

Test nicht kommerzieller Fragmentierungsmethoden an organischen Molekülen und Oligopeptiden

Inaugural Dissertation

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

vorgelegt von

Andreas Wolters

aus Tönisvorst

Düsseldorf, Februar 2020

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

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Rainer Weinkauff
2. Prof. Dr. M. Schmitt

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.05.2020

Meiner Frau

Erklärung

Hiermit versichere ich, Andreas Wolters, Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Diese Dissertation wurde bisher weder im In- noch im Ausland als Prüfungsarbeit vorgelegt.

Düsseldorf, 15. Februar 2020

Ort, Datum

Andreas Wolters

Danksagung

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

Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Herrn Prof. Dr. R. Weinkauff für die freundliche, verlässliche und ausdauernde Betreuung, die in meiner Vertiefungsphase ihren Anfang nahm, über die Diplomarbeit und letztendlich hin zur Dissertation führte.

Herrn Prof. Dr. M. Schmitt für die Übernahme des Korreferats.

den Herren Dr. Fabian, Drenkow, Dr. Paul Konieczny, Bernd Kasper, Dr. Stefan Vossköter, Frau Bettina Deckert und Herrn Daniel Schlapper mit denen das Arbeiten in einem guten sowie wie entspannten Arbeitsklima möglich war und deren Gespräch privater und fachlicher Natur unterhaltsam waren.

Frau Dr. Nadine Wolters, die mich zu Beginn meiner Arbeit unter ihre Fittiche genommen hat und so mir den Einstieg enorm vereinfacht hat.

Den freundlichen stets zuverlässigen Mitarbeitern der Feinmechanik-Werkstatt, die mir so manch Nützliches angefertigt haben.

Letztendlich besonders meiner Frau, ihrer Familie und meiner Mutter für die jahrelange Unterstützung, auch in schwierigen Zeiten. Auch gilt der Dank an meiner restlichen Familie.

Abstract

In der vorliegenden Arbeit werden spezielle Methoden zur Fragmentierung von Peptiden in einem Massenspektrometer genutzt, um dem Ziel einer vollständigen Sequenzanalyse von Peptiden näher zu kommen. Bisherige Experimente zu diesem Thema verwendeten meist kommerzielle Methoden wie die Stoßfragmentierung oder auch die etwas seltenere Photofragmentierung mit einer Laseranregungs-Wellenlänge von 193 nm. Letztere Methode erzeugt typischerweise Massenspektren, die eine breite Lücke zwischen Mutterion und den Fragmenten aufweisen, d.h. es treten nicht alle Fragmentationen auf, die für eine Sequenzanalyse nötig sind. Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es diese Lücke zu schließen. Resultierend aus der RRKM-Theorie und Überlegungen zum Energieeintrag in das Peptid wurde vermutet dass primäre Fragmente genügend interne Energie haben, um einen sekundären Zerfall durchzuführen. Um den meist langsamen zweiten Zerfalls-Prozess zu stoppen, wurde eine Methode entwickelt, um die nach der Anregung vorhandene überschüssige interne Energie schnell abzuführen. Dazu wurden in einer Ionenfalle Peptide gefangen, mit einem Laser angeregt und mit einem Helium-Gaspuls gekühlt, um die nach einer schnellen ersten Fragmentierung sonst auftretende sekundäre Fragmentierung zu verhindern.

Ein zweites Ziel war es die *charge transfer dissociation* (CTD), wie sie bei der Wechselwirkung von Peptiden mit Projektilionen auftreten kann, zu untersuchen. Diese ungewöhnliche Methode nutzt schnelle Kationen (Projektilionen) mit hoher Ionisierungsenergie, um eine Fragmentation in den protonierten und deprotonierten Peptiden einzuleiten. Das Interessante an der CTD-Methode ist die Veränderung der Ladungszahl der protonierten/deprotonierten Peptide und der damit einhergehenden erzeugten Radikalstelle im Peptid. Durch die Anwesenheit dieser Radikalstelle, die quasi eine Sollbruchstelle ist, erhofft man sich ein neues Fragmentierungsmuster von den Peptiden zu erhalten. In Anbetracht der Erzeugung eines Elektronenlochs an schon protonierten Systemen mittels CTD, ergibt sich die Problematik der Coulomb Abstoßung. Die Abstoßung gleicher Ladungen führt zur Frage an welcher Stelle im Molekül der Ladungstransfer stattfindet bzw. stattfinden kann. So wurden zum besseren Verständnis der CT-Prozesse an neutralen Peptidbereichen, die

schnellen Kationen auch auf neutrale Moleküle angewendet. Neben der Fragmentierung hatten die schnellen Kationen nun auch die Aufgabe der Ionisation der Moleküle zu leisten, damit sie detektierbar werden. Durch Variation der Projektilionen wurde versucht Resonanzeffekte zwischen Projektil und Probe sichtbar zu machen und somit Rückschlüsse auch auf einen Fragmentationsmechanismus in Peptiden geben zu können.

In the present thesis unusual methods are used for the fragmentation of peptides in a mass spectrometer in order to come closer to the goal of a complete sequence analysis of peptides. Previous experiments on this topic mostly used commercial methods such as fragmentation by He-collisions or the somewhat rarer photofragmentation with a laser excitation wavelength of 193 nm. The latter method generates mass spectra that typically show a broad gap between the parent ion and the heaviest fragments, i.e. not all fragment ions appear in the mass spectrum which are necessary for a sequence analysis. A first goal of this thesis was to close the gap in the fragmentation mass spectra. An analysis of the RRKM theory and the energy put into the peptides, indicated that often primary fragments have enough internal energy to undergo a secondary decay. To stop the slow secondary decay processes, a method was developed to remove the excess internal energy. For this purpose peptides were trapped in an ion trap, excited with a laser and cooled with a helium gas pulse to prevent secondary fragmentation.

A second goal was to study the *charge transfer dissociation* (CTD) as it can occur in the interaction of peptides with projectile ions. This unusual method uses fast cations (projectile ions) to initiate fragmentation in protonated and deprotonated peptides. The interesting thing about the CTD-method is the change in the charge number of the protonated / deprotonated peptides and the introduction of a radical site in the peptide. The hope is that the presence of this radical site enhances fragmentation and will lead to a new fragmentation pattern of the peptides. The generation of an electron hole on already protonated systems by CTD leads to the problem of Coulomb repulsion. This repulsion between charges leads to the question at which point in the molecule the charge transfer takes place or can take place. In order to better understand the CT processes at neutral peptide regions, the fast cations were also applied to neutral molecules. In addition to fragmentation, the fast cations now also have the task of ionizing the molecules so that they become detectable. By varying the type of projectile ions, resonance effects between projectile and probe were intended to be made visible and thus conclusions could be derived for the fragmentation mechanism in peptides.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	I
Danksagung	III
Abstract	V
1 Einleitung	1
2 Theorie und Methoden	3
2.1 Die moderne Massenspektrometrie	4
2.2 Das Elektrospray-Ionisation Massenspektrometer (ESI-MS)	6
2.2.1 Das Elektrospray-Verfahren	7
2.2.2 Die Paul-Falle	10
2.3 Das Flugzeitmassenspektrometer	11
2.4 Fragmentierung	14
2.4.1 Oligopeptide und Fragmentnomenklatur	15
2.4.2 Vorstellungen zu unimolekularen Reaktionen: Von den statistischen Zerfallstheorien (RRK- und RRKM-Theorie) bis zum nicht-statistischen Zerfall	21
2.4.3 Postulierte Mechanismen und Effekte	34
2.4.3.1 Ladder -/Ladder Switch -Modell	34
2.4.4 Anregungs- und Fragmentierungsmethoden	36
2.4.4.1 Stoßfragmentierung	37
2.4.4.2 Electron Capture Dissociation	39
2.4.4.3 Photofragmentierung	40
2.4.4.4 Charge-Transfer Dissociation an Peptiden	42
2.4.4.5 Electron Transfer Ionization/Dissociation an neutralen Mo- lekülen	45
2.5 Theoretische Überlegungen	48

3	Experimentelles	53
3.1	Experimente am ESI-MS	53
3.1.1	Probenpräparation	53
3.1.2	Lasereinkopplung/Gasdüse für das Kühlgas	55
3.1.2.1	Synchronisation der Komponenten	56
3.1.2.2	Kühlen durch Stoßgas	60
3.1.3	Ionenkanone	60
3.2	Experimente am selbstgebauten TOF-Massenspektrometer	62
3.2.1	Aufbau des selbstgebauten TOF-Massenspektrometer	63
4	Ergebnisse und Diskussion	65
4.1	Konsequente Fragmentierung nach Photoanregung	65
4.2	CTD an Peptiden	88
4.2.0.1	CTD an positiv geladenen Peptiden	90
4.2.0.2	CTD an negativ geladenen Peptiden	96
4.3	Elektronen Transfer Ionisation/Dissociation (ETI/D) an organischen Mole- külen	103
4.3.1	Beteiligung des <i>electronic stopping</i> -Mechanismus?	105
4.3.2	Ethanol	107
4.3.3	Toluol	111
4.3.4	Mesitylen	115
4.3.5	Anthracen	118
4.3.6	Diphenylbutadien	122
4.3.7	n-Butylbenzol	125
4.3.8	n-Hexylbenzol	128
4.3.9	Cyclohexan	131
5	Zusammenfassung und Ausblick	135
	Abkürzungsverzeichnis	139
	Literaturverzeichnis	150
	Anhang	155

1 Einleitung

Die Massenspektrometrie (MS) wurde zu einem zentralen Element in der Forschung, sowohl in der Organik, der Anorganik, der Biologie, der Medizin und in der Analytik. Hierbei ist die Ionisation von Molekülen eine essentielle Vorbedingung für die Manipulation der Moleküle in magnetischen und elektrischen Feldern mit dem Ziel die Masse oder wenigstens das Verhältnis Masse-zu-Ladung zu bestimmen. Mit der Einführung der modernen massenspektrometrischen Methoden wie Elektrospray-Ionisation (ESI) [YF84], [FMM⁺90] und Matrix-unterstützte-Laser-Desorptions-Ionisation (MALDI) [TWI⁺88] wurde erstmalig der massenspektrometrische Zugang zur Untersuchung von intakten biologisch relevanten Proben, wie Peptide und DNA, möglich. Besonders die schnelle Sequenzanalyse geringer Probenmengen von Peptiden und Proteinen mit Hilfe der Massenspektrometrie ist heute von enormer Bedeutung. Mithilfe dieser Strukturaufklärung ließen sich schon viele Prozesse verstehen, wie sie in einer Zelle ablaufen können, wie z.B. das Auftreten und die Wirkung/Funktion von Enzymen [SLE⁺90] in verschiedenen Wachstumsphasen eines Organismus. Der für eine massenspektrometrische Peptide-/Protein-Sequenzanalyse unabdingbare Prozess, ist die Fragmentierung. Dieser Fragmentierungs-Prozess benötigt sehr viel Energie, damit eine Dissoziation in einer durch das Spektrometer erfassbaren Zeit stattfinden kann. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Methoden entwickelt, die in große Moleküle genug Energie zur Fragmentierung bereitstellen können. Die am häufigsten eingesetzte Methode ist dabei die Stoßfragmentierung, bei der inerte Stoßpartner (z.B. Helium) Energie in Form von Stößen übertragen [SLB⁺90], [BEUS89]. Die benötigte Energie zur Dissoziation kann aber auch über den Einsatz eines UV-Laser, z.B. mit der Wellenlänge von 193 nm [BDHM84], [MHKB90],[WFM90], oder aber auch durch den Eintrag niederenergetischer Elektronen (ECD) [BZ00] eingebracht werden. Das Problem, das einer vollständigen Fragmentierung entgegen steht, ist die erstaunliche Stabilität dieser sehr großen Moleküle. Wegen ihrer Größe reduziert sich die Wahrscheinlichkeit der Dissoziation. Es folgt aus der statistischen unimolekularen Zerfallstheorie von Rice, Ramsberger, Kassel und Marcus (RRKM), dass wenn die in das System eingebrachte Energie über die vielen Schwingungsfreiheitsgrade des Moleküls mit Hilfe des sogenannten *internal vibra-*

tion redistribution (IVR) umverteilt werden kann, sodass in einer Bindung nicht mehr die benötigte Energie zur Dissoziation vorliegt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, möglicherweise auch unter Umgehung der RRKM-Mechanismen, mehr Fragmentierungskanäle zu erschließen bzw. direkte schnelle Dissoziationsprozesse zu finden und nachzuweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Fragestellungen zur Fragmentierung von Peptiden in einem Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometer aufgeworfen:

1. Könnte eine primäre Fragmentierung genügend Energie in den Fragmenten zurücklassen, die eine erneute sekundäre Fragmentierung nach sich ziehen könnte? Die nötige Energie für die Fragmentierung wird hier mit einem Excimer-Laser (ArF) mit einer Wellenlänge von 193 nm eingebracht. Wenn ja so könnte man durch einen Helium-Gaspuls versuchen überschüssige Energie in den Fragmenten zu "löschen".
2. Könnte das RRKM-Verhalten in großen Molekülen, wie Peptide, durch einen noch größeren Energiebetrag via *charge transfer* mit atomaren Kationen umgangen werden? Diese Methode würde auch eine Radikalstelle im Molekül erzeugen, die die Dissoziationsenergie an dieser Stelle absenken und somit eine Fragmentierung wahrscheinlicher machen würde. Die Erzeugung der atomaren Kationen erfolgt über eine konventionelle Ionenkanone. Die Ionen werden dann mit den Peptidionen zusammengeführt und die erhaltenen Massenspektren auf ihre Besonderheiten der Fragmentierung untersucht.
3. Eine weitere Überlegung resultiert aus der Frage nach der im Experiment 2 übertragenden Energie für die Fragmentierung. Da die in Punkt 2 vorangegangenen Untersuchungen im ESI-MS an protonierten bzw. deprotonierten Molekülen stattfinden, stellt sich die Frage, an welcher Stelle im Peptid der Ladungsübertrag vollzogen wird. So wurde für weitere Experimente ein neues Massenspektrometer aufgebaut, in dem die Wechselwirkung von schnellen Ionen mit neutralen Molekülen untersucht wurde. Solche Untersuchungen sind den *charge transfer*-Prozessen in Peptiden sehr ähnlich, da die Vermutung nahe lag, dass der Ladungstransfer von geladenen Peptid zu dem Projektilion in neutralen Bereich, fernab der Protonierungsstelle des Peptids stattfindet. Die Wechselwirkung von verschiedenen Projektilionen, wie H_2^+ , N_2^+ , He^+ , Ar^+ und Xe^+ (Ionenkanone aus 2.) mit neutralen Molekülen, wird in einem dafür extra gebauten Flugzeitmassenspektrometer untersucht, um bessere Erkenntnisse zur Fragmentierung via *charge transfer* zu erhalten.

2 Theorie und Methoden

In diesem Kapitel sollen die theoretischen und methodischen Grundlagen dargelegt werden, die für das Verständnis dieser Arbeit notwendig sind. Zunächst wird die Massenspektrometrie allgemein thematisiert, ehe genauer auf die hier verwendeten Methoden Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS) und die Flugzeit-Massentrennung eingegangen wird. Wie eingangs beschrieben und in Kapitel 2.4 begründet, würde eine vollständige Fragmentierung von Oligopeptiden in der Lage sein, die komplette Sequenz des Peptids zu liefern. Dabei heisst vollständig insbesondere das Auftreten aller Fragmente eines Peptids, bei der schrittweise vom N-Terminus und/oder vom C-Terminus eine Aminosäure nach der anderen abgespalten wird. Andererseits können aber große Moleküle erstaunlich stabil sein, sodass es nicht so einfach ist ihre vollständige Fragmentierung zu bekommen. Um diesen Effekt zu verstehen, wird hier die RRKM-Theorie dargelegt und insbesondere ihre Anwendung auf Peptide und sehr große Moleküle diskutiert. Bisherige Fragmentierungsmethoden liefern noch unbefriedigende Ergebnisse und funktionieren bis maximal zu einer Masse von 6000 Da. Für diese Arbeit werden zwei verschiedene sehr selten angewandte Methoden zur Fragmentierung von Peptiden und Oligopeptiden verwendet und erforscht. Zum Einen wäre das die Photofragmentierung mittels eines ArF-Excimer-Lasers mit der Wellenlänge von 193 nm. Dabei wurde auch versucht mittels eines Stoßgases zwischen prompten und verzögerten Fragmentierungsprozessen zu unterscheiden. Zum Anderen wurden Peptidionen in einer Paulfalle schnellen Edelgasionen aus einer Ionenkanone ausgesetzt in der Hoffnung, dass mit Ihnen eine Anregung und Fragmentierung möglich ist. Um die Mechanismen in solchen Prozessen besser zu verstehen zu können, wurden in Flugzeitexperimenten verschiedene schnelle Ionen wie Edelgase und molekularer Stickstoff und Wasserstoff auch zur Ionisation und Dissoziation genutzt. Die schnellen Ionen wurden dazu mit neutralen organischen, meist aromatischen Molekülen in Wechselwirkung gebracht. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Fragmentierungskanäle, die in diesem Kapitel vorgestellt und näher erläutert werden sollen.

2.1 Die moderne Massenspektrometrie

Die moderne Massenspektrometrie ist eine der wichtigsten Analysetechniken, in der unbekannte biologische Substanzen oder auch andere organische und anorganische Substanzen schnell und mit hoher Empfindlichkeit untersucht werden können. Zu den biologisch essenziellen Substanzen zählen insbesondere Peptide, Proteine und DNA-Ketten. Das der Massenspektrometrie zu Grunde liegende Prinzip beruht auf der Trennung von geladenen Molekülen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) mit elektrischen oder magnetischen Feldern [Gri08]. Grundsätzlich haben alle Massenspektrometer (MS) den selben konzeptionellen Aufbau.

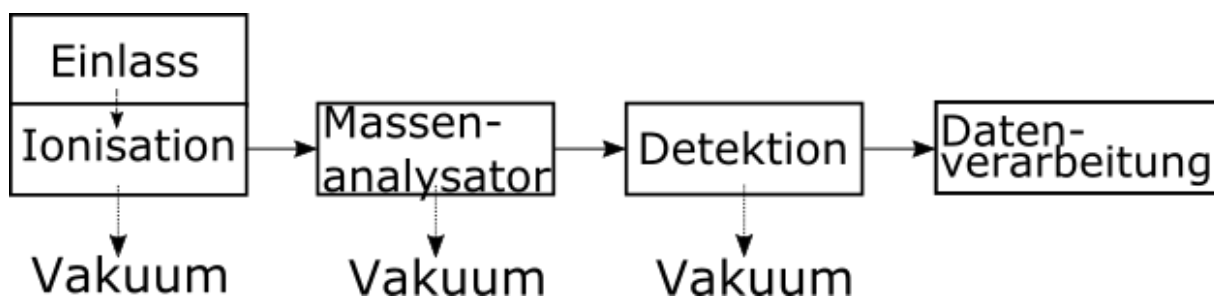


Abbildung 2.1: Ein MS besteht generell aus einem Einlasssystem, einer Ionisationskammer, einem Bereich für die Massenselektion sowie aus einem System für die Datenerfassung.

Im Einlass des Massenspektrometers wird die Probe zugeführt. Hierbei kann die Probe zunächst jeglichen Aggregatzustand (fest, flüssig oder gasförmig), je nach Art des Massenspektrometers, haben. Aber allen Arten der Massenspektrometrie ist gemeinsam, dass die zu untersuchenden Moleküle in die Gasphase überführt werden müssen. Dieser Schritt ist besonders kritisch für biologische Proben, da diese typischerweise durch thermische Einwirkung zersetzen werden, also durch einfaches Heizen nicht intakt in die Gasphase überführt werden können. Bei biologischen Proben erfolgt gleichzeitig mit dem Einlass der Probe auch die Ionisation der Probenmoleküle. Die als neutrale intakt in die Gasphase überführten Moleküle können mit verschiedenen Verfahren ionisiert werden. Hierfür können sowohl schnelle Elektronen oder ein gepulster Laser genutzt werden, um die Moleküle zu ionisieren. Bis heute gängige Methoden zur Ionisation der thermisch stabilen Probenmoleküle sind u.a. die Elektronenstoßionisation (EI) [FF70], die aber nur bisher für relativ kleine thermisch stabile Moleküle angewendet wird. Die Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI) (*matrix assisted laser desorption ionisation*) [TWI⁺88],

[KH88] und die Elektrospray-Ionisation (ESI) [FMM+90], [YF84] sind sanfte Methoden, um biologische Moleküle in die Gasphase zu bringen und mit wenig Fragmentierung zu ionisieren. Mit diesen beiden Verfahren können sehr große thermisch labile Moleküle, wie DNA, Proteine und Polymere in die Gasphase überführt und durch Protonierung und Deprotonierung ionisiert werden.

Nach der Ionisation erfolgt die Massentrennung der geladenen Probenmoleküle. Im Laufe der Zeit sind verschiedene Massenanalysatoren entwickelt wurden. So wird zum Beispiel die Flugzeit der Ionen genutzt, um eine Aussage über deren Masse-zu-Ladungsverhältnis zu geben. Zum Anderen können elektrische - oder magnetische Felder, sowie elektrische Wechselfelder für die Auftrennung der Probenionen genutzt werden. Zu den wichtigsten Methoden zählen neben der Flugzeit-Trennung der Massen (*time of flight*-MS) die Nutzung von zwei- bzw. drei-dimensionalen Ionenfallen, wie Quadrupolfallen oder auch die Paulfalle (auch Ionenfalle). Die nach ihrer Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennten Probenionen werden dann detektiert und das Signal im Computer gespeichert und ausgewertet. Für die Detektion werden meist sogenannte Sekundärelektronenvervielfacher genutzt. Zu den Sekundärelektronenvervielfachern zählen u.a. die Microkanalplatten (MCP) und das *channeltron*. Diese Teilchen-Detektoren werden genutzt um das elektrische Signal eines Einzelteilchens um ein Vielfaches zu verstärken. So können zwei hintereinander geschaltete MCPs aus einem auftreffenden Teilchen das Signal um 10^6 verstärken, während das *channeltron* eine Verstärkung zwischen 10^3 und 10^5 erreicht.

Da die klassische Ionisation mit Elektronen in dieser Arbeit keine Rolle spielt, soll sie nur bezüglich ihrer Ionisationswahrscheinlichkeit erwähnt werden. Während es Moleküle gibt, die sich sehr schwierig protonieren oder deprotonieren lassen, ist eine Ionisation mit hochenergetischen Elektronen immer möglich und hängt wohl auch mit der Größe des Moleküls zusammen (Trefferwahrscheinlichkeit). Bei der klassischen Massenspektrometrie liegt die Engstelle also bei dem Schritt neutrale Moleküle vom Festkörper in die Gasphase zu überführen, während die Engstelle für ESI und MALDI vor allem in der mangelnden Protonierungs- und Deprotonierungsfähigkeit besteht.

2.2 Das Elektrospray-Ionisation Massenspektrometer (ESI-MS)

Aus heutiger Sicht ist das erste Massenspektrometer der Wahl das ESI-MS. Wie zuvor in Kapitel 2.1 erwähnt ist das Elektrospray-Verfahren eine sanfte und effiziente Ionisationsmethode. So lassen sich Moleküle, wie die zu untersuchenden Peptide, aus einer Lösung leicht und unfragmentiert in die Gasphase überführen. In diesem Kapitel soll das in dieser Arbeit verwendete ESI-MS dargestellt werden und einzelne essenzielle Prozesse und Bauteile erläutert werden.

In der Abbildung 2.2 ist das verwendete ESI-MS schematisch dargestellt. Das Massenspektrometer ist aus fünf Kammern aufgebaut, in welchen schrittweise der Vakuum-Druck bis auf 10^{-6} mbar erniedrigt wird. Für das Sprühen der in der Regel in einer Acetonitril/Wasser-Gemisch gelösten Analytmoleküle wird in der Einlasskammer noch kein Vakuum benötigt, d.h. das in Kapitel 2.2.1 beschriebene Elektrospray-Verfahren findet unter Normalbedingungen (1 Atmosphäre [1 atm]) statt. Nach der Einlasskammer gelangen Ionen anschließend in die Kammer II (10^{-2} mbar) und Kammer III. Hier werden die Ionen durch zwei Skimmer in die Oktopolkammer (Kammer IV) geleitet.

In der Oktopolkammer befinden sich zwei Oktopole, mit denen die Ionen selektiert, geleitet (alle Ionen fliegen von Kammer III nach Kammer V) oder auch gefangen werden können. Der letzte Punkt resultiert aus der Anordnung der Skimmer vor dem Oktopol I und den Linsen hinter dem Oktopol II. Da in Kammer IV das Vakuum noch nicht ideal ($4 \cdot 10^{-4}$ mbar) ist, wird Kammer IV vor allen genutzt, um die Ionen in Kammer V zu überführen. In der Kammer V ($2 \cdot 10^{-6}$ mbar) finden die eigentlichen Experimente statt. Die Ionen gelangen dort über elektrostatische Linsen in die Paul-Falle (Ionenfalle). Durch nachträglich angebrachte Öffnungen an der Falle können sowohl Photonen oder auch Ionen in die Falle eingeschleust werden (siehe Kapitel 3.1.2). Entstehende Fragmente können dann über einem Aufschwingprozess in der Falle nach Masse getrennt in einem *channeltron* nachgewiesen werden.

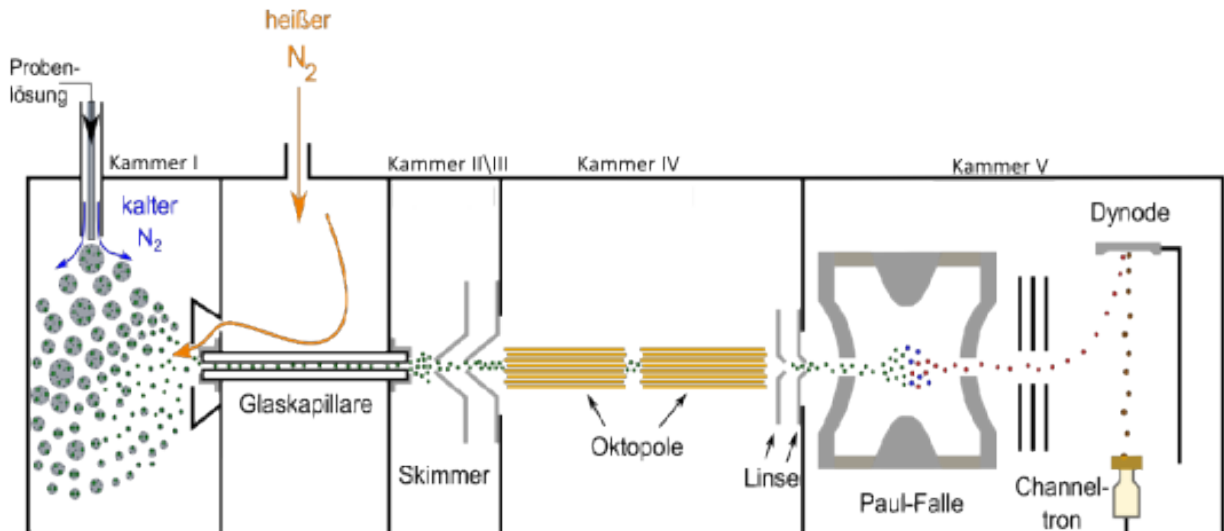


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des verwendeten ESI-MS; In der Einlasskammer (Kammer I) werden die gelösten Analytmoleküle durch den ESI-Prozess (siehe Kap. 2.2.1) in die Gasphase überführt und ionisiert. Die Ionen gelangen dann über eine Glaskapillare in die Kammer II und durch einen Skimmer in Kammer III. Dort werden die Ionen durch einen weiteren Skimmer in die Kammer IV, der Oktopolkammer, geleitet. Die Oktopole übernehmen hauptsächlich die Funktion die Ionen in die Kammer V zu überführen während die Neutralteilchen in die Vakuumpumpe fliegen. In der Kammer V werden die Ionen in der Paul-Falle gefangen und können dort auch fragmentiert werden. Entstehende Fragmente können dann Masse nach Masse aufgeschaukelt und über das *channeltron* nachgewiesen werden.[Wol13]

2.2.1 Das Elektrospray-Verfahren

Aus Kapitel 2.2 wurde ersichtlich, dass es essenziell für die Massenspektrometrie ist, die Probenmoleküle in die Gasphase zu bringen und zu ionisieren. Ein Problem bei der klassischen Methode wie EI war das Verdampfen der Probe, um das Analytmolekül intakt in die Gasphase zu überführen. Diese Methode ist daher für die hier untersuchte thermisch labile Substanzklasse der Peptide leider nicht möglich. Da Peptide sehr groß, nicht flüchtig und thermisch sehr instabil sind, musste man ein anderes Verfahren entwickeln, um die Massenspektrometrie von Peptiden zu erschließen. Als überaus erfolgreiches Verfahren erwies sich das Elektrospray-Verfahren (Abbildung 2.3) [FMM⁺90].

Hierfür wird der Analyt zunächst in einem Lösungsmittelgemisch, meist ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser (2:1), gelöst. Diese Lösung wird dann über eine dünne Nadel in die Einlasskammer überführt. Durch Anlegen einer hohen Spannung zwischen der Nadel (liegt auf Masse) und einer um neunzig Grad versetzten Gegenelektrode (negativ) bildet sich ein starkes elektrisches Feld aus. In diesem Feld bildet sich an der Spitze der Nadel

eine Ausstülpung, den sogenannten Taylor-Cone, aus. Das besondere am Taylor-Cone ist, dass sich auf seiner Oberfläche Ladungen (Protonen) ansammeln. Da sich die positiven Ladungen am Ende des Taylor-Cones abstoßen, wird unterstützend durch einen Stickstoffstrom entlang der Nadel, ein stark geladenes Tröpfchen abgelöst. Es bildet sich ein Sprühnebel aus mehrfach positiv geladenen Tröpfchen. Diese Tröpfchen werden aufgrund der negativen Spannung der Gegenelektrode zu dieser hingezogen. Auf dem Weg zur Gegenelektrode werden die Tröpfchen sequentiell immer kleiner, weil das Lösungsmittel durch einen heißen Stickstoffgegenstrom verdampft wird. Der Tropfen hat dann bezogen auf seine Größe zu viele Ladungen und explodiert. Dies wiederholt sich bis zum Schluss nur noch das Probenmolekül mit einer oder auch mehreren Ladungen zurückbleibt. Es gibt mehrere Modelle wie dieses Schrumpfen der Tröpfchen beschrieben werden könnte. Zum einen das *charge residue model* (crm) nach Dole [DMH⁺68] und zum anderen das *ion evaporation model* (evm) nach Iribane [IT76].

Beide Modelle stützen sich zunächst auf ähnliche Grundideen. Durch das Verdampfen der Lösungsmittelmoleküle aus dem Tröpfchen nimmt die Oberflächenladungsdichte der einzelnen Tropfen zu, während die Oberflächenspannung gleich bleibt. Das Schrumpfen der Tropfen ist soweit möglich bis eine Ladungsgrenze, oder auch Rayleigh-Limit [Ray82] erreicht ist. Der Sachverhalt geht aus Formel 2.1 hervor.

$$Q_R = 8\pi\sqrt{r^3\gamma\epsilon_0} \quad (2.1)$$

Das Rayleigh-Limit Q_R für die maximal auf einen Tröpfchen von Radius r befindliche Ladung setzt sich zusammen aus der Oberflächenspannung γ , aus der Dielektrizitätskonstante ϵ_0 und dem Radius r . Die Konsequenz aus der Überschreitung des Limits ist die Coloumb-Explosion der Tropfen in kleinere Tröpfchen, sodass das Verhältnis aus Oberflächenladungsdichte und Oberflächenspannung wieder stabil wird. Der Prozess aus Verdampfen von Lösungsmittel und der Explosion der Tröpfchen wiederholt sich so lange bis nur noch das isolierte Probenmolekül mit mindestens einer Ladung in der Gasphase zurückbleibt. Während das crm-Modell davon aus geht, dass aus einem großen Muttertropfen nach der Coloumb-Explosion mehrere Tochtertropfen entstehen, die weiter zerfallen, geht das evm-Modell davon aus, dass aus dem Muttertropfen schon geladene Ionen heraustreten können, ähnlich einer Dissoziation.

Der oben beschriebene Prozess erwähnt nur eine einfache Ladung des Analytmoleküls. Aber der ESI-Prozess führt auch zum mehrfach geladenen Molekülen. Dies hängt davon ab, wie groß das Molekül ist (Coulomb-Abstoßung) und wie viele mögliche Protonierungs-/Deprotonierungsstellen ein Molekül hat und wie gut sich diese Stellen auch protonieren

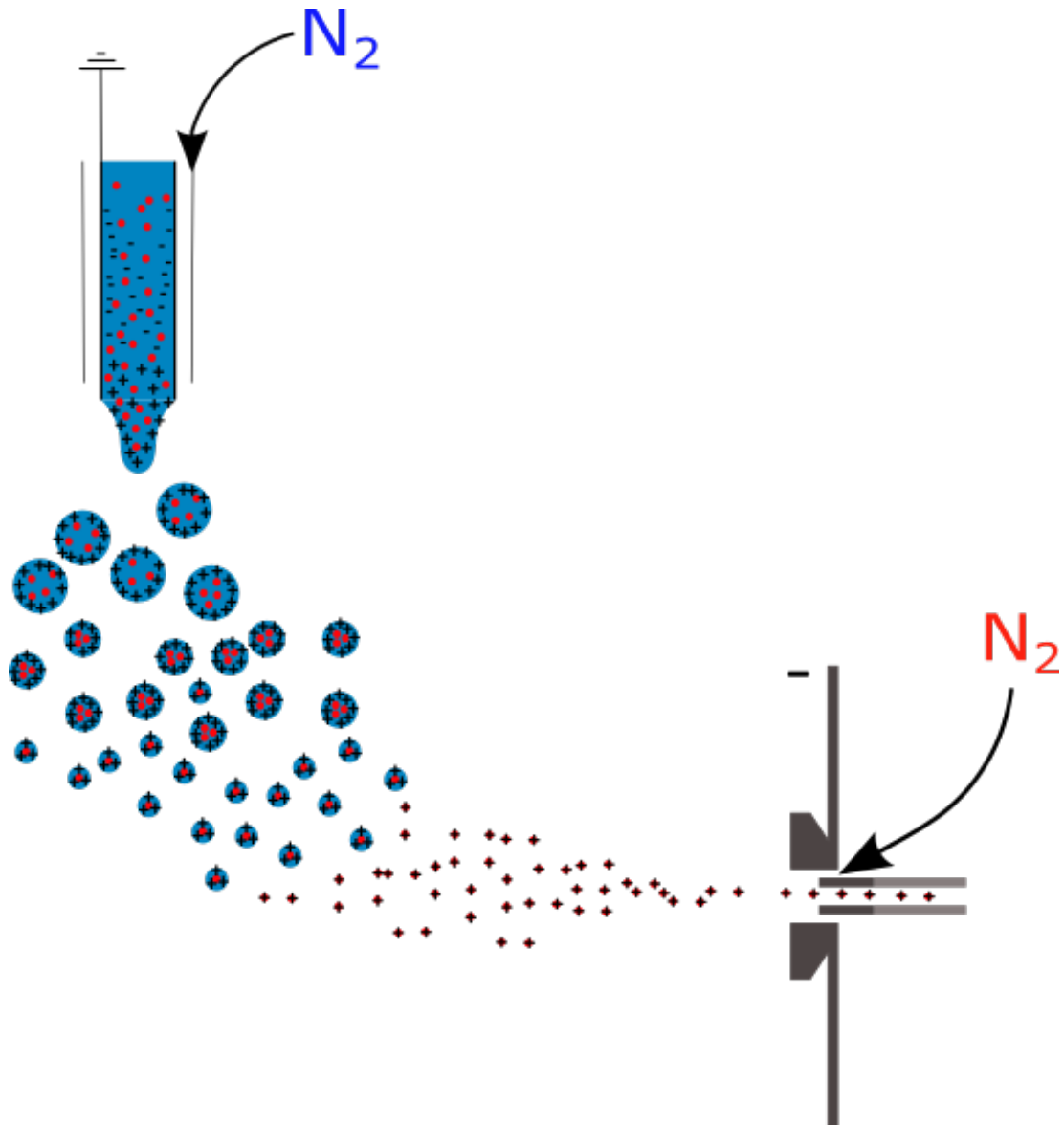


Abbildung 2.3: Darstellung des Elektrospray-Verfahrens; In die Einlasskammer werden die gelösten Analytmoleküle mittels einer dünnen Nadel überführt. Wird nun ein elektrisches Feld von 3 - 4 kV zwischen Nadel und Einlassblende aufgebaut, wird die Bildung eines Taylor-Cones an der Nadelspitze verursacht. Ein kalter Stickstoffstrom (blau) entlang der Nadel unterstützt die Ablösung von Tröpfchen, es entsteht ein Aerosolspray. Durch den heißen Stickstoffgegenstrom (rot) wird Lösungsmittel aus dem Tropfen verdampft. Die Tropfen schrumpfen und werden wegen ihrer vielen Ladungen instabil und explodieren. Die Tochtertröpfchen schrumpfen wieder durch Lösungsmitteilverdampfung, explodieren wiederum solange bis nur noch das Analytmolekül mit mindestens einer Ladung zurückbleibt. Das geladene Analytmolekül wird durch die Glaskapillare ins Massenspektrometer gesaugt.

lassen. Um einen Analyten, bezogen auf seine Größe, maximal zu laden, muss dem Lösungsmittel eine Säure, z.B. Essigsäure, zugeführt werden. Dies kann leider dazu führen, dass aufgrund der Vielzahl an Ladungsspezies das Massenspektrum einer Substanz mehrere Peaks enthält und je nach Größe des Moleküls, schnell unübersichtlich wird. Für Moleküle, die schlecht protonieren, wie Polymere, können auch Addukte mit Kationen gebildet werden, z.B. mit Natrium oder Kalium, welche evtl. als Verunreinigung in die Lösung gelangen. Die Adduktbildung, stört bei Peptiden, weil sich das Molekülsignal auf mehrere Adduktionen-Komplexe aufteilt. Die Adduktbildung ist aber bei Untersuchungen an Polymeren, die sich nicht protonieren lassen, durchaus gewünscht.

