wird. Der Nachteil des Gegenstroms ist, dass teilweise Substanzmoleküle durch den Gasstrom mitgerissen werden und dadurch weniger Ionen in das Massenspektrometer gelangen können. Wie schon erwähnt, wird durch die Desolvatation des Lösungsmittels der Tropfenradius verringert, so dass die größer werdenden Abstoßungskräfte der einzelnen Ladungen Coulomb-Explosion hervorrufen. Dieser Vorgang wiederholt sich mehrfach, bis aus den einzelnen Tröpfchen die isolierten Ionen freigesetzt werden. Von Gomez und Tang [28] wurde durch eine Serie von Hochgeschwindigkeitsphotographien 1994 erstmals der Moment der Rayleigh-Instabilitäten der hochgeladenen Tropfen visualisiert.

Der Mechanismus der Ionenbildung beim Elektrosprayprozess liegt im zentralen Interesse vieler Studien und Überlegungen. Zu diesem Themengebiet wurden deshalb schon eine Reihe von Übersichtsartikeln verfasst [29, 30, 31]. Der genaue Mechanismus ist jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt. Grundlegend kann er jedoch in drei Abschnitte gegliedert werden:

- Bildung ladungstragender Tröpfchen
- Desolvatisierung und Verkleinerung der Tröpfchen
- Freisetzung der Ionen aus den Tröpfchen

Für den Bildungsprozess der freien gasförmigen Ionen bzw. den Übergang der Ionen aus der Lösung gibt es zwei gleichberechtigt nebeneinander stehende Modellvorstellungen. Die ältere, die als Ladungsrückstandsmodell („Charge Residue Model“, CRM) bezeichnet wird, geht auf Dole et al. [17] zurück und wurde später durch Röllgen et al. [32] detailliert ausgearbeitet. Die Ionenbildung wird als kontinuierliche Abfolge von Desolvatisierung und Coulomb-Explosionen beschrieben. Dieser Prozess wiederholt sich solange, bis nur noch ein Molekülion in dem geladenen Tröpfchen vorliegt, aus dem durch Desolvatisation des Lösungsmittels das freie gasförmige Molekülion gebildet wird.

Die jüngere Theorie, das Ionenverdampfungsmodell [34] („Ion Evaporation Model“, IEM), stammt von Iribane und Thomson [35, 36]. Die Bildung der gasförmigen Analytionen erfolgt hierbei aus einem hochgeladenen Mikrotropfen mit einem Radius von ungefähr 8 nm und ca.

70 Elementarladungen durch Direktmission der an der Oberfläche lokalisierten Ionen. Hervorgerufen wird dieser Prozess durch Abstoßungskräfte zwischen geladenen Ionen und den Ladungen des Tröpfchens [37]. Diese Ionenemission aus den Mikrotropfen steht in Konkurrenz mit dem weiteren Zerfall des Tropfens durch Coulomb-Explosion. Der Ladungszustand des Analytmoleküls ist entscheidend abhängig von dessen räumlicher Größe [38]. Je größer das Analytmolekül unter der Oberfläche des Mikrotropfens ist, desto mehr Ladungen werden beim Austritt in die Gasphase mitgenommen. Peptide mit einer Größe von < 1000 Da treten nur einfach geladen auf, wohingegen Peptide mit einem Molekulargewicht > 1500 Da ausschließlich mehrfach geladen vorliegen.

Mittlerweile wird angenommen, dass die Coulomb-Explosion nicht, wie früher postuliert, zu mehreren in etwa gleich großen Tropfen führt, sondern zu einem großen und mehreren so genannten „*Offspring-Droplets*“ [29], welche nur noch etwa 2% der Ursprungsmasse und etwa 10-20% der Ladung ihres Vorgängers [39] besitzen. Durch diesen ungleichen Zerfall erhöht sich das Verhältnis von Oberflächenladung zur Zahl gepaarter Ionen in Tropfen dramatisch. Dieses gilt für jeden durchlaufenen Prozess von Tropfenbildung und Desolvation bis zum Rayleigh-Limit. Das bedeutet, dass nur die hochgeladenen *Offspring-Droplets* schließlich für die Ionenbildung verantwortlich sind und die zurückbleibenden großen Tropfen kaum eine Bedeutung in der Ionenproduktion besitzen, sondern den überwiegenden Teil der so genannten Salzfracht (gepaarte Ionen) tragen [40, 41, 42]. Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, ob die Freisetzung der Ionen aus den *Offspring-Droplets* durch Desorption von der Oberfläche oder durch Verdampfung des restlichen Lösungsmittels erfolgt.

Neben dem oben erwähnten Phänomen der Ladungsverteilung sind noch eine Reihe weitere experimentelle Befunde für die IEM-Theorie aufgezeigt worden. Bei ESI-Untersuchungen von Proteinen nach Spaltung der Disulfidbrücken [43] oder nach Denaturierung [44] wurde eine Verschiebung der Ladungsverteilung zu höheren Ladungszuständen beobachtet. Durch die angewendeten Verfahren wurde die Tertiärstruktur des Proteins destabilisiert, wodurch die Proteine teilweise entfaltet wurden. Dieses hat eine Vergrößerung der Oberfläche des Proteins zur Folge, die durch einen erhöhten Protonierungsgrad nachgewiesen werden konnte. Für das CRM-Modell sprechen beispielsweise die Ergebnisse von Smith et al. [45]. Im negativen ESI-Massenspektrum von Cytochrom C wurde das Auftreten von niedrig geladenen Spezies und Adduktionen beobachtet, die zwei oder drei intakte Cytochrom C-Moleküle enthielten, was mit den IEM-Modellvorstellungen nicht in Einklang zu bringen war. Ebenfalls ist die Beobachtung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen [46], die zum Beispiel auf Wasserstoffbrückenbindungen beruhen, durch CRM

durch Lösungsmittelverlust zu erklären und nicht durch die Ionenemission. Beide Modelle sind bis heute Gegenstand ausgedehnter Diskussionen [47]. Eine eindeutige Abgrenzung der beiden mechanistischen Vorstellungen ist also nicht möglich. Jedoch kommt eine Kombination der beiden Modelle der Realität wohl am nächsten.

Van Berkel et al. [48] zeigten, dass die Elektrospray-Ionisationsquelle als Elektrolysezelle genutzt werden kann, so dass Verbindungen, die normalerweise im Spray nicht ionisiert werden, durch elektrochemische Oxidation (im positiven Modus) oder elektrochemische Reduktion (im negativen Modus) ionisiert werden können. Allerdings gilt dies nur für Substanzen mit einem Redoxpotenzial von bis zu 1.0 V (gegen Standard-Kalomel-Elektrode). Damit besteht eine weitere Möglichkeit, unpolare Substanzen, die nicht als Ionen in Lösung vorliegen, durch ESI-MS zu untersuchen.

Während der Desolvatisierungsphase werden Bindungen gebrochen und es erfolgt eine Abkühlung. Diese und die Aufheizung durch das heiße Inertgas halten sich die Waage, so dass ein extrem niedriger Fragmentierungsgrad entsteht, eines der Hauptmerkmale der ESI-Methode. Die Masse spielt bei einem ESI-Prozess keine Rolle. Wichtig ist lediglich, dass sich die Substanz in einem Tropfen einschließen lässt. So wurde mittels ESI schon komplette DNA-Moleküle mit einer Masse von 110 MDa erfolgreich massenspektrometrisch untersucht [49].

2.3. Massenanalysatoren

Um ein Massenspektrum zu erhalten, müssen die gebildeten gasförmigen Ionen entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt werden. Die Massentrennung erfolgt durch magnetische oder/und elektrische Felder typischerweise im Vakuum. Hierzu werden sie im ersten Schritt auf bestimmte Ausgangsgeschwindigkeiten gebracht und zu einem Strahl gebündelt. Durch ein schwaches elektrisches Feld werden die Ionen aus der Ionisierungsregion der Quelle entfernt und anschließend über ein weiteres Potentialgefälle beschleunigt. Dabei hängt die Geschwindigkeit v der einzelnen Ionen nach Gl. (3) und Gl. (4) von der Ladung Q und der Masse m der Ionen sowie von der Beschleunigungsspannung U ab:

$$Q * U = m * v^2 / 2 \quad (3)$$

$$v = \sqrt{\frac{2 * Q * U}{m}} \quad (4)$$

Als bewegte, geladene Teilchen lassen sich die Ionen auf verschiedene Weise nach der Masse trennen. Zurzeit haben sich vier Prinzipien der Massenanalyse freier gasförmiger Ionen durchgesetzt:

- Die Trennung durch Kombination eines Magnetfeldes mit einem elektrischen Feld (so genannte Sektorfeld-Instrumente).
- Die Trennung in einem Hochfrequenzfeld eines Quadrupol-Stabsystems (Quadrupol-System).
- Die Massentrennung nach Flugzeit in Verbindung mit einer gepulsten Ionenerzeugung bzw. Beschleunigung (Flugzeit-MS).
- Das Einfangen von Ionen in einer elektrischen Ionenfalle (Paul Falle, Ion Trap) oder magnetischen Ionenfalle (Ionenzyklotronresonanzzelle, ICR) mit anschließender Massenanalyse.

Für die Messung von Peptiden und Proteinen sind der Massenbereich und die Auflösung von entscheidender Bedeutung. Das Auflösungsvermögen A ist definiert als der Quotient aus der mittleren Masse M und der Differenz ΔM , mit der ein weiteres Ion der Masse $M + \Delta M$ von M unterschieden werden kann:

$$A = M / \Delta M \quad (5)$$

A ist ein Maß für die Fähigkeit des Geräts, zwei eng benachbarte Massen zu unterscheiden. Nach der 10%-Tal-Definition (siehe Abb. 2.3a) gelten zwei benachbarte Signale dann als aufgelöst, wenn sie sich nicht mehr als zu 10% überlappen. Die Lage der beiden Maxima wird durch die 10%-Überlappung in einem noch tolerierbaren Maß verändert. Neben der 10%-Tal-Definition wird auch eine Definition, die sich auf die Breite des Signals in halber Höhe bezieht (Full Width Half Maximum, FWHM), verwendet.

In unserem Massenspektrometer können durch verschiedene Mode, d.h. durch verschiedene Scanngeschwindigkeit, die Massenspektren aufgenommen werden. Dadurch ergibt sich unterschiedliche Massenauflösung nach der 10%-Tal-Definition. Bei der Scanngeschwindigkeit von 13.000 m/z /s (Scannbereich: 50-3.000 Da) des protonierten Tryptophans ergibt sich die Massenauflösung von 287 (siehe Abb. 2.3b) und bei der Scanngeschwindigkeit von 1.600 m/z /s (Scannbereich: 200-6.000 Da) des protonierten Tryptophans die Massenauflösung von 645 (siehe Abb. 2.3c).

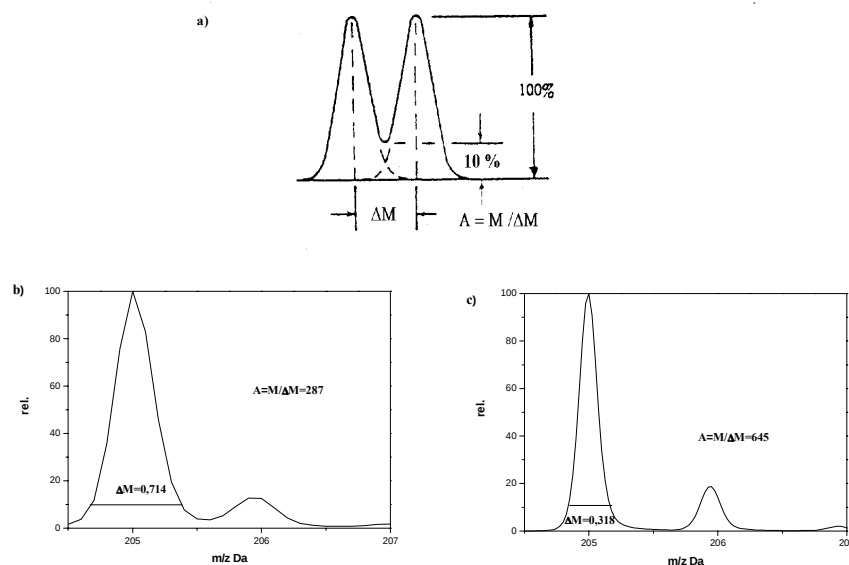


Abb. 2.3: a) 10%-Tal-Definition der Massenauflösung b) Massenspektrum von Tryptophan bei Scanngeschwindigkeit von 13,500 m/z pro Sekunde (Massenauflösung von 287 nach der 10%-Tal-Definition) c) Massenspektrum von Tryptophan bei Scann-Geschwindigkeit von 1500 m/z pro Sekunde (Massenauflösung von 645 nach der 10%-Tal-Definition).

2.3.1. Flugzeit-Analysatoren („Time of Flight“ TOF)

Die bei der MALDI-Ionisation am häufigsten eingesetzten Massenanalysatoren sind die Flugzeitmassenspektrometer oder TOF-Analysatoren [51], da sie für die Messung gepulster Ionenströme ideal sind, keine obere Massengrenze besitzen und eine gute Auflösung erreichen.

Bei einem Flugzeit (TOF)-Massenspektrometer wird die Flugzeit der Ionen zwischen Quelle und Detektor gemessen. Die Ionen werden durch ein elektrisches Feld (20-30 kV) beschleunigt. Wenn Ionen gleicher Ladung die gleiche Potentialdifferenz durchlaufen, erhalten sie die gleiche kinetische Energie. Für Ionen unterschiedlicher Masse bedeutet dies, dass im feldfreien Raum (*drift zone*) schwere Ionen langsamer sind als leichte und daher bei gleichem Startzeitpunkt später den Detektor erreichen. Die im Hochvakuum gemessenen Flugzeiten der Ionen sind proportional zur Wurzel aus ihrem Molekulargewicht. Die typischen Flugzeiten in einem TOF-Gerät liegen im Bereich von 1 µs bis 100 µs über eine Driftstrecke von 1 m bis 4 m. Dadurch, dass Erzeugung und Nachweis gepulst sind und die Flugzeiten relativ kurz sind (kleiner 1 ms), können innerhalb kürzester Zeit mehrere Einzelspektren summiert werden, um so das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern.

In der Ionenquelle werden die Ionen durch das angelegte elektrostatische Feld in die Richtung der Austritts-Elektrode beschleunigt. Beim Eintritt in das eigentliche Flugrohr besitzen alle Ionen verschiedener Masse theoretisch die gleiche kinetische Energie (E_{kin}):

$$E_{\text{kin}} = m \cdot v^2 / 2 = z \cdot e \cdot U \quad (6)$$

mit m: Masse des Ions; v: Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke; z: Ladungszahl; U: Spannung; e: Elementarladung.

Die Geschwindigkeit v, mit der die Ionen durch das Flugrohr driften, ist gleich der zurückgelegten Strecke L pro Zeit t. Somit ergibt sich durch Einsetzen in Gleichung 6:

$$m/z = 2 \cdot e \cdot U \cdot t^2 / L^2 \quad (7)$$

Die Masse ist proportional zum Quadrat der Zeit.

Flugzeitmassenspektrometer sind einfach aufgebaut und haben eine hohe Ionentransmission von fast 100%. Die Verluste treten hier mehrheitlich am Detektor auf, dessen Empfindlich-

keit ab ca. $m/z = 10.000$ Da mit steigendem m/z abnimmt. Da TOF-MS-Geräte gepulst arbeiten, müssen die Ionen in möglichst kurzer Zeit und örtlich definiert erzeugt werden. Dies ist unter Verwendung eines gepulsten Lasers möglich. Aus diesem Grund werden TOF-Massenspektrometer auch oft mit MALDI kombiniert, da hier ein gepulster Laser für die Desorption eingesetzt wird. So können im einfachen linearen TOF Massen-Auflösungen zwischen 200 und 5.000 erzielt werden. Die Auflösung ist massenabhängig und wird theoretisch zu höheren m/z -Werten besser. Der Nachteil der relativ schlechten Auflösung kann durch ein sog. Reflektron-Flugzeit-Massenspektrometer aufgehoben werden. Dabei ist das Flugrohr abgewinkelt gebaut. Die Ionen fliegen nach Durchlaufen der Driftstrecke gegen ein elektrisches Feld an und werden in einem Winkel reflektiert. Dabei dringen die schnelleren Ionen wegen ihrer höheren Energie tiefer in den Reflektor ein, fliegen also eine längere Strecke als Ionen mit einer geringeren Geschwindigkeit. Dadurch werden die durch Abweichungen in der kinetischen Energie verursachten Flugzeitfehler korrigiert.

2.3.2. Lineares Quadrupol-Massenspektrometer

Ein Massenspektrometer, das unter Verwendung des Quadrupols als Massenfilter arbeitet, wurde bereits 1953 von W. Paul und H. Steinwedel [50] beschrieben. Unter vorgegebenen physikalischen Bedingungen lässt eine Quadrupel-Stab-Anordnung nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis zum Detektor durch. Die anderen Ionen werden aus der Bahn geschüttelt und erreichen nicht den Detektor. Der Quadrupol-Massenanalysator setzt sich aus einem System von vier Metallstäben mit rundem oder hyperbolischem Querschnitt zusammen, die parallel zueinander in einem Viereck angeordnet sind (siehe Abb. 2.4). An den in der Praxis aus Kostengründen meist kreiszylindrischen Stäben liegt eine Gleichspannung U und eine Wechselspannung $V\cos(2\pi\nu t)$ mit Frequenz ν an. Diagonal gegenüberliegende Stäbe verfügen dabei über die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Polarität und Phase der Wechselspannung. Dementsprechend besitzen nebeneinander liegende Stäbe entgegengesetzte Wechselspannungspolarität also eine um 180° versetzt Phase. In der Nähe der z -Achse entsteht so ein elektrisches Potential Φ :

$$\Phi(x,y,t) = (U + V\cos(2\pi\nu t)) * (x^2 + y^2) / t^2 \quad (8)$$

Durch eine geringe Beschleunigungsspannung von 10-20 V erhalten die Ionen eine ausreichende Translationsenergie in Richtung der z -Achse, um auf der Achse in das elektrische Feld des Quadrupols zu gelangen. Ihre Bewegung in der xy -Ebene kann dabei durch einen Satz von Differentialgleichungen beschrieben werden, die im Prinzip den von Mathieu 1868 für die Untersuchung an schwingenden Membranen aufgestellten linearen Differentialgleichungen entsprechen.

Die Mathieu'schen Gleichungen haben zwei Arten von Lösung: Eine Lösung führt zu endlichen Amplituden der Oszillationen entsprechend einer stabilen Bewegung entlang der z -Achse durch den Quadrupol, die andere führt zu in x - und/oder y -Achse exponentiell anwachsenden Amplituden und damit instabilen Trajektorien. Die numerische Auswertung der Mathieu'schen Gleichungen ergeben ein Stabilitätsdiagramm, in dem jedem m/z -Verhältnis ein gegebener Wertsatz U , V , und ν zugeordnet werden kann.

Beim *Scannen* des Massenbereichs werden Gleichspannung U und Amplitude V des Wechselfeldes gleichzeitig erhöht, wobei das Verhältnis U/V und die Frequenz ν (im Radiofrequenzbereich) konstant gehalten werden. Dadurch werden Ionen mit verschiedenem m/z -Verhältnis nacheinander in den stabilen Bereich des Quadrupolfeldes gebracht. Da die

Masse m im Gleichungssystem direkt proportional zu U und V ist, sind bei Veränderung von U und V die Massenspektren linear.

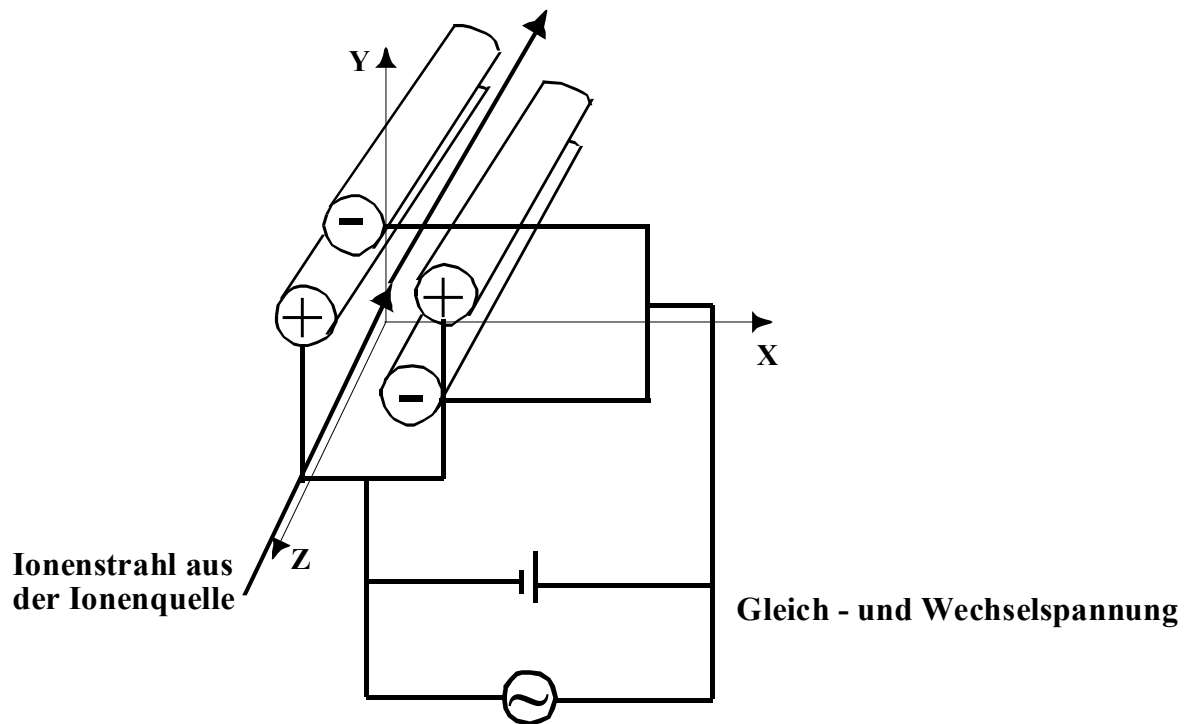


Abb. 2.4: Aufbau eines Quadrupol-Massenanalysators. Das Potential der Stäbe hat einen Gleichspannungsanteil und einen Wechselspannungsanteil. Zum *Scannen* werden Gleich-spannungshöhe und Wechselspannungsamplitude gleichzeitig erhöht, wobei deren Verhältnis zueinander konstant bleibt. Bei einem bestimmten Zustand gibt es nur für Ionen mit einem bestimmten m/z -Wert eine stabile oszillierende Flugbahn.

Kommerzielle Quadrupol-Analysatoren haben einen maximalen Massenbereich bis etwa m/z 4.000 Da und erzielen Auflösungswerte zwischen 500 und etwa 5.000. Die Auflösung (siehe Abschnitt 2.3.) kann variiert werden, erhöhte Auflösung ist auch hier mit einem Transmissions- also einem Empfindlichkeitsverlust verbunden. Da Quadrupol-Massenspektrometer über eine relativ hohe Ionentransmission von der Quelle zum Detektor verfügen, eine in Dauerbetrieb stabile Kalibration haben und relativ kostengünstig sind, werden sie oft mit ESI-Einlassquellen kombiniert und sind heute in der biochemischen und organischen Analytik sehr verbreitet.

2.3.3. Paul-Falle

Die nach seinem Erfinder benannte Paul-Falle (Wolfgang Paul, Nobelpreis für Physik 1989) wurde schon 1960 beschrieben und zum Patent angemeldet [52]. Es dauerte jedoch gut 20 Jahre, bis Stafford [53] ein modifiziertes und benutzbares Gerät entwickelte. Die elektrische Paul-Falle besteht aus einer ringförmigen Elektrode, die oben und unten mit einer perforierten Endkappe abgeschlossen wird (siehe Abb. 2.5), durch die die Ionen in die Falle ein- und wieder austreten können. Die Paul-Falle wirkt im Prinzip wie ein „kreisförmiger“ Quadrupol, arbeitet aber diskontinuierlich. Durch ein Hochfrequenzfeld, das an die Ringelektrode angelegt wird, können Ionen über einen breiten Massenbereich stabil im Inneren der Falle gehalten werden, wobei dies durch einen bestimmten Druck an Helium Hintergrundgas unterstützt wird. Die Falle wird mit einem relativ hohen Druck von He betrieben, das direkt in die Falle strömt. Das He-Gas hat einerseits die Aufgabe, die Ionen durch Stöße zu bremsen und dadurch einzufangen und auf einem kleinen Bereich in der Fallenmitte zu halten. Andererseits übernimmt es die Aufgabe des Kollisionsgases bei der massenspektrometrischen Fragmentierung. Die Paul-Falle fängt Ionen in einem dreidimensionalen elektrischen Feld und kann sie für Mikrosekunden bis Sekunden auf stabilen Bahnen halten und dann entsprechend ihrem m/z -Verhältnis trennen. Ionen werden zuerst in die Falle hineingelassen, gespeichert. Beim Austreten werden die Ionen dann nach und nach durch ein Wechselfeld an den Endkappen herausgeschüttelt, in einem Channeltron detektiert und nach dem m/z Verhältnis analysiert.

Wie beim linearen Quadrupol bestimmt auch hier die Lösung der Mathieu'schen Differentialgleichungen [54] die Wertebereiche von angelegten Gleich- und Wechselspannungen, in denen die Ionen stabile Bahnen beschreiben. Das Stabilitätsdiagramm bildet sich aus den überlappenden stabilen Bereichen der Endkappen und der Ringelektrode (siehe Abb. 2.6).

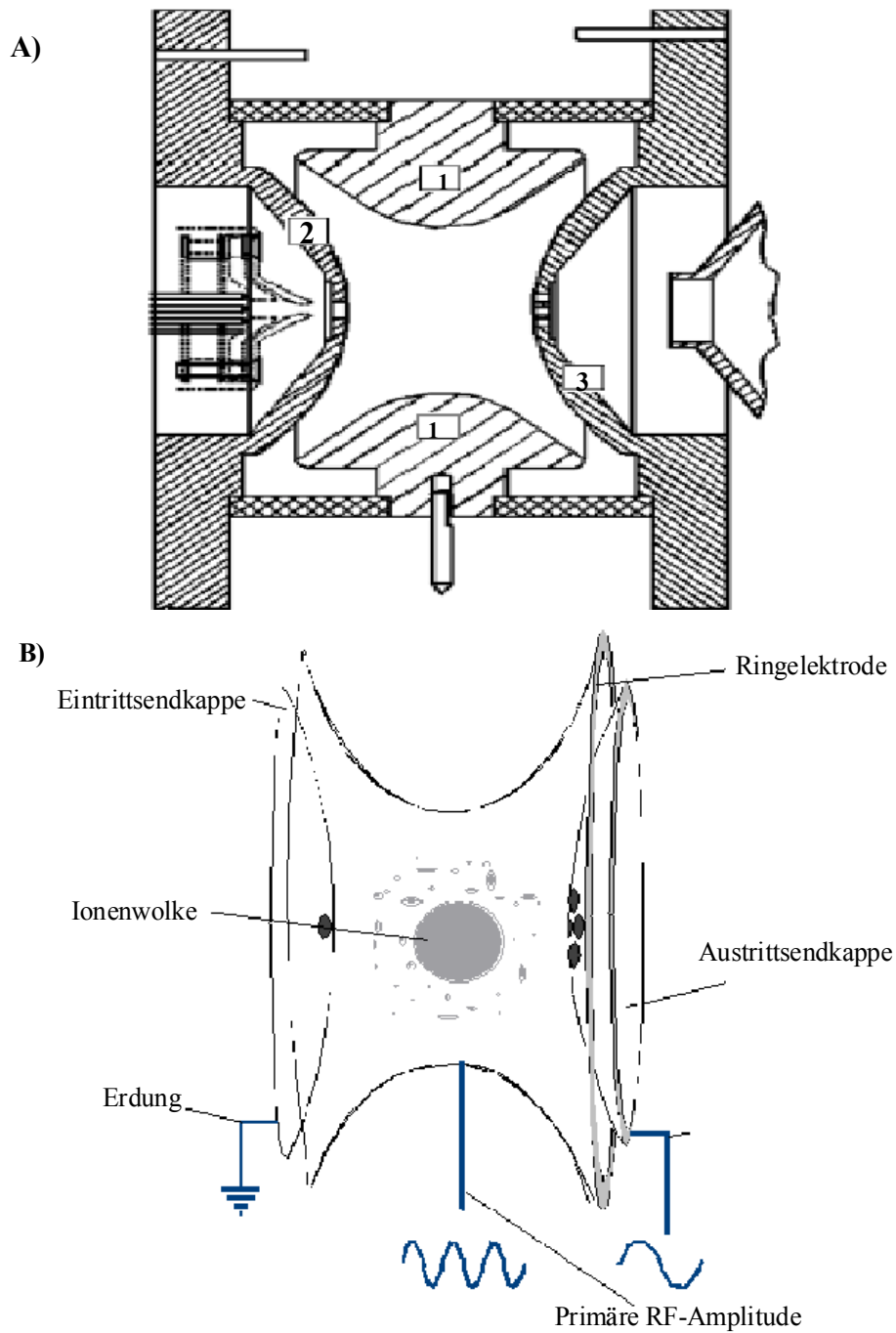


Abb. 2.5: (A) Schematische Darstellung einer Paul-Falle: Ringelektrode (1). Eintrittsendkappe (2). Austrittsendkappe (3). (B) Geometrische Darstellung einer Paul-Falle.

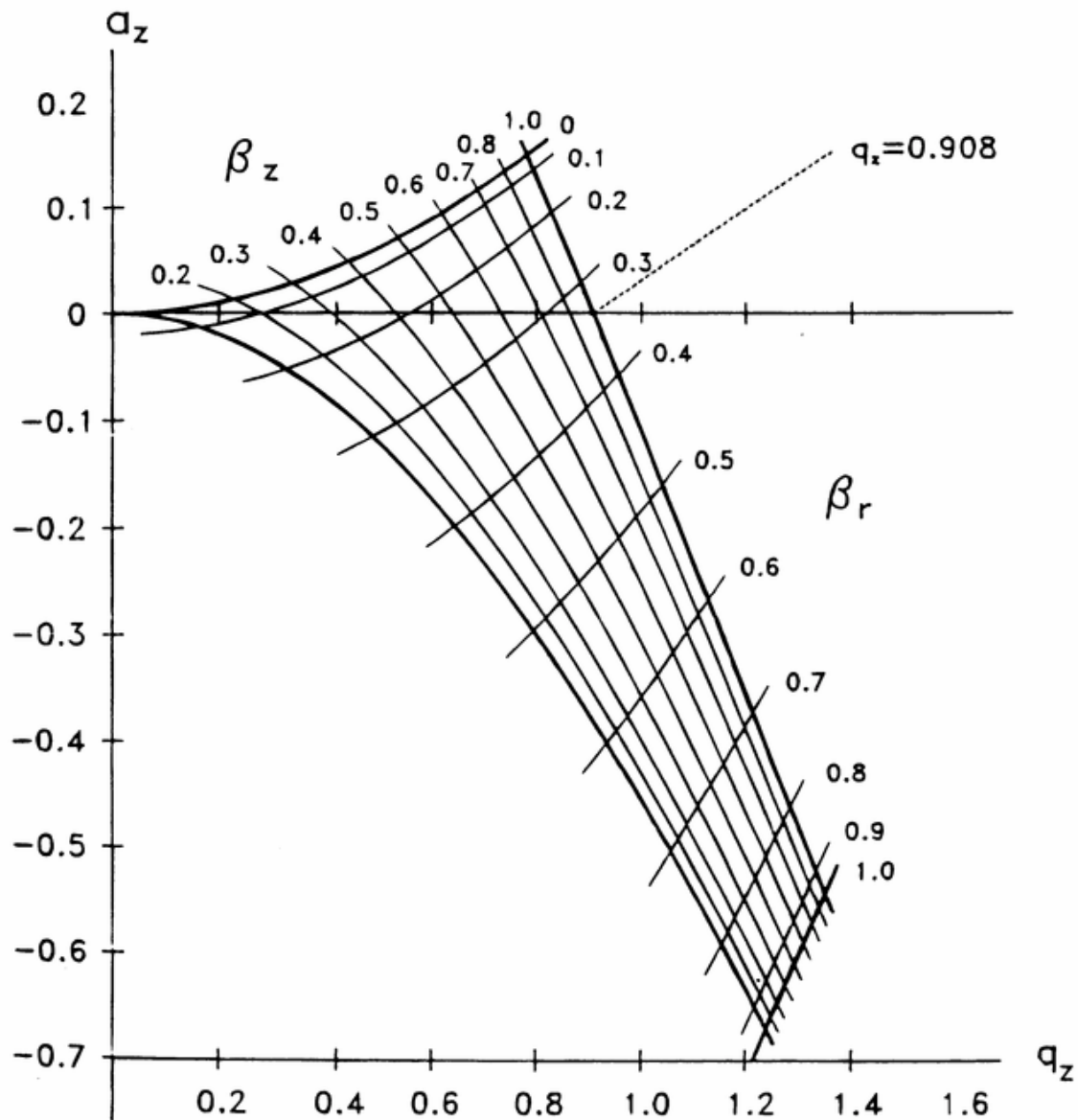


Abb. 2.6: Stabilitätsdiagramm der Mathieu'schen Gleichungen für die elektrische Paul-Falle [54].

Nach dem Einfangen der Ionen folgt die Massenanalyse. Dazu wird die Wechselspannungsamplitude V kontinuierlich erhöht, damit die Ionen schnell die Instabilitätslinie überschreiten, so dass sie innerhalb kürzester Zeit die Ionenfalle über die Öffnung an der Austrittsendkappe verlassen können. Zusätzlich werden Multipolfelder durch Überlagerung von dipolaren Feldern der Endkappen und den quadrupolaren Feldern der Ringelektrode erzeugt. Diese Felder erzeugen innerhalb des eigentlichen Stabilitätsbereiches scharfe Instabilitätsbereiche, in denen das Ion resonante Energien aufnimmt. So können Scanngeschwindigkeiten von bis zu 60.000 amu/s erreicht werden.

2.3.4. Fourier-Transform-Ionenzyklotron-Resonanz (FT-ICR)

Anders als bei der elektrischen Ionenfalle werden im ICR die Ionen im homogenen Magnetfeld eines supraleitenden Magneten eingefangen. Dazu werden Magnetfelder mit einer Stärke von bis zu 7,4 Tesla eingesetzt, die über ein Ionen-Interface mit der Ionenquelle verbunden sind. Die Analyse der Ionen erfolgt ebenfalls durch resonante Anregung (*Ion Cyclotron Resonanz*, ICR). Durch die Kombination mit der Fourier-Transform-Technik (FT-ICR) [55] werden hohe Nachweisempfindlichkeiten und Auflösungen [56] im Bereich der biochemischen Analytik (Elementarzusammensetzung von Molekül- und Fragmentionen) erzielt.

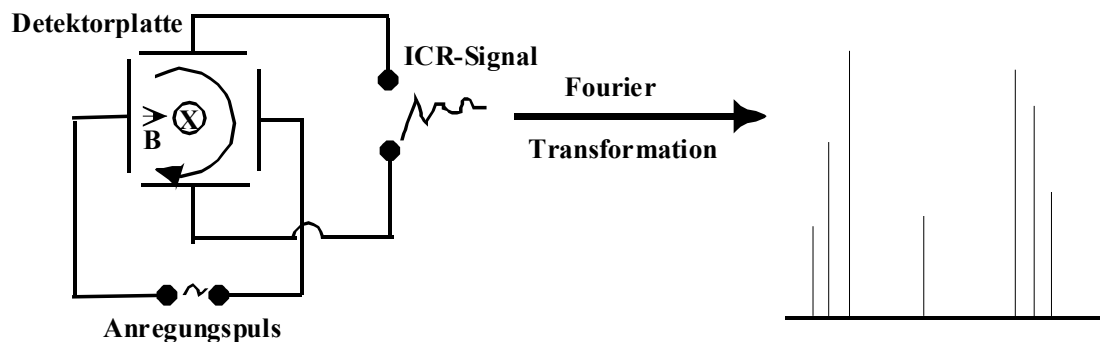


Abb. 2.7: Schematischer Aufbau eines FT-ICR-Massenspektrometers; Der Ionen-nachweis erfolgt durch die Aufzeichnung des Induktionsstroms auf den Empfänger-platten. Jede Masse besitzt eine andere Umlauffrequenz. Diese kann aus dem Rohsignal aller Schwingungen durch Fourieranalyse bestimmt werden.

Das Funktionsprinzip ist wie folgt: Die gebildeten Ionen werden in eine Analysezelle geführt, die in der Mitte eines starken, homogenen Magnetfeldes positioniert ist (siehe Abb. 2.7). Dort können die elektrisch geladenen Teilchen auf stabilen Kreisbahnen eingefangen und gehalten werden, wenn Stöße der kreisenden Analytationen mit Restgasmolekülen vermieden werden. Sie rotieren dabei mit einer Umlauffrequenz ω , die durch

$$\omega = Q * B / (2 * \pi * m) \quad (9)$$

mit Q : Ladung, B : Magnetfeldstärke, m : Teilchenmasse gegeben ist.

Bei Einstrahlung eines elektromagnetischen Wechselfeldes mit durchstimmbarer Radiofrequenz, die der Umlauffrequenz der rotierenden Ionen entspricht, nehmen diese aus dem Anregungspuls Energie auf. Dies bewirkt, dass die Ionen sich in Paketen gleicher Phase sammeln und dass sich gleichzeitig der Radius ihrer Kreisbahn vergrößert. Die kohärent rotierenden Pakete induzieren einen hochfrequenten Strom an einem senkrecht zu den beiden Anregungsplatten eingesetzten Empfänger. Dieser empfängt die Frequenzen aller im Analysator umlaufenden Ionenpakete. Nach einer Fourier-Transformation erhält man daraus das Frequenzspektrum. Aus diesem lässt sich das Massenspektrum berechnen. Die Radiofrequenzemission der Ionen bremst ihre Bewegung, so dass das Signal abklingt. Diese Abklingzeit der Spektren bestimmt die Massenauflösung. Sie muss möglichst lang sein, um eine hohe Massenauflösung zu bekommen.

Die extremen Anforderungen an das Hochvakuum in der Analysezelle (10^{-9} - 10^{-10} mbar) wurden unter anderem durch ein aufwendiges Ionentransfersystem gelöst, das die Kopplung einer ICR-Zelle mit einer unter wesentlich höherem Druck stehenden Ionenquelle, die auch eine Elektrospray-Quelle sein kann, erlaubt. Die Vorteile von FT-ICR liegen vor allem in der Messgenauigkeit und der sehr hohen Auflösung (R bis 10^6). Die erreichbare Auflösung übertrifft die von doppelfokussierenden magnetischen Massenspektrometern bei Weitem. Ein FT-ICR-Massenspektrum kann natürlich auch mit einer variablen Auflösung aufgenommen werden. Für Untersuchungen mit ESI-MS bedeutet dies, dass der Überblick über die Serie der auftretenden Ionen zunächst mit niedriger Auflösung aufgenommen werden kann und anschließend die einzelnen Signale mit hoher Auflösung registriert werden.

2.4. Die Fragmentation: Versuch einer chemischen Analyse mit der Massenspektrometrie

Neben der Bestimmung des Molekulargewichts kann die Massenspektrometrie durch spezifische und reproduzierbare Fragmentierung Informationen über die chemische Struktur des Analyten liefern. Oft benutzt man nur den Vergleich des Fragmenten-Pattern mit Literaturdaten, um eine bereits katalogisierte Substanz im eigenen Massenspektrum zu identifizieren. Besitzt man einen geeigneten bzw. vollständigen Satz von Fragmenten z.B. bei Peptiden, so ist die chemische Analyse auch einer unbekannten Substanz möglich. Die Vorteile einer massenspektrometrischen Analyse gegenüber anderen Analysemethoden (NMR etc.) sind ihre Geschwindigkeit und die Möglichkeit zum schnellen Zugriff auf Datenbanken über das Internet.

Peptide sind lineare Biomoleküle, die aus sich wiederholenden Struktureinheiten den Aminosäuren bestehen. Diese sind durch Peptidbindung verbunden und unterscheiden sich nur durch die Seitenketten. Bei 20 natürlichen Aminosäuren ergibt sich eine große Vielfalt, die die Analyse erschwert. Durch den bevorzugten Bruch der Peptidenbindung, lässt sich eine Reihe von Ionen erzeugen, deren Massendifferenzen einen direkten Rückschluss auf die Aminosäuresequenz zulässt. Leider gibt es einige Aminosäuren, die massengleich sind (z.B. Leucin und Isoleucin). Im Gegensatz zur Edmann-Sequenzierung [57], bei der vom N-Terminus der Peptidkette schrittweise die einzelnen Aminosäuren in Reaktionszyklen abgespalten werden, ist die Massenspektrometrie eine Methode, die nicht auf eine Sequenzier-Richtung festgelegt ist. Die bei einer Fragmentierungsreaktion entstandenen Bruchstücke können jedoch nur dann massenspektrometrisch detektiert werden, wenn sie weiterhin die Ladung besitzen.

Der Erfolg bei der Entwicklung von Methoden zur massenspektrometrischen Sequenzierung von Peptiden hängt einerseits vom Verständnis der Anregungsmechanismen und andererseits von den Fragmentierungsmechanismen der Peptidionen ab. Bei der Verwendung von relativ „weichen“ (fragmentfreien) Ionisierungsverfahren wie FAB, MALDI oder ESI fehlt zunächst die Information über die kovalente Struktur, weil in der Regel wenige verwertbare Fragmentationen beobachtet werden. Dies liegt daran, dass die großen Moleküle aufgrund der vielen inneren Freiheitsgrade und der daraus resultierenden hohen vibratorischen Zustandsdichten trotz der hohen internen Energie relativ lange stabil sind. Obgleich sie zum Beispiel nach der Laserdesorption bei MALDI sehr viel interne Energie besitzen, zerfallen sie nicht auf der Zeitskala der Detektion (typischerweise 100 μ s).

Aus relativ energiearmen Molekülen, wie sie mit „weichen“ Ionisierungsmethoden erzeugt werden, können aber durch Anregung mit Licht, durch Elektroneneinfang oder durch Stöße mit Neutralen Fragmente gewonnen werden. Die so genannte kollisionsinduzierte Dissoziation (*Collision Induced Dissociation*, CID) ist die kostengünstigste Methode. Mit ihr werden deshalb häufig nach der Ionisierung Fragmentationen erzeugt werden [58]. Die Aktivierung erfolgt meist über Stöße mit neutralen Gasmolekülen, wie z. B. Ar oder Xe, wobei die Translationsenergie der Ionen (einigen eV bis zu einigen keV) teilweise in Schwingungsenergie und unter Umständen auch in elektronische Energie umgewandelt wird. Im Molekül wird die zugeführte Energie schnell über alle Freiheitsgrade verteilt. Im nächsten Schritt kann die unimolekulare Dissoziation des durch Stöße aktivierten Ions entsprechend der so genannten Rice-Ramsberger-Kassel-Marcus-Theorie erfolgen (die RRKM-Theorie [59]). Dabei fluktuiert durch *internal vibrational redistribution* (IVR) die Energie zwischen den verschiedenen Schwingungen. Das IVR wird von Anharmonizitäten und den großen Schwingungszustandsdichten in der Nähe der Dissoziationsenergie verursacht. Die im Molekül verteilte Energie kann sich auch statistisch in einer Reaktionskoordinate konzentrieren und die entsprechende Bindung brechen. Nach dem Zerfall des Komplexes werden alle zugänglichen Quantenzustände der Produkte mit gleicher Wahrscheinlichkeit besetzt. Die RRKM-Theorie wurde für das Studium thermischer Reaktionen entwickelt und berücksichtigt nur den elektronischen Grundzustand.

Für Peptide sagt die RRKM-Theorie wegen den vielen Freiheitsgrade eine Fragmentierung nur bei sehr hohen Energien und mit einer kleinen Rate voraus [60]. Eine weitere Komplikation kann durch die Peptidfaltung entstehen. Hat das Protein die Struktur eines Wollknäuel, so ist es wohl möglich Fragmente aus äußeren Breichen abzuspalten und Bindungen an der Oberfläche aufzubrechen, es wird aber unmöglich sein das komplexe Gewirr aus Fragmenten zu trennen.

Auch mit hochenergetischen Stoßanregungstechniken [64] oder anderen speziellen Verfahren (*Electron capture dissociation* [65, 66, 67]) lassen sich bisher zuverlässig vollständige Fragmentmuster nur bis zu Massenbereichen von 5.000 Dalton erreichen. Der Hintergrund dieser Tatsache liegt vermutlich in der RRKM-Theorie und zusätzlich dem starken „Verknäulen“ der Peptidketten.

Die Anregung der Ionen wird in dieser Arbeit durch viele Stöße mit He, eine fs-Multiphotonenanregung im nahen IR- und Anregungen mit verschiedenen UV-Wellenlängen durchgeführt.

Im Folgenden werden die Fragmentierungskanäle in Peptiden beschrieben und dann die verschiedenen Dissoziationsmethoden kurz vorgestellt: Die kollisionsinduzierte Dissoziation, die IR-Photodissoziation (*black body infrared radiation dissociation*) (siehe Abschn. 2.4.4.), die IR-fs-Multiphotonanregung (siehe Abschn. 2.4.7.3.) im nahen IR, die Dissziation mit Elektroneneinfang und die UV-photoinduzierte Dissoziation. Als Modellsysteme wurden kleine Modell-Peptide, das Gramizidin A und das Cyochrom C verwendet.

2.4.1. Nomenklatur der Fragmentationen von Peptiden nach Roepstorff und Fohlmann

Die hier verwendete Nomenklatur für die Fragmentierung von Peptiden (siehe Abb. 2.8) geht von Bindungsbrüchen in der Nähe der Peptidbindungen aus. Brechen können die:

- die von Carbonyl-Kohlenstoff ausgehende C–C–Bindung,
- die von Carbonyl-Kohlenstoff ausgehende C–N–Bindung (die sogenannte Peptidbindung),
- die weitere von Amid-Stickstoff ausgehende N–C –Bindung.

Verbleibt bei der Spaltung die Ladung am N-terminalen Fragment, so werden die entsprechenden Fragmente als A-, B-, C-Typ klassifiziert, verbleibt die Ladung am C-terminalen Bruchstück, so werden die Fragmente entsprechend als X-, Y- und Z-Fragmente bezeichnet.

Das Y-Fragment entsteht durch das Brechen der Peptidbindung und wird zum Beispiel nur als protonierte Spezies detektiert. Ein zweifach geladenes Y-Fragment wird als Y^{2+} -Fragment bezeichnet. Fragmentationen, die den N-Terminus enthalten und durch den Bruch einer Peptidbindung entstehen, werden als B-Fragmente bezeichnet. Sie kommen bei ESI und MALDI ebenfalls als protonierte Spezies vor. Mehrfach geladene Fragmentationen werden mit B^{2+} und B^{3+} usw. bezeichnet. Die B-Fragmente werden von links durchnummeriert, die Y-Fragmente von rechts (siehe Abb.: 2.8).

Durch Abspaltung der Carbonylgruppe ($\Delta M = 28$) entstehen weitere Fragmentationen. Sie werden der Nomenklatur nach als A-Fragmente, wenn die Ladung auf dem N-Terminus bleibt und X-Fragmente, wenn die Ladung auf dem C-Fragment bleibt. Häufig erleiden Fragmentationen noch Neutralverluste von Ammoniak ($\Delta M = 17$) oder Wasser ($\Delta M = 18$). Neutralverluste sind bei der Interpretation von Fragmentationsspektren hilfreich, da sie häufig in einem konstanten Intensitätsverhältnis zu ihren Hauptfragmenten auftreten und so über den Abstand der beiden Ionen (Fragment und Neutralverlust) Rückschlüsse auf den Ladungszustand ermöglichen. In Abb. 2.8 ist die Nomenklatur von Roepstorff und Fohlmann dargestellt. Die Richtung der Haken zeigen wo die Ladung bleibt Die tiefgestellte Zahl gibt bei beiden Fragmentationen die Nummer der Aminosäure bezüglich des jeweiligen Terminus an.

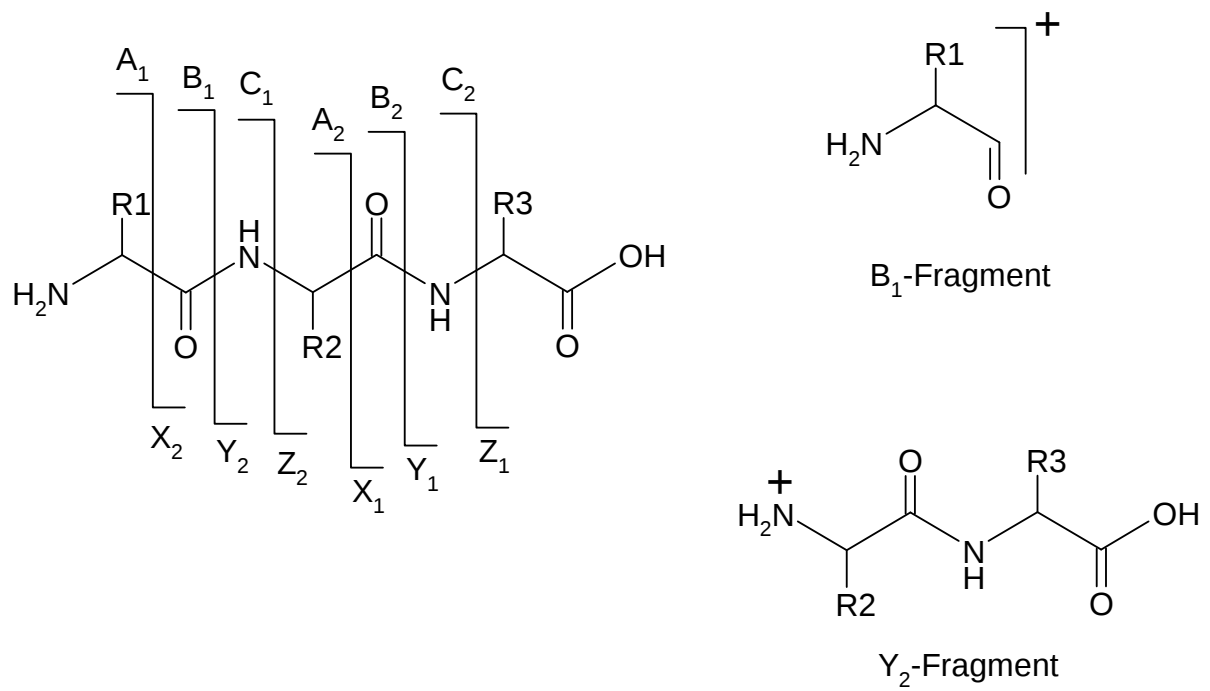


Abb. 2.8: Nomenklatur der Fragmentationen nach Roepstorff und Fohlmann [61]

2.4.2. Fragmentierungsmechanismen der geladenen Peptide

Für das tiefere Verständnis der Fragmentierungsmechanismen ist es wichtig ob die Ladung (hier das Proton) sich an Ort der Reaktion befindet (*charge site induced Mechanismus*), sie gar initiiert (*charge site initiated Mechanismus*) oder fernab des Bindungsbruchs als Zuschauer fungiert (*charge remote fragmentation*).

Charge-site-induced Mechanismus:

Für die Bildung von Y^+ -Fragmenten ist eine intramolekulare Übertragung eines Wasserstoff-atoms bzw. eines Protons aus dem N-terminalen Fragment nötig [62]. Für diese Übertragung wird ein zyklischer Übergangszustand vorgeschlagen (siehe Abb. 2.9, 1a), bei dem ein nucleophiler Angriff der Imidgruppe auf die Carbonyl-Gruppe der zu spaltenden Peptidbindung erfolgt. Dabei wird das Wasserstoffatom am Stickstoff übertragen. Alternativ wird die Übertragung des Wasserstoffatoms am α -Kohlenstoff der Aminosäure N-terminal zur Bindungsbruchstelle postuliert (siehe Abb. 2.9, 1).

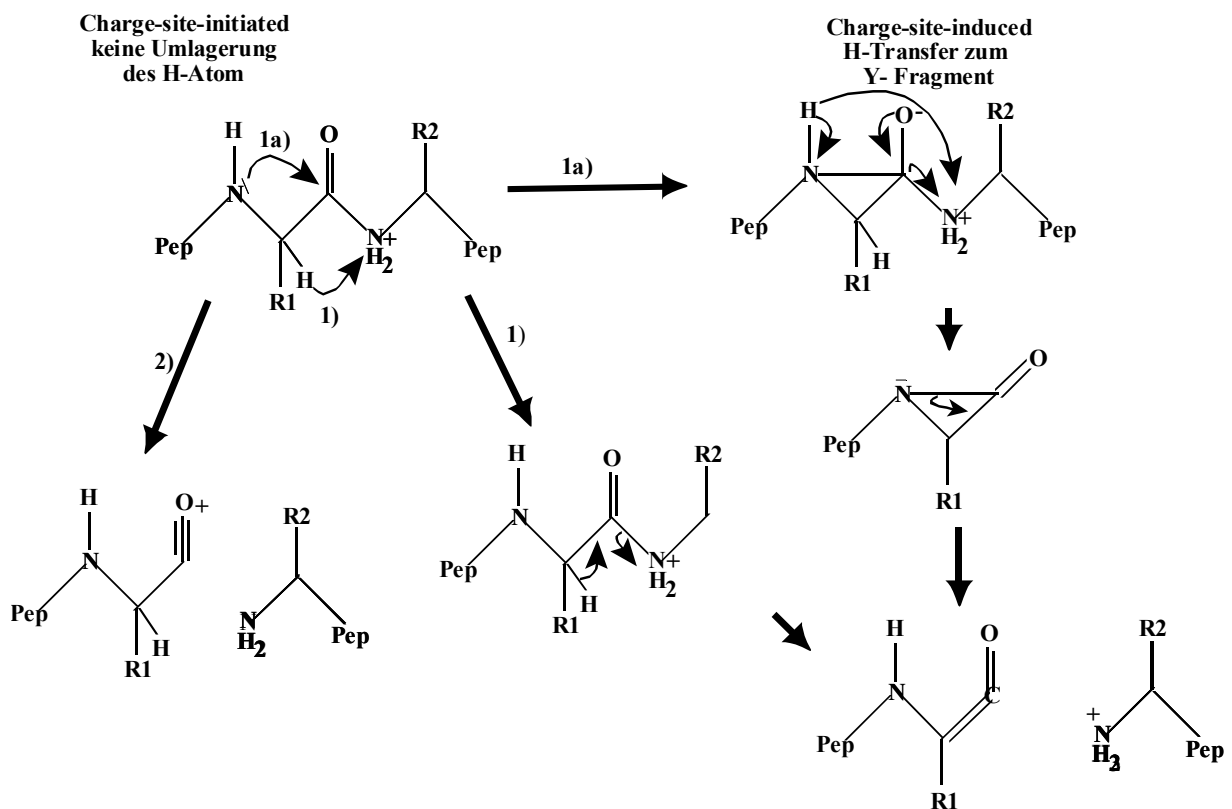


Abb. 2.9: Fragmentierungsmechanismen unter Beteiligung des „mobilen“ Protons.

Kenny [63] untersuchte 1992 mit Deuterium-Austausch- bzw. Deuterium-Labeling-Experimenten den Fragmentierungsmechanismus erneut und fand heraus, dass ein Imidwasserstoffatom und nicht das Wasserstoffatom am α -Kohlenstoff während des Bindungsbruches wanderte (siehe Abb. 2.9, 1a).

Charge-site-initiated Mechanismus:

Dieser Mechanismus geht von einer protonierten Peptidbindung aus (siehe Abb. 2.9, 2). Die formal dem C-Terminus zugeordnete Ladung initiiert den Bindungsbruch. Das Wasserstoffatom bleibt am Stickstoff. Der Bindungsbruch führt zur Entstehung eines Neutralteilchens (Y-Fragment) und des B^+ -Fragmentes, welches nun die Ladung trägt und im Fragmentionenspektrum detektiert werden kann.

Charge remote fragmentation:

Bei diesem Mechanismus geht man davon aus, dass die Bindung weitab der Ladung bricht, also die Ladung nur eine Zuschauerfunktion hat. Auch dieser Mechanismus ist plausibel, da die Dissoziationsenergien von neutralen und protonierten Molekülen sehr ähnlich sind.

Der Beweis welcher Mechanismus in den Peptiden abläuft ist schwierig zu führen so lange die Position der Protonen unbekannt ist, bzw. unbekannt ist, ob diese in geeigneter Zeit wandern können.

2.4.3. Kollisionsinduzierte Fragmentation

Bei ESI werden Fragmentierungen großer Moleküle mehrheitlich mit Kollisionsaktivierung durchgeführt. Der Nachteil einer Stoßanregung ist, dass keine definierte Energieübertragung erfolgt: Streifende Einfälle haben mehr statistisches Gewicht als zentrale Stöße, so dass eine sehr breite Energieverteilung der inneren Energie entsteht auch wenn die Stoßenergie exakt definiert wurde.

Generell muss man kollisionsinduzierte Fragmentierungen mit einem und mit mehreren Stößen unterscheiden. Bei der Stoßanregung mit einem Stoßpartner gibt es eine prinzipielle Beschränkung bei der Zufuhr der Energie: Bei gleicher Ionenenergie und mit zunehmender Ionenmasse wird ein immer geringerer Energieübertrag im Schwerpunktsystem erreicht.

In unserem ESI-Massenspektrometer dient He als Stoßpartner innerhalb der Ionenfalle (siehe Abb. 2.10). Aufgrund seiner geringen Masse sind viele Stöße mit den Ionen erforderlich, bevor es zur Fragmentierung kommen kann. Das Ion wird dabei schrittweise und langsam aufgeheizt und die Energie gleichmäßig im Molekül verteilt wie bei einem thermischen Heizen. Entsprechend erfolgt die Fragmentierung statistisch. Dadurch und da die Energie sehr langsam zugeführt wird, wird häufig nur der energetisch niedrigste Fragmentierungskanal beobachtet. Nur bei starker Anregung der Ionen sind auch höhere Kanäle beobachtbar. Auch für Peptide mit einer Masse unter 5 000 Dalton sind mit dieser Methode deshalb die Fragmentierungsmuster oft unvollständig und zudem sehr kompliziert, da es wegen der in großen Molekülen nötigen hohen Gesamtenergie in den Ionen zu Umlagerungen vor oder bei der Fragmentierung kommt.

Um die laserinduzierte Fragmentierung besser analysieren zu können werden zu allen Substanzen auch CID-Spektren gezeigt. Der Vergleich soll dann zeigen, ob die Photoanregung neue Kanäle erschließen kann.