2.2.2 Die Paul-Falle

Die Paul-Falle oder auch Wechselfeld-Ionenfalle ist das Herzstück des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ESI-MS. In diesem Massenanalysator können Peptidionen über lange Zeit akkumuliert werden. Deshalb findet die Mehrheit der hier beschriebenen Experimente in einer Paulfalle statt. Daher soll nun kurz der Aufbau und die Funktionsweise dieser Ionenfalle näher erläutert werden (für mehr zu diesem Thema siehe [Tod91]). Die Falle wurde nach seinem Erfinder Wolfgang Paul benannt [PS53]. In der Abbildung 2.2 ist in Kammer V eine Paul-Falle schematisch mit seinen Elektroden dargestellt. Sie besteht aus zwei hyperbolischen Endkappen-Elektroden, die eine Ringelektrode, die innen parabolisch geformt ist, umschließen. Allgemein abstrakt betrachtet leitet sich die Paul-Falle vom Quadrupol ab. Hierbei werden zwei gegenüberliegende Stäbe des Quadrupols zur Ringelektrode und die zwei verbliebenen Stäbe jeweils zu den hyperbolischen Endkappen-Elektroden überführt. Beide Endkappen-Elektroden werden nun zum Fangen der Ionen mit der gleichen Wechselspannung versorgt, während die Ringelektrode eine entgegengesetzte Spannungspolung erhält. Durch Anlegen einer Wechselspannung mit einer bestimmter Frequenz, z.B. 780 kHz, an der Falle bildet sich ein zeitlich schnell alternierendes elektrisches Feld aus, welches in alle Raumrichtungen wirkt und in der Lage ist die Molekülionen in der Mitte der Falle zu fangen. Wie werden nun die Ionen gefangen? Das elektrische Feld, welches auch aufgrund der Wechselspannung alterniert, erzeugt für die Ionen eine im Zeitmittel rücktreibende Kraft, deren Potential auch als Pseudopotential bezeichnet wird. Dieses Potential wirkt anziehend auf die vorbeifliegenden Ionen, reicht aber wegen der Energieerhaltung alleine nicht aus, um schnelle Ionen, die von außen kommen, in diesem Potential zu fangen. Die in die Falle fliegenden Molekülionen haben auf ihren Weg durch das Massenspektrometer z.B. im Skimmerbereich der Anlage nämlich kinetische Energie gewonnen. Aus Gründen der Energieerhaltung könnten die in die Falle beschleu-

nigten Ionen das attraktive Potential der Falle auf der anderen Seite wieder überwinden und fliegen einfach durch. Für das effiziente Einfangen wird deshalb ein Hintergrunddruck des inerten Edelgases Helium in die Falle eingeleitet. Die Heliumatome stoßen nun mit den Molekülonen zusammen und kühlen somit die Bewegung der Ionen. D.h. die Ionen verlieren so beim Durchfliegen der Falle genügend kinetische Energie und können vom Pseudopotential eingefangen werden. Das Pseudopotential der Ionenfalle kann nun so manipuliert werden, sodass für nur ein einziges m/z -Verhältnis die Bahnen stabil sind. Alle anderen m/z -Verhältnisse werden somit aus der Falle ausgeschlossen. Dieser Vorgang wird als Massenselektionsschritt (MS) bezeichnet (für ein tiefer gehendes Verständnis [RG07]). Anschließend an einen MS-Schritt kann eine sogenannte Wartezeit (bis zu 1 s) genutzt werden, um verschiedene Fragmentierungsmethoden anzuwenden.

Das hier verwendete ESI-MS basiert auf einer Basisversion des Esquire 3000 von der Firma Bruker Daltonics. Zur Koordinierung und zum gepulsten Einlass von Ionen und neutralen Stoßgasen wurden verschiedene Veränderungen durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.2 und Folgende).

2.3 Das Flugzeitmassenspektrometer

Neben dem umgebauten kommerziellen ESI-MS für Untersuchungen an Peptiden wurde u.a. ein zweites Massenspektrometer ein sogenanntes RE-TOF aufgebaut, welches für die Charge-Transfer-Ionisation von flüchtigen Molekülen eingesetzt wurde. Dieses Gerät soll nun im Folgenden schrittweise erläutert werden. Das Flugzeitmassenspektrometer, kurz auch TOF-MS (TOF für *time of flight*) misst die Flugzeit eines Ions. Das TOF dient als Massenanalysator, d.h. die Flugzeit der Ionen auf einer definierten Flugstrecke, auch Driftstrecke genannt, ist abhängig von ihrer Masse. Dabei erreichen große Massen später und kleine Masse früher den Detektor. Die Besonderheiten in Flugzeit-MS-Geräten sind in der Literatur ([WS53, WM55, Cot92, WWW⁺89]) eingehend beschrieben. Deshalb wird im Folgenden die Funktion des TOF nur kurz beschrieben.

Die erzeugten Ionen (vgl. Kapitel Experimentelles) werden über eine gepulste Abzugseinheit, meist bestehend aus drei Blenden, in die feldfreie Driftstrecke beschleunigt. Alle Ionen unterschiedlicher Masse erhalten somit theoretisch die gleiche kinetische Energie. Unter Betrachtung der Formel 2.2

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 \quad (2.2)$$

ist ersichtlich, dass die kinetische Energie proportional zum Quadrat der Geschwindigkeit



Abbildung 2.4: Das lineare TOF besteht aus einer Ionenquelle, aus einem feldfreien Flugrohr und einem Detektor. Die erzeugten Ionen werden im Abzug, hier bestehend aus drei Blenden, in die Driftstrecke beschleunigt und am Massendetektor detektiert.

v ist und somit auch zur Flugzeit t . Wird die Formel 2.2 um die Abzugsspannung U und der Ladung e erweitert, erhalten wir:

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 = Ue \quad (2.3)$$

Nun kann mit der Beziehung $t = \frac{s}{v}$ (s für die Länge der Flugstrecke) und durch das Umstellen der Formel 2.3 das Masse-zu-Ladungsverhältnis einer Flugzeit bestimmt werden.

$$\frac{m}{e} = \frac{Ut^2}{2s^2} \quad (2.4)$$

Die Genauigkeit der Flugzeit und damit die Massenauflösung hängt in erster Linie von den Startbedingungen der Ionen ab. In der Regel gilt, wird die Driftstrecke länger so wird die Massenauflösung besser. Das Hauptproblem im linearen Betrieb eines TOF-Massenspektrometers (vgl. Abb. 2.4) ist jedoch die örtliche Startbedingung in der Abzugseinheit. So sind schon minimale Wegunterschiede der entstandenen Ionen gleicher Masse in der Abzugseinheit dafür verantwortlich, das die Signale der resultierenden Massenspektren breit werden (vgl. Abb. 2.5).

Wie in Abbildung 2.5 gezeigt, haben für Ionen gleicher Masse die schnelleren Ionen den längeren Weg. Es kommt folglich zu einem Überholvorgang, der typischerweise relativ nahe hinter der Ionenquelle liegt. Der Ort am welchen der Überholvorgang stattfindet heißt „Ortsfokus“. Zwar ist es nach Weinkauf et al. [WWW⁺89] möglich durch eine geeignete Wahl der Abstände $x_{1,2}$ (Blende 1 zu Blende 2) und $x_{2,3}$ (Blende 2 zu Blende 3) den Ortsfokus zu größeren Fluglängen zu verschieben, aber wirklich große Fluglängen unter Beibehaltung der Korrektur der Anfangsortsunterschiede sind nur durch die Verwendung eines sogenannten Reflektrons möglich. Durch Einführung des Reflektrons, oder auch Ionen spiegels, konnten die Flugzeitfehler der Ionen gleicher Masse auch für lange Flugstrecken korrigiert werden. Die durch den Ortsfehler im Abzug verursachten zeitlich breiten Mas-

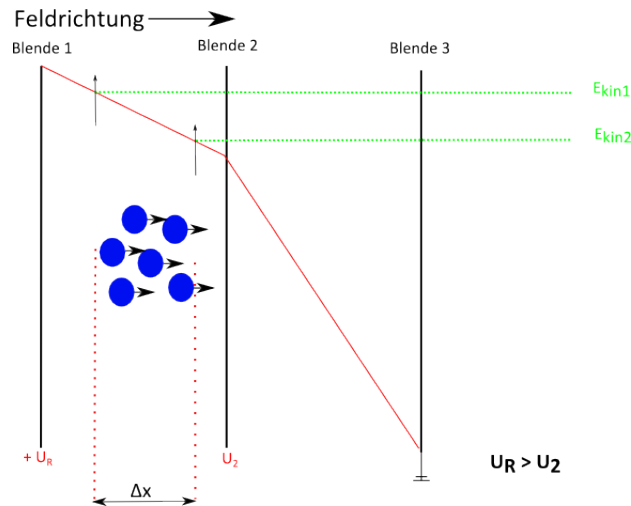


Abbildung 2.5: Durch die Größe der Ionenwolke (blau) hat diese eine räumliche Ausdehnung in Feldrichtung mit der Länge Δx . Werden diese massengleichen Ionen nun beschleunigt, erhalten alle Ionen im Intervall Δx eine unterschiedliche kinetische Energie. Ionen, die näher an Blende 2 sind, werden weniger beschleunigt als jene, die näher an Blende 1 sind. Man beachte, dass die Ionen mit höheren Energie den längeren Weg haben. Weiter Erklärungen siehe Text.

senspektren (vgl. 2.5) im linearen TOF, werden im Reflektron zeitlich refokussiert. Dies wird durch eine Blendenanordnung am Ende des Flugrohres bewerkstelligt. Diese ist oft um einen Winkel z zur linearen Flugrichtung der Ionen gekippt um beim Rückflug den Detektor zu treffen. In dieser Blendenanordnung wird ein zweistufiges Bremsfeld aufgebaut. Dieses Feld bremst die Ionen auf ihrem Flug ab und beschleunigt diese um den Winkel z in die entgegengesetzte Richtung. Dabei dringen schnelle Ionen tiefer in das Reflektron ein als langsamere. Dies heißt im Umkehrschluss, dass die zuvor schnellen Ionen auch die größere Zeit im Reflektor erfahren und deshalb bei geeigneten Spannungen gleichzeitig mit den zuvor langsamen Ionen am zweiten Detektor eintreffen (2.6). Das Korrekturvermögen des Reflektrons hat aber auch Grenzen. So ist einerseits der Winkel essenziell, um zwangsweise neben dem Strahlengang befindlichen den Detektor zu treffen. Wird der Winkel zur Flugachse zu groß eingestellt, so kommt es zu weiteren Flugzeitfehlern, bedingt durch diesen Winkel. Zudem können evtl. die Ionen das Reflektron nicht mehr durch die Öffnung verlassen, wenn der Winkel zu groß wird. Darüber hinaus hat die Länge des Reflektrons einen Einfluss auf die Auflösung im Massenspektrum. Ist dieses zu kurz, ist die Korrektur des Ionenspiegels nicht perfekt. Daher ist auf den Einbauwinkel und auf das richtig angelegte Feld im Reflektron bei gegebener Länge zu achten.

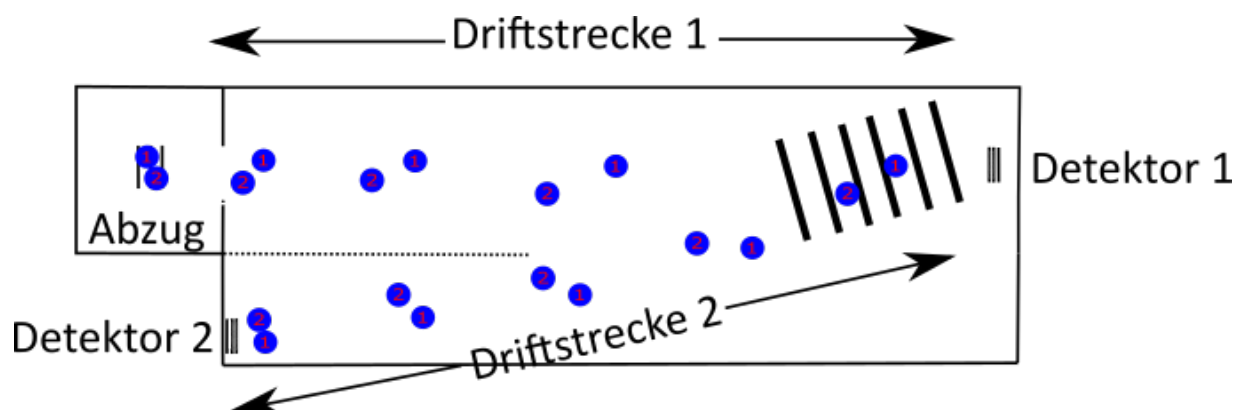


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung vom Prinzip eines Reflektrons. Die Ionen 1 und 2 besitzen die gleiche Masse und starten an unterschiedlichen Positionen in der Abzugseinheit. Dadurch erfahren sie jeweils eine Beschleunigung zu einer anderen Energie. In der Driftstrecke 1 wird der Abstand zwischen Ion 1 und Ion 2, aufgrund der größeren Beschleunigung von Ion 1, immer größer. Im Reflektron (mehrere Blenden im Winkel zur Flugachse der Ionen) wird ein dem Ionen gradientes entgegengesetztes Feld aufgebaut. Das Ion 1 dringt dabei tiefer in das Feld hinein und wird dabei abgebremst und in die entgegengesetzte Richtung um den Winkel beschleunigt. Durch den längeren Weg den Ion 1 zurücklegen muss, werden beide Ionen, 1 und 2, am Detektor ortlich und zeitlich fokussiert.

2.4 Fragmentierung

Ist das Mutterion massenspektrometrisch charakterisiert, so würde man sich im zweiten Schritt Fragmente wünschen, da diese wichtige Informationen zum chemischen Aufbau der Mutterionen liefern können. Bei organischen Molekülen z.B. mit π -Bindungen oder Ringstrukturen liefern charakteristische Fragmente Hinweise auf die chemische und strukturelle Vernetzung der Atome. Zum Beispiel bildet das Toluol-Kation unter Abspaltung eines Wasserstoffatoms einen Siebenring (Tropylium Kation). Bei Peptiden und Oligopeptiden steht hingegen die Art und die Abfolge von Aminosäuren im Vordergrund [MHP01]. Da Fragmente auch während der Ionisation (klassische MS) oder bei der Laser-Desorption (MALDI) entstehen können, ist es wegen der Eindeutigkeit oft besser die Fragmente erst im Massenspektrometer nach einer ersten Analyse und Separation des Mutterions zu erzeugen. Wie in Kapitel 2.2.2 erwähnt, ist die Paul-Falle, neben dem Einfangen der Ionen, auch zur Fragmentierung der Molekülionen sehr gut geeignet. Insbesondere kann man wegen der langen Speicherzeit der Ionen auch Methoden verwenden, die weniger effizient sind und so quasi kontinuierlich angewendet werden müssen. In diesem Kapitel wird neben verschiedenen Fragmentierungsmethoden auch die untersuchte Substanzklasse der Peptide vorgestellt, die eigentlich fragmentiert werden soll. Damit Fragmentierungsspektren

von Peptiden ausgewertet werden können, wird zudem die Nomenklatur der Fragmentation nach Roepstorff und Fohlmann [RF84] vorgestellt. Diese Nomenklatur ist wichtig hinsichtlich der Struktur und der Ladung der Fragmente, da die unterschiedlichen Fragmentierungsmethoden auch unterschiedliche Fragmente bilden. Alle gebildeten Fragmente lassen sich mit Hilfe der Nomenklatur nach Roepstorff und Fohlmann darstellen und erläutern. Weiterhin können sie auch Hinweise auf einen bestimmten Reaktionsmechanismus geben.

2.4.1 Oligopeptide und Fragmentnomenklatur

Um zu verstehen was Oligopeptide sind, wird das Oligopeptid gedanklich in seine Bausteine, die Aminosäuren, zerlegt. Es gibt zwanzig verschiedene proteinogene Aminosäuren, d.h. Aminosäuren die im menschlichen Körper vorkommen. In Tabelle 2.1 sind alle zwanzig proteinogene Aminosäuren in alphabetischer Reihenfolge mit ihren Abkürzungen, ihren molaren Massen und ihren chemischen Strukturen aufgelistet und nach der Fähigkeit der Seitenkette ein Proton aufzunehmen (basisch) oder abzugeben (sauer) charakterisiert. Kombiniert man nun verschiedene oder auch gleiche Aminosäuren, ergibt sich eine Vielzahl von Möglichkeiten, um unterschiedliche Peptide zu bilden. Die Verknüpfung der Aminosäuren erfolgt hierbei über eine Kondensationsreaktion der Carbonylgruppe der einen Aminosäure mit der α -Aminogruppe der Anderen unter Abspaltung eines Wassermoleküls (Abb. 2.7).

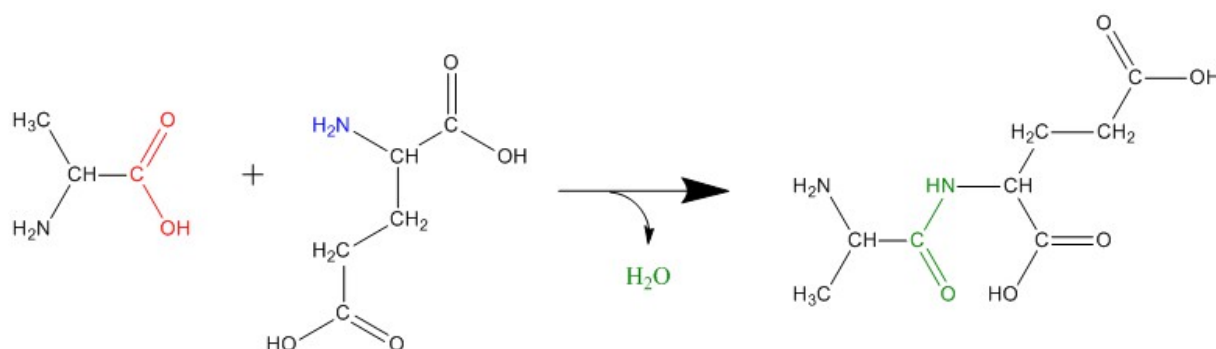


Abbildung 2.7: Die Aminosäure Alanin und die Aminosäure Glutaminsäure kondensieren zum Dipeptid Ala-Glu (Tabelle 2.1). Hierbei kondensieren die Carbonylgruppe des Alanins (rot) mit der α -Aminogruppe der Glutaminsäure (blau) unter Wasserabspaltung und bilden eine Peptidbindung (grün) im Dipeptid aus.

Der Vorgang kann quasi unbegrenzt fortgesetzt werden, sodass sich Oligopeptide und schließlich Polypeptide und Proteine ausbilden können. Oligopeptide sind meist dadurch

definiert, dass diese aus mindestens drei und maximal zehn Aminosäuren aufgebaut sind. Dementsprechend wird der Begriff Polypeptid ab elf Aminosäuren benutzt.

Tabelle 2.1: Proteinogene Aminosäuren

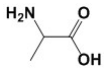
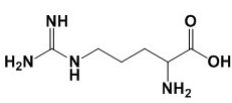
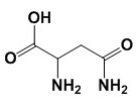
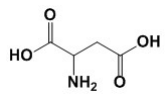
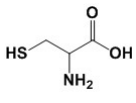
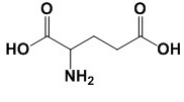
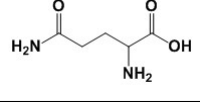
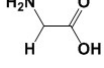
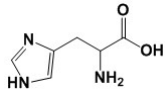
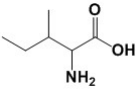
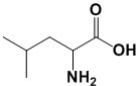
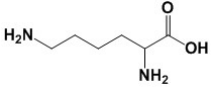
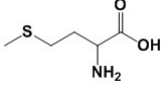
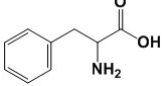
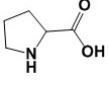
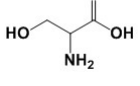
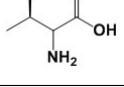
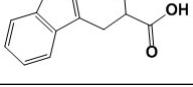
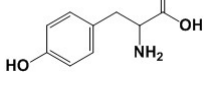
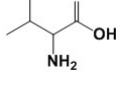
Name	Formel	Masse [g/mol]	Klassifizierung
Alanin Ala (A)		89,10	neutral
Arginin Arg (R)		174,20	basisch
Asparagin Asn (N)		132,10	neutral
Asparaginsäure Asp (D)		133,10	sauer
Cystein Cys (C)		121,60	neutral
Glutamin Gln (Q)		146,15	neutral
Glutaminsäure Glu (E)		147,13	sauer
Glycin Gly (G)		75,07	neutral
Histidin His (H)		155,16	basisch
Isoleucin Ile (I)		131,17	neutral

Tabelle 2.1: Proteinogene Aminosäuren Fortsetzung

Name	Formel	Masse [g/mol]	Klassifizierung
Leucin Leu (L)		131,17	neutral
Lysin Lys (K)		146,19	basisch
Methionin Met (M)		149,21	neutral
Phenylalanin Phe (F)		165,19	neutral
Prolin Pro (P)		115,13	neutral
Serin Ser (S)		105,20	neutral
Threonin Thr (T)		119,02	neutral
Tryptophan Trp (W)		204,22	neutral
Tyrosin Tyr (Y)		181,19	neutral
Valin Val (V)		117,15	neutral

Für eine Sequenzanalyse von Peptiden mit Hilfe der Massenspektrometrie braucht man möglichst viele verschiedene Fragmente aus denen man dann auf die Identität der Amino-

säuren und ihre relative Anordnung (Sequenz) rückschließen kann. Generell gibt es Aminosäuren, die massengleich sind (Leu und Ile) oder sich nur um eine Masse unterscheiden (Asn und Asp). Eine Sequenzbestimmung mit Hilfe der Massenspektrometrie hat zwar die wichtigen Vorteile, dass man nur sehr wenig Probe braucht und es sehr schnell geht, aber es kann zu Unsicherheiten bzw. Ungenauigkeiten bei der Bestimmung einzelner Aminosäuren kommen.

Zur Erklärung der Nomenklatur nach Roepstorff und Fohlmann [RF84] betrachten wir ein beliebiges Peptid in Abbildung 2.8. Das Peptid hat zwei unterschiedliche Kettenenden aufgrund der Amino- (links) und der Säure-Funktionalitäten (rechts). Als N-Terminus wird das Kettenende bezeichnet, welches die Aminogruppe trägt. Das andere Kettenende, der C-Terminus, trägt eine Carboxylgruppe. Dies bedeutet, dass das Peptid durch eine Protonierung am N-Terminus oder durch eine Deprotonierung C-Terminus sowohl eine positive Ladung als auch eine negative Ladung tragen kann. Weitere Ladungspositionen können sich auch auf den Seitenketten befinden. Für die Nomenklatur der Fragment-Ionen ist die Position der Ladung wichtig, denn die Ladung entscheidet über die Bezeichnung und vor allem über die Nachweisbarkeit des Fragments. Bricht in einem einfach geladenen Peptid eine Bindung (senkrechter Strich), so verbleibt die Ladung entweder auf einem N-terminalen Fragment (Fähnchen bzw. waagerechter Strich nach links) oder auf einem C-terminalen Fragment (Fähnchen bzw. waagerechter Strich nach rechts). Die Zählung der Aminosäuren-Schnittstelle, an welcher die Bindung bricht, folgt der Ladungsposition: d.h. die Zählung erfolgt vom N-Terminus aus für Fragmente mit der Ladung auf dem N-terminalen Fragment und dementsprechend erfolgt die Zählung vom C-Terminus aus für Fragmente mit der Ladung auf der C-terminalen Seite. In der Umgebung der Peptidbindung gibt es drei Bindungsbruch-Möglichkeiten. Zum einem ist dies eine C-C-Bindung, eine C-N-Bindung und eine N-C-Bindung. Diesen Bindungen werden nun Buchstaben zugeordnet:

- C-C-Bindung die Buchstaben a und x
- C-N-Bindung die Buchstaben b und y
- N-C-Bindung die Buchstaben c und z

Dabei werden die a-, b- und c-Fragmente als N-terminal bezeichnet, während die Fragmente x, y und z C-terminale Fragmente sind. Wie oben erwähnt, erhalten die Buchstaben noch einen Zahlenwert je nachdem welche Peptidbindung gebrochen wird. So erhält zum Beispiel ein N-terminales Fragment der ersten Peptidbindung, welches zwischen der C-C-Bindung

gespalten wurde, die Bezeichnung a_1 , wenn dieses die Ladung trägt. Wird ein C-terminales Fragment gebildet, beginnt die Zählweise in umgekehrter Reihenfolge, d.h. wird zum Beispiel die letzte C-C-Bindung des Peptids gespalten, erhält man ein x_1 -Fragment.

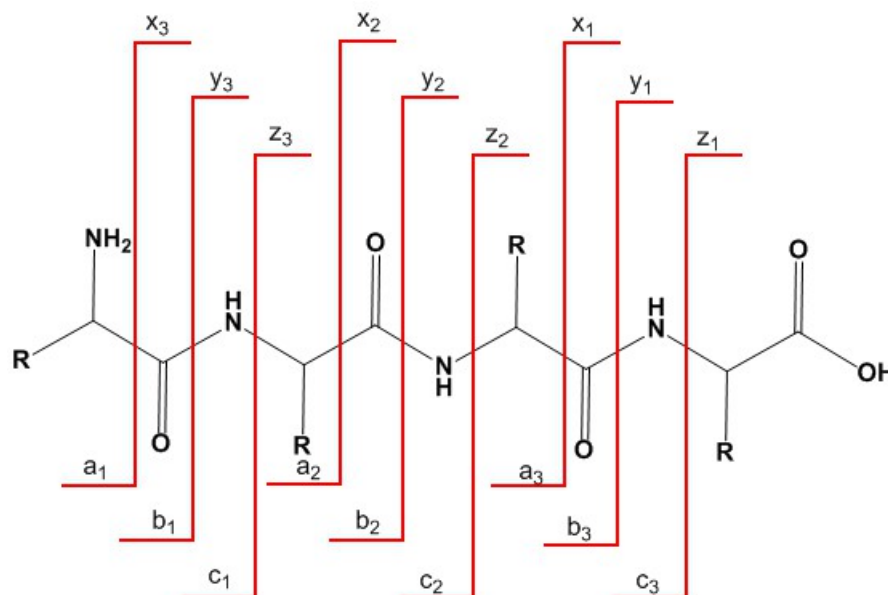


Abbildung 2.8: Nomenklatur nach Roepstorff und Fohlmann; Die senkrechten roten Markierungen über der Peptidbackbone geben die Positionen an, an welchen die Peptidbindung fragmentiert werden kann. Die oben und unten angebrachten Fähnchen an der Markierungslinie zeigen an, in welcher Richtung sich die Ladung nach der Fragmentierung befindet. Für N-terminale Fragmente (Ladung liegt auf dem N-Terminus) wird die Bezeichnung a, b und c gewählt. Für C-terminale Fragment (Ladung liegt auf dem C-Terminus) hingegen wird die Bezeichnung x, y und z gewählt. Die Fragmente bekommen zusätzlich ein Zahlenindizes (siehe Text).

In Ergänzung zu dieser Nomenklatur hat die Arbeitsgruppe um Johnson und Biemann weitere Fragment-Nomenklaturen hinzugefügt. Aus Experimenten mit hochenergetischen Stoßprozessen geht hervor, dass neben der normalen Fragmentation nach Roepstorff und Fohlmann auch Fragmente entstehen können, die einen Seitenkettenverlust oder Wasserstoffradikalverlust aufweisen. Diese Fragmente wurden mit d, v und w bezeichnet [JMB88]. Dabei wird von einer konsekutiven Fragmentierung ausgegangen, da die primär gebildeten Fragmente noch genügend Energie besitzen um ein weiteres Mal zu fragmentieren. Ein d-Fragment leitet sich z.B. aus einem a-Fragment ab, bei dem durch einem Wasserstoffradikalverlust eine Doppelbindung in der Seitenkette gebildet wird. Die Fragmente v und w leiten sich von einem z-Fragment und y-Fragment ab. Im einen Fall wird wiederum durch einen Verlust eines Wasserstoffradikals eine Doppelbindung in der Seitenkette generiert und bilden ein w-Fragment (abgeleitet von einem z-Fragment). Im anderen Fall führt der Verlust der gesamten Seitenkette und einer Ausbildung einer N-C-Doppelbindung zu

einem v-Fragment (abgeleitet von einem y-Fragment) (vgl.2.9).

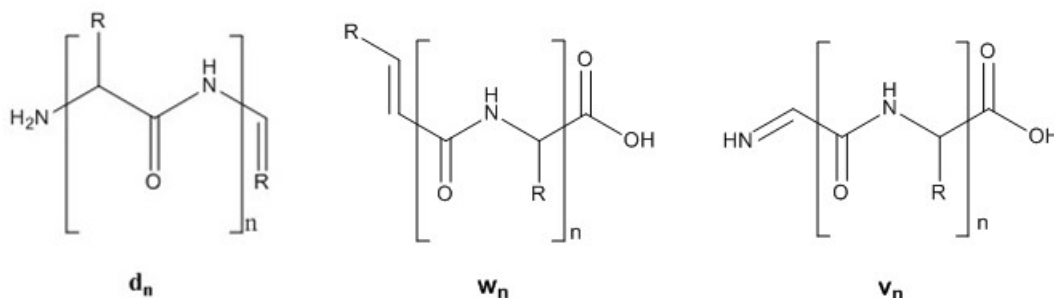


Abbildung 2.9: Seitenketten-Fragmente nach Johnson und Biemann; Aus hochenergetischen Stoßprozessen können d-, w- und v-Fragmente entstehen. Das d-Fragment leitet sich hierbei von einem a-Fragment ab, indem ein Wasserstoffradikal unter Bildung einer Doppelbindung in der Seitenkette abgespalten wird. Das w- und v-Fragment sind C-terminale Fragmente. Das w-Fragment bildet sich aus einem z-Fragment unter Abspaltung eines Wasserstoffradikals und Bildung einer Doppelbindung in der Seitenkette. Im v-Fragment wird die gesamte Seitenkette aus einem y-Fragment abgespalten. Hierbei bildet sich zudem eine Doppelbindung zwischen der N-C-Bindung aus.

Die Besonderheiten bei der Fragmentierung von Peptiden

Im Folgenden muss beachtet werden, dass es bei der Peptidfragmentierung in Massenspektrometern um eine Reaktion im isolierten Molekül handelt. Das Molekül wird von außen angeregt und hat nach der Anregung normalerweise nicht mehr die Möglichkeit die Anregungsenergie abzugeben. Ein solcher Vakuumprozess widerspricht sehr stark einer chemischen Reaktion im Lösungsmittel, da dort die zugeführte Energie sehr schnell an die Lösungsumgebung abgegeben werden kann. Betrachtet man das Kapitel 2.4.1 nochmals und ruft man sich die kettenartige Struktur der immer gleichen Bindungen der Peptid-Backbone in Erinnerung, so sollte in ein Peptidkation

- sehr viele Fragmentierungskanäle geben, deren Anzahl mit der Peptidgröße wächst, die
- aufgrund der repetitiven Peptidbindung in Backbone des Peptids energetisch sehr ähnliche Dissoziationsenergien besitzen und
- die deshalb bei nicht zu hohen internen Anregungsenergien simultan als parallele Dissoziationskanäle zur Verfügung stehen sollten (Entartung der Fragmentierungswege)

Man könnte also dem Trugschluss unterliegen, dass die Fragmentierung größer werdender Peptide immer leichter gehen sollte. Aber die Fragmentierung von großen Oligopeptiden,

Peptiden und Proteinen wird, wie viele Experimente zeigen, mit der Größe der Moleküle immer schwieriger. Dieser Umstand stellt in der Forschung, z.B. in der Sequenzanalyse der Peptide/Proteine, ein großes Problem dar. Im folgenden Kapitel sollen die grundlegenden Überlegungen, die zu dieser Einschränkung von großen Molekülen und deren außergewöhnlichen Stabilität führen, erläutert werden.

2.4.2 Vorstellungen zu unimolekularen Reaktionen: Von den statistischen Zerfallstheorien (RRK- und RRKM-Theorie) bis zum nicht-statistischen Zerfall

Ende der 1920-er Jahre entwickelten nahezu zeitgleich O.K. Rice, H.C. Ramsperger und L.S. Kassel zunächst die Rice-Ramsperger-Kassel-Theorie (RRK-Theorie). Sie forschten experimentell an der Energieabhängigkeit von unimolekularen Reaktionen/Prozessen von kleinen Molekülen [RR27], [RR28], [Kas28]. Unimolekulare Reaktionen sind Prozesse bei dem ein Molekül oder Ion entweder zerfällt (fragmentiert) oder eine Umlagerung (z.B. Isomerisierungen) erfährt, bei dem kein zweiter Reaktant in der Reaktion mitwirkt.

Für eine solchen Reaktion muss so viel Energie zugeführt werden, damit eine kritische Energie für das Brechen einer Bindung zwischen zwei benachbarten Atomen vorliegt. Dabei liegt diese kritische Energie, die für die Reaktionen zur Verfügung steht, im angeregten Molekül in Form von Schwingungsanregungen vor.

Die Experimente von Rice und Ramsperger an Azomethan und Propanal konnten zeigen, dass bei Molekülen die kritische Energie zum Erreichen einer Dissoziation überraschenderweise viel größer sein muss als die Dissoziationsenergie zwischen zwei benachbarten Atomen in der Kette und dass der Bindungsbruch nicht instantan sondern verzögert abläuft [RR27], [RR28]. Die für die Fragmentierung nötige Energie kann z.B. wie in den nachfolgenden Unterkapiteln beschrieben durch Kollision mit Inertgas, durch Photonen, durch Ionen oder durch Elektronen zugeführt werden.

Es wurde vermutet, dass sowohl die zeitliche Verzögerung wie auch die energetische Verschiebung, der für den Bindungsbruch nötigen kritischen Energie, über die Bindungsenergie hinaus dadurch entsteht, dass sich die zugeführte Energie zuerst über die Schwingungen des gesamten Moleküls verteilt und nachgeschaltet sich zufällig so viel Energie wieder in einer Bindung konzentriert, dass diese brechen kann.

Eine solches Modell setzt voraus, dass die Schwingungszustände eines Moleküls untereinander Energie austauschen können. Die Energieumverteilung zwischen Schwingungen und

deren Quantenzustände wird *internal vibrational redistribution* (IVR) genannt. Hierbei wird die Energie einer Anregung in einen lokalisierten angeregten Schwingungszustand in mehrere isoenergetische Schwingungszustände umverteilt.

Dass eine solche Umverteilung bzw. ein Energieaustausch zwischen Schwingungszuständen überhaupt möglich ist, bedarf einer Erklärung. Bei der Normalkoordinatenanalyse zur Berechnung der Schwingungsenergien und ihrer Bewegungsmuster wird durch die Wahl geeigneter Koordinaten eigentlich erreicht, dass die verschiedenen Schwingungen eines Moleküls voneinander unabhängig werden, demnach nicht koppeln. Streng genommen wird das aber nur für den jeweiligen Quantenzustand 1 jeder Schwingung erreicht. Eine Kopplung von Schwingungen ist aber polyatomaren Molekülen bei hohen Energien möglich, da

- i durch die vielen Schwingungen und die daraus gebildeten Kombinationszustände, also einer gemischten Anregung von mehreren Normalschwingungen, eine sehr hohe Dichte von isoenergetischen Schwingungszuständen entsteht, die einen isoenergetischen Energieaustausch zwischen Schwingungszuständen überhaupt möglich wird.
- ii die Schwingungsbewegung in höheren Schwingungsquanten anharmonisch sind und dadurch auch zwischen den Schwingungen starke Kopplungen auftreten, die das IVR begünstigen.

Die Energie, auch wenn sie lokal eingebracht wurde, kann somit sehr schnell (einige ps) in einem Molekül über alle Schwingungen gleichmäßig ausbreiten [HSN17]. Die Zahl der $3N-6$ (nicht lineares Molekül) oder $3N-5$ (lineares Molekül) Schwingungszustände, deren Kombinationschwingungen und deren Anharmonizität sowie deren anharmonischen Kopplungen bestimmt also ganz stark wie schnell die Energie im Molekül auf viele Zustände abfließt und wie wahrscheinlich es ist, dass sie wieder in einer Bindung konzentriert wird.

In der RRK-Theorie wurden bei der Beschreibung der Energieabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit einer unimolekularen Reaktion in Ermangelung von Computern und ab-initio- bzw. Simulationsprogrammen stark vereinfachende Annahmen gemacht, die gerade bei der Beschreibung von großen Molekülen zu großen Fehlern führen. Dabei trifft man in der RRK-Theorie die Annahme, dass alle Schwingungs-Oszillatoren gleich sind und eine mittlere Schwingungsfrequenz besitzen. Wie schnell nach diesem Modell eine unimolekulare Reaktion ablaufen kann, ist also ein Zusammenspiel aus eingebrachter Energie, kritischer Energie zur Dissoziation, Anzahl der vorhandenen Schwingungen im Molekül ($3N-6$) und vor allem deren mittleren Schwingungsfrequenz und der Zahl deren Kombinationszustände. Der Zusammenhang dieser Faktoren gemäß der RRK-Theorie ist in der nachstehenden Formel 2.5 angegeben.

$$k(E) = \bar{\nu} \left(\frac{E - E_0}{E} \right)^{s-1} \quad (2.5)$$

Die Terme in der Formel 2.5 sind wie folgt definiert:

- $k(E)$ ist Geschwindigkeitskonstante der unimolekularen Reaktion bei der internen Energie E
- $\bar{\nu}$ ist die mittlere Schwingungsfrequenz des Moleküls
- E ist die innere Energie des Moleküls
- E_0 ist die kritische Energie, die bei gegebenen Oszillator zur Reaktion führt
- s gibt die Anzahl der Schwingungsfreiheitsgrade/Oszillatoren über $3N-5$ (für lineare Moleküle) bzw. $3N-6$ (nicht lineare Moleküle) wieder. N für die Anzahl der Atome

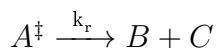
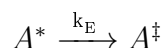
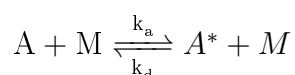
Der Formel 2.5 ist direkt zu entnehmen, dass mit jedem zusätzlichen Atom ($N+1 \dots N+2$ usw.) in einem Molekül die Anzahl der Schwingungsfreiheitsgrade s zunimmt und damit bei gleicher internen Energie und gleicher Dissoziationsenergie die Geschwindigkeit einer molekularen Reaktion zwangsläufig mit der Molekülgröße abnimmt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass wenn ein Molekül größer wird, also die Anzahl seiner Atome N steigt, die eingebrachte Energie über die überproportional anwachsende Anzahl von Schwingungen und vorallem deren Konformationszustände besser verteilt werden kann. Dies bedeutet darüber hinaus auch, dass die Dissoziationswahrscheinlichkeit abnimmt, da die Wahrscheinlichkeit, dass die kritische Energie, auch gleichbedeutend die Dissoziationsenergie, zufällig wieder in einer bestimmten Bindung vorliegt, statistisch sehr gering ist.

Die RRKM-Theorie

Eine Weiterentwicklung dieser RRK-Theorie ist die Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus-Theorie (RRKM-Theorie). Sie wurde unter anderem von R.A. Marcus und L.S. Kassel Anfang der 1950er Jahre postuliert [MR51, Mar52a, Mar52b]. Es wurden einige Schwächen der RRK-Theorie aufgegriffen und behoben. Die größte Schwachstelle der RRK-Theorie ist die Annahme einer quasi willkürlichen mittleren Schwingungsfrequenz $\bar{\nu}$. Sie vermittelt einerseits den Eindruck, dass jede Bindung im System nahezu die gleiche Schwingungsfrequenz hat und das IVR, also die Energieumverteilung über die Schwingungen eines Systems, leicht sei und täuscht darüber hinweg, dass niederfrequente Schwingungen viel stärker zur Zustandsdichte beitragen als hochfrequente Schwingungen. Eine Lösung dieses Problems ist demnach, alle Schwingungen mit ihren realen Wert mit einzubeziehen. Entweder gewinnt man die beteiligten Schwingungen aus spektroskopischen Ergebnissen oder aus "ab-initio"-Rechnungen. Die Zustandsdichte im Molekül oder im Übergangszustand bei einer festen Energie muss dann durch Kombinatorik via Computer ausgezählt werden.

Darüber hinaus wurde in der RRKM-Theorie das Konzept des Übergangskomplexes eingearbeitet. So muss das aktivierte Molekül nachdem sich die Energie in einer Reaktionskoordinate gesammelt hat einen Übergangszustand überschreiten, um überhaupt dissoziieren zu können. Dabei besitzt der Übergangskomplex aber nur $3N-7$ gebundene Koordinaten, da die dissoziierende Koordinate im Übergangszustand als Translation beschrieben wird (vgl. Abbildung 2.10). Wichtig zu erwähnen ist auch, dass noch im Übergangszustand entschieden werden kann, welcher Energieanteil bei der Dissoziation in die Translation der Fragmente geht bzw. in den Fragmenten bleibt.



Legen wir das obrige Schema zu Grunde, entnommen aus [Di 15], lässt sich erkennen, dass mehrere Ratenkonstanten an dem Prozess beteiligt sind. Als Erstes wird das System zu A^* aktiviert (durch energieeinbringende Prozesse s.u.). Im nächsten Schritt muss das System in den Übergangskomplex $A^\ddagger$ kommen, ehe es im letzten Schritt zu $B + C$ dissoziieren kann. Marcus formulierte hieraus, dass die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_{uni} dem Quotienten aus der Summe der möglichen Energieverteilungen des Übergangszustandes

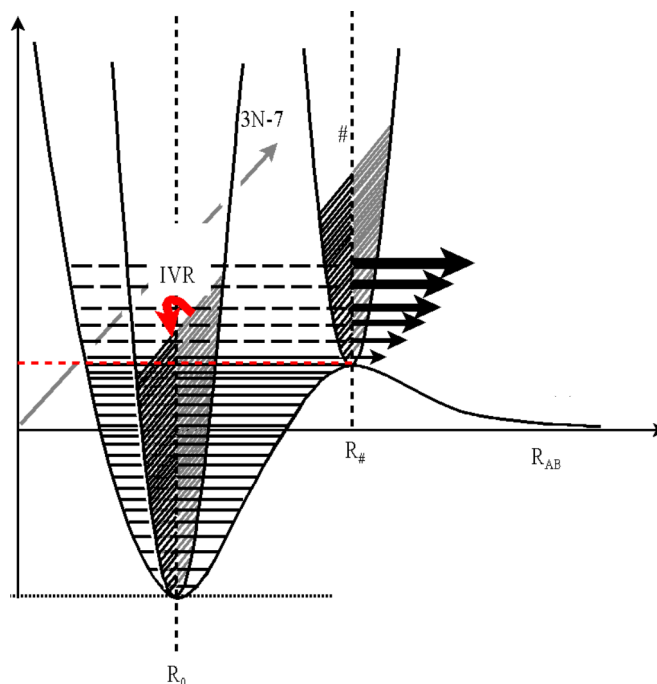


Abbildung 2.10: schematische Darstellung der RRKM-Theorie. Durch Schwingungs-umverteilung (IVR) konzentriert sich die Energie auf ein einzige Koordinate, die in einen Übergangszustand (#) übergeht. Dabei können verschiedene Niveaus im Übergangszustand erreicht werden. Die Pfeile im Übergangszustand (#) deuten die Translation an, die mit der Konzentrierung der Energie in ein Koordinate mit einhergeht, sodass zur Berechnung der Reaktionskonstante k nur noch $3N-7$ Schwingungen mit eingehen.

G^* im Bereich $E-E_0$ zwischen den Freiheitsgraden mit $3N-7$ [WM13] und der Dichte ρ aller Zustände im Molekül mit $3N-6$ Schwingungen [SFH89]:

$$k_{uni} = \frac{\sigma}{h} \frac{G^*(E - E_0)}{\rho} \quad (2.6)$$

- σ für Entartung Reaktionskoordinaten ($3N-6$)
- h Planksches Wirkungsquantum

Die Quintessenz aus der oben aufgetragenen Formel ist unter Betrachtung der Zustandsdichte die, dass kleine Moleküle noch relativ gut fragmentieren können, da die Wahrscheinlichkeit, dass eine kritische Energie in einer Reaktionskoordinate vorliegt, relativ groß ist. Da mit größer werdender Kettenlänge eines Peptids die Reaktionskoordinaten mit $3N-6$ mit jedem Atom nur linear zunehmen, aber deren Kombinationen also die Zustandsdichte viel schneller zunimmt, nimmt auch die Wahrscheinlichkeit sehr stark ab, dass die für die Dissoziation benötigte Energie in einer Reaktionskoordinate vorliegt. Daraus resultiert vor

allem, dass Peptide mit zunehmender Größe trotz hochenergetischer Anregung über lange Zeiten intakt bleiben können, da die eingebrachte Energie besser und schneller verteilt werden kann. Diese aus der Formel direkt erschließbare Aussage wurde von Griffin und McAdoo detailliert für Peptide mit verschiedener Kettenlänge untersucht [GM93]. Dabei wurden Peptide mit bis zu 1600 Aminosäuren untersucht. Die von ihnen berechneten Geschwindigkeitskonstanten sind für große Peptide bei einer interatomaren Bindungsenergie von etwa 1 eV trotz hoher interner Energie verschwindend gering.

An diesem Punkt stellt sich die Frage, wie trotz schlechter Prognosen die Hoffnung haben kann, dass auch für größere Peptide im Massenspektrometer eine Sequenzanalyse durch eine vollständige Fragmentierung möglich ist.

Eine genaue Analyse der an der RRKM-Theorie beteiligten Parameter und Annahmen sowie der vorangegangenen Literatur liefern aber vielversprechende Hinweise:

- 1) Das Verwenden einer sehr hohen Anregungsenergie (z.B. einige 100 eV)
- 2) Das Auftreten von konsekutiven Fragmentierungen
- 3) Das Absenken der Dissoziationsenergie durch das Einbringen einer Radikalstelle oder
- 4) eines mobilen Protons
- 5) lokale Einbringung von sehr viel Energie in der Hoffnung, dass sich in kurzer Zeit bis zur Dissoziation die Anregungsenergie nur über einen Teil des Moleküls verteilt kann (lokales RRK/RRKM)
- 6) lokale Einbringung von sehr viel Energie in der Hoffnung, dass direkt ein dissoziativer Kanal angesprochen wird, sodass nur sehr wenige oder nur ein Freiheitsgrad bei der Dissoziation beteiligt sind (nicht-statistischer Zerfall: direkte Dissoziation)

Im Folgenden sollen die einzelnen Punkte näher diskutiert werden.

zu 1) Die Konzeption der sehr hohen Anregungsenergie

Folgt man streng dem Konzept nach RRKM, so müsste die Energieanregung weit über die Dissoziationsgrenze hinaus erfolgen, um überhaupt einen Bindungsbruch in einer beobachtbaren Zeit zu bekommen. Eine erste Anwendung der RRK-Theorie auf große Peptide mit ungefähr 1000 Atomen wurde von Schlag und Levine durchgeführt [SL89]. Dabei wurde abgeschätzt, dass für ein Peptidion mit 1000 AS mindestens 70 eV interne Anregungsenergie nötig ist, um eine Fragmentierung im μ s-Zeitbereich zu erklären. Zu sehr ähnlichen Ergebnissen kommen Griffin und McAdoo mit Hilfe von RRKM-Rechnungen an Peptiden

mit bis zu 1600 Aminosäuren [GM93].

Sehr hohe Anregungsenergien von Peptiden können entweder durch Absorption von mehreren Photonen der Wellenlänge 193 nm (6,3 eV) oder durch sehr hochenergetische Stöße (*charge transfer dissociation*(CTD)) mit schnellen Ionen erreicht werden. Beide Methoden sollen in dieser Arbeit Anwendung finden. Der Vorteil der Anregung mit Photonen der Wellenlänge 193 nm liegt in der Tatsache, dass jede Peptidbindungsstelle absorbieren kann. Die Wahrscheinlichkeit einer sogenannten Multiphotonenanregung (vgl. Kapitel 2.4.4.3) steigt also mit der Zahl der Aminosäuren im Peptid. Dies würde dazu führen, dass die Anregungsenergie in großen Peptiden größer ist als in kleinen: Also genau so wie in der RRKM-Theorie gefordert, um eine Dissoziation zu erreichen.

zu 2) Das Auftreten von konsekutiven Fragmentierungen

Gelingt die Dissoziation eines Peptids gemäß der RRKM-Theorie zu zwei Fragmenten ähnlicher Größe, so können die Fragmente immer noch eine sehr hohe interne Energie enthalten, da die eingebrachte Energie viel größer war als die zum Bindungsbruch nötige Energie. Diese Fragmente haben nun deutlich weniger Schwingungsfreiheitsgrade und folglich eine viel geringere Zustandsdichte im Vergleich zum Muttermolekül. So besteht eine große Wahrscheinlichkeit, dass ein im ersten Fragmentierungsschritt entstandenes Fragmention aufgrund seiner immer noch hohen internen Energie und der drastisch reduzierten Zustandsdichte konsekutiv weiter fragmentieren kann, obgleich die vorausgegangene Fragmentierung schon Energie gekostet hat. Streng genommen gilt dies aber nur, wenn die Peptidkette im mittleren Bereich gebrochen wird. Denn genau hier würde die Zustandsdichte deutlich abnehmen, während die interne Energie pro Fragment in etwa halbiert wird. Je weiter am Ende einer Peptidkette die erste Fragmentierung auftritt, sollte dieser Effekt möglicherweise weniger ausgeprägt sein. Ein Ziel dieser Arbeit ist es solche "konsekutiven" Fragmentierungsschritte durch ein schnelles Quenchen der Überschussenergie zu identifizieren und zuweilen zu unterbinden.

zu 3) Die Absenkung der Dissoziationsenergie durch das Einbringen einer Radikalstelle

Bei der Elektronenstoßionisation von kleinen organischen Molekülen treten typischerweise viele zum Teil sogar sehr viele Fragmentationen auf. Dies liegt einerseits an der verwendeten hohen Elektronenenergie von 70 eV, andererseits sind die gebildeten Ionen Radikale, also fehlt ein Elektron in einer Bindung. Die Bindungsenergie ist in solchen Radikal-Kationen deutlich reduziert - etwa auf die Hälfte, was für kleine Moleküle eine deutliche Verstärkung der

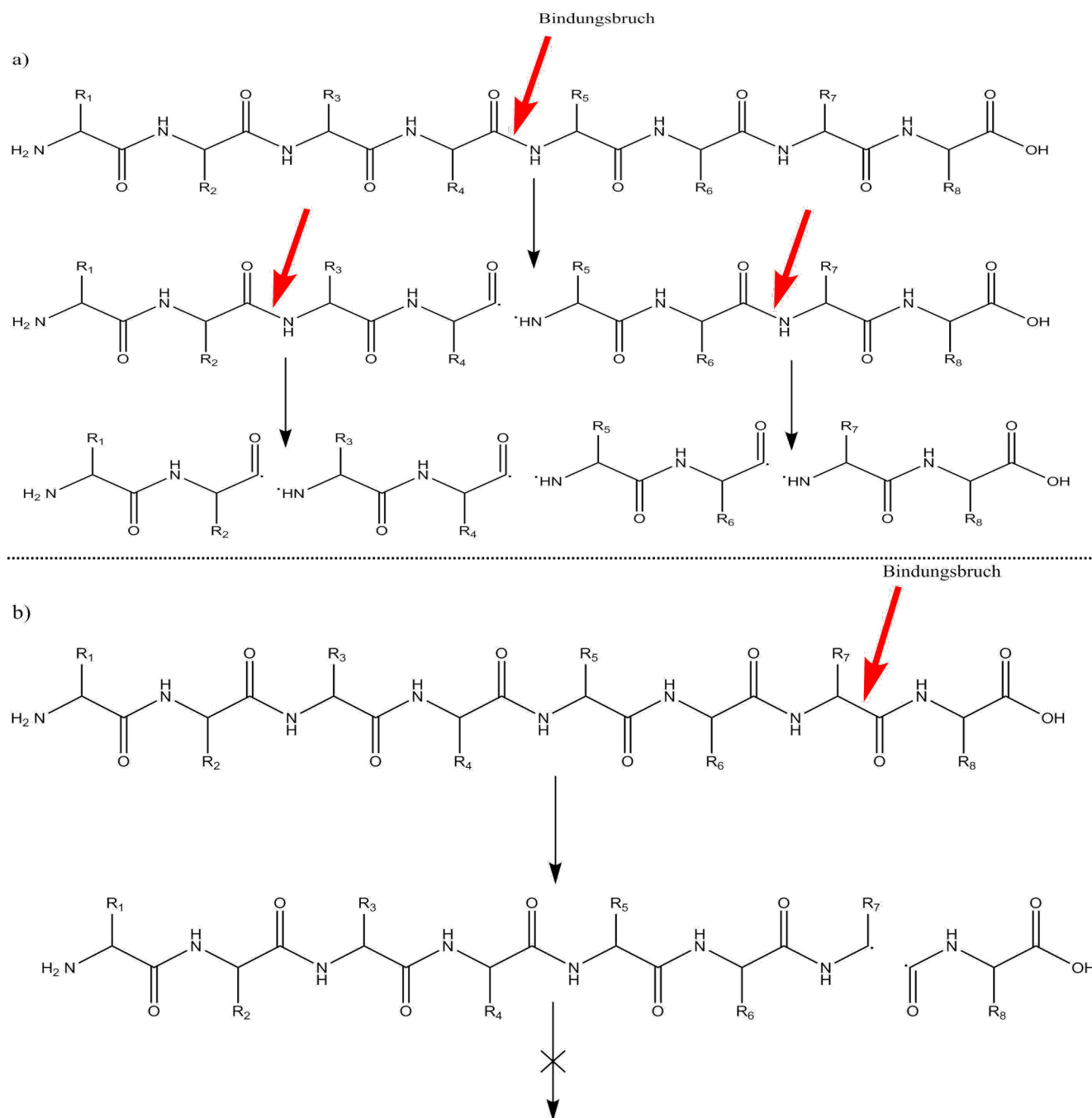


Abbildung 2.11: Vereinfachte Vorstellung in Bezug zur Fragmentierung eines Peptids in Abhängigkeit der Zustandsdichte. a) Ein Bindungsbruch in der Mitte der Peptidkette führt zu einer dramatischen Verringerung der Zustandsdichte. Die interne Energie liegt dabei gleich verteilt auf den entstanden Fragmenten vor. Diese interne Energie könnte unter Umständen ausreichen, dass die Fragmente nochmals zerfallen. b) Liegt der Bindungsbruch am Ende der Peptidkette, verringert sich die Zustandsdichte nicht viel, sodass ein weiterer Bindungsbruch weniger wahrscheinlich wird.

Fragmentierung zur Folge hat. In der Veröffentlichung Griffin und McAdoo werden für die gleichen Peptide zwei verschiedene Dissoziationsenergien die Zerfallskonstanten in Abhängigkeit von der Anregungsenergie gerechnet. Einmal für eine Dissoziationsenergie von 1 eV und einmal für eine Dissoziationsenergie von 0,1 eV ([GM93] Abbildung 1 und 2). Während für große Peptide mit einer Dissoziationsenergie von 1 eV die Geschwindigkeitskonstanten auch bei hohen Energien extrem klein ($k < 10^5$), sind sie bei der kleinen Dissoziationsenergie sehr groß ($k > 10^{10}$). Während eine Dissoziationsenergie von 1 eV durchaus realistisch ist, ist die Dissoziationsenergie von 0,1 eV unrealistisch klein. Durch das Einbringen einer Radikalstelle wird die Dissoziationsenergie auf etwa die Hälfte reduziert. Was bei sonst gleichen Parametern schon eine deutliche Erhöhung der Dissoziationswahrscheinlichkeit um einige Zehnerpotenzen bringen sollte. Die noch zu beantwortende Frage ist, inwieweit die positive Radikalstelle in Peptiden wandern kann, um die Reaktivität quasi zu exportieren. Die Wanderung der Ladungs- und Radikalstelle in Peptiden wurde von Weinkauf und Mitarbeitern untersucht [WSY⁺95, WSM⁺96]. Man beachte dabei, dass weder die Ladungswanderung noch die damit verbundene Absenkung der Dissoziationsenergie in der RRKM-Theorie vorgesehen ist. Es wurden von Weinkauf et al., um die Ladungswanderung zu beweisen, neutrale Peptide, welche am C-Terminus eine aromatische Seitenkette trugen, zunächst mit einer UV-Wellenlänge am Aromaten ionisiert. In einem zweiten Schritt wurde ein zweiter grüner Laser (VIS-Wellenlänge) genutzt, um den Chromophor nochmals anzuregen. Mit einem dritten sichtbaren Laserpuls wurde dann die Anwesenheit der Ladung am Aromaten geprüft. Je nach Wahl der dem Aromaten angrenzenden Aminosäuren ist die Ladung im Aromaten abgefließen oder im Aromaten verblieben. So konnten Schwellenenergien für den Ladungsfluss längs der Peptidkette abgeschätzt werden. Sie liegen bezogen auf den jeweiligen Aromaten (niedrigster Punkt für die Ladung) bei etwa 1 - 2,5 eV oberhalb der Ionisierungsenergie je nach Sequenz. Sie sind aber in jedem Fall viel kleiner als die Anregungsenergien, die für eine Dissoziation eines großen Peptid nötig sind, sodass man bei hohen Anregungsenergien von einer relativ freien Bewegung der Ladungs- und Radikalstelle längs der Peptidkette ausgehen kann [WSM⁺96]. Dadurch wird an der Radikalstelle gegenüber einer geschlossenschaligen Stelle die Dissoziationsenergie auf die Hälfte abgesenkt.

Die Absenkung der Dissoziationenergie durch das Einbringen einer Radikalstelle wird in dieser Arbeit bei der Anwendung der *charge transfer dissociation* getestet. Da die verwendeten Projektilionen sehr hohe Elektronenaffinitäten besitzen, können sie dadurch ein Elektron aus einem neutralen Bereich des Peptids entnehmen und so eine Radikalstelle einbringen.

zu 4) Die Absenkung der Dissoziationsenergie durch das Einbringen eines mobilen Protons

Beim Zusammentragen vieler Fragmentierungsergebnissen fiel auf, dass in protonierten Systemen das Proton eine große Rolle für die Fragmentierung übernimmt, wenn es mobil längs der *backbone* des Peptids wandern kann [JDSW94],[DJSW96],[CGMW96]. Das entsprechend genannte "Mobile Proton Modell" sagt aus, dass das Proton im protonierten Peptid nach Energiezufuhr wandern kann. Diese Wanderung erfolgt meist von den typischen Protonierungsstellen, N-Terminus oder Seitenkette, zu den Peptidbindungen der *backbone*. Hier hat das Proton zwei Möglichkeiten anzulagern. Die erste mögliche Stelle ist der Stickstoff der Peptidbindung. Diese Anlagerung würde, wie Rechnungen zeigen, zu einer Abschwächung der Peptidbindung führen [PS01], [CPLS00]. Anders würde sich eine Anlagerung am Sauerstoff der Peptidbindung verhalten. Dies würde zu einer Stärkung der Bindung führen. Ist das Proton an der Peptidbindung angelagert, kann ein nukleophiler Angriff auf die C-N-Bindung stattfinden. Das mobile Proton aktiviert demnach die Peptidbindung und macht sie dadurch reaktiv. Dadurch werden viele Reaktionskanäle, in Konkurrenz zu einem prompten Bindungsbruch ohne Protonen induzierten Bindungsbruch, eröffnet. Welcher Protonierungszustand vorlag, Proton auf dem Stickstoff oder Sauerstoff, kann man nach der Dissoziation durch die Fragmente nicht feststellen. Wie gut ein Proton wandern kann hängt von vielen Faktoren ab. So kann Basizität der Protonierungsstelle einen Einfluss auf die Mobilität haben. Je größer die Gasphasenbasizität der Seitenkette von den Aminosäuren ist, desto mehr Energie muss aufgebracht werden, damit das Proton in die Hauptkette injiziert wird und dort mobil wird.

Tabelle 2.2: Auflistung der Gasphasenbasizität von Aminosäuren [Har97]

Aminosäure	Basizität [kcal/mol]	Aminosäure	Basizität [kcal/mol]
Ala	205,6	Leu	210,9
Arg	237	Lys	222,3
Asn	214,3	Met	213,2
Asp	210,3	Phe	212,6
Cys	205,9	Pro	214,6
Gln	218,1	Ser	209,4
Glu	214,5	Thr	211,4
Gly	203,1	Trp	215,7
His	223,8	Tyr	212,9
Ile	211,4	Val	210,2

Aus der Tabelle 2.2 kann man z.B. entnehmen, das Arginin die größte Gasphasenbasizität von allen Aminosäuren aufweist. Hier sollte es unweit schwieriger sein das Proton aus der Seitenkette in Bewegung zu bringen. So zeigen auch Ergebnisse von Wysocki et al das Peptide mit Arginin in der Peptidkette weniger Fragmente zeigen als wenn kein Arginin in der Seitenketten vorhanden ist [WTSB00]. Neben dem Arginin gibt es noch weitere Aminosäuren, die durch die Protonenwanderung das Fragmentpattern beeinflussen. Die Aminosäure Prolin kann aufgrund ihrer Konstitution einen C-terminalen nukleophilen Angriff verhindern, sodass überwiegend N-Terminale Fragmente entstehen. Dies ist unter dem Begriff Prolin-Effekt bekannt. Das Prolin kann im Peptid eine cis/trans-Isomerisierung durchführen. Die dabei benötigte Energie beträgt ca. 80 kJ/mol [BTYW03],[SS15],[CB77], entspricht in etwa 0,8 eV. Zudem ist dies ein sehr langsamer Prozess [BHB75]. Es könnte also durch den Einsatz der Photonen erst zu einer Isomerisierung kommen, die eher ein ungünstiges Umfeld für die Fragmentierung schafft, z.B. die Protonenwanderung wird dadurch beeinträchtigt. Neben den Prolin-Effekt sind auch der Asparginsäure- und Histidin-Effekt bekannt. Diese Effekte führen im Allgemeinen zu C-Terminale Fragmenten. Eine Kombination aus Asp-Pro und His-Pro können Unterumständen in Abwesenheit von Arginin die einzigen Fragmente im Spektrum bilden.

Die Frage inwieweit dieses Modell bei verschiedenen Anregungen zum Zuge kommt, müsste diskutiert werden. Zum einen bedürfte es einer Anregung, also einer Aktivierung, für den Ablauf der Protonen-Wanderung, demgegenüber kann die Wanderung des Protons einen wichtigen Anteil an der Absenkung der Dissoziationsenergie in *closed shell* Peptidionen haben. Es ist zu beachten, dass nach RRKM zum Erreichen der Dissoziation eine hohe

Energie in einer kurzen Zeit eingekoppelt werden muss. Diese Energie sollte eigentlich immer höher sein, als zur Aktivierung der Protonen-Wanderung nötig. Wegen der geringen Masse des Protons sollte die Protonen-Wanderung schnell sein können, da sie auch von Tunneleffekten unterstützt werden kann. In dieser Arbeit werden Methoden genutzt die einen großen Energieeintrag ins System verursachen (z.B. Photonen der Wellenlänge von 193 nm oder auch schnelle Projektilionen). Diese Methoden tragen das Potential eine prompte Fragmentierung, also nicht nach RRKM, mit Ratenkonstanten zu induzieren, die weitaus größer sein sollten als die Ratenkonstanten, die durch eine protoneninduzierten Fragmentierung des Mobil Proton Modells erzeugt werden.

zu 5) Beschränkung des IVR auf einen lokalen Bereich

Legt man theoretische Ergebnisse von den Arbeitsgruppen um Lifshitz et al. [BMML75] und McAdoo et al. [GM93] zu Grunde und vergleicht diese mit experimentell erfolgreichen Fragmentierungen von Peptiden, so ergibt sich der Verdacht, dass die Energieumverteilung in großen Molekülen möglicherweise nicht im ganzen System wirksam ist. Vielmehr beschränkt sich möglicherweise die lokal eingebrachte Energie auf diesen Bereich des Moleküls. Dies resultiert demnach in einer größeren Wahrscheinlichkeit zur Fragmentierung eines Peptids, anders als der über die RRKM-Theorie berechnete Wert voraussagt.

Gerade die zuletzt genannten Punkte eröffnen für die Fragmentierung von Peptiden einige interessante Möglichkeiten. Die lokale Beschränkung der Energie und die nachfolgende effiziente Fragmentierung kann aber nur zum Einsatz kommen, wenn sehr viel Energie lokal ins Peptid eingebracht wird. Weder die Multiphotonenanregung mit 193 nm ist dazu in der Lage, da die einzelnen Photonen an verschiedenen Stellen des Peptids absorbiert werden, noch eine Multi-Stoßanregung mit Heliumatomen. Einzig die Methoden wie *electron capture dissociation* (ECD Kapitel 2.4.4.2) und *charge transfer dissociation* (CTD Kapitel 2.4.4.4) bringen lokal sehr hohe Energien ein. Da die ECD schon viel untersucht und sehr kostspielig ist, wurde in dieser Arbeit die CTD-Anregungsmethode untersucht. Sie kombiniert das lokale Einbringen einer hohen Anregungsenergie mit dem absenken der Dissoziationsenergie durch das Einbringen einer Radikalstelle (siehe oben).

Zusammenfassend sind in Abbildung 2.12 die verschiedenen Modelle, die in Zusammenhang mit der RRKM-Theorie stehen, nochmals dargestellt. Hier lassen sich die RRKM-Effekte grob in drei Kategorien einteilen. Die erste Kategorie ist die RRKM-Theorie selbst, die im Sinne ihrer Urheber die Effekte in *closed shell*-Molekülen beschreibt. Die zweite Kategorie beschreibt die Annahme, dass in großen Molekülen die RRKM-Effekte nur lokal

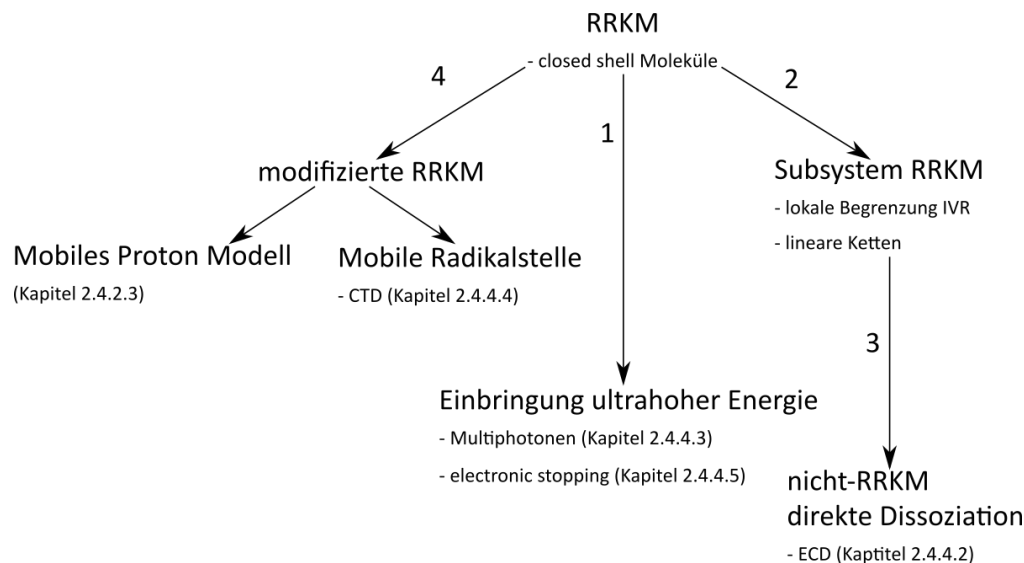


Abbildung 2.12: Überblick zum RRKM-Verhalten. Die RRKM-Theorie angewandt auf Ionen kümmert sich nicht um die Veränderung, die an der Ladungsstelle im Molekül passieren. Um den RRKM-Effekt zu überwinden muss man eine ultrahohe Energie (1), z.B. über Mutliphotonen oder über *electronic stopping*, einbringen. Eine Varinate der RRKM (2) geht in sehr großen Molekülen von einen RRKM-Subsystem aus. Hier beruft man sich auf die örtlich lokale Begrenzung des RRKM-Effekts. Eine direkte Dissoziation (3) geht davon aus, dass die lokal eingebrachte Energie an diesem Ort sofort die Bindung bricht. Eine modifizierte Abwandlung der RRKM-Theorie ist nötig, wenn mobile Ladungs-/ bzw. Radikalstellen (4) eingebracht werden und somit nicht mehr im Sinne der ursprünglichen RRKM-Theorie ist.

begrenzt auftreten. Im Extremfall kann bei einer sehr lokalen Anregung mit sehr viel Energie eine direkte ultraschnelle Dissoziation erzeugt werden. Eine solche Dissoziation würde weder IVR noch statistische Effekte beeinhalten. Letztendlich beruht die dritte Kategorie auf Moleküle, die nicht mehr der *closed shell*-Theorie folgen und müsste der Ladungs- und Protonenwanderung angepasst werden. Da hier durch die Beweglichkeit eines Protons oder auch einer Radikalstelle an dieser Störstelle zum Absenken der Dissoziationsenergie führt.

2.4.3 Postulierte Mechanismen und Effekte

Für eine Sequenzanalyse von Peptiden ist ein möglichst vollständiger Satz von Fragmentationen erforderlich. Eine wichtige noch zu klärende Frage ist, wie die Anregungsenergie ins Molekül eingebracht wird und nach welchem Modell die Fragmentierung abläuft. Nach dem Energieeintrag ins Molekül können spezielle molekülspezifische Mechanismen und Eigenschaften eine Dissoziation verhindern bzw. steuern und sowie charakteristische Fragmente bilden. Natürlich ist die Größe der Energie, die ins Molekül eingebracht wird, der primäre Parameter für jede Art von Fragmentierung. Zusätzlich können die Zeitskala des Energieeintrags oder der Ort im Molekül auch eine Rolle spielen. Zum Beispiel wird bei der Fragmentierung mit Helium-Stößen die Energie in kleinen Schritten und örtlich verteilt in die Peptide eingekoppelt. Extreme Methoden, wie *high energy collisional induced dissociation* HE-CID oder CTD bzw. ETI/D, können gänzlich andere Fragmente bilden als z.B. die Photofragmentierung, obwohl theoretisch annähernd der selbe Energiebetrag in das Molekül eingebracht werden kann. Im Folgenden werden einige dieser Mechanismen und Effekte vorgestellt.

2.4.3.1 Ladder -/Ladder Switch -Modell

Wie Eingangs erwähnt können unterschiedliche Methoden unterschiedliche Mechanismen im Molekül abrufen und unterschiedliche Fragmentpattern erzeugen. Ein erster Schritt zur Beschreibung dieser Fragmentmuster ist die Diskussion des *ladder switch*-Modells (ls-Modell) und des *ladder*-Modells (l-Modell). Diese Modelle wurden durch die Arbeitsgruppe um Boesl et al. an Laserexperimenten mit Benzolderivaten postuliert [DNB⁺82, BNS82, BWW⁺90]. Beide Modelle beschreiben auf ihre Weise wie das Einbringen der Energie (dort Photonen) die Energie mit Fragmentierung interagiert. In Abbildung 2.13 sind beide Modelle schematisch aufgetragen. Beim l-Modell, hier in Abbildung 2.13, stellt man sich vor, dass ein absoluter Energiebetrag, je nach Art der Einbringung (mehrere Photonen, ein hochenergetischer Stoß), die Dissoziationsschwelle E_0 bei weitem überschreiten kann und daraus instantan viele Fragmentierungskanäle eröffnet werden. Während dieses Modell bei kleinen zyklischen Molekülen nicht überzeugend ist, da dort die unterschiedlichen Fragmentierungskanäle energetisch sehr unterschiedlich sind, ist dieses Modell ideal für Peptide geeignet. Die Anregung muss wegen der RRKM-Effekte so lange akkumulieren bis die kritische Energie für einen Bindungsbruch erreicht wird. Dann öffnen sich aber gleichzeitig alle nach Roepstorff und Fohlmann möglichen Fragmentierungskanäle, die nahezu isoenergetisch sind. Das ls-Modell lässt sich am Besten an der Photofragmentierung erläutern. Da ein Laserpuls eine feste Breite besitzt, können in diesen Zeitraum auch mehrere Photonen

absorbiert werden. So werden einzelne $h\nu$ -Pakete absorbiert und somit die Energie akkumuliert, bis diese ausreicht um zu fragmentieren. Ist dieser erste Schritt noch zeitlich im Laserpuls kann das Fragment weitere Photonenpakete aufnehmen, dessen resultierender Energiebetrag zu einer weiteren Fragmentierung führen kann. Dieser *ladder-switch*-Prozess des Energie Aufnehmens und Fragmentieren ist solange möglich solange der Laserpuls, also noch Photonen, zu Verfügung steht.

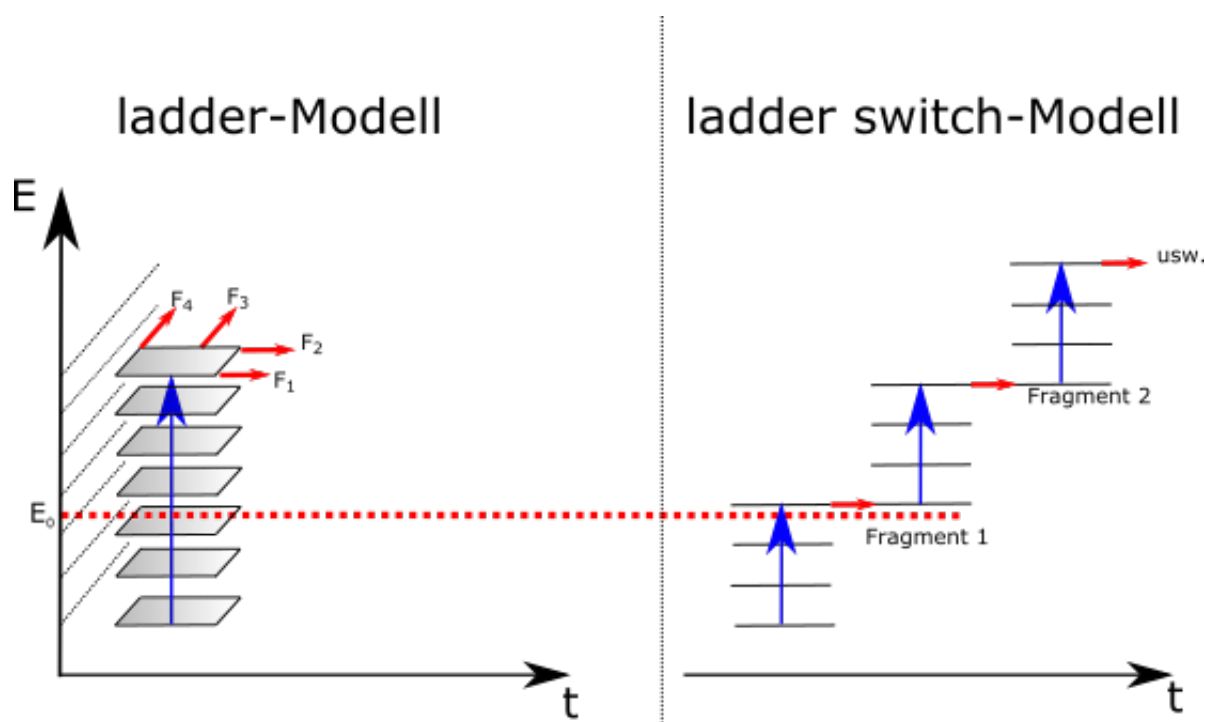


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung der beiden Modelle. Links ist das *ladder*-Modell dargestellt. Rechts das *ladder switch*-Modell. Mit E_0 ist die erste Dissoziationschwelle eingezeichnet. Diese wird im Falle des *ladder*-Modells deutlichst überschritten. Hieraus können verschiedene Fragmente resultieren. Im *ladder switch*-Modell hingegen werden Energiepakete, z.B. Photonen, aufsummiert bis E_0 erreicht ist. Daraus folgt eine schnelle Fragmentierung. Das Fragment kann wieder ein Photon, wenn der Laser noch an ist, aufnehmen kann. Der Wechsel zwischen Energie aufnehmen und anschließender Fragmentation erfolgt solange die Energiequelle, z.B. die Länge des Laserpulses, aktiv ist.

Da nach Boesl et al. das ls-Modell vor allem für eine Laseranregung mit 10 ns Laserpuls an kleinen Molekülen wie Benzol gilt, erwartet man vor dem Hintergrund der RRKM-Theorie für die Experimente dieser Arbeit mit Laser an Peptiden oder CT-Prozessen eher das l-Modell. Zumal mit Peptiden größere Moleküle gemessen werden und ein Laser mit der Wellenlänge 193 nm (6,3 eV) und einer Pulsbreite von 5 ns mehrere der vielen vorhandenen Amidstellen angeregt werden können. Für die Experimente in denen schnelle Projektionen eingesetzt werden, ist auch das *ladder*-Modell anzunehmen, da sowohl mit

der resonanten *charge transfer* oder dem *electronic stopping* in einem Schritt eine erhebliche Menge Energie eingebracht wird. In dieser Arbeit erweitern wir das *ladder*-Modell insofern (siehe Abbildung 2.14) als dass, dass die zuerst gebildeten Fragmente wegen der hohen Energie dann weiter fragmentieren können (siehe auch Kap. 2.4.2).

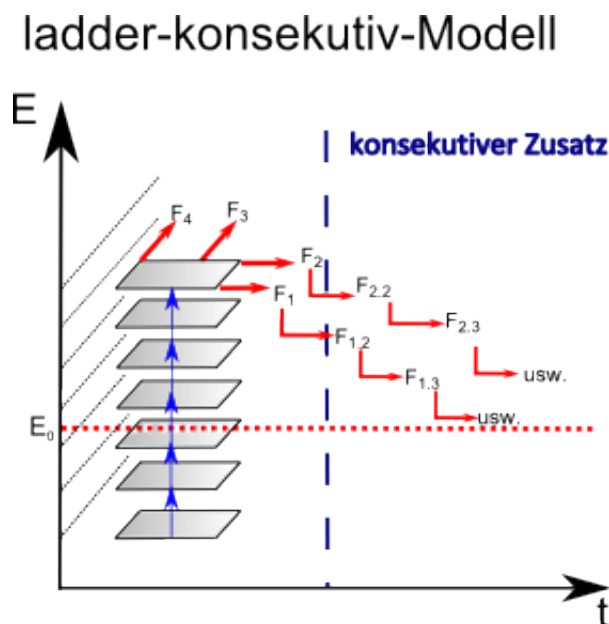


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung des modifizierten ladder-Modells. In Anlehnung an das Ladder-Modell in Abbildung 2.13 wird in dieser Abbildung das Modell erweitert. Durch den Energieeintrag können, wie oben schon erwähnt, viele Fragmente in einem ersten Schritt entstehen. Diese Fragmente können dennoch eine Überschussenergie enthalten, die zu einen weiteren Zerfall führen kann. Der Vorgang kann solange erfolgen bis die Energie nicht mehr ausreicht um einen weitere Dissoziation zu induzieren.