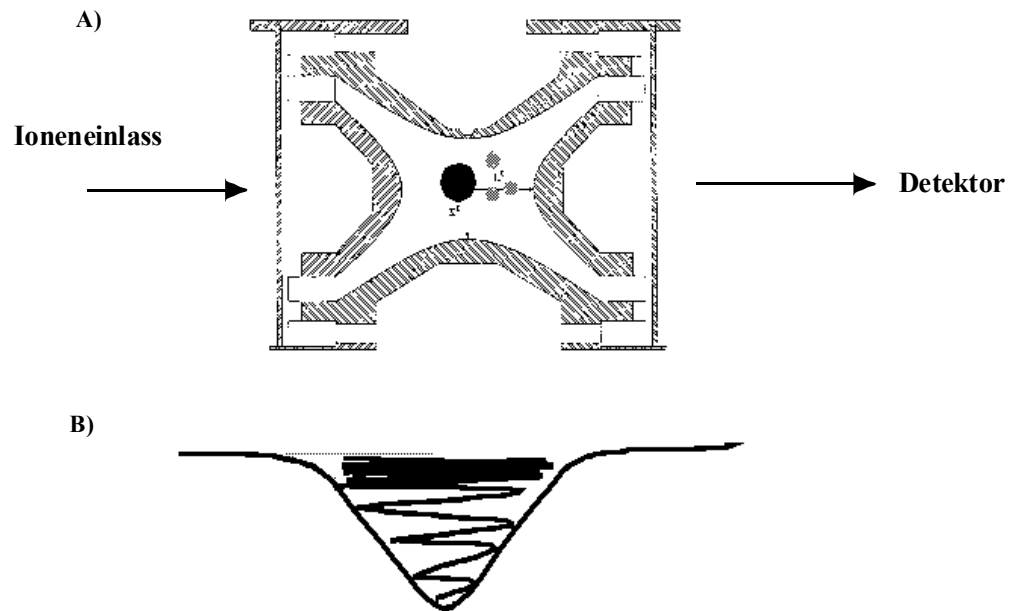


Abb. 2.10: Schematische Darstellung der Fragmentation in der Paul-Falle: A) Fallen-Querschnitt mit Ionen, B) Schematisches Potential mit Teilchenbewegung: Durch Aufschaukeln der Ionen in der Falle kommt es zu kinetischen Stößen mit dem He-Puffergas (sehr lange Dauer, viele Stöße)

2.4.4. *Back body infrared dissociation (Bird)*

Williams und Mitarbeiter [68] konnten zeigen, dass Peptidionen in Ionenfallen spontan zerfallen obgleich sie keinen Stoß mit Restgas erlitten haben. Sie führten dies auf eine IR-Anregung der Ionen durch die Wärmestrahlung (Schwarzkörperstrahlung) der Wand zurück und konnte dies systematisch durch eine Temperaturänderung der Wände beweisen. Sie nannten dieses Phänomen *black body infrared dissociation* (BIRD) und verwendeten es im Folgenden als eine eigenständige Dissoziations-Methode. Die Energetik der IR-Photonen und der Dissoziationsenergien der Molekülionen macht klar, dass es sich um eine Absorptionsskaskade von IR-Photonen auf einer langen Zeitskala handeln muss. Dabei stellt ein Peptid einen idealen IR-Absorber dar, da es viele Schwingungs-Freiheitsgrade gibt und die Kombinationsbanden dieser eine extrem hohe Schwingung-Zustandsdichte anbietet.

Durch die schrittweise Absorption ist klar, dass die Energie zwischen den Absorptionen durch IVR über das Molekül gleichmäßig verteilt wird. Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Fragmente bei BIRD und die Fragmente bei CID mit vielen Stößen gleich sind und sehr ähnliche Intensitäten besitzen. Ein Nachteil der Methode ist, dass es sehr lange dauert bis die Ionen ihre interne Temperatur der Wandtemperatur anpassen (bis zu 12 Sekunden). Noch gravierender und störender für die Messung ist es, dass die Wandtemperatur nur langsam hoch geheizt bzw. in der Temperatur variiert werden kann.

Später konnte mit IR-Lasern das Multi-Photonen-Aufheizen von BIRD imitiert werden [69] jedoch ohne nennenswerte Verbesserung der Fragmentierung. Der Vorteil der Verwendung eines IR-Lasers ist es jedoch, dass die Wände des Massenspektrometers nicht geheizt werden müssen und ein Aus- und Einschalten sehr schnell möglich ist.

2.4.5. Dissoziation durch Elektroneneinfang (*Electron capture dissociation*)

Bei *electron capture dissociation* wird ein freies niederenergetisches Elektron an das Molekülion angelagert und die dabei freiwerdende Energie verursacht eine Dissoziation. Für die Massenspektrometrie macht dies nur Sinn, wenn es sich vorher beim Mutterion um ein mehrfach geladenes Ion handelte und somit auch die Fragmente geladen sind. Diese Methode wurde von Zubarev und McLafferty zufällig beim Versuch einer UV-Dissoziation entdeckt: Die Photonen aus dem Laser erzeugten an Oberflächen Elektronen, die sich dann an mehrfach geladene Moleküle anlagerten [70]. Dadurch entstehen trotz vorhergehender Selektion eines m/z -Verhältnisses größere m/z -Verhältnisse (Mutterionen mit geringerer Ladungszahl) und auch Fragmente mit größeren m/z -Verhältnissen als das des Mutterions. In Abb. 2.11 ist ein ESI-electron-capture Dissoziations-Spektrum gezeigt. [71]. Deutlich ist die Verkomplizierung des Massenspektrums durch die verschiedenen Ladungszahlen, die durch den *electron capture* Prozess (mehr als ein Elektron kann eingefangen werden) oder die Bindungsbrüche mit verschiedenen Ladungsaufteilungen erzeugt werden. Diese Verkomplizierung muss jedoch in Kauf genommen werden, da zum Beispiel *electron capture* an MALDI-Ionen (MALDI erzeugt typischerweise einfach geladenen Ionen) zur Neutralisierung und somit keinem Nachweis führt.

Die *electron capture* Dissoziation liefert erfolgreich eine Sequenzanalyse von Polypeptiden bis zur Masse ca. 3000 Da. Bei höheren Massen wird zwar auch eine starke Fragmentierung beobachtet aber die Spektren sind sehr komplex (siehe Abb. 2.11) und enthalten nicht alle Fragmente wie sie zur Sequenzanalyse notwendig wären.

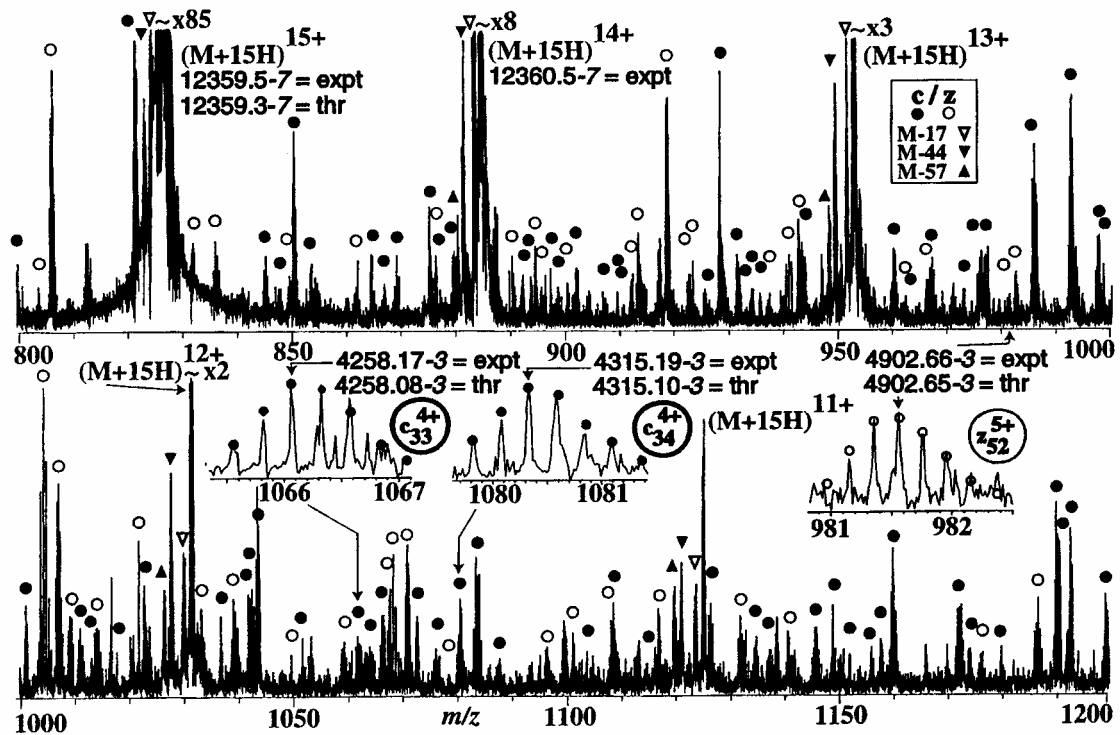


Abb. 2.11: *Electron capture dissociation* Massenspektrum des massenselektierten und ladungsselektierten Cytochrom C mit 15 Protonen $(M+15H)^{+15}$. Beachte die Erzeugung von Mutterionen mit weniger Ladungen bis $(M+15H)^{+11}$ durch Anlagerungen von mehreren Elektronen und die vielen Fragmentationensignale zwischen den Mutterionensignalen. Sie entstehen durch die Fragmentierung aus verschiedenen Ladungszuständen des Mutterions aber auch durch die vielen Aufteilungsmöglichkeiten der Ladung bei jeder Fragmentierung an einer Peptidbindung.

2.4.6. Photofragmentation durch elektronische Anregung

Das Verhalten von Molekülen in der Gasphase ist von grundlegendem Interesse in der Chemie und Physik, da hier die intrinsischen Eigenschaften von Molekülen ohne Einfluss anderer Moleküle oder einer Solvatationshülle untersucht werden können. Die spektroskopischen Ergebnisse können direkt mit theoretischen Ergebnissen verglichen werden. Andererseits können aber auch Umgebungseinflüsse zum Beispiel in Clustern und Komplexen gezielt erzeugt und nachgewiesen werden. Dadurch ist es möglich zwischen molekülinternen und lösungsmittelsinduzierten Effekten zu unterscheiden.

Als besonders elegante Methode zum Nachweis von strukturellen und Eigenschaften und der Energetik von Zerfällen hat sich die Laser-Massenspektrometrie erwiesen. Der Vorteil der Anregung mit Photonen liegt dabei darin, dass die zugeführte Energie exakt definierbar ist. Mittels unterschiedlicher Verfahren, wie der Einphotonen- und der resonanten Multiphotonen-Anregung lassen sich unterschiedliche Fragestellungen untersuchen. Die einfachen spektroskopischen Experimente wie eine Absorptionsmessungen, die in Lösung wegen den möglichen hohen Teilchendichten durch eine direkte Intensitätsmessung möglich sind, sind mit massenaufgelösten Ionen in der Gasphase unmöglich. Es gibt technische Schwierigkeiten wegen der geringen Teilchendichte und ihre starken Fluktuation. Typischer Teilchenzahlen sind 500 Ionen einer Masse und Spezies in der Paul-Falle. Man benutzt deshalb die Photodissoziation als Nachweis der Photoanregung, da sich Fragmentationen mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit nachweisen lassen. Die Photodissoziation kann aus dem angeregten elektronischen Zustand (direkte Dissoziation) oder aus dem heißen Grundzustand erfolgen

In Abb. 2.12 sind die photophysikalischen Prozesse nach einer resonanten Einphotonen-anregung in einem modifizierten Jablonski-Termschema zusammengefasst. Vom Grundzustand, der im Allgemeinen ein Singulettzustand S_0 ist, kommt man durch eine resonante Photoabsorption geeigneter Wellenlänge in die höheren Singulettzustände S_1 , S_2 usw. Die Rückkehr zum S_0 kann vom S_1 (aber selten von höheren Singulettzuständen S_n aus) durch Emission von Strahlung, genannt Fluoreszenz, oder durch strahlungslose Deaktivierung (*Internal Conversion*, IC) erfolgen. Für nicht-optimierte Moleküle ist typischerweise die Fluoreszenzquantenausbeute (Anzahl der Fluoreszenzphotonen pro absorbiertes Photon) sehr klein. Der Zerfall höherer Singulett-Zustände führt im Allgemeinen über ein IC zum schwingungsangeregten S_1 , über Schwingungsrelaxation zum kalten S_1 und dann wie oben beschrieben zum S_0 .

Strahlungslose Spin-Umkehrprozesse (*intersystem crossing*, ISC) sind im Allgemeinen unwahrscheinlich und führen zu Triplettzuständen T, die entgegen dem Spinverbot durch Strahlungsemission, genannt Phosphoreszenz, oder durch erneutes ISC zum S_0 zurückkehren können. Im Lösungsmittel wird die molekulinterne Schwingungsenergie in kürzester Zeit an die Lösungsumgebung abgegeben. Diesen Prozess nennt man Schwingungsrelaxation. Er läuft auf der Zeitskala von Schwingungsperioden ab (einige ps). In der Gasphase bzw. in der ESI-Ionenfalle bleibt die Schwingungsenergie im Molekül bis sie auf einer Zeit von μs durch He-Stöße gekühlt wird. Die durch einen strahlungslosen Zerfall des S_1 oder des T_1 in den S_0 frei werdende Schwingungsenergie reicht im Allgemeinen zu einer Fragmentierung eines Moleküls aus. Die Photofragmentierung kann deshalb zum Nachweis der erfolgreichen Photoanregung verwendet werden. Im Allgemeinen gibt es je nach Molekül nach einer Photoanregung Dissoziation, Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Der Nachweis der Fluoreszenz [74] ist zwar möglich, jedoch wegen der ungünstigen Fallengeometrie sehr ineffizient. Zudem zeigt sich, dass viele protonierte Moleküle eine kurze Lebensdauer besitzen.

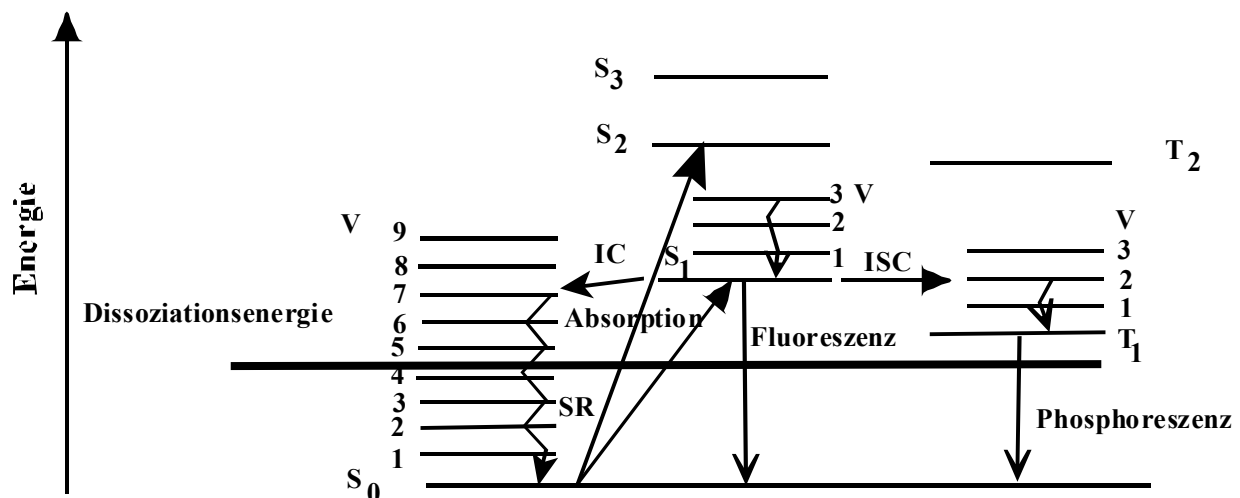
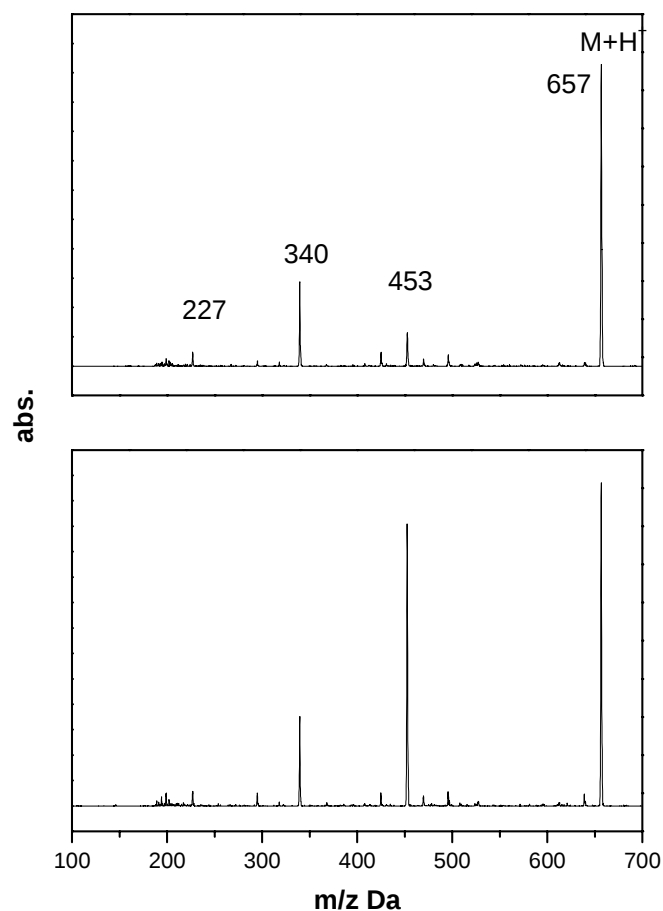


Abb. 2.12: Jablonski Termschema. Strahlungsprozesse: Absorption, Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Strahlungslose Prozesse: *Internal Conversion* (IC); *Intersystem Crossing* (ISC) und Schwingungsrelaxation (SR).

Im klassischen Jablonski-Diagramm fehlen jedoch konische Durchschneidungen elektronischer Zustände und direkte Dissoziation aus angeregten Zuständen wie sie in den letzten Jahrzehnten experimentell und theoretisch gefunden wurden [72, 73, 74].

Besonders letztere können für die Fragmentierung von Peptiden von großer Bedeutung sein, da sie möglicherweise wie eine Schere Molekülteile trennen bevor eine chemische Umlagerung im Molekül bzw. in den Fragmenten entstehen kann, die die chemische Identität wie sie vor der Anregung vorhanden war, verwischen würde.

Wie bereits oben erwähnt muss es nicht zwangsweise zur Fragmentierung kommen, auch wenn die innere Energie des Systems nach einer Photoanregung und einem IC oberhalb der Dissoziationsenergie liegt. Nach der inneren Konversion wird die Energie auf alle Schwingungsfreiheitsgrade verteilt und die Fragmentierung erfolgt dann statistisch nach der RRKM-Theorie. Also muss der Ort der Fragmentierung im Molekül nicht der Ort der Photoabsorption sein. Je größer die Anzahl der internen Freiheitsgrade, desto kleiner wird die Zerfallsrate. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit für Stöße mit dem Restgas (z. B. Helium) durch die das Ion Energie abgeben kann. Je nach vorliegender Situation kann so die Fragmentierung sehr verzögert erfolgen. Da sich in der Paul-Falle Edelgas befindet erwartet man bei sehr großen Molekülen, dass das *Quenchen* der Fragmentation durch das Edelgas möglich ist. Durch einen gepulsten Einlass des He nur während der Ionenspeicherzeit und nicht während der Wechselwirkungszeit mit dem Laser können Fragmentkanäle mit geringen Dissoziationsraten sichtbar gemacht werden, die sonst bei Anwesenheit des He *gequencht* werden. In Abb. 2.13 sind die laserinduzierten Massenspektren (Anregung bei 285 nm) von $\text{NH}_2\text{Leu-Leu-Leu-Leu-Trp-OH}$ mit und ohne He in der Paul-Falle gezeigt. Der Fragmentierungskanal bei 453 nm reagiert in seiner Intensität deutlich auf die Anwesenheit des He. Dies zeigt, dass bei diesem Kanal die Kühlrate durch die Stöße mit He und die Rate des Zerfalls im Wettbewerb stehen. Der Fragmentierungskanal bei 339 Da reagiert dagegen überhaupt nicht auf das He und ist deshalb vermutlich durch eine resonante UV-Zweiphotonenanregung verursacht. Da von der An- oder Abwesenheit des He nur die Intensitäten der Fragmente betroffen sind, wir aber nur an den Fragmentmassen interessiert sind, haben wir auf eine weitere Verkomplizierung der Laser-ESI-Experimente durch diesen Freiheitsgrad verzichtet.



In Abb. 2.13: ist das Laser-Massenspektrum des NH₂-Leu-Leu-Leu-Leu-Trp-OH mit (oben) und ohne He in der Paul-Falle (unten) gezeigt. Der Fragmentierungskanal bei 453 Da verschwindet nahezu in Anwesenheit von ca. 0,01 mbar He. Erklärung siehe Text.

Die typische Bindungsenergie von C-C-Bindungen liegt bei 3,6 eV und die von C-N-Bindungen bei 3,0 eV [76]. Bei protonierten Systemen liegen die Dissoziationsenergien unterhalb von 4,0 eV, auch deshalb da die Ladungen die Bindungsenergien des Moleküls reduziert. Für die protonierten aromatischen Aminosäuren liegen die Dissoziationsenergie entsprechend unterhalb von 3,0 eV [77]. Ein UV-Photon (4,32 eV bei 285 nm) kann also bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Molekülen zur Fragmentierung führen.

2.4.7. Die Ein- oder Mehrphotonenanregung mit UV-Licht

Die verschiedenen elektronischen Molekülzustände haben im Gegensatz zu Atomen durch überlagerte Schwingungs- und Rotationsniveaus relativ breite Energiebereiche. Ein bestimmtes Energieniveau ($E_{\text{ges.}}$) entspricht dann einem bestimmten elektronischen Schwingungs- und Rotationszustand des Moleküls.

Die Gesamtenergie entsteht in erster Näherung durch die Summe der drei Energieanteile

$$E_{\text{ges.}} = E_{\text{elektr.}} + E_{\text{vibr.}} + E_{\text{rot.}} \quad (10)$$

Bei einer elektronischen Anregung können auch Schwingungsenergie und Rotationsenergie geändert werden und es gilt

$$\Delta E_{\text{ges.}} = \Delta E_{\text{elektr.}} + \Delta E_{\text{vibr.}} + \Delta E_{\text{rot.}} \quad (11)$$

Die elektronische Energie ist stets sehr viel größer als die Schwingungsenergie und diese ist wieder sehr viel größer als die Rotationsenergie.

Für ein komplexes Molekül wie Peptide liegen die Schwingungs- und Rotations-Niveaus sehr dicht, so dass bei Raumtemperatur die elektronische Bande sehr breit wird. Für eine resonante Laseranregung muss man also nur darauf achten, dass man mit der Wellenlänge innerhalb der elektronischen Bande liegt.

Da die Ionen für mehrere Sekunden in der Paul-Falle akkumuliert werden können, ist es möglich, das gleiche Ionenensemble mehrfach mit dem Laser zu beschießen. Dadurch kann die Fragmentierungsausbeute erhöht werden. Es lassen sich so auch wenig wahrscheinliche Fragmentierungskanäle mit ausreichender Intensität erzeugen. Damit ergibt sich die Möglichkeit mehrere Photonen aus verschiedenen Laserpulsen zu absorbieren. Dabei muss man beachten, dass im Falle einer Anregung bis zum nächsten Schuss ein sehr großer Teil der Energie zwischen den Laserpulsen durch Stöße mit He abgegeben werden kann. Ist während des ersten Laserschusses ein Fragment entstanden, so kann dieses Fragment während eines nachfolgenden Laserschusses auch ein weiteres Photon absorbieren. Danach kann sich eine weitere Fragmentierung anschließen.

2.4.7.1. Die Chromophoren Gruppen

Die Photoanregung ist immer dann resonant, wenn die Photonenenergie mit einer Energiedifferenz im Molekül übereinstimmt. Da im Lösungsmittel, aber auch bei hohen Temperaturen in der Gasphase die elektronischen Spektren durch die vielen Schwingungs- und Rotationsübergänge bzw. verschiedene Konformationen verbreitert sind, ist diese Bedingung relativ leicht zu erfüllen.

Peptide bestehen aus Aminosäuren, die sich in den Seitenketten unterscheiden. Von den 20 natürlichen Aminosäuren besitzen drei eine aromatische Seitenkette. Die UV/VIS Absorptionsspektren der drei aromatischen Aminosäuren sind in Abb. 2.14 gezeigt.

Tryptophan (Trp) absorbiert bei der längsten Wellenlänge (erster Peak bei etwa 286 nm), Tyrosin (Tyr) bei der zweitlängsten (Peak bei etwa 276 nm) und Phenylalanin (Phe) bei der kürzesten Wellenlänge (Peak bei etwa 260 nm). Leider sind in Abb. 2.14 die Konzentrationen nicht exakt gleich, so dass man direkt die relativen Übergangsmomente entnehmen könnte. Aus anderen Experimenten ist aber bekannt, dass die Absorption in Trp wesentlich stärker ist als die in Tyr und diese wiederum stärker als die in Phe [78].

Die chemische Intuition aber auch Experimente [79] zeigen, dass die Protonierung in Peptiden nicht an den aromatischen Resten erfolgt und folglich die Absorptionen der aromatischen Chromophore durch die Ladung kaum verschoben sind. Bei Verwendung von Wellenlängen von 285 nm kann man also selektiv das Trp resonant ansprechen, bei 266 nm Tyr und Trp. Beide Wellenlängen werden im Folgenden zur Photodissoziation von Modellpeptiden eingesetzt.

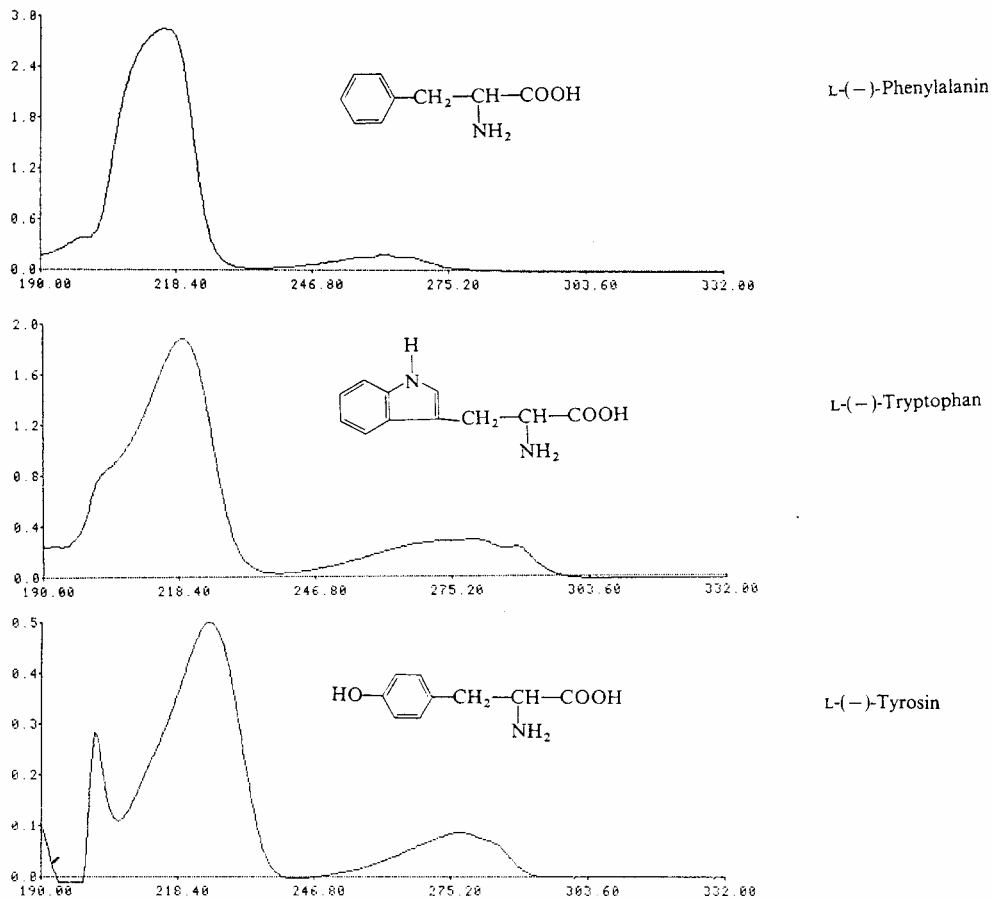


Abb. 2.14: Die UV/VIS-Spektren (Absorption gegen Wellenlänge) der aromatischen Aminosäuren Trp, Tyr und Phe. Man beachte von Trp über Tyr nach Phe die Verschiebung der Absorptionen zu kürzeren Wellenlängen.

Das Absorptionsspektrum des Gramicidin D, das vier Trp-Aminosäuren enthält, ist der Absorption des Trp sehr ähnlich (Abb. 2.15).

Mann kann offensichtlich in erster Näherung die aromatischen Aminosäuren in Peptiden als lokale Chromophore betrachten. Der Nachteil einer Anregung bei 285 nm oder 266 nm ist folglich, dass nur in den aromatischen Seitenketten Energie eingekoppelt werden kann. Die Anregung kann also nur dann erfolgen, wenn überhaupt ein solcher Chromophor im Peptid enthalten ist. Ist dies der Fall, so führt dies dann möglicherweise auch nur zu lokalen Bindungsbrüchen in der Umgebung der Chromophore, ein Effekt, der für eine Sequenzanalyse nicht gewünscht ist.

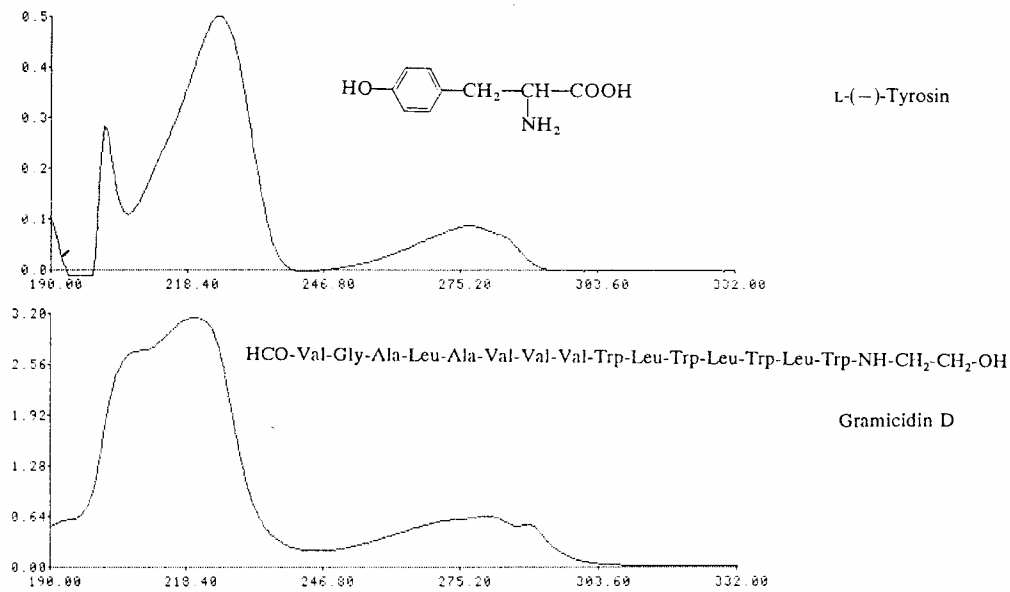


Abb. 2.15: Absorptionsspektrum (Absorption gegen Wellenlänge) der Aminosäure Trp (oben) und des Gramicidin D, das vier Trp-Reste besitzt (unten). Die Ähnlichkeit der beiden Spektren im Bereich von 300–240 nm unterstützt ein lokales Bild der aromatischen Seitenketten in Peptiden.

Die drei aromatischen Aminosäuren besitzen darüber hinaus eine zweite Absorptionsbande bei 215 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren auch die restlichen 17 nicht-aromatischen Aminosäuren mit ähnlichen Intensitäten (siehe Abb. 2.16).

Auch bei Einbau des nicht-aromatischen Aminosäuren in ein Peptid ändert sich die Absorption bei 200 nm nicht wesentlich wie das Lösungsmittelsspektrum des N-Methylamids, das die Peptidbindung enthält, und das eines Poly-Ala-Peptids im Vergleich dazu zeigt (siehe Abb.2.17).

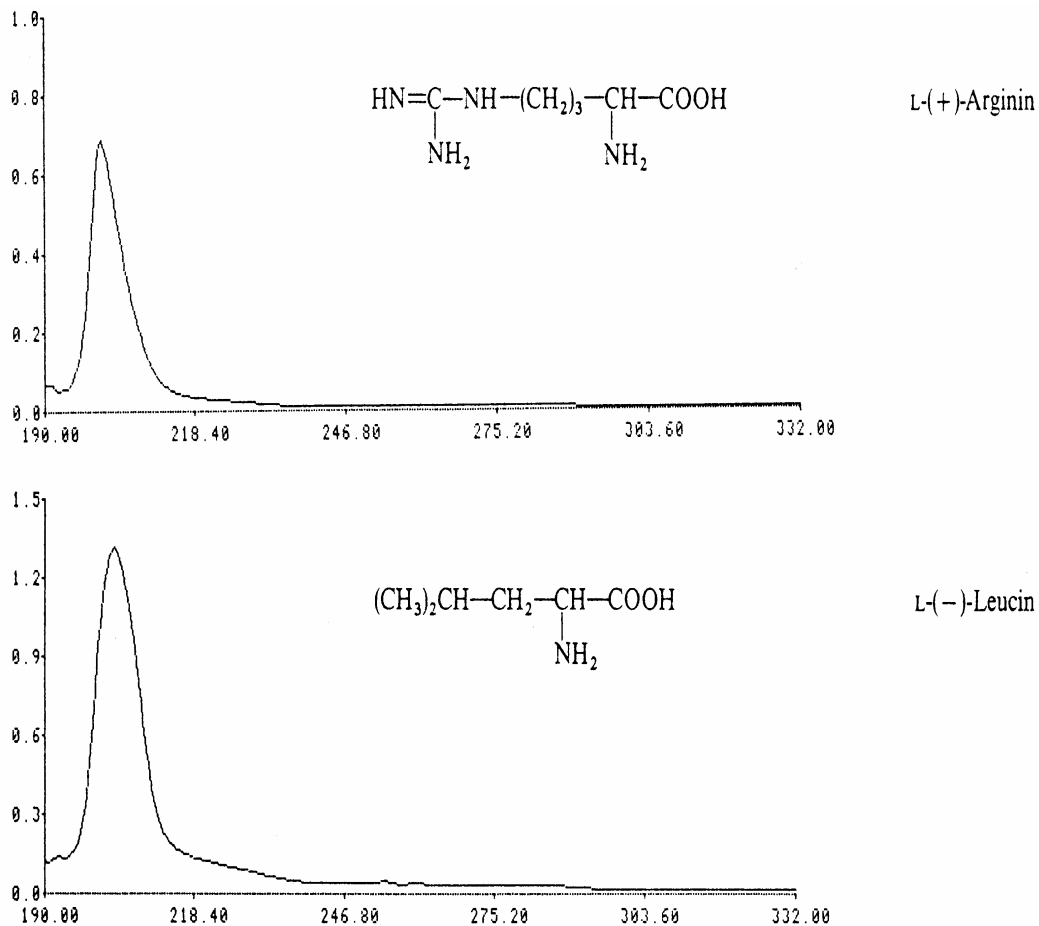


Abb. 2.16: Die UV/VIS-Spektren (Absorption gegen Wellenlänge in nm) der nicht-aromatischen Aminosäuren Leu und Gly. Die Spektren der anderen nicht-aromatischen Aminosäuren sind sehr ähnlich aber hier aus Platzgründen nicht gezeigt. Beachte die starke Absorption bei 200 nm. Die Wellenlänge 213,5 nm (5. Harmonische eines Nd:YAG-Lasers) liegt zwar nur in der ansteigenden Flanke der Absorption der nicht-aromatischen Aminosäuren, aber dennoch ist eine Anregung aller Aminosäuren möglich.

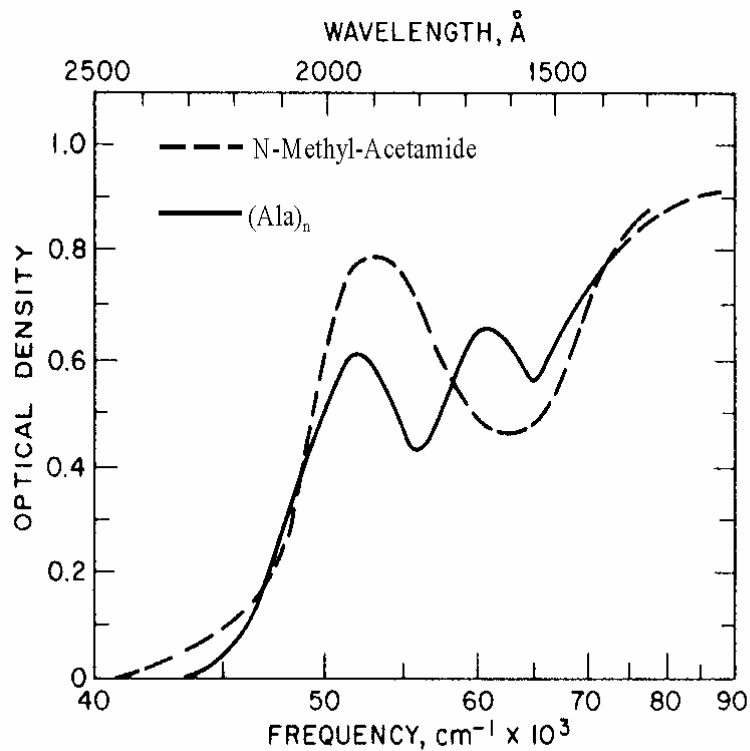


Abb. 2.17: Die Absorption eines Poly-L-Alanin-Peptids (durchgezogene Linie) ist der des N-Methyl-Acetamids (gestrichelte Linie) sehr ähnlich [80]. Das N-Methyl-Acetamid ist ein molekulares Modell für die Peptidbindung.

Man kann also annehmen, dass bei Anregung im Wellenlängenbereich 218-190 nm alle Aminosäuren angeregt werden können. In der Tat konnte bei 213,5 nm eine weitaus erhöhte Absorption der Aminosäuren gegenüber der Wellenlänge 266 nm nachgewiesen werden. In den Abb. 2.18, Abb. 4.63 und Abb. 4.64 sind die Laserfragment-Massenspektren bei 213,5 nm und 266 nm der Substanzen Leu-Leu-Leu (Abb. 2.18) und Gamicidin A (Abb. 4.63 und Abb. 4.64) dargestellt. Bei gleichen Schusszahlen und vergleichbaren Pulsintensitäten, gibt es bei der Anregung mit 213,5 nm viel mehr Fragmentierung.

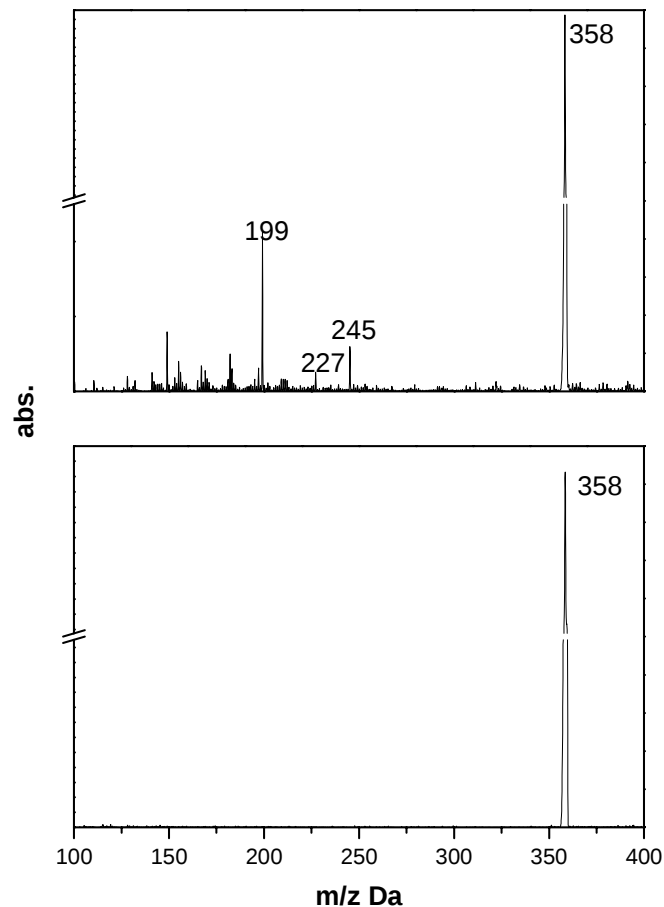


Abb. 2.18: Laser-Fragmentierungsspektren des Peptids Leu-Leu-Leu, oben Anregung bei 213,5 nm und unten bei 266 nm bei gleicher Laser-Pulsenergie (2 mJ) und gleicher Schusszahl (2 Laserschüsse). Bei 213,5 nm ist offensichtlich eine Anregung der nicht-aromatischen Aminosäure Leu möglich.

Die Vorteile einer kurzwelligen UV-Photoanregung von Peptiden und Proteinen an der Peptidbindung sind, dass

a) die Peptidbindungen zwischen allen Aminosäuren können bei etwa 200 nm ähnlich absorbieren. Bei geringer Lichteinstrahlung wird jedes Molekül nur einmal angeregt. In einem Ensemble von mehreren Molekülen wird bei dem einen Molekül die eine, bei einem anderen eine andere, Peptidbindung angeregt. Man sollte also - wie gewünscht - viele verschiedene Fragmente bekommen.

b) möglicherweise eine schnelle, nichtstatistische Bindungsspaltung vor und hinter der C=O-Gruppe (so genannte Norrish-Reaktion) initiiert werden kann. Dieser Bindungsbruch ist so schnell, dass die Energie vorher nicht auf andere Molekülbereiche abfließen kann. Dadurch wird das Peptid wie mit einer Schere zerschnitten. Umlagerungsreaktionen, die die chemische Struktur verändern und zu Fragmenten führen, die nicht direkt mit der Ausgangsstruktur korrelierbar sind, sollten dabei selten sein. Die Molekülgröße sollte dann keine Rolle mehr spielen und das Verfahren sollte deshalb also auch auf Proteine anwendbar sein. Möglicherweise sind die Proteine gefaltet (Wollknäuel) und müssen vorher durch Stoßanregung entfaltet werden. Eine Anwendung in einer Ionenfalle wäre also besonders interessant. Dabei spielt die Anwesenheit des He keine Rolle, da die Fragmentierung wie gesagt sehr schnell ist (fs-Zeitskala).

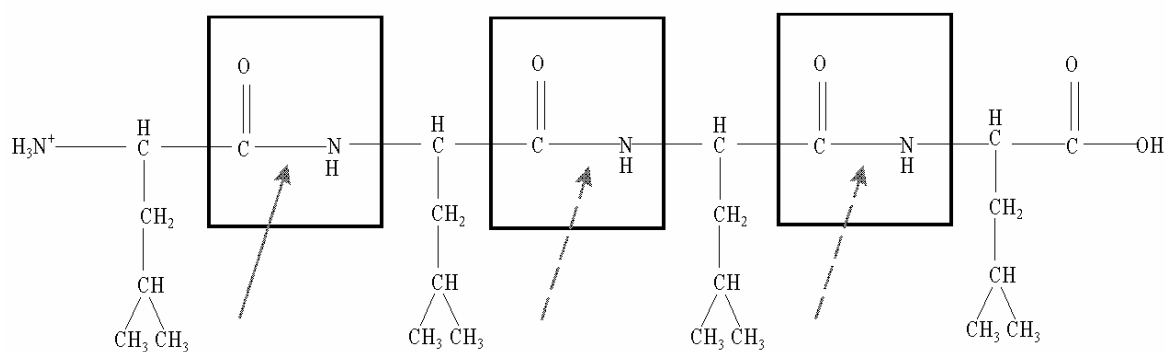


Abb. 2.19: Schema des Konzepts der Anregung bei 213,5 nm in Peptiden. Hier Anregung in der Peptidbindung des $\text{NH}_2\text{-Leu-Leu-Leu-Leu-OH}$.

Die Photofragmentierung von protonierten Peptiden wurde bereits mit einem 193 nm Laser in einem ICR an mit MALDI und ESI erzeugten Ionen durchgeführt [81]. Es wurde dabei immerhin ein Peptid mit 10 Aminosäuren sequenzanalysiert. Es wurden jedoch keine weiteren systematischen Untersuchungen an verschiedenen Peptiden durchgeführt, vermutlich auch deshalb, da man feststellte, dass auch Photoelektronen entstehen, die *electron capture dissociation* verursachen können.

Wird die eingestrahlte Energie nicht über Strahlung abgegeben sondern bleibt im Molekül, so kann es zur Dissoziation kommen. Wie bereits oben erwähnt hat die Photoanregung den Vorteil, dass exakt die Photonenenergie übertragen wird. Als Resultat kann man höher liegende Dissoziationskanäle selektiver ansprechen als dies mit Stoßprozessen möglich ist. Die Zerfallsrate nimmt allgemein mit zunehmender innerer Energie zu und die Kühlung und Stabilisierung durch das He in der Paulsfalle wird immer unwahrscheinlicher.

2.4.7.2. Die resonante Mehrphotonenanregung

Bei geeignet hohen Laser-Intensitäten kann aus dem angeregten Zustand ein weiteres Photon absorbiert werden, so dass mehr Energie ins Molekül eingekoppelt werden kann und weitere neue Fragmentierungskanäle erschlossen werden können (Abb. 2.20). Für die innere Energie ist es dann unbedeutend, ob das zweite Photon aus dem angeregten Zustand oder nach dem IC wieder aus dem Grundzustand absorbiert werden kann.

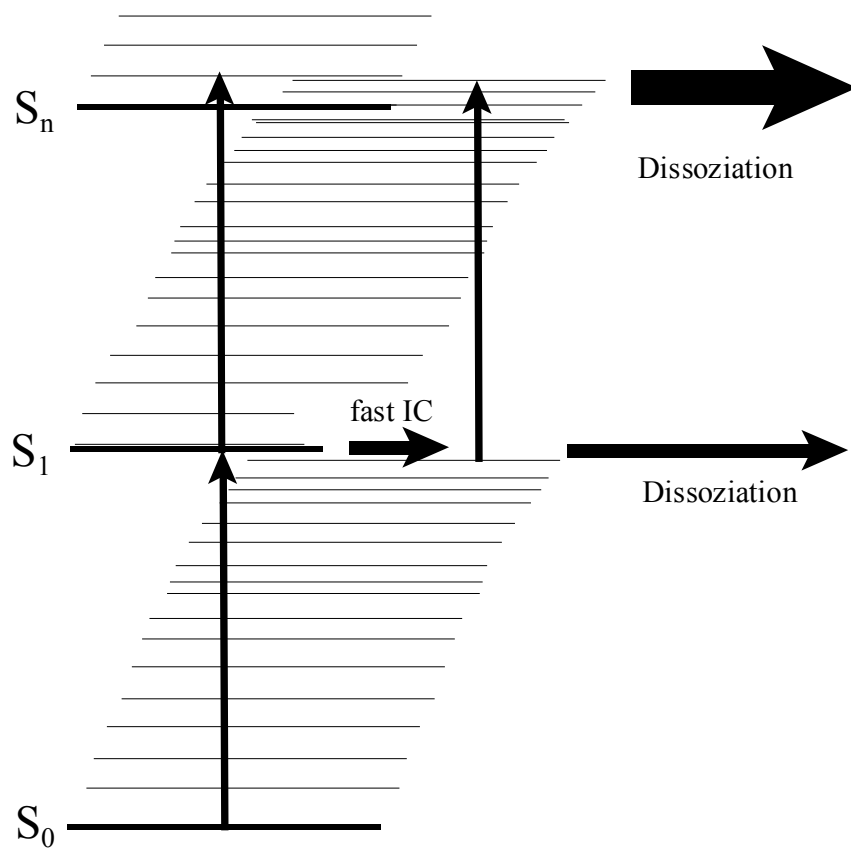


Abb. 2.20: UV-Multiphoton-Anregungsschemata: Resonante Ein- Zwei- oder Multiphoton-UV-Anregung in einem Schritt oder sequentiell (UV, ns Laserpulse).

Bei der Multiphotonen-Anregung nimmt das Molekül zwei oder mehrere (n) Photonen auf. Die Absorption von mehreren Photonen im Molekül skaliert mit der Laser-Intensität I^2 oder I^n und unabhängig davon, ob eine resonanter Zustand getroffen wird oder nicht. Sofern die Energie der eingestrahlt Photonen gerade der Energiedifferenz zwischen dem Molekülgrundzustand und einem angeregten Molekülzustand entspricht, wird die Absorptionseffizienz um mehrere Größenordnungen gesteigert (Resonanzverstärkung), bleibt

aber dennoch relativ klein, so dass eine effiziente Anregung in einer kurzen Zeit nur mit einem intensiven gepulsten Laser möglich ist [82, 83]. Im neutralen Molekül führt typischerweise die Absorption von zwei UV-Photonen zur Ionisation. In bereits positiv geladenen Ionen ist dies jedoch nur mit drei oder mehr UV-Photonen möglich, da die Ionisationsenergie sehr groß ist (je nach Molekülgröße größer als 15-20 eV). Das zweite Photon kann dann nur aus dem S_1 in höhere elektronische Zustände absorbiert werden (Abb. 2.20 links), die in einer Fragmentierung aus diesem oder dem Grundzustand enden. Wegen der kleinen Abstände der elektronischen Zustände jenseits des S_1 ist die UV-Absorption immer resonant mit einem Übergang S_1-S_n .

Zerfällt der angeregte elektronische Zustand während des Laserpulses, so kann das nächste Photon wieder den gleichen Übergang aber bei entsprechend höheren Schwingungsenergien durchführen (Abb. 2.20 rechts). Das Ion befindet sich danach in einem stark schwingungsangeregten Zustand des S_1 und kann direkt oder nach IC zerfallen. Im Vergleich zum Einphotonenschritt ist die interne Energie bei Mehr-Photonen-Schritten entsprechend höher und es können dadurch entsprechend hoch liegende Fragmentierungskanäle angesprochen werden. Experimentell kann nur schwer zwischen Ein- und Zwei-Photonenschritten unterschieden werden. Nach dem Zweiphotonenschritt sind die gleichen Fragmentierungskanäle wie bei der Einphotonenanregung zugänglich. Allerdings sollten höher energetische Fragmentierungskanäle neu dazukommen. Aufgrund der größeren Überschussenergie nach der Absorption von zwei Photonen sollte nach der RRKM-Theorie jedoch die Fragmentierungsrate wesentlich größer sein als beim Einphotonenschritt, so dass dann die He-Quenching-Rate nicht mehr mithalten kann. Dies kann durch ein Ein- und Ausschalten des He-Zustroms in die Paul-Falle gezeigt werden (siehe Abb. 2.13).

2.4.7.3. Nichtresonante Laseranregung mit nahem IR: Fs-Laser-Puls-Anregung bei 800 nm

Mit geeignet hohen Laserintensitäten bei 800 nm ist auch eine nicht-resonante Zwei- Drei- oder Multiphotonen-Anregung möglich (siehe Abb. 2.21). Resonante Zwischenresonanzen erhöhen wieder die Absorptionswahrscheinlichkeit. Eine solche nicht-resonante Mehr-Photonen-Anregung mit zum Beispiel IR Photonen der Wellenlänge 800 nm benötigt jedoch sehr intensiveres Laserlicht, wie es besonders gut mit fs-Laserpulsen (Pulsdauer hier 27 fs) erzeugt werden kann. Im Allgemeinen ist bei IR-Anregung mit 800 nm die Engstelle die Absorption S_0 - S_1 , hier ein Drei-Photonenschritt (siehe Abb. 2.21). Vom S_1 aus sind die weiteren IR-Photonen wegen der kleinen Energieabstände zwischen den höheren elektronischen Zuständen resonant, so dass man die Anzahl der absorbierten IR-Photonen oft nicht steuern kann. Bestes Beispiel ist die Doppelionisation im Gramicidin A (Kap. 4.6.1.2.) Hier ist die Ladung offensichtlich weit vom Chromophor entfernt, so dass auch im positiv geladenen Molekül eine Photoionisation mit fs-IR-Lichtpulsen durchgeführt werden kann.

Das Entwicklungspotential einer fs-Anregung mit IR Licht ist, dass inzwischen die Pulsformen durch Computer gesteuert werden können und sich dadurch ein neuer Freiheitsgrad ergibt dessen Tragweite bisher nicht abschätzbar ist. Es war beabsichtigt in Berlin solche Laserpulse mit geformten Pulsen für die Photodissoziation von Peptiden zu verwenden. Die beobachteten Effekte waren jedoch so klein und verrauscht, dass keine Sinnvolle Optimierung durch den Computer vorgenommen werden konnte.

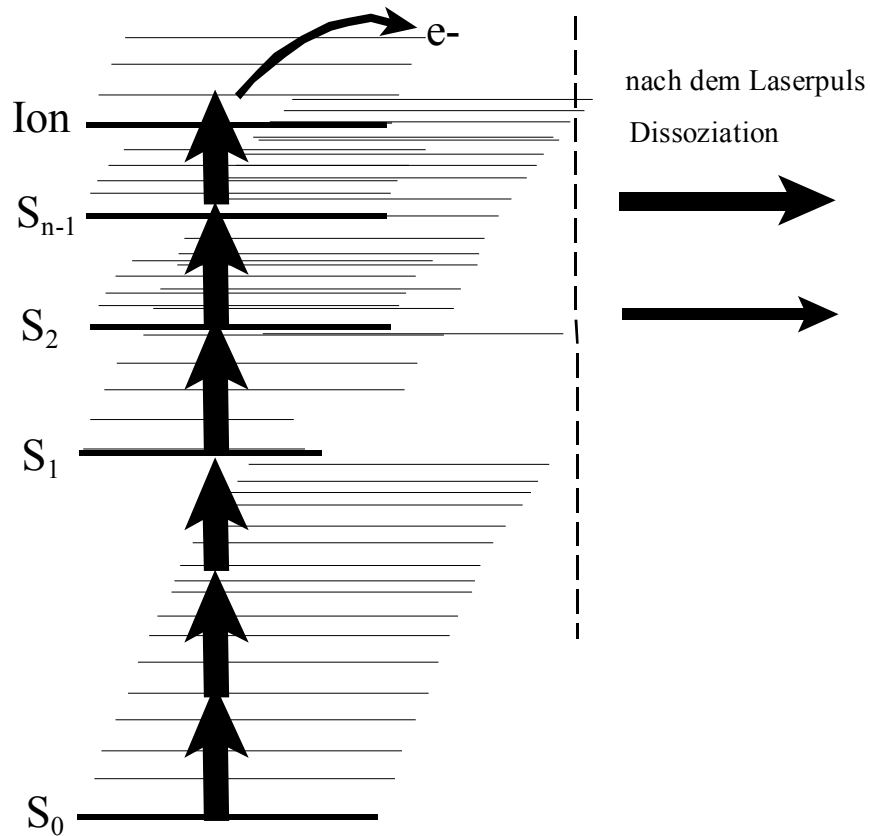


Abb. 2.21: Fs-IR-Multiphoton Anregung. Die optische Pumprate während des Laserpulses ist so hoch, dass selbst schnelle Dissoziationsprozesse nicht konkurrieren können. Erst nach Ende des Laserpulses erfolgt die Dissoziation. Bei einer geeigneten Photonenzahl kann auch ionisiert werden. Nachfolgende Pulse können die Fragmente weiter dissoziieren (hier nicht gezeigt).

3. Experimenteller Teil

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die untersuchten molekularen Systeme, das Massenspektrometer, Änderungen daran und das benutzte Einlasssystem. Einfache aromatische Substanzen, wie Tryptophan, dienten als Testmolekül für die apparative Entwicklung. Mit Hilfe des Tryptophans wird die Untersuchung zur Photofragmentierung von protonierten Systemen in der Gasphase diskutiert und das neu aufgebaute Experiment getestet.

3.1. Wahl des Einlasssystems

Um protonierte biologisch relevante Moleküle zu untersuchen, wurde als Einlasssystem die Elektrospray-Ionisation (ESI) gewählt. ESI ist neben MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) die einzige Methode, die den gestellten Anforderungen gerecht wird. Sie bringt folgende Vorteile gegenüber MALDI:

- ESI-MS lässt sich problemlos mit wässrigen Lösungen unter nahezu physiologischen Bedingungen durchführen. MALDI benötigt eine aufwändige Probenpräparation und erfolgt aus dem Feststoff mit ausgewählter Matrix.
- ESI erzeugt ein relativ stabiles Ionensignal unter anderem durch eine kontinuierliche Probenzufuhr durch eine Kapillare, durch die eine Pumpe die Probenlösung presst. Bei MALDI ist es sehr schwierig für jeden Desorptionsprozess gleiche Voraussetzungen, wie zum Beispiel eine neue Probenoberfläche, bereit zu stellen.
- Während bei MALDI-MS überwiegend einfach geladene Ionen erzeugen werden, werden bei ESI-MS mehrfachgeladene Ionen gebildet. Dies führt bei ESI zu einem relativ kleinen Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und es können kostengünstige Massenselektoren eingesetzt werden, die eine Massenselektion vor und nach der Spektroskopie erlauben.

Ein Nachteil von ESI in Kombination mit gepulsten Lasern ist jedoch die Tatsache, dass bei ESI die Probe kontinuierlich eingeführt wird, während bei MALDI gepulst desorbiert wird. Es bedarf bei ESI also eines Ionenspeichers, der im Rhythmus des Lasers gefüllt, bestrahlt und dessen Inhalt dann nach jedem Laserschuss nach m/z analysiert wird.

Das Elektrosprayverfahren basiert wie oben ausgeführt auf dem kontinuierlichen Zerstäuben von Lösungsmittelströpfchen, in welchen die Probenmoleküle eingelagert sind (siehe Kap.

2.1.2.). Das Tröpfchen entsteht an einer elektrisch geladenen sehr kleinen Kapillare. Die Lösung, die aus der Öffnung der Kapillare kommt, lädt sich mit gleicher Polarität wie die Kapillare stark auf und wird von dieser abgestoßen. Dadurch lösen sich Tröpfchen ab, die durch einen ladungsunterstützten Trocknungsprozess schnell an Größe verlieren, bis einzelne isolierte Probenmoleküle vorliegen. Typischerweise entstehen bei diesem Verfahren Moleküle mit hohen Ladungszahlen, die je nach Polung der Kapillarenspannung durch mehrfache Protonierung oder Deprotonierung erzeugt werden. Aufgrund der hohen Ladungszahl sind auch sehr große Moleküle bis zum Massenbereich 60.000 Dalton mit Massenspektrometern, die eine m/z -Obergrenze von 3.000 besitzen, zugänglich. Dabei befindet sich etwa eine Ladung auf 1.300 Da, das heißt auf etwa 100 C-Atome. Man kann also annehmen, dass die Eigenschaften des Molekülions durch die Ladungen nicht zu dramatisch geändert sind, so dass eine Spektroskopie noch Sinn macht. Andererseits ist es möglich bis zur Masse 1.300 Da Ionen mit nur einer Ladung zu erzeugen. Man hat also einen sehr großen Massenbereich, der sonst nicht erschließbar wäre.

Der Einlass im Elektrosprayverfahren ist der typischen nasschemischen Ausgangssituation im biochemischen Labor gut angepasst. Lösungsmittel mit hoher Oberflächenspannung können jedoch nicht in Reinform verwendet werden, da sonst die Tröpfchen nicht schnell genug schrumpfen. Die Ionenbildung wird je nach Polarität der Nadel durch die Zugabe von Basen oder Säuren unterstützt. DNA-Bruchstücke lassen sich dabei gut als deprotonierte Spezies und Peptide als protonierte Spezies darstellen. Moleküle, die sich nicht oder nur schlecht protonieren oder deprotonieren lassen können als Adduktionen mit Na-, K- oder Metallionen oder sogar als Radikalkationen dargestellt werden. Das bisher beschriebene Verfahren gilt für Nanospray, also für ESI mit kleinsten Sprühnadeln, die allerdings sehr schnell verschleifen oder verstopfen. In unserem ESI wird die Tröpfchenbildung durch einen Stickstofffluss um die ESI-Kapillare unterstützt. Dies hat den Vorteil, dass größere Nadeln verwendet werden können, aber den Nachteil eines größeren Probenverbrauchs.

Wie in Kapitel 2.1.1. bereits erwähnt, werden bei MALDI die Probenmoleküle durch gepulste Laserdesorption aus einer Matrix in die Gasphase gebracht. Während des Desorptionsprozesses kommt es zu einem Protonentransfer und es entstehen protonierte oder deprotonierte Molekülionen mit meist einfacher Ladung. Wie erwähnt, ist die Rolle der im Überschuss beigemischten Matrix vielschichtig. Sie dient als "Lösungsmittel" für die Probenmoleküle, als Laserabsorptionsmedium, aber auch als Protonierungs- oder Deprotonierungsmittel. Dadurch wird die Probenpräparation bei MALDI sehr aufwendig. Das große Problem ist jedoch, dass durch Tests für jede Probe erst eine geeignete Matrix gefunden wird. Bedingt

durch Inhomogenitäten der Probenoberfläche und Intensitätsfluktuationen des Lasers kommt es jedoch bei der Laserdesorption zu sehr großen Schuss-zu-Schuss-Schwankungen der Ionenzahlen. Insbesondere ist es unmöglich für jeden Schuss eine neue, gleiche Probenoberfläche anzubieten. Die resultierenden Schuss-zu-Schuss-Schwankungen sind für eine Spektroskopie, bei welcher die Lichtquelle in der Wellenlänge verändert wird, nicht tolerierbar. Zudem ist auch die Anzahl der bei einem Messzyklus erzeugten Ionen relativ klein. Besonders die letzten beiden Bedingungen sind für weitere Anregungsschritte mit einem Laser sehr ungünstig, so dass die MALDI-Methode für die hier geplanten Experimente nicht gewählt wurde.

3.2. Untersuchte Molekülsysteme

3.2.1. Testmolekül für apparative Entwicklung

Für die Entwicklungsphase des optischen Experimentes wurde ein Molekül gesucht, das eine hohe Anregungswahrscheinlichkeit hat und leicht protonierbar ist. Hier wurde Tryptophan gewählt. Es ist wahrscheinlich, dass beim Tryptophan die Protonierung an der Amino-Gruppe stattfindet [84]. Die Absorption sollte hingegen im Indolring erfolgen. Der Feldeffekt der Ladung auf den Indol-Chromophor ist zunächst durch den Abstand bestimmt, der zwischen dem Ort der Protonierung und dem Ort der Absorption liegt. Nach diesem Modell sollte die Ladung nur eine geringe Verschiebung in der relativen Lage der elektronischen Niveaus haben, da alle Orbitale von Stark-Effekt in ähnlicher Weise betroffen sein sollten. Die in dem Lösungsmittel bekannte Zwitterionenform der allgemeinen Aminosäuren kann durch ESI nicht erzeugt werden, da nur positive Ladungen zugelassen sind und somit nur der N-Terminus protoniert ist.

Tryptophan besitzt einen relativ unpolaren L_b -Zustand und einen polaren L_a -Zustand als niedrigste angeregte Zustände und hat die höchste Anregungswahrscheinlichkeit im Vergleich zu anderen Aminosäure. Die UV-Absorption des protonierten Tryptophan verschiebt sich nur sehr gering im Vergleich zum neutralen Tryptophan. Damit wird es möglich ein Photodissoziations-Signal auch bei nicht optimalen experimentellen Bedingungen zu finden.

Die spektroskopischen Eigenschaften von Tryptophan werden häufig benutzt, um strukturelle Informationen über Proteine zu erlangen [78]. Tryptophan ist damit für Untersuchungen zur Ladungs-Chromophor-Wechselwirkung von höchstem Interesse. Wobei es besonders interessant ist die Wirkung der Ladung auf die angeregten Zustände zu untersuchen.

3.2.2. Untersuchte Peptide

Die in dieser Arbeit mit der ESI – Methode untersuchten Substanzen, sollen einen Überblick über den Fragmentierungsmechanismus von Peptiden erlauben. Die Frage nach dem Ort der Fragmentierung und dem Verbleib der Ladung nach der Dissoziation des Moleküls auf einem der beiden Fragmente ist dabei von grundlegender Bedeutung. Denn nur die geladenen Fragmente sind massenspektrometrisch erfassbar. In diesem Zusammenhang ist es weiterhin wichtig zu erfahren, welche Rolle der Chromophor und welche Rolle die Ladung (hier das überschüssige Proton) bei diesen Vorgängen spielt. Um diese Fragestellungen zu untersuchen, wurden hauptsächlich kleinere Peptide mit einfachen Sequenzen mit nur einem Chromophor und keinen weiteren Protonierungsstellen in den Seitenketten analysiert. Je nach Aminosäurezusammensetzung lassen sich diese in verschiedene Gruppen einteilen. In dieser Arbeit wurden die Aminosäure Tryptophan und die sequenzverwandten Peptide Tryptophan, NH_2 -Leucin-Tryptophan-OH, NH_2 -Leucin-Leucin-Tryptophan-OH, NH_2 -Leucin-Leucin-Leucin-Tryptophan-OH, NH_2 -Leucin-Leucin-Leucin-Leucin-Tryptophan-OH und NH_2 -Leucin-Leucin-Leucin-Leucin-Leucin-Tryptophan-OH untersucht. Die Wahl ähnlicher Aminosäure-reihen bietet den Vorteil, Effekte einzelner bzw. kleiner Gruppen von Aminosäuren auf die massenspektrometrisch erhaltene Information zu untersuchen. Bei obigen Aminosäuren würde man annehmen, dass das Proton am N-Terminus sitzt und somit der Chromophor-Ladungs-Abstand von der Kettenlänge abhängt.

3.2.3. Probenvorbereitung für den ESI-Vorgang

Die Lösungsmittel spielen eine große Rolle, um die Empfindlichkeit für den positiven oder den negativen Modus der Elektrosprayionisation zu erhöhen. Die Funktion des Lösungsmittels ist es in erster Linie die Probenmoleküle zu lösen, das heißt als Einzelmoleküle, umgeben von Lösungsmittelmolekülen darzustellen. Damit die Elektrospraymethode effizient eingesetzt werden kann, müssen die Lösungsmitteltröpfchen, die vom „Nebulizer“ erzeugt werden, durch ein wiederholtes Durchlaufen der Prozesse Abdampfen von Lösungsmittelmolekülen und Explodieren bis zum Einzelmolekül schrumpfen können. Dazu ist eine relativ geringere Oberflächenspannung erforderlich. Als Folge davon lässt sich reines Wasser nur verwenden, wenn ein spezieller „Nebulizer“ eingesetzt wird. Des Weiteren muss das Lösungsmittel eine Ionisation der Moleküle durch Deprotonierung, Protonierung oder Adduktionenbildung ermöglichen. Dazu können dem Lösungsmittel zusätzliche Stoffe beigefügt werden (z. B. Salze) oder die Lösung wird alkalisch oder sauer angesetzt. Wenn die Proben in einem polaren Lösungsmittel mit einer Base oder einer Säure gelöst werden, können sie ionisiert werden. Bei ESI von Peptiden benötigt man ein polares Lösungsmittel z. B. eine Mischung aus Acetonitril und Wasser oder Methanol und Wasser. Aber auch ein unpolares Lösungsmittel wie Toluol kann durch Zusatz eines polaren Modifikators wie Isopropanol eingesetzt werden.

3.2.4. Peptidsynthese

Das Ziel war es die Photofragmentierung als Methode zur Sequenzanalyse mit massenspektrometrischen Mitteln zu testen, bzw. Fragmentierungsmechanismen zu verstehen. Besonders interessant ist es die Rolle der Ladung bei der Fragmentierung zu untersuchen. Dabei unterscheidet man die beiden Fälle bei welchen die Fragmentierung in der Nähe und mit Hilfe der Ladung erfolgt (*charge induced fragmentation*) und bei welchen die Ladung weit weg vom Ort der Fragmentierung ist (*charge remote fragmentation*). Bei geladenen Peptiden kann es sein, dass sich in der Gasphase eine Struktur ausbildet, bei welcher sich die Ladung (vermutlich positioniert am N-Terminus) direkt neben dem Chromophor zu liegen kommt.

Da $\text{NH}_2\text{-Leu-Leu-Leu-Trp-OH}$ und $\text{NH}_2\text{-Leu-Leu-Leu-Leu-Trp-OH}$ nicht kommerziell erhältlich sind, mussten sie selbst synthetisiert werden. Es wurde folgende Strategie umgesetzt:

Aus zwei geschützten Aminosäuren wird die Dipeptid nach Kupplung synthetisiert. Je nach der Kupplung der Anzahlen von Aminosäuren mit Dipeptid werden Tripeptid, Tetrapeptid, Heptapeptid und Hexapeptid synthetisiert.

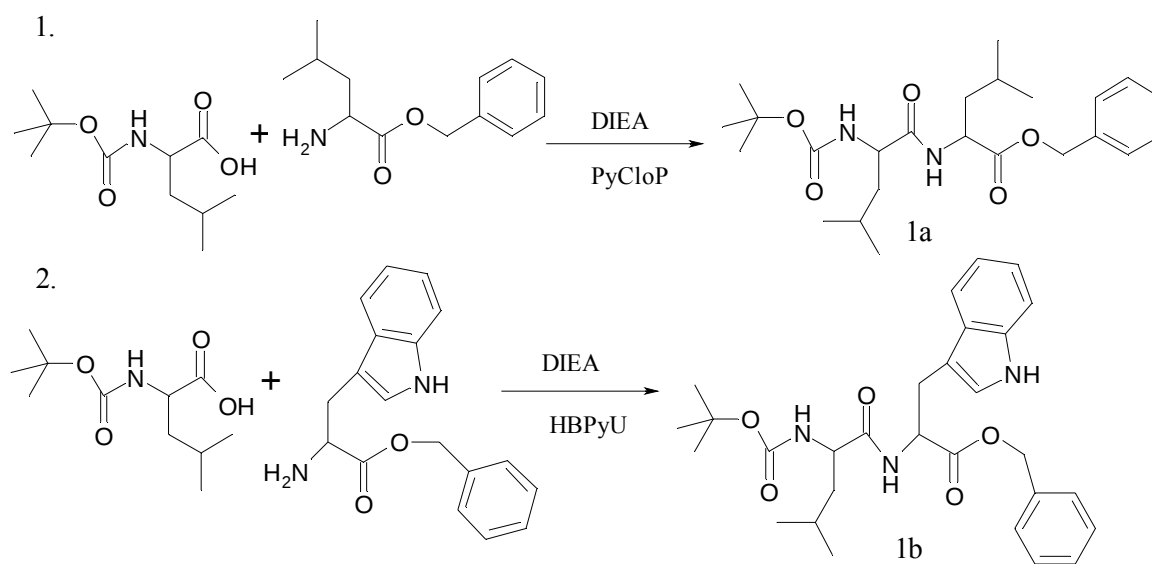
Darstellung von Leucin-Leucin-Leucin-Tryptophan

Aus Boc-geschütztem Leucin und Benzyl-geschütztem Leucin konnten durch Umsetzung mit Chlorotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyCloP) als Kupplungsreagenz gemäß Reaktionsgleichung 1.1 die entsprechenden Dipeptide **1a** erhalten werden.

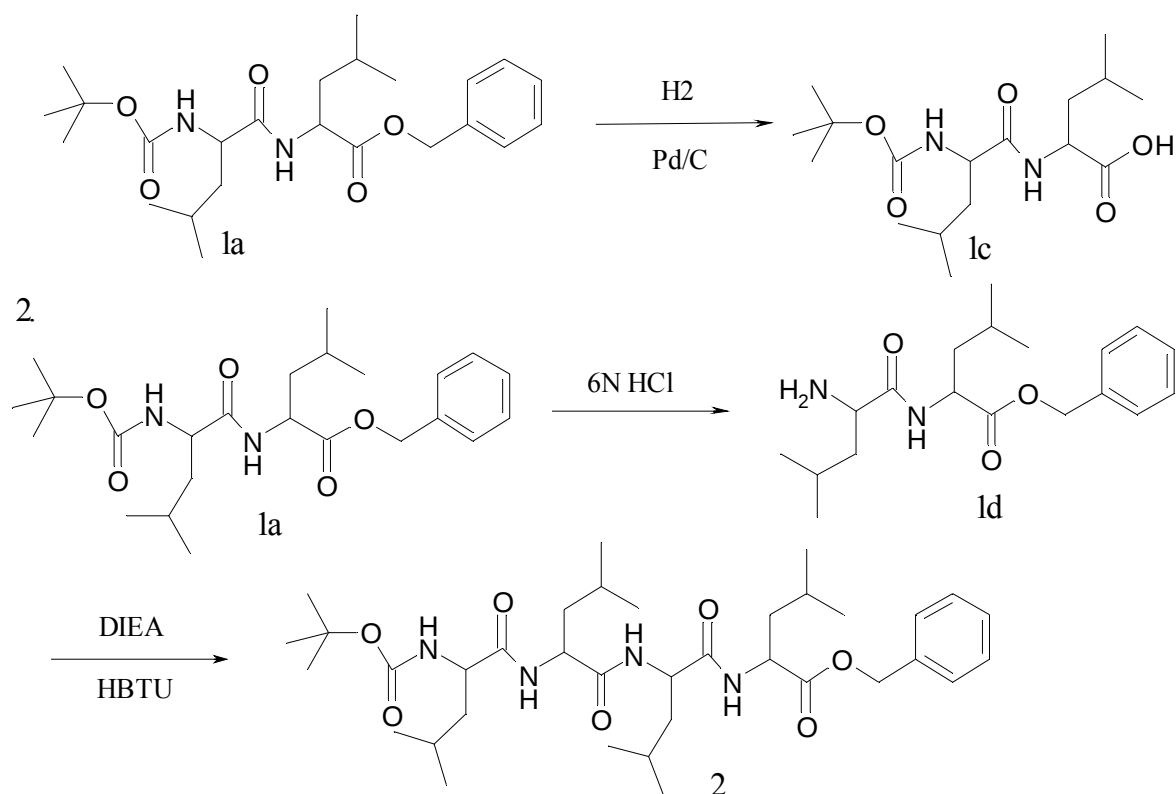
Entsprechend konnten aus Benzyl-geschütztem Tryptophan und Boc-geschütztem Leucin durch Umsetzung mit (Benzotriazol-1-yloxy)-dipyrrolidinocarbenium-hexafluorophosphat (HBPYU) als Kupplungsreagenz gemäß Gleichung 1.2 das entsprechende Dipeptid **1b** erhalten werden.

Die Dipeptide **1a** und **1b** wurden mit 6N HCl Boc-entschützt bzw. mit Hilfe einer palladium-katalysierten Hydrierung zur freien Carbonsäure umgesetzt. Die entschützten Derivate wurden wiederum mit O-(Benzotriazol-1-yl)-N, N, N', N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) zu den entsprechenden Tetrapeptiden **2** (siehe Gl. 2) und **3** (siehe Gl.3) gekuppelt.

Das Tetrapeptid **2** wurde dann zunächst hydriert und anschließend mit Benzyl-geschütztem Tryptophan und HBPyU zum entsprechenden Heptapeptid **4** gekuppelt. Schließlich wurden das Tetrapeptid **3** und das Heptapeptid **4** hydriert und dann mit 6N Salzsäure in trockenem Dioxan zum vollständig entschützten Tetrapeptid bzw. Heptapeptid umgesetzt.



Reaktionsgleichung 1: Darstellung von Dipeptiden



Reaktionsgleichung 2: Synthese des Tetrapeptides 2

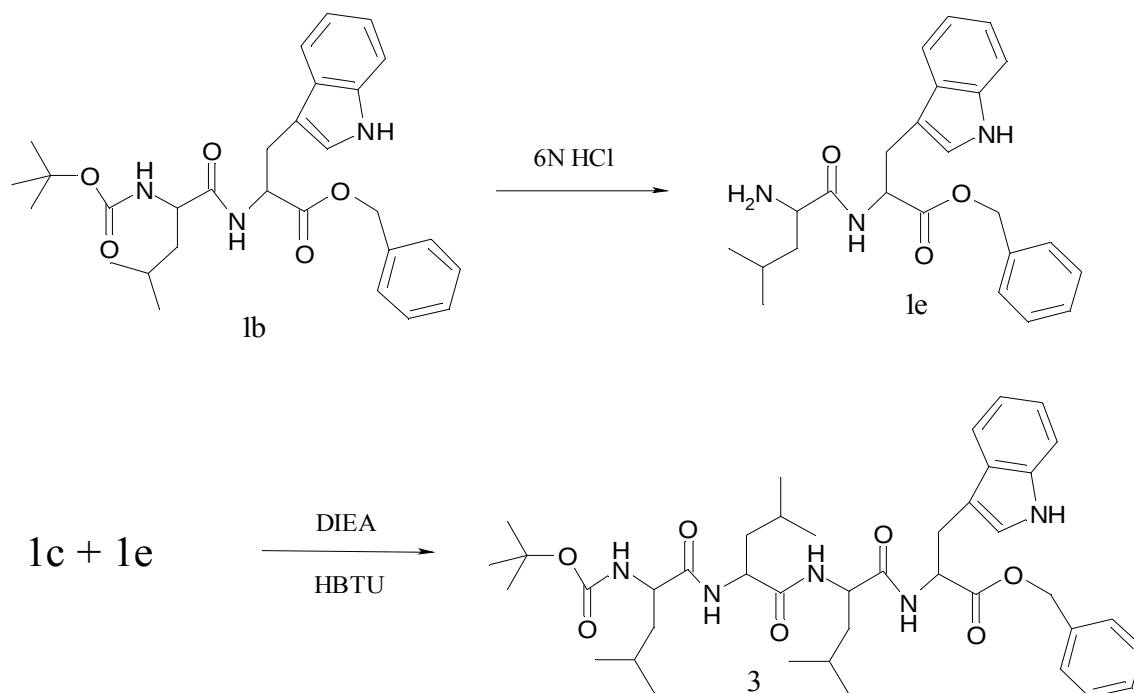
Darstellung von Boc-Leu-Leu-OBzl und Boc-Leu-Trp-OBzl:

1250 mg (5 mmol) Boc-Leu-OH, 1970 mg (5 mmol) H-Leu-OBzl, 2530 mg PyCloP (6 mmol) und 2,96 ml (17 mmol) Diisopropylethylamin (DIEA) wurden in 85 ml getrocknetem Dichlormethan zusammengegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Durch Dünnschichtchromatographie konnte kontrolliert werden, ob die Reaktion vollständig ablief. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in getrocknetem Dichlormethan aufgenommen und anschließend durch Säulenchromatographie (Laufmittel: Hexan/Ethylester 3/1) gereinigt.

Ebenfalls wurden 217 mg (0,87 mmol) Boc-Leu-OH, 256 mg (0,87 mmol) H-Trp-OBzl, 450 mg (1,04 mmol) HBPYU und 0,51 ml (2,96 mmol) DIEA in 20 ml getrocknetem Dichlormethan gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach der vollständigen Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum abrotiert und der Rückstand durch Säulenchromatographie (Laufmittel: Hexan/Ethylester 2/1) gereinigt.

Abspaltung der Boc-Schutzgruppe oder Benzyl-Schutzgruppe von Dipeptiden:

1a bzw. 1b wurde in 13 ml trockenem 1,4-Dioxan (20 ml/mmol) gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad abgekühlt und tropfenweise mit 26 ml einer 6N Lösung von HCl in trockenem 1,4-Dioxan (40 ml/mmol) versetzt. Nach 2 Stunden Rühren in der Kälte wurden das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Diethylether gerührt. Das Produkt (**1d** oder **1e**) wurde abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

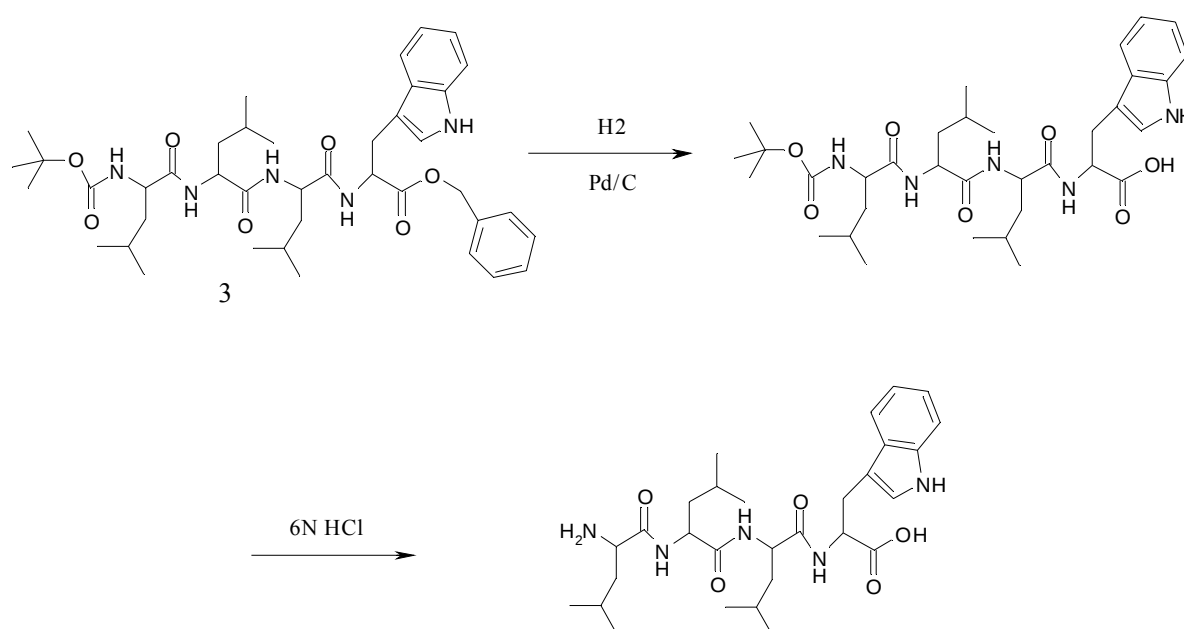


Reaktionsgleichung 3: Synthese des Tetrapeptides 3

1a wurde in 110 ml Dioxan:Wasser (9:1) gelöst und nach Zugabe von 200 mg Pd/C (10%) unter Normaldruck für 18 Stunden in einer Wasserstoffatmosphäre zum vollständigen Umsatz nach der Dünnschichtchromatographie-Kontrolle gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat zur Trockene eingengt. Der Rückstand (**1c**) wurde anschließend im Ölpumpenvakuum eingetrocknet.

Darstellung von Boc-Leu-Leu-Leu-Trp-OBzl:

696,7 mg (3 mmol) **1c**, 1054,2 mg (3 mmol) **1e** und 1365,3 mg (3,6 mmol) HBTU wurden in 100 ml trockenem Dichlormethan gelöst und dazu 1,74 ml (10,2 mmol) DIEA zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz nach DC-Kontrolle gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde im trockenen Dichlormethan aufgenommen und durch Säulenchromatographie gereinigt. Auf diese Weise wurden **3** erhalten.



Reaktionsgleichung 4: Synthese von H-Leu-Leu-Leu-Trp-OH

Synthese des vollständig entschützten Tetrapeptids (siehe Gl. 4):

Substanz **3** wurde in 40ml Dioxan:Wasser (9:1) gelöst und nach Zugabe von 100mg Pd/C (10%) unter Normaldruck für 24 Stunden in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat zum Trocknen eingengt. Den Rückstand trocknete man anschließend im Ölpumpenvakuum.

Der Rückstand wurde in 10 ml trockenem 1,4-Dioxan gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad abgekühlt und tropfenweise mit einer 20 ml 6N HCl-Lösung in trockenem 1,4-Dioxan

versetzt. Nach 4 Stunden Rühren in der Kälte wurden das Lösungsmittel mit Vakuum entfernt und der Rückstand mit Diethylether gerührt. Das Produkt wurde abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Darstellung von NH₂-Leucin-Leucin-Leucin-Leucin-Tryptophan-OH

Synthese von Boc-Leu-Leu-Leu-Leu-OBzl:

780 mg (2,26 mmol) 12c, 840 mg (2,26 mmol) 12d und 1030 mg (2,71 mmol) HBTU wurden in 55 ml trockenem Dichlormethan gelöst und dazu 1,34 ml (7,68 mmol) DIEA zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz nach DC-Kontrolle gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit trockenem Dichlormethan aufgenommen und durch Säulenchromatographie (Laufmittel: Hexan/Ethylester 1/1) gereinigt. Das Produkt (**2**) wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

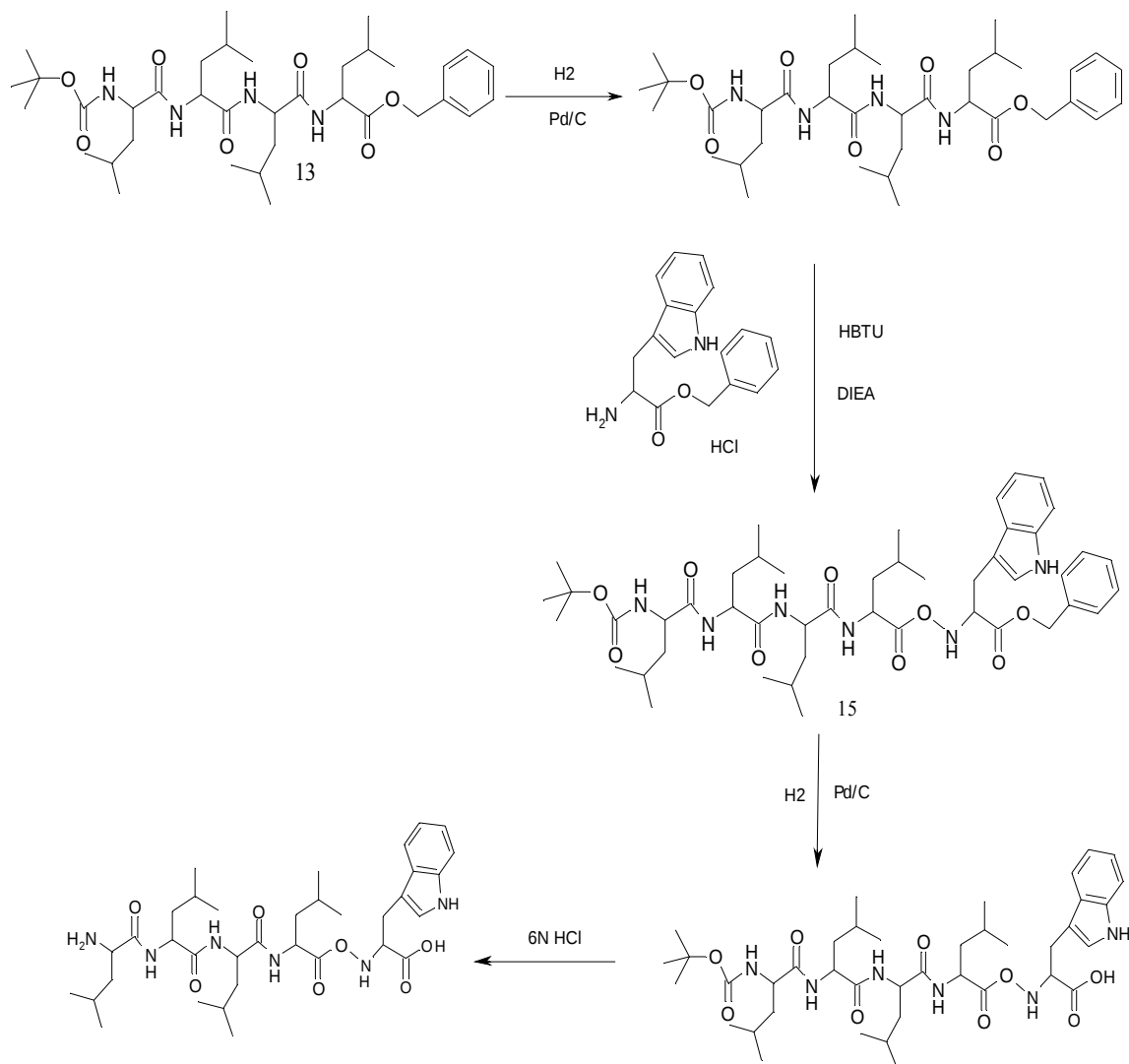
Synthese von Boc-Leu-Leu-Leu-Leu-Trp-OBzl:

Substanz **2** wurde in 180 ml Dioxan:Wasser (9:1) gelöst und nach Zugabe von 600mg Pd/C (10%) unter Normaldruck 72 Stunden in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat zur Trockenen eingengt. Der Rückstand wurde anschließend im Ölpumpenvakuum eingetrocknet.

Der Rückstand 0,46 mmol wurde zusammen mit 0,46 mmol H-Trp-OBzl in 15 ml trockenem Dichlormethan suspendiert und direkt danach 0,55 mmol HBTU und 1,56 mmol DIEA zugegeben. Die Mischung wurde so lange bei Raumtemperatur gerührt, bis die DC-Kontrolle vollständigen Umsatz zeigte. Das Gemisch wurde im Vakuum eingengt und durch Säulenchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Ethylester 3/1) gereinigt. Das Produkt (**4**) wurde einrotiert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Darstellung von NH₂-Leu-Leu-Leu-Leu-Trp-OH:

Produkt **4** wurde in 40ml Dioxan:Wasser (9:1) gelöst und nach Zugabe von 100mg Pd/C (10%) unter Normaldruck in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt, bis die DC-Kontrolle vollständigen Umsatz zeigte. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet.



Gleichung 5: Synthese von NH₂-Leu-Leu-Leu-Leu-Trp-OH

Der Rückstand wurde in 10 ml trockenem 1,4-Dioxan gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad abgekühlt und tropfenweise mit einer 20 ml 6N HCl-Lösung in trockenem 1,4-Dioxan versetzt. Nach 4 Stunden Rühren in der Kälte wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der

Rückstand mit Diethylether gerührt. Das Produkt wurde abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

3.3. Chemikalien und Lösungsmittel

Fluka:

Celite® FilterCel

Palladium auf Aktivkohle (10%)

Chlorotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
(PyCloP), 98%

(Benzotriazol-1-yloxy)-dipyrrolidinocarbenium-
hexafluorophosphat (HBPYU), 98%

O-(Benzotriazol-1-yl)-N, N, N', N'-tetramethyluronium-
hexafluorophosphat (HBTU), 97%

Boc-Gly-OH, 99%

Boc-Leu-OH, 99%

Diisopropylethylamin (DIEA), 98%

Dichlormethan, p.a.

Ethylester, p.a.

Hexan, p.a.

Ether, p.a.

Methanol, p.a.

Aceton, p.a.

Fluka:	Celite® FilterCel
BACHEM:	H-Gly-OBzl.p-tosylate, 99%
	H-Trp-OBzl.HCl, 99%
	H-Leu-OBzl.p-tosylate, 99%
ACROS ORGANICS:	1,4-Dioxan, p.a.
	Acetonitril, Spectrophotometric grade
Messer-Griesheim:	Wasserstoff, 5.0
	Helium, 5.0
	Stickstoff, 5.0

Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destillativ gereinigt, bei Bedarf nach den literaturbekannten Standardmethoden [85] getrocknet und durch zweistündiges Einleiten von Stickstoff 5.0 entgast.

3.4. Experimenteller Aufbau

In Abb. 3.1 ist der experimentelle Aufbau gezeigt. Es ist eine Kombination aus einem Elektrospray-Massenspektrometer und dem Nanosekunden- bzw. dem Femtosekunden-Lasersystem. Das ESI-Massenspektrometer ist ein kommerzielles aber auf unsere Bedürfnisse umgebautes Gerät der Firma Bruker Daltonik (Model Esquire 3000). Das Gerät besteht aus einer Elektrospray-Quelle, einer Paul-Falle zur Akkumulation, Isolierung und Massentrennung der Ionen und einem Ionendetektor aus Konversionsdynode und Channeltron kombiniert. Eine schematische Darstellung dieses Gerätes ist in Abb. 3.2 gezeigt.

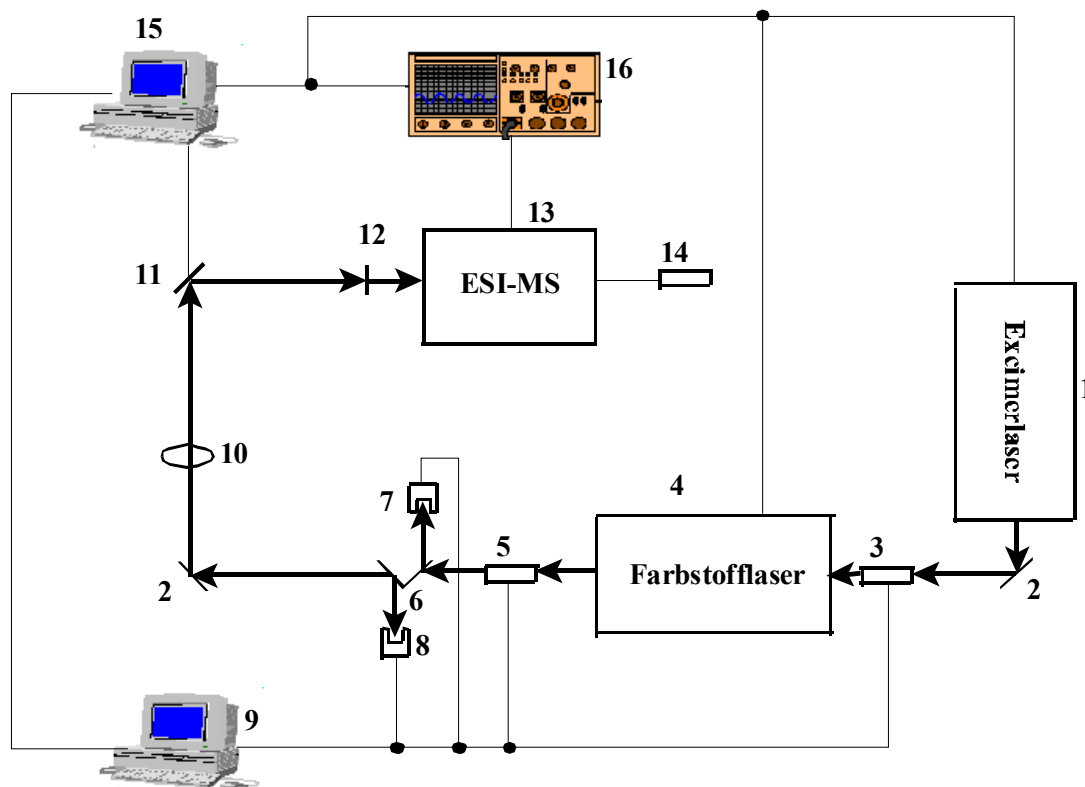


Abb. 3.1: Schematischer Aufbau des Experiments: 1. XeCl-Excimerlaser, 2. Umlenkspiegel, 3. Pumpstrahlabschwächer, 4. Farbstofflaser, 5. Verdoppler, 6. Kristall, 7. Photo-diode, 8. Quadrantendiode, 9 Computer 1, 10. Linse, 11. Umlenkprisma mit Piezoversteller, 12. ansteuerbarer Unterbrecher, 13. ESI-MS, 14. Spritze, 15. Computer 2, 16. Messelektronik.

Da es bislang sehr wenige Arbeiten gibt, die über die Absorptionen von protonierten Substanzen in der Gasphase untersucht worden ist, sind ihre Absorptionen im Allgemeinen

unbekannt. Lösungsmitteluntersuchungen helfen zwar den Frequenzbereich einzuschränken, jedoch kommt es durch das Lösungsmittel möglicherweise zu starken Verschiebungen, da die Ladung stark abgeschirmt wird. Es ist also wichtig, dass über einen großen Bereich die Wellenlänge verändert werden kann. Deshalb werden als Lasersysteme je nach Anwendung entweder ein Nd:YAG gepumpter Farbstofflaser oder harmonische des Nd:YAG (532 nm, 355 nm, 266 nm, 213,5 nm) oder intensive fs-IR-Laserpulsen eingesetzt. Mit Farbstofflasern ist theoretisch der gesamte Wellenlängenbereich vom nahen Infrarot bis zum nahen Ultraviolett zugänglich. Durch Frequenzverdopplung ist zusätzlich der gesamte Bereich bis zum Vakuum-UV erreichbar. Zum Pumpen von Farbstofflasern werden häufig Nd:YAG-Laser oder Excimer-Laser eingesetzt. Der Vorteil des Pumpens mit einem Excimer-Laser (308 nm) gegenüber dem Pumpen mit der dritten Harmonischen eines Nd:YAG-Lasers (355 nm) ist der größere Abstimmbereich der Farbstoffe im verwendeten Farbstofflaser.

Ein wichtiger weiterer Vorteil des Excimer-Lasers ist die Tatsache, dass er mit beliebigen Wiederholraten bis 100 Hz ansteuerbar ist. Dies erlaubt es den Excimer-Laser mit dem ESI-Massenspektrometer exakt zu synchronisieren. Der Nd:YAG-Laser dagegen muss immer mit 20 Hz laufen. Da die Messzyklen im ESI unterschiedlich lange dauern, ist eine direkte Synchronisation prinzipiell unmöglich. Man muss deshalb in den Zyklus des ESI eine Wartezeit einbauen, die lange genug ist, so dass ein Schuss in diese Wartezeit fällt und die Ionen trifft.

Deshalb wurde in dieser Arbeit mehrheitlich ein XeCl-Excimerlaser (LPX10, Lambda Physics) (1) als Pumplaser eingesetzt, der einen Farbstofflaser (4) (FL 3001, Lambda Physics) pumpt. Der Farbstofflaser liefert zunächst Wellenlängen im sichtbaren Bereich. Da die untersuchten Moleküle aber im UV-Bereich absorbieren, wird die Frequenz des Farbstofflasers verdoppelt. Das Verdopplerkristall wird durch einen Computer (9) gesteuert, um die Phasenanpassung zu gewährleisten. Dieser Computer übernimmt ebenfalls die Kontrolle über die Quadrantendiode und die Photodiode.

Die Elektrospray-Quelle besteht aus einer Elektrospraykapillare, dem *Sprayshield*, der Transferkapillare, mehreren Skimmern und differenziellen Pumpstufen, zwei Oktupolen und zwei Ionenlinsen, der Paul-Falle und einem *Channeltron*-Detektor mit Konversionsdynode (siehe Abb. 3.2).

Die Probenlösungen werden mittels einer motorgetriebenen Spritze (14) der Fa. Hamilton Bonaduz AG (Modell MicroliterTM Syringes) durch eine Elektrospraykapillare in die Spraykammer eingespritzt. Die Elektrospraykapillare wird mit Stickstoff (bei ca. 300 °C) umspült, um effizient Tröpfchen zu erzeugen. Im elektrischen Feld zwischen Elektrospray-

kapillare und „Sprayshield“ werden Ionen aus den Tröpfchen gebildet (siehe Kap. 2.2.). Die entstandenen Ionen werden durch das elektrische Feld in die Transferkapillare (Innendurchmesser 0,5 mm, Länge 20 cm) ins Vakuum überführt, während ungeladene Teilchen insbesondere Lösungsmittel abgesaugt werden. Durch zwei Skimmer, die zwischen differenziellen Pumpstufen sitzen wird der Druck weiter reduziert. Die Skimmer wirken als Ionenoptik obgleich die Molekülionen noch nicht in einem stoßfreien Bereich sind. Mit zwei Oktopolen und weiteren Linsen werden die Ionen in die Paul-Falle fokussiert, dort akkumuliert und die gewünschte Masse selektiert. Dann werden die Ionen in der Paul-Falle mit dem Laser beschossen, wobei Fragmente in Abhängigkeit der Wellenlänge entstehen. Diese bleiben zunächst bis zur Massenselektion in der Paul-Falle. Aus der Paul-Falle werden die Ionen durch Schütteln nach und nach ausgekoppelt und im Detektor nachgewiesen. Dabei erzeugen die Ionen auf der Konversionsdynode Elektronen, die dann im *Channeltron* verstärkt werden.

3.4.1. Elektrospraykammer

In der Spraykammer wird die Probenlösung mit einer Fließgeschwindigkeit von ca. 120 $\mu\text{l/h}$ durch die Elektrospraykapillare gepumpt, deren Ende durch eine Metallkapillarspitze geführt ist (siehe Abb.3.2). Ein elektrisches Feld mit einer Potentialdifferenz von ca. 2-4 kV wird zwischen dem Ende der Elektrospraykapillare und dem *Sprayshield* angelegt. Dabei wird ein Aerosol aus geladenen Tröpfchen bei Atmosphärendruck erzeugt.

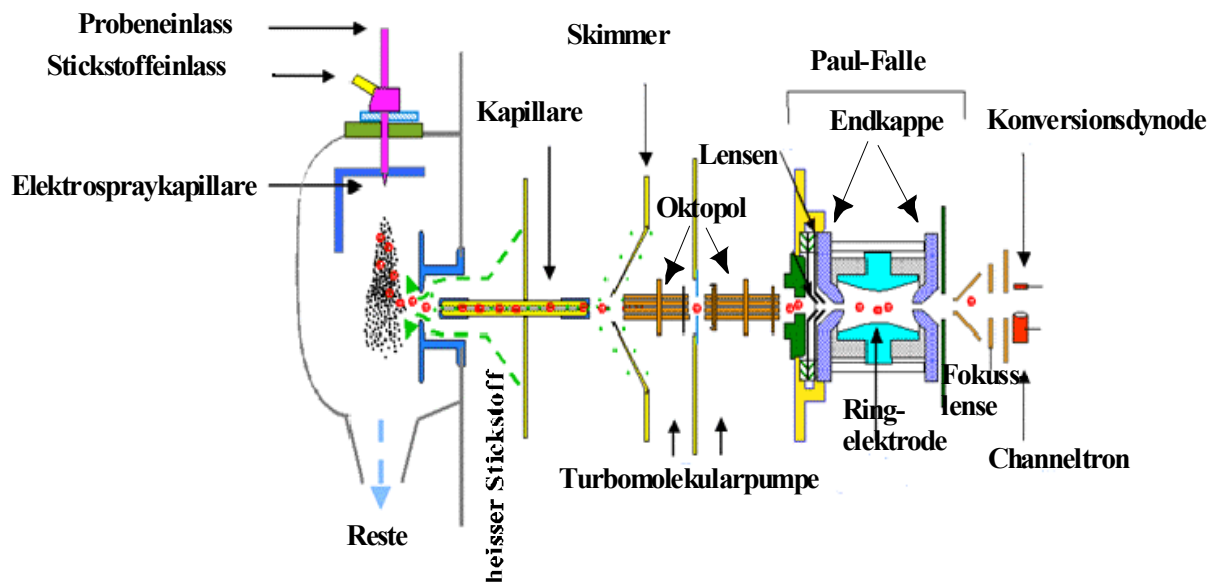


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Elektrospray Massenspektrometers (Bruker Daltonics, Model Esquire 3 000)

3.4.2. Ionentransport und Fokussierungsregion

In der Ionentransport- und Fokussierungsregion des Esquire 3000 gibt es vier unterschiedliche Druckbereiche. In diesen Bereichen werden die Analytione vom Atmosphärendruck in den Hochvakuum-Bereich des Massenspektrometers transportiert und fokussiert. Die Transferkapillare, deren Ende durch eine Metallkappe geführt ist, dient als Überführung der Ionen in den ersten Vakuumbereichen. Am Ausgang der Transferkapillare herrscht dann ein Druck von ca. 1 mbar, der mit einer Vorpumpe erzeugt wird. Über einen anschließenden Skimmer werden die Ionen in die nächste Kammer eingelassen in welcher der Druck mit Hilfe des Seiteneingangs einer *Splitflow*-Turbomolekularpumpe auf 0,15 mbar erniedrigt wird. Ein weiterer Skimmer transferiert die Ionen in die Oktopol-Kammer, die mit einer Turbomolekularpumpe auf einen Druck von $1 \cdot 10^{-3}$ mbar gebracht wird. Die letzte Kammer wird mit Hilfe einer weiteren Turbomolekularpumpe auf einen Druck von $1 \cdot 10^{-5}$ mbar gebracht. In dieser Kammer befinden sich die Paul-Falle und der Detektor. Alle wesentlichen Modifikationen wurden an dieser letzten Kammer durchgeführt.

Das Führen und Fokussieren der Ionen ist komplex.

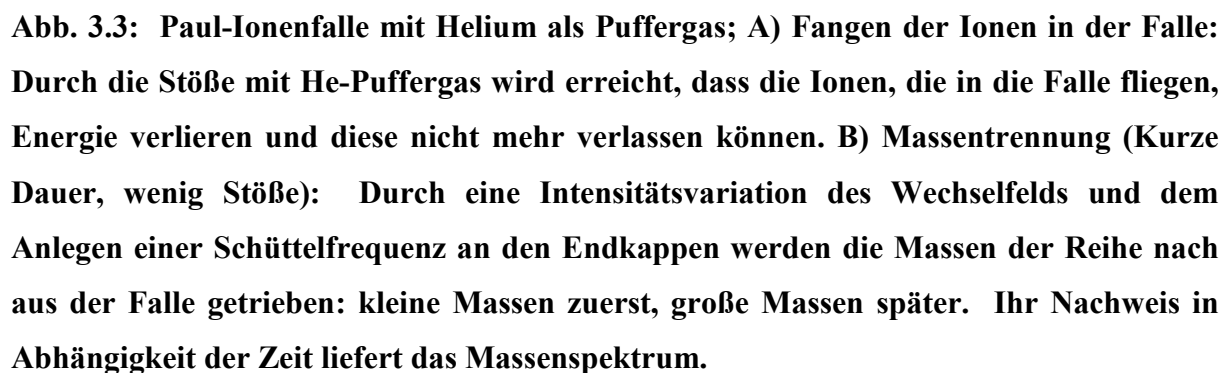
Aus Gründen der Handhabbarkeit liegt die Sprühnadel auf Erdpotential und das Sprayshield auf für die Ionen attraktiver Spannung. Der Eingang der Kapillare befindet sich auf dem gleichen Potential wie das Sprayshield. Ihr Ausgang wird massenah gehalten, wodurch für die Ionen eine Gegenspannung entsteht, die die Ionen wegen der vielen Stöße mit Neutralteilchen jedoch überwinden können.

Der Skimmer 1 befindet sich ca. 5 mm hinter der Transferkapillare. An dieser Stelle stoßen die Ionen vielfach mit Neutralteilchen zusammen, bevor sie den Skimmer passieren. Durch diese Stöße wird Energie auf die Ionen oder die Komplexe übertragen, so dass sie auch fragmentiert werden können. Auch im Bereich des zweiten Skimmers in der Trennwand zur Oktopolkammer sind die Bedingungen für Ionen noch nicht stoßfrei. Um einen effizienten Transfer der Ionen in die anschließende Oktopolkammer sicherzustellen, wird eine optimale Spannung für die entsprechenden Teilchen an diesen Skimmer angelegt. Eine höhere Spannung verursacht wieder Fragmentation und hat einen negativen Einfluss auf den Totalionenstrom.

Durch die Oktopolkammer werden die Ionen mit Hilfe von elektrischen Wechselfeldern, die an acht rotationssymmetrischen Stäben anliegen, geführt. Zwei Oktopole sind dabei hintereinander geschaltet. Sie dienen also nicht der Massenselektion sondern nur dem

Transfer der Ionen in die nachfolgende Kammer. Oktopole haben gegenüber Quadrupolen den Vorteil, dass sie für einen größeren m/z -Bereich transparent sind. Zwischen den beiden Oktopolen kann eine Gleichspannung eingestellt werden. Diese dient zur Nachbeschleunigung der Ionen, damit sie die Potentialbarriere am Eingang der Falle überwinden können. Direkt hinter den Oktopolen befinden sich zwei Ionenlinsen, mit denen die Ionen nochmals beschleunigt und direkt in der Paul-Falle fokussiert werden.

Durch Veränderung der Wechselfelder können gezielt m/z-Verhältnisse aus der Falle entnommen und detektiert werden.



Die Potentialmulde wird durch eine hochfrequente Wechselspannung von 780 kHz an der Ringelektrode erzeugt. Die Tiefe der Pseudopotentialmulde für ein bestimmtes m/z -Verhältnis hängt von der angelegten HF-Spannung ab. In der Regel wird die Spannung so gewählt, dass das Potential für das m/z -Verhältnis des Mutterions der zu untersuchenden Substanz am tiefsten ist. Die Tiefe des Potentials liegt bei ca. 2 eV. Die RF-Spannungen, die dafür nötig sind, liegen im Bereich von 70 V. Während des Einfangs werden die Endkappen auf Masse gehalten.

Die Bewegung der Ionen lässt sich durch die Mathieugleichung beschreiben, mit deren Hilfe man Stabilitätsdiagramme (siehe Abb. 6) aufstellen kann, die die Bedingungen für stabile Ionenbahnen beschreiben. In der Funktion *Trapping* werden die Endkappen auf Spannung 0 V gehalten und nur am Ring liegt die HF-Spannung an. Für die Massenselektion, für das CID und zur Detektion werden die Ionen entlang der Längsachse in Schwingung versetzt. Je nach Anwendung werden die Ionen andere. Die Anregungsenergie wird langsam erhöht, bis Ionen die Falle durch eine Endkappe verlassen und zum Detektor gelangen.

Die Anzahl der Ionen, die für die Aufnahme eines Massenspektrums benutzt wird, beeinflusst sowohl das Signal/Rausch-Verhältnis als auch die Massenauflösung. Je höher die Anzahl der Ionen in der Falle, desto besser wird das Signal/Rausch-Verhältnis. Da sich aber die Ionen abstoßen, ist die Ionenwolke örtlich verschmiert und es können nicht alle Ionen gleichzeitig die Falle verlassen. Dadurch verbreitern sich die Peaks und sinkt die Auflösung. Die Anzahl der Ionen die typischerweise für die Aufnahme von Massenspektren verwendet wurde, lag bei unseren Messungen zwischen 200 und 500.

Am Anfang eines Messzyklus werden alle noch in der Falle verbliebenen Ionen entfernt. Nach einer definierten Akkumulationszeit der Ionen in der Paul-Falle wird der zweite Skimmer massenah geschaltet und somit der Zustrom von weiteren Ionen unterbunden. Die gefüllte Falle kann dann für verschiedene Anwendungen benutzt werden (siehe Abb. 3.4).

- Einfang und Akkumulation von Ionen
- Isolierung einer einzelnen Masse
- Fragmentierung eines bestimmten m/z -Verhältnisses
- Analyse aller in der Falle befindlichen m/z -Verhältnis

Zur Analyse einer Probe in einem Gemisch kann ein bestimmtes m/z -Verhältnis isoliert werden indem alle anderen Ionen aus der Falle entfernt werden. Dies geschieht durch das Anlegen von Wechselfeldern an die Endkappen der Falle. Zu jedem m/z -Verhältnis existiert

eine Frequenz, mit der eine translatorische Schwingung dieses Ions angeregt werden kann. Das so angeregte Ion führt damit eine Pendelbewegung zwischen den Endkappen aus. Ist die anregende Spannung groß genug, so trifft das Ion auf eine der Endkappen und wird entladen oder fliegt durch die Öffnung aus der Falle heraus. Auf diese Art und Weise können alle Ionen bis auf ein gewünschtes m/z -Verhältnis aus der Falle entfernt werden.

Wird das Ion angeregt, aber nicht so stark angeregt, dass es die Falle verlässt, so kann man die oben beschriebenen Mechanismen zur Stossfragmentierung nutzen. Durch die erhöhte Amplitude des Ions in der Falle steigt die Energie der Stöße mit dem Puffergas Helium. Die innere Energie des Ions wird mit jedem Stoß erhöht, bis es im Ion zu Bindungsbrüchen kommt (*Collision Induced Dissociation*, CID). Die erhaltenen Fragmente können entweder alle detektiert werden oder es können in einem nächsten Schritt Fragmente gezielt isoliert und weiter fragmentiert werden. Dadurch sind MS^n ($n = 1$ bis 11) Messungen möglich. Die schrittweise Fragmentierung durch wiederholte MS/MS-Schritte kann zur Strukturaufklärung der Probenmoleküle genutzt werden. Eine häufige Anwendung ist deshalb auch die Sequenzierung von Polypeptiden und Peptidfragmenten wie sie zum Beispiel bei einem enzymatischen Abbau entstehen..

Bei der Aufnahme von CID-Spektren können jedoch nicht alle m/z -Verhältnisse aufgenommen werden: es gibt eine untere m/z -Schranke für die detektierbaren Fragmente. Das elektrische Wechselfeld in der Paul-Falle bildet eine Pseudopotentialmulde, die für ein eingestelltes m/z -Verhältnis, die größte Tiefe besitzt. Je weiter die Massen von eingestelltem m/z entfernt sind, desto geringer ist die Bindungsenergie durch das Pseudopotential. Je tiefer man die Potentialmulde für die Zielmasse wählt, desto schmaler ist der Massenbereich, der noch eingefangen werden kann [86]. Das kleinste m/z -Verhältnis, das noch in der Falle verbleiben kann, wird als *cutoff* bezeichnet. Für eine reine Massenanalyse kann die Tiefe der Potentialmulde so gering gewählt werden, dass der *cutoff* bei nahezu Null liegt. Für die Fragmentierung muss den Ionen jedoch so viel kinetische Energie und somit über die He-Stöße auch interne Energie zugeführt werden, um eine chemische Bindung zu brechen. Um die Ionen trotz erhöhter kinetischer Energie in der Falle zu halten, muss die tiefe der Potentialmulde erhöht werden. Dadurch wird aber gleichzeitig der *cutoff* erhöht. Bei Normaleinstellungen liegt der *cutoff* bei 27% der Muttermasse.

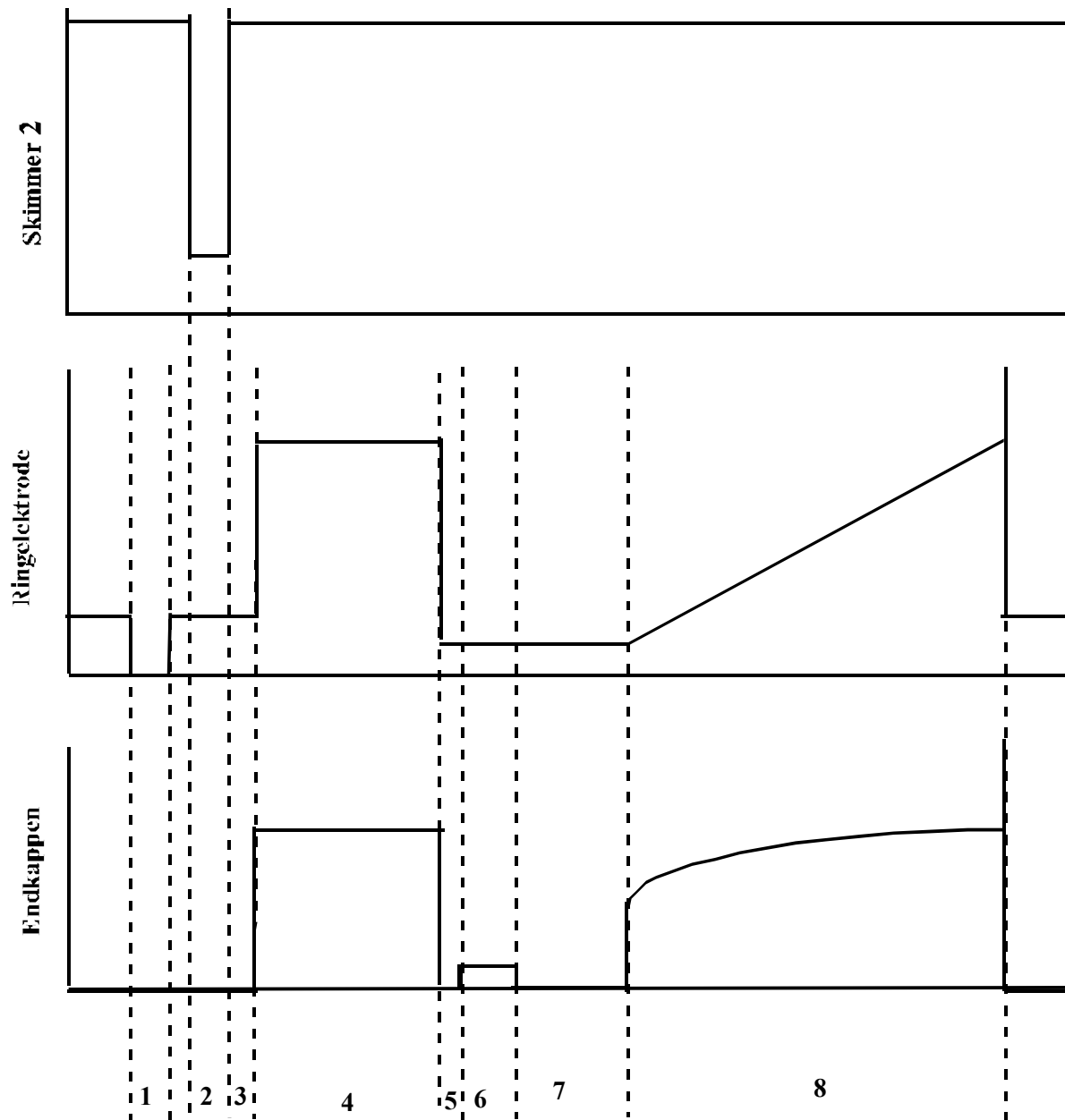


Abb. 3.4: Signalspuren aus dem ESI-MS: erste Zeile: DC-Spannung am Skimmer 2
 mitte: Amplitude der RF-Spannung am Ring, unten: RF-Amplitude der RF-Spannung
 an der Endkappe. Zeitlicher Ablauf für die Aufnahme eines Massenspektrums. 1)
 Entfernen aller Ionen aus der Falle, 2) Akkumulation, 3) Verzögerung für die
 Massenisolation, 4) Massenisolation 5) Fragmentationsdelay, 6) Fragmentation,
 7) Scandelay 8) Massenanalyse

3.4.4. Ionendetektor

Die aus der Paul-Falle austretenden Ionen werden durch zwei Ionenlinsen fokussiert und dann auf den Detektor gelenkt. Der Detektor des Esquire 3 000 ist ein sog. Daley Detektor (siehe Abb. 3.5). Er besteht aus einer Konversionsdynode und einem *Channeltron*. Die Konversionsdynode steht senkrecht auf der Flugbahn der Ionen und der Channeltron-Detektor liegt gegenüber der Konversionsdynode.