2.4.4 Anregungs- und Fragmentierungsmethoden

In der Massenspektrometrie wurden viele Methoden entwickelt, um die Fragmentierung von Molekülen zu bewerkstelligen. Für einen Massenspektrometer mit einer Paul-Falle hat sich z.B. die Stoßfragmentierung durch Helium-Multistöße bewährt. Aber auch andere Methoden zeigten die erwünschte Dissoziation von Molekülen. Unkonventioneller Weise kann durch ein Einkoppeln eines Lasers gezielt Photonen eingesetzt werden, um die Moleküle zu fragmentieren. Es wird auch eine Methode genutzt, dass das Einfangen von Elektronen, im sogenannten *electron capture dissociation* [ZKM98], zu einer Bindungsspaltung einsetzen. Weiterhin können auch neuerdings schnelle Ionen, sowohl durch Kollision als auch durch einen *charge transfer* (CT), Energie in das Molekül überführen, die ausreichend ist, das

Molekül zu fragmentieren. Aus den verschiedenen dargebotenen Energieübertragungsmechanismen können auch unterschiedliche Reaktionswege durchlaufen werden (vgl. [PS05]). In diesem Abschnitt wird vor allem auf die verschiedenen Fragmentierungsmethoden wie Stoßfragmentierung, die Photofragmentierung und die *charge transfer dissociation* (CTD) usw. eingegangen. Es soll gezeigt werden welche Faktoren die Fragmentierungsmethoden beeinflussen. Die Fragen wie "wie die Energie für die Dissoziation frei wird" und "in welcher Zeit die Dissoziation erfolgt", soll geklärt werden. Natürlich soll untersucht werden welche Auswirkung diese Faktoren auf die entstehenden Fragmente haben.

2.4.4.1 Stoßfragmentierung

Die simpelste Form Energie in ein Molekül zu überführen ist wohl die Stoßfragmentierung (*collision induced dissociation* (CID)) [McL92, MM05, GM96]. Hierbei werden durch inelastische Stöße mit einem neutralem Stoßpartner Energie auf das Molekülion übertragen. Die Stoßfragmentierung kann in zwei verschiedene Methoden unterschieden werden. Zum einen in die *low energy collision induced dissociation* und in die *high energy collision induced dissociation*. Beide Methoden benötigen einen neutralen Stoßpartner, welches ein Atom oder auch ein Molekül sein kann. Einzige Bedingung an den Stoßpartner ist, dass er inert sein muss. Anderenfalls könnten bei einem Stoß unerwünschte Reaktion stattfinden, die das zu untersuchende Molekül verändern.

In der *high energy* CID Methode ist die kinetische Energie des Ions größer als ein keV. Diese Energie reicht bei einem einzigen Stoß für viele Molekülionen aus, um diese zu fragmentieren. Die bei dieser Methode resultierenden Fragmente sind unter anderem von Biemann et al. [JMB88] untersucht wurden. Für sehr große Molekülionen ergibt sich das Problem, dass der maximale Impulsübertrag im Schwerpunktsystem Ion - neutrales Edelgas mit der Masse des Ions immer kleiner wird.

Das in dieser Arbeit verwendete ESI-MS mit seiner Ionenfalle nutzt hingegen die *low energy* Methode. In der Falle werden die Ionen durch Steigerung der Amplitude der Wechselspannung in Schwingung versetzt. Die daraus resultierende Bewegung gleicht einer Lissajous-Figur durch die Fallenmitte. Bei Ihrem Weg stoßen die Ionen mit dem neutral Gas zusammen und nehmen Schritt für Schritt in vielen Stößen jeweils kleine Mengen Energie auf. Bedingt durch die vielen Stöße kann die interne Energie des Moleküls aber dennoch hoch werden. Durch die *low energy* CID Methode werden also durch einen Stoßpartner deutlich weniger als 1 eV Energie übertragen. Ein Stoß würde demnach noch nicht ausreichen, um das Molekülion zu fragmentieren. Es müssen folglich mehrere Stöße stattfinden, damit sukzessiv die Grenze der Dissoziationsenergie überschritten wird und das Molekülion frag-

mentieren kann. Da die Helium-Stöße statistisch nach und nach verschiedene Stellen des Moleküls treffen, wird per Definition die Energie gleichmäßig verteilt und RRKM muss zur Anwendung kommen. Man erwartet daher, dass die schwächsten Bindungen zuerst brechen. Anders als bei der *high energy* Methode werden mit dieser Methode vor allem b- und y-Fragmente gebildet. Es zeigen sich auch Verlustkanäle, wie H_2O -, NH_3 - oder auch CO-Verlust [Pap95].

Für die Fragmentierung via *low energy* CID spielen einige Faktoren eine große Rolle. So sind die Akkumulationszeit, d.h. wie lange können Molekülion und Stoßpartner interagieren, und der Druck des Stoßgases entscheidende Faktoren für eine hohe Ausbeute an Fragmenten. Stöße eines Stoßgases mit dem Molekülion können Energie übertragen - die interne Energie des Ions nimmt dabei zu. Der Prozess des Energieübertrags kann aber auch in die andere Richtung erfolgen, d.h. es wird die Energie vom Ion auf den Stoßpartner zurück übertragen, wenn das Ion langsam ist (Umkehrpunkt). Dies wiederum bedeutet die interne Energie des Molekülions nimmt wieder etwas ab [RG07, BPG06]. Da die Anregung der Moleküle mit der Amplitude der Wechsellspannung erfolgt und diese eine hohe Frequenz besitzt (ca. 1 MHz), kann man sich auf einer Zeitskala von Millisekunden eine mittlere Energie definieren.

Würde man einen Graphen betrachten (Abb.2.15), der die mittlere interne Energie des Ions gegen die Zeit nach Beginn des Schüttelns zeigt, erkennt man, dass ab einer bestimmten Zeit die mittlere interne Energie nicht mehr zunimmt. Ab diesem Punkt wird ein Gleichgewicht erreicht, indem das Molekül aufgeheizt wird (interne Energie nimmt zu) und abgekühlt wird (interne Energie nimmt ab). Der Graph zeigt auch die Dissoziationsenergie für die unteren Fragmentierungskanäle an. Erhöht man den Druck des Stoßgases, wird dieser *steady state* schneller erreicht. Wird der Druck weiter erhöht, so stoßen die Ionen sehr oft und werden gebremst, so werden die Stöße niederenergetischer und es kommt zu einem Kühleffekt.

Wenn das System durch andere Anregungsmethoden eine höhere interne Energie (z.B. durch Photonenbestrahlung) besitzen würde, könnte man sich diesen Kühleffekt zu Nutze machen, um eine langsame Fragmentierung zu verhindern. In dieser Arbeit wurden unter anderem Peptide mit einem Laser der Wellenlänge von 193 nm bestrahlt und ein Heliumgaspuls in die Paulfalle geleitet. Damit sollte bewiesen werden, dass die eingebrachte Energie des Lasers so hoch ist, dass die entstehende Fragmente aufgrund von hoher Restenergie nochmals fragmentieren können. Diese Restenergie kann durch den Kühleffekt eines Gaspulses dem Fragment entzogen werden und kann nicht mehr weiter fragmentieren.

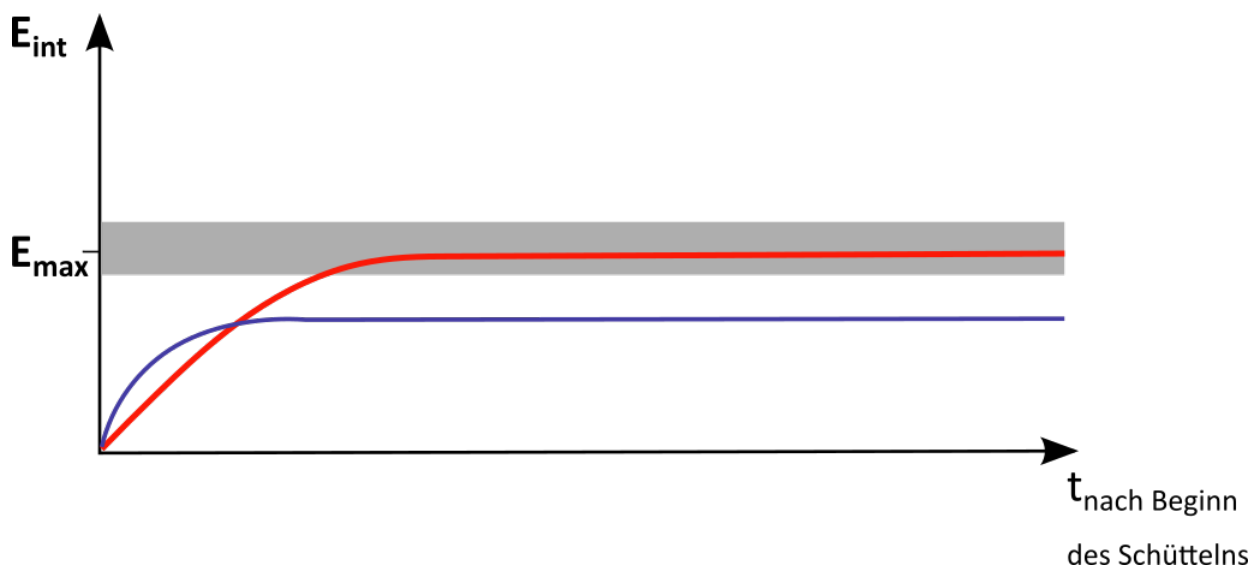


Abbildung 2.15: Zuwachs der internen Energie eines Moleküls während der Zeitdauer in der Stöße mit Helium stattfinden. In blau und rot sind unterschiedliche Drücke des Stoßgases dargestellt (blau > rot). Da der Druck des Stoßgases in der blauen Kurve größer ist, wird der *steady state* schneller erreicht. In grau unterlegt ist der Bereich, in dem die unteren Fragmentierungskanäle eines Peptids liegen.

2.4.4.2 Electron Capture Dissociation

Eine gänzlich andere Methode zur Fragmentierung von Peptiden stellt die *electron capture dissociation* (ECD) da. Diese Methode macht sich einerseits die hohe Einfangwahrscheinlichkeit von niederenergetischen Elektronen durch mehrfach positiv geladene Oligopeptide zu nutze und andererseits die Tatsache, dass bei der Rekombination eines Kation mit einem Elektron sehr viel Energie frei wird, die zur Fragmentation eines Moleküls genutzt werden kann [ZKM98, Bat50]. Neben der dissoziativen Rekombination kommt es auch zu einer Ladungsneutralisation, d.h. das Molekül (M) mit der Ladung $1+$ könnte am Ende neutral sein. Daher ist es für die ECD essenziell, dass die Mutterionen eine höhere Ladung aufweisen als $1+$.



Man geht davon aus, dass die Ladungsneutralisation, also der Einfang eines Elektrons, an oder in der Nähe eines Protons im Molekül stattfindet und somit eine Radikalstelle im Molekül bildet [Zub04]. Eine $[M]^{(n-1)+}$ -Spezies lässt sich dann genau an dem Massenshift um ein Dalton (Da) erkennen. Ein Vergleich eines zweifach geladenes Peptides X z.B. aus einem ESI-Prozesses und einem durch ECD neutralisiertem dreifach geladenem Peptids X würde man erkennen, dass das ECD-Produkt um eine Masse schwerer wäre.

Neben der Ladungsänderung des Peptids wird an der Einschlagstelle eine Radikalsstelle erzeugt und Energie frei, sodass ein schneller Bindungsbruch induziert werden kann (in ca. 10^{-11} s) [ZKM98, Zub04]. Man glaubt, dass der Bindungsbruch so schnell geht, dass die RRKM-Theorie keine Rolle spielt. Verschiedene Experimente mit Peptiden zeigen eine Bevorzugung des Bindungsbruchs an der N-C-Bindung der Peptidbindung. Dies bedeutet, es werden überwiegend c-Fragmente und zum kleinen Prozentsatz auch z-Fragmente gebildet. Da das Einfangen der Elektronen aufgrund von einer Rückfaltung der protontragenden Aminosäure zum Rückgrat des Peptids an jeder N-C-Bindung ([ZKM98, ZHF⁺00]) stattfinden kann, führt es zu einer Fragmentierung an dieser N-C-Bindung. Da viele dieser Rückfaltungen denkbar sind, ergibt sich die Möglichkeit einer kompletten Sequenzanalyse über die c-Fragmente. Das macht diese Methode zu einer wertvollen Ergänzung zu anderen Methoden, mit denen bevorzugt andere Fragmente (z.B. a und b-Fragmente) erzeugt werden. Nachteilig an dieser Methode ist, dass bei ihrer Anwendung das größte Signal im Massenspektrum das um eine Ladung reduzierte Mutterion ist. Die Intensitäten der gesuchten Fragmente sind nur sehr klein und können im Rauschen des Spektrums verschwinden. Weiterhin macht der große technische Aufwand (meist verwendet im *Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer* (FT-ICR-MS)) niederenergetische Elektronen an die Peptidionen heran zu führen unattraktiv.

2.4.4.3 Photofragmentierung

Neben der Stoßfragmentierung und der ECD lassen sich Peptide auch mit monochromatischen Photonen fragmentieren. Diese Methode wird jedoch nicht in der Analytik angewendet. Hierfür wird in der Regel ein Laser eingesetzt, um eine geeignet hohe Photonendichte zu erzeugen. Betrachtet man ein Peptid, können bei geeigneter Wellenlänge neben den Chromophoren der aromatischen Seitenketten (290 - 260 nm), auch die Peptidbindungen (190 - 200 nm) an sich ein Photon absorbieren. Absorptionsspektren von Peptiden, oder auch nach dem Chromophor Motif der Peptidbindungsstelle N-Methylacetamid, zeigen, dass die Amidbindung zwei Absorptionsbanden hat. Eine Absorptionsbande liegt etwa bei 150 nm und eine andere Absorptionsbande bei 190 nm. Für die Absorptionsbande bei 190 nm bietet sich ein Argon-Fluor-Excimer-Laser an, der Photonen mit 193 nm emittieren kann. Diese Wellenlänge hat zudem den Vorteil, dass diese nicht im Vakuum geführt oder justiert werden muss, da die Luft hier eine Absorptionslücke hat. Die Energie zur Fragmentierung wird hier also über die Absorption von einem oder mehreren Photonen eingebracht. Ein Photon der Wellenlänge von 193 nm hat die Energie von 6,3 eV. Vergleicht man diesen Wert mit der Bindungsenergie einer Peptidbindung, in etwa 3 bis 4 eV, so erkennt man,

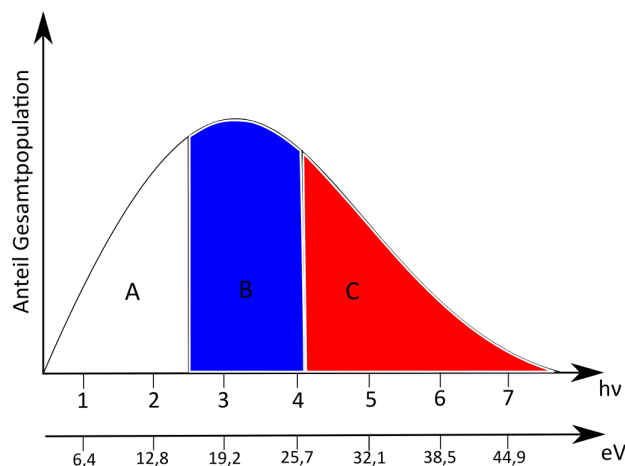


Abbildung 2.16: Auftragung der Population von angeregten Zuständen in Abhängigkeit der absorbierten Photonen in Anlehnung der Arbeit von Dr. N. Wolters [Wol13]. Die Peptide können mehrere Photonen absorbieren. Dadurch erhalten sie auch unterschiedlich viel interne Energie. Im Bereich A werden nur wenige Photonen absorbiert und das Mutterion bleibt dabei intakt. Im Bereich B hat das Mutterion gerade so viel Energie aufgenommen, sodass es langsam zerfallen kann. Im letzten Bereich C erhalten die Peptide so viel Energie, dass diese sehr stark fragmentieren.

dass theoretisch ein Photon ausreichen könnte, um eine Fragmentierung einzuleiten. Die Wellenlänge von 157 nm (7,89 eV) findet auch in der Forschung zur Peptidsequenzanalyse ihre Anwendung [CTR05]. Der Nachteil ist, dass der Strahl des Lasers zum Gerät im Vakuum geführt werden muss. Neben der benötigten Energie zur Fragmentierung würde also auch bei einer 193 nm - Anregung noch ein kleinerer Energiebetrag überbleiben. Die entscheidende Frage ist aber, ob es möglich ist, mehr als ein Photon einzubringen. Mit der Photofragmentierung der Peptide durch die Photonen der Wellenlänge 193 nm wird eine große Anzahl an a-Fragmenten (a_1 , a_2usw.), aber auch an b und y-Fragmenten gebildet [BR99],[MR06],[TCR07],[MYK05, Wol13]. Viele Experimente deuten an, dass die Bildung der a-Fragmente wahrscheinlich über einen sekundären Schritt, dem CO-Verlust der b-Fragmente, gebildet werden. Dies liegt am oben erwähnten Chromophor, der Peptidbindung. Wird ein Peptid mit Photonen der Wellenlänge von 193 nm ausgesetzt, so kann an jeder Stelle im Molekül (die Peptidbindungen) mit einer ähnlichen Wahrscheinlichkeit absorbiert werden. So können, bei einem intensiven Laserstrahl, auch mehrere Photonen absorbiert werden, was die Effizienz der Fragmentierung stark erhöhen sollten. In der Arbeitsgruppe von Prof. Weinkauff et al. konnte iterativ bestimmt werden, dass z.B. ein Angiotensin II-Molekül vier Photonen der Wellenlänge 193 nm (Σ 25,2 eV) absorbieren muss, um fragmentieren zu können. In diesen Zusammenhang spricht man auch von der Multiphotonenanregung [Wol13].

Die Abbildung 2.16 zeigt beispielhaft wie die Verteilung der absorbierten Photonen in einen Experiment mit Peptiden sein kann. Die sich daraus ergebende Populationkurve lässt sich dabei in drei Bereiche einteilen.

A hier werden nur wenige Photonen pro Molekül absorbiert und es wird keine Fragmentierung erwartet.

B hier werden gerade soviel Photonen absorbiert, dass es zu metastabilen Zerfällen kommt.

C es werden viele Photonen absorbiert und es ist daher mit starker Fragmentierung zu rechnen.

Der Einsatz dieser Methode scheint geeignet, um in ein Peptid genügend Energie einzubringen sodass eine Fragmentierung stattfindet. Bei großen Peptiden werden mehr Photonen absorbiert als bei kleinen, so dass der RRKM-Effekt abgeachwächt oder sogar kompensiert wird. Mit Hilfe der Konsequenzen der RRKM-Theorie und noch folgenden Überlegungen (vgl. Kap. 2.5), kommt man im Falle einer Multiphotonenanregung zur Annahme, dass es auch konsekutive Fragmentationen geben muss. Ein solcher konsekutive Schritt könnte ursächlich für die kleinen Fragmente, wie sie bei der 193 nm-Anregung entstehen, sein. Durch die Wahl einer geeigneten Methode, z.B. durch den massiven Einsatz von Heliumstößen (vgl. Kap. 3.1.2 und 4.1) während der Laserexposition, könnte die Fragmentierung nach dem ersten Schritt unterbrochen werden und evtl. neue Fragmente im Massenspektrum auftreten, die im Lasermassenspektrum bisher nicht zu sehen sind.

2.4.4.4 Charge-Transfer Dissociation an Peptiden

Eine weitaus neuere Methode zur Fragmentierung ist die *charge transfer dissociation* ([BHS10], [BHS11], [HJ14] und [LJ17]). Diese Methode macht sich zu Nutze, dass Edelgas-Kationen quasi eine höhere "Elektronenaffinität" besitzen als das Ionisierungspotenzial eines Peptid-Quasimoleküls. Betrachtet man zum Beispiel ein einfach geladenes Helium-Kation so besitzt dieses eine "Elektronenaffinität" von 24,5 eV während das Ionisierungspotential eines bereits geladenen Peptides im Bereich von ca. 11 eV liegt (Substanz P $11 \pm 0,6$ eV ([BTHZ02] und weitere)). Es würden also nach dem Elektronübertrag von einfach positiv geladenen Peptid zum Edelgasion immer noch 13 eV Überschussenergie vorliegen. Neben Edelgasionen ([LJ17]) können natürlich auch andere Gasionen, wie Wasserstoff-Kationen, O_2^+ oder N_2^+ ([CMD⁺14], [BSP⁺08]) genutzt werden. Ein Problem dabei ist, dass sich gleich geladene Ionen aufgrund der Coloumb-Abstoßung eigentlich abstoßen. Daher werden die Edelgasionen, auch in diesem Zusammenhang als Projektil bezeichnet und

auf mehrere kV beschleunigt, um somit die repulsive Barriere zur positiven Ladung im Peptid zu überwinden und dem Molekülion möglichst nahe kommen zu können.

Diese Methode weist zwei Besonderheiten auf. Neben einer Fragmentierung, die Überwiegend auf die aromatischen Seitenketten beschränkt ist, kann man unter bestimmten Umständen an manchen Molekülionen in den Massenspektren eine Ladungserhöhung der Muttermasse beobachten ($M^+ \rightarrow M^{2+}$), bei der aber die Protonenanzahl gleich geblieben ist ($[M + H]^+ \rightarrow [M + H]^{2+}$). Aus diesen so entstandenen Radikalkationen können durch radikal-induzierte Fragmentierungsschritte Fragmente entstehen, die der Roepstorff-Fohlmann-Nomenklatur entsprechen.

Für die Wechselwirkung von schnellen Ionen, die hohe Ionisierungsenergie besitzen, mit protonierten Peptiden werden zwei Mechanismen postuliert [BSP⁺08, BHS10, BHS11], (i) da sogenannte *electronic stopping* und (ii) ein Ladungstransfer vom Peptid auf das Projektilion.

Beim *electronic stopping* (i) wird die Annahme gemacht, dass das Projektilion das Molekül direkt trifft, also durch die Elektronenwolke der Valenzelektronen des Peptids fliegt. Dabei kann das Projektil verschiedene Trajektorien durch das Molekülion nehmen. Je nach Länge des Weges durch das Molekül gibt das Projektil mehr oder weniger Energie, durch die extrem vereinfachte Vorstellung einer "Reibung", ab. Das Molekül nimmt diese Energie auf, indem Elektronen in einen höheren Zustand angeregt werden. Die Frage hier ist, ob der dabei übertragende mechanische Impuls noch die Detektion der Fragmentionen erlaubt, oder diese schon aus der Paul-Falle entfernt werden. Da Fragmente von Peptiden überwiegend aus den Seitenketten aromatischer Aminosäuren stammen, deutet das auf eine Ladungswanderung hin. Es werden dabei wieder zwei verschiedene Fälle unterschieden. Im ersten Fall wird nur wenig Energie übertragen und es entstehen größere Fragmente. Bei höheren Anregungsenergien tritt dann eine Multifragmentierung zu kleineren Fragmentationen auf. Beim Ladungstransfer (ii) von Peptid zum Projektilkation ist kein direkter Kontakt zwischen Beiden nötig. Durch die Barrierenunterdrückung (siehe auch Abb. 2.18) im Augenblick des Elektronentransfers wird das Elektron zwischen Peptid und Projektilkation von zwei positiven Ladungen angezogen. Als Folge kann dieser Prozess auch über relativ große Reichweiten kontaktlos ablaufen.

Aber nicht nur dieser geometrische *cross section* ist entscheidend für die Fragmentierung sondern auch die Lage der energetischen Zustände der Projektilionen und der Probenionen ist relevant für den Übertrag eines Elektrons vom Peptid zum Projektil. Die Arbeitsgruppe um Schlathöller postuliert in diesen Zusammenhang einen Resonanzeffekt. Sie vergleichen die Lage der elektronischen Zustände der Projektil Ionen (Rekombinationsenergie), wie

H^+ ($n=1$), He^+ ($n=1$) und He^{2+} ($n=2$), mit dem Ionisierungspotential des HOMO's (*highest occupied molecular orbital*) und HOMO-1's eines Peptides. So zeigt sich, dass die Lage des $n=1$ -Zustandes von H^+ und des $n=2$ -Zustandes von He^{2+} in etwa in diesen Bereich liegen. Betrachtet man hingegen den $n=1$ -Zustand des He^+ , erkennt man, dass dieser zu weit oberhalb des Ionisierungspotentials des Peptides ist. Dennoch lässt sich vermuten, dass der Resonanzeffekt nicht nur für den HOMO und HOMO-1 gilt, sondern auch für weit tiefer liegenden Niveaus (HOMO- x ; x für 2, 3, 4, 5 usw.). Vergleicht man HeI-Photoelektronenspektren mit den Rekombinationsenergien von Edelgaskationen erkennt man für die höheren Potentiale durchaus gleichwertige Energien. Mithilfe dieser Methode lassen sich Spektren erstellen, die ein breites Fragmentierungsmuster haben, d.h. es lassen sich alle Fragmenttypen (a,b,c/x,y,z) im Spektrum erkennen. Darüber hinaus könnten die umgeladenen radikalischen Muttermassenpeaks isoliert werden und durch ein CID-Experiment weiter untersucht werden. Nachteilig erscheint aber, dass neben den zu untersuchenden Molekülen auch das Restgas (Restgas bestehend aus Verunreinigung (Proben vorheriger Untersuchungen, Pumpenöl usw.)) auf die schnellen Ionen reagiert. Diese Restgasionen können das Spektrum erheblich verfälschen. Die Motivation war, die Methode dennoch in dieser Arbeit zu verfolgen, lag zum Einen durch den Ladungsübertrag vom protonierten Peptid auf das Gasion und der damit verbundene entstehenden Radikalstelle am Peptid. Dem schon protonierten Peptid fehlt es nach dem Elektronentransfer also ein Elektron in einer Bindung, so dass eine Radikalstelle vorhanden ist und somit auch offensichtlich ist, dass die so erzeugten Ionen leichter zu fragmentieren sein sollten als die nur protonierten Ionen. Zum Anderen ist mechanistisch offensichtlich, dass die lokale Ionisationsenergie im Peptid steigen muss, je näher die Einschlags- und Wechselwirkungsstelle an der schon vorhandenen Ladung (Proton) liegt. In unmittelbarer Umgebung der Primärladung ist eine Ionisation durch den Elektronentransfer aus energetischen Gründen unmöglich. Es kommt dort also bei einem streifenden Einfall nicht zum Ladungs- und Energieübertrag. Die daraus resultierende Frage ist, ob dieser Effekt eines partiell ortsselektiven Ladungstransfer durch Fragmentierungen weit weg von der Primärladung beobachtbar und beweisbar ist. Darüber hinaus sollte die positive Radikalstelle im Peptid längs der Kette wandern können [WSY⁺95, WSM⁺96, RLSW99]. Energiesenken sind der N-Terminus und die aromatischen Seitenketten, aber natürlich nur, wenn sie weit weg von der Primärladung sind. Die Arginin-Seitenkette, die energetisch ebenfalls günstig für die positive Radikalstelle wäre, scheidet aus, da sie sehr wahrscheinlich bereits die Primärladung (Proton) trägt. Die Anwesenheit der Radikalstelle und die Aussicht auf ihre Wanderung lassen diese Methode äußerst spannend erscheinen.

2.4.4.5 Electron Transfer Ionization/Dissociation an neutralen Molekülen

Die *electron transfer ionization/dissociation* (ETI/D) ähnelt im Prinzip der CTD und wurde deshalb durchgeführt in der Hoffnung mehr über Resonanzeffekte beim *charge transfer* zu Peptidionen zu lernen. Bei dieser Fragmentierungsmethode werden auch positive schnelle Ionen als Projektilionen genutzt. Der Unterschied zur CTD ist, dass bei ETI/D die positiven Ionen nicht mit anderen positiven Ionen interagieren sondern mit neutralen Molekülen. Mitte der 70er Jahre konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen [AO72, AFL72], dass der Beschuss von neutralen Molekülen mit Ionen, wie He^+ und andere Gasionen, zur Ionisierung und Dissoziation der neutralen Moleküle führten. Neben der Ionisierung zeigten die Spektren also auch Fragmentierung. Der Grad einer Fragmentierung nach der ETI/D-Methode richtet sich hiernach der Überschussenergie, die nach dem Ladungsübertrag von dem neutralen Molekül auf das Projektil-Ion im Molekül verbleibt. Im Grunde wurden hier für die Wechselwirkung von Projektilionen mit neutralen Molekülen die zwei gleichen Mechanismen der CTD zuerst postuliert. Die Projektil-Ionen sollten in diesen Fall sogar besser mit den Molekülen wechselwirken können. Ohne eine positive Ladung am zu untersuchenden Molekül fällt auch die Coloumb-Abstoßung weg. Die positiven Ionen können daher näher an das Molekül herankommen, was auch einen langreichweitigen *charge transfer* begünstigt.

Reichweite eines *charge transfer* zwischen Ion und neutralen Molekül

Der relativ langreichweitige *charge transfer* wird möglich, da das Elektron, wie oben schon kurz erwähnt, in der Mitte zwischen dem vorher neutralen Molekül dann links und rechts je eine positive Ladung spürt, deren Anziehung die Barriere reduziert. Diese Absenkung der Barriere ist von Ladungsübertrag zwischen Ar^+ und Ar in FAB (*fast atom bombardment*) bekannt, der sehr effizient auch über große Distanz möglich ist. Der *cross section* des *charge transfer* von $\text{Ar}^+ \rightarrow \text{Ar}$ beträgt um die $50 \text{ \AA}^2$ und ist dabei abhängig von der Ionenenergie [MM68, PDTG00]. Für viele CT-Prozesse ist also eine Durchdringung der Elektronenwolken, sogar nicht einmal ein Kontakt, nötig. Natürlich muss dann um so mehr die Energieresonanzbedingung erfüllt werden, da wegen der geringen Wechselwirkung praktisch nur wenig Energie aus dem elektronischen Prozess in die kinetische Energie der Atome oder der Partikel gehen kann. Da die Wechselwirkung in diesen Fall praktisch sehr klein ist, ist der CT nur ein elektronischer Prozess, der gemäß Franck-Condon nur Schwingung überträgt, wenn sich die Kernkoordinaten der elektronischen Zustände unterscheiden, also die Geometrie des neutralen Moleküls mit der des angeregten Ionenzustandes. Diese

Franck-Codon-Faktoren könnte man aus HeI-Spektren (z.B. [Kim81]) entnehmen. Betrachtet man hier die Möglichkeit eines energetischen Resonanzeffekts des Moleküls mit dem Projektilion so erkennt man, dass mit dem hier verwendeten Projektilionen der Ladungstransfer nicht aus dem HOMO des neutralen Moleküls stattfinden kann. Vielmehr müssen die darunter liegenden Molekülorbitale betrachtet werden. Es muss im Fall eines isoenergetischen resonanten Ladungsübertrag ein Elektron aus einem HOMO- n_x entfernt werden. Welcher angeregte kationische Zustand dabei resultiert, ist dann abhängig vom eingesetzten Projektilion. Zudem kann, wenn dies der Überlapp der Schwingungswellenfunktionen Neutral zu Kation erlauben, eine Anregung in eine Schwingung dieser angeregten Ionenzustände möglich sein, sodass die elektrische Resonanz nicht perfekt erfüllt sein muss. Der *charge transfer* lässt hier drei Möglichkeiten zu, wie dieser von statten gehen könnte:

1. Orbitale durchdringen sich stark
2. Orbitale durchstreifen sich mit minimalen Überlapp
3. Orbitale durchdringen sich nicht, aber es kommt noch zum Elektronentransfer

Diese drei Möglichkeiten sind in Abbildung 2.17 nochmals dargestellt. Im Falle eines direkten Treffers zwischen Projektilion und Molekül durchdringen sich die Orbitale stark (1) und folglich führt dies zu einer sehr starken Fragmentierung des Moleküls. Ein streifenförmiger Überlapp der Orbitale und sogar ein naher Vorbeiflug des Projektilions bewirkt eine Umstrukturierung der Energieniveaus des Zielmoleküls. So können z.B. das HOMO und das LUMO bei Vorbeiflug des Projektils ihre Position tauschen. Beim Zurücktauschen der Orbitale kann das Molekül in einen angeregten Zustand zurückbleiben. Da sich die Verschiebung auf viele Molekülorbitale auswirken kann, kann dementsprechend viel Energie ins Molekül eingebracht werden. Dies hat eine starke Fragmentierung zu Folge. Der langreichweitige CT (3) ist, wie oben beschrieben, eher eine sanfte Methode. Unter Zuhilfenahme

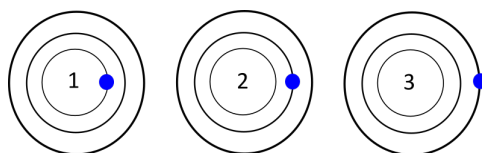


Abbildung 2.17: Bildliche Darstellung für verschiedene Reichweiten eines CTs. 1) Situation des *electronic stopping*: Die Orbitale des Projektils und des Moleküls durchdringen sich vollkommen. 2) In dieser Region eines CTs liegt ein streifender Stoß des Projektils vor. Hier kann es zu Bewegungen der Molekülorbitale hinsichtlich ihrer energetischen Lage kommen. 3) Der *charge transfer* erfolgt hier ohne Kontakt der beteiligten Orbitale. Dieser Ladungstransfer erfolgt resonant zwischen Projektil und Probe.

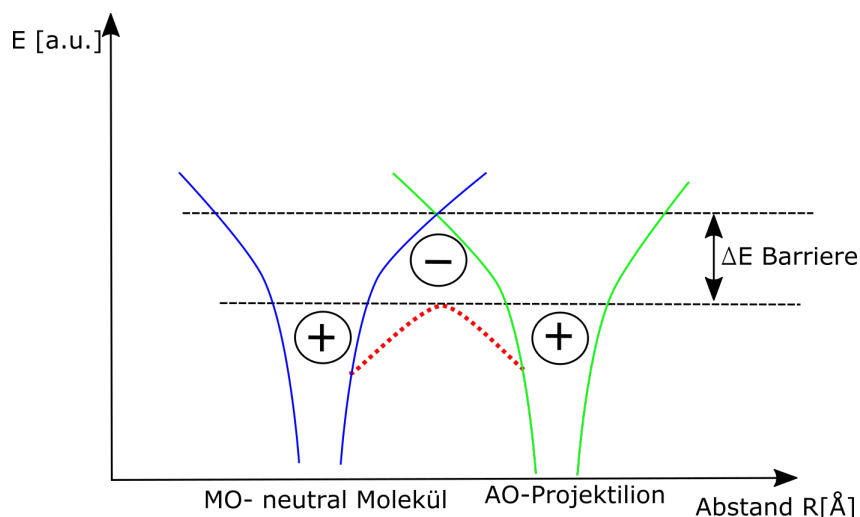


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung des Modells der Barrierenunterdrückung. Je näher sich neutrales Molekül (MO für Molekülorbital) und atomares Ion (AO für Atomorbital) kommen, dargestellt durch die jeweiligen Coulomb-Potentialkurven (blau und grün), desto mehr wird die Barriere (rot) für einen *charge transfer* herabgesetzt.

der Abbildung 2.18 zeigt sich, dass der *charge transfer* abhängig vom Abstand ist. Treten die beteiligten Orbitale näher zusammen wird die Barriere zwischen beiden Potentialen herabgesenkt. Die *barrier suppression* wirkt auch schon bei einem Nichtdurchdringen der Orbitale, da der *cross section* für einen Ladungsübertrag deutlich größer ist als für einen direkten Stoß.

2.5 Theoretische Überlegungen

Für diese Arbeit wurden verschiedene Fragmentierungsmethoden hinsichtlich ihrer Mechanismen untersucht:

- prompte oder konsekutive Reaktionen in Multi-Photon angeregten (Quasi)-Molekülionen
- Radikalstellen-induzierte Dissoziation von (Quasi)-Molekülionen durch Wechselwirkung mit hochenergetischen Atomionen (He^+)
- Ionisation und Dissoziation von Neutramolekülen durch Elektronentransfer zu hochenergetischen Gasionen (Xe^+ , N_2^+ , H_2^+ , He^+ , Ar^+) (Erzeugung einer Radikalstelle)

Allen drei Methoden ist gleich, dass um in großen Molekülen eine dissoziative Wirkung zu erzielen (siehe RRKM Theorie Kap. 2.4.2) die eingebrachte Energie die Dissoziationsschwelle deutlich überschreiten sollte. Dabei ist zu beachten, dass unter Berücksichtigung des *mobile proton*-Modells bzw. einer mobilen Radikalstelle die Dissoziationsschwelle auch deutlich abgesenkt wird. Das dazu bevorzugte Modell ist das *ladder model* (vgl. Kap. 2.4.3.1), denn sowohl bei Anregung mit mehreren Photonen der Wellenlänge 193 nm (6,3 eV) als auch bei Anregung mit schnellen Ionen (Rekombinationsenergie (RE) von 12,3 eV bis 24,5 eV) ist anzunehmen, dass in kürzester Zeit sehr viel Energie in das Zielmolekül eingebracht wird. Die Menge an Energie, die eingebracht werden kann, ist bei Photonen der Wellenlänge von 193 nm über die Zahl der absorbierten Photonen variabel. Bedingt durch die Anzahl der Absorptionsstellen im Peptid können mehrere Photonen absorbiert werden und die interne Energie des Targets in die Größenordnung oder sogar über die der *charge transfer*-Versuche bringen.

Bei eingehender Betrachtung der Anregungsmethoden erfolgen diese nach dem *ladder model*. Dabei können zwei unterschiedliche Zerfalls-Mechanismen auftreten:

- 1 Das Einschnitt- Anregungs- und Fragmentierungs-Modell (EAF-Modell) (vgl. Abbildung 2.19)
- 2 Das "Konsekutiv"-Modell (vgl. Abbildung 2.20)

Durch eine Anregung weit über die Dissoziationsschwelle hinaus können unterschiedlich viele und vor allem unterschiedlich energetisch hoch liegende Reaktionskanäle adressiert werden. D.h. aus der einen und selben fixen Anregung können unterschiedliche Fragmentierungsprodukte entstehen. Dies ist speziell für die Experimente mit den schnellen Gasionen

anzunehmen, da sie durch den resonanten *charge transfer* in einen Schritt eine hohe Energie im Zielmolekül freisetzen (Abbildung 2.19).