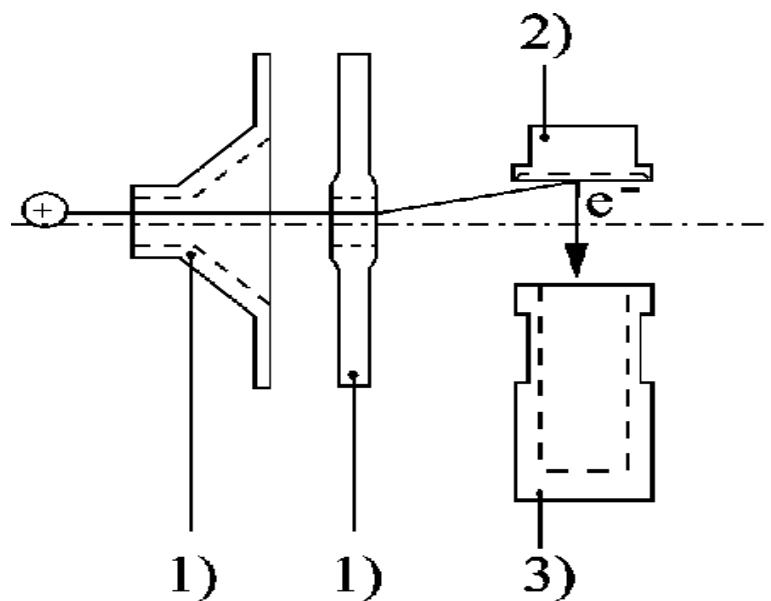


Abb. 3.5: Schematische Darstellung der Detektion; Ionen werden dabei auf der Konversionsdynode in Elektronen konvertiert und im *Channeltron* verstärkt. 1) Fokuslinsen 2) Konversionsdynode 3) *Channeltron*.

Die Ionen werden mit 7 kV auf die Konversionsdynode beschleunigt, wo sie beim Auftreffen Elektronen herauslösen. Durch eine auf Masse liegende Ionenlinse werden die entstandenen Elektronen in den Eingang des Channeltrons fokussiert. An der Innenwand des Channeltrons werden kaskadenartig weitere Elektronen herausgeschlagen. Das so vorverstärkte Signal wird dann von der Messelektronik des Massenspektrometers aufgezeichnet. Der Ionendetektor kann sehr empfindlich einzelne positive und negative Ionen nachweisen. Dies ist z.B. beim ICR nicht der Fall wo mehrere Ionen für eine Masse gebraucht werden, damit die emittierte HF-Energie ausreicht um ein für die Detektion ausreichendes Signal zu erzeugen.

3.5. Modifikationen an der Hochvakuumkammer

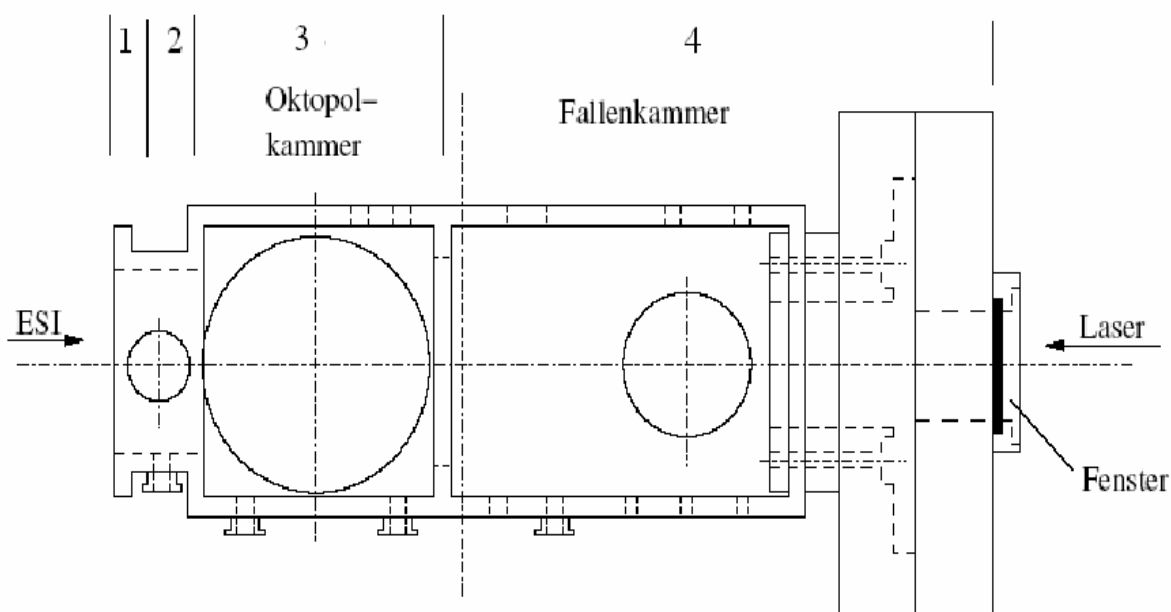


Abb. 3.6: Aufsicht auf die modifizierte Vakuummekammer. Die Vakuummekammer besteht aus vier durch Trennwände und Skimmer getrennte Kammern. 1) Kammer mit Kapillarenausgang 2) Reduzierstufe mit zweitem Skimmer, 3) Oktopol-Kammer 4) Fallenkammer. An der vierten Kammer wurde ein Flansch mit einem Fenster (Laser parallel zur Achse der Ionenflugrichtung), bzw. durch eine Bohrung zwei Fenster (senkrechter Laserzugriff) angebracht.

Die Vakuummekammer des Massenspektrometers besteht aus vier Kammern (siehe Abb. 3.6). In den Trennwänden zwischen der ersten und der zweiten und der Oktopol-Kammer sind die beiden Skimmer eingebaut. Die Skimmer sind zusammen mit den beiden Oktopolen auf einem Einschub montiert, so dass sich alle Einheiten relativ einfach zentrieren lassen. Die erste Kammer dient der Druckreduzierung von Atmosphärendruck auf 1 mbar (unsere Pumpe besser als die von Bruker). Die zweite Kammer wird mit dem Seiteneingang einer Splittflow-Turbopumpe auf einen Druck von $1 \cdot 10^{-1}$ mbar evakuiert. Die dritte Kammer enthält die beiden Oktopolen und wird mit Hilfe des Haupteinganges der Splittflow-Turbopumpe auf einen Druck von Druck von $1 \cdot 10^{-3}$ mbar evakuiert. Die vierte Kammer, in der sich Paul-Falle und der Detektor befinden, wird auf $2 \cdot 10^{-5}$ mbar gebracht. Durch das weitere

Anbringen einer Turbopumpe mit Vorpumpe verbessert sich der Druck auf $8 \cdot 10^{-6}$ mit He-Einlass und $5 \cdot 10^{-6}$ ohne He-Einlass.

Um die Photofragmentierung in der Paul-Falle ausführen zu können, mussten einige Modifikationen am Elektrospray-Massenspektrometer durchgeführt werden. Die meisten Modifikationen wurden in der Hochvakuumkammer, wo sich die Paul-Falle und der Ionendetektor befinden, vorgenommen. Das kommerzielle Massenspektrometer ist ein vollkommen abgeschlossenes Gerät. Um auf die Ionen innerhalb der Falle mit dem Laser zugreifen zu können, wurden zwei Versuchsaufbauten realisiert:

- i) ein Laserzugriff parallel zur Ionenflugrichtung durch eine Öffnung im Gehäuse und den vorhandenen oder modifizierten Öffnungen in den Endkappen.
- ii) ein Laserzugriff senkrecht zur Ionenflugrichtung durch zwei gebohrte Öffnungen im Gehäuse und zwei gebohrte Öffnungen im Ring der Paul-Falle.

zu (i): Zur Realisierung eines Laserzugriffs parallel zur Ionenflugrichtung wurde ein Loch in die Rückwand der Hochvakuumkammer gebohrt und mit Gummi-O-Ringen gedichtet ein Aluminiumblock an die Wand geschraubt. An diesen Aluminiumblock wurde ein CF 200 Flansch angebaut, auf dem ein CF 35 Flansch mit einem Quarz-Fenster montiert wurde (siehe Abb.3.6). Außerdem wurden einige elektronische Durchführungen an der Gehäusewand des ESI eingebaut, um interne Steuersignale nach außen zu führen. In diesem Aufbau wird der Laser durch das Fenster entlang der optischen Achse durch das Gerät geführt und durch die Austrittsendkappe in die Paul-Falle fokussiert. Die Austrittsendkappe (siehe Abb. 3.7a) besitzt sieben Löcher mit einem Durchmesser von je 1 mm. Da die Löcher kleiner als der Strahldurchmesser des Lasers sind, wurde die Endkappe modifiziert. Statt der Endkappe mit sieben Löchern wurde eine neue Endkappe mit einer größeren Öffnung, die einen Durchmesser von 1,5 mm (siehe Abb. 3.7b) beträgt, als Austrittsendkappe eingesetzt.

Durch ein an der Ringelektrode angelegtes Hochfrequenzfeld werden die Ionen zunächst in der Paul-Falle auf Lissajous-förmigen Kreisbahnen stabilisiert (siehe Abb. 3.8). Die Ionen werden durch Stöße mit dem Heliumgas, welches in die im Hochvakuum liegende Paul-Falle strömt, auf einen kleinen Bereich in der Fallenmitte konzentriert. Der Radius, der Kreisbahnen der Ionen sowie die Größe der Ionenwolke sind jedoch nicht bekannt.

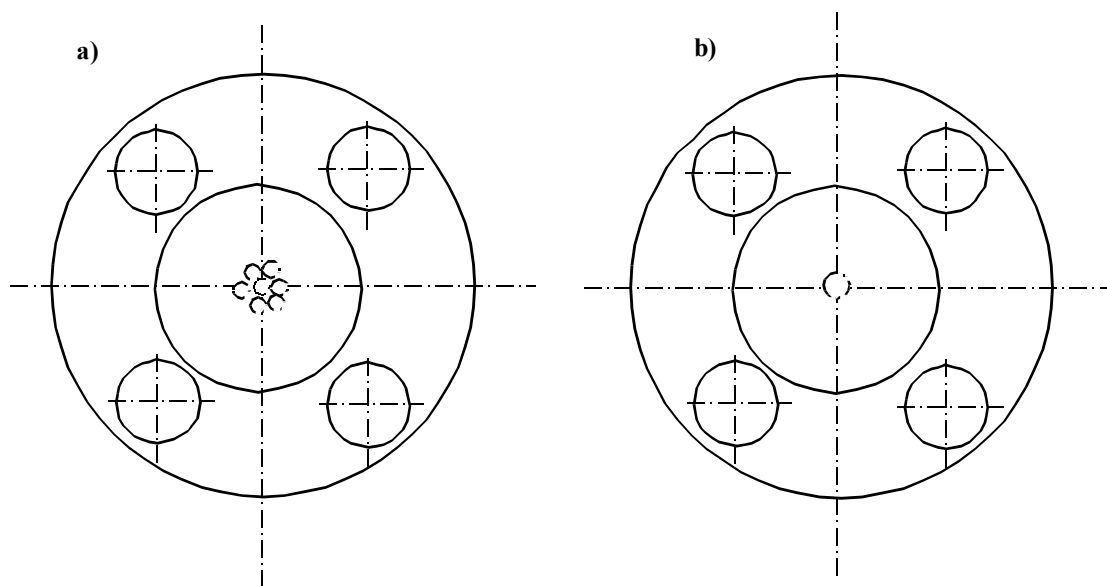


Abb. 3.7: Draufsicht auf die Austrittsendkappe. a) Originale Endkappe mit sieben Löcher ($\varnothing$ 1 mm) b) Modifizierte Endkappe mit einem $\varnothing$ 1,5 mm Loch.

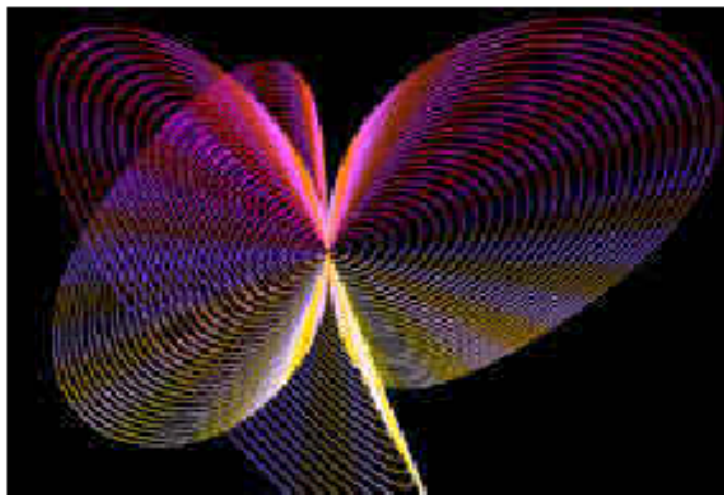


Abb. 3.8: Zweidimensionale Bahnen nach Lissajous, mit deren Hilfe man sich die Bahnen von Ionen in einer elektrischen Paul-Falle vorstellen kann.

Es kann passieren, dass der entlang der optischen Achse durch das Fenster in die Paul-Falle einfallender Laserstrahl, der ca. 100 μm Fokusdurchmesser besitzt, die Ionenwolke nicht trifft. Um sicher zu stellen, dass der Laser direkt die Ionenwolke bestrahlt, soll der Zeitpunkt des

Laserbeschusses kontrolliert werden. Der Zeitpunkt des Laserzugriffs wurde dazu mit dem Phasenwinkel der HF-Ringspannung synchronisiert, um zu überprüfen, ob die Bewegung der Ionen in der Paul-Falle auf die Fragmentierung Einfluss hat. Die Intensität des Signals der Fragmentierung in Abhängigkeit vom Phasenwinkel ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Aus dem sinusförmigen Verlauf kann man schließen, dass die Ionen eine angeregte harmonische Schwingung in der Falle ausführen.

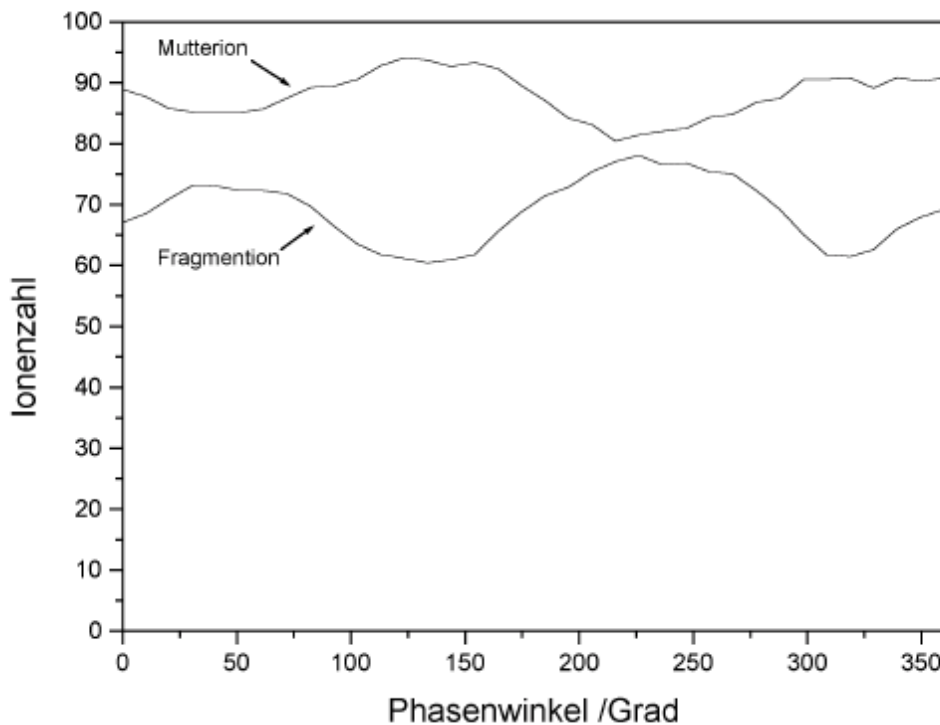


Abb. 3.9: Abhängigkeit der Fragmentierung vom Phasenwinkel der Ringspannung in der Paul-Falle. Es zeigt sich eine sinusförmige Funktion, die vermutlich auf eine Fragmentierung zurückgeht, die durch Photoelektronen verursacht wird.

Der Einfluss auf die Fragmentierung liegt im Bereich von ca. 5%. Die Ionenwolke verlässt also nie komplett den Laserfokus.

Zu ii): Um Laserzugriff senkrecht zur Ionenflugrichtung zu realisieren, wurden zwei Öffnungen in die Hochvakuumkammer gebohrt und darauf zwei im UV-Bereich nicht absorbierbare Fenster geklebt. Außerdem wurden zwei Löcher mit den Durchmessern von 3 mm in der Ringelektrode der Paul-Falle gebohrt.

3.6. Lasersysteme

Die elektronischen Übergänge der neutralen Aminosäuren liegen unterhalb von 285 nm. Für die protonierten Spezies werden Übergänge in der gleichen Region erwartet. Wichtig für die Wahl des Lasersystems ist folglich die Intensität, die im Ultravioletten-Bereich (UV-Bereich) zur Verfügung steht und die benötigten Wellenlängen. So kann Trp bei 285 nm nahezu in den schwingungslosen S_1 angeregt werden. Bei 266 nm wird der S_1 mit interner Schwingungstemperatur erzeugt. Die Wellenlänge von 213,5 nm wird von allen Aminosäuren absorbiert. Intensive fs-Laserpulse können durch eine Multiphoton-Anregung mehr Energie ins Molekül einbringen als ein einziges UV-Photon. Es wurden nun drei Arten von Experimenten durchgeführt:

- (i) Spektroskopische Experimente mit abstimmbaren ns-Lasern, bei welchen die Absorption bei verschiedenen Wellenlängen untersucht wird und die Fragmente nur als Nachweis der Photo-Anregung dienen, und
- (ii) Experimente zur Photodissoziation mit fest-frequenten ns-Lasern, bei welchen zwar die Absorption der verwendeten Wellenlänge wichtig ist, jedoch die chemische Identität der Fragmente die Hauptinformation darstellt.
- (iii) Experimente mit intensiven fs-IR-Laserpulsen, bei welchen untersucht werden soll, ob durch eine schnelle Mehrphotonenanregung andere Fragmente liefert als die ns-Laser-Anregung

Zu i) Um die Wellenlängen eines ns-Lasers in einem großen Bereich durchstimmen zu können, sind Farbstofflaser die beste Wahl. Hohe Intensitäten lassen sich am einfachsten mit gepulsten Lasersystemen erreichen. Zum Pumpen des gepulsten Farbstofflasers (FL 3001, Lambda Physik) wird in dieser Arbeit einem XeCl-Excimerlaser mit 308 nm (LPX 110 Lambda Physik) benutzt. Die durchschnittliche Leistung des XeCl-Lasers betrug 100 mJ. Der Farbstofflaser besitzt im Resonator ein Gitter zur Wellenlängenselektion (Littrov-Anordnung). Er ist mit zwei Farbstoffküvetten ausgestattet. Die erste Küvette dient als Verstärkermedium im Laserresonator und wird zudem als Vorverstärker genutzt. Die zweite Küvette wird als Hauptverstärker verwendet. Für die Wellenlängen von 569 - 608 nm wurde der Farbstoff Rhodamin 6G ($M_r = 479$ g/mol) benutzt, mit einer Konzentration von 1,2 g/l in Methanol (p.a., Merck) für den Resonator [57]. Für die Wellenlängen von 595 - 535 nm

wurde der Farbstoff Coumarin 153 ($M_r=309$ g/mol) eingesetzt, mit einer Konzentration von 4,2 g/l in Methanol für den Resonator [57]. Für die Wellenlängen von 540 - 500 nm wurde Coumarin 307 ($M_r=271$ g/mol) verwendet, mit einer Konzentration von 3,4 g/l in Methanol für den Resonator [86]. Die Konzentration des jeweiligen Farbstoffes im Hauptstärker wurde auf ein Drittel des entsprechenden Resonators verdünnt.

Die Ausgangsfrequenz des Farbstofflasers wurde mittels eines nichtlinearen Kristalls (BBO-Kristall) verdoppelt und der Strahlversatz durch einen entsprechenden Kompensator ausgeglichen. Die Isolation der UV-Wellenlänge wurde mit einem Pellin-Broka Wellenlängenseparator realisiert. Der Strahl wurde mit dielektrischen Spiegeln in die Apparatur gelenkt. Mit Hilfe einer Linse mit der Brennweite von 2000 mm wurde der Laserstrahl in die Falle fokussiert.

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

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

Ein gängiges Verfahren zur Ansteuerung des Schrittmotors besteht in der Verwendung von Kalibrierkurven. Dazu werden einzelnen Wellenlängen Schrittmotorpositionen zugewiesen und die Zwischenwerte interpoliert. Diese Methode ist experimentell leicht umzusetzen und funktioniert für kleine Abstimmungsbereiche auch sehr gut. Je größer der Bereich ist, der durchgestimmt werden soll, desto aufwändiger wird die Verwendung von Kalibrierkurven.

Das Hauptproblem scheint die Temperatur des Verdopplerkristalles zu sein. Sie wird zwar aktiv geregelt, ist aber offensichtlich nicht völlig von der Labortemperatur abgekoppelt. Als Folge kommt es je nach Labortemperatur zu systematischen Abweichungen von der Kalibrierkurve, die unakzeptabel sind.

Aus diesem Grund wurde hier eine andere Art der Nachführung gewählt, die in Abb. 3.10 dargestellt ist.

Der Verdopplerkristall wird durch einen aktiven Regelkreis variiert. Dabei wird ausgenutzt, dass das Strahlprofil des UV-Lichtes nur dann symmetrisch ist, wenn der Kristall optimal

gekippt ist. Ist der Winkel zwischen Laser und Kristall nicht optimal, so ist das Strahlprofil des UV-Lichts elliptisch und einseitig. Die Hauptachse der Ellipse liegt horizontal.

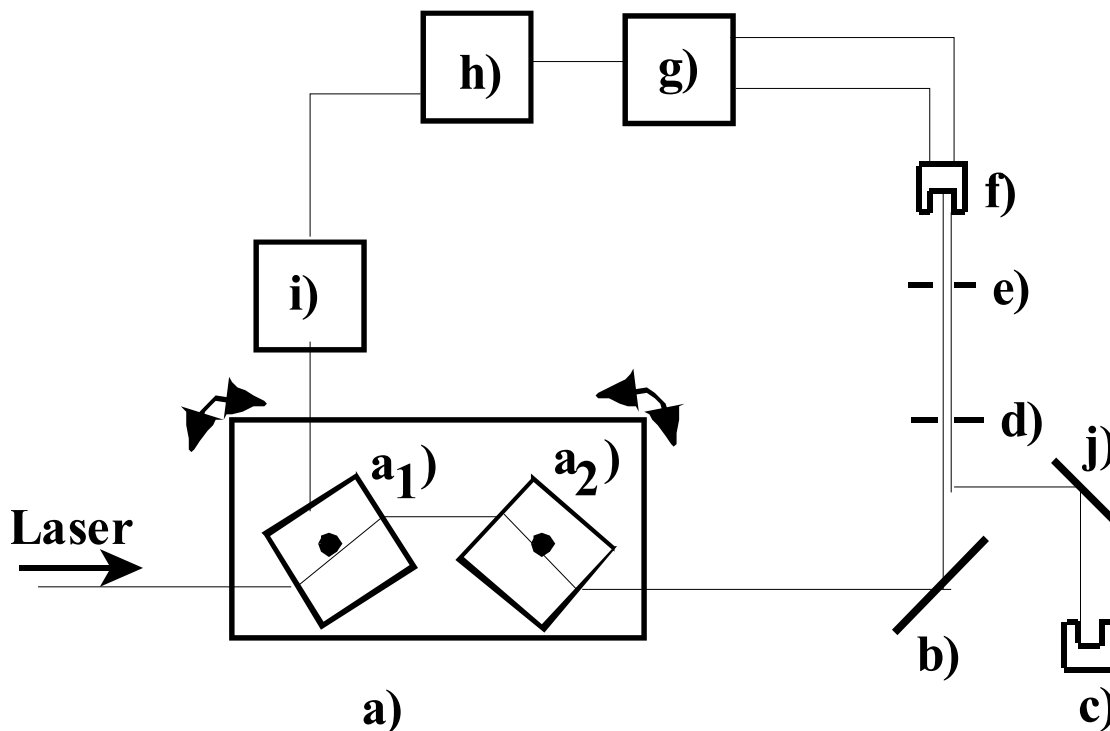


Abb. 3.10: Aufbau der aktiven Verdopplersteuerung. a) Schrittmotor mit montiertem nichtlinearen BBO-Kristall (a₁) und Kompensator (a₂), b), j) Quarzplatte, c) Photodiode, d) Blende, e) horizontale Schlitzblende, f) Quandrantendiode, g) Integrator, h) Computer, i) Schrittmotorsteuerung.

Die Links-Rechts-Assymmetrie beinhaltet die Information zur Fehlstellung des Kristalls. Ein kleiner Teil des UV-Lichts wird durch eine planparallele Quarzplatte, die fast im Brewsterwinkel steht b) ausgekoppelt. Die Blende d) dient zum Abtrennen des Rückreflexes, so dass nur ein Reflex auf die Photodiode c) trifft. Die Laserintensität wird mit Abschwächern (Schlitzblende e), die in den Strahlengang gebracht werden kann, variiert. Es wird nur der obere Teil des Strahls abgeschnitten. Dadurch bleibt die Rechts/Links-Information erhalten. Zur Intensitätsbestimmung wird auch die Photodiode c) mit Streulicht des abgeschwächten Laserlichts beleuchtet und das Signal über eine AD-Wandlerarte eingelesen. Der Strahl trifft dann durch die Schlitzblende auf eine Quandrantendiode f). Die Quandrantendiode hat die Funktion, den Kristall richtig zu positionieren. Sie wird so geschaltet, dass der zweite und dritte Quadrant (linke Hälfte) und der erste und vierte Quadrant (rechte Hälfte) jeweils zusammengeschaltet sind. Ist der Kristall optimal

positioniert, so werden beide Hälften gleich beleuchtet. Ist das Strahlprofil unsymmetrisch, so wird eine Hälfte stärker beleuchtet als die andere Hälfte. Dieser Unterschied wird zur Justierung des Kristalls genutzt.

Das Signal der beiden Teildioden wird jeweils durch einen Integrator g) integriert und über eine AD-Wandlerkarte (ME-30, Meilhaus) von einem Rechner h) ausgelesen, der aus den beiden Signalen ein Steuersignal generiert.

Schwankungen der Laserleistung wirken sich sehr störend auf die Messung aus. Da die Wellenlängenabhängigkeit der Fragmentierung bei den Trp-haltigen Peptiden zu breiten Strukturen führte, soll die Laserleistung während der Messung konstant gehalten werden. Die Intensität eines Farbstofflasers ist doch nicht über den gesamten Wellenlängenbereich konstant. Die Wellenlängenabhängigkeit der Intensität wird durch die Fluoreszenz des verwendeten Farbstoffes bestimmt. Typischerweise ergibt sich für ihre Wellenlängenabhängigkeit eine flache Glockenkurve, die an den Rändern des verwendbaren Wellenlängenbereichs steil abfällt.

Die Intensitätsvariation des Lasers, die durch die Abstimmkurve des Farbstoffes verursacht wird, wirken sich auch stark auf die Intensität des Fragmentsignals aus. Dieser Effekt ist in der Größe den molekularen Effekten vergleichbar. Da unsere Messungen sehr breite Strukturen in den Spektren ergeben haben, ist es auch nicht möglich eine Basislinie im Spektrum zu ermitteln. Man kann daher ohne Konstanzhaltung der Laserleistung nicht sicher stellen, dass die gemessene Strukturen wirklich durch eine Wellenlängenabhängigkeit der Molekülabsorption zustande gekommen sind, oder durch Schwankungen bzw. Änderungen in der Intensität des Lasers hervorgerufen wurde. Aus diesem Grund wurde eine Regelung aufgebaut, mit der die Laserleistung während der Messung konstant gehalten werden kann. Dazu wird innerhalb des Farbstofflasers die Intensität des Pumpstrahls der Verstärkerküvette reguliert. Dies ist mit einem Drahtgitter, das mit einem Motor in den Pumpstrahl gefahren werden kann, gelungen.

Zu (ii): Möchte man bei fester Wellenlänge die Art der Fragmente, d.h. ihre chemische Zusammensetzung untersuchen, so kann man durchstimmbaren Laser bei festgehaltener Wellenlänge verwenden. Wegen den geringen Intensitäten sind bei größeren Peptiden mehrere Laserschüsse für die Fragmentierung erforderlich. Besser ist jedoch die Verwendung von höheren Harmonischen eines Nd:YAG-Lasers. Hierzu stand ein Nd:YAG-Laser (Spittlight 600, Fa. Innolas) mit der vierten und fünften Harmonischen zur Verfügung. Der Vorteil von ns-Lasern mit fest frequenten Wellenlängen ist die hohe Pulsenergie. So können zum Beispiel problemlos pro Puls bis zu 100 mJ bei 266 nm und 15 mJ bei 213,5 nm erzeugt

werden. Mit Pulsenergien von 5-10 mJ ist es bereits möglich mit einem oder wenigen Schüssen eine Fragmentierung zu erreichen.

Zu (iii): Für die Fragmentierung mit dem intensiven IR-Femtosekunden-Laser wurde ein kommerzielles kHz Titan:Saphir (mit Titanionen dotierter Saphirkristall, Al_2O_3) fs-Laser mit einem regenerativen Verstärker (Spectra Physik) eingesetzt.

In einem speziell konzipierten Ti:Saphir-Laserresonator werden durch Modenkopplung verschiedener Wellenlängen schwache fs-Lichtimpulse von ca. 27 fs Zeitbreite bei 800 nm erzeugt. Diese Lichtpulse laufen mit einer Wiederholrate von 88 MHz im Resonator um. An einem Endspiegel wird bei jedem Umlauf ein Teil des Strahles ausgekoppelt, so dass ein Pulszug mit 88 MHz Wiederholrate entsteht. Aus diesem werden mit einer Wiederholrate von 1 kHz einzelne Pulse selektiert, die dann zur Nachverstärkung zugelassen werden. Die Nachverstärkung erfolgt in einem regenerativen Ti:Saphir-Verstärker, der mit der zweiten Harmonischen eines kHz Nd:YAG-Laser gepumpt wird. Der regenerative Verstärker funktioniert wie ein Laserresonator, jedoch kann ein externer Puls durch einen elektrooptischen Schalter (Pockelszelle) eingekoppelt und nach etwa 50-70 Umläufen als verstärkter Strahl wieder ausgekoppelt werden.

Mit Ti:Saphir ($\text{Ti: Al}_2\text{O}_3$) steht ein Material zur Verfügung, welches zwei wichtige Kriterien an ein Lasermedium in idealer Weise erfüllt: die breitbandige Fluoreszenz reicht von etwa 700 nm bis 1100 nm und die Absorption ist stark und deutlich von der Emission abgesetzt (400 nm bis 600 nm).

Das hier verwendete fs-Lasersystem mit Nachverstärker liefert 27 fs lange Lichtimpulse mit einer Wiederholrate von 1 KHz und einer Pulsenergie von 200 μJ bei 800 nm. Nach der Fokussierung wird etwa eine Intensität von 10^{12} W/cm^2 erreicht. Bei dieser Intensität können nicht-resonante Multiphoton-Prozesse effizient durchgeführt werden.

3.6.1. Piezoverstellbare Spiegelhalterung

Wie erwähnt, soll die Photofragmentation in der Paul-Falle stattfinden. So muss das Laserlicht in die Paul-Falle eingestrahlt werden und dort die Ionenwolke treffen. Die Öffnungen an der Austrittsendkappe bzw. im Ring der Falle haben nur einen Durchmesser von 1,5 mm. Um das Laserlicht und die Ionenwolke möglichst gut zu überlappen, muss der Laser sehr genau auf die justiert werden können. Außerdem ist eine tägliche Nachjustage nötig, um die optimale Photofragmentation zu erreichen. Die geringe Größe der Ionenwolke und die geringe Teilchenzahl machen ein manuelles Justieren der Spiegel mühsam bzw. unmöglich. Aus diesem Grund wurde eine durch einen Computer positionierbare Spiegelhalterung gebaut (siehe Abb. 3.11), um so die Feinabstimmung zu automatisieren.

Die Positionierung des Spiegels wird durch einen piezoelektrischen Biegeschwinger ermöglicht. Der Biegeschwinger wurde aus piezokeramischen Bauteile gefertigt, die elektromechanische bzw. elektroakustische Wandler sind. Mit solchen Wandlern ist die Umwandlung einer Form von Energie in eine andere in Sensoren ebenso wie in Ultraschallgebern und -empfänger möglich. Der Biegeschwinger wurde auf eine Aluminiumbodenplatte aufgebracht.

Wird eine Spannung zwischen Keramik und dem Metall angelegt, so verbiegt sich das Material ähnlich einem Bimetall. Der Biegeschwinger hat die Form eines Winkels bei dem die Piezo-elektrische Keramik an zwei Stellen unterbrochen worden ist. Dadurch können die beiden Schenkel des Winkels getrennt angesprochen werden. Zwischen den beiden Schenkeln liegt ein drittes Feld, welches die Biegebewegung der beiden Schenkel mechanisch entkoppelt.

Der Spiegelhalter wird an drei Punkten mit dem Biegeschwinger verbunden. Auf jeweils ein Feld des Biegeschwingers wird dazu ein keramischer Abstandhalter gesetzt. In die Spitze des Abstandhalters ist eine Kugel eingelassen, um eine punktuelle Auflage zu erreichen. Der Spiegelhalter wird mit einer Feder gegen die Kugeln gedrückt. Die Feder ist ebenso wie der Biegeschwinger auf einer Aluminiumplatte befestigt. Mit dieser Aluminiumplatte kann der Spiegelhalter an einem mechanischen Spiegelversteller befestigt werden. Die beiden Schenkel des Biegeschwingers sind elektrisch kontaktiert und jeweils mit einem Hochspannungsnetzteil (HCN-7E 3500, FUG) verbunden. Da bei Spannungen größer als 500 V keine nennenswerte Verformung mehr eintritt, wurde die maximale Spannung an den Piezoelementen mittels Zehner-Dioden auf 500 V begrenzt.

Die Hochspannungsnetzteile können über eine externe Spannung angesteuert werden. Die externe Spannung wird durch eine D/A-Wandlerkarte (ME 1600, Meilhaus) am Computer erzeugt. Zur Ansteuerung wurde unter Labview 6 (National Instruments) ein Programm geschrieben. Das Programm erzeugt ein Raster indem an jedem Punkt die prozentuale Fragmentierung aufgenommen wird.

Der piezoverstellbare Spiegel ist der letzte Umlenkspiegel vor der Paul-Falle und wurde an einem normalen Spiegelversteller befestigt. Mit dem mechanischen Versteller kann der Spiegel grob justiert werden. Danach kann über das Regeln der Spannung an den beiden Schenkeln ein Feinjustag vorgenommen werden.

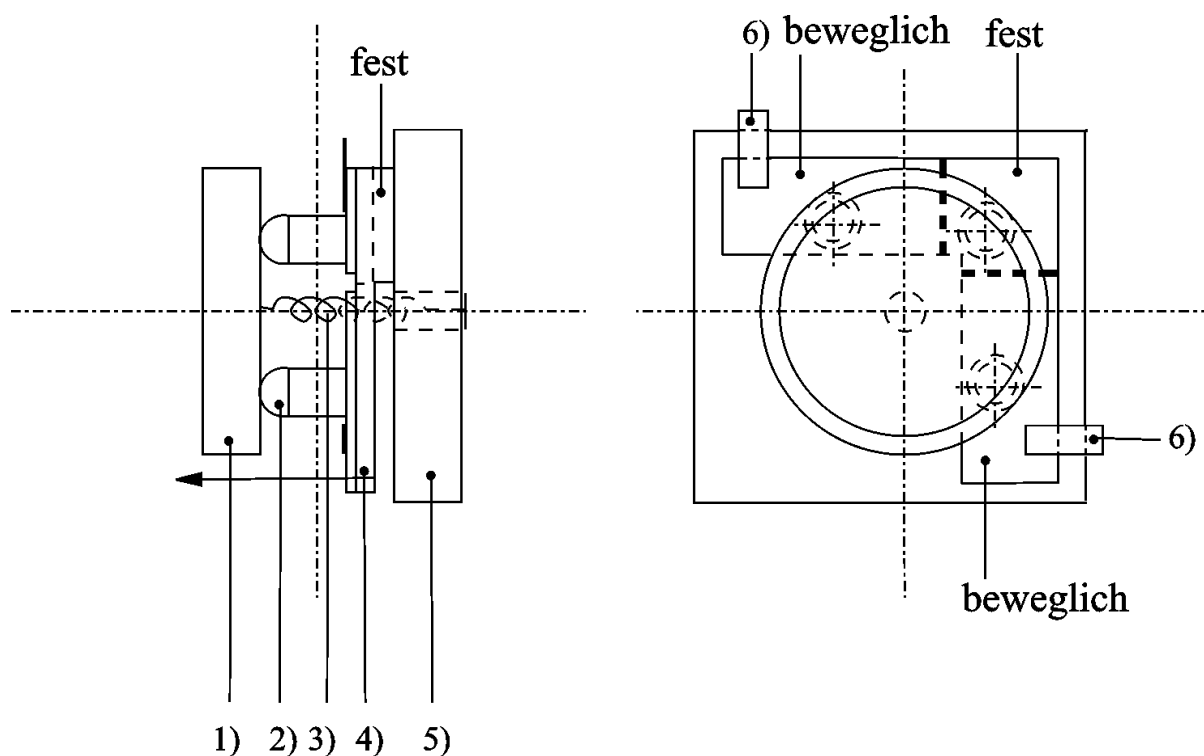


Abb. 3.11: Aufbau des Piezospiegelhalters 1) Spiegelhalter, 2) Keramikabstandshalter, 3) Haltefeder, 4) Piezoelektrischer Biegeschwinger, 5) Bodenplatte, 6) elektrische Kontakte.

Der Bereich in dem der Spiegel mit Hilfe des Computers (Computer 2 in Abb. 3.1) verstellt werden kann, reicht aus, um den gesamten Bereich, in dem ein Fragmentsignal erhalten wird, zu überstreichen. Die Vorrichtung ist somit geeignet, um eine Feinjustage zu übernehmen.

3.7. Messelektronik und Datenaufnahme

3.7.1. Messelektronik

Der Esquire 3000 lässt sich nicht von externen Geräten aus ansteuern. Aus diesem Grund muss die externe Messelektronik mit den internen Abläufen des Massenspektrometers synchronisiert werden. Auf zwei Platinen der Steuerelektronik des Massenspektrometers wurde jeweils ein Testpunkt nach außen geführt. Beim einen Signal handelt es sich um das 780 kHz Signal des Schwingquarzes, der die Frequenz der Ringelektrode erzeugt. Das andere Signal ist das Steuersignal für die HF-Hochspannung an der Ringelektrode. Dieses Signal liegt im Bereich von 0 - 5 V und wird vom Hochspannungsgenerator des Massenspektrometers in eine Spannung von 0 -14 kV umgesetzt.

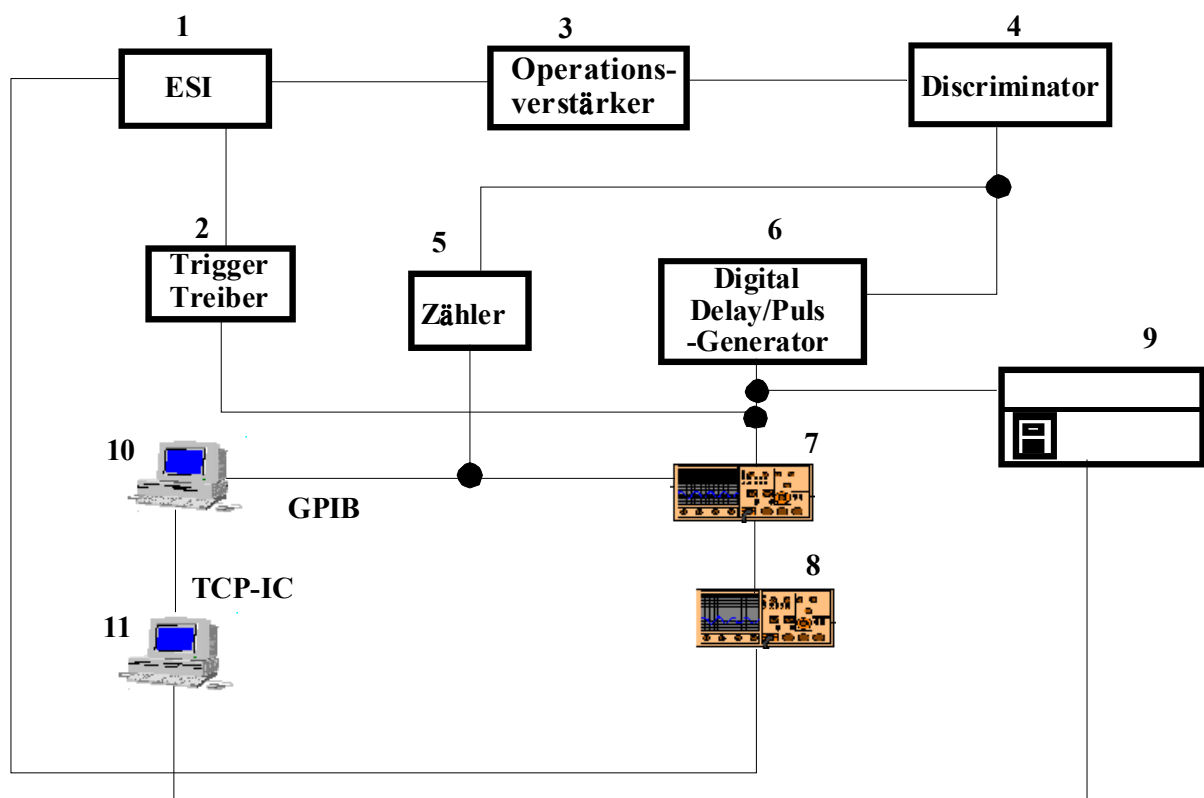


Abb. 3.12: Schematische Darstellung der Elektronikmessgeräte.

Das Signal des Detektors wird von der Messelektronik des ESI-Massenspektrometers direkt weiter verarbeitet und per Ethernet an dessen Messrechner geschickt. Dieses Signal kann auch nach außen geführt und von der externen Messelektronik weiter verarbeitet werden.

Dazu wird das Signal aus dem ESI (1) zuerst durch einen sehr schnellen Operationsverstärker (3) (Modell 774, Phillipsscientific) um den Faktor 25 verstärkt und weiter von einem Diskriminator (4) (Modell 7011, CMTE) zu einem TTL-Signal konvertiert (siehe Abb. 3.12). Das TTL-Signal wird von einem Zweikanal-Zähler (5) mit Zeitfenster aufgezeichnet. Das Signal des Detektors wird an den Eingang beider Kanäle gelegt. Der Zähler zeichnet Ereignisse nur während des Zeitfensters auf, während dessen der entsprechende Kanal durch ein TTL-Signal freigegeben wird. Das Freigeben erfolgt über einen digitalen Delay/Puls-Generator (6) (Modell DG 535, Stanford Research Systems, Inc.), der von einem Steuersignal des ESI angesprochen wird. Auf den einen Kanal des Zweikanalzählers wird das Mutterionensignal gegeben und auf den anderen das der Fragmentionen. Dazu werden der Zähler, das Oszilloskop, der Farbstofflaser (9) und ein Messrechner (10) über eine IEEE-488.2 (GPIB) Schnittstelle angeschlossen. Zudem wird der Messrechner (10) mittels TCP/IP über eine Ethernetverbindung mit dem Messrechner (11) verbunden, der die Verdopplereinheit kontrolliert.

Der Zeitablauf für die Aufnahme eines photoerzeugten Massenspektrums kann durch einen Pin eines 21-poligen Sub-D Steckers verfolgt werden, welcher für bestimmte Ereignisse eines Triggersignals für Peripheriegeräte zur Verfügung steht. Das Signal wird durch einen Triggertreiber (2) über den digitalen Delay/Puls-Generator (6) mit einem Oszilloskop (8) (Modell LT 264, LeCroy) getriggert.

Die 780 kHz Signale der Ringelektroden synchronisieren alle internen Abläufe des Massenspektrometers. Damit wird auch der Zeitablauf für die Aufnahme eines einzelnen Datenpunktes durch das Oszilloskop (8) phasensynchron aufgezeichnet (siehe Abb. 3.13). Ein Analysezyklus vom Massenspektrometer enthält die Entleerung der Paul-Falle, Akkumulation, Isolation, Fragmentierung und Massenanalyse. Am Ende der Isolation wird der ESI-Trigger von low auf high gesetzt und damit das Oszilloskop getriggert. Das Oszilloskop triggert über TTL-Signale den Laser und den digitalen Delay/Puls-Generator für Gate A (über alle Fragmentionen) und B (über Mutterionen). Über GPIB wird das Signal auch an den Messrechner weiter gegeben, der dann das Starten, das Stoppen sowie das Auslesen und Zurücksetzen des Zählers durchführt. Der Laserzugang zur Falle wird mittels eines Schutters nur erlaubt wenn die Ionen zwischen Massenisolation und dem Beginn der Massenanalyse im Fallenmittelpunkt sitzen.

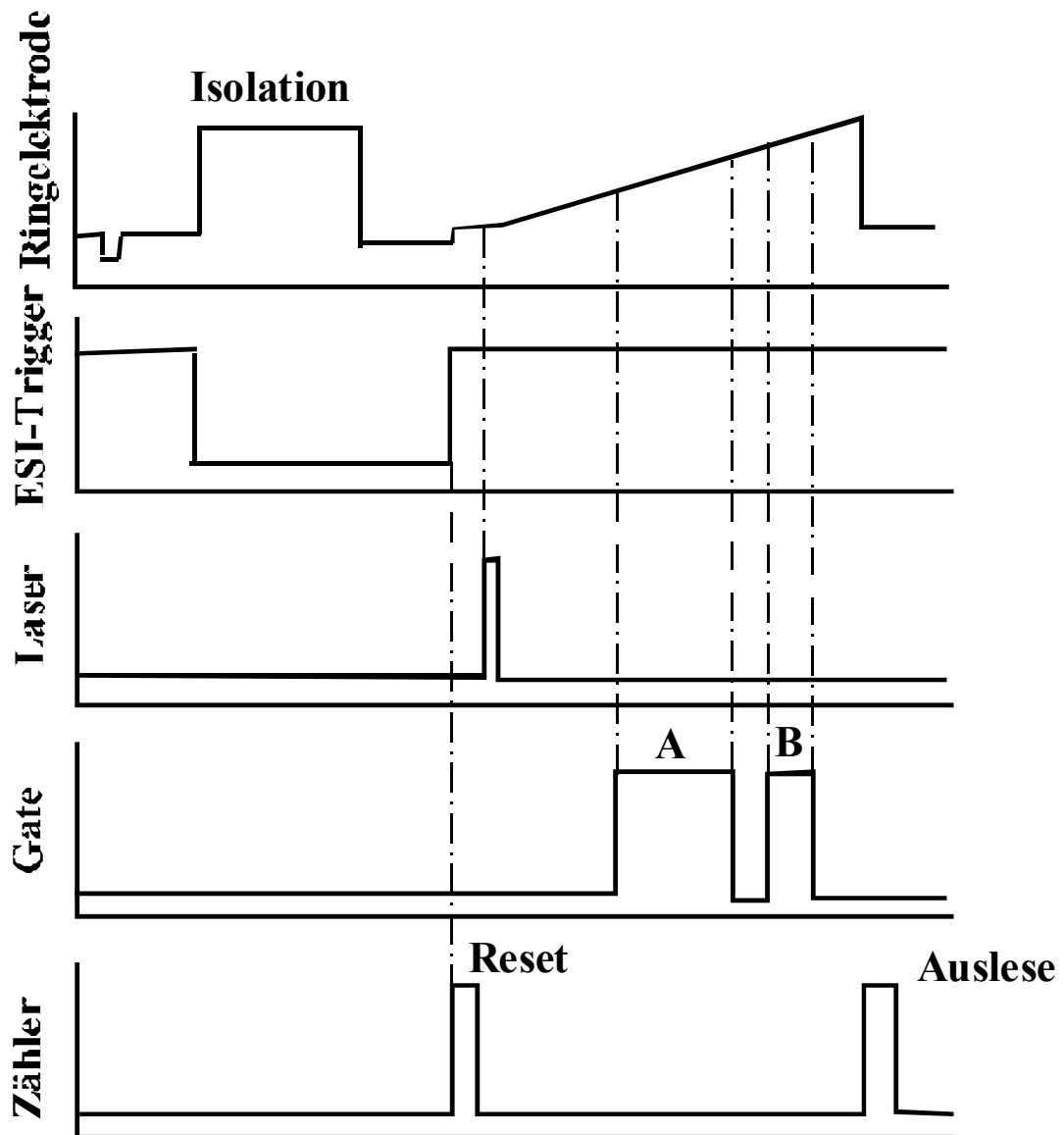


Abb. 3.13: Darstellung des Zeitablaufes für die Erfassung eines einzelnen Datenpunktes. Während des Zeitfensters A werden die Fragmentionen und während des Zeitfensters B die Mutterionen nachgewiesen. Beide Zeitfenster liegen in der Phase der Massenanalyse.

Für die Steuerung des Experimentes standen Labview 6i (National Instruments) Programme unter Windows 98SE zur Verfügung.

3.7.2. Datenaufnahme

Ziel dieser Arbeit ist es die nicht statistische Photofragmentierung von protonierten Peptiden zu untersuchen. Zur Ausführung wird ein kommerzielles Elektrospray-Massenspektrometer mit einer speziellen nicht-statistischen Laserphotodissoziation kombiniert. Zu diesem Zweck wird in einem kontinuierlichen Elektrosprayverfahren, eine Akkumulation von Ionen in einer Paul-Falle erzeugt. Die Chromophore der akkumulierten Ionen werden dann mit einem Laser resonant angeregt. Zwei Probleme, die sich bei diesem Experiment ergeben sind:

- die geringe Teilchenzahl in der Paul-Falle
- die vielen verschiedenen Einflüsse auf das Signal/Rausch-Verhältnis im Massenspektrum

Akkumulationszeit, die einen großen Einfluss auf die Teilchenzahl hat, wurde so eingestellt, dass sich im Durchschnitt 200 bis 250 Ionen in der Paul-Falle während der Analyse befanden. Diese Teilchenzahl konnte durch Zählen der Ionensignale ermittelt werden. Die schwankt von Massenspektrum zum Massenspektrum um ca. 20 % (siehe Abb. 3.14), da der ESI-Prozess nicht stabil ist.

Abb. 3.14 zeigt die Aufnahme von 255 einzelnen Massenspektren, die mit der internen Messelektronik des ESI-Massenspektrometers aufgenommen wurden. Dabei wurde das Signal linear verstärkt, so dass die Intensität proportional zur Anzahl der Ionen ist.

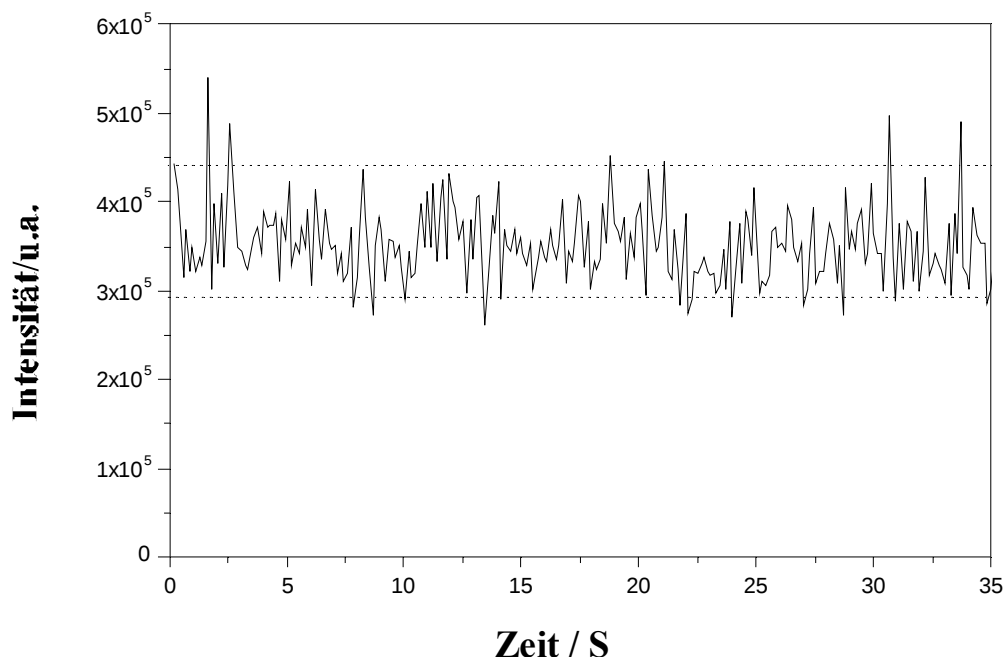


Abb. 3.14: Zeitlicher Ablauf des Ionensignal vom Tryptophan-Mutterion ($m/z = 205$ Da). Die Schwankungen des Ionensignals betragen ca. 30%. Sie entstehen durch Fluktuationen im ESI-Prozess. Es wurden 255 einzelne Massenspektren mit Laserzugriff in 35s aufgezeichnet. Dies entspricht einer Wiederholrate von 8 Hz.

In Abb. 3.15 wurden 255 aufeinander folgende Massenspektren mit der externen Mess-elektronik aufgezeichnet. Die Ionenzahl schwankt durchschnittlich wie bei der Aufnahme mit der internen Elektronik (siehe Abb. 3.15) um ca. $\pm 20\%$ von der mittleren Ionenzahl. Damit gibt der Zähler das Detektorsignal gut wieder. Die signifikanten Ausreißer sind Artefakte, die durch die schlechte Synchronisation zwischen ESI-MS und Computer entstehen. Die Störungen nach oben entstehen durch ein zu spätes Auslesen des Zählers. Die Störung nach unten durch einen Ausfall des Speicherns der Ionen, da die ESI-Elektronik andere Funktionen wahrnimmt (Ablesen des Drucks, Überprüfung der Spannungen).

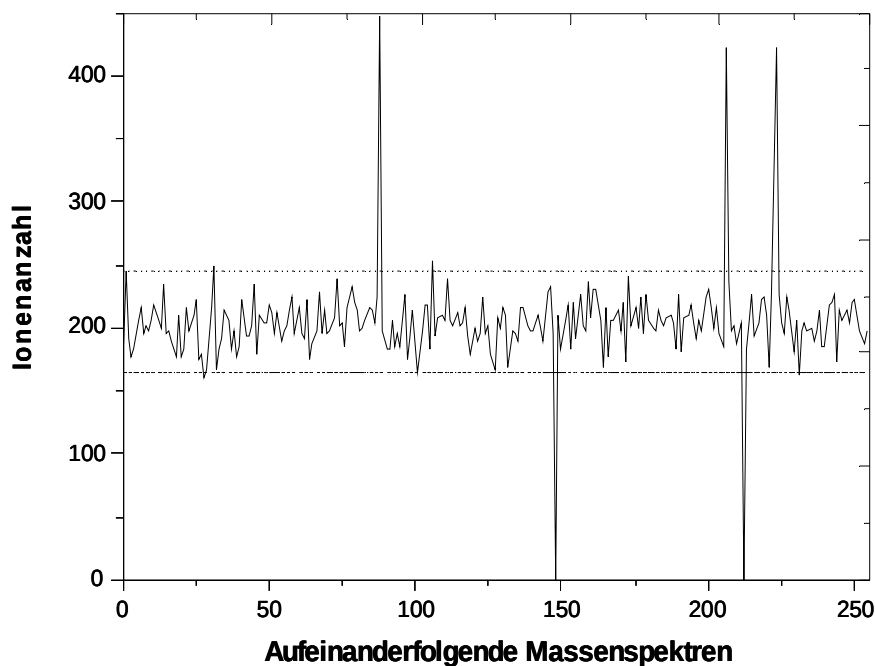


Abb. 3.15: Anzahl der Ionen wird in 255 direkt aufeinanderfolgenden Massenspektren mit externer Zählelektronik aufgezeichnet. Die Schwankungen der Ionenzahl sind qualitativ den Schwankungen wie sie mit der internen Messelektronik des Equires 3000 aufgezeichnet wurden ähnlich. Die Ionenzahl schwankt um etwa $\pm 20\%$ (gestrichelte Linien) (siehe auch die Erklärung im Text).

Die Ausreißer im Signal würden das ohnehin schon vorhandene schlechte Signal/Rausch-Verhältnis weiter verschlechtern. So ist es sehr wichtig, dass jede einzelne Messung schon während der Datenaufnahme auf solche Ausreißer überprüft wird. Durch das Mess-Programm wurde kontrolliert, dass die Datenpunkte, bei denen die Teilchenzahl über $\pm 50\%$ von dem eingestellten Zielwert entfernt sind, von vornherein eliminiert werden.

Neben der Teilchenzahl hat die Schuss-zu-Schuss-Schwankung der Laserleistung einen großen Einfluss auf das Signal/Rausch-Verhältnis der Fragmentationensignale. So soll die Laserleistung auch von der Konstanthaltung überwacht werden (siehe Kap. 3.6.). Alle Datenpunkte, bei denen die Laserleistung um mehr als 10% vom festgelegten Wert abgewichen ist, wurden verworfen.

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

Das Steuerprogramm fährt sowohl den Farbstofflaser als auch den Verdopplerkristall zu der gewünschten Wellenlänge. Die genaue Positionierung des Kristalls wird durch die aktive Verdopplersteuerung variiert. Die Laserleistung wird von der Konstanthaltung überwacht. Es werden dann so lange Messpunkte nach obigem Schema (siehe Abb. 3.13) aufgenommen, bis eine gewünschte Anzahl an Einzelmessungen pro Wellenmesspunkt erfasst wurde. Dabei soll sowohl die Anzahl der Ionen als auch die Laserleistung innerhalb erlaubten Schwankungen konstant gehalten werden. Über diese Punkte wurde dann gemittelt und zum nächsten Wellenlängenmesspunkt gefahren. Es werden bei einer Messung gleichzeitig vier Datenspuren aufgenommen: Die Wellenlänge, die beiden Kanäle des Ionen-Zählers und die Laserleistung.

4. Ergebnisse

Die in dieser Arbeit mit der Kombination von ESI- und Photoanregungs-Methoden untersuchten Substanzen, sollen einen Einblick in die Photofragmentierungsmechanismen von protonierten Peptiden in der Gasphase erlauben. Die Frage nach dem Ort der Ladung und nach dem Ort bzw. dem Mechanismus der Photodissoziation des Molekülions ist von grundlegender Bedeutung: Nur die geladenen Fragmente sind massenspektrometrisch erfassbar. Es handelt sich bei den hier untersuchten Systemen um protonierte Moleküle, die eine geschlossene Elektronenschale besitzen. Eine mögliche Anwendung ist die Sequenzanalyse von Peptiden und Proteinen.

Um obige Fragestellungen zu untersuchen, wurden hauptsächlich kleinere Peptide mit einfachen Aminosäuresequenzen mit nur einer aromatischen Seitenkette analysiert. In dieser Arbeit werden Peptid-Serien mit Tryptophan als Chromophor am C-Terminus untersucht, in welchen nur eine Eigenschaft verändert wird, z. B. die Kettenlänge.

Für die Photoanregung ist es wichtig zu verstehen, dass in protonierten Molekülen die Absorption der Moleküle, obgleich geladen, weitgehend denen der neutralen Moleküle entspricht. Dies liegt an der Tatsache, dass in solchen Systemen die Elektronen gepaart also die Molekülorbitale (MOs) gefüllt sind (nur zwischen bindenden und antibindenden Orbitalen sind Übergänge möglich) und sich die optisch aktiven MOs, meist π -Orbitale offenbar in Anwesenheit der Ladung in gleichem Maße verschieben, so dass die elektronischen Übergangsenergien weitgehend erhalten bleiben. Trp-haltige Peptide absorbieren folglich bei der Wellenlänge des neutralen Trp.

Neben der CID werden Photoanregungen mit 285 nm, mit 266 nm mit 213, 5 nm und mit fs-Multiphoton-IR-Anregung bei 800 nm durchgeführt und deren Ergebnisse verglichen. Bei CID mit He wird die Energie in kleinen Portionen zugeführt, was oft zur Dissoziation nur aus dem niedrigsten Fragmentierungskanal führt. Bei der Photoanregung mit UV-Licht wird sehr viel Energie in einem Schritt zugeführt. Es gibt zudem die Möglichkeit zur Fragmentierung aus dem angeregten elektronischen Zustand. Bei der Anregung mit 285 nm wird der Chromophor Trp in der Nähe des Origins angeregt. Man erzeugt dadurch einen „kalten angeregten Zustand“. Bei Anregung mit 266 nm wird Trp zu höheren Schwingungszuständen des S_1 angeregt oder sogar der S_2 erreicht. Es wird ein also heißer elektronisch angeregter Zustand erzeugt. Bei Anregung mit 213,5 nm können neben dem aromatischen Chromophor auch die nicht-aromatischen Bereiche der Peptide angeregt werden. Man kann hoffen, dass deshalb die Fragmente aus verschiedenen Bereichen des Moleküls kommen und die

Anregungseffizienz mit der Anzahl der Aminosäuren steigt. Von 285 über 266 zu 213,5 nm wird auch zunehmend mehr Energie (285 nm: 4,32 eV; 266 nm: 4,66 eV; 213,5 nm: 5,8 eV) in einem Schritt in die Molekülonen eingekoppelt, so dass auch deshalb zu höheren Energien andere Fragmentierungen auftreten können. Mit intensivem IR Licht aus fs-Lasern (mehr als 10^{12} W/cm²; 800 nm: 1,55 eV) ist es möglich auch nicht-resonante Anregungen durchzuführen und die Anregung möglicherweise ebenfalls von chromophoren Gruppen unabhängig zu machen. Zudem kann möglicherweise in einer Multiphotonen-Anregungssequenz (ein Laserschuss) mehr Energie als bei der UV-Anregung eingekoppelt werden.

4.1. Tryptophan

Wie in Kap. 3.2. erwähnt, wurde in dieser Arbeit Tryptophan aus folgenden Gründen als Testsubstanz für apparative Entwicklung gewählt.

- Von neutralem Tryptophan gibt es bereits viele spektroskopische Untersuchungen [88, 89, 90]. Es wird erwartet, dass die Absorption des protonierten Tryptophans zur Absorption des neutralen Trp nur gering verschoben ist. Ferner ist bekannt, dass Tryptophan wahrscheinlich an der Aminogruppe protoniert wird [91].
- Tryptophan hat die höchste Anregungswahrscheinlichkeit im Vergleich mit anderen aromatischen Aminosäuren.

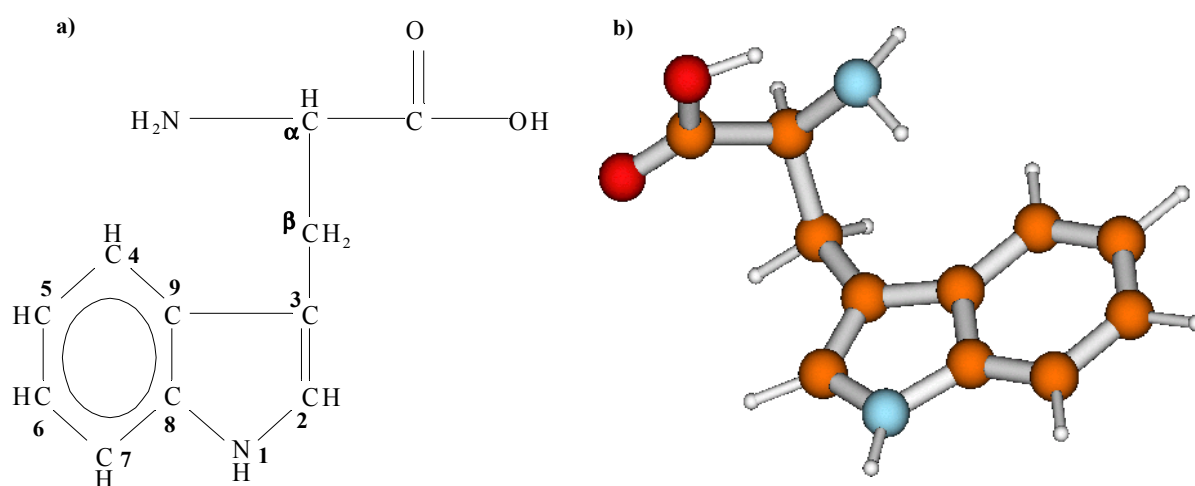


Abb. 4.1: a) Lewis-Struktur des Tryptophans, b) Konformer mit niedrigsten Energie des neutralen Tryptophans in der Gasphase [80, 81].

Tryptophan (nach IUPAC 2-Amino-3-(1H-indol-3yl)-Propansäure) hat eine Molmasse von 204 g/mol. In der Dreibuchstabennomenklatur wird das Symbol Trp und in der Einbuchstabennomenklatur das Symbol W verwendet. In Abb. 4.1, Teilabbildung a) ist die Lewis-Struktur von Tryptophan dargestellt. In Teilabbildung b) ist das nach *ab initio* Rechnung (MP2/6-311+G(d, p)//B3LYP/6-31+G(d)) [92, 93] energetisch niedrigste Konformer des neutralen Tryptophans in der Gasphase gezeigt. Durch *Resonance Enhanced*

two-photon-ionisation-spectroscopy (R2PI) konnten sechs Konformere des neutralen Tryptophan im Vakuum nachgewiesen werden [88, 89]. Die Wechselwirkung zwischen dem freien Elektronenpaar am Stickstoff der Aminogruppe und der OH-Gruppe der Carboxylgruppe bestimmt die Position der Carboxylgruppe. Beide Gruppen stehen also in fester Relativposition und können dann in verschiedene Positionen zum Indol-Ring gebracht werden.

Die Atome des Tryptophans werden so nummeriert, dass man am Stickstoff des Indolrings beginnt und im Gegenuhreigersinn vom kleinen Ring zum größeren Ring durchzählt. Die Seitenkette am Indolring wird anders benannt: Der Kohlenstoff, an dem die Aminogruppe hängt, bekommt die Bezeichnung α -Kohlenstoff und der Kohlenstoff an dem der Indolring hängt wird β -Kohlenstoff genannt. Die im Folgenden benutzen Symbole und Nummern zur Beschreibung von Atom-Positionen innerhalb des Trp-Moleküls folgen diesem System.

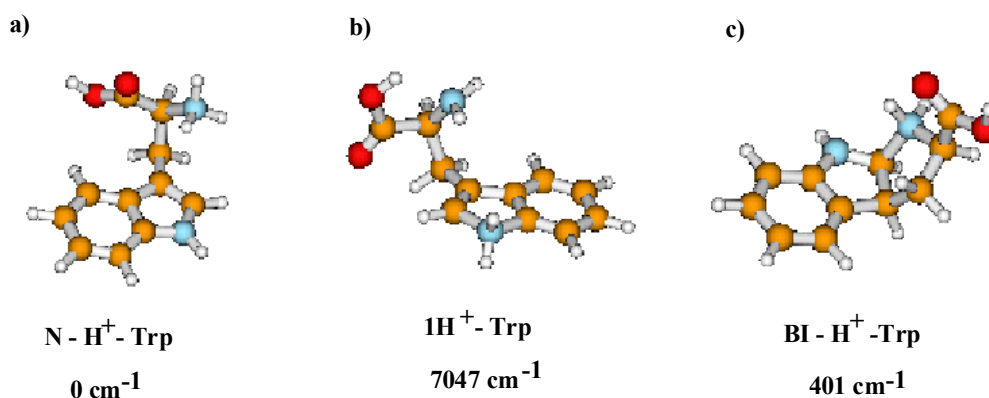


Abb. 4.2: Berechnete Strukturen und Energien (nach der Methode DFT/MRCI/TZVP) von drei möglichen Tautomeren des protonierten Tryptophan [93]. a) Das an der Aminogruppe protonierte Tautomer ist das energetisch günstigste. b) Die Protonierung am Indolstickstoff (Position 1) ist sehr ungünstig. c) Nach Protonierung an Position 3 erfolgt eine Isomerisierung mit einem Ringschluss.

Beim protonierten Tryptophan kann es prinzipiell von jedem Tautomer noch mehrere Konformere geben, so dass es viel mehr mögliche Strukturen als beim neutralen Tryptophan gibt.

Prinzipiell sind drei Protonierungsstellen denkbar:

- a) an der Aminogruppe: N-H^+ -Trp; (siehe Abb. 4.2 a)
- b) in 1-Position am Indol: 1H^+ -Trp; (siehe Abb. 4.2 b)
- c) in 3-Position nach Umlagerung des Moleküls: BI-H^+ -Trp; (siehe Abb. 4.2 c)

Das an der Aminogruppe protonierte Tryptophan ist energetisch am niedrigsten (siehe Abb. 4.2) [84, 93, 94]. Alle übrigen Protonierungsmöglichkeiten sind energetisch deutlich ungünstiger. Die Protonierung an Position 1, d.h. am Indolstickstoff liegt energetisch zu hoch wird ausgeschlossen [84]. Bei Protonierung in Position 3 muss eine Reaktionsbarriere überwunden werden, um die Isomerisierung in Gang zu setzen und den energetisch relativ günstigen Ringschluss zu erhalten. Da erwartet wird, dass die Barriere sehr hoch ist, erscheint diese Protonierung energetisch unwahrscheinlich.

Das elektronische Spektrum des Tryptophans wird durch zwei Übergänge bestimmt. Im neutralen Tryptophan bildet der unpolare L_b -Zustand den S_1 . Der S_2 wird vom L_a -Zustand gebildet, der ein höheres Dipolmoment besitzt als der L_b . Die Geometrien dieser elektronisch angeregten $\pi\pi^*$ -Zustände bleiben bei der Protonierung weitgehend erhalten. Die Anwesenheit der Ladung ermöglicht jedoch einen weiteren tief liegenden Zustand. Dabei kann das angeregte Elektron aus dem Indol zum protonierten Amin wandern.

Die berechneten Werte für die Anregungsenergie sind in Tabelle 1 gegeben [84]. Beim protonierten Tryptophan ist, wie beim Neutralen, der L_a -Zustand der S_2 -Zustand. Durch die positive Ladung gibt es einen diffusen Zustand zwischen den Zuständen L_a und L_b und der polare L_a -Zustand wird stark zu höheren Energien geschoben. Dagegen hat die positive Ladung nur einen geringen Einfluss auf den unpolaren L_b -Zustand, egal wo der Ort der Protonierung liegt. Aufgrund des hohen Energieunterschieds von 84 kJmol^{-1} des energetisch günstigsten Tautomers zum zweitgünstigsten, ist es sehr wahrscheinlich, dass bei der Ionisierung lediglich das N-H^+ -Trp gebildet wird.

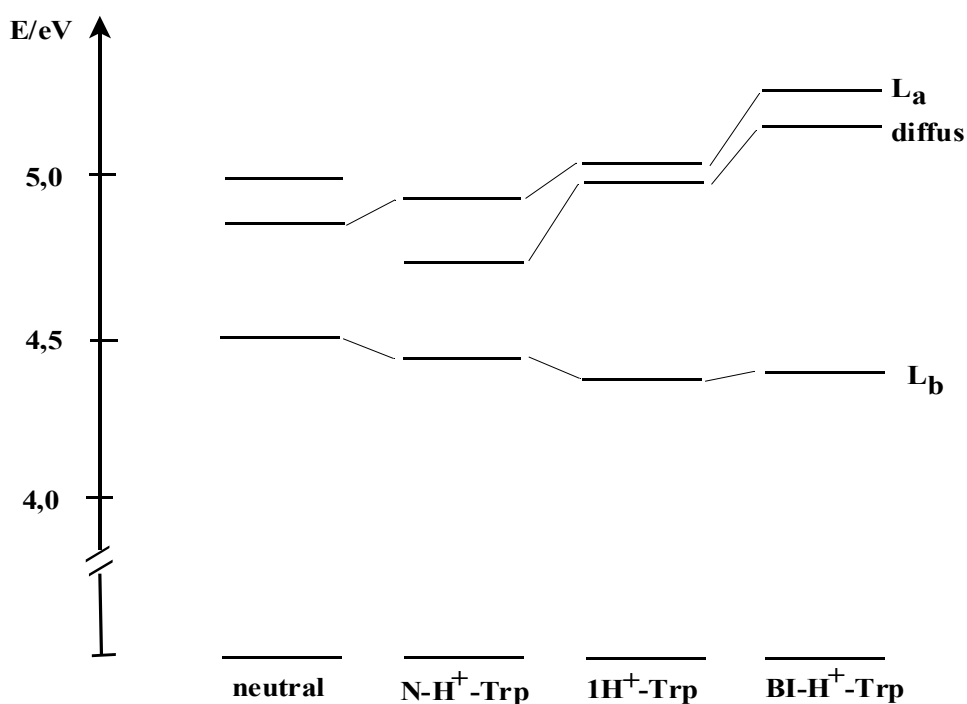


Abb. 4.3: Vertikale elektronische Energiezustände des neutralen Tryptophans und der protonierten Tautomere N-H⁺-Trp, 1H⁺-Trp und BI-H⁺-Trp.

Zustand	neutral	N-H ⁺ -Trp	1H ⁺ -Trp	BI-H ⁺ -Trp
S ₀	0	0	0	0
S ₁	L _b 4,50/0,019	L _b 4,47/0,045	L _b 4,42/0,009	4,43/0,028
S ₂	L _a 4,76/0,137	diffus 4,67/0,050	diffus 4,93/0,005	5,12/0,006
S ₃	4,93/0,002	L _a 4,88/0,129	L _a 5,03/0,231	5,31/0,004
Exp. S ₀ - S ₁	4,32	4,36		

Tabelle 1: Berechnete Energien (nach der Methode TZVE+R) der Zustände und elektronische Übergänge von neutralem und protoniertem Tryptophan.

4.1.1. ESI-Massenspektrum von Tryptophan

Im Massenspektrum des Tryptophans (siehe Abb. 4.4) sind drei Hauptsignale deutlich zu erkennen, das Molekülion $[\text{Trp} + \text{H}]^+$ bei m/z 205 Da, das einfach protonierte Dimer $[\text{M}_2 + \text{H}]^+$ bei $m/z = 409$ Da und das Z_1 -Fragmentation $[\text{M} + \text{H} - 17]^+$ des protonierten Monomers bei $m/z = 188$ Da, das durch den Verlust von NH_3 entsteht (siehe Kap. 4.1.2.).

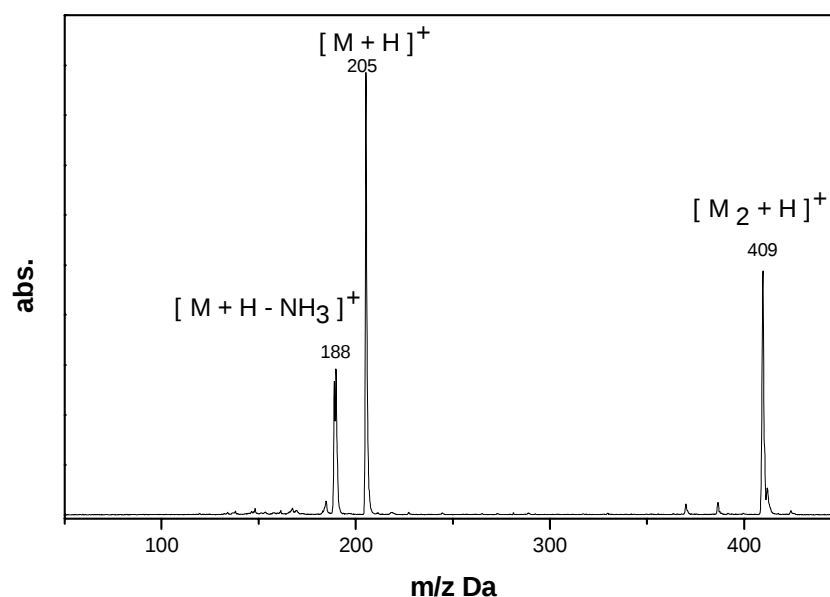


Abb. 4.4: ESI-MS von protoniertem Tryptophan ($M_r = 204$ g/mol). Im Spektrum befinden sich drei intensive Peaks: Mutterion $[\text{M} + \text{H}]^+$, Dimer $[\text{M}_2 + \text{H}]^+$ und Fragment $m/z = 188$ $[\text{M} + \text{H} - 17]^+$.

Der hohe Anteil von Dimeren im Massenspektrum lässt darauf schließen, dass während der Ionisation hauptsächlich das Dimer entsteht, das durch eine kovalente Bindung über das Proton und die zwei Amingruppen zusammengehalten wird. Das protonierte Monomer kann in der Paul-Falle kein neutrales Tryptophan anlagern und so ein Dimer bilden, da das neutrale Tryptophan nicht flüchtig ist als Reaktionspartner nicht zur Verfügung steht.

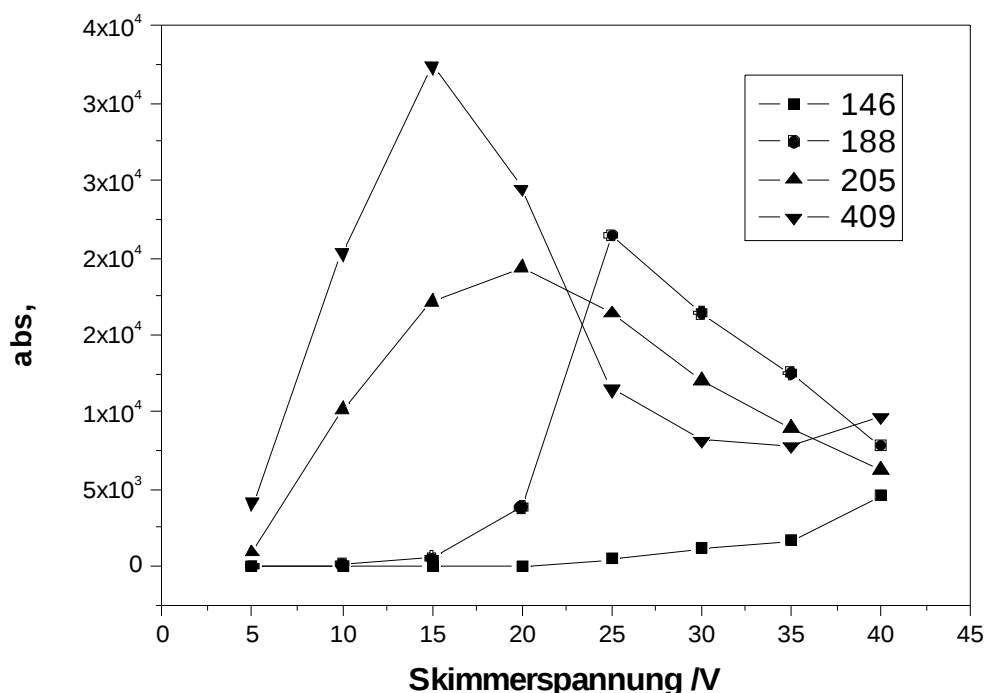


Abb. 4.5: Abhängigkeit der Intensitäten von der Skimmerspannung. Bei hoher Skimmerspannung, also bei hochenergetischen Stößen der Ionen mit Neutralteilchen zerfällt das Dimer (m/z 409 Da) verstärkt in das Monomer (m/z 205 Da). Das Monomer fragmentiert bei höheren Spannungen zunächst in das Fragment m/z 188 Da, dann in das Fragment m/z 146 Da.

Die häufigsten und energiereichsten Stöße erfährt das Proben-Ion direkt nach dem Transfer durch die Glaskapillare in der ersten Kammer (Druck: 10 mbar). Die am ersten Skimmer hinter der Glaskapillare anliegende Spannung ist maßgeblich für die Energie dieser Stöße und damit den Grad der Fragmentierung der Probe vor dem Eintritt in die Paul-Falle. In Abb. 32 ist die Abhängigkeit der verschiedenen Signale im Massenspektrum von der Beschleunigungsspannung am Skimmer 1 gezeigt. Bei einer geringen Skimmerspannung von 5 V ist an meisten vom protonierten Dimer vorhanden und die Fragmente von m/z = 188 und m/z = 146 Da gibt es praktisch nicht. Erhöht man die Spannung am Skimmer1, so nimmt zunächst der Anteil an Monomer zu, während der Anteil des Dimers sinkt. Das beweist obige Hypothese, dass während der Elektrosprayionisation hauptsächlich das Dimer entsteht und das Monomer erst durch die Fragmentierung des Dimers gebildet wird.

Ab einer Spannung von 15 V fragmentiert dann das Monomer zu einer Masse von $m/z = 188$ Da, während gleichzeitig der Anteil des Dimers stark abnimmt. Da relativ viel Energie nötig, um das Dimer zum Monomer zu dissoziieren folgt, dass das Dimer kovalent gebunden ist, in Übereinstimmung mit der chemischen Intuition, dass sich beide Amingruppen das Proton teilen. Ab einer Spannung von 25 V steigt dann auch die Bildung des Fragmentes $m/z = 146$ Da an. Die Bildung dieses Fragmentes erfordert noch mehr Energie, als die des Fragmentes $m/z = 188$ Da, in Übereinstimmung mit der Interpretation, dass nun zwei Fragmente (NH_3 und CO_2) abbrechen. Da man durch das Hochregeln der Skimerspannungen monoton mehr Energie zuführen kann, ist es auch möglich mittel einem ESI-MS die relativen Stabilitäten von Fragmenten zu untersuchen. Leider ist es nicht möglich diese Messungen zu quantifizieren und Bindungsenergien zu bestimmen.

4.1.2. Kollisionsinduzierte Fragmentierung von protoniertem Tryptophan

Die durch Stöße mit einem Stoßpartner oder sequenziell mit mehreren Stoßpartnern verursachte Fragmentierung wird auch als kollisionsinduzierter Zerfall bezeichnet (CID, *collision induced decomposition* oder *dissociation*). In konventionellen Magnetsektor-Massenspektrometern wird oft nur ein hochenergetischer Stoß angewendet. In unserer Anordnung wird als Stoßpartner in der Paul-Falle Helium eingesetzt. Um hohe Energie zuzuführen werden die ausgewählten Ionen durch ein elektrisches Wechselfeld an den Endkappen geschüttelt. Die Amplitude der Bewegung kann eingestellt werden. Aufgrund der geringen Masse des He sind mehrere Stöße zwischen He und dem Proben-Ion erforderlich, bevor es zur Fragmentierung kommen kann. Das Ion wird dadurch langsam intern aufgeheizt und die Energie gleichmäßig im Molekül verteilt. Entsprechend erfolgt die Fragmentierung statistisch.

In Abb. 4.6 sind die CID-Massenspektren von Tryptophan dargestellt. In 4.6 c) wird protoniertes Tryptophan vollständig zum Fragmention mit $m/z = 188$ Da fragmentiert, obgleich die Aktivierungsenergie für diese Fragmentierung bei ca. 2,5 eV liegt [83]. Dieser Kanal ist offensichtlich der niedrigste Fragmentierungskanal in Trp. Es gibt zwei denkbare Möglichkeiten, aus Tryptophan ein Fragment $m/z = M - 17$ Da zu erzeugen:

- durch die Abspaltung von NH_3 und
- durch die Abspaltung von $\text{OH}^\bullet$;

Um zu prüfen, welches Fragment gebildet wird, wurde das Tryptophan partiell deuteriert, indem es statt in H_2O in D_2O gelöst wurde. Dadurch werden die fünf Wasserstoffatome an den Heteroatomen ausgetauscht [93]. Abb. 4.6 b) zeigt das CID-Spektrum des deuterierten Mutterions. Es sind drei Fragmente mit den Massen $m/z = 190$ Da, 191 Da und 192 Da zu sehen. Diese entsprechen den Fragmenten NH_2D , NHD_2 und ND_3 . Die Fragmente NH_2D , NHD_2 erklären sich dadurch, dass die Energie für die Dissoziation des Moleküls oberhalb der Energie für einen intramolekularen H/D-Austausch liegt. Aus sterischen Gründen findet nur ein Austausch mit den H-Atomen an C2 und C4 statt (siehe Gl. 6). So ist der Verlust von NH_3 nicht zu finden. Dadurch ist klar, dass es sich bei dem Verlust von $m/z = 17$ Da in Abb. 4.6 c) nicht um den Verlust von $\text{OH}^\bullet$ handeln kann. Sonst würde man nur die Massen 193 Da ($[\text{M} + \text{H} - \text{OH}^\bullet]^+$) und 192 Da ($[\text{M} + \text{H} - \text{OD}^\bullet]^+$) erwarten.

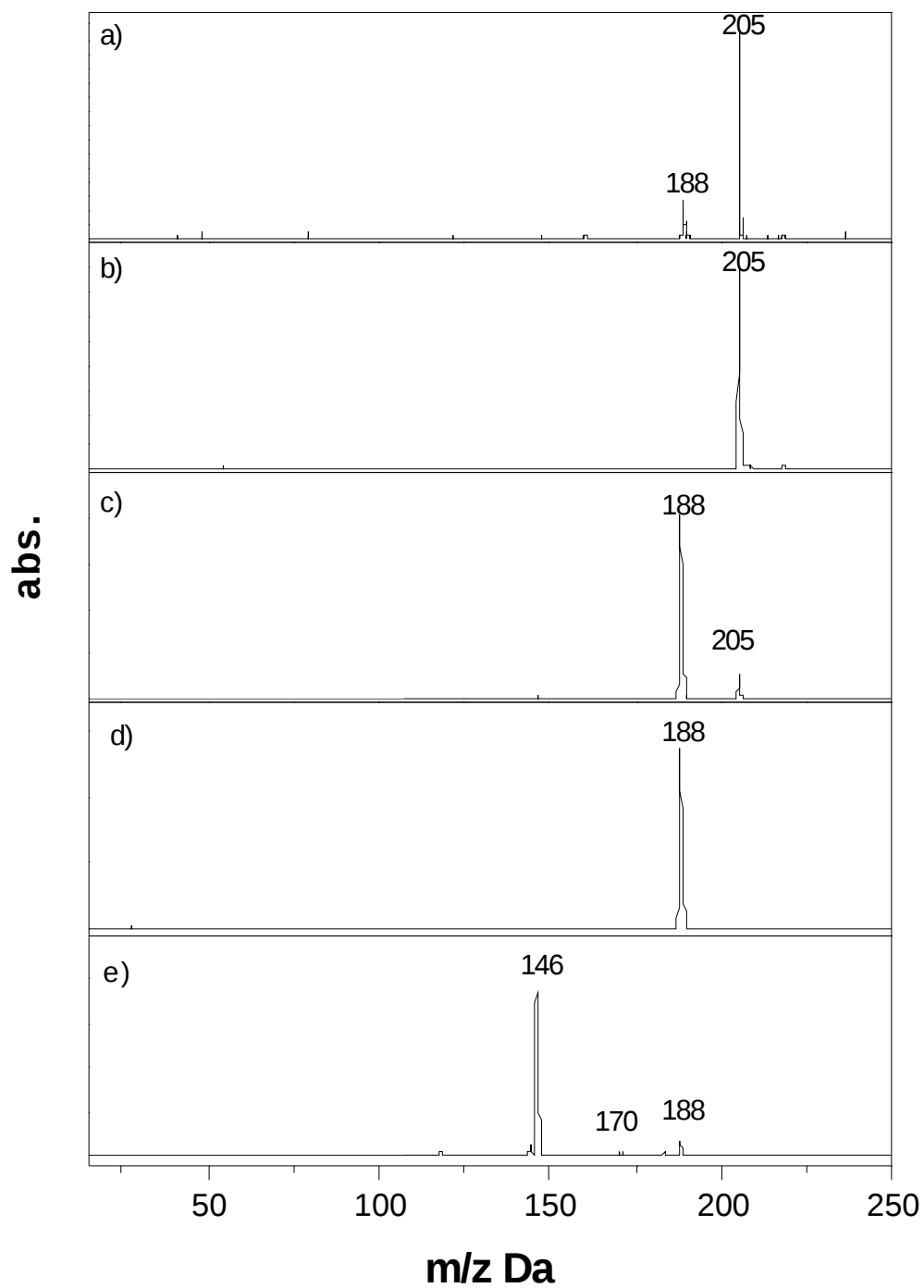


Abb. 4.6: a) Massenspektrum von Tryptophan, b) Isolationsmassenspektrum von Tryptophan, c) Fragmentierung vom Molekölion $[\text{TrpH}]^+$ durch CID-Methode zu $m/z = 188$, d) Isolation von Fragmention $m/z = 188$ Da, e) ein anschließender CID führt im MS^3 Schritt zu den Fragmenten $m/z = 170$ Da und 146 Da.

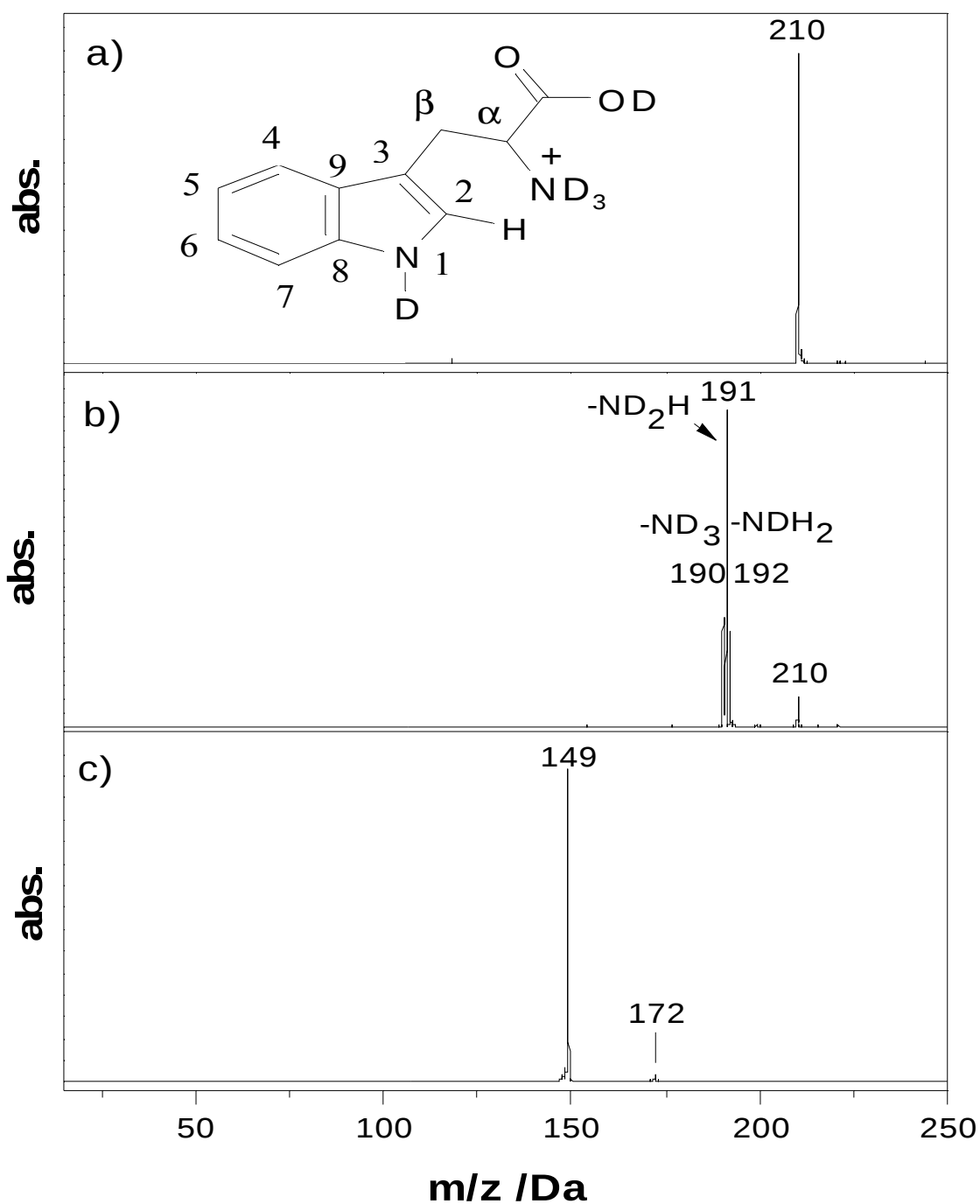
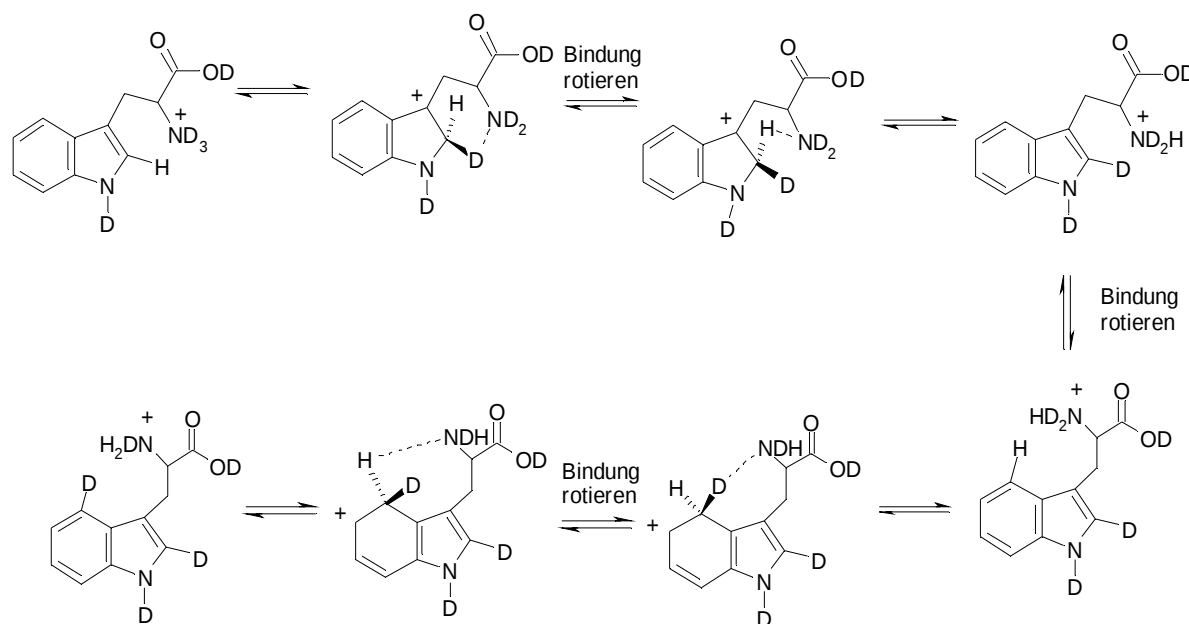


Abb. 4.7: CID-Massenspektren von deuterierten Tryptophan. a) ESI-Massenspektrum von deuterierten Tryptophan b) Isolierung von Masse m/z 210 Da und anschließende Fragmentierung. C) Isolation und ein anschließender MS³ Schritt von m/z 191 Da.

Der Verlust von Ammoniak wird vermutlich von einem intramolekularen Angriff vom aromatischen Ring am α -C-Atom ausgelöst. Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie in Abb. 4.8 gezeigt wird, dass von verschiedenen Stellen des Indolrings nukleophil angegriffen wird.

Struktur a) wird durch einen Angriff vom C-2-Atom am α -C-Atom mit anschließender Ringerweiterung erhalten. Struktur b) wird durch den Angriff vom C-4-Atom aus und Struktur c) vom C-3-Atom aus erzielt. Es ist auch möglich, dass von den Brückenatomen aus, d. h. vom C-8- oder C-9-Atom aus, am α -C-Atom angegriffen wird. Aus energetischen Gründen sind die Strukturen von b), d) und e) unwahrscheinlich (siehe Tabelle 2). Die Struktur f) ist auch möglich. Sie vermeidet sterische Spannungen und der Indolring bleibt erhalten.



Reaktionsgleichung 6: Mechanismen des H/D-Austausches bei deuteriertem Tryptophan. Der Austausch kann aus sterischen Gründen nur an den Positionen 2 und 4 stattfinden.

Das Fragment $m/z = 188$ Da kann weiter isoliert und durch die CID-Methode fragmentiert werden. Dabei werden weitere Fragmente, $m/z = 146$ Da und $m/z = 170$ Da, erzeugt (siehe Abb. 4.6 e). Dabei ist die Intensität vom Fragment $m/z = 170$ Da sehr viel geringer als die der Masse $m/z = 146$ Da. Das Fragment $m/z = 170$ Da entsteht durch die Abspaltung von NH_3^- und H_2O aus protoniertem Tryptophan. Dieser Kanal kann auch durch die Fragmentierung von deuteriertem Tryptophan nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.7 c), wobei nach Abspaltung eines HDO -Moleküls das Fragment $m/z = 172$ Da gebildet wird. Die mögliche Struktur ist in Abb. 4.13 dargestellt. Die Intensität für das Fragment $m/z = 170$ Da

relativ zum Hauptfragment $m/z = 146$ Da aus der Fragmentierung von dem Ion $m/z = 188$ Da beträgt 4 % (siehe Abb. 4.6 C). Dieser Fragmentierungskanal ist also beim Tandem-MS³ Schritt an protoniertem Tryptophan von untergeordneter Bedeutung.

Das Fragment $m/z = 146$ Da kann nicht durch einen einfachen Bindungsbruch erklärt werden und kann nicht durch einen weiteren Tandem-MS-Schritt fragmentiert werden. Da das Fragment $m/z = 146$ Da durch die Fragmentierung von $[\text{Trp} + \text{H} - \text{NH}_3]^+$ erzeugt wird, enthält die Masse 146 maximal 11 C-Atome, 10 H-Atome, 1 N-Atom und 2 O-Atome. Die Fragmentmasse kann formell durch folgende Summenformeln erklärt werden:

1: $\text{C}_9\text{H}_8\text{NO}$; 2: $\text{C}_8\text{H}_4\text{NO}_2$; 3: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}$; 4: $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$; 5: C_{11}N .

Da bei den Summenformeln 3 und 4 der Indolring geöffnet und sehr viel Dissoziationsenergie gebraucht würde, können sie ausgeschlossen werden. Das CID-Massenspektrum der Masse 191 Da ist in Abb. 4.7 c) dargestellt. Das Spektrum enthält ein Fragment von $m/z = 149$ Da, das drei Deuteriumatome enthält. Da die Summenformel 5 keine Wasserstoffatome enthält, ist auch sie ausgeschlossen.

Die Summenformel 2 entsteht formal durch eine Abspaltung von C_3H_6 . Die auf dem geladenen Fragment verbleibenden vier Wasserstoffatomen reichen jedoch nicht aus, um eine stabile Struktur zu generieren. Deshalb kann auch sie als unwahrscheinlich ausgeschlossen werden.

Bei der Summenformel 1 würde das Fragment $m/z = 146$ Da durch den Verlust eines Ketens hier $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ gebildet. Die Keten-Gruppe wird durch eine Umlagerung der OH-Gruppe der Carboxyl-Gruppe gebildet. Aus Abb.36 kann man sehen, dass die Fragmente $m/z = 192$ Da, 191 Da und 190 Da von deuteriertem Tryptophan durch keinen weiteren H/D-Austausch direkt zu $m/z = 150$ Da, 149 Da und 148 Da fragmentieren. Das Fragment $m/z = 150$ entsteht nach Abspaltung von NDH_2 im ersten MS/MS-Schritt aus deuteriertem Tryptophan. So sollten sich noch vier Deuteriumatome im Fragment befinden. Wahrscheinlich befinden sie sich an C-2, C-4 (siehe Gl. 6), N-1 und der Carboxyl-Gruppe. Daraus kann man schließen, dass die OH-Gruppe von der Carboxyl-Gruppe tatsächlich umgelagert wird und sich immer noch im Fragment befindet.

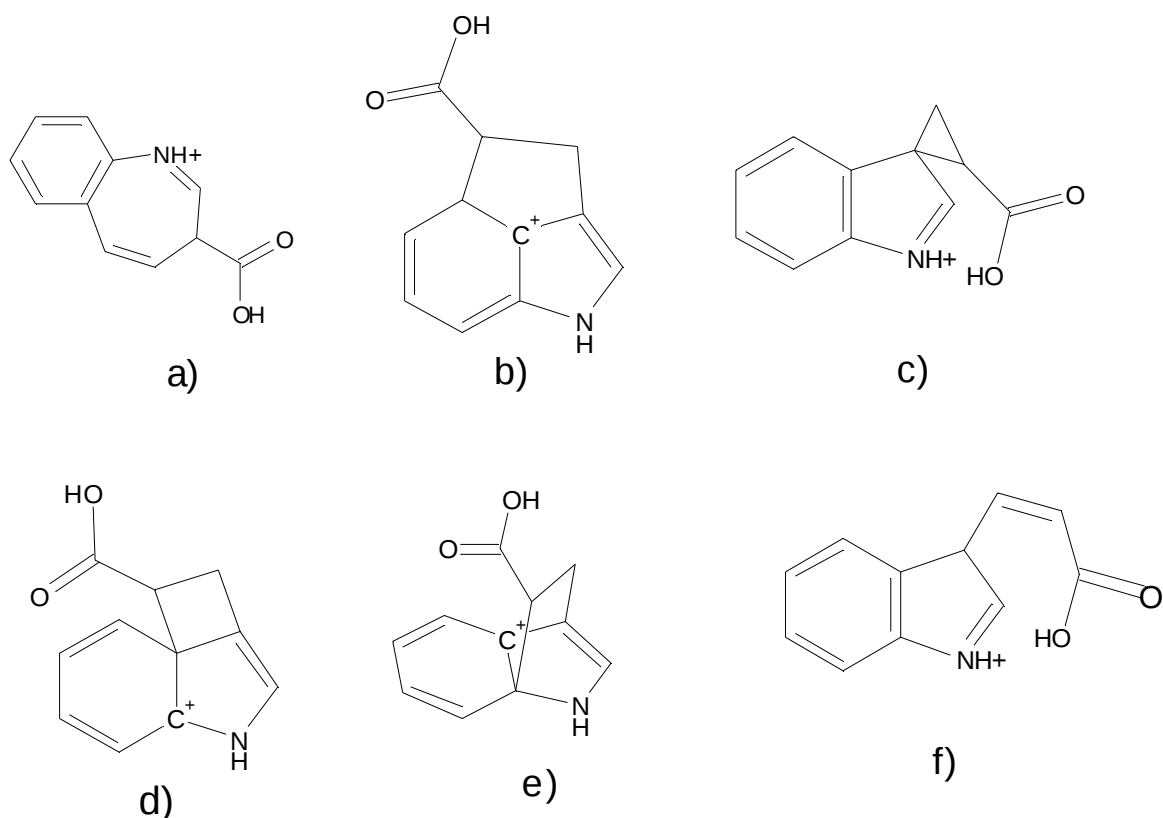


Abb. 4.8: Mögliche Strukturen nach der Abspaltung von Ammoniak. Sie entstehen vermutlich durch einen intramolekularen Angriff auf das α -C-Atom des Tryptophans von verschiedenen Stellen des Indolrings oder durch eine andere komplexe Umlagerung.

Nach dem Vergleich der verschiedenen Summenformeln ist die Abspaltung der Ketengruppe die wahrscheinlichste Ursache für die Entstehung des Fragmentes $m/z = 146$ Da. Daraus kann man auch schließen, dass die Struktur des Fragmentes $m/z = 188$ Da wahrscheinlich der Struktur c) aus Abb. 4.8 ähnlich ist. Da mit ihr weniger Energie als bei anderen Strukturen gebraucht wird, um das Neutralefragment von Keten zu erzeugen.

	<u>Total Energie (Hartree)</u> B3LYP/6-31G*	ZPVE	Relative Energie (kcal/mol)
a)	-630,130581	0,188585	10,1
b)	-630,115783	0,188732	19,5
c)	-630,146511	0,188382	0,0
d)	-630,080520	0,187308	40,7
e)	-629,993912	0,185989	94,40

Tabelle 2: Nach B3LYP/6-31G* berechnete Totalenergie und die Nullpunkts-Schwingungsenergie für verschiedene Isomere des Ions $[M + H - NH_3]^+$ [94].

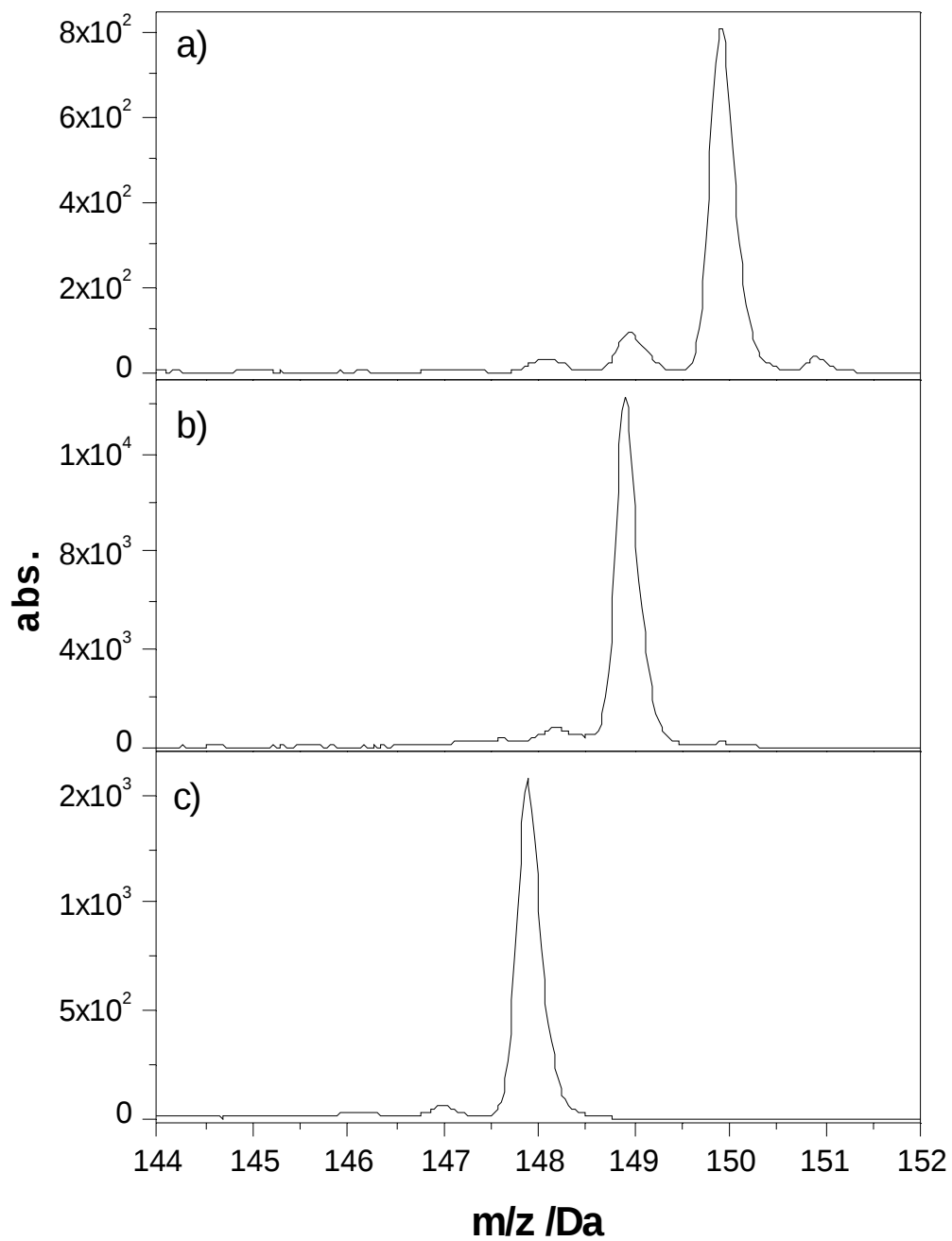


Abb. 4.9: CID-Spektren des deuterierten bzw. partiell deuterierten Tryptophans: Abspaltung eines Neutral-Fragmentes der Masse 42 aus $m/z = 192$ Da a), aus $m/z = 191$ Da b) und aus $m/z = 190$ Da c)

4.1.3. Photofragmentierung von Tryptophan mit Nanosekunden-Lasern

4.1.3.1. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 285 nm

In Abb. 4.10 sind jeweils die photoinduzierten Fragmentierungsmassenspektren des protonierten Tryptophans mit zwei Laserschüssen gezeigt. Eingestrahlt wurde mit UV-Licht der Wellenlänge 285 nm und einer Energie von 1 mJ/Puls. Diese Wellenlänge ermöglicht eine Anregung des Trp am Beginn der elektronischen Bande, so dass nur eine minimale Schwingungsenergie im angeregten elektronischen Zustand vorhanden ist. Durch die Einkopplung einer Energie von Dabei entsteht ein reichhaltigeres Fragmentspektrum im Vergleich zu den CID-Massenspektren. Die Massen $m/z = 204$ Da, $m/z = 188$ Da, $m/z = 170$ Da, $m/z = 159$ Da, $m/z = 146$ Da, $m/z = 132$ Da und $m/z = 130$ Da werden beobachtet.

Das Ionenensemble der massenselektierten Trp-Moleküle kann in der Paul-Falle örtlich für mehr als eine Sekunde gespeichert werden, um es mit Laserlicht wiederholt zu beschießen. Dadurch kann das Mutterion praktisch vollständig fragmentiert werden. Da sichergestellt werden muss, dass keine Laserschüsse während der Massenanalyse in die Paul-Falle kommen, wurde ein Unterbrecher (shutter) zwischen den Laser und das Fenster des ESI-MS eingebaut, der den Laserstrahl während dieser Zeit abblockt (siehe Abb. 3.1). Die Einstellung des Unterbrechers wird so vorgenommen, dass mindestens 2 Schüsse pro Zyklus in die Falle gelangen.

Bei protonierten Peptiden handelt sich um Systeme mit geschlossener Elektronenschale und deshalb sollten auch die Fragmente eine geschlossene Elektronenschale besitzen. Das mit einem Nanosekundenlaser bestrahlte protonierte Tryptophan zeigt jedoch zu einem geringen Prozentsatz auch einen radikalischen Fragmentationspfad. Wie man in Abb. 4.11 erkennen kann, wird ein H-Atom durch Photoanregung von protoniertem Tryptophan abgespalten, was dadurch zu einem Radikalkation des Tryptophans $[\text{Trp}]^{+\bullet}$ mit einer Masse von 204 Da [96] wird.

Zu der Abspaltung des Wasserstoffatoms kommt es vermutlich durch einen Ladungstransfer-Zustand. Durch die Absorption des Photons wird in einen $\pi\pi^*$ -Zustand, der im Indolring lokalisiert ist. Das Elektron kann mit der positiven Ladung am protonierten Stickstoff zu einem $\pi\sigma^*$ -Zustand rekombinieren. Die positive Ladung wandert dadurch in den Indolring und wird dort delokalisiert. Der Transfer des Elektrons führt in einen dissoziativen Kanal, der die Abspaltung des Wasserstoffatoms verursacht [96].

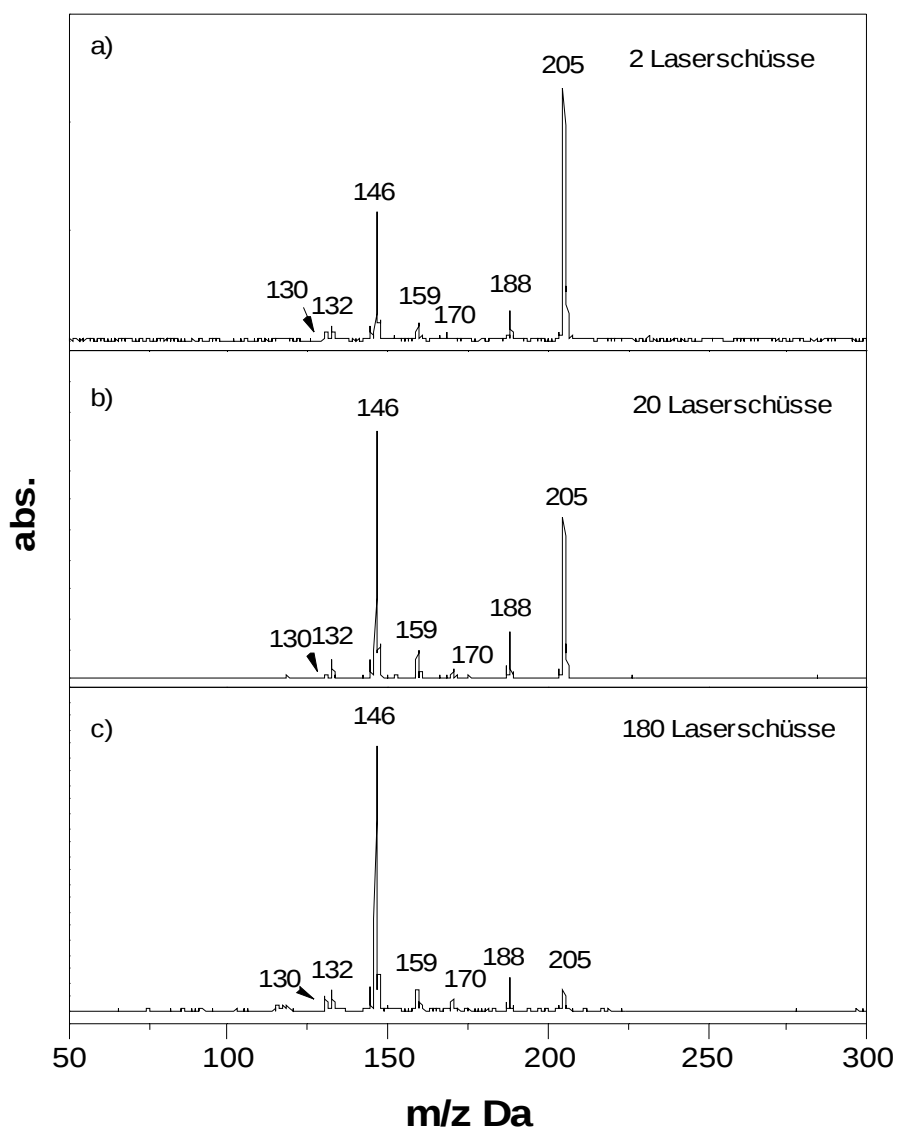


Abb. 4.10: Photofragmentierung von protoniertem Tryptophan. Dasselbe Ionenensemble wurde mit 1 mJ Pulsenergie bei $\lambda = 285$ nm angeregt. Es wurde jeweils. a) mit 2 Laserschüssen, b) mit 20 Laserschüssen und c) mit 180 Laserschüssen dissoziiert. Dabei wird das Molekülion fast vollständig zur Masse 146 umgesetzt. Die Masse 146 reichert sich an was nur so erklärt werden kann, dass die Masse 146 nicht bei $\lambda = 285$ nm absorbiert.