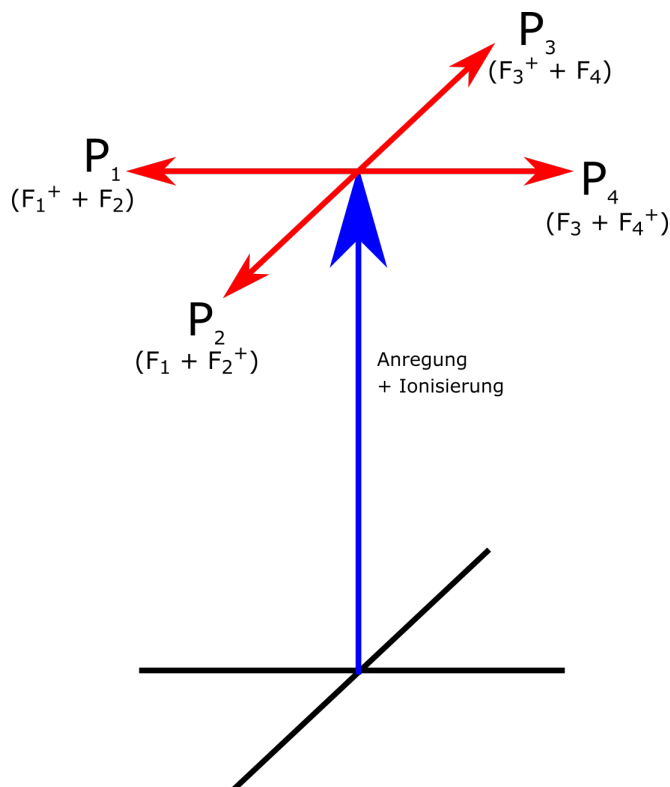


Abbildung 2.19: Schematische Darstellung des Einschritt- Anregungs- und Fragmentierungs-Modells. Die Energie und die Ladung wird als Ganzes in einem Schritt eingebracht. Im ersten Schritt wird das Molekül ionisiert und zeitgleich wird die interne Energie des Moleküls auf ein sehr hohes Niveau angehoben. In diesen hohen angeregten Zustand gibt es für das Molekül alternative Reaktionskanäle. Bedingt durch den hohen energetischen Zustand, der weit über der Dissoziationsschwelle liegt, zerfällt das Molekül in verschiedene Reaktionsprodukte. Diese Reaktionsprodukte (P) können dabei ein breites Spektrum von Fragmenten (F) erzeugen, die im ein Fall geladen sind und im anderen Fall als neutrales Fragment zurückbleiben können (z.B. $P_1 \rightarrow F_1^+ / P_2 \rightarrow F_1$).

Als zusätzlicher Zerfalls-Mechanismus können nach der ersten Fragmentation weitere Fragmente konsekutiv entstehen. Die primären Dissoziationsprodukte können nach dem ersten Schritt noch so viel interne Energie enthalten, dass dies zur weiteren Fragmentierung führt. Wir nennen dieses Modell "Konsekutivmodell". Die Untersuchung des Konsekutivmodells war ein Ziel dieser Arbeit, dabei wurde versucht den zweiten Schritt, der vermutlich mehr Zeit benötigt als der Erste, durch Heliumstöße schnell zu unterbinden. Dafür wurde ein separater gepulster Helium-Einlass in die Paulfalle eingebaut.

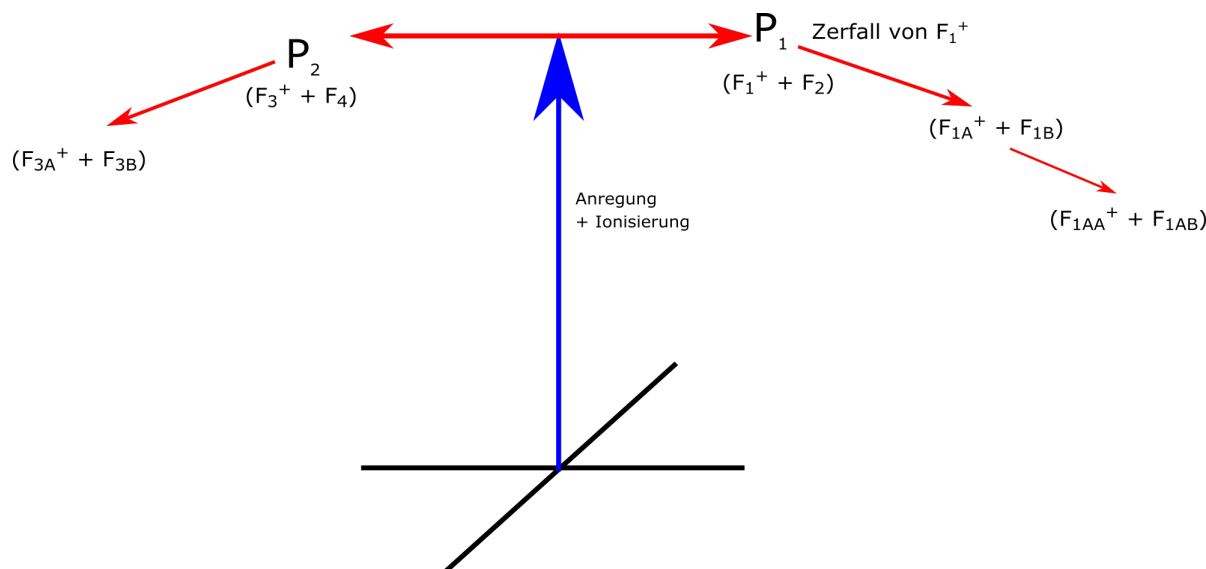


Abbildung 2.20: Schematische Darstellung des Konsekutiv-Modells. Nach Ionisation und Anregung des Target-Moleküls über die Dissoziationsschwelle hinaus sind verschiedene Reaktionskanäle gegeben. Zerfällt ein Reaktionprodukt (P) in die Fragmente (F), wobei eines geladen ist und eines neutral (im günstigsten Fall zerfällt das Molekül in zwei geladene Fragmente), kann genügend Energie im Fragment verbleiben, die eine zweite oder dritte Fragmentierung induzieren ($P_1 \rightarrow F_1^+ + F_2 \rightarrow F_{1A}^+ + F_{1B}$).

In der Abbildung 2.20 ist als Erweiterung des EAF-Modells das Konsekutiv-Modell illustriert. In der Abbildung 2.20 wird veranschaulicht, dass nach dem ersten Fragmentierungsschritt das Fragmentation genug Energie besitzt um weiter zu fragmentieren. Da aber RRKM-Verhalten insbesondere bei größer werdenden Peptiden zu erwarten ist, ist dieses zu auch berücksichtigen. Dieses RRKM-Verhalten, insbesondere in großen Molekülen, erschwert ungemein den ersten Fragmentierungsschritt, sodass - wenn überhaupt - nachfolgende Fragmentierungen eine untergeordnete Rolle spielen sollten und nicht sehr intensiv im Massenspektrum auftreten. Tritt dennoch eine primäre Fragmentierung auf, wird ein konsekutiver Schritt umso wahrscheinlicher, da im Falle einer Halbierung des Moleküls die Zustandsdichte der Schwingungen viel stärker fällt als $\frac{1}{2}$ [BMML75],[GM93].

Eine Einschränkung zum *charge transfer* könnte es bei den Experimenten mit den Peptiden geben. Durch die Protonierung des Peptides werden Coluombeffekte auftreten, welche zum Einen die Ionisierungsenergie des Peptids im Abstand R ($\frac{1}{R}$) von der Ladung heraufsetzen und zum Anderen den *charge transfer* möglichst weit von der Protonierungsstelle stattfinden lassen. Fragmentierungen durch *charge transfer* und *electronic stopping* können am Besten auch durch das Einschnitt-Modell wiedergegeben werden, da durch die großen Werte der Ladungsrekombinationsenergien der Gasionen (von 12,3 eV bei Xenon bis 24,5

eV bei Helium) und deren hohe Geschwindigkeit (3 kV) ein enormer Energieeintrag ins das Zielmolekül zu erwarten ist. Dies führt nach obiger Überlegung zu einer großen Fragmentvielfalt. Dies gilt vor allem für die Fragmente, deren Fragmentierungskanäle mit den gängigen Methoden wie CID oder Photodissoziation nicht erreichbar sind.

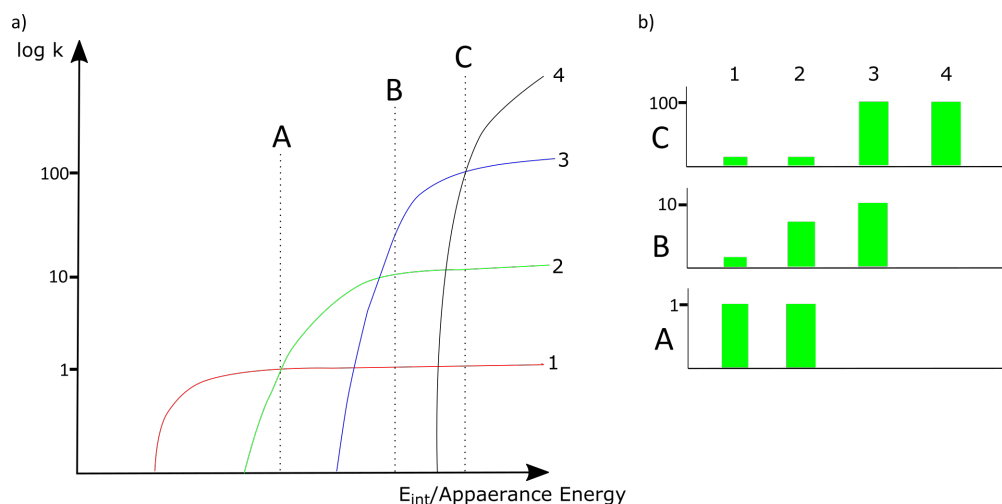


Abbildung 2.21: Schematische Darstellung über die Bildung eines primären Fragmentpatterns nach RRKM. a) Aufgetragen sind die typischen $k(E)$ -Kurven von Geschwindigkeitskonstanten nach RRKM von verschiedener Fragmentierungskanälen in Abhängigkeit der internen Energie. Ab bestimmten internen Energien treten neue Fragmente auf. Diese werden deshalb auch als *appearance energies* bezeichnet. Ab einem bestimmten Wert von $\log k$ wird dieser Fragmentkanal auch überwiegend das Fragmentpattern dominieren. Nur noch zum kleinen Teil werden Fragmente aus unteren Reaktionkanälen auftreten [MR06]. b) Aus a) resultierende nicht lineare Fragmentintensitäten der Kanäle 1, 2, 3 und 4 bei verschiedenen Anregungsenergien an den Punkten A, B und C.

Auf Grundlage der Abbildungen 2.19 und 2.21 sollten die Fragmentionen in den Experimenten von neutralen Molekülen mit schnellen Gasionen und den daraus resultierenden Massenspektren erklärbar sein. Die große Energie, die dem neutral Molekül zu geführt wird, sollte sich in den Spektren insofern widerspiegeln, dass viele kleine Fragmente gebildet werden sollten. Man beachte, dass bei hohen Energien nicht mehr der tiefste Dissoziationskanal dominant ist (vgl Abb. 2.21 b)). Dies widerspricht stark jeder Intention nach der man erwarten würde, dass immer der tiefste Kanal dominiert. Man sieht auch in Abbildung 2.21, dass praktisch ab einer gewissen Energie fast nur noch Fragmente auftreten sollten, die hohe Dissoziationsenergien besitzen. Bei protonierten Peptiden ist es aber so, dass abgesehen von der Protonierungsstelle sehr viele Dissoziationskanäle sehr ähnliche Dissoziationsenergien besitzen sollten. Das sollte dazu führen, dass alle Fragmente mit

ähnlichen Intensitäten auftreten sollten. Das wird aber typischerweise nicht beobachtet.

3 Experimentelles

Dieses Kapitel besitzt zwei Teile. Zunächst werden die Experimente am Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer erläutert, die wiederum die Versuche zum Konsekutivmodell bei Laseranregung (193 nm) und zu der CTD an Peptiden beinhalten. Im zweiten Teil des Kapitel Experimentelles wird auf das selbst aufgebaute Massenspektrometer zur *electron transfer* Ionisation und Dissoziation eingegangen. Ziel ist es den grundsätzlichen Aufbau der Experimente wiederzugeben. Es soll auch aufgezeigt werden welche technischen und digitalen Anforderungen durch die Methoden erforderlich wurden und welche Tücken sich während der Versuche ergaben.

3.1 Experimente am ESI-MS

In diesem Abschnitt soll nun erläutert werden, welche experimentelle Änderungen am eigentlich kommerziellen ESI-MS (esquire 3000, Bruker Daltonics) gewählt wurden. Da in dieser Arbeit zwei verschiedene Experimente am ESI-MS durchgeführt wurden, werden diese gesondert beschrieben und erläutert. Zum Einen musste das ESI-MS für eine Lasereinkopplung und einen gepulsten Gaseinlass umgebaut werden. Zum Anderen wurde eine justierbare Ionenkanone angebaut.

3.1.1 Probenpräparation

Für die Experimente war es zunächst notwendig, die Proben, die in fester kristalliner Form vorlagen, in Lösung zu bringen. Hierfür wurden einige μg bis mg der Probe, je nach Größe des Moleküls, eingewogen und in ein Gemisch aus 1 ml Acetonitril-Wasser im Verhältnis 2:1 gelöst. Schwer lösliche Substanzen wurden zusätzlich mit 5 - 15 μl Essigsäure versetzt, um deren Löslichkeit zu verbessern. Ein weiterer Punkt ist die qualitative Steuerung der Ladungszahl im Molekül. Das Lösen eines Oligopeptides mit mehreren möglichen Ladungsstellen in Acetonitril/Wasser ohne Säure führt in den meisten Fällen zu einfach protonierten Molekülen. Durch eine sukzessive Zugabe der Essigsäure, kann man das Verhältnis Ladungsverteilung steuern (Abbildung 3.1). Bei leicht protonierbaren Substanzen

mit mehreren potentiellen Ladungsstellen kann man unter Zugabe einer Natriumhydroxid-Lösung (wenig!), eine mehrfach Ladung des Moleküls verhindern. Gibt man zu viel in die Standardlösung lässt sich das Molekül im positiv Modus nicht mehr darstellen. Daher ist auf eine genaue Dosierung zu achten.

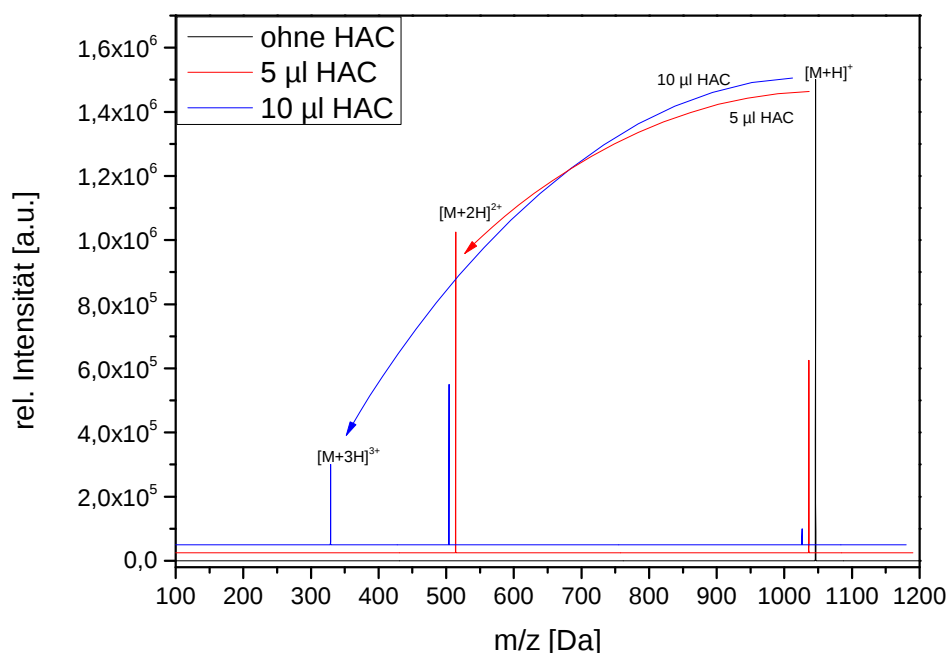


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Einflusses der Essigsäurezugabe zur Protonierung von Peptiden. Durch sukzessive Zugabe von Essigsäure zur Standardlösung kann das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis verändert werden. Je mehr Essigsäure hinzugegeben wird, desto mehr höher geladenen Moleküle können gebildet werden. Limitiert wird dies nur durch die maximale Anzahl der vorhandenen Ladungsstellen im Molekül und die Coloumb-Abstoßung. (Darstellung für 5 µl und 10 µl sind jeweils auf der x und y Achse verschoben)

Die Einstellung der Protonenkonzentration, also die volumetrische Zugabe der Essigsäure, ist aber nicht der einzige Faktor für das in ESI-Massenspektrometer beobachtete Masse-zu-Ladungsverhältnis. Hierzu zählen auch diverse Einstellung am Gerät selbst. So lassen sich über Einstellung der Spannung an der Kapillare, am Skimmer sowie über die Einstellung über die sogenannte *Trap Drive* (Abbildung 3.2) eine optimale Intensität der m/z-Verhältnisse justieren.

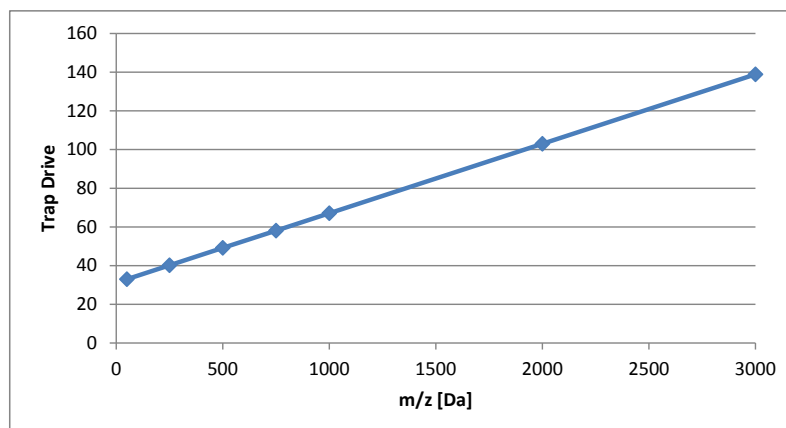


Abbildung 3.2: Zusammenhang zwischen *Trap Drive* und dem m/z -Verhältnis. Je größer die Masse des Mutterions, desto höher muss die *Trap Drive* eingestellt werden, damit die Signalintensität ideal erhalten wird. Um höher geladene Mutterionen zu erhalten, muss dementsprechend auch die *Trap Drive* erniedrigt werden.

3.1.2 Lasereinkopplung/Gasdüse für das Kühlgas

Der nächste Schritt dieses Experimentes ist die richtige zeitliche Vernetzung der Abläufe. Es mussten das Massenspektrometer, der Laser und die Düse synchronisiert werden. Hierfür brauchte es ein Steuerungssignal. Dieses wurde vom Massenspektrometer ausgegeben und soll nun fortlaufend als ESI-Trigger bezeichnet werden. Der ESI-Trigger gibt den Startpunkt für alle weiteren Trigger, wie Lasertrigger und Düsentrigger, an. Der ESI-Trigger kann an jede beliebige Stelle eines Fallen-Zyklus gesetzt werden. Des weiteren mussten Veränderungen am Gerät selbst durchgeführt werden, um den Laser und das gepulste Gas einzubringen. Die Einkopplung des Lasers (PSX-501-2 von Neweks (heute Nemor Technologies)) für die Wellenlänge 193 nm erwies sich trotz des tiefen UV-Bereiches als unproblematisch, da die Wellenlänge von 193 nm nicht im Vakuum geführt werden musste, konnte die Justage außerhalb des Massenspektrometers erfolgen. Neben drei Spiegeln genügte eine Linse für die Justierung des Laserstrahls durch die Paul-Falle, welche an der Ringelektrode gegenüber liegende Bohrungen aufwies. Durch Anbringung eines General-Valve Spulenkörpers an einem modifizierten Düsenkopf, der so gefertigt wurde, dass er in das Gehäuse des ESI-MS angebracht werden konnte, wurde eine gepulste Zugabe von Helium sichergestellt. Hier waren zwei Probleme zu lösen. Es wurden PEEK-Schläuche

verwendet, um den Helimpuls in die Falle zu transportieren. Das Problem lag hier zum Einen an der Länge und zu Anderen an dem Querschnitt der Schläuche. Durch die Länge (>10 cm) und den großen Querschnitt ($\varnothing \approx 1,5$ mm²) wurde der Heliumgaspuls zeitlich verschliffen, d.h. das Maxima des Gaspulses wurde erst nach einigen Millisekunden (20 ms-30 ms) erreicht. Besserung wurde durch kürzere PEEK-Schläuche (5 cm) mit einem geringeren Durchmesser (0,5 mm²) erreicht. Durch diese Optimierung wurde eine wesentlich kürzere Zeit zwischen öffnen des Ventils und dem Ankommen des Gases in der Falle erreicht. Zudem war die Pulsbreite nach dem Umbau kürzer (10 - 12 ms), also die Gasdichte in der Falle entsprechend höher. Leider war es nicht möglich die Helium-Gasdichte während des Pulses im Maximum anzugeben. Vermutlich liegt er im Bereich von einigen mbar, so dass mit Stoßzeiten Helium zu Peptid im Bereich von 10 - 100 ns zu rechnen ist. Da ein Helium-Stoß vermutlich nicht viel Energie aus dem Molekül abführen kann, braucht man für einen Quenchvorgang eventuell 100 Stöße, also 1- 10 μ s.

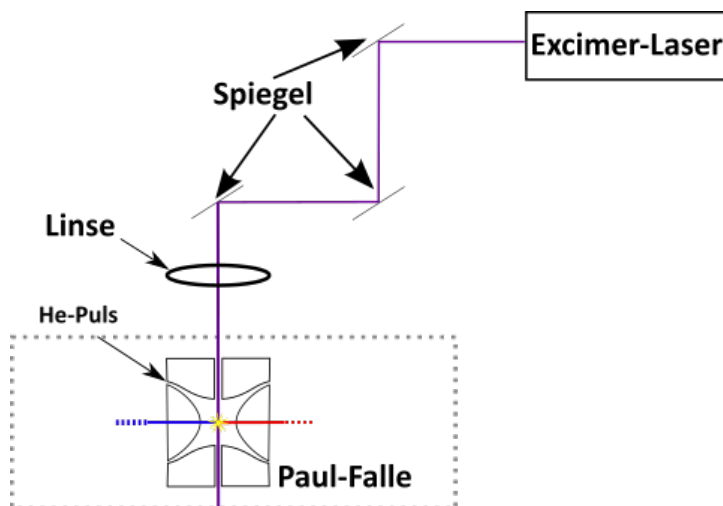


Abbildung 3.3: Schema der Lasereinkopplung mit Andeutung eines gepulsten Heliumszugriffs. Der Laserstrahl wurde über drei für die Wellenlänge (193 nm) geeignete Spiegel geführt und über eine Linse für die Fokussierung des Strahls in das Massenspektrometer eingelassen. **blau** ankommender Ionenstrom, **rot** Fragmentierte Ionen

3.1.2.1 Synchronisation der Komponenten

Für den zeitlichen Ablauf, also die Triggerschaltung, braucht man einen ESI-Trigger. Dieser ist, wie oben schon erwähnt, der Startpunkt eines jenes Zyklus. Aufbauend auf diesem Signal, dass das Massenspektrometer ausgibt, lassen sich alle darauf folgende Aktionen starten. Neben dem ESI-Trigger wurde auch ein proportionales Signal zur RF-Fallenfrequenz, folgend nur noch RF-Frequenz, abgegriffen. Dieses Signal konnte auf einem Oszilloskop

verfolgt werden (vgl. Abb. 3.4). Beide Signale, ESI-Trigger und RF-Frequenz, sind dabei miteinander verknüpft. Durch die schematische Darstellung der RF-Frequenz lässt sich auch die Position des ESI-Triggers darstellen. Durch die Darstellung und den ESI-Trigger lassen sich nun alle wichtigen folgenden Trigger genau einstellen. So können nun Lasertrigger, Düsentrigger und ggfs. ein Heliumgate in die Wartezeit des Fallenzyklus gelegt werden (vgl. Abb. 3.5).

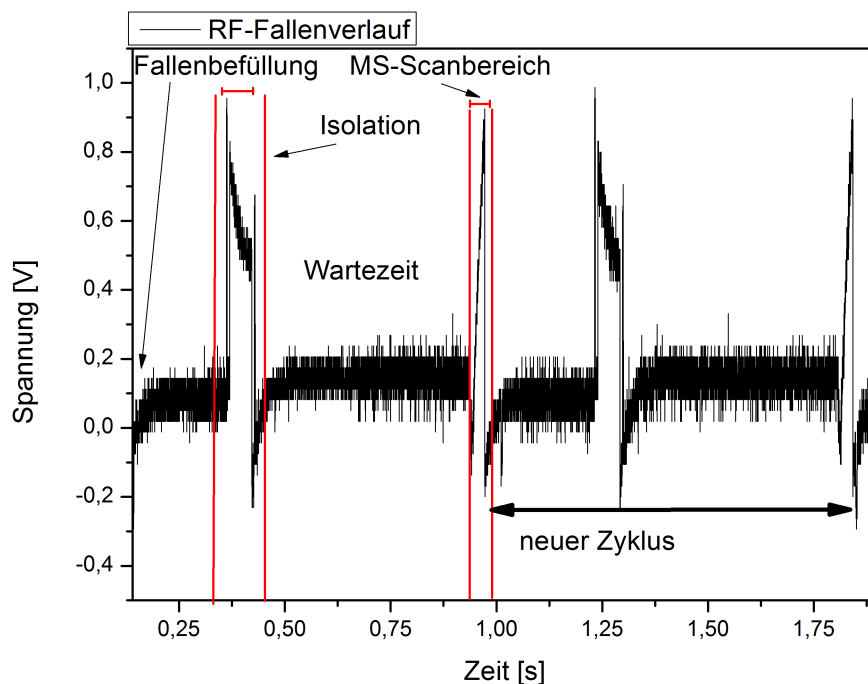


Abbildung 3.4: Abbildung des vollständigen proportionalen Radiofrequenz (RF)-Siganls des Fallenzyklus (Befüllung, Isolation, Fragmentierung und Scan). Dieser zeigt alle Abläufe, die in der Paulfalle geschehen an. Zu Beginn des Zyklus wird die Falle in der sogenannten Akkumulationszeit (meist 10 ms) befüllt. Darauf folgt eine Isolation einer Masse eines zuvor eingestellten Masse-zu-Ladungsverhältnisses. In der anschließenden Wartezeit, auch Fragmentierungszeit genannt, können die isolierten Molekülionen durch Stoß- oder Photofragmentierung fragmentiert werden. Der Abschluss des Zyklus bildet der MS-Scanbereich. Hier werden die Molekülionen und seine Fragmentationen nacheinander aus der Falle entlassen und detektiert. Danach wiederholt sich der Zyklus.

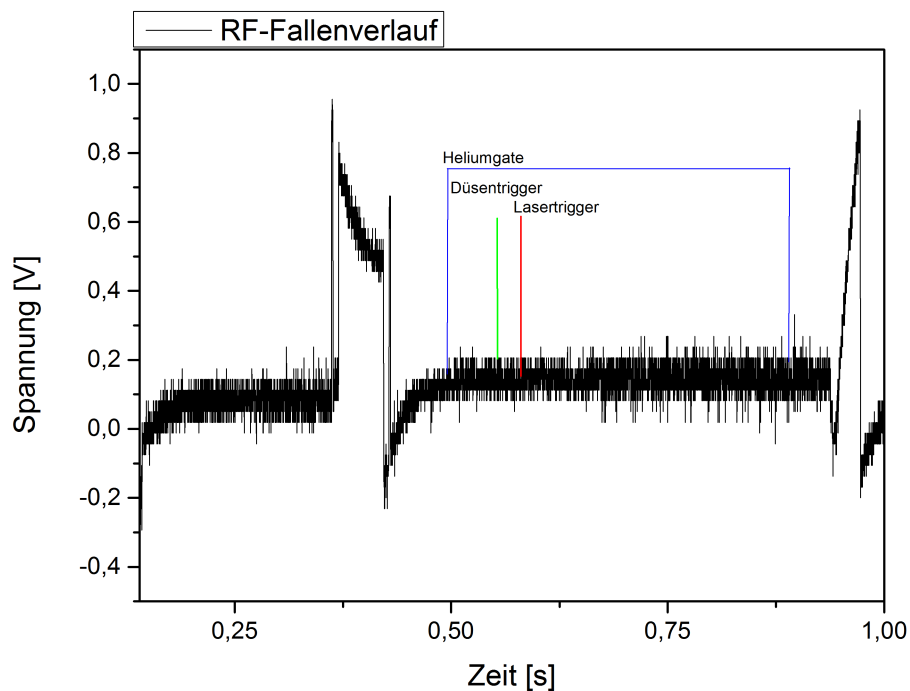


Abbildung 3.5: Einbettung der Trigger für den Laser, für den Gaspuls und dem Heliumgate in die RF-Frequenz. Der Düsentrigger wird so gewählt, dass der intensive Helium-Gaspuls während des Laserzugriffs in der Paulfalle ist. Die Helium-Stöße sollen eine konsekutive Fragmentierung verhindern.

Aber wie sieht nun die elektronische Vernetzung aller Trigger aus? Als Erstes wird der ESI-Trigger an einem Punkt, genau vor der Isolation des RF-Signals gesetzt. Dieses Signal triggert nun einen Delaygenerator, welcher das Heliumgate setzen kann. Die Funktion des He-Gates ist dafür da, den Helium-Fluss, der zum Einfangen der Ionen nötig ist, abzuschalten. Es wird aktiviert wenn kein Helium während des Laserzugriffs gewünscht ist und wenn die gepulste Düse genutzt wird. Letzter Fall ist nötig, um damit den Unterschied zwischen Laseranregung und Laseranregung/Quenchen möglichst maximal zu gestalten. Zudem wird ein TTL-Puls in Richtung eines Dual Linear Gate (DLG) gesetzt.

Das DLG bekommt zusätzlich ein bearbeitetes RF-Signal der Paulfalle. Dieses RF-Signal folgt einem Sinus mit circa 786 kHz. Durch die kurze Periode des Signals muss dies dementsprechend für das DLG vorbereitet werden. Zunächst wird das RF-Signal verstärkt, ehe alle negativen Anteile durch einen Positivwandler herausgenommen werden. Anschließend wird das Signal über ein 10 nF Kondensator (Signal wird nahezu TTL-förmig) in einen Teiler geleitet. Im Teiler wird das von der Falle kommende Signal durch 500 geteilt, sodass dies vom DLG verarbeitet werden kann.

So findet nun die Synchronisation zwischen ESI-Trigger und RF-Frequenz im Dual Linear Gate statt. Ausgehend vom DLG wird nun ein zweiter Delaygenerator benötigt, der die TTL-Pulse für den Laser und für den Pulser der Düse freigibt. Ein zusätzlicher dem Laser vorgeschalteter Delaygenerator wird benötigt um den Laser genau beim Nulldurchgang der Sinusspannung am Fallenring zu feuern. Der Sinn hinter dieser Maßnahme lag in der Reduzierung evtl. entstehender Störpeaks und Fragmente, die durch Elektronen, die von der Fallenwand (ECD) kommen, gebildet werden. (vgl. Abbildung 3.6).

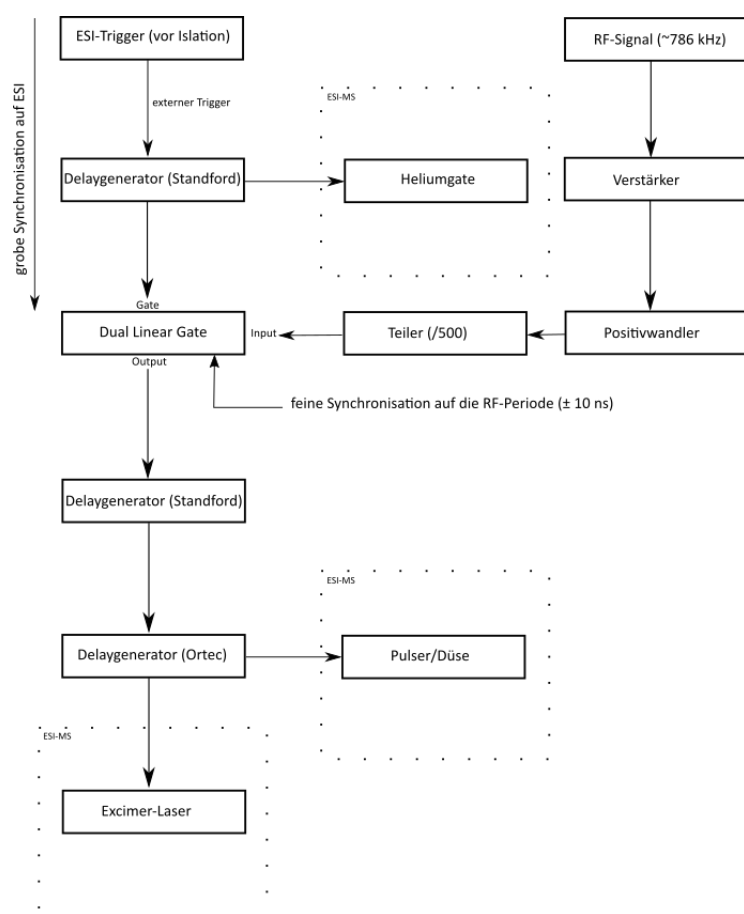


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Triggerschaltung für die grobe und feine Synchronisation des Lasers mit dem Pulser für den Gaspuls. Durch das Zusammenlegen des ESI-Triggers mit dem RF-Signal über das Dual Linear Gate können der Laser und der Pulser bzw. Düse synchronisiert werden.

3.1.2.2 Kühlen durch Stoßgas

Wie eingangs erwähnt wird Helium als Stoßgas zum "löschen" der internen Energie der angeregten Moleküle genutzt. Damit der Effekt des Kühlens voll zum tragen kommt, muss jedoch vorher das Helium für den Trapvorgang aus der Paulfalle entfernt werden. Dies wird mit dem obigen beschriebenen Helium-Gate bewerkstelligt. Das Helium-Gate steuert das Ventil für das Helium des Trapvorgangs. Also schließt es nach der Isolation der Muttermasse und öffnet es wieder vor der Massenselektion. Dadurch wird sichergestellt, dass der Gaspuls zum Kühlen der angeregten Moleküle einen maximalen druckgegebenen Effekt hat.

Der angelegte Druck für das Stoßgas birgt eine gewisse Problematik für das Experiment. Hierbei sind für das Gelingen des Experimentes verschiedene Faktoren beteiligt. Ruft man sich die Abbildung 2.16 aus Kapitel 2.4.4.3 in Erinnerung, so ist nicht auszuschließen, dass es eine Verteilung unterschiedlich hoher angeregter Moleküle gibt. So ergibt sich offensichtlich auch eine Verteilung unterschiedlicher Ratenkonstanten für eine Dissoziation. Je höher diese Ratenkonstanten sind, muss dementsprechend der Druck erhöht werden, damit die Stoßzeiten mit dem Helium klein werden und die interne Energie der Moleküle abgeführt werden können. Wie oben angedeutet, kann der Gasdruck, genauer die Gasdichte im Pulsmaximum in der Falle, nicht bestimmt werden und weiterhin lässt sich gerätebedingt der Druck sich nicht beliebig erhöhen, da das Massenspektrometer eine Abschaltfunktion hat, wenn der Druck im Massenspektrometer zu hoch wird. Generell ist daher eine Abschätzung der Kühlrate sehr schwierig, da neben den obigen Faktoren die Stoßquerschnitt der Moleküle, welcher von Molekül zu Molekül anders ist, zusätzlich fehlt.

3.1.3 Ionenkanone

Um die Wirkung von Edelgasionen, speziell mit Helium, auf Peptidionen untersuchen zu können, benötigt das Massenspektrometer eine entsprechende Modifikation. Diese Modifikation besteht aus der Anbringung einer beweglichen Ionenkanone des Typs EX05 von der Firma VG IONEX über der Paulfalle. Die Ionenkanone besteht aus einer thermischen Elektronenquelle über die ein kontinuierlicher Heliumstrom geleitet wird. Durch die am Filament freigesetzten Elektronen werden die Gasteilchen durch Elektronenstoß ionisiert und gleichzeitig auf mehrere hundert V bis kV, je nach Einstellung, beschleunigt. Um die Beweglichkeit der Ionenkanone zu gewährleisten, wurde eine Justiereinheit in Rahmen einer Masterarbeit von Miriam Sonnenberg entwickelt und aufgebaut [Son17]. Die Justiereinheit enthält neben der Beweglichkeit in xy-Richtung zusätzlich einen Shutter für einen

quasi gepulsten Betrieb der Ionenkanone. Die Unterbrechung des Ionenstrahl war nötig, da durch den kontinuierlichen Betrieb der Kanone der gesamte Fallenzzyklus beträchtlich gestört wurde. Durch den Einsatz des Shutters wurden die Projektil-Ionen nur während der Fragmentierungszeit in die Falle gelassen (vgl. Abbildung 3.5 entsprechend dem Heliumgate).

Die benötigte Triggerschaltung wurde im Vergleich zum vorherigen Experiment vereinfacht und durch den Trigger für den Shutter erweitert (Abbildung 3.7).

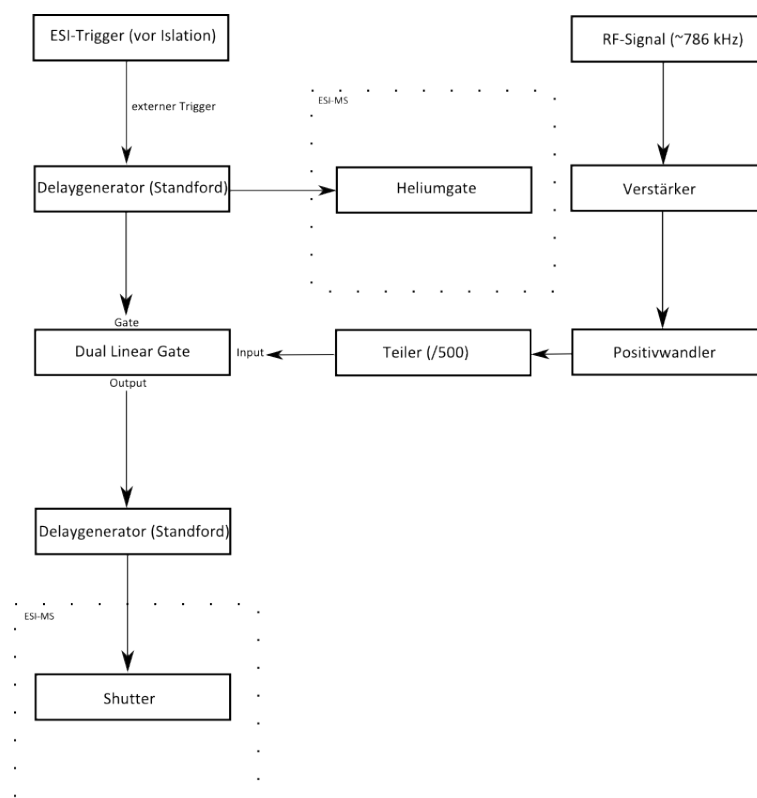


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Triggerschaltung für die Shuttersteuerung. Es muss nur noch ein Element mit dem ESI-Trigger und dem RF-Signal synchronisiert werden. Der Shutter verhindert vor allem eine Ionisation von Restgasmolekülen durch die Projektilionen während dem Einfangen der Ionen, der Isolation und der Massenselektion.