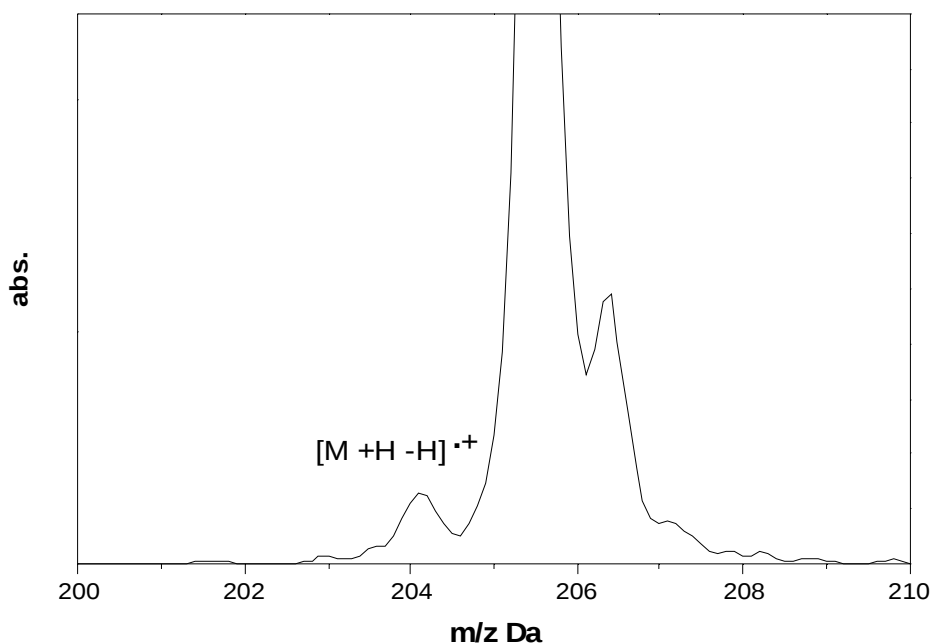
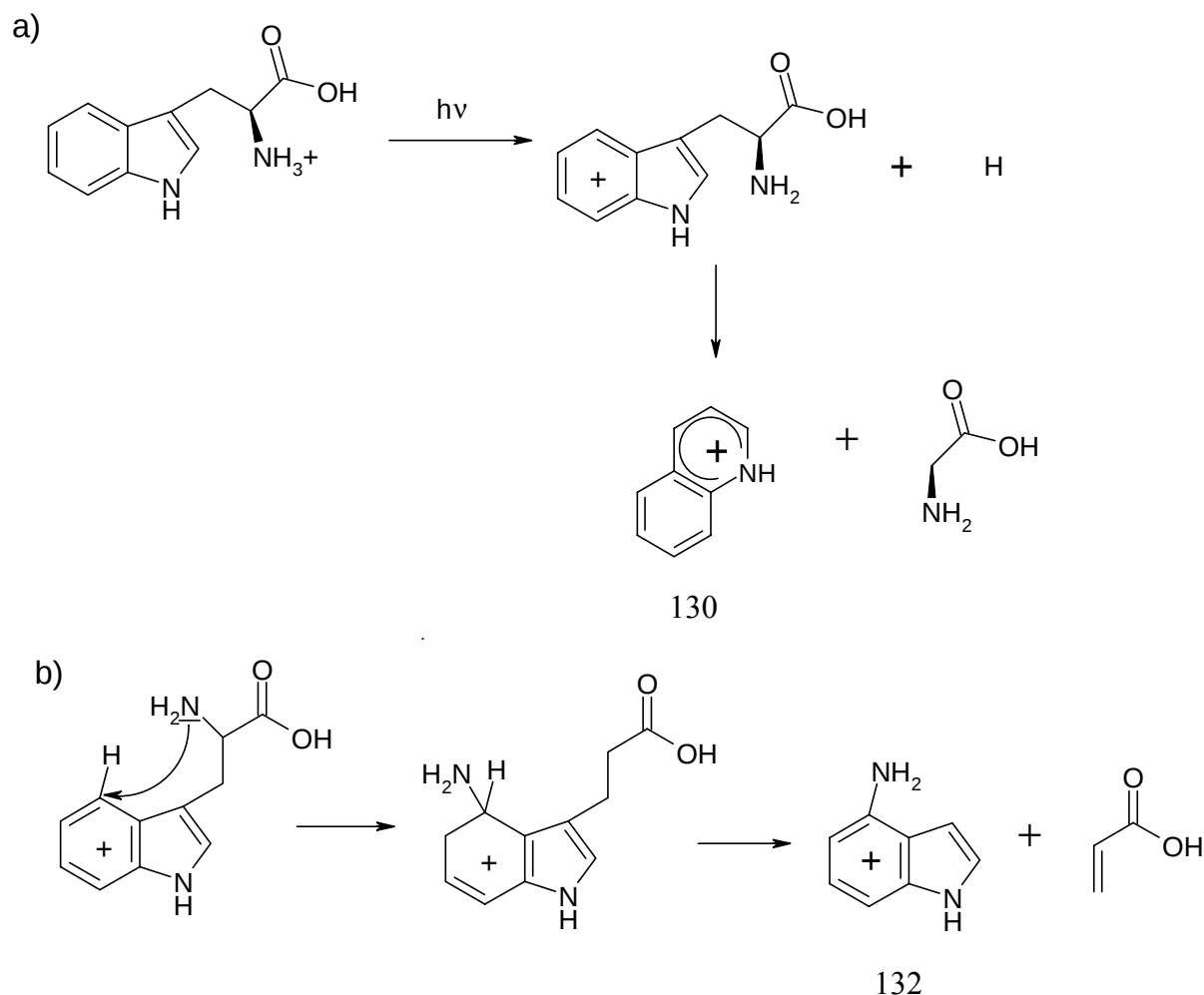


Abb. 4.11: Ausschnitt von Abb. 4.10 b). Man sieht ein photoinduziertes Fragment $m/z = 204$ (radikalische H-Abspaltung) jedoch mit geringerer Intensität.

Die Absorption des Radikalkations $[\text{Trp}]^{\cdot+}$ ist in den sichtbaren Bereich verschoben [97]. Durch Absorption eines weiteren Photons kann das Radikalkation weiter fragmentiert werden. Dabei werden die Fragmente $m/z = 132$ Da und $m/z = 130$ Da gebildet.

Die Masse von $m/z = 130$ Da, ein Radikal, stellt das Hauptfragment sowohl bei der Elektronenstoßionisation, als auch bei der Photoionisation [98, 99] von neutralen Trp-Molekülen, also der Radikalkationenbildung des Muttermoleküls. Das Auftreten dieses Fragments im Spektrum des protonierten Trp unterstützt den Vorschlag einer Radikalbildung durch die Abspaltung von H. Auch bei der Photodissoziation von Trp-hältigen Peptidkationen [100] ist es das Fragment mit der höchsten relativen Intensität. In Falle der Photodissoziation von Trp-H^+ wird es nach der H-Abspaltung aus dem $\text{Trp}^{\cdot+}$ wahrscheinlich durch die Spaltung der α -C- und β -C-Bindung erzeugt (siehe Gl. 7a). Das Fragment $m/z = 132$ Da entsteht durch eine intramolekulare nukleophile Substitution an $[\text{Trp}]^{\cdot+}$ (siehe Gl. 7 b). Die Fragmente $m/z = 188$ Da, $m/z = 170$ Da und $m/z = 146$ Da sind geschlossen-schalige Fragmentationen die auch in den CID-Massenspektren beobachtet wurden (siehe Abb. 4.6). Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei beiden Methoden um den gleichen Fragmentierungsmechanismus handelt. Das Fragment $m/z = 188$ Da entsteht durch die

Abspaltung der NH_3 -Gruppe und daraus werden die Fragmente $m/z = 170$ Da und $m/z = 146$ Da gewonnen. Bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung wird die Energie durch Stöße ständig nachgeführt wobei allerdings etwa nur alle 100 ns bis $1\mu\text{s}$ ein Stoß erfolgt. Dadurch wird bei der Fragmentierung nur der Kanal angesprochen, der die niedrigste Energie benötigt. Damit ist nahe liegend, dass die Fragmentierung zu $m/z = 170$ Da und 146 Da in zwei Stufen abläuft.



Reaktionsgleichung 7: Mögliche Mechanismen der Fragmentierung des Radikalkations des Tryptophans. a) zum Fragment m/z 130 Da b) zum Fragment m/z 132 Da.

Bei der Photofragmentierung wird die gesamte Energie auf einmal in das Molekül eingebracht. Dadurch können auch Kanäle effizient angesprochen werden, die viel Energie benötigen, und es ergeben sich daraus andere Wege für die Fragmentierung. Darüber hinaus kann es auch zu einer direkten Fragmentierungen aus angeregten elektronischen Zuständen kommen. Der H-Verlustkanal steht wie oben erwähnt im Verdacht ein solcher zu sein.

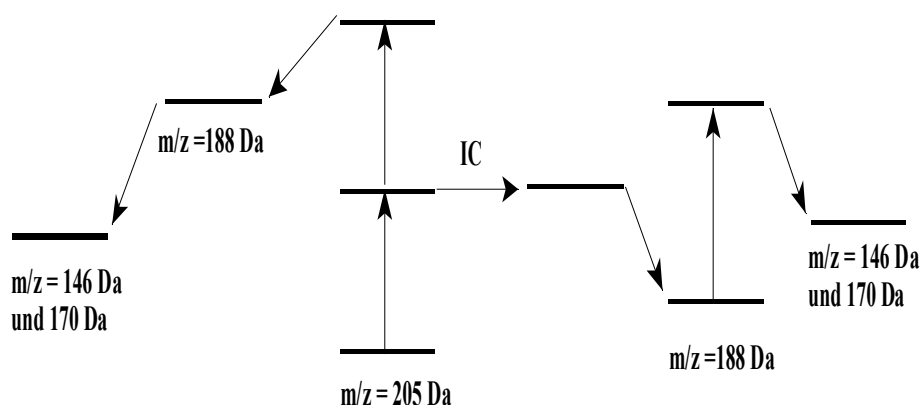


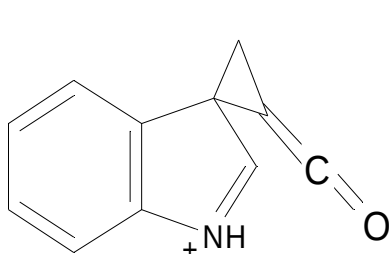
Abb. 4.12: Schematische Darstellung von verschiedenen Fragmentierungswegen für die Fragmente $m/z = 188$ Da und $m/z = 146$ Da. Das Fragment $m/z = 188$ Da kann direkt durch einen Einphotonenschritt erzeugt werden. Das Fragment $m/z = 146$ Da kann durch einen Zweiphotonenschritt nach Fragmentierung von Masse 188 noch mal fragmentiert werden oder durch zwei Einphotonenschritte gebildet werden.

Die mittlere Bindungsenthalpie beträgt für eine C-C-Bindung 348 kJ/mol ($\equiv 3,6$ eV) und für eine C-N-Bindung 292 kJ/mol ($\equiv 3,0$ eV) [101]. Die Energie eines Photons bei der Wellenlänge $\lambda = 285$ nm beträgt $E = 4,35$ eV. Um das Fragment $m/z = 146$ Da zu bilden, müssen mehrere Bindungen aufgebrochen werden. Also reicht ein Einphotonenschritt nicht für mehrere Bindungsbrüche und eine Umlagerung. Dazu muss mehr Energie zugeführt werden. In Abb. 4.12 werden einige Fragmentierungswege vorgestellt. Es ist jedoch möglich, dass das Fragment $m/z = 146$ Da durch einen Zweiphotonenschritt oder zwei aufeinander folgende Einphotonenschritte vermutlich aus zwei Laserschüssen gebildet wird. Bei Erhöhung der Anzahl der Laserschüsse treten keine weiteren Fragmente auf. Lediglich die Intensität des Signals der Masse $m/z = 146$ wird höher. Daraus kann man erkennen, dass das Fragment $m/z = 146$ nicht bei $\lambda = 285$ nm absorbiert.

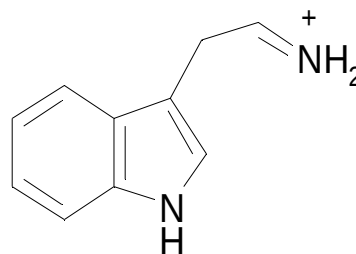
Theoretisch könnte das Fragment $m/z = 188$ Da direkt nach einem Laserschuss durch die Abspaltung von NH_3 gebildet werden. Bei Erhöhung der Anzahl der Laser-Schüsse wird die Intensität jedoch nicht höher.

Das Fragment $m/z = 188$ Da absorbiert offensichtlich während der folgenden Laserschüsse ein weiteres Photon und fragmentiert dann weiter. Dabei ist nicht eindeutig, welche Fragmentierungswege des protonierten Tryptophans zu den Fragmenten $m/z = 146$ Da und

170 Da führen, ob es zwei Einphotonschritte oder ein Zweiphotonenschritt (vermutlich nach einem IC, da der angeregte Zustand in Trp kurzlebig ist [96].



$m/z = 170$



$m/z = 159$

Abb. 4.13: Mögliche Strukturen der Fragmente $m/z = 170$ Da und $m/z = 159$ Da. Die Masse 170 (Keten) entsteht durch Abspaltung eines H_2O -Moleküls vom Fragment $m/z = 188$ Da. Das Immuonium-Ion hat das m/z -Verhältnis 159 Da und entsteht nach Abspaltung von CO und H_2O aus protoniertem Tryptophan.

Im Photofragmentierungsspektrum in Abb. 4.10 ist noch ein weiteres bisher unbekanntes Fragment mit der Masse $m/z = 159$ Da zu sehen. Die mögliche Struktur davon ist in Abb. 4.13 dargestellt. Dieses Fragment kann offensichtlich auch nur durch die höhere Energie bei der Photoanregung entstehen, da es bei CID nicht beobachtet wird. Das Fragment, das Immuonium-Ion genannt wird, entsteht direkt durch die Abspaltung von H_2O und CO vom protoniertem Tryptophan. Die Aktivierungsenergie dieses Prozesses liegt beim protonierten Tryptophan nach quantenmechanischen Rechnungen 26,7 kcal/mol unter der Aktivierungsenergie für die Ammoniakabspaltung [83]. Dies steht im Einklang damit, dass dieser Fragmentierungskanal auch sehr häufig bei protonierten Aminosäuren in CID-Spektren beobachtet wird, die Ammoniakabspaltung aber nicht. Bei der Photofragmentierung wird die hohe Energie in einem Schritt zugeführt und es können beide Fragmentierungskanäle beobachtet werden.

4.1.3.2. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 226 nm

In Abb. 4.14 ist das photoinduzierte Fragmentierungsmassenspektrum vom protonierten Tryptophan mit 3 Laserschüssen gezeigt. Eingestrahlt wurde UV-Licht der Wellenlänge 266 nm mit 2 mJ/Puls. Mit dieser Wellenlänge regt man im ersten angeregten elektronischen Zustand bereits hohe Schwingungsenergien an, bzw. kann vielleicht sogar den zweiten elektronisch angeregten Zustand anregen.

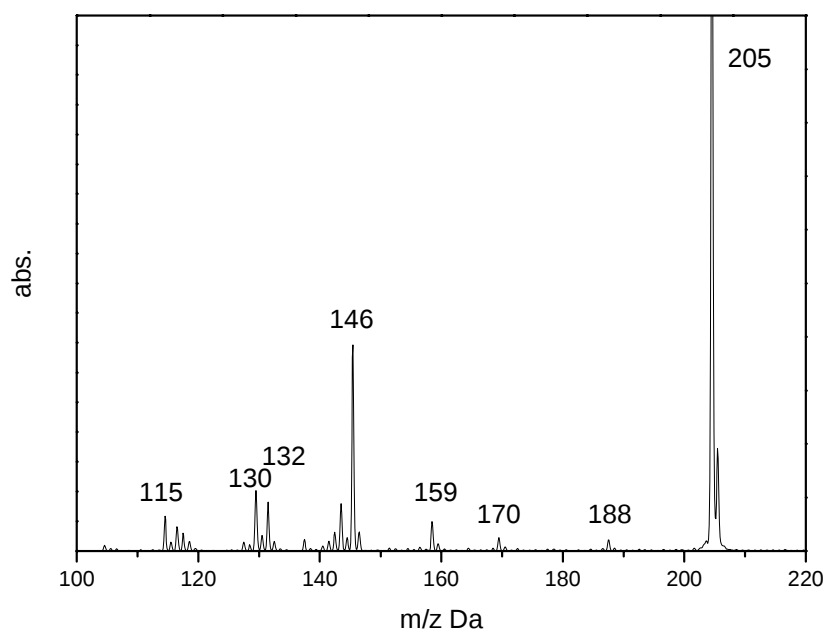


Abb. 4.14: Das photoinduzierte Fragmentierungsspektrum von protoniertem Tryptophan bei der Wellenlänge 266 nm. Die Pulsenergie betrug 2 mJ pro Puls. Bei 266 nm entspricht ein Photon einer Energie von 4,66 eV.

Als Hauptfragment entsteht wie bei 285 nm die Masse von $m/z = 146$ Da. Außerdem bilden sich noch Fragmente wie z.B. $m/z = 204$ Da, 188 Da, 170 Da, 159 Da, 132 Da und 130 Da, die bereits aus der Fragmentierung bei 285 nm bekannt sind. Der H-Verlustkanal ist sehr klein wie bei der Anregung mit 286 nm.

Im Vergleich zur Photofragmentierung bei 285 nm wird sich hier ein neues Fragment mit der Masse von $m/z = 115$ Da gebildet, das durch eine weitere Abspaltung der NH_3 -Gruppe aus dem Fragment $m/z = 132$ Da entsteht.

4.1.3.3. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 213,5 nm

Bei 213,5 nm kann die Absorption in hohe $\pi\pi^*$ Übergänge erfolgen oder auch nicht-aromatische Bereiche der Aminosäure anregen. Es könnten dadurch neue, bisher unbekannte Fragmente entstehen. Wie im photoinduzierten Massenspektrum vom protonierten Tryptophan bei 213,5 nm (siehe Abb. 4.15) zu sehen ist, entsteht als Hauptfragment $m/z = 130$ Da, ein Radikalkation wie bereits oben beschrieben. Gleichzeitig werden auch andere Fragment-Radikalkationen wie z.B. die Masse $m/z = 204$ Da und 132 Da beobachtet. Die Masse $m/z = 146$ Da ist das gut-bekannte Fragment des protonierten Trp. Mit geringerer Intensität werden auch andere geschlossen-schalige Trp-Fragmente wie $m/z = 188$ Da, 170 Da und 159 Da beobachtet.

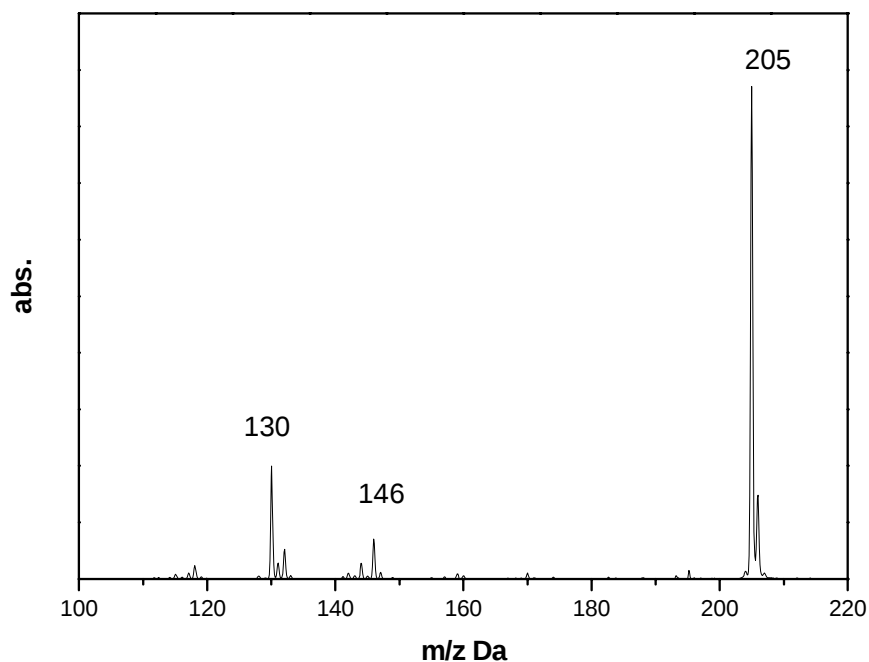


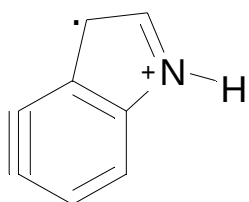
Abb. 4.15: Photofragmentierungsmassenspektrum des protonierten Tryptophan angeregt mit der Wellenlänge 213,5 nm und einer Pulsenergie von 2mJ/ Puls (ein Schuss). Bei einer Wellenlänge von 213,5 nm entspricht ein Photon einer Energie von 5,8 eV. Man beachte das starke Auftreten der Masse 130 Da, ein Radikal-Fragment.

4.1.4. Photofragmentierung von Tryptophan mit fs-IR-Laserpulsen

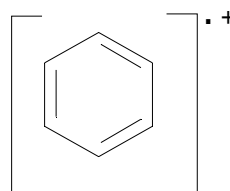
Die Kurzzeitanregung mit IR-fs-Laserpulsen hoher Intensität erfolgt zum Teil nicht-resonant und zum Teil resonant. Nach Besetzung des S_1 wird die Photoabsorption vermutlich erst durch das Ende des Laserpulses gestoppt. Da sich diese Anregung deutlich von den ns-UV-Experimenten unterscheidet ergibt sich erneut eine Chance bisher nicht beobachtete Fragmente zu finden.

In Abb. 4.17 b) ist das Photofragmentierungsmassenspektrum von protoniertem Trp das mit einem Femtosekunden-Laser aufgenommen wurde gezeigt. Die experimentellen Bedingungen waren wie folgt: $\lambda=800$ nm, ca. 300 $\mu\text{J}/\text{Puls}$, 500 Schüsse pro Messzyklus.

Die Photofragmentierung mit einem Femtosekunden-Laser bei einer Wellenlänge 800 nm bedarf mindestens einer nicht-resonanten Dreiphotonenanregung zum S_1 . Vermutlich können von S_1 aus jedoch während des gleichen Laserpulses weitere Photonen resonant in höhere elektronische Zustände absorbiert werden. Wegen der hohen Laserintensität können zudem auch Fragmente, die in einer vorangegangenen Anregung entstanden sind, durch nachfolgende Laserpulse weiter angeregt werden.



115



78

Abb. 4.16: Mögliche Struktur der Fragmente $m/z = 115$ Da und 78 Da.

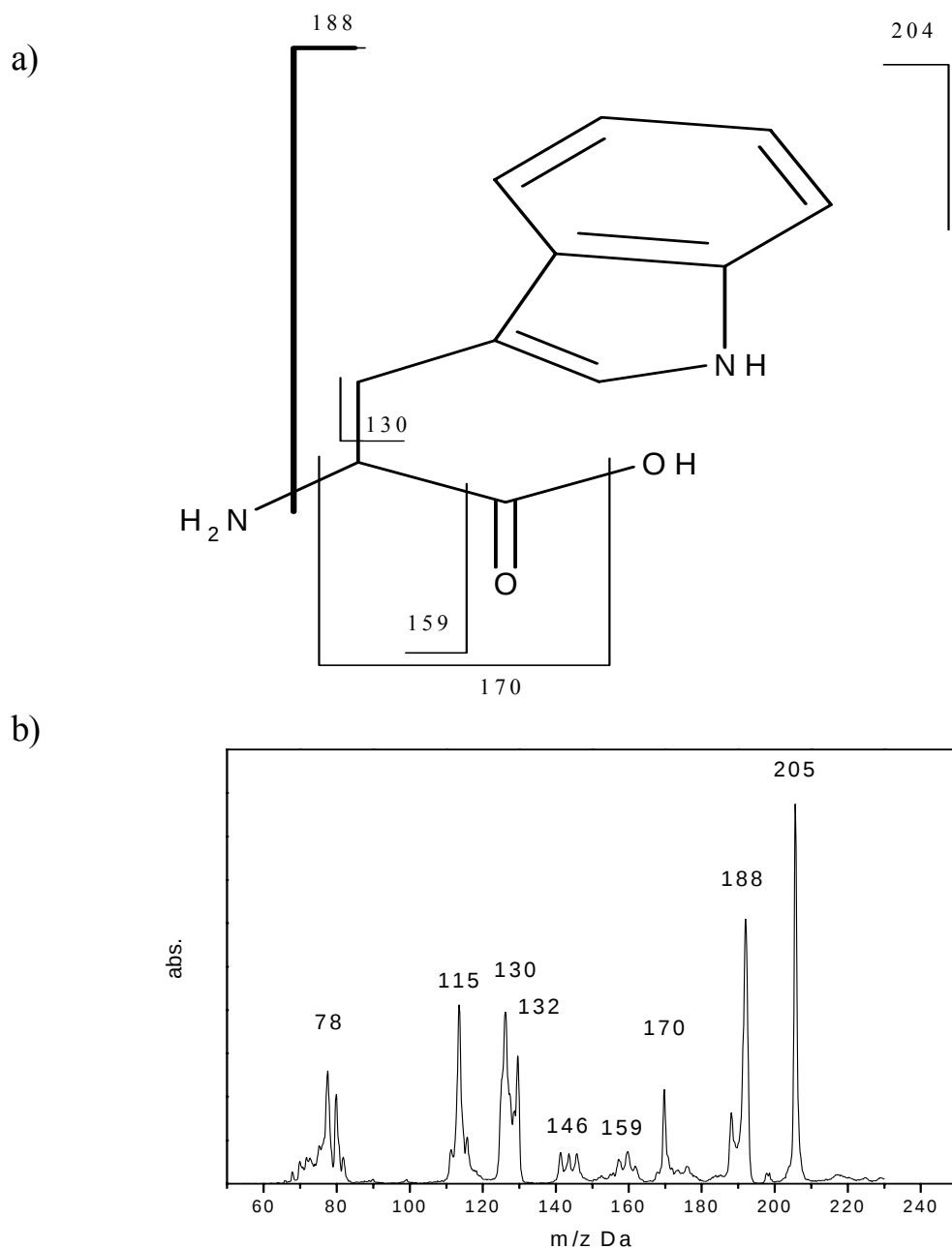


Abb. 4.17: a) Mögliche Fragmentierungsmuster von protoniertem Tryptophan nach fs-Multi-Photonanregung. b) Photofragmentierungs-Massenspektrum von protoniertem Tryptophan angeregt mit fs-IR-Laserpulsen (Pulslänge 27 fs, 800 nm, 300 μJ /Puls).

Im Vergleich zur Photofragmentierung mit Nanosekunden-Laserpulsen bilden sich bei einer fs-Multiphoton-Anregung hier zwei neue Fragmente mit den Massen 115 Da und 78 Da. Als Hauptfragment entsteht die Masse 188 Da. Außerdem werden wieder die Fragmente 204 Da, 170 Da, 159 Da, 146 Da, 132 Da und 130 Da zum Teil mit sehr hohen Intensitäten beobachtet.

Das Fragment $m/z = 115$ Da entsteht durch die Abspaltung der NH_3 -Gruppe aus dem Fragment $m/z = 132$ Da vermutlich durch das Absorbieren eines weiteren Photons aus einem nachfolgenden Laserschuss. Die mögliche Struktur ist in Abb. 4.16 gezeigt. Offensichtlich ist die durch den fs-Laser eingekoppelte Energie ausreichend, um den Indolring zu öffnen und dadurch das Fragment $m/z = 78$ Da zu bilden.

4.2. Protoniertes NH_2 -Leucin-Tryptophan-OH (NH_2 -Leu-Trp-OH)

NH_2 -Leucin-Tryptophan-OH wird aus Leucin und Tryptophan nach der Abspaltung eines Wassermoleküls aufgebaut. Im NH_2 -Leu-Trp-OH gibt es zwei mögliche Positionen für die Protonierung. Zum einen kann wie beim Trp die Aminogruppe protoniert werden, zum anderen kann das Proton an die Amidgruppe gebunden werden.

In Abb. 4.18 wird ein ESI-MS von protoniertem NH_2 -Leu-Trp-OH gezeigt. Es beinhaltet drei Massensignale. Das intensivste Signal ist das Mutterion $[\text{M} + \text{H}]^+$. Außerdem kann man das protonierte Dimer $[\text{M}_2 + \text{H}]^+$ und ein Fragment bei $m/z = 205$ Da (Trp-H^+) finden, das durch die Abspaltung des Moleküls Leucin vom Mutterion entsteht.

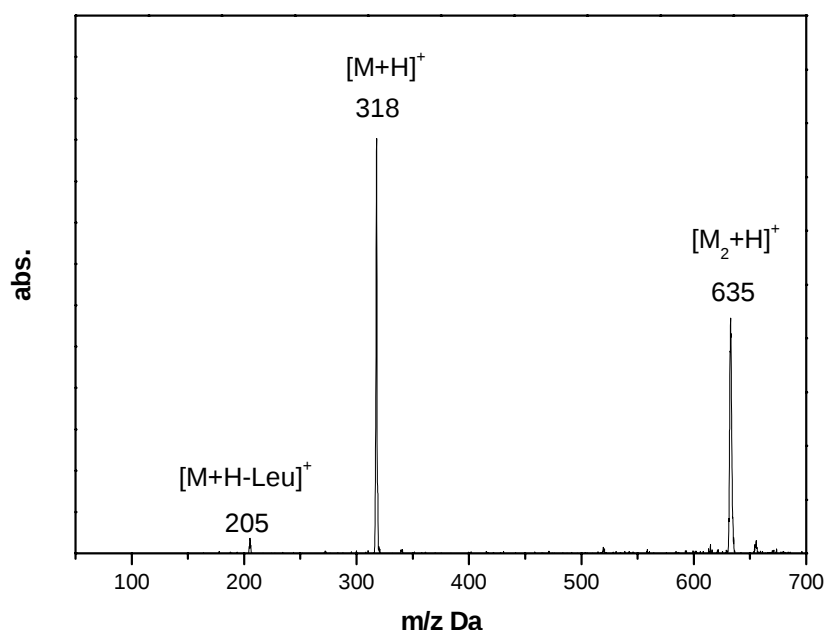


Abb. 4.18: ESI-MS von protoniertem NH_2 -Leu-Trp-OH ($M_r = 317$ g/mol). Es sind das Mutter-Ion $[\text{M} + \text{H}]^+$, das protonierte Dimer $[\text{M}_2 + \text{H}]^+$ und das Fragmentation bei 205 Da $[\text{M} + \text{H} - \text{Leu}]^+$ zu sehen.

Genau wie beim protonierten Tryptophan entsteht während der Ionisierung hauptsächlich das protonierte Dimer. Um im ESI einen hohen Anteil von Mutterion zu erzeugen, müssen die Skimmerspannungen so eingestellt werden, dass die Dimere durch Stöße teilweise, aber die Monomere jedoch nicht vollständig zu Trp (205 Da) fragmentieren.

4.2.1. Kollisionsinduzierte Fragmentierung von protoniertem NH₂-Leu-Trp-OH

Die Fragmentierung der meisten Aminosäuren folgt durch die aufeinander folgende Abspaltung von H₂O und CO. Dabei wird das Immoniumion $[RHC = NH_2]^+$ gebildet [102, 103, 104]. Da nach quantenchemischen Rechnung die Energie für die Ammoniakabspaltung bei den Aminosäuren mit Heteroatomen in den Seitenketten unter der Energie für die Abspaltung der Carboxylgruppe liegt [94], wird zum Beispiel bei der Fragmentierung von Tryptophan zuerst Ammoniak abgespalten. Kombinieren die Aminosäuren mit Heteroatom in der Seitenkette und ohne Heteroatom in der Seitenkette zu einem Peptid, so sind beide Fragmentierungskanäle möglich. Welchem Fragmentierungspfad die Dipeptide oder Oligopeptide folgen, hängt dann von der Position der Aminosäure mit einem Heteroatom in der Seitenkette in der Peptidsequenz ab. Beim N-terminalen Trp wird zum Beispiel zuerst der Verlust vom Ammoniak beobachtet während bei C-termialem Trp erst die Carboxylgruppe abgespalten wird.

Wie Abb. 4.19 b) zeigt, ist das intensivste Signal bei CID das Fragment 205 Da, das durch die Abspaltung vom Leucin entsteht. Dieses Trp-H⁺ Fragment wird auch nach Roepstorff und Fohlmann'scher Nomenklatur Y₁-Fragment oder auch C-terminales Fragment genannt. Die Fragmentkanäle 300 Da, 272 Da und 188 Da sind deutlich schwächer aber noch signifikant.

Beim CID von protoniertem NH₂-Leu-Trp-OH gibt es offensichtlich zwei verschiedene Fragmentierungspfade. Wie bei der Mehrheit der α -Aminosäuren wird H₂O und CO abgespalten [105, 106, 107], wobei sich die Massen $m/z = 300$ Da und 272 Da (siehe Abb. 4.20) bilden. Beim zweiten Fragmentierungsweg werden Tryptophan und dessen Fragment mit der Masse 188 Da gebildet.

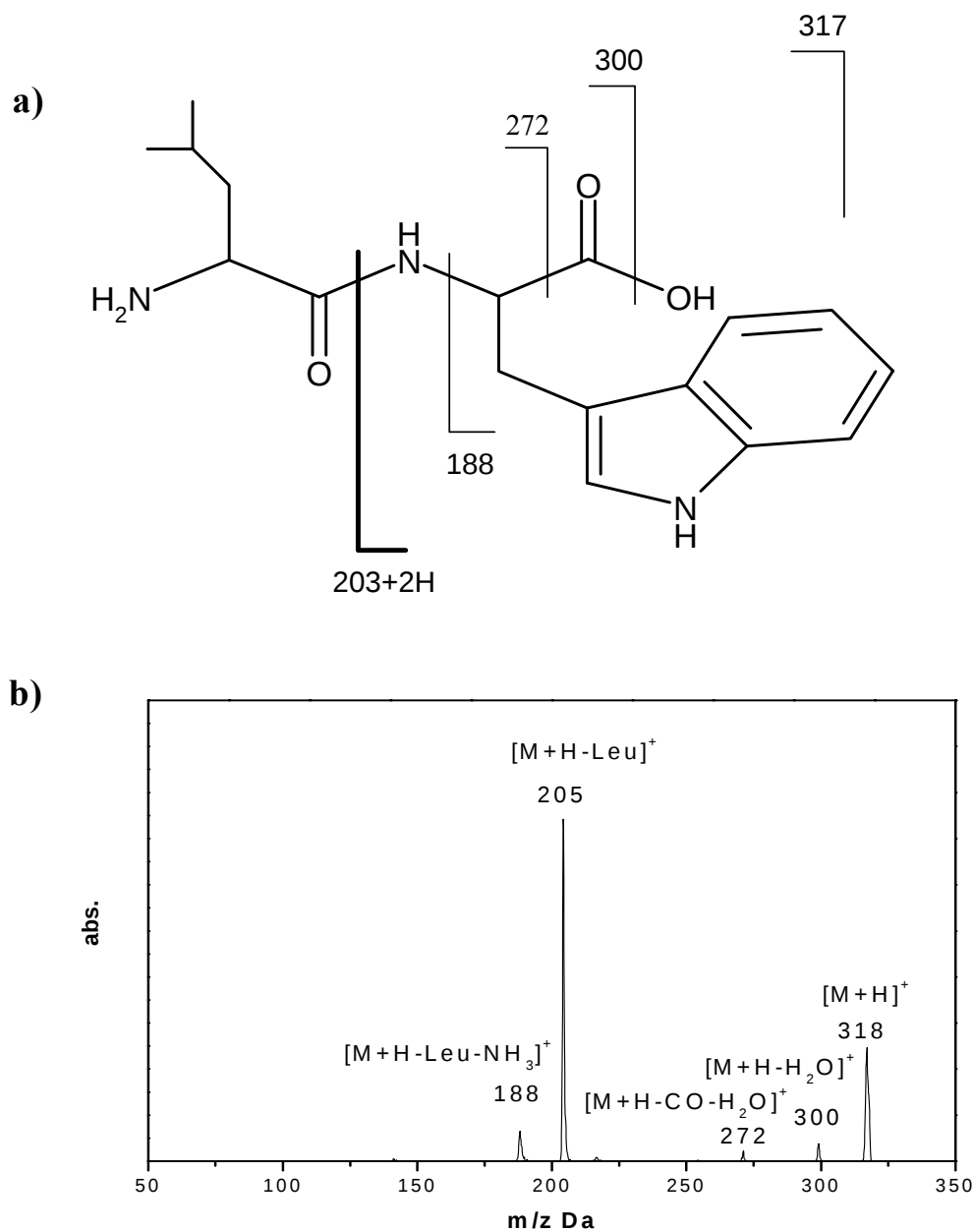
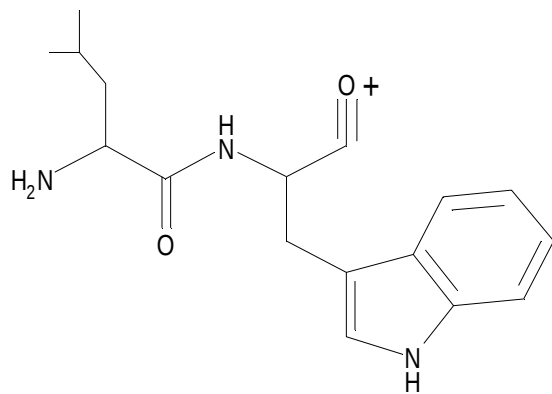
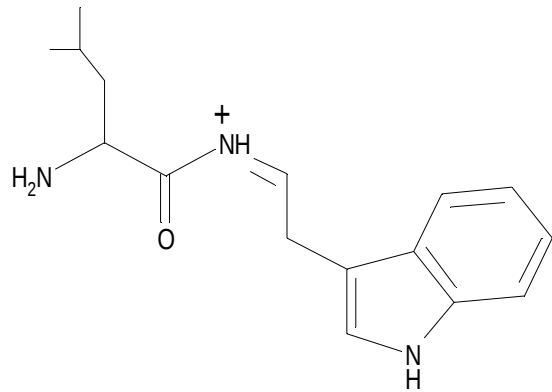


Abb. 4.19: a) Struktur und CID-Fragmentierungsmuster von protoniertem NH_2 -Leu-Trp-OH. b) CID-MS/MS-Spektrum von massen-isoliertem protoniertem NH_2 -Leu-Trp-OH. Das intensivste Fragmentensignal ist $[M + H - \text{Leu}]^+$, die weniger intensiven Fragmentensignale sind $[M + H - \text{H}_2\text{O}]^+$, $[M + H - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}]^+$ und $[M + H - \text{Leu} - \text{NH}_3]^+$. Daraus kann man schließen, dass die Ladung nach der Fragmentierung auf der Seite des aromatischen Chromophors verbleibt.



$m/z = 300 \text{ Da}$



$m/z = 272 \text{ Da}$

Abb. 4.20: Die mögliche Struktur nach Abspaltung von H_2O ($m/z = 300 \text{ Da}$) bzw. H_2O und CO ($m/z = 272 \text{ Da}$) von protoniertem $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$.

Dies steht im Einklang mit Rechnungen [108] und Beobachtungen [109], dass in kleinen geladenen Peptiden die Ladung am N-Terminus sitzt und zu den polaren aromatischen Chromophoren rückfaltet.

4.2.2. Photofragmentierung von NH₂-Leu-Trp-OH mit UV-Nano-sekunden-Lasern

4.2.2.1. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 285 nm

Bestrahlt man das protonierte NH₂-Leu-Trp-OH mit UV-Licht mit der Wellenlänge von 285 nm, so entstehen mehr Fragmente als bei der CID. Das intensivste Fragment ist wieder das protonierte Trp (205 Da). Die Trp-H⁺-Fragmente $m/z = 146$ Da, 188 Da, 159 Da, 130 Da und 132 Da sind vorhanden, aber sehr schwach. Außerdem werden mit kleinen Intensitäten die Fragmente 204 Da, 170 Da und 300 Da und gebildet (siehe Abb. 4.21).

Beim Vergleich des photoinduzierten Fragmentierungsspektrum von Tryptophan mit dem des Dipeptids NH₂-Leu-Trp-OH fällt auf, dass alle Fragmente, die in dem ersteren vorkommen auch im zweiten zu finden sind. Durch die Abspaltung des Leucins von NH₂-Leu-Trp-OH entsteht offensichtlich das Ion [Trp + H]⁺ als Y₁-Fragment (205 Da), was dann in bekannte Weise weiter photofragmentiert (siehe Kap. 4.1.3.). Daraus kann man schließen, dass sich das Proton in H-Leu-Trp-OH bereits in der Nähe der Peptidbindung befindet, am N-Terminus sitzt und rückgefaltet ist oder noch vor der Fragmentierung zur Amidbindung wandert.

Die Fragmente $m/z = 300$ Da werden, wie es bei den meisten α -Aminosäuren, die keine Heteroatom an der Seitenkette besitzen, der Fall ist durch die Abspaltung von H₂O gebildet.

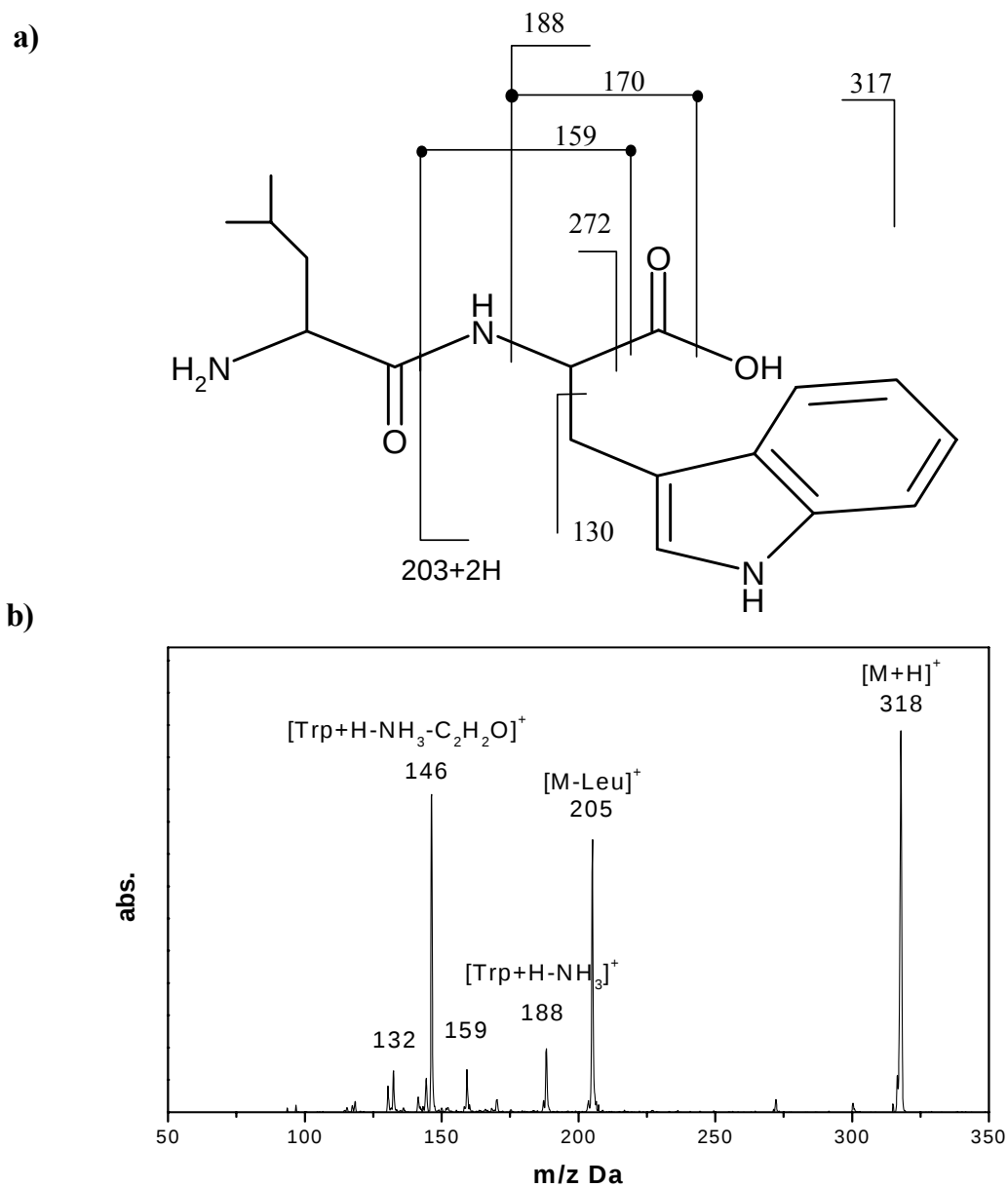


Abb. 4.21: a) Mögliche Fragmentierungsmuster von protoniertem $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$ nach UV ns-Photoanregung bei 285 nm. b) Photoinduzierte Fragmentierung von $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$ nach 180 Laserschüssen. Die Laser-Pulsenergie betrug 500 μJ bei 285 nm.

4.2.2.2. Photofragmentierung bei der Wellenlänge 266 nm

Die Photofragmentierung von $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$ bei 266 nm (siehe Abb. 4.22) führt zu einem ähnlichen Ergebnis wie bei Anregung mit 285 nm. Hier entsteht als Hauptfragment ebenfalls die Masse $m/z = 205$ Da. Außerdem werden die üblichen Fragmente des Trps wie die Masse $m/z = 188$ Da, 170 Da, 159 Da, 132 Da, 130 Da und 115 Da beobachtet.

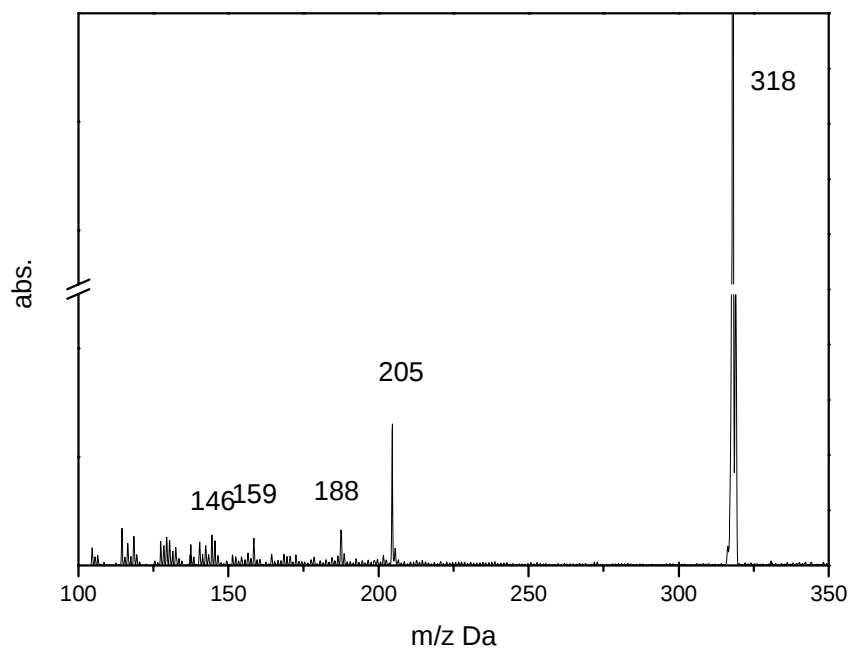


Abb. 4.22: Photofragmentierungsmassenspektrum vom protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$ bei der Wellenlänge von 266 nm. Das in der Paul-Falle isolierte Ionenensemble wurde durch drei Laserschüsse fragmentiert. Die Pulsenergie betrug jeweils 2 mJ. Betrachte Y-Skala ist unterbrochen.

4.2.2.3. Photofragmentierung bei der Wellenlänge 213,5 nm

Im photoinduzierten Dissoziationsmassenspektrum (siehe Abb. 4.23) von $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$ bei 213,5 nm werden die Fragmente von $m/z = 205$ Da, 188 Da und 130 Da beobachtet. Das intensivste Fragment ist die Masse $m/z = 188$ Da. Im Vergleich zur Photofragmentierung bei 285 nm und 266 nm ist das Fragment $m/z = 130$ Da intensiv.

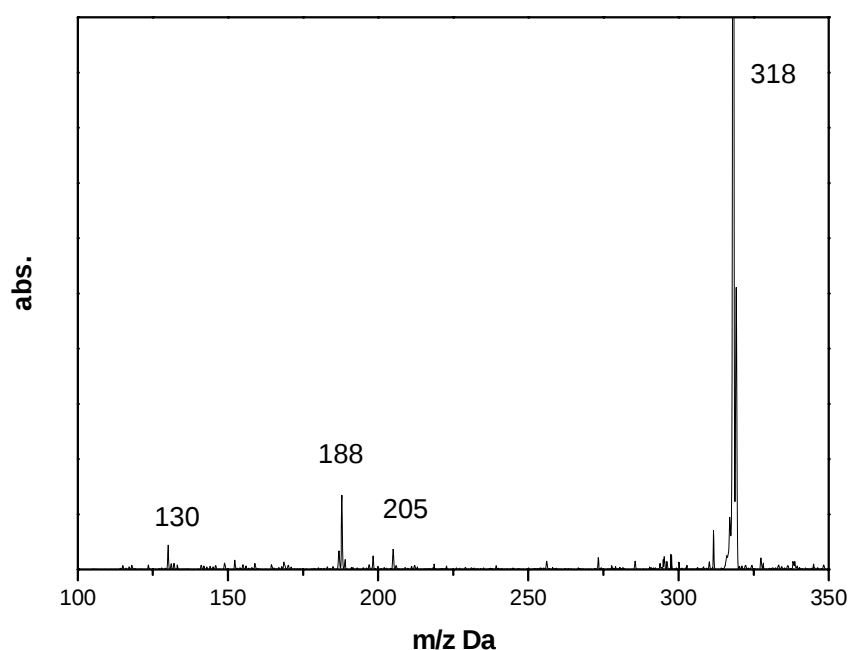


Abb. 4.23: Photoinduziertes Fragmentierungsmassenspektrum vom protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$ mit drei Laserschüssen bei 213,5 nm. Die Pulsenergie betrug jeweils 2 mJ.

4.2.3. Photofragmentierung von $\text{NH}_2\text{-LeuTrp-OH}$ mit fs-IR-Laserpulsen

Die photoinduzierte Fragmentierung von protoniertem $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$ mit dem intensiven IR-fs-Laser liefert dem Massensektrum in Abb. 4.24 b). Alle Fragmente, die in der Photofragmentierung mit UV nanosekunden Laser beobachtet wurden, sind hier auch zu beobachten, jedoch mit anderen Intensitäten. Das intensivste Signal besitzt die Masse 188 Da und ist ein wohlbekanntes Trp-Fragment. Man beobachtet noch zwei intensive Signale mit den Massen 170 Da und 130 Da. Das Fragment 130 Da ist wie mit der Wellenlänge 213,5 nm ns-Laser gebildetes Radikalkation, das mehr Energie zu erzeugen braucht. Das Fragment 170 Da wird durch Abspaltung der H_2O -Gruppe vom Fragment 188 Da gebildet. Dieses Fragment mit fs-IR-Laserpulsen ist im Vergleich mit UV ns-Lasern und CID viel intensiver. Es bedeutet, dass dieser Fragmentierungskanal sehr höher liegt. Die üblichen Fragmente von TrpH^+ werden auch beobachtet.

Außerdem wird ein bisher nicht beobachtetes Fragment mit höherer Intensität die Masse 272 Da gebildet, das durch die Abspaltung von H_2O und CO aus dem protoniertem Mutterion entsteht.

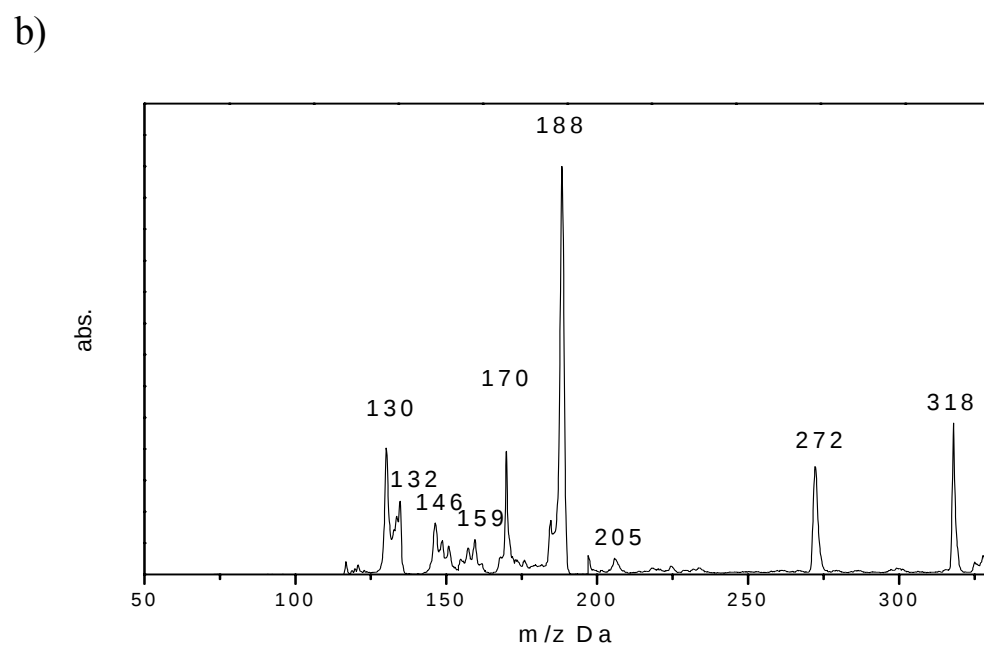
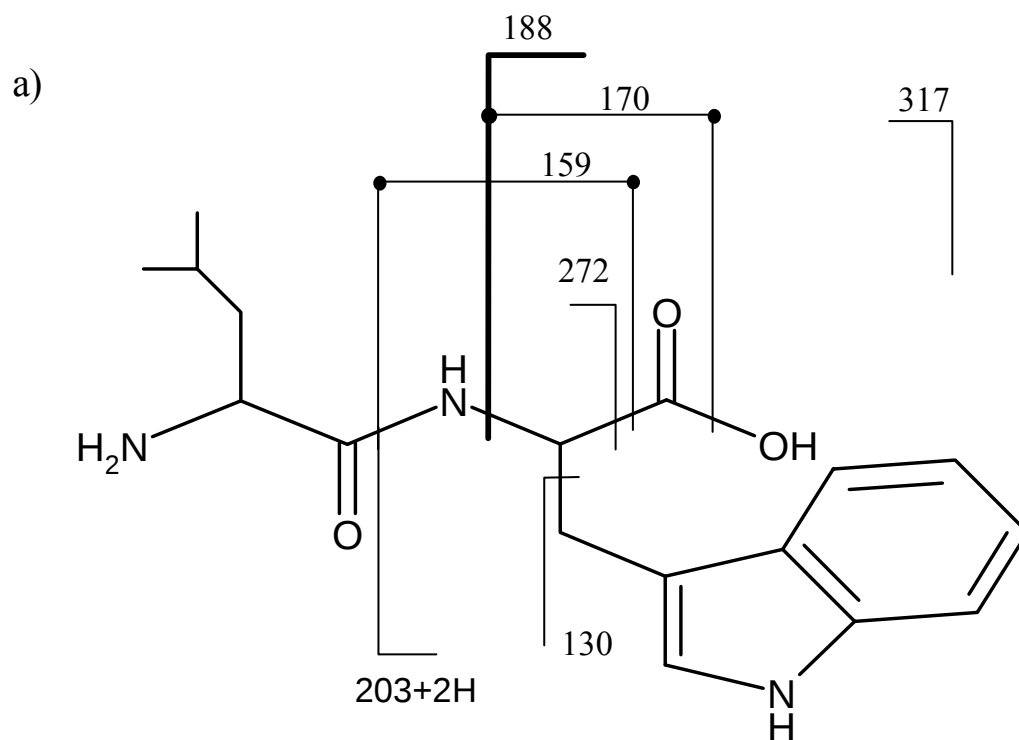


Abb. 4.24: a) Mögliches Fragmentierungsmuster des protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$ nach Photoanregung. b) Photoinduzierte Fragmentierung von protoniertem $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$ nach Anregung mit einem intensiven femtosekündem Laser mit einer Wellenlänge von 800 nm. (300 $\mu\text{J/Puls}$, Pulslänge betrug 27 fs, 500 Schüsse).

4.3. Protoniertes $\text{NH}_2\text{-Leucin}_2\text{-Tryptophan-OH}$ ($\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$)

Durch die Verlängerung der Peptidkette erwartet man naiv, dass sich der Abstand zwischen dem geladenen N-Terminus und dem Chromophor vergrößert und folglich neue Fragmente auftreten. Es könnte jedoch auch sein, dass die Ladung zum Chromophor rücfaltet und sich ähnliche Fragmentierungen wie beim $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$ ergeben

4.3.1. Kollisionsinduzierte Fragmentierung von $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$

Die kollisionsinduzierte Fragmentierung von $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ liefert, wie in Abb. 4.25 b) zu sehen ist, als intensivstes Fragment-Signal das protonierte Trp mit der Masse $m/z = 205$ Da. Außerdem entstehen die Fragmente $m/z = 413$ Da, 318 Da, 277 Da, 199 Da, 188 Da, 159 Da und 146 Da.

Das Fragment $m/z = 205$ Da ist das protonierte Trp, hier das Y_1 -Bruchstück, das durch die Abspaltung von zwei Leucin-Einheiten gebildet wird. Es fragmentiert wie bisher schon beobachtet weiter, wobei sich die Massen $m/z = 188$ Da (Z_1 -Fragment) $m/z = 146$ Da und 159 Da bilden. Im CID-Spektrum von $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ sieht man mit geringerer Intensität noch das Y_2 -Fragment mit $m/z = 318$ Da. Es scheint so, als ob vom protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ erst eine Leucin-Einheit und erst danach die zweite Leucin-Einheit abgespalten werden.

Das Fragment 227 Da ist ein B_2 -Bruchstück (siehe Abb. 4.27a), auch N-terminales Fragment genannt. Es entsteht durch das Spalten der Amidbindung. Man kann daraus schließen, dass das Proton in die Nähe von der Peptidbindung gewandert ist. Dieses Ion wird direkt noch einmal durch Abspaltung eines CO-Moleküls zu der Masse $m/z = 199$ Da fragmentiert. Ein solches Fragment wird auch A_2 -Fragment genannt (siehe Abb. 4.27b).

Das Fragment $m/z = 413$ Da entsteht wie gewöhnlich bei der Fragmentierung von α -Aminosäuren direkt durch die Abspaltung eines H_2O -Moleküls. Die Masse $m/z = 385$ Da hat sehr kleine Intensität. Es handelt sich um das Fragment, das durch Abspaltung eines CO_2 -Moleküls von Mutter-Ion.

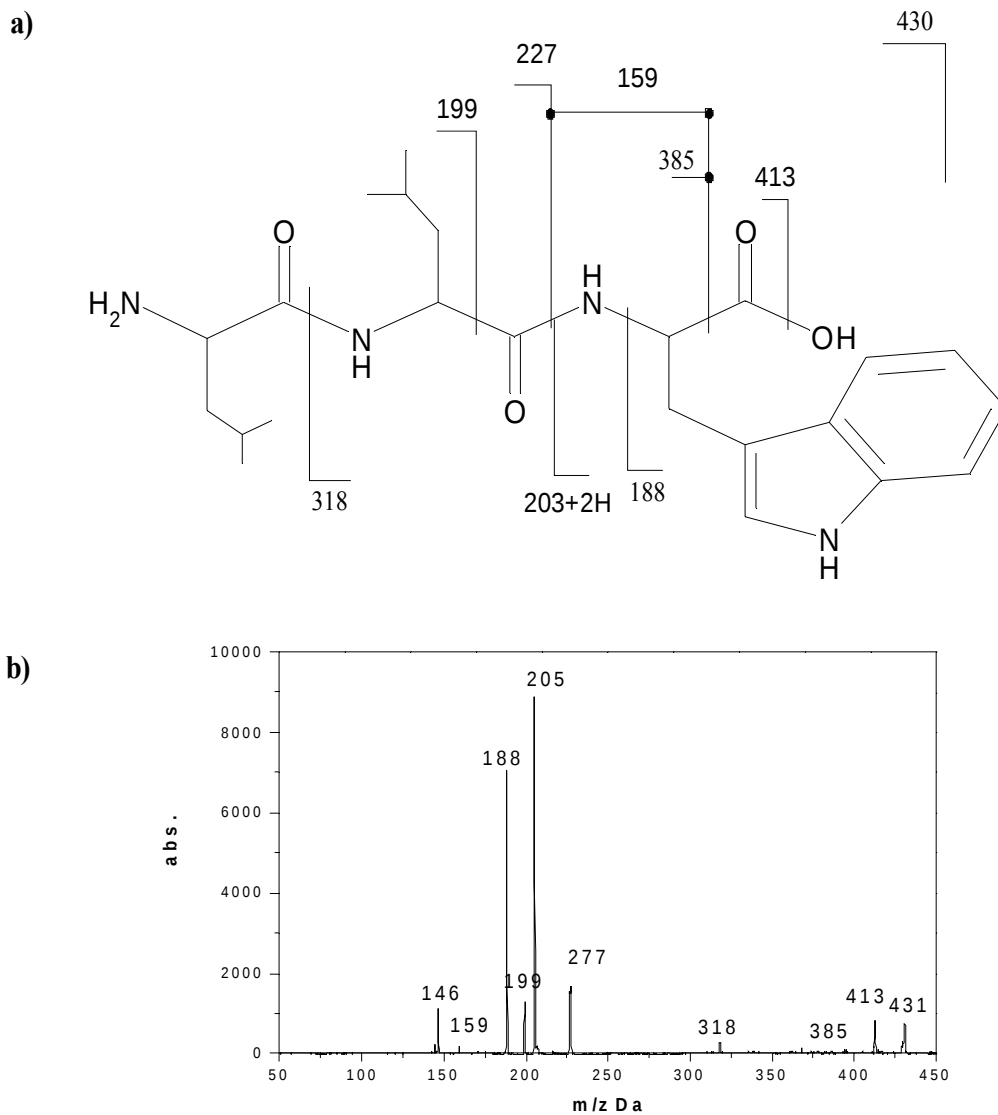


Abb. 4.25: a) Fragmentierungsmuster von NH₂-Leu₂-Trp-OH nach CID (Masse 431 Da). b) CID-Spektrum von NH₂-Leu₂-Trp-OH. Dabei wird das Hauptfragment m/z =205 Da (Trp-H⁺) beobachtet. Es gibt insgesamt drei verschiedene Fragmentierungs-kanäle: C-terminale Fragmentierung, H₂O- und CO-Abspaltung und N-terminale Fragmentierung.

4.3.2. Photofragmentierung von $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ mit einem UV-Nanosekunden-Lasern

4.3.2.1. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 285 nm

Bei der photoinduzierten Dissoziation von $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ mit einem UV ns-Laser der Wellenlänge 285 nm bilden sich wie erwartet mehr Fragmente als bei der kollisionsinduzierten Dissoziation. Wie in Abb. 4.26 b) gezeigt ist, entsteht durch Photofragmentierung als Hauptfragment statt 205 Da wie bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung die Masse $m/z = 227$ Da. Darüber hinaus bilden sich noch einige andere Fragmente wie z.B. $m/z = 368$ Da, 346 Da, 204 Da, 132 Da und 130 Da.

Bei der Photofragmentierung mit mehreren Schüssen können gebildete Fragmentationen durch nachfolgende Laserpulse weiter fragmentiert werden, so dass sich auch wieder dieselben Fragmente, wie bei der Photofragmentierung von Trp bilden.

Im Photofragmentierungsspektrum von protoniertem $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ werden auch, wie im CID-Spektrum, das C-terminale B_2 -Fragment mit $m/z = 227$ Da und das A_2 -Fragment mit der Masse 199 Da beobachtet. Außerdem wird das aus dem energetisch höher liegenden Fragmentierungskanal stammende X_2 -Fragment mit 346 Da beobachtet. Seine Struktur ist in Abb. 4.27 d) dargestellt.

Das Fragment $m/z = 368$ Da (Struktur siehe Abb. 4.27 c) wird durch die Abspaltung der NH_3 -Gruppe vom Fragment $m/z = 385$ Da, das selbst durch Verlust von H_2O und CO entsteht [110], gebildet.

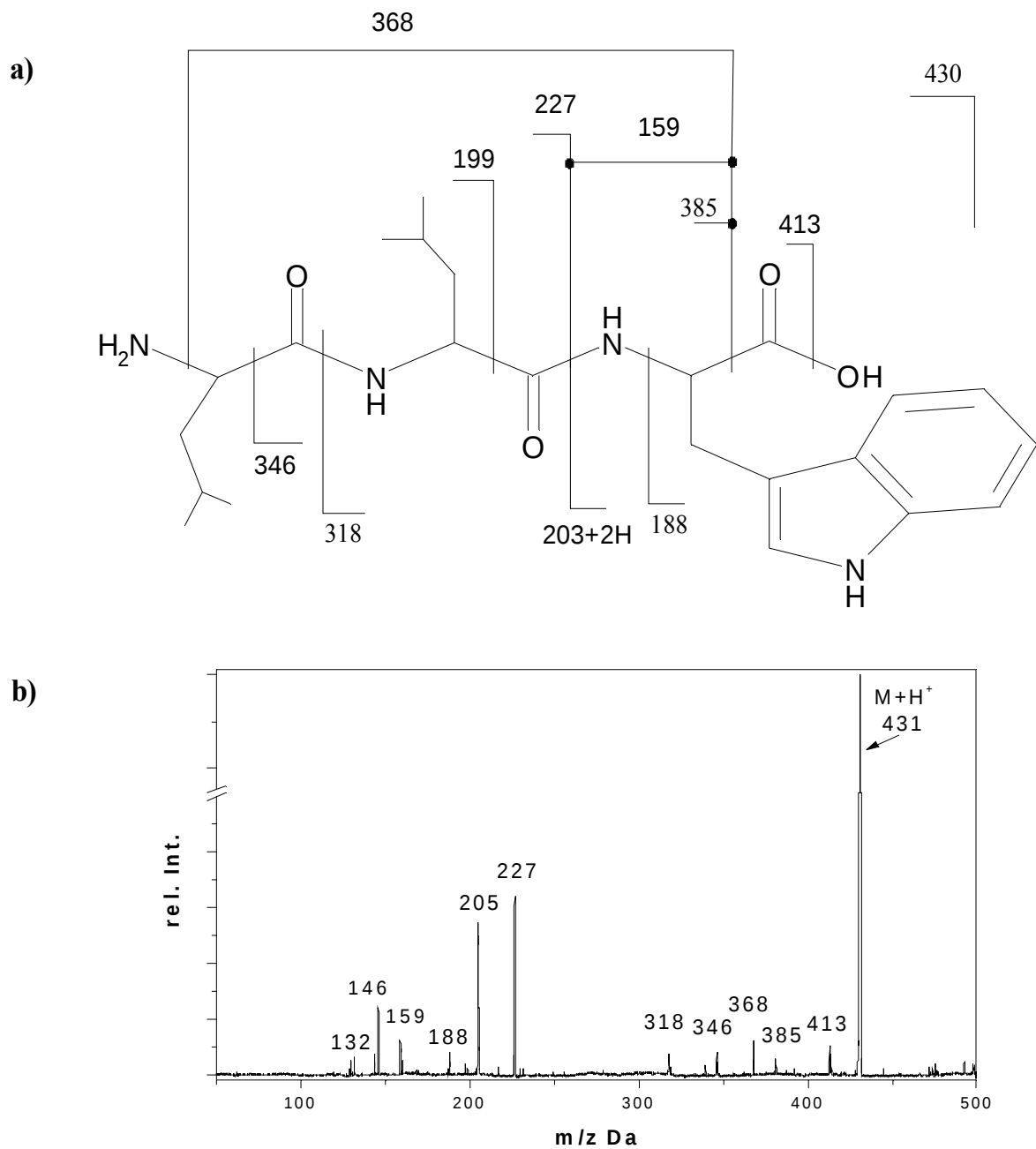
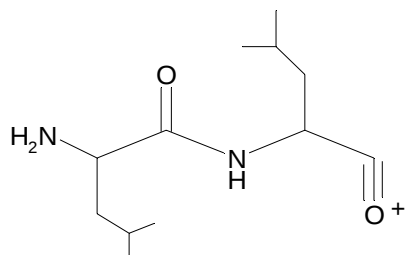


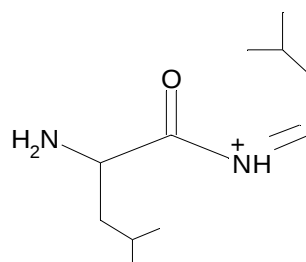
Abb. 4.26: a) Photofragmentierungsmuster von protoniertem $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$. b) Das zugehörige photoinduzierte Fragmentierungsspektrum mit einer Photoanregung bei 285 nm. Das in der Paulsfalle isolierte Ionenensemble wurde durch mehrfachen Laserbeschuss (20 Schüsse) fragmentiert. Die Pulsenergie betrug jeweils 500 μJ bei 285 nm. Betrachte Y-Skala ist unterbrochen.

a)



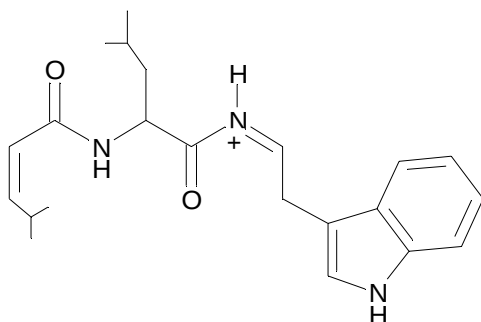
m/z = 227 Da

b)



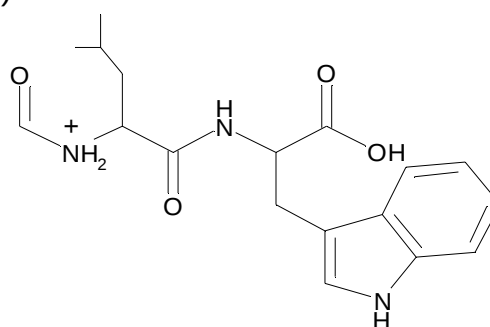
m/z = 199 Da

c)



m/z = 368 Da

d)



m/z = 346 Da

Abb. 4.27: Mögliche Struktur für die durch die UV ns-Fragmentierung von protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ erzeugten Fragmentationen: a) B_2 -Frament, b) A_2 -Fragment, c) nach Abspaltung von NH_3 , H_2O und CO gebildetes Ion, d) X_2 -Fragment.

4.3.2.2. Photofragmentierung mit der Wellenlänge 266 nm

In Abb. 4.28 ist das photoinduzierte Fragmentierungsmassenspektrum vom protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ gezeigt. Die intensivsten Signale gehören zum B_2 -Fragment $m/z = 227$ Da und zum Y_1 -Fragment $m/z = 205$ Da. Außerdem werden noch das Y_2 -Fragment $m/z = 318$ Da, das A_2 -Fragment $m/z = 199$ Da und die bekannten Fragmente des Trps beobachtet ($m/z = 188$ Da, 170 Da, 159 Da, 146 Da, 132 Da und 130 Da).

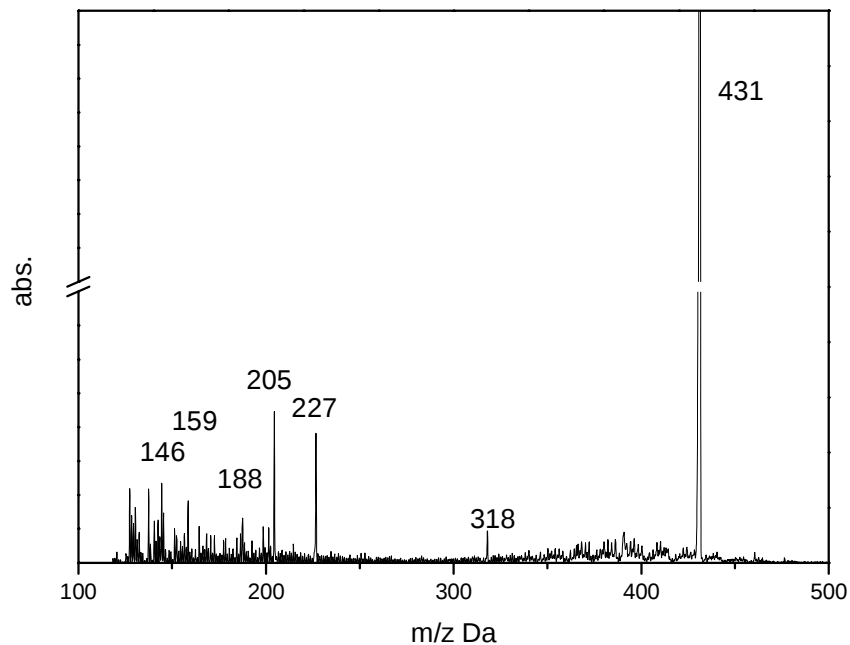


Abb. 4.28: Photofragmentierungsmassenspektrum des protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ angeregt mit Wellenlänge 266 nm. Das Molekülion wurde mit 5 Laserschüssen bestrahlt. Die Laserenergie betrug jeweils 2 mJ. Betrachte Y-Skala ist unterbrochen.

4.3.2.3. Photoanregung mit der Wellenlänge 213,5 nm

Die photoinduzierte Fragmentierung vom protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ wird in Abb. 4.29 gezeigt. Die Fragmentierung ist ähnliche der mit den Wellenlängen 266 nm und 285 nm. Nur das Fragment $m/z = 130$ Da ist merklich intensiver geworden. Dies deutet auf einen selektiven Bindungsbruch am Indolring mit einem vorhergehenden Ladungstransfer eines Elektrons zur protonierten Gruppe hin.

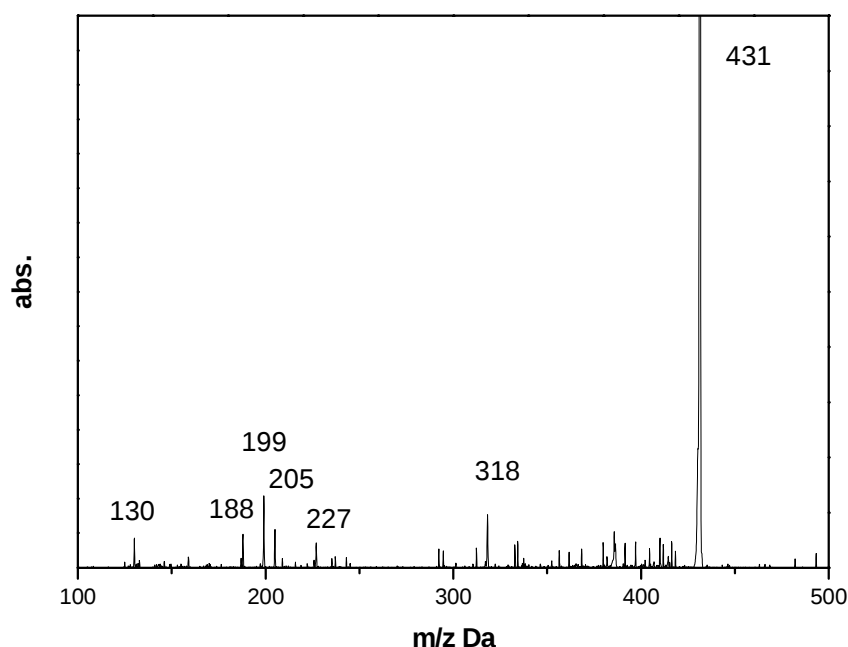


Abb. 4.29: Das photoinduzierte Fragmentierungsmassenspektrum vom protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ bei der Wellenlänge von 213,5 nm nach 5 Laserschüssen. Die Pulsenergie betrug jeweils 2 mJ.

Das Signal zu Rauschverhältnis im Spektrum aufgenommen mit 213,5 nm ist besser als das bei der Wellenlänge 266 nm aufgenommene Spektrum. Vermutlich deshalb, da bei der Wellenlänge 213,5 nm auch das Leu angeregt werden kann.

4.3.3. Photofragmentierung von $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ mit intensiven fs-IR-Laserpulsen

Wie in Abb. 4.30b) gezeigt ist, entsteht bei der photoinduzierten Fragmentierung von protoniertem $\text{NH}_2\text{-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ mit einem fs-IR-Laser das Hauptfragment $m/z = 188$ Da. Außerdem werden noch die Fragmente $m/z = 413$ Da, 385 Da, 368 Da, 318 Da, 170 Da und $m/z = 146$ Da beobachtet. Im Vergleich zur Photofragmentierung mit nanosekunden Lasern werden hier die B- und A-Fragmente nicht mehr beobachtet. Die Fragmente $m/z = 318$ Da und $m/z = 205$ Da werden weiter vollständig in die Fragmente $m/z = 272$ Da und 188 Da fragmentiert.

Die Fragmente $m/z = 413$ Da und 385 Da entstehen durch die Abspaltung von H_2O und $\text{H}_2\text{O/CO}$ von protoniertem Mutterion. Insgesamt bestätigt sich die Erwartung, dass sehr hohe Energien in die Moleküle einge koppelt werden können, wobei sogar eine sequenzielle Anregung durch mehrere Laserschüsse erwartet wird.

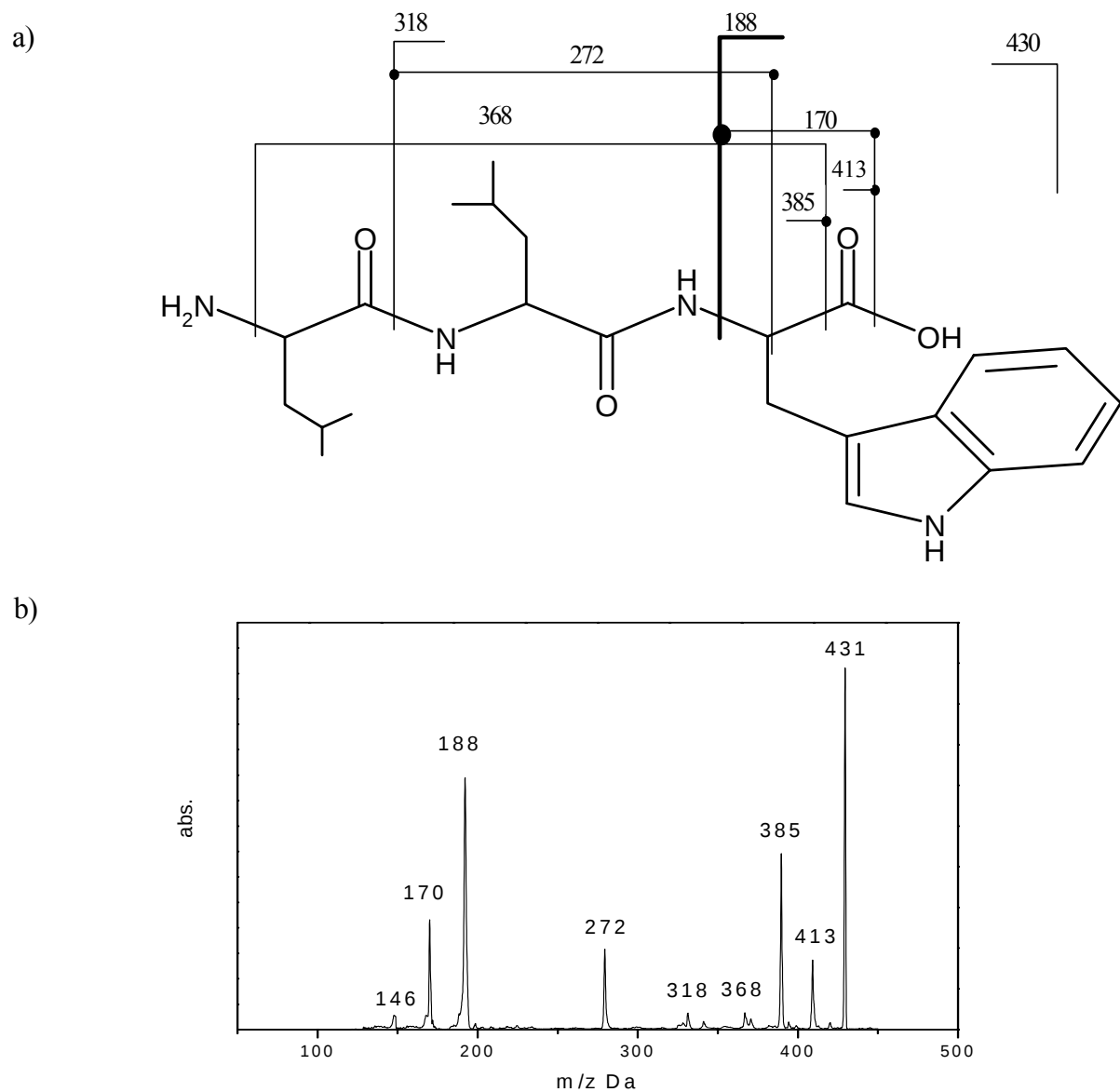


Abb. 4.30: a) Fragmentierungsmuster von protoniertem NH₂-Leu₂-Trp-OH nach fs-IR-Photoanregung. b) Photofragmentierungsmassenspektrum des protonierten NH₂-Leu₂-Trp-OH angeregt mit dem femtosekunden IR-Laser. Die Pulsenergie betrug 300 μJ bei 266 nm, die Laserpulsbreite 27 fs bei 500 Schüssen.

4.4. NH₂-Leucin₃-Tryptophan-OH (NH₂-Leu₃-Trp-OH)

4.4.1. Kollisionsinduzierte Fragmentierung von NH₂-Leu₃-Trp-OH

In Abb. 4.31b) wird ein kollisionsinduziertes Fragmentierungsmassenspektrum von NH₂-Leu₃-Trp-OH gezeigt. Das Hauptfragment hat die Masse $m/z = 340$ Da und ist ein B₃-Fragment, also ein N-terminales Fragment. Man sieht auch ein intensives C-terminales Fragment Y₂-Fragment mit der Masse $m/z = 318$ Da.

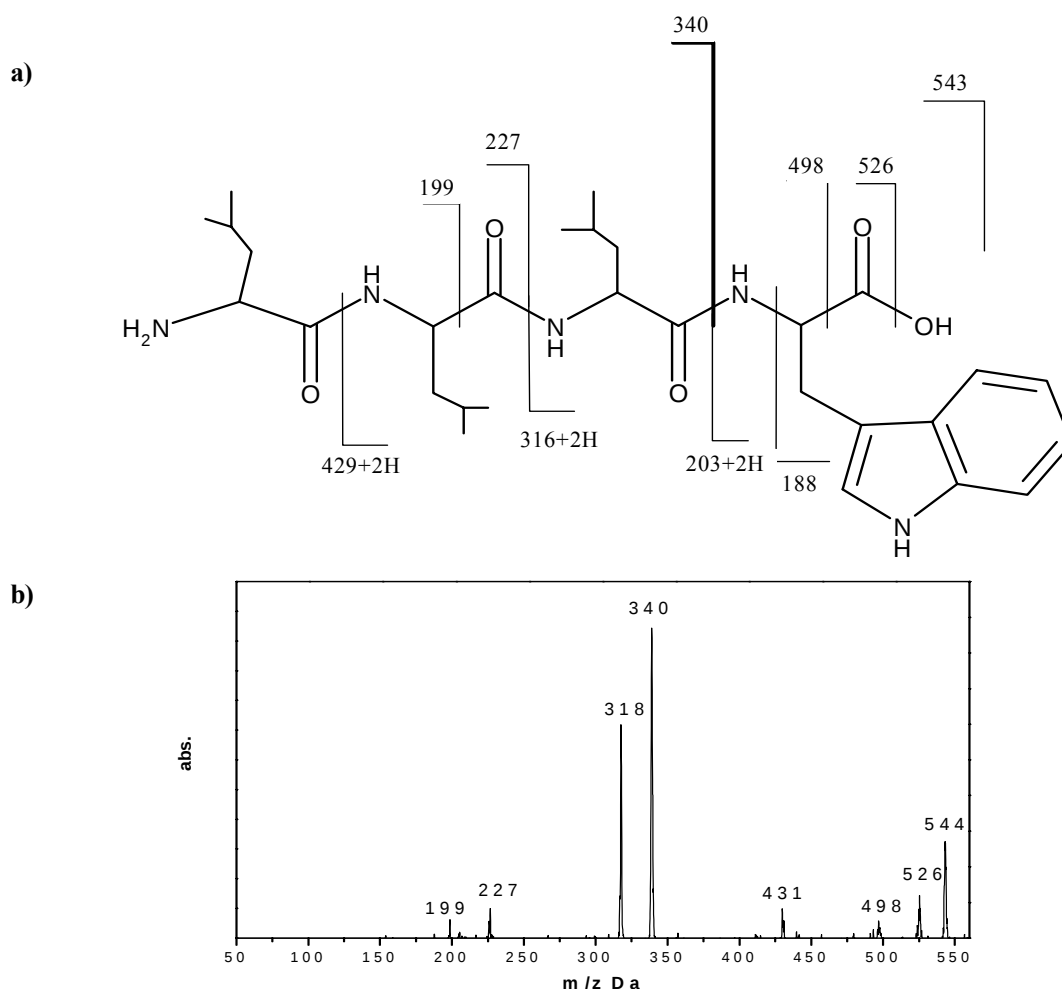


Abb. 4.31: a) CID-Fragmentierungsmuster von NH₂-Leu₃-Trp-OH. b) CID-Spektrum von NH₂-Leu₃-Trp-OH. Das intensivste Fragmentensignal liegt bei $m/z = 340$ Da. Man beobachtet noch die anderen Fragmente $m/z = 526$ Da, 498 Da, 481 Da, 431 Da, 318 Da, 227 Da und 199 Da, die aus Fragmentierungen der Peptidkette resultieren.

Mit geringerer Intensität werden das B₂-Fragment $m/z = 227$ Da, das A₂-Fragment $m/z = 199$ Da, das Y₃-Fragment $m/z = 431$ Da und das Y₁-Fragment $m/z = 205$ Da beobachtet. Zwei metastabile Ionensignale von $m/z = 526$ Da und 498 Da, die durch die Abspaltung von H₂O und H₂CO₂ (H₂O + CO) vom Mutterion entstehen [96], sind auch beobachten.

4.4.2. Photofragmentierung von $\text{NH}_2\text{-Leu}_3\text{-Trp-OH}$ mit Nanosekunden-Lasern

4.4.2.1. Photofragmentierung bei der Wellenlänge 285 nm

Die Photofragmentierung von $\text{NH}_2\text{-Leu}_3\text{-Trp-OH}$ bei 285 nm (siehe Abb. 4.33b) führt zu einem ähnlichen Ergebnis, wie die kollisionsinduzierte Fragmentierung (siehe Abb. 4.32b). Man findet auch die Signale des Hauptfragmentes mit der Masse $m/z = 340$ Da und des Y_2 -Fragmentes mit der Masse $m/z = 318$ Da. Ferner werden Signale mit geringerer Intensitäten, wie das B_2 -Fragment $m/z = 227$ Da, das A_2 -Fragment $m/z = 199$ Da, das Y_3 -Fragment $m/z = 431$ Da und das Y_1 -Fragment $m/z = 205$ Da beobachtet.

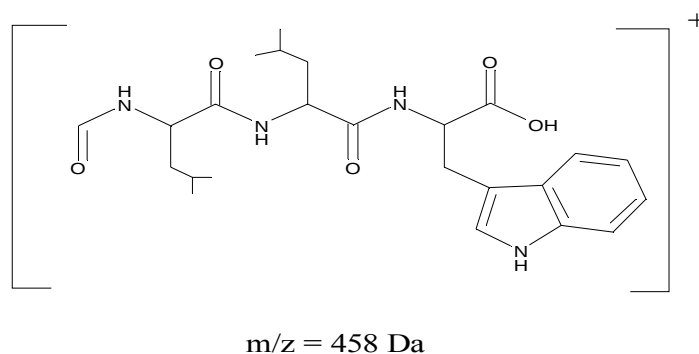
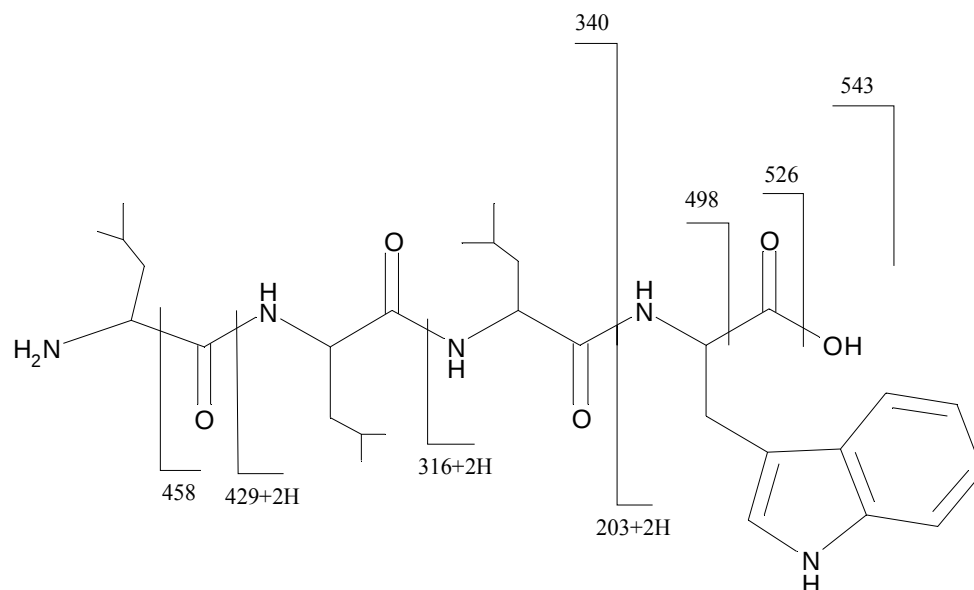


Abb. 4.32: Mögliche Struktur für das durch photoinduzierte Fragmentierung von $\text{NH}_2\text{-Leu}_3\text{-Trp-OH}$ gebildete X_3 -Fragment.

Das Fragment $m/z = 340$ Da entsteht durch die Abspaltung der Tryptophan-Einheit und wird auch als N-terminales Fragment bezeichnet. Zu den N-terminalen Fragmenten gehören auch die Massen $m/z = 227$ Da und $m/z = 199$ Da. Die Fragment $m/z = 318$ Da und 431 Da sind C-terminale Fragmente, die hintereinander durch die Abspaltung je einer Leucin-Einheit entstehen. Auch hier beobachtet man die metastabilen durch Eliminierung von H_2O -Molekül und Carboxyl-Gruppe entstandenen Fragmente von $m/z = 526$ Da und 498 Da.

Im Vergleich zur kollisionsinduzierten Fragmentierung wird ein energetisch höhenliegendes Fragment von $m/z = 458$ Da (mögliche Struktur siehe Abb. 4.32), das auch als X_3 -Fragment bezeichnet wird, beobachtet.

a)



b)

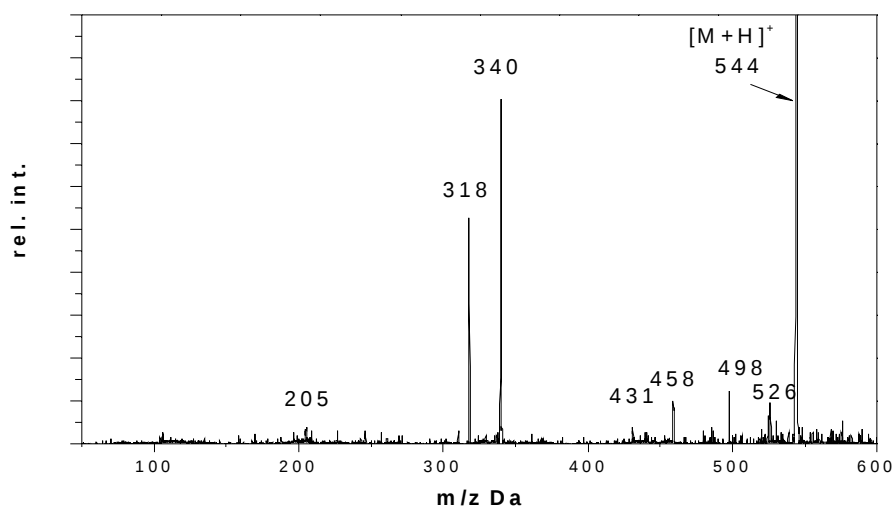


Abb. 4.33: a) Mögliche Photofragmentierungswege von $\text{NH}_2\text{-Leu}_3\text{-Trp-OH}$. Das Haupt-fragment B₃ ist fettgezeichnet. b) Photoinduzierte Fragmentierung von $\text{NH}_2\text{-Leu}_3\text{-Trp-OH}$. Das in der Paul-Falle isolierte Ion wird durch 20 Laserschüsse fragmentiert. Die Laserenergie betrug 500 μJ bei 285 nm. Durch die erhöhte Anzahl an Laserschüssen werden nicht mehr Fragmente erzeugen, sondern nur die Intensität der Ionensignale verändert.

4.4.2.2. Photofragmentierung bei der Wellenlänge 266 nm

In Abb. 4.34 wird das photoinduzierte Fragmentierungsmassenspektrum von protoniertem $\text{NH}_2\text{-Leu}_3\text{-Trp-OH}$ angeregt bei 266 nm gezeigt. Die intensiven Signale sind das B_3 -Fragment $m/z = 340$ Da und Y_2 -Fragment $m/z = 318$ Da.

Im Spektrum werden noch das N-terminale Fragmente wie $m/z = 227$ Da, 199 Da und das C-terminale Fragment $m/z = 205$ Da beobachtet. Die üblichen Trp-Fragmente werden ebenfalls beobachtet.

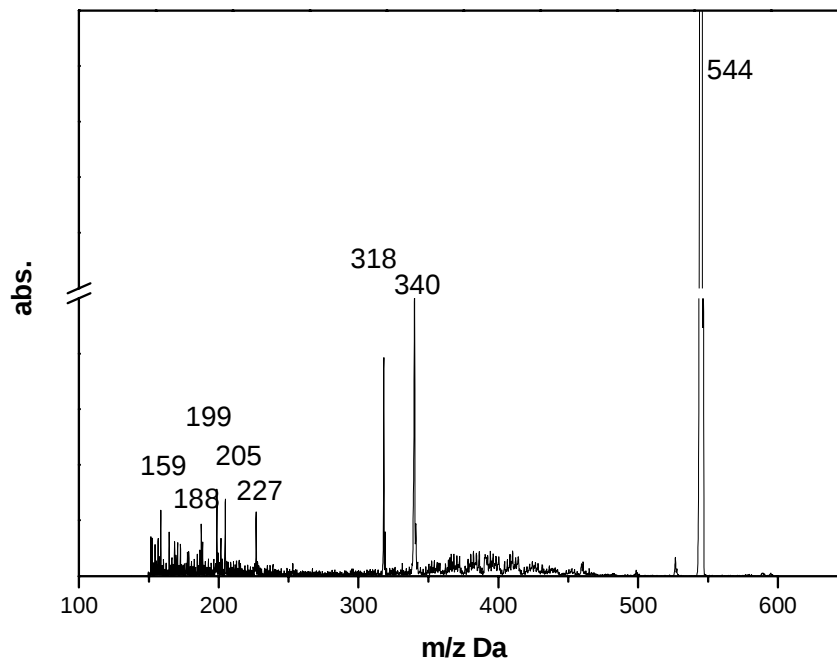


Abb. 4.34: Photofragmentierungsmassenspektrum vom protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu}_3\text{-Trp-OH}$ bei der Wellenlänge 266 nm (5 Laserschüsse). Die Laserenergie betrug 2 mJ/Puls. Beachte die starken B_3 (340 Da) und Y_2 -Fragmente (318 Da). Betrachte Y-Skala ist unterbrochen.

4.4.2.3. Photofragmentierung bei der Wellenlänge 213,5 nm

In Abb. 4.35 ist das photoinduzierte Fragmentierungsmassenspektrum von protoniertem $\text{NH}_2\text{-Leu}_3\text{-Trp-OH}$ bei Anregung mit der Wellenlänge 213,5 nm gezeigt. Dasselbe Ionenensemble wurde mit 2 mJ/Puls jeweils mit 5 Laserschüssen bestrahlt.

Wie bei der Wellenlänge 266 nm sind die Hauptfragmente die N-terminalen und C-terminalen Fragmente mit den Massen 340 Da (B_3) und 318 Da (Y_2). Außerdem wird noch das B_2 -Fragment mit $m/z = 227$ Da beobachtet.

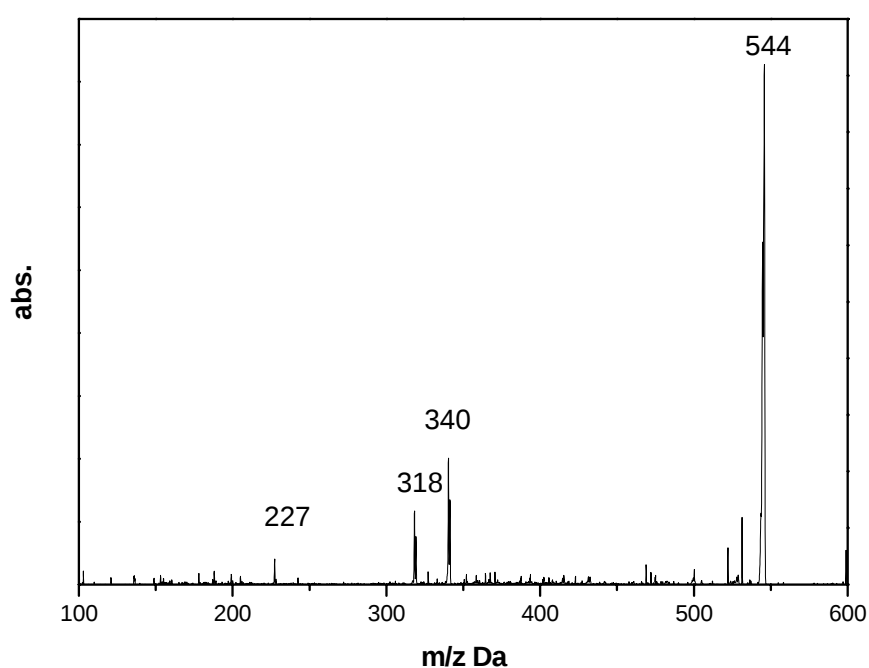


Abb. 4.35: Photofragmentierungsmassenspektrum vom protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu}_3\text{-Trp-OH}$ angeregt mit der Wellenlänge 213,5 nm (5 Laserschüsse). Die Laserenergie betrug jeweils 2 mJ/Puls.

4.4.3. Photofragmentierung vom protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu}_3\text{-Trp-OH}$ mit dem fs-IR-Laserpuls

In Abb. 4.36 b) ist das photoinduzierte Fragmentierungsmassenspektrum nach Anregung mit dem fs-IR-Laser gezeigt. Dabei sind nur C-terminale Fragmente und deren Fragmente zu sehen: Alle Fragmente kommen also aus dem Chromophorbereich und man kann schließen, dass die fs-IR-Strahlung selektiv den Chromophor anregt. Das Fragment $m/z = 272$ Da wird als Hauptfragment beobachtet. Außerdem werden noch die Fragmente $m/z = 431$ Da, 413 Da, 386 Da, 368 Da, 340 Da, 318 Da und $m/z = 188$ Da beobachtet. Interessanterweise wird das radikalische Fragment 130 Da nicht mehr beobachtet.

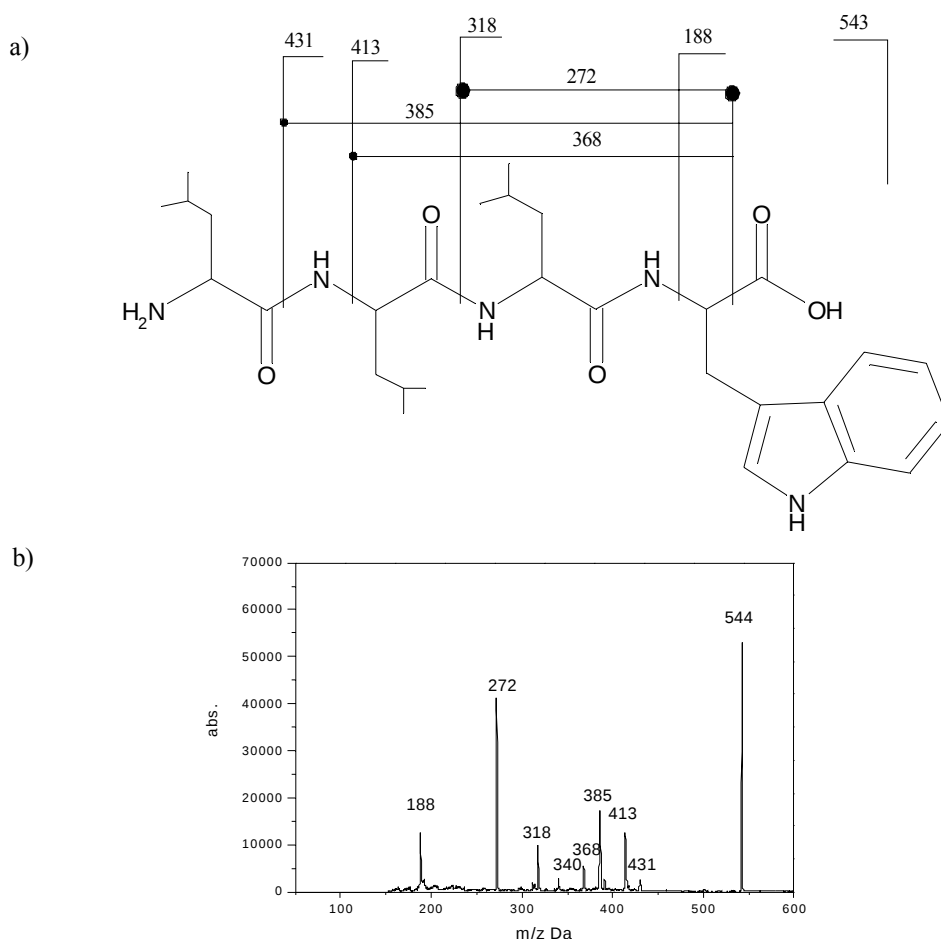


Abb. 4.36: a) Fragmentierungsmuster von $\text{NH}_2\text{-Leu}_3\text{-Trp-OH}$ nach Photoanregung. b) photo-induzierte Fragmentierungsmassenspektrum von $\text{NH}_2\text{-Leu}_3\text{-Trp-OH}$ mit fs-IR-Laser. Die Pulsenergie betrug $300 \mu\text{J}$ bei 266 nm (500 Laserschüsse).

4.5. $\text{NH}_2\text{-Leucin}_4\text{-Tryptophan-OH}$ ($\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$)

4.5.1. CID-Spektrum von $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$

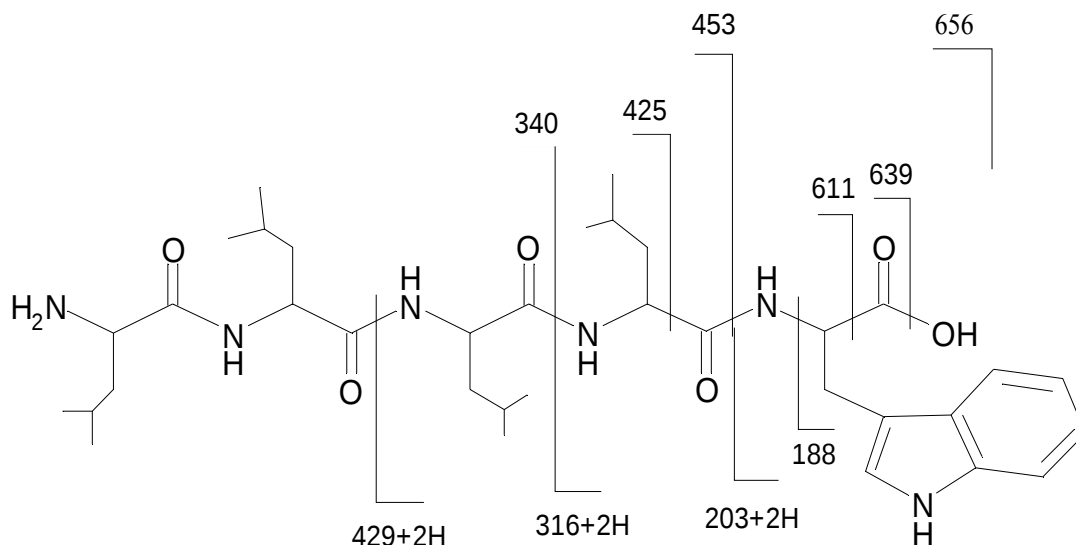
Im CID-Spektrum von $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$ sind das Hauptfragment $m/z = 453$ Da und die Fragmente $m/z = 639$ Da, 611 Da, 431 Da, 425 Da, 340 Da, 318 Da, 205 Da und 188 Da zu sehen. Die Fragmente $m/z = 639$ Da und 611 Da werden durch die Abspaltung eines H_2O -Moleküls und der Carboxyl-Gruppe ($\text{H}_2\text{O} + \text{CO}$) gebildet.

Das B_4 -Fragment $m/z = 453$ Da entsteht durch Verlust einer Trp-Einheit. Durch den weiteren Verlust von CO wird das A_4 -Fragment von $m/z = 425$ Da gebildet. Von dem B_4 -Fragment aus wird durch die Abspaltung der Leu-Einheit das B_3 -Fragment $m/z = 340$ Da gebildet (siehe Abb. 4.37 b). Solche Fragmente werden auch als N-terminale Fragmente bezeichnet.

Das Y_3 -Fragment $m/z = 431$ Da wird durch eine Abspaltung der Leu-Einheit gebildet. Die weitere Abspaltung der Leu-Einheit erzeugt das Y_2 -Fragment $m/z = 318$ Da und das Y_1 -Fragment $m/z = 205$ Da. Durch die Abspaltung der CO-Gruppe vom Y_1 -Fragment entsteht das Z_1 -Fragment mit der Masse $m/z = 188$ Da. Solche Fragmente werden als C-terminale Fragmente bezeichnet.

Aus den CID-Spektren der $\text{NH}_2\text{-Leu}_n\text{-Trp-OH}$ (mit $n = 1\text{-}4$) kann man sehen, dass die meisten Fragmentierungen an der Peptidbindung stattfinden. Da sowohl N-terminale, als auch C-terminale positive Ionen entstehen muss das Proton entlang der Peptidkette beweglich sein.

a)



b)

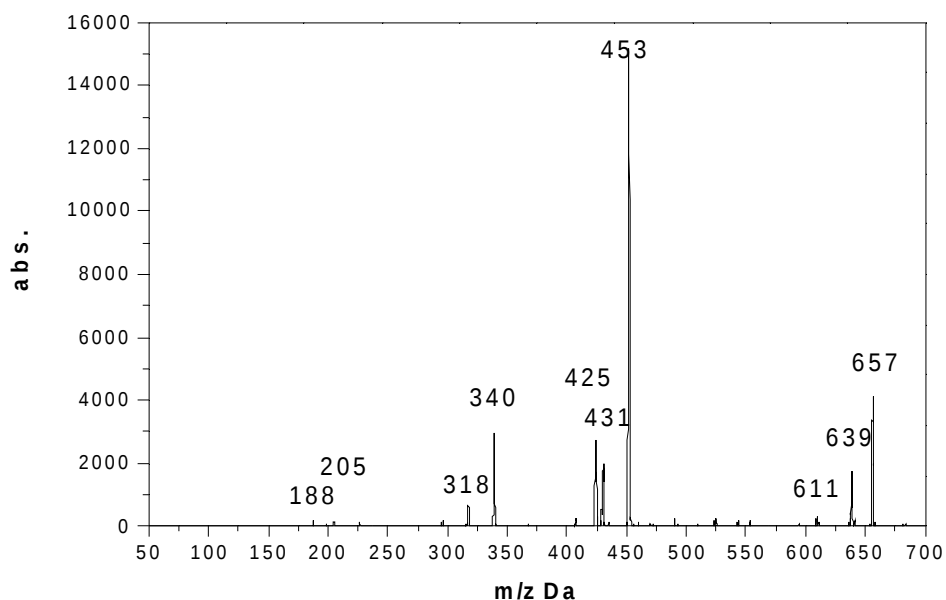


Abb. 4.37: a) Fragmentierungsmuster von $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$ entsprechend dem CID-Spektrum. Das intensivste Fragment ist fett hervorgehoben. b) CID-Spektrum von $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$. Das intensivste Signal ist das B_4 -Fragment mit der Masse $m/z = 453$ Da.

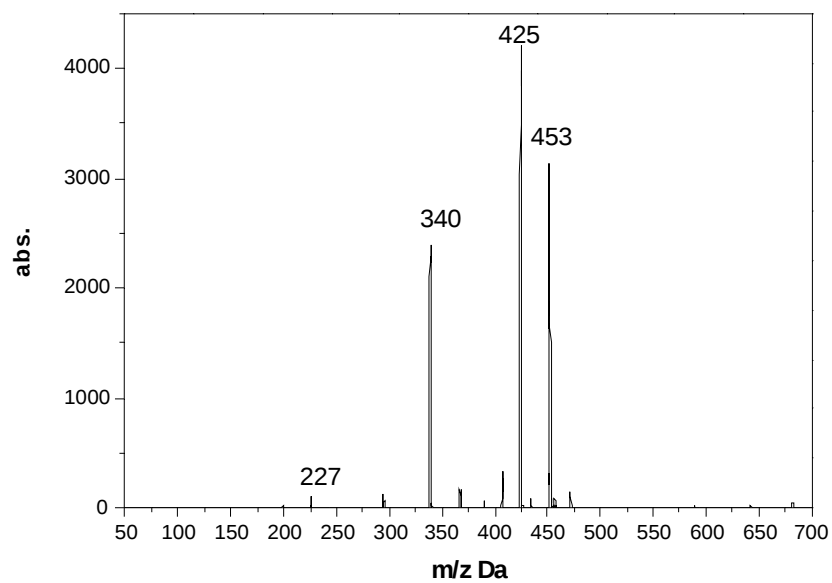


Abb. 4.38: CID-spektrum von H-Leu₄-Trp-OH im MS³ Schritt Fragmentierung der Masse 453 zu den Fragmenten mit m/z = 425 Da, 340 Da und 227 Da.

4.5.2. Photofragmentierung von NH₂-Leu₄-Trp-OH mit Nanosekunden-Lasern

4.5.2.1. Photofragmentierung bei der Wellenlänge 285 nm

Wie im photoinduzierten Fragmentierungsspektrum von NH₂-Leu₄-Trp-OH (siehe Abb. 4.39b) zu sehen ist, entstehen einige andere Fragmente als die bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung erzeugten Fragmente (siehe Abb. 4.35b). Man findet nun die Fragmente $m/z = 453$ Da, 425 Da, 340 Da, 227 Da, 199 Da und $m/z = 639$ Da.

Das Fragment wird sich direkt durch Verlust des H₂O-Moleküls von dem Mutterion $[M + H]^+$ gebildet. Das Hauptfragment ist das B₄-Fragment $m/z = 453$ Da, das durch die Abspaltung der Tryptophan-Einheit entsteht. Durch weiteren Verlust der CO-Gruppe am B₄-Fragment wird das A₄-Fragment mit $m/z = 425$ Da gebildet. Weiteres Abfragmentieren von je einer Leucin-Einheit führt zum B₃-Fragment $m/z = 340$ Da und zum B₂-Fragment $m/z = 227$ Da. Die durch die Photonen in das Molekül eingebrachte Gesamtenergie ist offensichtlich ausreichend, um das B₂-Fragment weiter zum A₂-Bruchstück der Masse $m/z = 199$ Da zu fragmentieren. Interessanterweise findet man bei der Photofragmentierung von H-Leu₄-Trp-OH nur die so genannten N-terminale Fragmente.

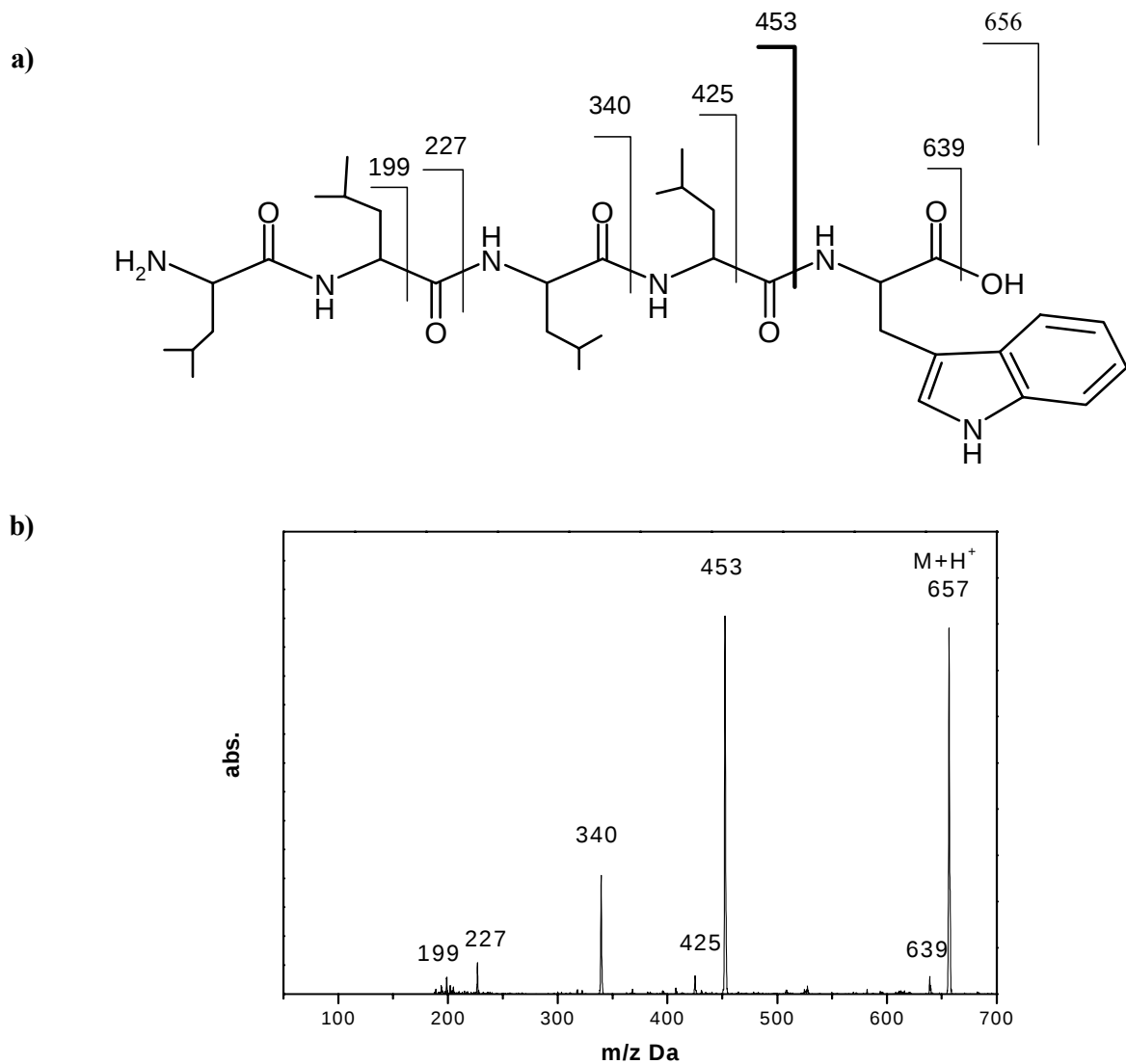


Abb. 4.39: a) Fragmentierungsmuster des protonierten NH₂-Leu₄-Trp-OH entsprechend dem photoinduzierten Fragmentierungsspektrums. Das fett gekennzeichnete Fragment ist das Hauptfragment. b) Photofragmentierungsspektrum von NH₂-Leu₄-Trp-OH. Die Ionen werden von 180 Laserschüssen beschossen. Die Pulsenergie beträgt 500 μ J bei der Wellenlänge 285 nm. Hierbei werden nur N-terminale Fragmente beobachtet.

4.5.2.2. Photofragmentierung bei der Wellenlänge 266 nm

In Abb. 4.40 ist das Photofragmentierungsmassenspektrum von protoniertem $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$ gezeigt. Man findet hier nur N-terminale Fragmente wie die Massen $m/z = 453$ Da, 340 Da, 227 Da und 199 Da.