3.2 Experimente am selbstgebauten TOF-Massenspektrometer

Ausgehend von den Ergebnissen der Experimente mit der Ionenkanone im ESI-MS eröffnete sich neue Fragestellungen hinsichtlich des *charge transfers*. In einem neu gestalteten Experiment sollte geklärt werden, unter der Annahme, dass der *charge transfer* überwiegend am neutralen Teil eines Peptids abläuft, wie der Ladungs- und Energietransfer zu einem neutralen Molekül durch schnelle atomare Projektilionen wie He^+ , Ar^+ und Xe^+ sowie mit den molekularen Projektilionen wie H_2^+ und N_2^+ ablaufen könnte. Es stellten sich mehrere Fragen wie dies Umzusetzen ist:

- in welchem Massenanalysator kann die Reaktion am Besten beobachtet werden?
- wie können die Moleküle zerstörungsfrei in die Gasphase überführt werden?
- und wie werden diese Moleküle ionisiert?

Letzterer Punkt konnte durch *charge transfer* schnellen Ionen realisiert werden. Die verwendeten Gase zum Betrieb der Ionenkanone (Wasserstoff, Stickstoff, Helium, Argon und Xenon) besitzen alle in ihrer einfach geladenen ionischen Form eine höhere Rekombinationsenergie als das Ionisierungspotential aller untersuchten Moleküle (vgl. Tabelle 3.1). Ruft man sich die Feststellung aus Kapitel 2.4.4.4 in Erinnerung können die zwei Prozesse, resonanter *charge transfer* und *electronic stopping*, genügend Energie aufbringen, um alle Moleküle zu ionisieren. Die Erwartungshaltung ist: Wenn der Mechanismus des *electronic stopping* greift und das Molekül direkt vom Ion getroffen würde, sollte das Molekül unterschiedlich stark fragmentiert werden. Da aber Ionenstrom senkrecht zur Abzugseinheit steht, könnte ein Stoß des Projektilions dafür Sorge tragen, dass das Molekül aufgrund eines Impulsübertrags eine Querkomponente in Flugrichtung erhalten. Dies wird im nächsten Kapitel (Kap. 3.2.1) nochmals aufgeriffen und erläutert. Für den anderen Fall des resonanten *charge transfer*-Mechanismus ionisiert das Projektilion das Molekül via CT und kann auch gegebenenfalls fragmentiert werden kann.

Tabelle 3.1: Übersicht der Rekombinationsenergien der verwendeten Gase in energetischer absteigender Folge

Gas	Rekombinationsenergie [eV]
Helium	24
Wasserstoff	15,8
Argon	15,4
Stickstoff	14,9
Xenon	12,3

Da die Auswahl der Analytmoleküle auf kleine meist aromatische Moleküle fiel, konnten die Moleküle einfach durch Erhitzen und durch die Tatsache des geringen Dampfdruckes in die Gasphase überführt werden. Der Transfer der Moleküle ins Massenspektrometer wurde über eine gepulste Düse, ähnlich der im ESI-MS eingesetzten Düse, realisiert. Die entstandenen Ionen konnten dann mittels eines TOF-Reflektron-Massenspektrometers detektiert werden.

3.2.1 Aufbau des selbstgebauten TOF-Massenspektrometers

Um den Mechanismus des Ladungs- und Energietransfers zwischen Ionen und Analyten, der in dieser Arbeit auch für die Fragmentierung von Peptidionen verwendet wurde, besser zu verstehen und eventuell Resonanz-Effekte zu finden, wurde mithilfe des CT von neutralen Molekülen zu schnellen Kationen ihre Ionisation und Dissoziation studiert. Dazu wurden verschiedene Projektilionen (He^+ , Ar^+ , Xe^+ , H_2^+ und N_2^+) und verschiedene Moleküle verwendet.

Für dieses Experiment wurde ein TOF-MS mit Reflektron aufgebaut. Der Aufbau ist in Abbildung 3.8 gezeigt. Wie eingangs schon kurz erläutert besteht das TOF-Reflektron-Massenspektrometer aus einer Einlasskammer, in der auch ionisiert wird, einer gepulsten Abzugseinheit, einem Ablenkquadrupol, einer feldfreien Flugstrecke und einem Ionenreflektor mit einer Gesamtflugstrecke von 4,5 m. Der Einlass in die Ionenquelle, der thermisch in die Gasphase gebrachten Moleküle, wird über eine beheizte gepulste Düse realisiert. Dabei werden die Moleküle effusiv in die Vakuumkammer zwischen die Abzugsblenden eingelassen. Die Moleküle können nun ionisiert werden. Dies geschieht zum einen über die schnellen Ionen oder durch einen Laser mit der Wellenlänge von 266 nm zur Justage des Massenspektrometers. Der Ionisierungsort ist dabei genau zwischen den ersten zwei Blenden der Abzugseinheit.

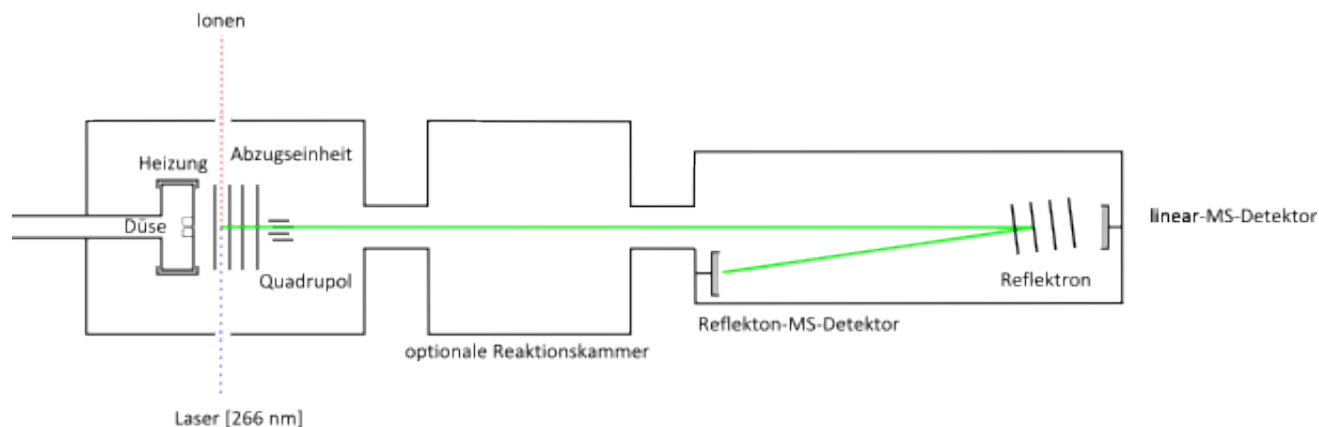


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des selbstgebauten Reflektoren-TOF-Massenspektrometers. Der Einlass der Neutalmoleküle erfolgte über eine beheizbare gepulste Düse. Der Ort der Ionisierung liegt in der gepulsten Abzugseinheit. Die Ionen werden mit 850 V gepulst beschleunigt und letztendlich am Reflektoren-MS-Detektor detektiert.

Die Ionen werden dann gepulst mit 850 V in Richtung des Linear Detektor beschleunigt. Wahlweise kann über ein Ablenkquadrupol das Signal am Linear-Detektor optimiert werden. Durch den Ionenreflektor wird dann die Massenauflösung des Signals am Reflektoren-Detektor verbessert.

Bedingt durch den senkrechten Aufbau der Ionenkanone zur Ionenquelle, kann es zu direkten Treffern zwischen den Projektilionen und den Molekülen kommen, die einen Impulsübertrag nach sich ziehen. Dieser Impulsübertrag von Projektil auf Molekül kann dazu führen, dass die voll getroffenen Moleküle eine Querkomponente in Flugrichtung erhalten, sodass der Detektor nicht mehr getroffen wird. D.h. bei einer Flugstrecke von 4,5 m und einen Detektordurchmesser von 2 cm darf die Abweichung von der idealen Flugstrecke nicht größer als 0,5 % werden. In Kapitel 4.3.1 wird auf diese Problematik hinsichtlich des *electronic stopping*-Mechanismus näher eingegangen, da dieser Prozess mit einen Impulsübertrag einhergeht.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im folgendem Kapitel werden nun die Ergebnisse aus den jeweiligen Experimenten vorgestellt. Das übergeordnete Ziel ist es neue Fragmentierungs-Methoden anzuwenden, um möglichst viele Fragmente mit gut nachweisbarer Intensität zu erhalten. Es soll mit Hilfe der Fragmente auf die Mechanismen, die im Molekül aktiv sind, geschlossen werden, um so Fragmentierungsprozesse von Peptiden besser zu verstehen. Es soll geklärt werden in wie weit und ob Molekülonen, wie Peptide und Oligopeptide nach einer Energieexposition schrittweise in einer zeitlich sequenziellen Kaskade weiter fragmentieren können. Zuerst werden die ESI-Experimente mit der Laseranregung bei 193 nm mit dem anschließenden Versuch der Fragmentquenchung beschrieben und danach wird auf die im ESI-MS durchgeführten CTD-Experimente an Peptiden eingegangen. Abschließend werden die Ergebnisse der ETI/D an organischen Molekülen mit dem selbstgebauten Massenspektrometer vorgestellt und diskutiert.

4.1 Konsekutive Fragmentierung nach Photoanregung

Viele Experimente aus der Literatur und dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Weinkauff, die mit Photonen der Wellenlänge 193 nm durchgeführt wurden, zeigten sich in den resultierenden Massenspektren, auch bei großen Peptiden, meist relativ kleine Fragmente, da offensichtlich auch mit zunehmender Peptidgröße mehr Photonen absorbiert werden können (siehe Kapitel 2.4.4.3). Größere Fragmente, bei denen z.B. nur eine oder zwei Aminosäuren abgehen, sind sehr schwach oder treten nicht auf. Daraus ergeben sich Massenspektren, die nach dem Muttermassenpeak eine breite Lücke bis zu den ersten Fragmenten aufweisen. Das Fehlen dieser Fragmentionen, bei welchen beispielsweise nur eine oder zwei Aminosäuren abbrechen, verhindert die komplette Sequenzanalyse durch die Massenspektrometrie. Die Frage war nun, was ist die Ursache für diese Lücke, und ist es möglich sie zu schließen. Die Vermutung war, dass nach einmaliger Anregung mit dem Laser so viel Energie in die Moleküle gepumpt wird, sodass sie nach einem ersten Zerfall (z.B. dem Brechen einer Bindung) ohne weitere Anregung weiter zerfallen könnten. Ziel dieses Experimen-

tes war es also zu klären, ob die Fragmentierung von Oligopeptiden durch Photonen der Wellenlänge von 193 nm nach einem ersten Fragmentierungsschritt noch weitere Zerfälle in kleinere Fragmente machen und ob man diese zweite Fragmentierung stoppen könnte. Die Hypothese ist also, dass sich auf einem schnellen primären Zerfall, ausgelöst durch die Absorption eines oder mehrerer Photonen, ein zweiter bzw. mehrere weitere Zerfälle anschließen. Da durch die erste Fragmentierung Energie verbraucht wurde, sollte der nachfolgende Zerfall langsamer, also metastabil, erfolgen. Durch Stöße mit vielen He-Atomen während der Photonen-Exposition der Oligopeptide sollten in dieser Arbeit die nachfolgenden langsamsten metastabilen Zerfälle gequench und somit verhindert werden. So sollten in den folgenden Spektren zu erkennen sein, dass Fragmente aus dem kleinen Massenbereich an Intensität verlieren und gleichzeitig Fragmente aus dem höheren Massenbereich an Intensität gewinnen oder sogar neue Peaks im Spektrum entstehen. Die Abkühlung, der durch die Laseranregung intern aufgeheizten Ionen, wurde durch Stöße mit Helium hoher Dichte (1,5 bar an sekundärer Seite des Flaschenventils) geleistet. Dazu wurde Helium mit einer Düse gepulst in die Falle zugeführt. Dies ist nötig, da eine zu hohe Helium-Dichte bei der nachfolgenden Massenselektion stört. Das Helium hat dabei den Vorteil, dass es schnell wieder entfernt werden kann und eine geringe Restmenge bei der Massenanalyse nicht stört.

Als ersten Beispiel wird das Tripeptid $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-Leu-OH}$ behandelt. Dieses Peptid besteht aus einem Tryptophan, welches jeweils von einem Leucin flankiert wird. Dieses Molekül weist, nach vorausgegangen Überlegungen [WM13, Wol13], demnach vier mögliche Absorptionstellen für die Photonen der Wellenlänge 193 nm auf. Dies sind neben dem N-Terminus die zwei Peptidbindungen und die Seitenkette des Tryptophans. Man kann also davon ausgehen, dass mehr als ein Photon absorbiert wird.

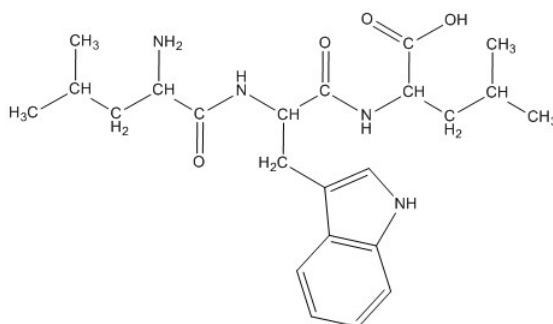


Abbildung 4.1: Struktur des Tripeptids $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-Leu-OH}$ (LWL). Das Tryptophan wird von zwei Leucinen flankiert.

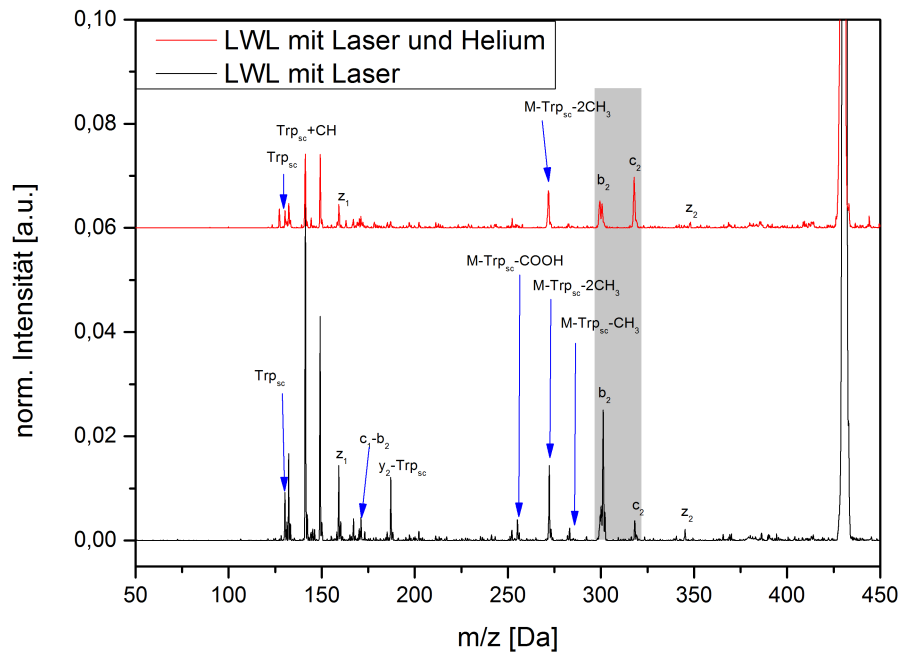


Abbildung 4.2: Vergleich der Massenspektren von LWL. Das schwarze Spektrum zeigt das Fragmentierungsverhalten von LWL, das mit einer Anregungs-Wellenlänge von 193 nm (Laserpulsenergie von 2,2 mJ) angeregt wurde. Das rote Spektrum hingegen zeigt das Fragmentierungsmuster nach der Laser-Bestrahlung (gleiche Laserenergie) und des gleichzeitig anwesenden Helium-Gaspulses. Die Spektren wurden aufgrund der Vergleichbarkeit auf den Basispeak, der zugleich der Muttermassenpeak ist, normiert. Zudem wurde das rote Spektrum 0,06 auf der Y-Achse nach oben versetzt. Im Vergleich beider Spektren erkennt man, dass durch die vielen Heliumstöße die Intensität der kleinen Fragmente (im roten Spektrum) stark abnimmt. Einzig ein Fragment, das c_2 , gewinnt an Intensität.

Abbildung 4.2 zeigt das Experiment mit dem Tripeptid LWL. Auf dem ersten Blick erkennt man, dass die Intensität der Fragmentpeaks vom Lasermassenspektrum ohne Helium (schwarz) zum roten Massenspektrum (mit Helium) abnehmen. Ein genauerer Blick offenbart, dass überwiegend tryptophanabhängige Fragmente Einbußen in ihrer Intensität aufweisen. Eine weitere Auffälligkeit ist der Intensitätswechsel des b_2 - und c_2 -Fragments. Hier könnten scheinbar ein Teil der b_2 -Fragmente über den metastabilen Zerfall des c_2 -Fragments entstanden sein.

Die Fragmentierung in Zerfallsprodukte, die von Tryptophan abgeleitet werden können, erscheint logisch. Die Seitenkette des Tryptophans, die Indolgruppe, hat ein kleines Ionisierungspotential sodass man davon ausgehen kann, dass nach Anregung (evtl. auch Ioni-

sation) mit dem Laser die Ladung im Aromaten lokalisiert wird. Bei einer entsprechenden Überschussenergie nach einer primären Fragmentierung, lässt dies auch genügend Spielraum für weitere metastabile Zerfälle zu. Diesen Trend kann man auch in den Spektren der Abbildung 4.2 erkennen. Alle tryptophanabhängigen Fragmente verlieren an Intensität, wenn durch den Helium-Gaspuls die Überschussenergie der Fragmente gequencht wird. Leider kann man nicht definitiv sagen welches bzw. welche primären Fragment\e ursächlich für die nachfolgende Fragmentierung in die tryptophanabhänigen Fragmente sind. Es lässt sich nur vermuten, dass diese direkt über die Muttermasse gebildet wurden. Man kann nach diesen ersten Experiment festhalten, dass durch das Einbringen von Helium in die Paulfalle während der Laseranregung viele Dissoziationsreaktionen verhindert werden können. Unter diesen gibt es auch, wie in der Hypothese angenommen, konsekutive Fragmentierungen. Leider ergibt sich aber noch nicht das gewünschte Bild, dass die Lücke unterhalb des Mutterions geschlossen wird. Somit wird das Ziel eines vollständigen Satzes von Fragmenten für die Sequenzanalyse hier nicht erreicht.

In Anlehnung zum Experiment mit LWL wurde auch das kleinere $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-OH}$ (LW) untersucht. Das Dipeptid hat im Vergleich zum LWL ein Leucin weniger. Trotz einer geringeren Anzahl an Absopritionsstellen (drei) sollte laut RRKM-Theorie mehr bzw. intensivere Fragmentpeaks entstehen. Die aus den Experiment mit LW entstandenen MS-Spektren in Abbildung 4.4 zeigen vor allem, wie erwartet, intensivere Fragmentpeaks. Z.B. hat das a_1 -Fragment mit fast 15 Prozent Anteil an den Spektren. Das Lasermassenspektrum ohne Helium (schwarz) zeigt neben den Roepstorff-Fohlmann-Fragmenten auch Fragmente, die in Verbindung zum Tryptophan stehen. D.h. im konkreten Fall des LW, dass die Trp-Seitenkette (Trp_{sc}) abgespalten wurde oder selbst als Fragment in Erscheinung tritt. Im roten Spektrum werden diese Fragmente weniger intensiv erzeugt. Zudem zeigen sich hier einige Besonderheiten. Es zeigt sich wieder ein Tausch der Intensitäten bei zwei Fragmenten, dem x_1 und dem y_1 . Während das x_1 im schwarzen Lasermassenspektrum nahezu einem Faktor 6 (9:1,5) größer ist als das y_1 -Fragment, ist das y_1 im rotem Massenspektrum doppelt so groß wie das x_1 (3:6). Neben dieser Auffälligkeit erkennt man zudem neue Peaks, wie das $y_1\text{-I}$ (I für das Indol der Trypophanseitenkette) und I-CH_3 . Im großen Massenbereich des roten Spektrum treten bei Anwendung des Gaspulses Fragmente auf, die nahe an der Muttermasse liegen. Dies sind der Hydroxylverlust (M-OH) und der Carboxylverlust(M-COOH).

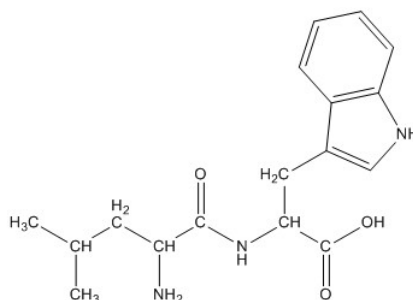


Abbildung 4.3: Struktur des Dipeptids NH₂-Leu-Trp-OH (LW). Hier bildet das Leucin den N-Terminus und das Tryptophan den C-Terminus.

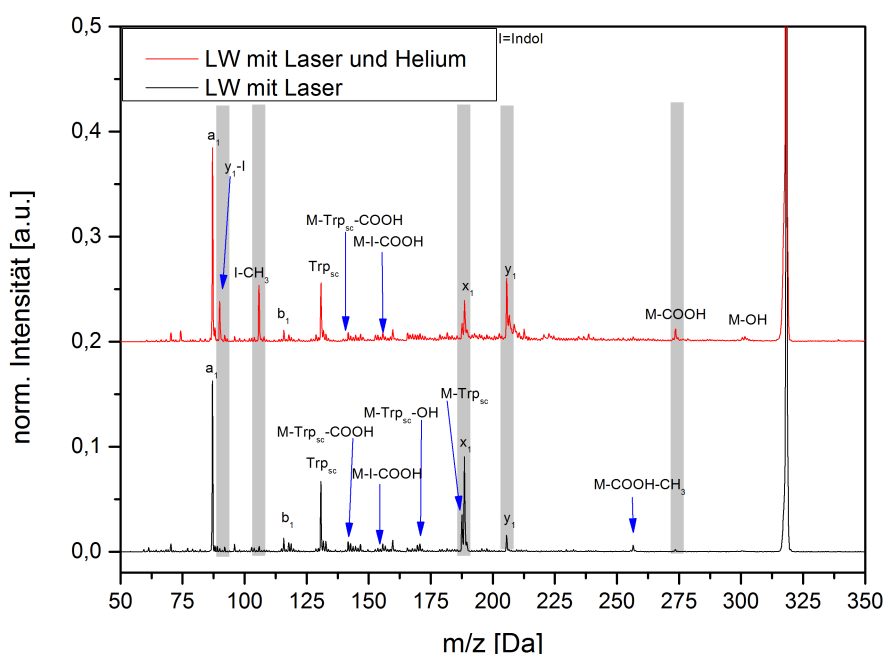


Abbildung 4.4: Vergleich der Massenspektren von LW. Das schwarze Spektrum zeigt das Fragmentierungsverhalten von LW bei einer Wellenlänge von 193 nm (Laserenergie von 2,2 mJ). Das rote Spektrum zeigt das Fragmentierungsmuster bei gleicher Laserenergie aber nun gleichzeitig anwesenden Gaspuls mit Helium. Die Spektren wurden aufgrund der Vergleichbarkeit auf den Basispeak, der zugleich der Muttermassenpeak ist, normiert. Zudem wurde das rote Spektrum 0,2 auf der Y-Achse nach oben versetzt. Die grau hinterlegten Bereiche zeigen eine starke Veränderung der Intensitäten von Fragmenten an.

Das Experiment an NH₂-Leu-Trp-OH zeigt, dass ganz allgemein die Kühlung vom angereg-

ten LW viel weniger durch das Helium beeinflusst wird als im größeren LWL (Abbildung 4.2). Es gibt aber bei genauerer Betrachtung Veränderung, die andeuten, dass es zu metastabilen Zerfällen nach Photofragmentierung kommt. Die Indizien sind, wie oben schon erwähnt, in Anwesenheit von hoher Helium-Dichte neu auftretende Massenpeaks, die in einem reinen Lasermassenspektrum ohne Helium Stoßgas des Moleküls LW nicht auftreten. Zwar zeigen sich einige neue Fragmente im kleinen Massenbereich ($I-CH_3$ und $y-I$) (I für Indol), können aber aus noch kleineren Fragmenten herrühren, die links außerhalb des Scanbereichs liegen. Ein Vorläufer einer sekundären Fragmentierung lässt sich aber bestimmen. Ein Teil der x_1 -Fragmente muss aus dem metastabilen Zerfall des y_1 stammen. Auch sind im großen Massenbereich neue Fragmente ($M-OH$ und $M-COOH$) mit He-Quechning zu sehen. Welchen sekundäre Fragmentierung diese Fragmente ohne Helium Stoßgas durchführen, kann leider dem Spektrum nicht entnommen werden.

Neben dem LW wurde ein zweites Dipeptid, das NH_2 -Gly-Trp-OH (GW), untersucht. Bei diesem Peptid wurde also die N-Terminale Aminosäure Leucin durch die Aminosäure Glycin ersetzt. Die Wahrscheinlichkeit des Moleküls den Laser zu absorbieren, ist dadurch gegenüber NH_2 -Leu-Trp-OH indes nicht kleiner geworden. Das Dipeptid GW besitzt wie das LW drei Absorptionsstellen. Da aber die Anzahl der Atome deutlicher geringer ist, sollten Zerfälle gemäß der RRKM-Theorie bei gleicher internen Energie deutlich schneller ablaufen. Betrachtet man die Abbildung 4.5 so lässt sich in Übereinstimmung damit auf dem ersten Blick kein Unterschied feststellen, der auf die Wirkung des Helium-Stoßgases zurückzuführen ist. Das heisst, es gibt nur sehr wenige metastabile Zerfälle. Offensichtlich ist das Molekül so klein, dass trotz RRKM-Effekt sehr schnelle Zerfälle resultieren. Es sind viele Fragmente in beiden Spektren vorhanden, die aber in den Massenspektren nur schwache Intensitäten besitzen. Dies deutet an, dass die Photoabsorption schwach ist und die Fragmente aus einem 1-Photoenschritt stammen. Der intensivste Massenpeak ist das y_1 -OH-Fragment mit vier Prozent sowohl im Lasermassenspektrum (ohne Helium) als auch im Lasermassenspektrum mit Gaspuls (rotes Massenspektrum). Bei genauerer Analyse findet man Unterschiede im kleinen als auch im großen Massenbereich. Diese Unterschiede liegen in einer relativ größeren Intensität der entsprechenden Fragmente ($M-I-COOH$, $M-COOH-H_2$ und $M-COOH$) bei der Messung mit Gaspuls. Der mittlere Bereich der Massenspektren zeigt nur marginale Änderung auf, die auch durch etwaige statistische Messungenauigkeit verursacht sein könnten. Nicht desto trotz zeigen sich sekundäre Fragmentierungskanäle. Ursache der geringen Fragmentierung lässt zwei Thesen zu. Erstens die Absorption der Wellenlänge ist nicht gut. Oder Zweitens und viel wahrscheinlicher liegen

die möglichen Abspaltprodukte außerhalb des detektierbaren Massenbereich. Dies könnte z.B. das Ammoniumion (NH_4^+) sein, welches eine Masse von 18 Da hat und somit deutlich unter dem low-mass cutoff des ESI-MS von 50 Da liegt. Zudem könnte dieser Fragmentierungskanal sehr schnell sein, sodass er nicht mehr durch Helium-Stöße gelöscht werden kann. Untermuert werden kann diese These, wenn man die nicht normierten Spektren des Experiment (siehe Anhang) betrachten. So zeigt das Massenspektrum von GW ohne Laseranregung eine Muttermassenintensität von ca. $1,6 * 10^{-5}$ und in den beiden anderen Fällen, also mit Laseranregung und Laseranregung mit Heliumstößen, eine Intensität von ca. $1,4 * 10^{-5}$. Diese Werte zeigen, dass durch den Beschuss mit dem Laser das Muttermassensignal deutlich an Intensität am verliert. Zudem kann durch die Heliumstöße das Signal aber auch nicht an Intensität gewinnen. Dies führt zur Annahme, dass die Fragmentierung hier einen sehr schnellen Reaktionskanal folgt und unbeeinflusst von der Dichte des Helium-Stoßgases bleibt.

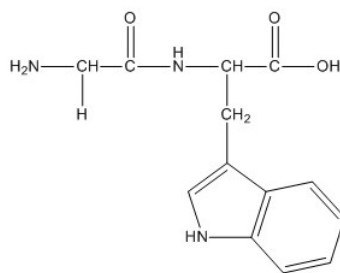


Abbildung 4.6: Struktur des Dipeptids NH_2 -Gly-Trp-OH (GW). Hier bildet das Glycin den N-Terminus und das Tryptophan den C-Terminus.

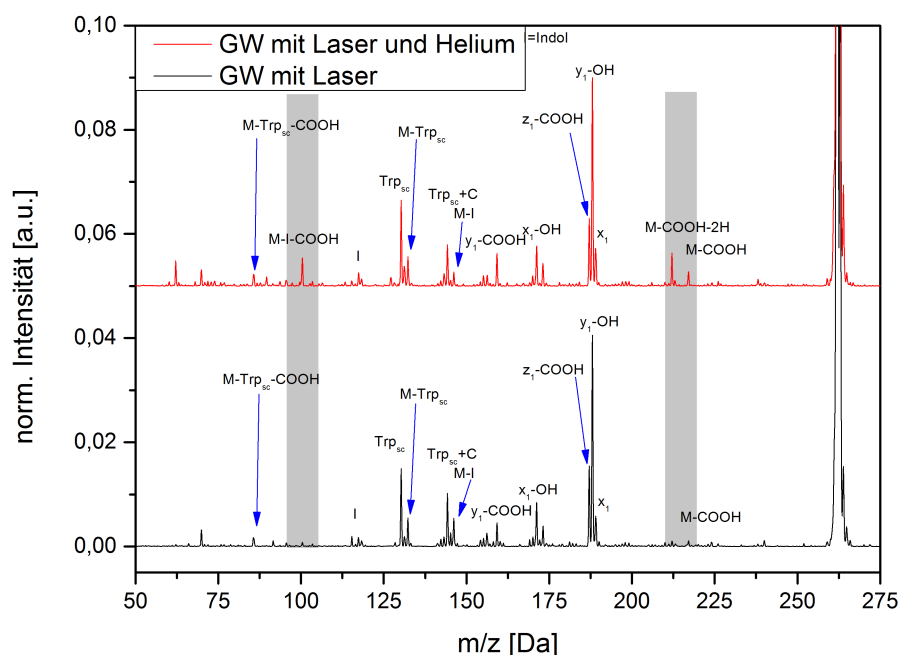


Abbildung 4.5: Vergleich der Massenspektren von GW bei Laseranregung (193 nm bei 2,2 mJ Pulsenergie) mit (rot) und ohne (schwarz) Helium-Puls. Die Spektren wurden aufgrund der Vergleichbarkeit auf den Basispeak, der zugleich der Muttermassenpeak ist, normiert. Zudem wurde das rote Spektrum 0,05 auf der Y-Achse nach oben versetzt. Markant sind der untere (zwischen 50-100 Da) und obere Massenbereich (ab 200 Da). Hier sind die Intensitäten im roten Spektrum größer, was durch quenching von konsekutiven Fragmentierung erklärbar ist.

Weiteres Vorgehen:

Die ersten gezeigten Spektren (vgl. 4.2 ,4.4, 4.5) zeigten vermehrt Fragmente, die sich überwiegend aus der Tryptophanseitenkette ableiten lassen.

Als Kontrast zu der aromatischen Seitenkette, werden nun Beispiele gezeigt, die ohne jeglichen Aromaten auskommen. Als erstes Beispiel dieser Serie steht das einfache Tripetid Triglycin ($\text{NH}_2\text{-Gly-Gly-Gly-OH}$).

In Abbildung 4.8 sind die Massenspektren des Triglycins mit 193 nm Laseranregung mit und ohne Helium-Gaspuls zu sehen. Es fällt auf, dass beide Spektren, das schwarze Lasermassenspektrum und das rote Gas/Lasermassenspektrum, eine geringe Fragmentintensität aufweisen. Lediglich das c_1 -Fragment erreicht gerade ein Prozent der Intensität. Alle anderen Fragmentpeaks weisen eine deutlich niedrigere Intensität auf. Vergleicht man beide Spektren miteinander so zeigen die massengleichen Fragmentpeaks nur eine marginale Veränderung. Das b_1 tritt nur im Gas/Lasermassenspektrum in Erscheinung. Das zweite Fragment im Spektrum, das b_1 - c_2 -Fragment, wird trotz geringer Intensität ohne Helium, dann mit Helium doppelt so groß. Neben dieser Veränderung ist eine kleine Abnahme der Intensität von a_2 -H bei gleichzeitiger Zunahme des a_2 zu erkennen. Den optisch größten Zuwachs an Intensität zeigt das z_2 -OH-Fragment. Die nachfolgenden Fragmente unterscheiden sich mit Helium kaum von den Fragmenten aus dem Lasermassenspektrum ohne Helium. Es stellt sich wiederum die Frage warum die Fragmentintensitäten sehr klein sind. In Abbildung 4.8 unterscheiden sich die Fragmente im großen Massenbereich (<150 Da), lassen sich aber nicht zuordnen. Dies lässt den Schluss zu, dass sich die Intensitäten der Fragmentpeaks im Untergrund des Spektrums befinden oder aus dem Nachweisbereich ($m < 50$ Da). Dennoch zeigen Massenpeaks gleicher Masse Intensitätsunterschiede. Folgernd aus dieser Prämisse kann man das Experiment als erfolgreich bewerten. Vor allem da ein neues Fragment, das b_1 , nach dem Gaspuls entstanden ist. Folglich muss dieses Fragment aus einem noch kleineren Fragment herrühren, welches aus dem Massenbereichs des Massenspektrometers fällt.

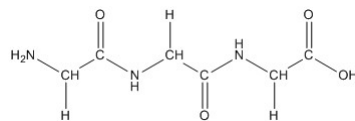


Abbildung 4.7: Struktur des Tripeptids $\text{NH}_2\text{-Gly-Gly-Gly-OH}$ (GGG). Hier bildet das Glycin sowohl den N-Terminus und als auch den C-Terminus des Tripeptids.

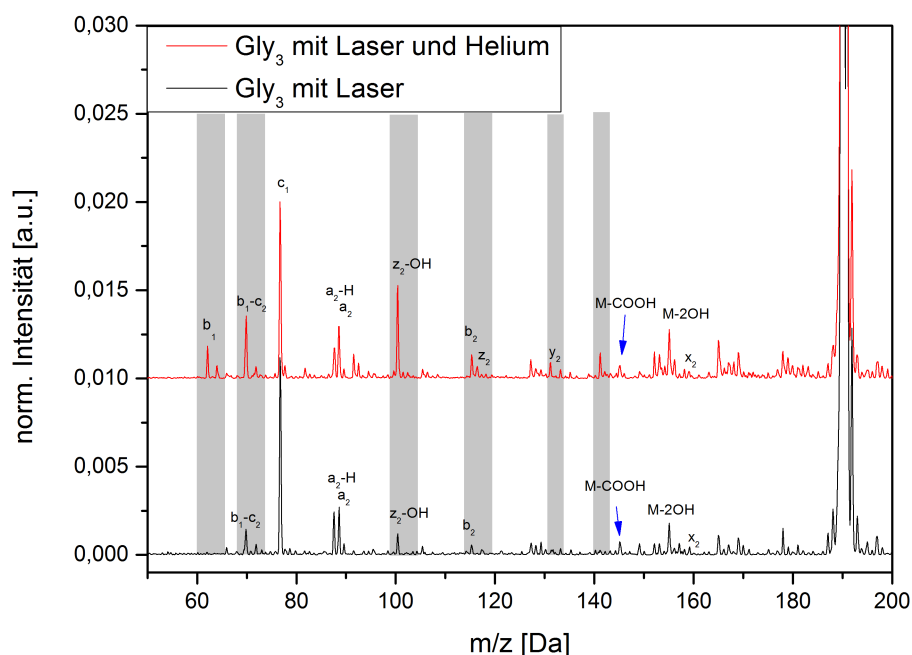


Abbildung 4.8: Vergleich der Lasermassenspektren (193nm bei einer Pulsenergie von 2,2 mJ) von GGG mit (rot) und ohne (schwarz) Helium. Die auffallend geringe Fragmentierung könnte auf das Fehlen von Tryptophan zurückgehen. Offensichtlich ist der Anregungsquerschnitt von Tryptophan höher als der einer Peptidbindung. Die Spektren wurden aufgrund der Vergleichbarkeit auf den Basispeak, der zugleich der Muttermassenpeak ist, normiert. Zudem wurde das rote Spektrum 0,01 auf der Y-Achse nach oben versetzt.

Das nächste Beispiel aus dieser Serie nicht aromatischer Peptide ist das $\text{NH}_2\text{-Ala-Ala-Ala-OH}$. Der Unterschied zu vorherigen Substanz ist eine zusätzliche Methylgruppe in den Seitenketten der Aminosäuren anstatt eines Wasserstoffatoms. Die nachfolgende Abbil-

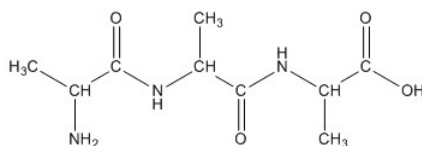


Abbildung 4.9: Struktur des Tripeptids $\text{NH}_2\text{-Ala-Ala-Ala-OH}$ (AAA). Hier bildet das Alanin sowohl den N-Terminus und als auch den C-Terminus des Tripeptids.

Abbildung 4.10 zeigt das Ergebnis der Versuche mit $\text{NH}_2\text{-Ala-Ala-Ala-OH}$ (AAA). Auf den ersten Blick wird deutlich, dass die Intensität der Fragmente wiederum klein ist. Als

höchsten Massenpeak lässt sich das a_2 -Fragment identifizieren, sowohl im Lasermassenspektrum (0,5 %) als auch im Gas-Lasermassenspektrum (0,75 %). Beide Spektren zeigen Roepstorff-Fohlmann-Fragmente und Fragmente, die aus diversen Verlustkanälen, wie Hydroxyl-, Amino- und Carboxylverlust, stammen. Bei dem Vergleich beider Spektren zeigt sich im kleinen Massenbereich (50 - 120 Da) vor allem die Auffälligkeit der Fragmente a_2 und x_1 . Stehen beide Fragmente noch im Verhältnis 2:1 in dem Lasermassenspektrum, so ist das Intensitätsverhältnis im Gas-Lasermassenspektrum auf 6:1 angewachsen. Der mittlere Massenbereich (121 - 180 Da) scheint geprägt von intensiveren Fragmentpeaks im Gas-Lasermassenspektrum. Hier ist das y_2 zu erwähnen, tritt dieses Fragment im schwarzen Spektrum noch nicht auf - oder ist höchstens zu erahnen, ist es im roten Spektrum relativ präsent. Im großen Massenbereich des Moleküls (> 180 Da) erkennt man wiederum intensivere Fragmentpeaks, welcher vor allem durch direkte muttermassenbasierenden Zerfallsprodukte bestimmt ist. Den größten Anstieg verbucht hier der Hydroxylverlustkanal ($[M-OH]^+$).