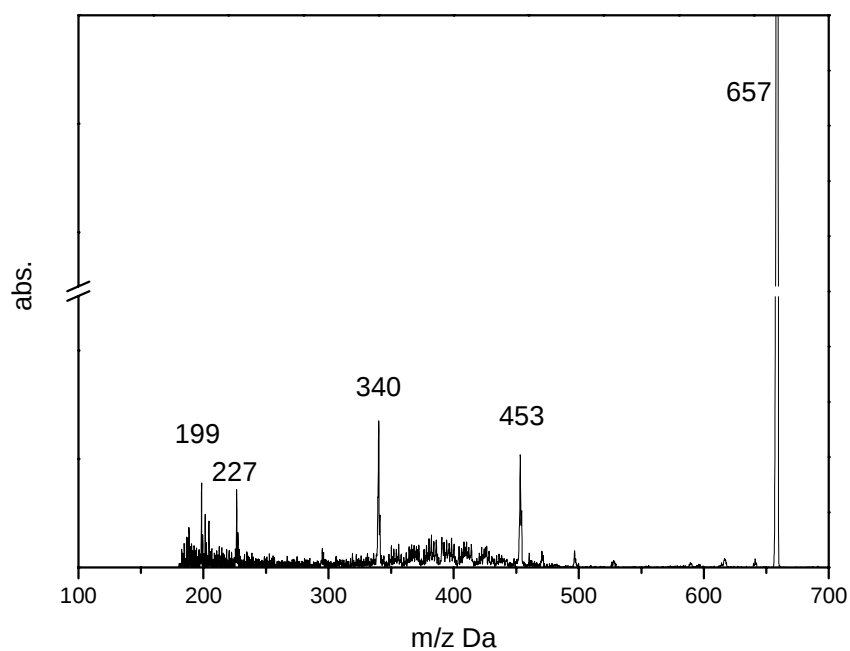


Abb. 4.40: Das photoinduzierte Fragmentierungsmassenspektrum vom protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$ bei der Wellenlänge von 266 nm. Dasselbe Ionenensemble wurde mit 5 Laserschüssen bestrahlt (2 mJ/Puls). Betrachte Y-Skala ist unterbrochen.

4.5.2.3. Photofragmentierung bei der Wellenlänge 213,5 nm

Die Photofragmentierung von protoniertem $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$ bei Anregung mit der Wellenlänge 213,5 nm (siehe Abb. 4.41) bildet deutlich mehr Fragmente als bei der Anregung mit der Wellenlänge $\lambda = 266$ nm. Hier werden sowohl alle B-Fragmente als auch das A_4 -Fragment $m/z = 425$ Da beobachtet.

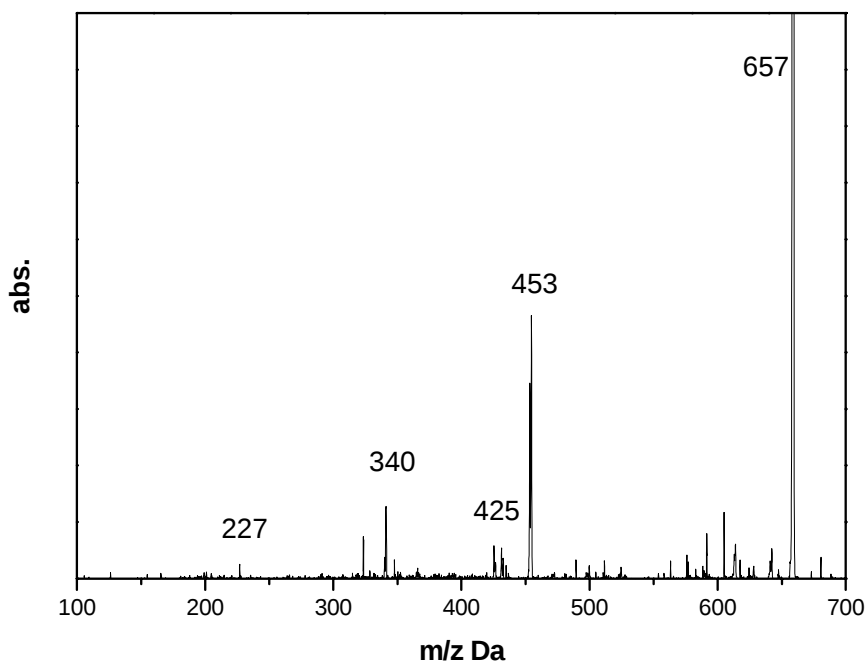


Abb. 4.41: Photofragmentierungsmassenspektrum vom protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$ bei der Wellenlänge von 213,5 nm nach 5 Laserschüssen. Die Laserenergie betrug 2 mJ/Puls.

4.5.3. Photofragmentierung von $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$ mit fs-IR-Laserpulsen

Bei der photoinduzierten Dissoziation von protoniertem $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$ mit dem fs-IR-Laserpulsen entsteht das Hauptfragment $m/z = 414$ Da (siehe Abb. 4.42b), das durch die Abspaltung von Leu-Leu und NH_3 gebildet wird. Es wird auch Z_3 -Fragment genannt. Dieses Fragment kann noch durch die Abspaltung von H_2O und $\text{H}_2\text{O/CO}$ zur den Massen $m/z = 397$ Da und 369 Da weiter fragmentiert werden.

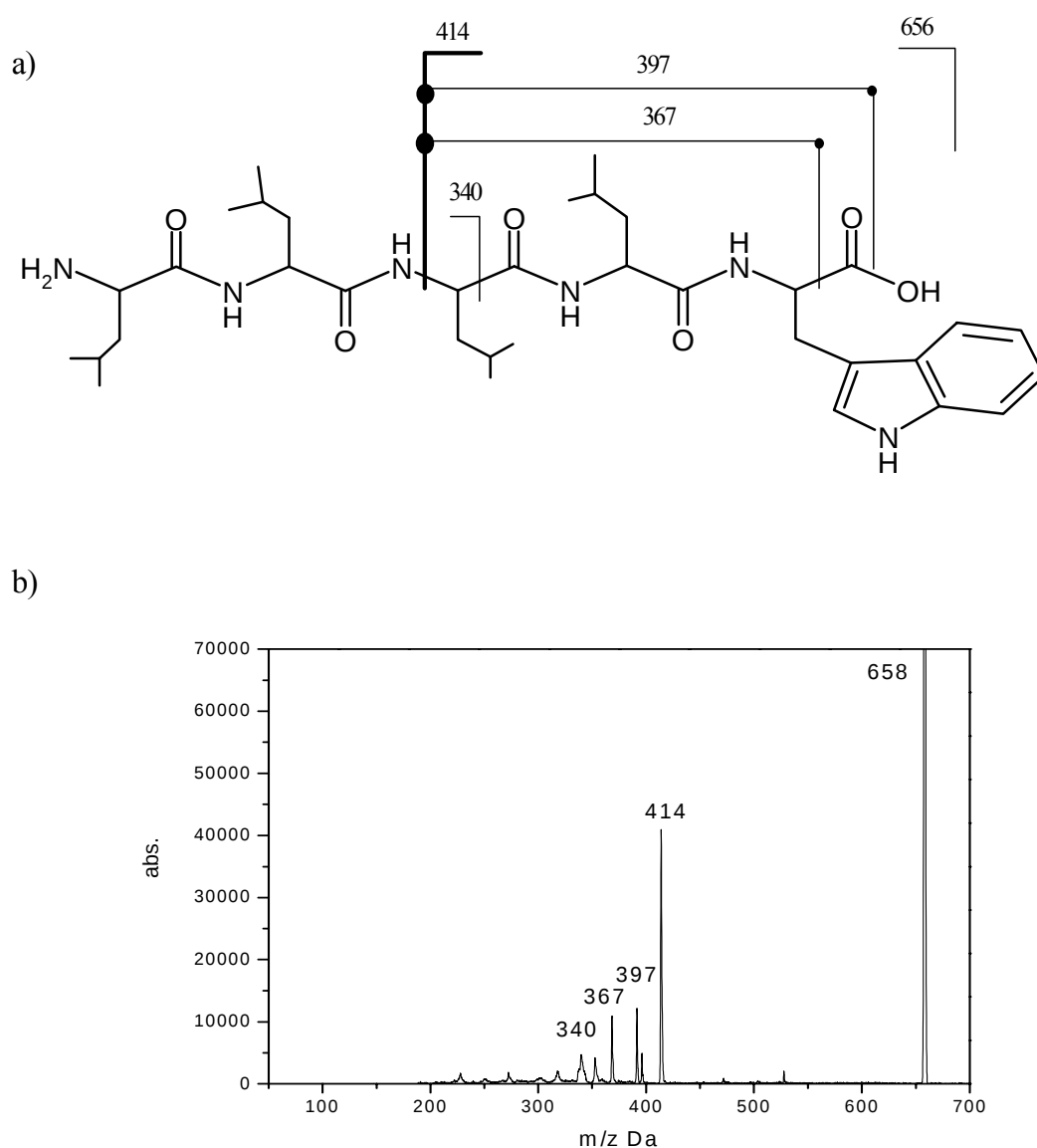


Abb. 4.42: a) Fragmentierungsmuster vom protonierten $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$. b) Photofragmentierungsmassenspektrum von protoniertem $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$ mit fs-IR-Laserpulsen. Die Pulsenergie betrug $300 \mu\text{J}$ bei 266 nm (500 Laserschüsse).

4.6. Gramicidin A

Gramicidin A ist ein Peptid-Antibiotikum von Bakterium *Bacillus brevis* und ist ein lineares Pentadeka-Peptid. Die Primäresequenz lautet: Formyl-L-Val₁-D-Gly₂-L-Ala₃-D-Leu₄-L-Ala₅-D-Val₆-L-Val₇-D-Val₈-L-Trp₉-D-Leu₁₀-L-Trp₁₁-D-Leu₁₂-L-Trp₁₃-D-Leu₁₄-L-Trp₁₅-Ethanolamin. Die alternierende stereochemische Konfiguration (L- und D-Form) der Aminosäuren ist notwendig für die Ausbildung einer β -Helix in Membranen.

4.6.1. Photofragmentierung von Gramicidin A mit Nanosekunden-Lasern

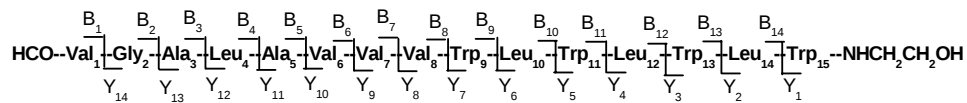
4.6.1.1. Photofragmentierung bei der Wellenlänge 266 nm

In Abb. 4.43 ist das photoinduzierte Fragmentierungsspektrum von Gramicidin A bei Anregung mit 5 Laserschüssen mit Licht der Wellenlänge 266 nm gezeigt. Die Pulsenergie betrug 2 mJ/Puls. Es werden B-Fragmente (N-terminales Fragment) und Y-Fragmente (C-terminales Fragment) gebildet.

Die Fragmente B₆ (m/z = 540 Da), B₇ (m/z = 639 Da), B₈ (m/z = 738 Da), und [M+H-NHCH₂CH₂OH]⁺ (m/z = 1824 Da) sind deutlich intensiver als die anderen Fragmente. Die Fragmente Y₅ (m/z = 848 Da), Y₆ (m/z = 961 Da), Y₇ (m/z = 1147 Da), B₉ (m/z = 925 Da), B₁₀ (m/z = 1038 Da), B₁₁ (m/z = 1226 Da), B₁₂ (m/z = 1339 Da), B₁₃ (m/z = 1525 Da) und B₁₄ (m/z = 1638 Da) werden ebenfalls aber deutlich schwächer beobachtet.

Um das Molekölion des Gramicidin A gut zu isolieren, musste die Tiefe der Potentialmulde des quadratischen Pseudopotentials der Paul-Falle erhöht werden. Dadurch wird aber gleichzeitig der *cut off* also die untere Nachweisgrenze erhöht. Eine Konsequenz daraus ist, dass die Massen unter m/z = 500 Da verloren gehen und nicht mehr detektiert werden können.

a)



b)

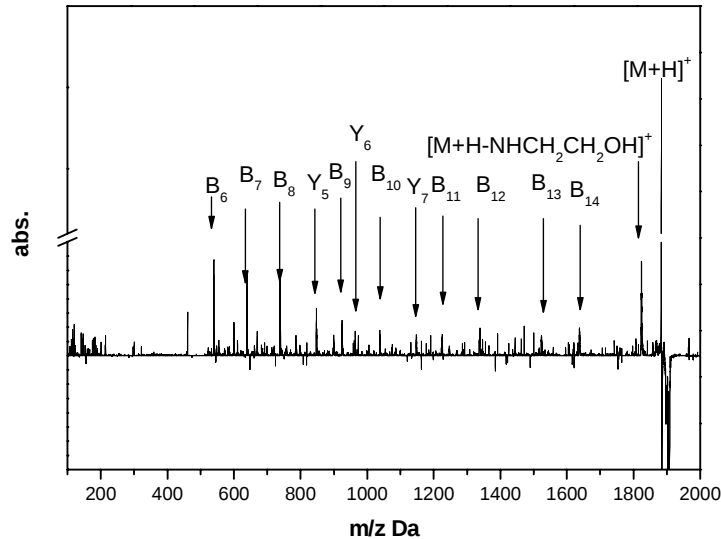


Abb. 4.43: a) Primärstruktur und mögliche Fragmentierungsmuster von Gramicidin A. b) Die Fragmentierung ist sehr schwach, so dass hier nur das Differenzspektrum der Photofragmentierung vom Gramicidin A (Differenz der Massenspektren mit und ohne Fragmentierungslaser) gezeigt wird. Die in der Paul-Falle isolierten Ionen werden durch fünf Laserschüsse fragmentiert. Die Laserenergie betrug 2 mJ/Puls bei 266 nm. Betrachte Y-Skala ist unterbrochen.

4.6.1.2. Photofragmentierung bei der Wellenlänge 213,5 nm

Bestrahlt man das protonierte Gramicidin A mit UV-Licht der Wellenlänge 213,5 nm, so entstehen die gleichen Fragmente wie bei der Anregung mit Licht der Wellenlänge 266 nm aber mit sehr viel höherer Intensität (Die Laser-Pulsenergie betrug jeweils 2 mJ/Puls) (siehe Abb. 4.44). Das Mutterion wird fast um 30 % fragmentiert. Das intensivste Fragment ist das B₈-Fragment (m/z = 738 Da), zur dessen Entstehung die Bindung in der Nähe des Trps gebrochen wird.

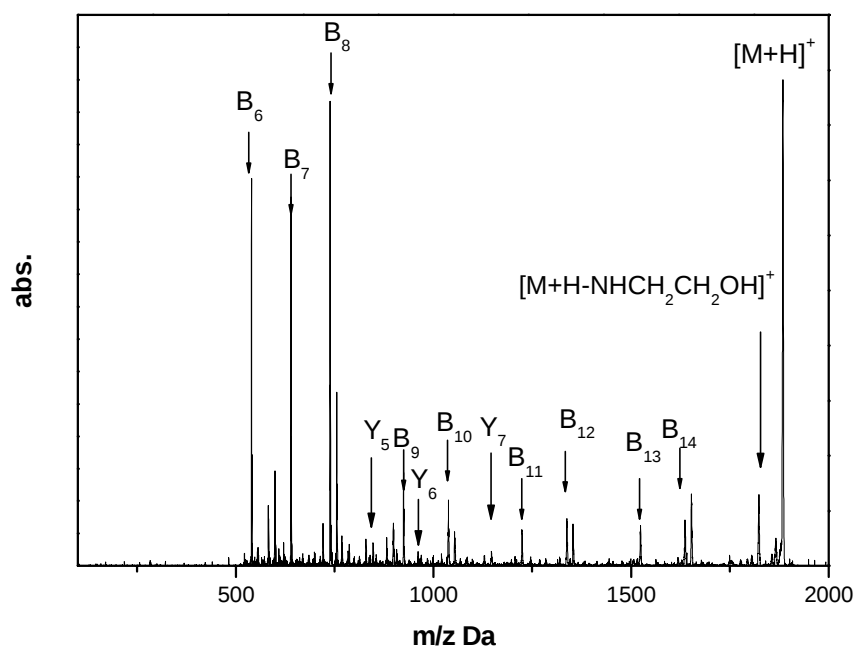


Abb. 4.44: Das photoinduzierte Fragmentierungsspektrum vom Gramicidin A bei Anregung mit drei Laserpulsen mit der Wellenlänge 213,5 nm. Die Laserenergie betrug 2 mJ/Puls.

Die Aminosäuren Gly, Ala, Val, Leu absorbieren bei der Wellenlänge von 190-218 nm ebenfalls (siehe Kap. 2.4.7.1.). So gibt es Gramicidin A bei 213,5 nm 15 lokale Chromophore um das Molekülion anzuregen. Dies schlägt sich in der besseren Fragmentierung bei 213,5 nm als bei 266 nm nieder.

4.6.1.3. Photofragmentierung von Gramicidin A mit fs-IR-Laserpulsen

Bei der photoinduzierten Dissoziation von Gramicidin A mit dem Femtosekunden-Laser bildet sich mit großer Wahrscheinlichkeit ein doppelgeladenes Molekülion ($m/z = 943,5$ Da). Dieser Anregungsprozess wird bei der Anregung mit Nanosekunden-Lasern nicht beobachtet. Das Auftreten des doppelt geladenen Mutterions bestätigt die Vermutung, dass nach einer nicht-resonanten Anregung zum S_1 in einem aromatischen Chromophor die Absorption weiterer Photonen ungebremst bis zum Ende des fs-Pulses abläuft. Selbst wenn die Ladung relativ weit vom Chromophor entfernt ist, müssen für die Ionisation mindestens 7 IR-Photonen aufgewendet werden. Eine Feldionisation durch das Laserfeld kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

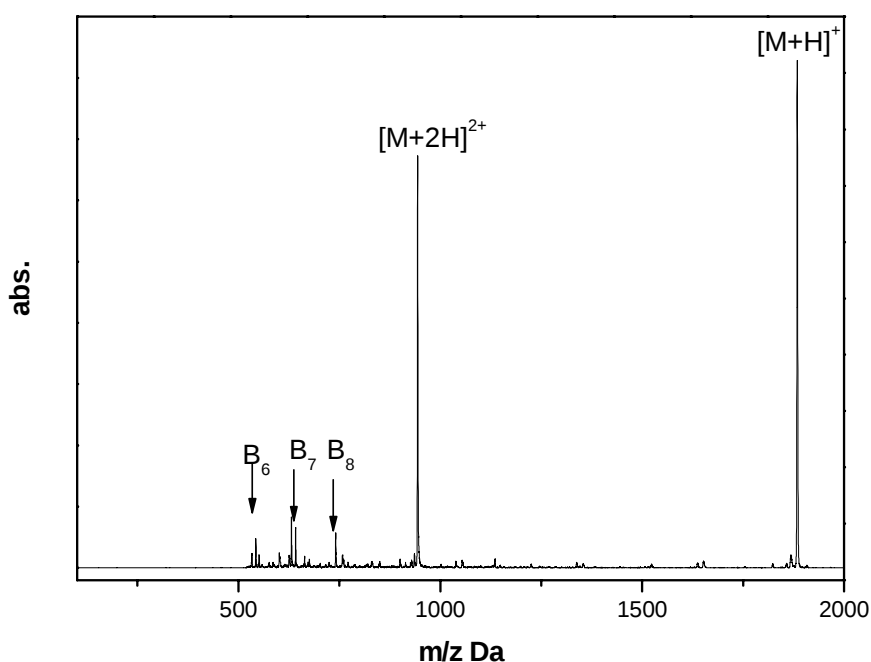


Abb. 4.45: Photofragmentierungsmassenspektrum vom Gramicidin A mit Anregung durch den intensiven fs-IR-Laserpulsen. Man beachte die Bildung des doppelt geladenen Mutterions durch die Ionisation des protonierten Mutterions.

Zusätzlich aber wesentlich schwächer werden die Fragmente B_6 ($m/z = 540$ Da), B_7 ($m/z = 639$ Da) und B_8 ($m/z = 738$ Da) durch die fs-IR-Laser-Anregung gebildet (siehe Abb. 4.45).

4.7. Cytochrom C

Cytochrom C ist ein kleines Protein mit etwa 100 Aminosäuren, aus der Familie der Cytochrome, das in den Mitochondrien (Kraftwerke der Zelle) bei der oxidativen Phosphorylierung eine entscheidende Rolle als Elektronentransporter spielt. Da Cytochrom C in praktisch allen Lebewesen vorkommt und sich seine Primärstruktur zwischen ähnlichen Arten nur in wenigen Aminosäuren unterscheidet, ist es ein wichtiges Hilfsmittel zur taxonomischen Einteilung der Lebewesen und ein Indiz für die evolutionäre Entwicklung der Arten.

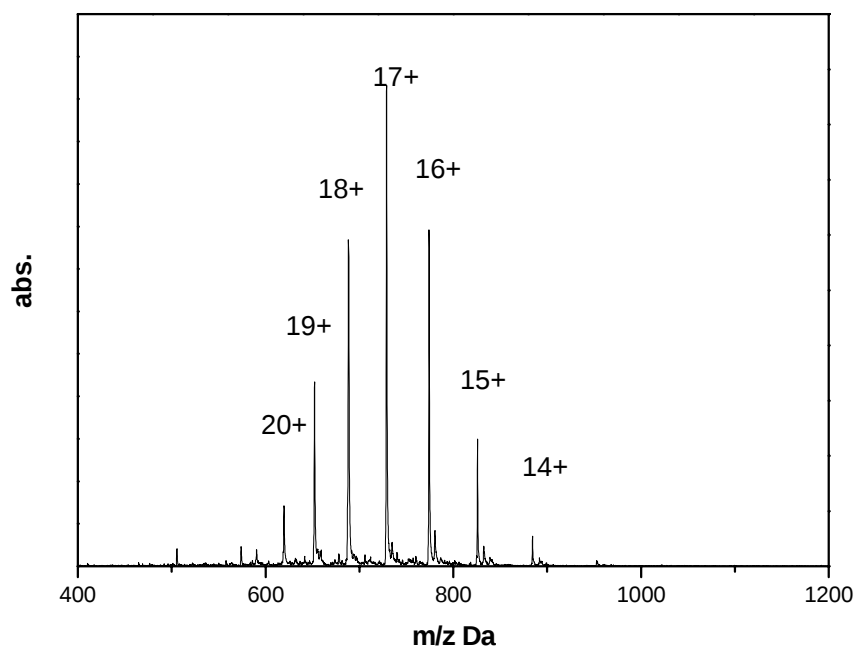


Abb. 4.46: ESI-MS von Cytochrom C gewonnen aus Pferdeherzen. Es werden mehrfach geladene Molekülonen mit Ladungszahlen bis $z = 20$ gefunden. ($M_r = \text{ca. } 12400 \text{ g/mol}$)

Große Proteine besitzen zwar auch nur einen N-terminus, besitzen aber mehrere Seitenketten, die auch protonieren können. Somit beobachtet man aufgrund der vielen Aminosäuren mit einer geeigneten Protonierungsstelle und auf Grund der Größe des Proteins (die Ladungen

können große Abstände zueinander einnehmen) mehrfach-positiv-geladene Ionen. Abb. 4.46 zeigt eine Positiv-Ionen ESI-MS des Cytochrom C mit einem Molekulargewicht von ca. 12400 Dalton. Man findet wie erwartet eine Verteilung von mehrfach geladenen Molekülionen. Das intensivste Signal stellt das 17fach geladene Molekülion $[M + 17H]^{17+}$ dar. Außerdem sind noch die 14fach, 15fach, 16fach, 18fach, 19fach und 20fach geladenen Molekülionen zu sehen.

In Abb. 4.47 ist ein photoinduziertes Fragmentierungsmassenspektrum von Cytochrom C bei einer Anregung mit der Wellenlänge 213,5 nm gezeigt. Es wurde vorher das 17fach geladene Molekülion isoliert. Leider kann das Signal nicht sauber isoliert werden und es bleiben einige Ionen des 18fach geladenen Mutterions in der Falle. Das in der Paul-Falle isolierte Ionenensemble wurde dann durch 10 Laserschüsse fragmentiert. Wie in Abb. 4.47 gezeigt, entstehen durch die Anregung bei 213,5 nm sehr viele Fragmente. Da jedes Fragmention verschiedene Ladung tragen kann (je nach Aufteilung der Ladungen bei der Fragmentierung), teilen sich die Fragmente gleicher Masse auf viele Signale bei verschiedenen m/z -Werten auf und ist es praktisch unmöglich, das PID-Spektrum des Cytochrom C zu interpretieren. Beachte auch, dass viele Fragmente aus diesem Grund gegenüber dem Mutterion auch zu höheren m/z -Verhältnissen verschoben sind.

Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass die Photoanregung mit 213,5 nm sehr wohl geeignet ist, als Dissoziationsmethode auch für große Ionen eingesetzt zu werden.

Es scheint jedoch, dass die ESI-Methode wegen der Bildung hoch geladener Ionen für die Photofragmentierung von größeren Molekülen nicht geeignet ist. Zudem stößt die Paul-Falle offenbar an ihre Grenzen, da die Ionen nicht mehr identifizieren können.

Hier schlagen wir eine Kombination von MALDI als Einlassquelle mit einer Photodissoziation mit 213,5 nm vor.

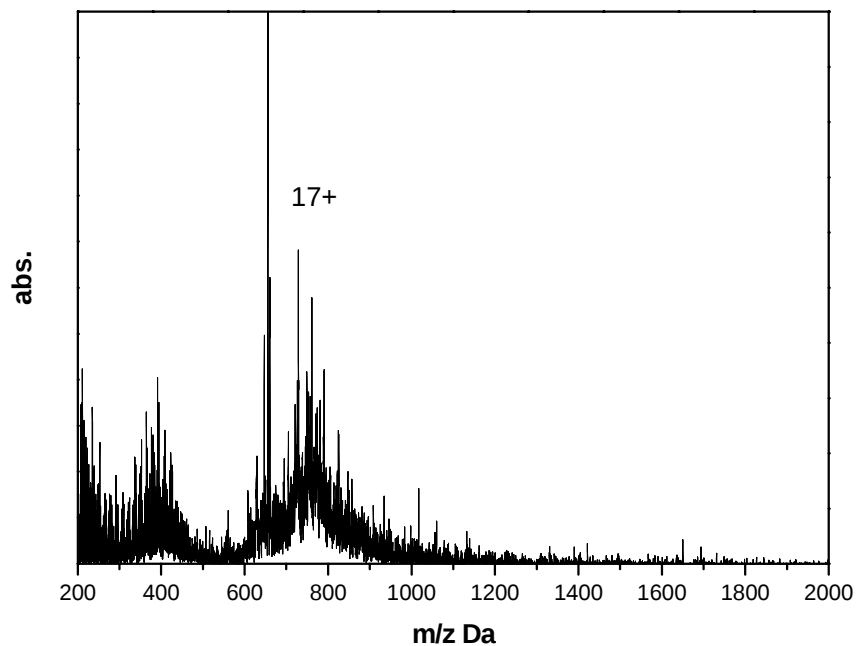


Abb. 4.47: Photofragmentierungsspektrum von Cytochrom C mit 17 Ladungen bei einer Laseranregung mit 213,5 nm. Für jede Fragmentmasse werden auf Grund der vielen Möglichkeiten der Aufteilung der Ladungen viele m/z-Signale erzeugt. Beachte auch, dass viele Fragmente aus diesem Grund gegenüber dem Mutterion auch zu höheren m/z-Verhältnissen verschoben sind.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Massenspektrometrie ist inzwischen eine Standardmethode für die Analytik in der Biologie, der Biochemie, der Chemie und der Medizin. Besonders interessante Substanzen sind biologisch relevante Moleküle wie Peptide, Proteine und DNA-Fragmente. Dabei spielt die Fragmentierung für die Identifizierung und die Sequenzanalyse von Peptiden und Proteinen eine große Rolle. Überraschenderweise lassen sich große Peptide selbst bei Zufuhr sehr hoher Energien nicht mehr so einfach in endlicher Zeit fragmentieren, da die im Molekül vorhandene Energie über alle Schwingungen verteilt ist (3N-6 Schwingungen, deren Obertöne und deren Kombinationen) und die statistische Wahrscheinlichkeit, dass die Energie in der Reaktionskoordinate konzentriert wird, klein ist.

Ziel dieser Arbeit war es nun biologisch relevante Moleküle, wie Peptide, Proteine und Polymere, aus dem Lösungsmittel in die Gasphase zu bringen und mit hohen Photonenenergien bei verschiedenen Wellenlängen resonant anzuregen und zu fragmentieren. Zudem wurde eine femtosekunden-IR-Multiphoton-Anregung angewandt in der Hoffnung neue Fragmentierungswege zu finden. Dabei kann die Kombination von einer Elektrospray-ionisation mit einer Paul-Falle fast alle Substanzen, die protonierbar oder deprotonierbar sind, für eine Laserdissoziation zugänglich machen.

Die Motivation für diese Arbeit war die Suche nach einem möglichst universellen und systematischen Fragmentierungsverfahren für Peptide und Proteine. Dieses Verfahren soll eine Fragmentierung an allen Peptidbindungen ermöglichen und dadurch eine schnelle und vollständige Sequenzanalyse von Oligopeptiden und wenn möglich auch von Proteinen mit geringsten Probenmengen verwirklichen.

Zur Realisation dieses Vorhabens wurde ein kommerzielles Elektrospray-Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonik, das mit einer Elektrospray Ionenquelle und einer Paul-Falle ausgestattet ist, mit einer Laserfragmentierung kombiniert. Um die Laserstrahlen in die Paul-Falle auf die Ionen zu fokussieren bzw. das Experiment zu synchronisieren, wurden am Massenspektrometer entsprechend einige Modifikationen gemacht.

- Für den Laserzugriff entlang der Längsachse der Falle musste die Vakuumkammer des Gerätes um ein Fenster erweitert werden und statt der originalen Austrittsendkappe mit sieben Löcher wurde eine Endkappe mit einer größeren Austrittsöffnung mit

einem Durchmesser von 1,5 mm eingesetzt. Dadurch konnten die Laserstrahlen direkt in die Paul-Falle fokussiert werden. Der Nachteil dieses Laserzugriffs war, dass der Laser die Apparatur nicht mehr verlassen konnte und auf Metalloberflächen im Einlassbereich Elektronen erzeugte (Photoeffekt), die dann die Ionenflugbahnen beeinflussten.

- Ein senkrechter Laserzugriff durch den Ring der Paul-Falle erlaubte den Laser über ein zweites Fenster wieder auszukoppeln. Diese Änderung war sehr riskant, da nicht klar war, ob die Funktionen des Massenspektrometers dadurch zerstört werden würden. Es gab jedoch keinerlei Störeffekte weder für die massenspektrometrischen Funktionen (Auflösung, Transmission) noch wurde das Signal durch Photoelektronen beeinflusst. Durch diese Änderung wurden die Laserjustage wesentlich einfacher und reproduzierbarer.
- Der He-Einlass in die Paul-Falle wurde gepulst, um zu testen ob die Kühlung der Ionen durch He-Stöße die Fragmentierung wesentlich beeinflusst.
- Es wurde auch ein zusätzlicher gepulster Gaseinlass realisiert, der es erlaubt reaktive Gase nach der Massenselektion zuzuführen.
- Die internen Abläufe des Massenspektrometers mussten mit dem Laser synchronisiert werden. Zur Synchronisierung des Massenspektrometers mit der externen Mess-Elektronik war es nötig, internes Signal des Massenspektrometers nach außen zu führen, elektronisch umzusetzen und auszuwerten.
- Die geringe Größe der Ionenwolke und die geringe Teilchenzahl machen ein manuelles Justieren der Spiegel schwierig. Aus diesem Grund wurde eine durch einen Computer positionierbare Spiegelhalterung gebaut. Diese Halterung erlaubt eine Computerunterstützte Justage.
- Für die Harmonischen des Nd:YAG-Lasers (266 nm und 213,5 nm) wurde ein verrohrter Strahlengang aufgebaut. Die Justage des Nd:YAG-Lasers konnte mit einem Ne-Ne-Hilfslaser perfekt reproduzierbar gestaltet werden.

Mit diesen umfangreichen Änderungen und komplexen Aufbauten konnten dann photoinduzierte Fragmentierungsspektren von protonierten Substanzen wie Aminosäuren und Peptiden, die eine geschlossene Elektronenschale besitzen, aufgenommen werden.

Ziel war es einen Einblick in die Photofragmentierungsmechanismen von Peptiden in Abhängigkeit von der Größe und der eingestrahnten Wellenlänge zu gewinnen. Da nur die

geladenen Fragmente massenspektrometrisch erfassbar sind, ist die Frage nach dem Ort der Ladung und nach der Stelle der Dissoziation des Molekülions von grundlegender Bedeutung. Um diese Fragestellung möglichst detailliert zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit bevorzugt kleine Peptide, die nur eine Ladung tragen können, einfache Aminosäuresequenzen mit nur einer aromatischen Seitenkette am C-Terminus (hier Trp) analysiert. Dabei wird als einziger Molekülparameter nur die Kettenlänge verändert. Diese Peptide wurden zum großen Teil selbst synthetisiert und gereinigt.

Aus Photofragmentierungsspektren konnten Aussagen über den Ort der Protonierung in Peptiden gewonnen werden. Gemäß dem Gefühl des Chemikers stehen drei Positionen in der Peptidkette für die Protonierung zur Verfügung:

- i. der N-terminus
- ii. die Peptidbindung (Bindung zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff und dem Amid-Stickstoff)
- iii. die Seitenketten mit basischen funktionellen Gruppen

Wie die Photofragmentierung von $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$ zeigt (siehe Abb. 4.21b), ist das intensivste Photofragment die Masse 205 Da (protoniertes Trp), das Y_1 -Fragment. Für seine Erzeugung gibt es zwei mögliche Positionen, an der das Proton sitzt:

- (1) Das Proton sitzt am N-terminus und ist beweglich (siehe Abb. 5.1a).
- (2) Das Proton sitzt in der Nähe der Peptidbindung neben dem Chromophor (siehe Abb. 5.1b).

Bei Oligopeptiden größerer Kettenlänge wie zum Beispiel dem $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$ findet man bei Photofragmentierung jedoch ein B_n -Fragment als das Hauptfragment. Dies wird als Beweis gewertet, dass in längeren $\text{NH}_2\text{-Leu}_n\text{-Trp-OH}$ Peptiden das Proton wahrscheinlich am N-Terminus angelagert wird und nur bedingt beweglich ist. Bei $\text{H-Leu}_2\text{-Trp-OH}$ und $\text{H-Leu}_3\text{-Trp-OH}$ findet der Übergang statt und es sind beide Fragmentierungskanäle zu beobachten. Neben der stoßinduzierten Fragmentierung mit vielen He-Stößen wurden Photoanregungen mit 285 nm, mit 266 nm mit 213, 5 nm und mit fs-Multiphoton-IR-Anregung bei 800 nm durchgeführt und deren Ergebnisse verglichen.

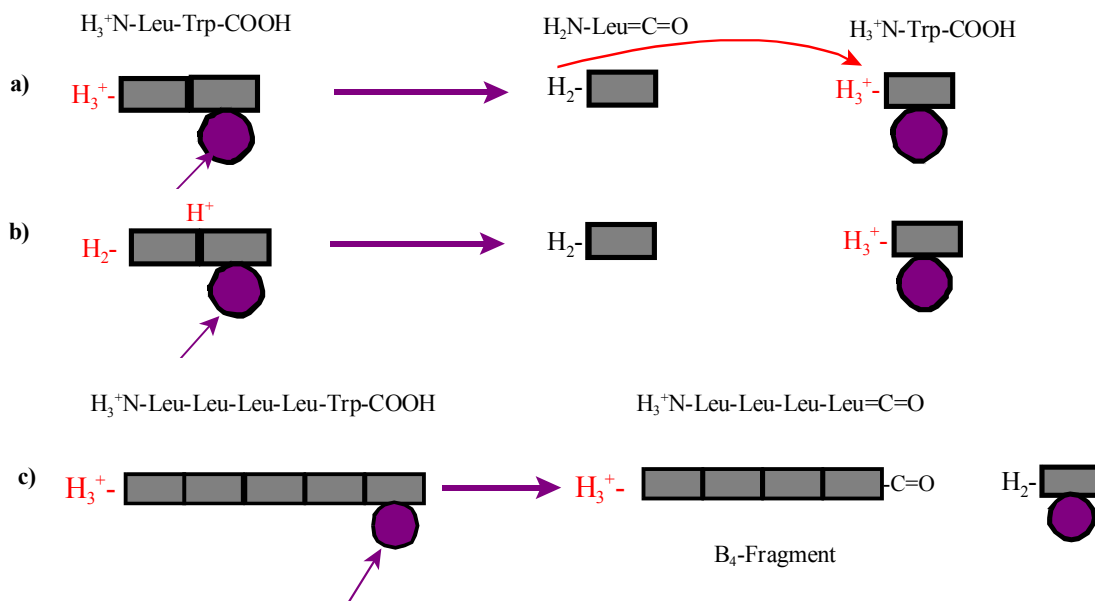


Abb. 5.1: Protoniertes $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$ a) Protonierung am N-Terminus: Für die Fragmentierung muss das Proton wandern. b) Protonierung in der Nähe der Peptid-Bindung. c) Protoniertes $\text{NH}_2\text{-Leu}_4\text{-Trp-OH}$: Wir beobachten keinen Protontransfer zum C-terminalen Trp.

Bei CID mit He wird die Energie in kleinen Portionen zugeführt, was meist nur zur Dissoziation aus den niedrigsten Fragmentierungskanälen führt. Die Fragmente reichen im Allgemeinen bei CID nicht aus, um die Sequenz eines Peptids zu erschließen. Bei der Photoanregung mit UV-Licht wird sehr viel Energie in einem Schritt zugeführt. Damit wird eine breitere Vielfalt von Fragmenten erzeugt, die bei allen untersuchten Peptiden eine Sequenzanalyse erlaubte. Wie der Nachweis von Radikalen zeigt, gibt es offensichtlich auch die Möglichkeit zur direkten Fragmentierung aus einem angeregten elektronischen Zustand. Bei der Anregung mit 285 nm wird der Chromophor Trp in der Nähe des Ursprungs angeregt. Man erzeugt dadurch einen „kalten angeregten Zustand“. Bei Anregung mit 266 nm wird Trp zu höheren Schwingungszuständen des S_1 angeregt oder sogar der S_2 erreicht. Es wird also ein heißer elektronisch angeregter Zustand erzeugt. Der Vergleich der Massenspektren zeigt jedoch, dass die interne Schwingungsenergie im angeregten elektronischen Zustand offensichtlich kein wichtiger Parameter ist, da die Massenspektren für die Anregungen mit beiden Wellenlängen bis auf Intensitätsunterschiede der Fragment-*peaks* sehr ähnlich sind.

Diese Intensitätsunterschiede sind nicht signifikant und können durch unterschiedliche Intensitäten der beiden Laserstrahlungen oder durch einen unterschiedlichen Überlapp der Laser mit den Ionen erklärt werden.

Bei Anregung mit 213,5 nm können theoretisch neben dem aromatischen Chromophor auch die nicht-aromatischen Bereiche der Peptide angeregt werden. Man hoffte, dass deshalb die Fragmente aus verschiedenen Bereichen des Moleküls kommen und die Anregungseffizienz mit der Anzahl der Aminosäuren steigt. Am Beispiel des Tripeptids $\text{NH}_2\text{-Leu-Leu-Leu-OH}$ konnten wir zeigen, dass bei dieser Wellenlänge auch die nicht-aromatischen Aminosäuren absorbieren und fragmentieren. Für die Modellpeptide, für Gramicidin A und auch für Cytochrom C finden wir bei sonst gleichen Bedingungen eine deutlich erhöhte Fragmentierung bei 213,5 nm im Vergleich zur Anregung mit 266 nm. Die Anregung mit 213,5 nm ist also sehr viel versprechend, da insbesondere die Absorption bei dieser Wellenlänge mit der Anzahl der Aminosäuren skaliert und nicht auf die Anwesenheit von aromatischen Aminosäuren angewiesen ist.

Von 285 über 266 zu 213,5 nm wird zunehmend mehr Energie (285 nm: 4,32 eV; 266 nm: 4,66 eV; 213,5 nm: 5,8 eV) in einem Schritt in die Molekülionen eingekoppelt, so dass zu erwarten ist, dass von niedrigen zu höheren Energien andere Fragmentierungen auftreten können. Während sich für die Wellenlängen 285 nm und 266 nm praktisch keine Änderungen zeigen, werden bei 213,5 nm in kleinen Peptiden auch Radikalkation-Fragmente des Tryptophans, vermutlich direkte Dissoziationen aus dem angeregten Zustand, beobachtet.

Mit intensivem IR Licht aus fs-Lasern (mehr als 10^{12} W/cm^2 ; 800 nm: 1,55 eV) ist es möglich nicht-resonante Anregungen durchzuführen. Unsere Hoffnung war es deshalb, dass die IR-Multiphotonen-Anregung möglicherweise überall und von aromatischen Gruppen unabhängig erfolgt. Zudem erwarteten wir, dass in einer Multiphotonen-Anregungssequenz (ein Laserschuss) mehr Energie als bei der UV-Anregung eingekoppelt werden kann. Die Massenspektren mit dieser Anregungsmethode zeigten oft kleine Fragmente des Chromophors oder Fragmente, die den Chromophor enthalten. Es sieht also so aus, als ob die IR-Multiphotonen-Anregung ebenfalls bevorzugt am Chromophor ansetzt. Die Beobachtung von doppelt geladenen Mutterionen für Gramicidin A zeigt, dass mit dem IR-Laserpuls in Gegenwart einer positiven Ladung nochmals ionisiert werden konnte. Offensichtlich ist der erste nicht-resonante Schritt der Engpass der IR-Multiphoton-Anregung (für Trp ein Drei-Photonen-Schritt) und da die Weiterabsorption immer resonant ist, ist sie nicht mehr steuerbar: Bis zum Ende des Laserpulses (Laserpulsdauer 27 fs) werden weitere Photonen absorbiert.

Insgesamt ist das Ziel erreicht und mit der Anregung bei 213,5 nm eine Photofragmentierungs-Methode für Peptide gefunden, deren Effizienz mit der Anzahl der Aminosäuren zunimmt und die auch für Proteine sehr viel versprechend ist. Es hat sich aber auch gezeigt, dass die Kombination der Photoanregung mit einem ESI-Einlass Probleme aufwirft, da durch die vielen Ladungen in großen Peptiden oder Proteinen und die daraus resultierende komplexe Statistik der Aufteilung der Ladungen auf die Fragmente praktisch nicht interpretierbare Fragmentspektren entstehen. Hier schlagen wir eine Kombination der Laseranregung mit der MALDI-Methode vor, da hier die Mutterionen bevorzugt nur eine Ladung besitzen: Als Folge können alle Fragmente nur einfach geladen auftreten was die Massenspektren ganz wesentlich vereinfacht.

Des Weiteren hat sich gezeigt, dass die Paul-Falle als Massenselektor und Massenanalysator an seine Grenzen stößt: Kleinere Fragmente können nicht mehr nachgewiesen werden, da die Massenbandbreite der Falle dies nicht mehr zulässt. Mehrfachgeladene Mutterionen können nicht mehr vollständig isoliert werden, vermutlich ein Artefakt der Tatsache, dass immer noch viele Lösungsmittelmoleküle in die Falle kommen (*in line* Anordnung der Falle bezogen auf die Einlassöffnung) und dort energetische Stöße mit den Ionen verursachen. Wir schlagen deshalb eine Massentrennung durch ein Flugzeitmassenspektrometer vor, von dem bekannt ist, dass es einen sehr großen Massenbereich mit höchster Empfindlichkeit analysieren kann.

Die erzeugten Ionen sind intern sehr heiß und werden bei Transfer schon fragmentiert. Für eine schwingungsaufgelöste Spektroskopie ist gerade bei großen Molekülen, wegen der nieder-frequenten Schwingungen, der vielen internen Freiheitsgrade und mehrerer Konformeren eine Kühlung nötig. Theoretisch kann die Temperatur des He bis auf 70 K oder tiefer abgekühlt werden. Da durch Stöße mit dem neutralen Molekülstrom (N_2 , H_2O etc.) aus dem Einlassbereich die Temperatur der Ionen wieder erhöht wird, sollte ein Unterbrecher für den Molekülstrom eingebaut werden. Dieser magnetoelektrisch bewegte mechanische Unterbrecher wurde bereits entwickelt und zusammengebaut, konnte aber aus Zeitgründen nicht mehr getestet werden. Durch die Kühlung könnte die Auflösung von optischen Spektren wesentlich verbessert werden und auch Daten zur Dynamik und Geometrie gewonnen werden.

6. Literaturverzeichnis

- 1) J.J. Thomson, Phil. Mag., 1899, **48**, 547.
- 2) J.V. Iribarne, B.A. Thomson, J. Chem. Phys. 1976, **64**, 2287.
- 3) B.A. Thomson, J.V. Iribarne, J. Chem. Phys. 1979, **71**, 4451.
- 4) S.A. Carr, M.E. Hemling, M.F. Bean, Anal. Chem. 1991, **63**, 2802.
- 5) R.D. Suenram, F.J. Lovas, J. Mol. Spectrosc. 1978, **72**, 372.
- 6) P.H. Cannington, N.S. Ham, J. Electr. Spectrosc. 1979, **15**, 79.
- 7) T. R. Rizzo, Y.D. Park, D.H. Levy, J. Am. Chem. Soc. 1985, **107**, 277.
- 8) C. Desfrancois, H. Abdoul-Carime, J.P. Schermann, J. Chem. Phys. 1996, **104**, 7792.
- 9) H.D. Beckey, Principles of Field Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry. Pergamon, Oxford, **1977**.
- 10) M. Karas, F. Hillenkamp, Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1987, **78**, 53.
 - a) M. Karas, F. Hillenkamp, Anal. Chem. 1988, **60**, 2299.
 - b) F. Hillenkamp, M. Karas, R.C. Beavis, B.T. Chait, Anal. Chem. 1991, **63**, 1193A.
- 11) M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick, A.N. Tyler, Nature 1981, **293**, 270.
- 12) M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick, A.N. Tyler, J. Chem. Soc. Commun. 1981, **7**, 325.
- 13) R.E. Honig, J. Appl. Phys. 1958, **29(3)**, 549.
- 14) A. Benninghoven, Surf. Sci. 1973, **35**, 427.
- 15) D.F. Torgerson, R.P. Skowronski, R. Macfarlane, Biophys. Res. Commun. 1976, **60**, 616.
- 16) M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, F. Hillenkamp, Angew. Chem. 1989, **101**, 805.
- 17) M. Dole, L.L. Mack, L.D. Ferguson, R.L. Hines, R.C. Mobley, M.B. Alice, J. Chem. Phys. 1968, **49**, 2240.
- 18) M. Yamashita, J.B. Fenn, J. Phys. Chem. 1984, **88**, 4451.
- 19) J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, Science, 1989, **246**, 64.
- 20) M.L. Alexandrow, L.N. Gall, V.N. Krasnov, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1984, **277**, 379.
- 21) M. Karas, U. Bahr, F. Hillenkamp, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 1987, **8**, 2.

- 22) R.C. Dunbar, J. Am. Chem. Soc. 1971, **93**, 4354.
- 23) B.S. Freiser, J.L. Beauchamp, J. Am. Chem. Soc. 1977, **99**, 3214.
- 24) W. Paul, O. Osberghaus, E. Fischere, Forschungsberichte des Wirtschaftsministeriums Nordrhein-Westfalen, **1958**.
- 25) Lord Rayleigh, Philos. Mag. 1882, **14**, 184.
- 26) W.J. Griffiths, A.P. Jonsson, S. Liu, D.K. Rai, Y. Wang, Biochem. J. 2001, **355**, 545.
- 27) G.I. Taylor, Proc. Roy. Soc. London Ser. A, 1964, **280**, 383.
- 28) A. Gomez, K. Tang, Phys. Fluids, 1994, **6**, 404.
- 29) P. Kerbarle, Y. Ho, Elektrospray Ionization Mass Spectrometry – Fundamentals, Instrumentation and Applications, R. B. Cole (Ed.) Wiley, New York, **1997**.
- 30) P. Kebarle, J. Mass Spectrom. 2000, **35**, 804.
- 31) A.P. Bruins, J. Chromatogr. A. 1998, **794**, 345.
- 32) F.W. Röllgen, E Bramer-Weger, L. Bütfering, J. Phys. 1987, **48**, 253.
 - a) G. Schmelzeisen-Redker, L. Bütfering, F.W. Röllgen, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 1989, **90,2**, 139.
 - b) H. Nehring, S. Thiebes, L. Bütfering, F.W. Röllgen, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 1993, **128,3**, 123.
- 33) L.B. Loeb, A.F. Kip G.G. Hudson, W.H. Bennet, Phys. Rev. 1941, **60**, 714.
- 34) M. Labowsky, J.B. Fenn, J. Fernández de la Mora, Anal.Chim. Acta, 2000, **406**, 105.
 - a) R. Guevremont, K.W.M. Siu, J.C.Y. Le Blanc, S.S.J. Berman, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1992, **3**, 216.
 - b) J.C.Y. Le Blanc, R. Guevremont, K.W.M. Siu, Int. J. Mass Spectrom. 1993, **125**, 145.
- 35) J.V. Iribarne, B.A. Thomson, J. Chem. Phys. 1976, **64**, 2287.
- 36) B.A. Thomson, J.V. Iribarne, J. Chem. Phys. 1979, **71**, 4451.
- 37) S.J. Gaskell, J. Mass Spectrom. 1997, **32**, 677.
- 38) J.B. Fenn, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1993, **4**, 524.
- 39) P. Kerbarle, L. Tang, Anal. Chem. 1993, **65**, 972A.
- 40) P. Kerbarle, M. Peschke, Anal. Chim. Acta. 2000, **406**, 11.
- 41) S. Zhou, K.D. Cook, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2000, **11**, 961.
- 42) S. Zhou, K.D. Cook, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2001, **12**, 206.
- 43) J.A. Loo, C.G. Edmonds, H.R. Udseth, R.D. Smith, Anal. Chem. 1990, **62**, 693.
- 44) L. Konermann, D.J. Douglas, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1998, **9**, 1248.

- 45) B.E. Winger, K.J. Light-Wahl, R.R. Ogorzalck Loo, H.R. Udseth, R.D. Smith, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1993, **4**, 536.
- 46) R.D. Smith, K.L. Light-Wahl, Biol. Mass Spectrom. 1993, **22**, 493.
- 47) G. Wang, R.B. Cole, Anal. Chim. Acta 2000, **406**, 53.
 - a) M. Gamero- Castaño, J. Fernández de la Mora, Anal. Chim. Acta 2000, **406**, 67.
 - b) J. Fernández de la Mora, Anal. Chim. Acta 2000, **406**, 93.
- 48) G.J. Van Berkel, F. Zhau, Anal. Chem. 1994, **66**, 3408.
 - a) G.J. Van Berkel, F. Zhau, Anal. Chem. 1995, **67**, 2916.
 - b) G.J. Van Berkel, F. Zhau, Anal. Chem. 1995, **67**, 3643.
 - c) G.J. Van Berkel, F. Zhau, Anal. Chem. 1995, **67**, 3958.
- 49) R. Chen, X. Cheng, D.W. Mitchel, S.A. Hofstadler, A.L.R. Qinyuan Wu, M.G. Sherman, R.D. Smith, Anal. Chem. 1995, **67**, 1159.
- 50) W. Paul, H. Steinwedel, Zeitung für Naturforschung, 1953, **8a**, 448.
- 51) R.J. Cotter, Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1989, **18**, 513.
- 52) W. Paul, H. Steinwedel, US Patente, 2939952, **1960**.
- 53) G.C. Stafford, P.E. Kelley, J.E. Syka, W.E. Reynolds, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 1984, **60**, 85.
- 54) Raymond E. March, John F.J. Todd, Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry, Vol.I CRC Press **1995**.
- 55) C.L. Wilkins, Anal. Chem. 1990, **50**, 493A.
- 56) S.C. Beu, M.W. Senko, J.P. Quinn, F.W. McLafferty, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1993, **4**, 190.
- 57) P. Edman, G. Begg, Euro. J. Biochem. 1966, **1**, 80.
- 58) R.N. Hayer, M.L. Gross, Methods Enzymol. 1990, **193**, 237.
- 59) E.W. Schlag, R.D. Levine, Chem. Phys. Lett. 1989, **163.6**, 523.
- 60) L.L. Griffin, D.J. McAdoo, J. Am. Soc. Mass Spectrom 1993, **4**, 11.
- 61) P. Roepstorff, J. Fohlman, J. Biomed. Mass Spectrom. 1984, **11**, 601.
- 62) D.R. Mueller, M. Eckersley, W.J. Richter, J. Org. Mass Spectrom. 1988, **23**, 217.
- 63) P.T.M. Kenny, K. Nomoto, R. Orlando, Rapid Comm. Mass Spectrom. 1992, **6**, 95.
- 64) S.A. Carr, M.E. Hemling, M.F. Bean, G.D. Roberts, Anal. Chem. 1991, **63**, 3587.
- 65) K.L. Busch, G.L. Glish, S.A. McLuckey, Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry. Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry, VCH Publishers, New Youk, **1988**.
- 66) B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann, Rapid Comm. Mass Spectrom. 1991, **5**, 198.

- 67) Y.M.Eva Fung, F. Kjekdsen, O.A. Silivra, T.W. Dominic Chan, A. Zubarev, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, **44**, 6399.
- 68) W.D. Price, P.D. Schnier, E.R. Williams, *Anal. Chem.* 1996, **68**, 859.
- 69) K. Paech, R.A. Jockusch, E.R. Williams, *J. Phys. Chem. A.* 2002, **106**, 9761.
- 70) Z. Guan, N.L. Kelleher, P.B. O'Connor, D.J. Aaserud, D.P. Little, F.W. McLafferty, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 1996, **157/158**, 357.
- 71) R.A. Zubarev, N.L. Kelleher, F.W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, **120**, 3265.
- 72) *Femtochemistry: With the nobel Lecture of A. Zewail*, Eds: F.C. De Schryver, S. de Feyter, G. Schweitzer, Wiley, London, **2001**.
- 73) G. Stock, W. Domcke in "Femtosecond time-resolved spectroscopy of the dynamics at conical intersecons: Electronic Structure, Dynamics and Spectroscopy" Eds.: W. Domcke , D.R. Yarkony, H. Köppel, World Scientific, Singapore **2002**.
- 74) I.V. Hertel, W. Radloff, *Rep. Prog. Phys.* 2006, **69**, 1897.
- 75) A.S. Danell, J.H. Parks, *Int. J. Mass Spectrom.* 2003, **229**, 35.
- 76) W.J. Moore, D.O. Hummel, *Physikalische Chemie*, de Gruyter, 4 ed., **1986**.
- 77) H. el Aribi, G. Orlova, A.C. Hopkins, K.W.M. Siu, *J. Phys. Chem. A*, 2004, **118/119**, 3844.
- 78) *Priciples of Fluorescence Spectroscopy*, Ed.: J.R. Lakowicz, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, **1999**.
- 79) A. Kamariotis, O.V. Boyarkin, S. Mercier, R.D. Beck, M.F. Bush, E.R. Williams, T.R. Rizzo, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, **128**, 905.
- 80) *Higher excited states of polyatomic molecules*, Ed.: M.B. Robin, Academic Press, New York, **1975**.
- 81) E.R. Williams, J.J.P. Furling, W. McLafferty, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1990, **1**, 288.
- 82) G. Petty, C. Tai, F.W. Dalby, *Phys. Rev. Lett.* 1975, **34**, 1207.
- 83) P.M. Johnson, C.E. Otis, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1981, **32**, 139.
- 84) M. Rožman, S. Kazazić, L. Klasnic, D. Srzić, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 2003, **17**, 2769.
- 85) K. Schwetlick, *Organikum-Organisch chemisches Grundpraktikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin. **1990**.
- 86) R.E. March, *J. Mass Spectrom.*, 1997, **32**, 351.
- 87) U. Brackmann, *Lambdachrome Laser Dyes*, Lambda Physik, 2 ed., **1997**.
- 88) T.R. Rizzo, L.P.Young D. Park, D.H. Levy, *J. Chem. Phys.* 1985, **83**, 4819.

- 89) T.R. Rizzo, L.P. Young D. Park, D.H. Levy, J. Chem. Phys. 1986, **84**, 2543.
- 90) Y. D. Park, T.R. Rizzo, L.A. Peteanu, D.H. Levy, J. Chem. Phys. 1986, **84**, 6539.
- 91) Z.B. Maksić, B. Kovačević, Chem. Phys. Lett., 1999, **307**, 497.
- 92) L.C. Snoek, R.T. Kroemer, M.R. Hockridge, J.P. Simons, Phys. Chem. Chem. Phys. 2001, **3**, 1819.
- 93) D. Nolting, C. Marian, R. Weinkauff, Phys. Chem. Chem. Phys. 2004, **6**, 2633.
- 94) H. Lioe, R.A.J. O'Hair, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2004, **15**, 65.
- 95) H. el Aribi, G. Orlova, A.C. Hopkins, K.W.M. Siu, J. Phys. Chem. A, 2004, **108**, 3844.
- 96) H. Kang, C.D. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, S. Martrenchard, G. Grégoire, C. Desfrancoise, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, Phys. Chem. Chem. Phys., 2004, **6**, 2628.
- 97) R. Weinkauff, P. Schanen, A. Metsala, E.W. Schlag, J. Phys. Chem. 1996, **100**, 18567.
- 98) NIST, Chemistry WebBook Standard Reference Database, **69**, 2003.
- 99) T.R. Rizzo, Y.D. Park, L.A. Peteanu, D.H. Levy, J. Chem. Phys. 1986, **84**, 2534.
- 100) R. Weinkauff, E.W. Schlag, T. J. Martinez, R.D. Levy, J. Phys. Chem. A, 1997, **101**, 7702.
- 101) W.J. Moore, D.O. Hummel, Physikalische Chemie, de Gruyter, 4 ed. **1986**.
- 102) G.A.W. Milne, T. Axenrod, H.M. Fales, J. Am. Chem. Soc. 1970, **92**, 5170.
- 103) J.S. Klassen, P. Kebarle, J. Am. Chem. Soc. 1997, **119**, 6552.
- 104) F. Rogalewicz, Y. Hoppilliard, G. Ohanessian, Int. J. Mass spectrom. 2000, **195/199**, 565.
- 105) W. Kulik, W. Heerma, Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1988, **15**, 419.
- 106) G. Bouchoux, S. Boucier, Y. Hoppilliard, C. Mauriac, Org. Mass Spectrom. 1993, **28**, 1064.
- 107) T. Yalcin, C. Khouw, I.G. Csizmadia, M.R. Peterson, A.G. Harrison, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1995, **6**, 1165.
- 108) D. Nolting, T. Schultz, I.V. Hertel, R. Weinkauff, Phys. Chem. Chem. Phys. **2006**, in Print.
- 109) O.V. Boyarkin, S.R. Kamariotis, T.R. Rizzo, J. Am. Chem. Soc. 2006, **128**, 2816.
- 110) N.N. Dookeran, t. Yalcin, A.G. Harrison, J. Mass Spectrom. 1996, **31**, 500.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

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

Herrn PD Dr. M. Schmitt für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. D. Nolting für die zahlreichen kritischen Diskussionen.

Allen Angehörigen des Arbeitskreises für die freundliche und stets lebendige Arbeitsatmosphäre und vielen hilfreichen Diskussionen.

Meinen Eltern, meiner Frau, die mich jederzeit nach Kräften unterstützt haben und mir stets Rückhalt gewesen sind.