Der Versuch an NH_2 -Ala-Ala-Ala-OH zeigt deutlich, dass es unterschiedlich schnelle Prozesse nach der Absorption von Photonen gibt. Wird die überschüssige Energie nach der primären Fragmentierung durch Stöße mit Helium abgeführt, werden wie in Abb. 4.10 manche Fragmente intensiver wie a_2 oder auch $[M-OH]^+$ bei gleichzeitiger Abnahme von anderen Fragmenten, wie dem z_1 und dem x_1 . Es treten, wie auch erwartet neue Fragmente, hier das y_2 auf.

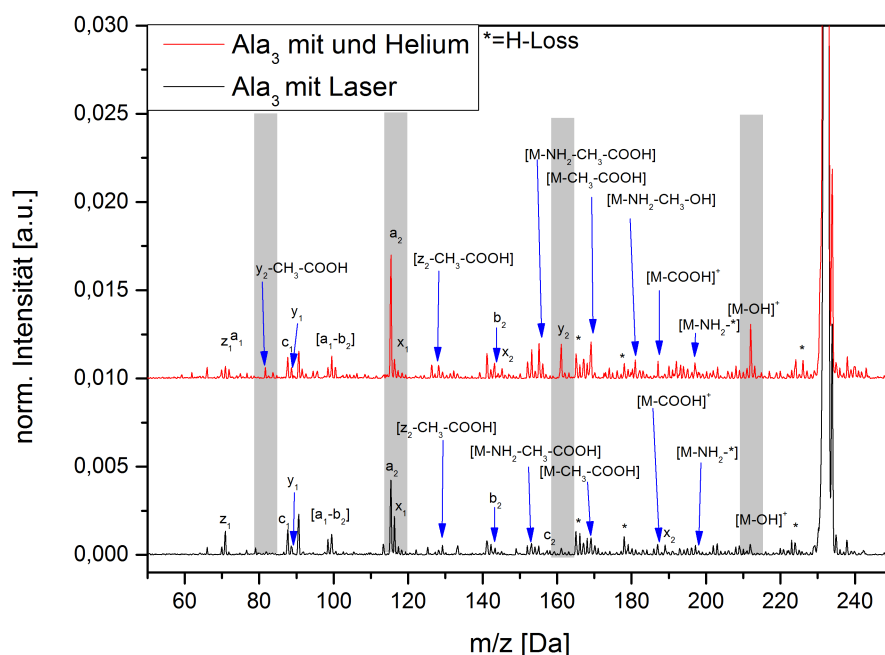


Abbildung 4.10: Vergleich der Lasermassenspektren (193 nm bei einer Pulsenergie von 2,2 mJ) von AAA. Das schwarze Lasermassenspektrum zeigt das Fragmentierungsverhalten ohne Helium, während das rote Lasermassenspektrum das Fragmentierungspattern mit Helium zeigt. Wie bei GGG ist die Intensität der Fragmentierung nicht sehr intensiv, was darauf hindeuten, dass auch hier der Absorptionsquerschnitt des Moleküls AAA nicht sonderlich hoch ist. Die Spektren wurden aufgrund der Vergleichbarkeit auf den Basispeak, der zugleich der Muttermassenpeak ist, normiert. Zudem wurde das rote Spektrum 0,01 auf der Y-Achse nach oben versetzt.

Als Letztes dieser kleinen Serie ohne jeglichen Aromaten im Peptid werden die Ergebnisse des Tripeptids $\text{NH}_2\text{-Leu-Leu-Leu-OH}$ (LLL) vorgestellt. Im Vergleich zum AAA wurde in der Seitenkette die Methylgruppe gegen eine 2-methylpropyl-Gruppe ausgetauscht.

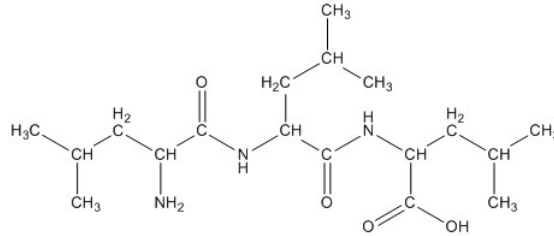


Abbildung 4.11: Struktur des Tripeptids $\text{NH}_2\text{-Leu-Leu-Leu-OH}$ (LLL). Hier bildet das Leucin sowohl den N-Terminus und als auch den C-Terminus des Tripeptids.

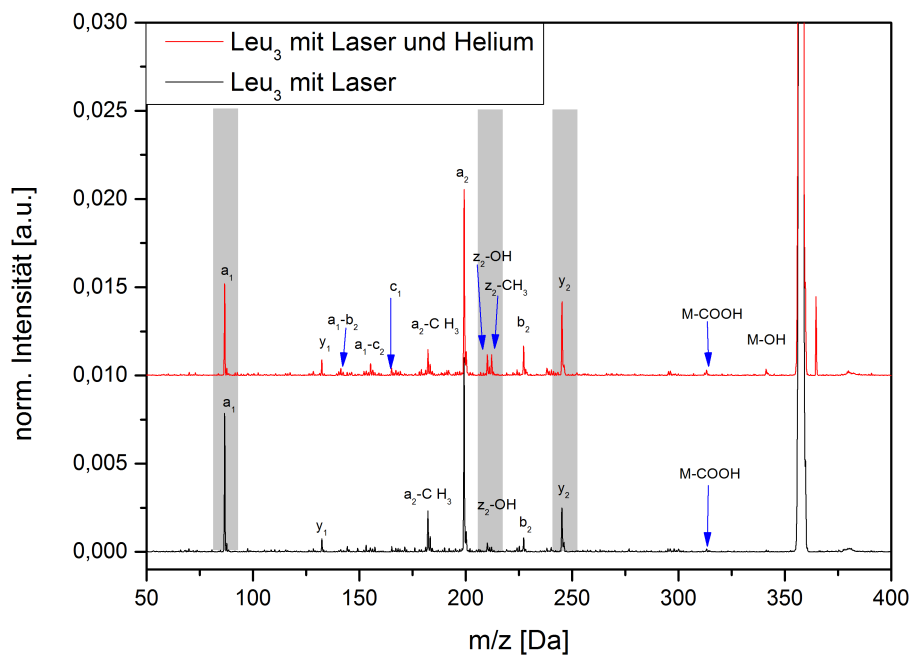


Abbildung 4.12: Vergleich der Lasermassenspektren (193 nm bei einer Pulsenergie von 2,2 mJ) von LLL mit Helium (rot) und ohne Helium (schwarz). Die gebildeten Fragmente sind bei LLL intensiver als bei AAA und GGG, dennoch sind auch hier die Veränderungen marginal. Die Spektren wurden aufgrund der Vergleichbarkeit auf den Basispeak, der zugleich der Muttermassenpeak ist, normiert. Zudem wurde das rote Spektrum 0,01 auf der Y-Achse nach oben versetzt.

Die Abbildung 4.12 zeigt uns die aufgenommenen Lasermassenspektren von LLL mit und

ohne Helium-Puls. Es gibt relativ wenige Fragmente, sowohl im schwarzen Spektrum (ohne Helium) als auch im Roten (mit Helium). Dominiert werden beide Spektren von den a-Fragmenten a_1 und a_2 . Diese sind im Lasermassenspektrum größer als im Lasermassenspektrum mit Helium. Des weiteren verlieren nur noch zwei weitere Fragmente an Intensität, das y_1 und das a_2 -CH₃-Fragment. Alle anderen Fragmente nehmen in ihrer Intensität zu. Der Massenbereich zwischen 200 und 250 Da zeigt dabei den größten Zuwachs an Intensität der Fragmente. Die Fragmente z_2 -OH, z_2 -CH₃ und y_2 nehmen dabei am deutlichsten zu. Auch zeigen sich nach dem Einsatzes des Gaspulses vermehrt Verlustkanäle wie der Hydroxylverlust ($[M-OH]^+$).

Das Experiment an NH₂-Leu-Leu-Leu-OH folgt am Besten von den bisher gezeigten Versuchen den theoretischen Erwartungen. Kleinere Fragmente werden gequencht, wie z.B. das a_1 und größere Fragmente werden intensiver. Ein genauer Zusammenhang zwischen gequenchten Fragmenten und den daraus resultierenden Primärfragmenten lässt sich hieraus leider nicht eindeutig ableiten. Man kann nur Vermutungen anstellen, das z.B. aus dem y_2 als primäres Fragment, zum Teil die zwei Fragmente a_2 -CH₃ und a_2 als sekundäres Fragment entstehen könnten.

Als letztes Tripetid soll nun das NH₂-Leu-Trp-Met-OH (LWM) vorgestellt werden. Dieses Peptid weist wieder eine aromatische Seitenkette auf und sollte auch deshalb wiederum mehr und intensivere Fragmente liefern. Betrachtet man das Lasermassenspektrum in Abbildung 4.14 erkennt man sofort die tryptophanabhängigen Fragmente im unteren Massenbereich des Spektrums (Trp_{sc} oder auch der Verlust der Seitenkette in den Fragmenten b_2 und c_2). Es zeigen sich auch die typischen Roepstorff-Fohlmann-Fragmente. Das Intensivste von ihnen ist das a_1 mit ca. 4 Prozent des Mutterions. Weitere Fragmente bewegen sich mit ihrer Intensität zwischen 1 und 2 %. Stellt man nun das Gas-Lasermassenspektrum dem schwarzen Spektrum gegenüber, so zeigen sich über das gesamte Spektrum Unterschiede. Im unteren Massenbereich bis etwa zum c_2 -Trp_{sc}-Fragment verlieren alle Fragmente mehr oder weniger an Intensität. Vor allem fünf dieser Zerfallsprodukte weisen einen großen Verlust an Peakhöhe auf. Das a_1 verliert hier nahezu die Hälfte seiner Höhe. Weniger stark ist der Verlust bei der Tryptophan-Seitenkette (Trp_{sc}). Bedeutender ist der Schwund bei dem Innerketten-Fragment c_1 - a_2 und den tryptophanabhängigen Fragmenten b_2 -Trp_{sc} und c_2 -Trp_{sc}. Ab der Masse 198 Da dreht sich die Beobachtung um: fast alle Fragmente gewinnen hier in Anwesenheit des Heliums an Intensität. Als einziges Fragment in diesen Massenbereich, welches noch an Intensität verliert, ist das z_2 -Fragment. Besonders markant ist der Anstieg bei den Fragmenten b_2 und y_2 . Die Intensität des b_2 steigt auf ca. das

2,5-fache an (von 0,9 % auf 2,2 %), während die Intensität von y_2 von 0,85 % auf 1,6 % ansteigt.

Das Peptid LWM erscheint als gutes Beispiel für die erwartete sekundäre Fragmentierung nach der Absorption eines Lasers mit anschließender primärer Fragmentierung: kleine Fragmente, die ohne Helium-Quenching entstehen, werden bei Anwesenheit von Helium in ihrer Intensität reduziert und große Fragmente tauchen beim Helium-Quenching auf. Das ist ein klarer Beweis von einer Anwesenheit von metastabilen konsekutiven Fragmentierungen. Die Mechanismen der sekundären Zerfälle lassen sich nur vermuten. Am wahrscheinlichsten hat den größten Anteil der Sekundärfragmentierung das Tryptophan. Als mittlere Aminosäure des Tripetid könnte es sowohl einen weiteren Zerfall nach links (z.B. y_2 zerfällt weiter in z_2) oder nach rechts (b_2 zerfällt nach $b_2\text{-Trp}_{sc}$) triggern. Als weiteres Indiz der Tryptophaninduktion könnten die Innerketten-Fragmente geben. Wie in der Abbildung 4.14 ersichtlich nehmen jeweils die Fragmente $c_1\text{-a}_2$ und $b_1\text{-a}_2$ ab. Diese Fragmente leiten sich von der Aminosäure Tryptophan ab, genau wie das neu entstandene Fragment $a_1\text{-b}_2$.

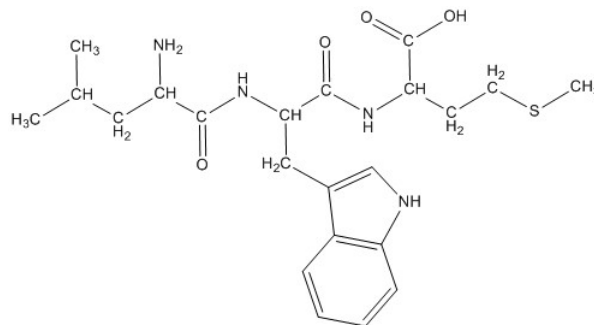


Abbildung 4.13: Struktur des Tripeptids $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-Met-OH}$ (LWM). Hier bildet das Leucin sowohl den N-Terminus und das Methiodin den C-Terminus des Tripeptids.

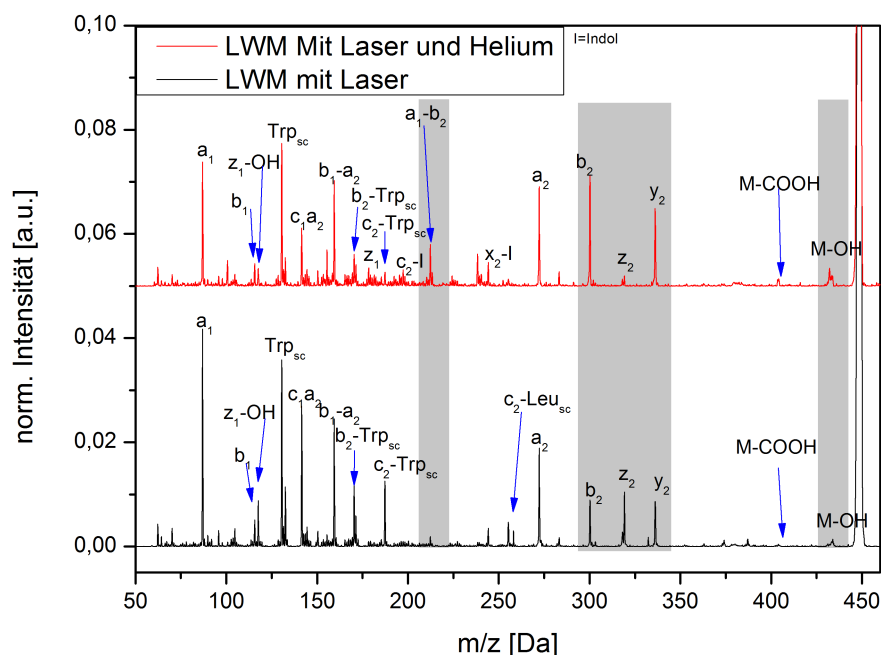


Abbildung 4.14: Vergleich der Lasermassenspektren von LWM mit (rot) und ohne (schwarz) Helium. Die Laseranregung erfolgte mit der Wellenlänge von 193 nm (2,2 mJ Laserenergie). Besonders hervor zu heben ist der mittlere Massenbereich zwischen 200 bis 350 Da. Hier zeigt das rote Lasermassenspektrum die größte Veränderung im Vergleich zum Lasermassenspektrum ohne Helium. Weitere Erläuterung siehe Text. Die Spektren wurden aufgrund der Vergleichbarkeit auf den Basispeak, der zugleich der Muttermassenpeak ist, normiert. Zudem wurde das rote Spektrum 0,05 auf der Y-Achse nach oben versetzt.

Bei dem nächsten Beispiel wird das Peptid LWM um eine Aminosäure verlängern. Es wird zusätzlich die Aminosäure Arginin in die Peptidkette eingefügt sodass sich die Sequenz $\text{NH}_2\text{-Leu-Trp-Met-Arg-OH}$ (LWMR) ergibt. Aufgrund dieser neuen Aminosäure in der Peptidkette sollte sich die Tryptophan lokalisierte Fragmentierung abmildern, da nun davon ausgegangen werden kann, dass das Proton am Arginin so gut gebunden ist, dass es durch die Anregung nicht aktiviert werden kann, um in die *backbone* zu wandern und damit die Fragmentierung zu begünstigen. Ist die Aminosäure Arginin wegen ihrer hohen Basizität der Seitenkette Hauptträger der Ladung, so sollte es nachweisbar in den geladenen Fragmenten vorkommen.

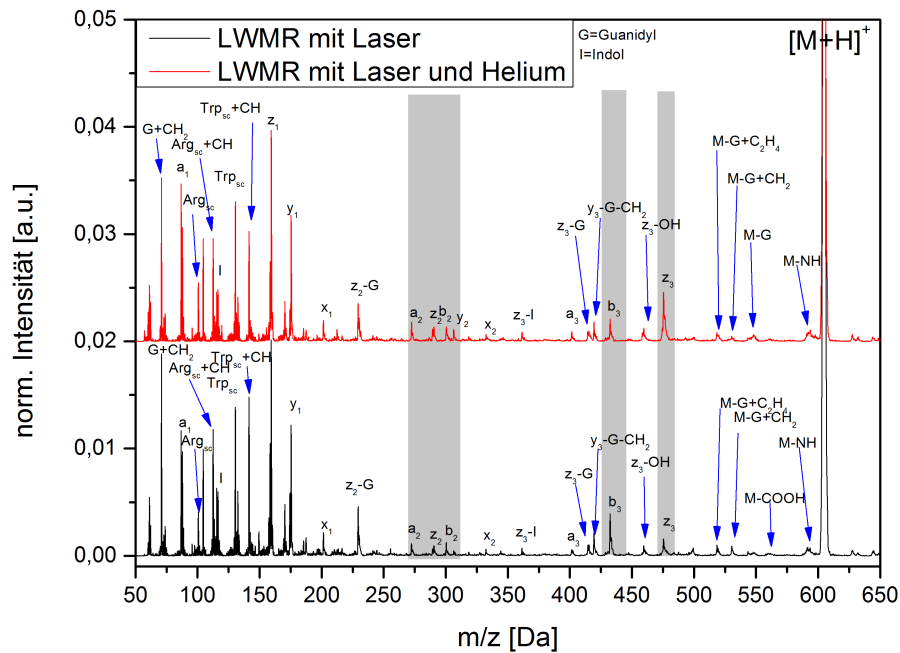


Abbildung 4.15: Vergleich der Lasermassenspektren von LWMR mit (rot) und ohne Helium (schwarz). Die Lasermassenspektren von LWMR wurden bei einer Wellenlänge von 193 nm (2,2 mJ Pulsenergie) aufgenommen. Beide Spektren sehen erstaunlich ähnlich aus, daher wurden Bereiche grau hinterlegt, die eine sichtbare Veränderung zeigen. Beschreibung siehe Text. Die Spektren wurden aufgrund der Vergleichbarkeit auf den Basispeak, der zugleich der Muttermassenpeak ist, normiert. Zudem wurde das rote Spektrum 0,02 auf der Y-Achse nach oben versetzt.

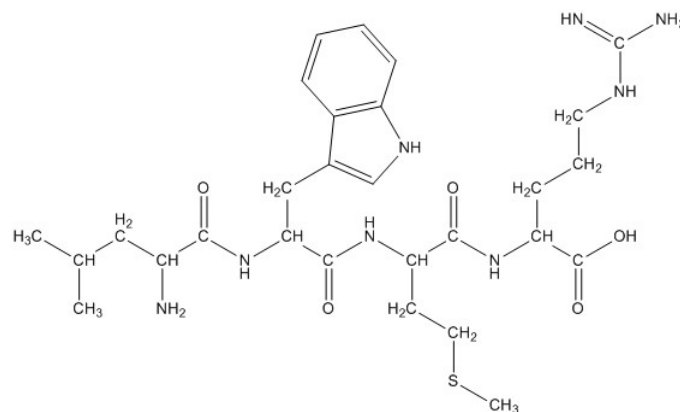


Abbildung 4.16: Struktur des Tripeptids NH₂-Leu-Trp-Met-Arg-OH (LWMR). Hier bildet das Leucin den N-Terminus und das Arginin den C-Terminus des Tripeptids.

In Abbildung 4.15 ist der Vergleich zwischen einem Lasermassenspektrum von LWMR mit und ohne dem Gaspuls zu sehen. Wie man erwarten konnte, finden sich im kleinen Massenbereich viele Fragmente, die das protonierte C-terminale Arginin enthalten. Neben diversen Seitenketten-Fragmenten des Arginins (z.B. Arg_{sc} oder den Verlust der Guanidylgruppe) kann man alle drei C-terminalen Fragmente (x₁, y₁ und z₁) finden. Zu Erinnerung - die Aminosäure Arginin bildet in diesem Tetrapeptid den C-Terminus. Durchaus trägt auch noch das Tryptophan zum Fragmentpattern bei, wie man am Massenpeak für die Tryptophanseitenkette (Trp_{sc}) erkennen kann. Fragmente im Massenbereich ab 200 Da sind weniger intensiv, zeigen aber C- und N-terminale Roepstorff-Fohlmann-Fragmente. Wenn man beide Spektren miteinander vergleicht, fallen die Unterschiede kaum auf. Der untere Massenbereich (bis 200 Da) zeigt nahezu keine Veränderung. Nur das a₁-Fragment verliert nennenswert an Intensität. Im mittleren Massenbereich (200- 400 Da) sind die Veränderungen marginal. Die Fragmente a₂, b₂ und z₂ nehmen nur kaum wahrnehmbar zu. Das y₂-Fragment hingegen tritt deutlicher in Erscheinung. Der große Massenbereich (ab 400 Da) zeigt nur in den Fragmenten b₃ und z₃ eine Veränderung. Das b₃ verliert hier an Intensität, während das z₃ an Höhe gewinnt.

Welche Erkenntnis kann man aus den Experiment mit LWMR ziehen? Vermutlich ist der dominante Einfluss auf das Massenspektrum durch die Lokalisierung der Ladung am Arginin gegeben. Die Bindungsenergie für das Proton am Arginin ist vermutlich so groß, dass das Proton auch bei hoher internen Energie des Peptids lokalisiert bleibt. Daraus würde man auf ein Ausbleiben einer Proton-induzierten Fragmentierung (siehe Kap. 2.4.2) schließen. Die Bestätigung findet man im Fragmentpattern insbesondere in der geringen bis nicht vorhandenen Löschung der argininenthaltenden Fragmente bei Anwesenheit des Heliums. Die beiden Spektren zeigen überwiegend C-terminale Zerfallsprodukte, mit den größten Intensitäten an x₁, y₁ und z₁ und somit überwiegend argininhaltige Fragmente. Im unteren Massenbereich muss es sich dabei um sehr schnelle Reaktionen handeln, da diese sich fast nicht durch den Gaspuls beeinflussen ließen. Wenn am Arginin prompt fragmentiert wird, können die primären Zerfälle durch das Helium zum einem nicht mehr gelöscht werden und zum anderen wird auch ein Großteil der Überschussenergie im Fragment bleiben, die dann eine sehr schnelle sekundär Reaktion in kleine argininabhängige Produkte nach sich ziehen könnte. Dies würde in Übereinstimmung mit der kleinen Intensität im mittleren und großen Massenbereich stehen. Die einzigen Fragmente, die hier einen konsekutiven sekundären Fragmentierungsschritt vermuten lassen, sind das a₁-Fragment, das b₃-Fragment und das Fragment z₃. Bei diesen Fragmenten lässt sich aber kein Mechanismus erkennen aus welchen Vorläufer sie stammen oder in welche Produkte sie zerfallen.

Um einen Überblick zu bekommen, wie sich dieser Konsekutiv-Mechanismus mit zunehmender Peptidgröße verhält, werden nun im Folgenden größere Peptide untersucht. Als Erstes werden die Ergebnisse zu dem Oligopeptid α -Substanz 1B vorgestellt. Dieses Oligopeptid, mit der Masse 685 Da, besteht aus sechs Aminosäuren, in der Sequenz NH₂-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-OH (RGPFPI). Das Molekül hat viele Chromophorstellen und kann viele Photonen absorbieren. Die Absorptionstellen in diesem Molekül sind neben der N-terminalen Aminogruppe, die Seitenkette des Arginin mit seiner guanidyl-Gruppe und die sechs Peptidbindungen. Hier hat man einerseits die simple Erwartung, dass viele Photonen absorbiert werden und andererseits, dass mit zunehmender Größe des Moleküls der RRKM-Effekt eine zeitliche Verzögerung der Zerfälle verursacht. So sollten nicht nur primäre Fragmentierungen abnehmen sondern auch die sekundären Zerfallsschritte zum Erliegen kommen.

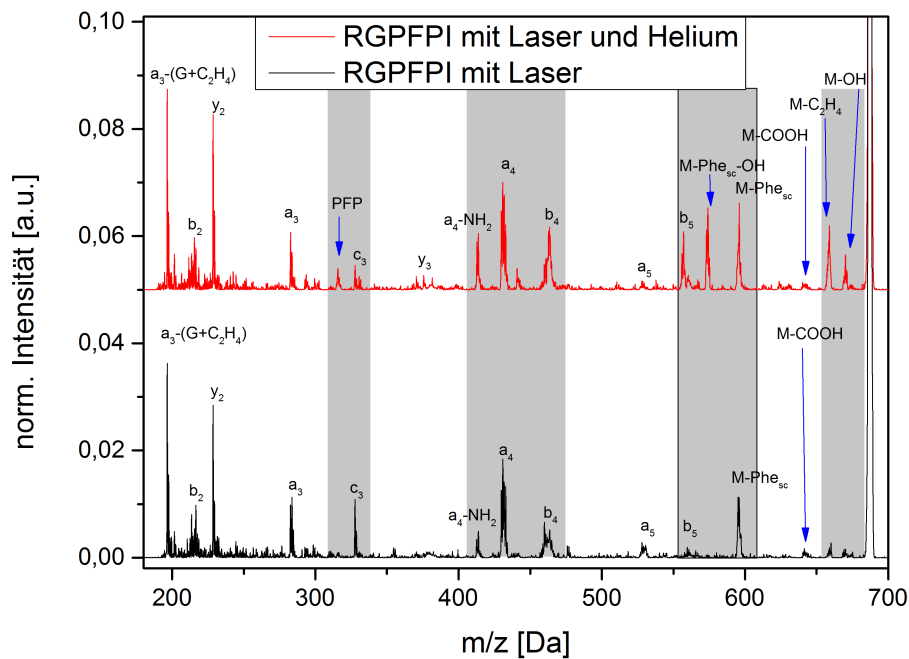


Abbildung 4.17: Vergleich Lasermassenspektren von RGPFPI mit (rot) und ohne (schwarz) Helium. In beiden Experimenten war die Laseranregungs-Wellenlänge 193 nm und die Laserpulsenergie 2,2 mJ. Die Spektren wurden aufgrund der Vergleichbarkeit auf den Basispeak, der zugleich der Muttermassenpeak ist, normiert. Zudem wurde das rote Spektrum 0,02 auf der Y-Achse nach oben versetzt. Wie erhofft steigt die Ausbeute an Fragmenten, die in der Nähe des Mutterions liegen. Für Erklärungen siehe Text.

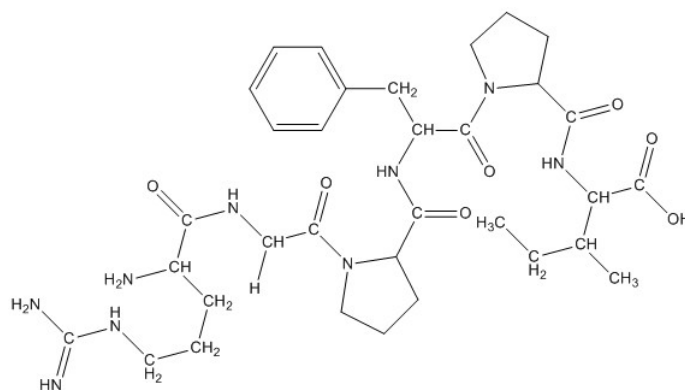


Abbildung 4.18: Struktur des Oligopeptids $\text{NH}_2\text{-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-OH}$ (RG-PFPI). Hier bildet das Arginin den N-Terminus und das Isoleucin den C-Terminus des Peptids.

Entgegen den Erwartungen zeigen die Spektren in Abbildung 4.17 ein anderes Bild. Zwar ist nur eine überschaubare Anzahl an Fragmenten zu sehen, was die erste Aussage der geringen Fragmentierung nach RRKM unterstützen würde, aber das Gas-Lasermassenspektrum (rot) zeigt deutlich intensivere Massenpeaks besonders im Bereich des Mutterions. Teilt man die Massenspektren wieder in drei Abschnitte, unterer, mittlerer und großer Massenbereich ergibt sich ein interessantes Bild. Der untere Massenbereich (180 - 350 Da) zeigt im Lasermassenspektrum (schwarz) fünf Peaks, die im Gas-Lasermassenspektrum eine gewisse Veränderung erfahren. Die ersten vier Peaks ($a_3\text{-(G+C}_2\text{H}_4)$, b_2 , y_2 und a_3) zeigen nur eine marginale Intensitätsänderung. Das Fragment c_3 verliert hingegen deutlich an Höhe. Im Gas-Lasermassenspektrum erscheint mit einem Innerkettenfragment, dem PFP, sogar ein neuer Peak. Im mittleren Massenbereich des Spektrums (350 - 500 Da) scheinen alle Fragmente des Lasermassenspektrums (y_3 , $a_4\text{-NH}_2$, a_4 und das b_4) vom Spektrum ohne Helium zum Gas-Lasermassenspektrum zu zunehmen. Der große Massenbereich zeigt die größte Veränderung. Hier nimmt das a_5 verschwindend gering ab, während die Fragmente b_5 , M-Phe_{sc} , $\text{M-C}_2\text{H}_4$ und M-OH bei Anwesenheit von Helium erheblich zunehmen. Den größten Sprung macht aber das $\text{M-Phe}_{sc}\text{-OH}$ -Fragment. Es ist im Lasermassenspektrum ohne Gas praktisch nicht zu sehen, kommt aber im Gas-Lasermassenspektrum mit ca. 1,5 % des Mutterions vor.

Die Frage, die zunächst beantwortet werden muss, ist - warum fragmentiert α -Substanz 1B relativ gut? Dies kann mehrere Ursachen haben. Primär liegt es vermutlich an den vielen Chromophoren und damit den vielen eingebrachten Photonen. Sekundär kann durch den Energieeintrag das Proton, welches für die Ladung des Peptids verantwortlich ist, beweglicher gemacht werden. Es kann sich schneller über das Molekül bewegen und bei einer

kritisch angeregten Bindung zur Fragmentation führen (siehe Mobil Proton Model). Als Drittes kann der "Prolin-Effekt" [BSHP11] aufgeführt werden. Dieser Effekt verstärkt die Spaltung an der N-terminalen Seite der Aminosäure, sodass bevorzugt b- und y-Fragmente gebildet werden (vgl. 4.17 mit b_2 , y_2 und b_4). Das Experiment an Peptid RGPFPi kann in puncto Löschen eines sekundären Fragmentierungsschrittes also als sehr erfolgreich bezeichnet werden. Nahezu jedes Fragment aus dem Lasermassenspektrum verzeichnet im Gas-Lasermassenspektrum eine Intensitätsveränderung und die Lücke zwischen kleinen Massen und Mutterion wird besser geschlossen.

Die Tatsache der Existenz von vielen sekundären Fragmentierungen bestätigt, die von Schlag et al. prognostizierte Aussage, dass große Moleküle nach einer hochenergetischen Anregung mittels Photonen noch sekundär weiter fragmentieren können.

Das letzte Beispiel dieser Experimente soll das Angiotensin III sein. Dabei handelt es sich um ein Peptid, aufgebaut aus sieben Aminosäuren, mit der Masse 931 Da und der Sequenz $\text{NH}_2\text{-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH}$ (Struktur siehe Abbildung 4.19). Man beachte, dass das protontragende Arginin am N-Terminus sitzt. Das Molekül birgt ein sehr gutes Potential Photonen zu absorbieren. Neben sechs Peptidbindungen und der N-terminalen Aminogruppe, weist das Molekül drei Seitenketten mit aromatischen Charakter auf. Da das Peptid also viele Absorptionsstellen aufweist, sollten auch viele Fragmente bei relativ kleinen Massen entstehen. Hinsichtlich sekundärer Fragmentierung könnte man erwarten, dass aufgrund der Molekülgröße und dem RRKM-Verhalten, diese trotz der hohen Anregungsenergie auch ohne Helium langsam ist.

Die Spektren des Angiotensins III in Abbildung 4.20 zeigen auf dem ersten Blick viel Aktivität trotz sehr geringer Fragmentintensität. Die Massenpeaks aus dem schwarzen Spektrum zeigen neben vielen Roepstorff-Fohlmann-Fragmenten, Fragmente die von diesen abgeleitet sind (z.B. $z_4\text{-OH}$ oder $a_5\text{-NH}_2$). Eine Auffälligkeit des Spektrums ist, dass sich alle Fragmente im Spektrum eher an die rechte Seite des Moleküls orientieren. D.h. die Bindungsbrüche finden überwiegend nach der Aminosäure Tyrosin statt. Dies ist daran zu erkennen, dass große a,b,c-Fragmente und eher kleinere x,y,z-Fragmente entstehen. Dabei liegt das Maximum in der fünften Peptidbindung zwischen Histidin und Prolin (a_5 , b_5 und y_2). Die Fülle an Zerfallsprodukten aus dem Lasermassenspektrum ohne Helium ist im Lasermassenspektrum mit Helium nicht mehr vorhanden. Viele der dargestellten Fragmente haben große Verluste in ihrer Intensität (z.B. a_4 und b_4) oder sind nahezu ganz aus dem Spektrum verschwunden ($b_4\text{-NH}_2$). Schlussendlich zeigen nur zwei Fragmente einen Anstieg. Dabei handelt es sich um zwei muttermassennahe Fragmente, dem M-OH und

dem M-CH₂N.

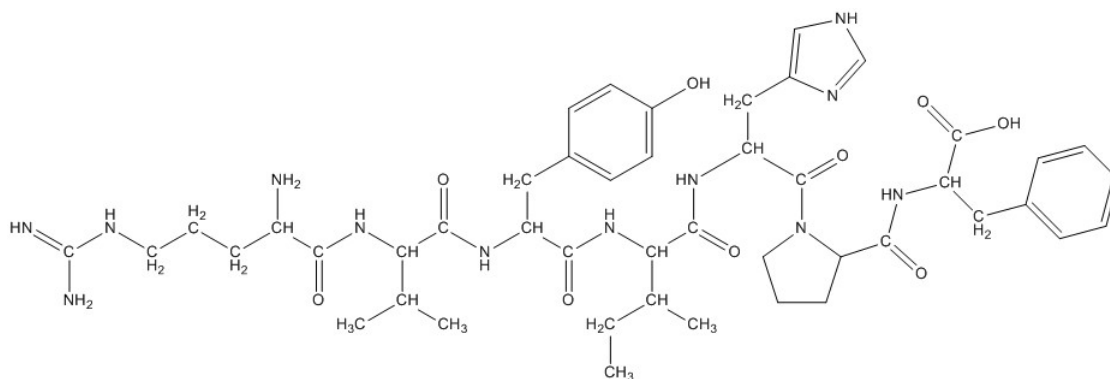


Abbildung 4.19: Struktur des Oligopeptids Angiotensin III mit der Aminosäuren Sequenz NH₂-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH (RVYIHPF). Hier bildet das Arginin den N-Terminus und das Phenylalanin den C-Terminus des Peptids.

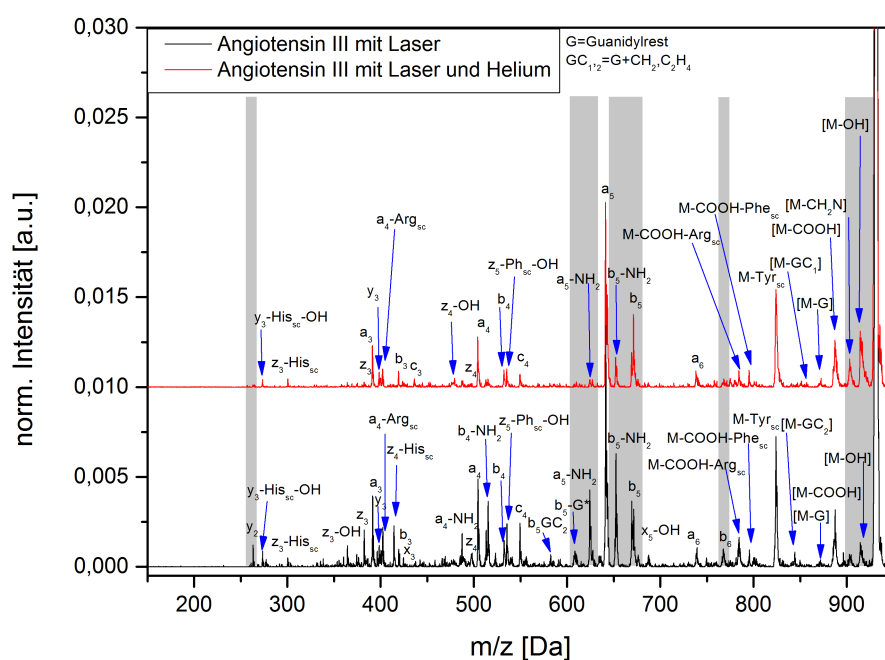


Abbildung 4.20: Vergleich der Lasermassenspektren von Angiotensin III mit (rot) und ohne (Helium). Die Laseranregung erfolgte mit der Wellenlänge 193 nm und einer Laserpulsenergie 2,2 mJ. Die Spektren wurden aufgrund der Vergleichbarkeit auf den Basispeak, der zugleich der Muttermassenpeak ist, normiert. Zudem wurde das rote Spektrum 0,02 auf der Y-Achse nach oben versetzt.

Das abschließende Experiment am Angiotensin III scheint im gewissen Maße den Erwartungen des experimentellen und methodischen Konzepts gerecht zu werden, zumindest wenn man die Intensität der einzelnen Fragmente genauer betrachtet. Die Spektren zeigen, dass viele Fragmente über einen sekundären Schritt gebildet worden sein müssen. Dies wird über das Gas-Lasermassenspektrum belegt. Leider zeigen sich keine starken Intensitätserhöhungen der Fragmente, sondern eher marginal. Es zeigen sich auch keine neuen, für die Sequenzanalyse wichtige Fragmente. Nur die trivialen Zerfallsprodukte M-OH und M-CH₂-N treten hervor. Bei den nicht normierten Spektren (vgl. Anhang) deutet sich an, dass die vielen Fragmente direkt aus der Muttermasse gebildet wurden, wie im *ladder*-Modell mit zusätzlicher Multikanalfragmentierung beschrieben (vgl. 2.4.3.1). Schaut man sich die relativen Intensität der Muttermassen an, so liegen diese im Massenspektrum und im Gas-Lasermassenspektrum bei ca. $6 \cdot 10^{-5}$ und im Lasermassenspektrum bei $4,7 \cdot 10^{-5}$, was die Interpretation unterstützt.

Resümiert man alle gezeigten Ergebnisse an Oligopeptiden aus den Laserexperimenten mit und ohne Helium-Quechning, so konnte zumindest qualitativ veranschaulicht werden, dass die Fragmentpattern der Lasermassenspektren eine Mischung aus primären und sekundären, vielleicht aus noch mehreren Fragmentierungsschritten bestehen. Der gezielte Einsatz eines Gaspulses während der Exposition des Lasers konnte Reaktionskanäle erfolgreich blockieren, sodass die Fragmentpattern in den Massenspektren deutlich verändert wurden. Manche dieser primär-sekundär Beziehungen ließen sich anhand der Spektren errahnen, viele hingegen jedoch nicht. Bezüglich einer Sequenzanalyse von Oligopeptiden kann das Kühlen von sekundären Fragmentierungen ein hilfreiches Werkzeug sein, aber es ist im jetzigen Status nur bedingt hilfreich. Vor allem da die Fragmentierung der Oligopeptide trotz der Multiphotonen-Anregung mit der Wellenlänge 193 nm nicht besonders stark ist. Ein weiteres Problem ist, dass bedingt durch den *cutoff* des Gerätes Fragmente des kleinen Massenbereichs verloren gehen können. Wie groß der Anteil von gequenchten Fragmenten aus diesen Massenbereich ist und durch das Quenchen von metastabilen Zerfällen mit Helium in den detektierbaren Massenbereich rutschen, lässt sich nur mutmaßen. Durch das Löschen von Überschussenergien können den Massenspektren neue Informationen entnommen werden. Insbesondere dann, wenn ein Fragment auftaucht, dass in einem reinen Laserexperiment nicht erhalten wird. Könnte man die sekundären Fragmentierung genau zu ordnen, könnte die Methode sogar Rückschlüsse auf die Reaktionsmechanismen geben.

4.2 CTD an Peptiden

Die hier verwendete Methode des CTD ist eine selten eingesetzte Methode zur Fragmentierung von Peptidkationen. Zur Erinnerung: Bei der CTD kann ein schnelles geladenes Ion (z.B. He^+) mit einer hohen Ionisierungsenergie - also vom Kation aus gesehen- einer hohen Rekombinationsenergie (Elektronenaffinität des Kations) aus dem angebotenen protonierten Peptid ein Elektron entnehmen. Bei diesem Ladungsübertrag (gilt nur für CT) kann es möglicherweise zu Resonanzeffekten kommen, die aus der Energieerhaltung der Elektronenenergie resultieren (die Masse des Elektrons ist zu klein um effizient Energie auf Kerne übertragen zu können). Es wird im protonierten Peptid so eine Radikalstelle erzeugt - bevorzugt weit entfernt vom Proton- die dann eine Fragmentierung induzieren kann (siehe Kapitel 2.4.4.4). Dies ist ein Grund, warum der alleinige Ladungsübertrag, also die Zunahme der Ladungszahl des Peptids, nach der Fragmentierung nicht mehr erkennbar ist. Zudem kann das Peptid aus energetischen Gründen die Radikalstelle auf Restgasmoleküle übertragen, wenn das Mutterion stabil ist. Die Thematik, die in diesen Abschnitt geklärt werden soll, behandelt die Frage inwiefern die Wechselwirkung der Edelgasionen mit den protonierten Peptiden aus einen *charge transfer* besteht und dann eine Fragmentierung auslösen. Zudem wird die Frage diskutiert, ob RRKM-Verhalten, unter Berücksichtigung der postulierten Mechanismen, vorliegt oder auch andere Faktoren, wie zum Beispiel die Bildung einer Radikalstelle und dessen Wanderung, die Reaktion beeinflussen können. Ein weiterer Faktor kann unter anderem das Ionisierungspotential des geladenen Peptids sein. Nimmt man protoniertes Substanz P mit einer Ionisierungsenergie von $10,7 \pm 0,5$ eV [BZ00] kann man auf dem ersten Blick erkennen, dass hier, im Falle des Heliumkations (24 eV), keine Resonanz vorliegen sollte. Der Wert des IP im Falle von Substanz P ergibt sich aus dem IP des neutralen Moleküls plus einem Beitrag der Coulombabstoßung (1,1 eV) [BTHZ02]. Dies würde bedeuten, dass das IP von 10,7 eV den Punkt beschreibt, an dem das Coulombpotenzial am Geringsten ist. Demnach sollte das Ionisierungspotenzial des geladenen Peptids steigen, je näher man der Ladung, also dem schon vorhandenen Proton, kommt. Die Abbildung 4.21 liefert eine grobe Abschätzung im Falle einer linearen Struktur. Je näher man der Ladung kommt desto mehr sollte die Coulombabstoßung zum IP beitragen. D.h. aus der Näherung und der empirischen Größe von 1,1 eV (Molekül liegt nicht linear vor) kann man schließen, dass es ein lokales IP gibt, welches deutlich höher liegt und an eine Resonanz zwischen Molekül und Atomion heran kommen könnte. Jedoch liefert die Abschätzung in Abbildung 4.21, dass der Effekt der Coulombabstoßung zum Ionisierungspotential des Peptids nicht sehr groß ist, sodass ein *charge transfer* auch in der Nähe der Ladung stattfinden könnte.

Weiterhin erwartet man, das die Struktur des Peptids einen Beitrag zur Höhe der lokalen IPs hat. Hier ergeben sich zwei Überlegungen:

- das Peptid ist aufgefallen (lineare Struktur) - niedrigere IPs im weiten Abstand zur Ladung
- das Peptid ist gefallen (Knäuel Struktur) - insgesamt höhere lokale IPs

Hieraus ergeben sich auch unterschiedliche Querschnitte für einen abstands-abhängigen CT. Hier lassen sich drei verschiedene Varianten zum abstands-abhängigen CT nach ihren Abstand aufsteigend nennen:

- die beteiligten Orbitale (Molekülorbital und Atomorbital vom Projektilion) durchdringen sich
- streifender oder naher Vorbeiflug mit minimalen Überlapp
- die beteiligten Orbitale durchdringen sich nicht

Ein weiterer Faktor ist das Projektilion. Dies geht neben sein IP auch mit seiner Größe, explizit mit seiner Größe der Elektronenhülle, ein.

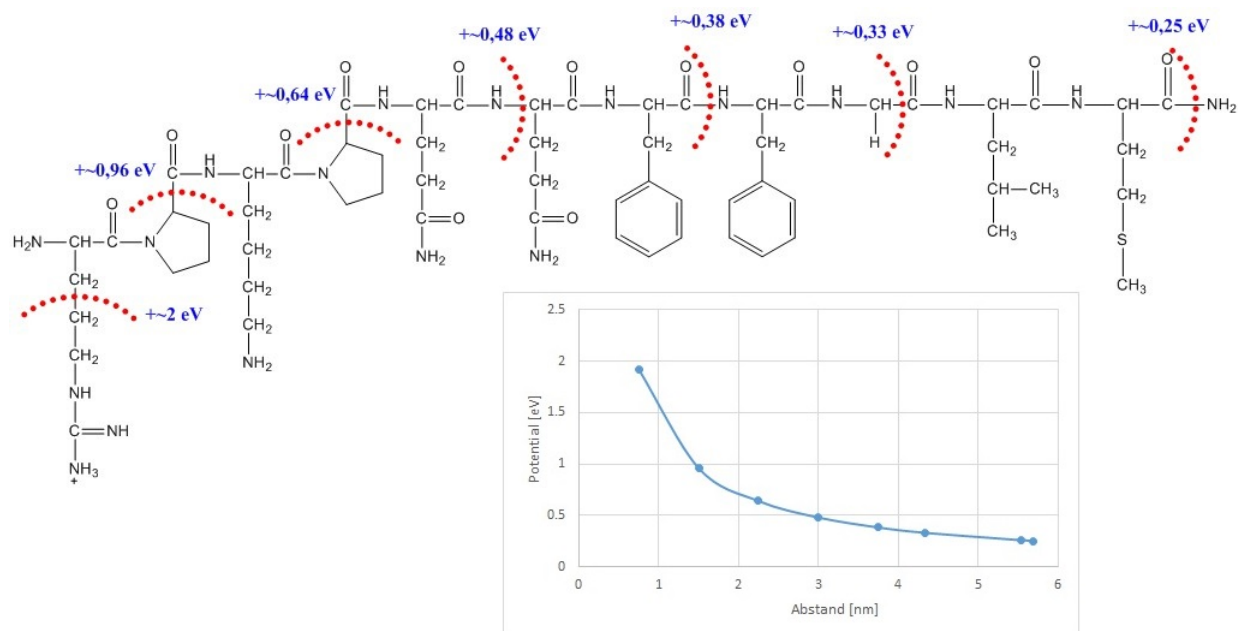


Abbildung 4.21: Abschätzung der Coulombabstoßung und der damit verbundenen IP-Änderung im gedachten linearen Molekül. Das Beispielmolekül Substanz P trägt die Ladung in der Seitenkette des Arginins. Bei Annahme einer linearen Struktur hat der C-Terminus dann den größten Abstand zur Ladung in der Guanydyl-Gruppe des Arginins (N-Terminus). Oben: Lineare Struktur des Moleküls mit eingezeichneten abgeschätzten Potenzialwerten der Coulombabstoßung (blau) der jeweiligen Bindungen (rot). Unten: Auftragung des lokalen Ionisationspotenzial gegen den Abstand der Ladung zu einer beliebigen Bindung. Man erwartet normalerweise, dass der Ladungstransfer vom Peptid zu Ion nicht in der Nähe des Protons stattfindet, jedoch zeigt die Abschätzung, dass die Änderung des IPs nicht zu groß ist, sodass der Ladungstransfer auch in der Nähe der Ladung stattfinden könnte.

4.2.0.1 CTD an positiv geladenen Peptiden

Das erste Experimente wurde an der Substanz P durchgeführt und wurde schon in ähnlicher Weise in der Arbeitsgruppe Jackson et al. durchgeführt [LJ17]. Dabei handelt es sich um ein Neuropeptid bestehend aus elf Aminosäuren mit einer Gesamtmasse von 1346 Da. Besonders an diesen Molekül ist, dass der C-Terminus nicht mit einer Carboxylgruppe abschließt sondern mit einer Amidgruppe. Gemäß den obigen Überlegungen nach sollte ein *charge transfers*-Prozess die Ladungszahl der Muttermasse um eins vergrößern. Dies würde ein klarer Beweis für die Existenz des CT-Mechanismus sein, der der Fragmentierung vorgelagert ist. Im Falle des zuerst untersuchten Peptids, der Substanz P, wurde neben der einfach geladenen Variante auch die zweifach geladene Muttermasse im primären

MS-Schritt selektiert und untersucht. Demnach sollte im Falle eines erfolgreichen CTs die Ladungserhöhung bei Substanz P von $[M+H]^+$ zu $[M+H]^{2+}$ und $[M+2H]^{2+}$ zu $[M+2H]^{3+}$ zu sehen sein.

Die nachfolgenden Spektren in den Abbildungen 4.22 und 4.23 sind die Ergebnisse der Experimente mit Substanz P zu sehen. Die Abbildung 4.22 zeigt das Ergebnis mit einfach positiv geladenen Molekül ($[M+H]^+$). Auf dem ersten Blick ist zu erkennen, dass die Fragment-Intensitäten der Peaks im roten Spektrum sehr gering sind und überhaupt nur eine geringe Zahl an Massenpeaks vorhanden ist. Die zwei intensivsten Signale lassen sich aber als zweifach geladene Spezies identifizieren. Zum Einen ist die zweifach geladene Muttermasse $[M+H]^{2+}$ vorhanden und zum Anderen das Fragment $[M+H]^{2+}$ -Phe_{sc}. Neben diesen beiden markanten Peaks sind noch zwei bestimmbare intensivere Signale vorhanden, das b₅-Fragment und das Fragment M-Arg_{sc}. Alle anderen Massenpeaks im roten Spektrum der Abbildung 4.22 weisen so eine zu kleine Intensität auf, dass sie vom Rauschen des Detektors kaum zu unterscheiden sind.

Die Bildung von $[M+H]^{2+}$ aus dem vorher selektierten einfach geladenen Peptid kann nur mit einem *charge transfer* erklärt werden. Das zweifach geladene Molekül, als Radikal, kann nur entstehen, wenn dem Molekül ein Elektron entzogen wird. Dies kann in diesem Fall nur durch das Edelgaskation He⁺ bewerkstelligt worden sein. Auch das zweifach geladene Fragment ($[M+H]^{2+}$ -Phe_{sc}) kann dann nur ein Produkt eines Elektronenübertrags vom Peptid auf das Edelgaskation sein. Der einzige Unterschied zwischen diesen doppelt geladenen Spezies ist, dass in einen Fall offensichtlich so viel Überschussenergie, die im Molekül zurückgeblieben sein muss sodass eine Bindung brechen konnte. Daraus könnte man folgern, dass in beiden Fällen jeweils Elektronen entfernt wurden, die unterschiedliche Niveaus besetzten. Diese These lässt sich nicht ohne weiteres auf die anderen beiden Fragmente (b₅ und M-Arg_{sc}) übertragen, da der Nachweis des doppeltgeladenen Mutterions als Vorläufer fehlt. Hierbei könnte es sich auch um das *electronic stopping* handeln, bei dem Energie durch Reibung frei wird und das Molekül zur Fragmentation zwingt.

Das Experiment am zweifach protonierten Substanz P ist in Abbildung 4.23 dargestellt. Es fällt sofort auf, dass aus dem M²⁺ ein M⁺ mit hoher Intensität entstanden ist (rotes Spektrum). Auch zeigen sich viele Fragmente mit einer höheren Intensität als im Spektrum der einfach geladenen Substanz P. Als einziges zweifach geladenes Fragment ist das a₈-Phe_{sc}²⁺ im Massenspektrum zu erkennen. Alle anderen Zerfallsprodukte sind nur einfach geladen. Dabei handelt es sich um Roepstorff-Fohlmann-Fragmente (z.B. z₂, y₆, y₈ und das a₈), um Fragmente mit Seitenkettenverlust (z.B. y₁₀-Lys_{sc}, a₇-Arg_{sc} und a₈-Arg_{sc}) und einem Innerketten dem FFG, welches anderes ausgedrückt auch als b₆-a₉ bezeichnet

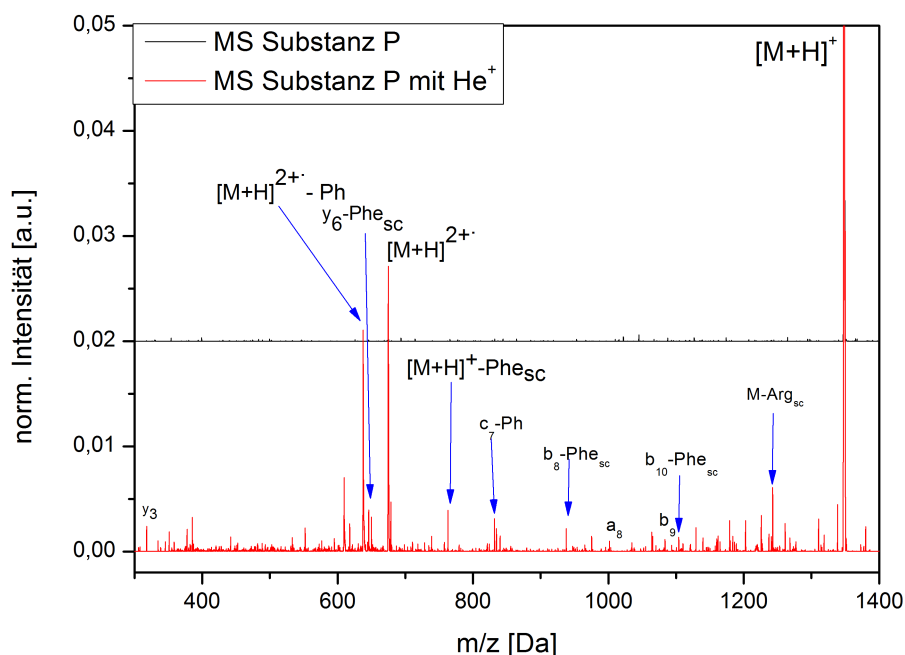


Abbildung 4.22: CTD-Massenspektrum vom einfach geladenen Substanz P. Die Spektren wurden jeweils auf den Basispeak, welcher in beiden Fällen auch die Muttermasse ist, normiert. In schwarz wird das normale Massenspektrum der vorher selektierten Substanz P gezeigt, das zu Vergleichszwecken um 0,02 auf der Y-Achse, sowie um 10 auf der x-Achse, verschoben wurde. Das rote Spektrum ist das CTD-Massenspektrum von der Substanz P. Erläuterungen siehe Text.

werden kann.

Das Experiment am zweifach geladenen Substanz P zeigt ein völlig anderes Bild als das Experiment am einfach geladenen Substanz P. Die Umladung bei einem *charge transfer* hätte eigentlich von 2+ auf 3+ stattfinden müssen. Stattdessen zeigt das Spektrum den gegenteiligen Fall. Demnach muss etwas anderes passiert sein. Das $[M+2H]^{2+}$ muss für eine Umladung zum einfach geladenen Molekül eine Elektron aufgenommen haben. Deshalb scheidet ein *charge transfer* via Edelgaskationen aus. Aber woher kommen die Elektronen? Hier lassen sich zwei Thesen aufstellen. Die schnellen Edelgasionen können aus der Oberfläche der Paulfalle Elektronen herausschlagen, die dann anlagern könnten. Das ist aber unwahrscheinlich, da am Ringe der Falle fast immer Spannung anliegt und dann die Elektronen vom Ring nicht in den Mittelpunkt der Falle gelangen würden. Wenn die Elektronen keine große kinetische Energie (nicht größer als 10 eV) besitzen, kann das Molekül Elektronen einfangen. Eine weitere These ist in der Literatur bekannt ([LJ17]). Befinden

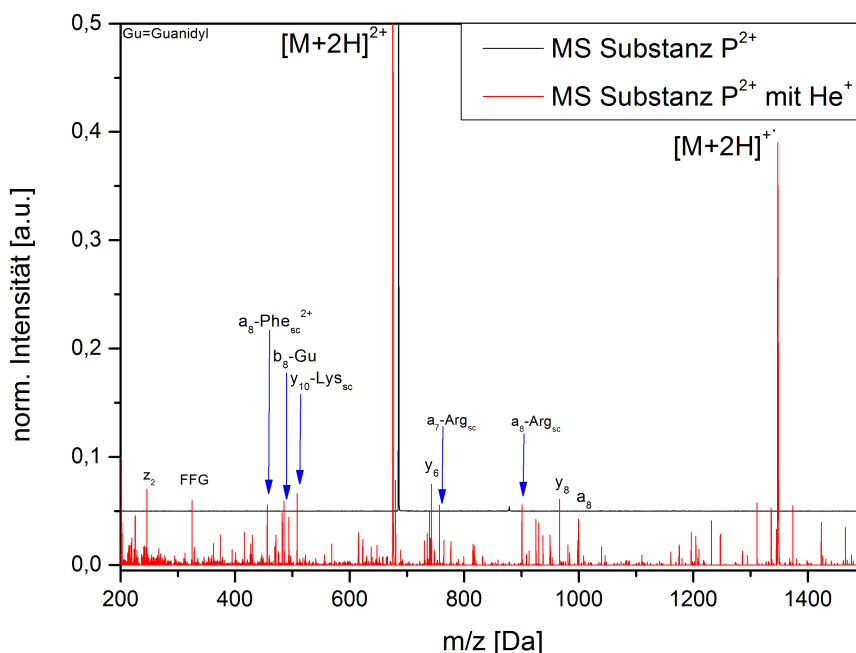


Abbildung 4.23: CTD-Massenspektrum vom zweifach geladenen Substanz P. Die Spektren wurden jeweils auf den Basispeak, auf das $[M+2H]^{2+}$, normiert. Das normale Massenspektrum des vorher massenselektierten zweifach geladenen Moleküls ist in schwarz aufgetragen und um 0,05 auf der Y-Achse, sowie um 10 auf der x-Achse, verschoben. Das rote Spektrum zeigt die Exposition von Substanz P ($[M+2H]^{2+}$) mit He^+ .

sich in der Falle Neutalmoleküle, sei es aus Pumpenöl oder aus vorherigen Versuchen (Amine), in größere Konzentration als das Zielmolekül, ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass die Neutalmoleküle die Elektronen aus These eins aufnehmen größer als beim Peptid. Das daraus resultierende Anionen kann dann sehr leicht sein Elektron auf das Zielmolekül übertragen und zur Ladungsreduktion beitragen, ähnlich der ETD. Welcher Mechanismus greift, ist vorerst nicht zu klären. Da auch für den Vorschlag aus der Literatur Zweifel bleiben. Aromaten werden das Elektron nur schwer aufnehmen und z.B. perfluorierte Kohlenwasserstoffe können Elektronen sehr gut aufnehmen, aber schwerlich wieder abgeben. Die anderen Fragmente im Spektrum lassen sich dadurch nicht genau erläutern, aus welchem Prozess sie genau entstanden sind. Sie können ein Produkt der CTD sein, welches eigentlich nur für das $a_8\text{-Phe}_{sc}^{2+}$ aufgrund der zweiten Ladung in Frage kommt. Ein *electronic stopping* könnte auch beteiligt sein. Aber viel wahrscheinlicher handelt es sich hier um eine Art der ETD. Dafür spricht deutlich die Ladungsreduktion der zweifachen

Muttermasse.

Um den ETD ähnlichen Effekt zu quantisieren wurde im folgenden ein Molekül gewählt, das eine größere Ladungszahl zulässt. Bei dem Molekül handelt es sich um das Cytochrom C (12327 Da). Das Cytochrom C kann schon als ein kleines Protein bezeichnet werden. Es besteht aus einer Kette von 104 Aminosäuren mit einer Hämgruppe als Co-faktor. Durch die hohe Zahl an Aminosäuren, kann das Molekül sowohl im positiven als auch im negativen große Ladungszahlen erreichen. In der Abbildung 4.24 ist das Ergebnis des Experimentes dargestellt. Das schwarze Spektrum zeigt den isolierten Massenspeak für $[M+13H]^{13+}$. Durch den Beschuss des Molekülions mit den Heliumionen wurde das rote Spektrum generiert. Dieses zeichnet sich im wesentlichen durch drei Massenpeaks aus. Der mittlere ist die zuvor isolierte Masse von $[M+13H]^{13+}$. Das linke Signal lässt sich als das $[M+13H]^{14+}$ identifizieren. Das rechte Signal neben der Muttermasse ist das $[M+13H]^{12+}$. Beim Versuch mit Cytochrom C und hoher Ladungszahl zeigen sich sowohl Anteile des CTD und Anteile an einer Reduktion der Ladungszahl. In diesen Setup scheint der CTD ein bisschen mehr zu überwiegen. Dennoch zeigt dieses Spektrum nahezu keine Fragmentierung, sodass sich der Wunsch nach einer effizienten Fragmentierung von sehr großen Peptiden mit CTD nicht erfüllt hat.

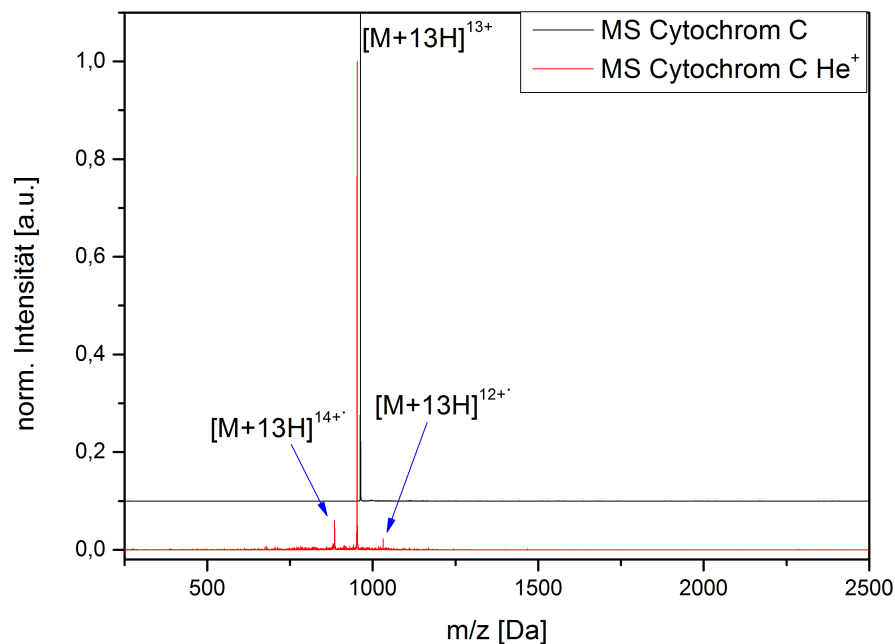


Abbildung 4.24: CTD-Spektrum vom dreizehnfach geladenen Cytochrom C. Die Spektren wurden jeweils auf den Basispeak, auf das $[M+13H]^{13+}$, normiert. Das normale Massenspektrum des dreizehnfachen geladenen Moleküls ist in schwarz aufgetragen und um 0,1 auf der Y-Achse, sowie um 10 auf der x-Achse verschoben. Das rote Spektrum zeigt die Exposition von Cytochrom C ($[M+13H]^{13+}$) mit He^+ .

Zusammenfassend über alle Spektren lässt sich resümieren, dass CTD von Peptiden zu schnellen Heliumionen möglich ist, aber ein nicht ganz geklärter Effekt (Ladungsreduzierung) mit dem CTD konkurriert. Zudem erscheint der CTD an positiv geladenen Peptiden zunächst nicht sehr Effizient, einzig allein an einfach geladenen Substanz P war der *charge transfer* erfolgreich, jedoch mit wenig Fragmentierung. Ein möglicher Erklärungsversuch für die geringe Effizienz könnte wiederum über das Restgas geführt werden. Ein erfolgreicher *charge transfer* vom Peptid auf das Helium ($M^{13} \rightarrow M^{14}$) könnte einen Ladungsübertrag vom Restgas auf das Peptid nach sich ziehen ($M^{14} \rightarrow M^{13}$).

4.2.0.2 CTD an negativ geladenen Peptiden

Aus den Ergebnissen aus den CTD-Experimenten mit positiven Peptidionen folgt, dass es bei großen Peptiden nur wenig Fragmente mit geringer Intensität gibt. Das kann an folgenden Gründen liegen:

- i) Einerseits wird bei überwiegenden CT offensichtlich nur relativ wenig Anregungsenergie übertragen und die Absenkung der Dissoziationsenergie durch das Einbringen der Radikalstelle, nicht dramatische Effekte auslöst.
- ii) Das Vorhandensein einer positiven Ladung auf dem Peptid (als Proton) ist sicher der Stoßwahrscheinlichkeit mit dem positiven Projektil nicht hilfreich.

Deshalb wurden die Experimente auch auf negativ geladene Peptide ausgeweitet. Im ESI sind die negativen Ladungen in den Molekülen durch eine Deprotonierung der Moleküle entstanden. Man beachte, dass nach einem Elektronentransfer vom negativen geladenen Molekül zum atomaren Ion wieder eine Radikalstelle also eine Sollbruchstelle entsteht. Zudem sollte dabei eine Ladungsreduktion der negativen Moleküle stattfinden. Es macht deshalb nur Sinn mindestens doppelt negativ geladene Moleküle zu untersuchen. Als erstes wird wiederum Cytochrom C als Probe gewählt. Diesmal wurde nicht explizit eine Masse isoliert sondern ein ganzes Ladungsspektrum zwischen 500 und 2500 Da aufgenommen. In der Abbildung 4.25 sind drei CTD-Massenspektren enthalten. Man erkennt jeweils die m/z -Verhältnisse von M^{-14} bis M^{-7} in den drei Spektren. In schwarz aufgetragen ist das normale Spektrum. Hier liegt der intensivste Peak bei M^{-11} . Betrachtet man nun das rote Spektrum, welches mit einer Exposition mit 2 kV schnellen Heliumionen aufgenommen wurde, zeigen sich Unterschiede zum schwarzen Spektrum. Die ersten vier Peaks (M^{-14} bis M^{-11}) verlieren an Intensität. Der Peak bei M^{-10} gewinnt hingegen deutlich an Intensität und ist im roten Spektrum auch der Intensivste. Die nachfolgenden Massenpeaks (M^{-9} und M^{-8}) gewinnen zudem ebenfalls leicht an Höhe. Wird die Geschwindigkeit der Heliumionen um 1 kV auf 3 kV gesteigert, erhält man das blaue Spektrum in Abbildung 4.25. Der Unterschied zum schwarzen Spektrum ist ersichtlich und zeigt das gleiche Verhalten wie bei der Unterscheidung zwischen dem schwarzen und roten Spektrum. Unterschiede zwischen dem Spektrum mit 2 kV He^+ und 3 kV He^+ zeigen sich erst ab M^{-9} . Hier steigt die Intensität der Massenpeaks M^{-9} , M^{-8} und M^{-7} an. Und da dieser Unterschied marginal ist, scheint der CT vom deprotonierten Peptid zum positiven Projektilen nahe zu unabhängig von der Projektilionenenergie zu sein.

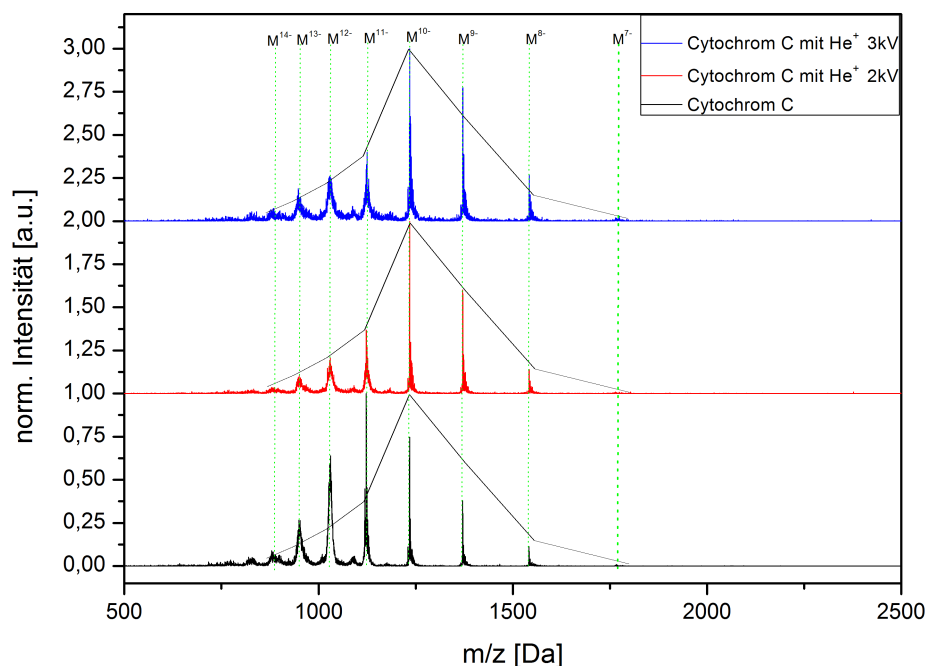


Abbildung 4.25: CTD-Massenspektren vom mehrfach negativ geladenen Cytochrom C-Ionen. Die Spektren wurden jeweils auf den Basispeak normiert. Das Massenspektrum der mehrfach geladenen Moleküle ohne Wechselwirkung ist in schwarz aufgetragen. Spektren mit 2kV Helumionen-Beschuß wurde in rot aufgetragen. Schließlich in blau die Wechselwirkung von Cytochrom C mit 3 kV Helumionen. Offensichtlich ist die im hohen Energiebereich die Energie der Ionen für den Prozess von geringerer Bedeutung. In jedem Spektrum erkennt man die m/z -Verhältnisse von M^{-14} bis M^{-7} . Der Transfer von Elektronen zur den positiveren Ionen ist deutlich beobachtbar.

Das CTD-Experiment an negativ geladenen Cytochrom C (Abbildung 4.25) zeigt vor allem, dass die Umladung zu kleineren m/z -Verhältnissen sehr gut funktioniert. Dies bestätigt genau die Erwartungen, dass es viel leichter sein sollte einen positiven Ladungsträger (atomares Stoßion) näher an ein negativ geladenes als an ein ebenfalls positiv geladenes Molekül heranzuführen. Die Ladungskomplementarität begünstigt somit den *charge transfer*. Zudem wird durch die negative Ladung des Moleküls verhindert, dass etwaige in der Falle parasitär entstehende Elektronen vom Peptid aufgenommen werden. Der Versuch zeigt auch wie effizient die positiven Edelgasionen mit den negativen Zielmolekülen wechselwirken. Es reicht dabei aus die Spannung für die Beschleunigung der Edelgasionen nicht zu hoch zu wählen, da eine höhere Spannung sich kaum auf das Pattern im Massenspektrum auswirkt. Zu schnelle Ionen würden sich hier vermutlich auch nicht so stark ablenken lassen, so dass die Chance steigt, dass sie nur vorbeifliegen. Diese Art

des *charge transfers* in diesem Experiment mit negativ geladenem Cytochrom C niederschlägt führt offensichtlich für dieses große Molekül (Zahl der Atome 1000) nicht zur Fragmentierung. Die Intensität von möglichen Fragmenten in den Massenspektren und liegen in der Größenordnung des Untergrunds. Da es sich um ein sehr großes Molekül handelt, reicht die eingebrachte Energie offensichtlich nicht aus, um den RRKM-Effekt zu überwinden. Die sich nun stellende Frage ist, ob CTD mit negativen Peptiden für kleinere Peptide als Cytochrom C erfolgreich ist. Um zu testen ob eine Fragmentierung via CTD an negativen Molekülen möglich und effizient ist, werden im Folgenden zwei weitere Peptide untersucht, die in ihrer Kettenlänge deutlich kürzer sind und deren Stabilität, bedingt durch RRKM, wesentlich geringer ist. Den Anfang macht das Angiotensin II. Das Angiotensin II (1046 Da) ist ein Oktapeptid mit der Sequenz $\text{NH}_2\text{-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-COOH}$ (DRVYIHPF). Da durch einen *charge transfer* eine Ladungsreduktion um eine Elementarladung am negativen Molekül zu erwarten ist, muss das zweifach negative geladene Peptid untersucht werden. So bleibt auch nach dem CT eine negative Ladung auf dem Molekül zurück, sodass es im Massenspektrum nachweisbar bleibt. Neben der Ladungsreduktion sollen nun durch das CTD nun auch Fragmente entstehen.

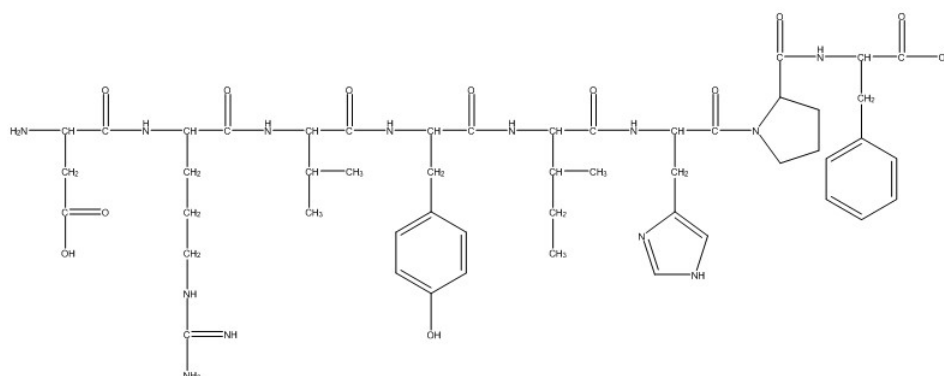


Abbildung 4.26: Struktur des Oktapetids $\text{NH}_2\text{-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-COOH}$ (DRVYIHPF). Hier bildet die Asparginsäure den N-Terminus und das Phenylalanin den C-Terminus des Peptids.

Das Ergebnis dieses CTD-Experiments an zweifach negativ geladenen Angiotensin II ist in Abbildung 4.27 dargestellt. Das Massenpektrum erscheint sehr aufgeräumt, d.h. es sind wenige Fragmente mit eher geringer Intensität zu sehen. Als intensivstes Produkt der CTD mit circa vier Prozent entsteht die zu erwartende Ladungsreduktion zum $[M-2H]^-$ aus der isolierten Muttermasse $[M-2H]^{2-}$. Die Intensitäten aller anderen Fragmentpeaks betragen je etwa ein Prozent des Mutterions, sowohl links als auch rechts des Muttermassenpeaks $[M-2H]^{2-}$. Es liegen auch überwiegend große Fragmente allen voran der sechsten

(a_6 -imidazol, a_6 und b_6) und siebten Peptidbindung (b_7 -NH₂ und c_7) vor. Desweiteren zeigen sich nur noch zwei Fragmente mit nennenswerter Intensität das y_3 -imidazol und das c_4 -Phe_{sc} links von der isolierten Muttermasse.

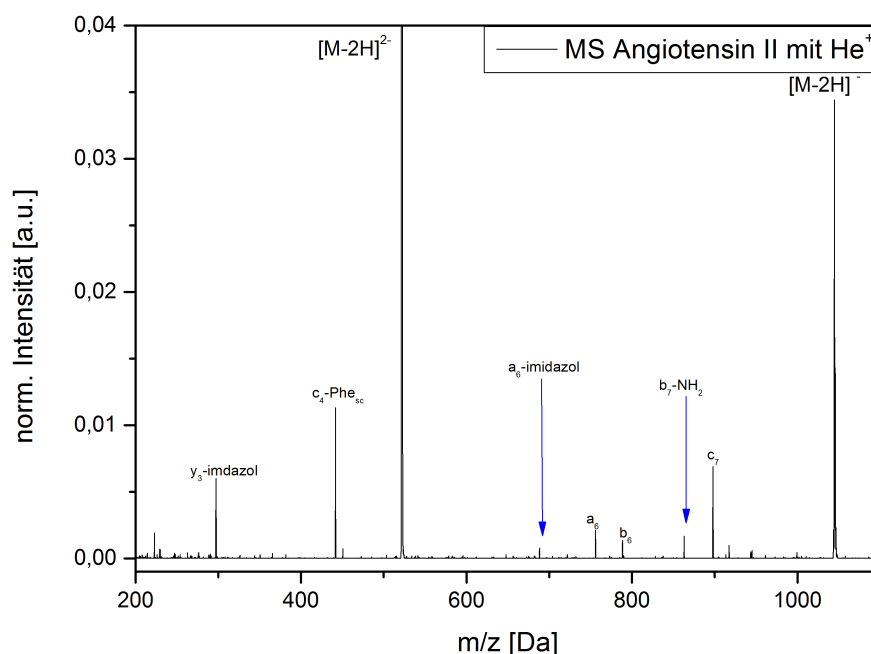


Abbildung 4.27: CTD-Spektrum vom negativ geladenen Angiotensin II. Das Spektrum wurde auf den Basispeak, auf $[M-2H]^{2-}$, normiert.

Der Versuch der CTD an negativen geladenen Peptiden, hier explizit das Angiotensin II, verdeutlicht die Machbarkeit dieses Experimentes. Das deutlichste Anzeichen eines *charge transfers* wird durch die Bildung der ladungsreduzierten Spezies ($[M-2H]^{-}$) bewiesen. Die Fragmentierung der Substanz muss folglich auch über die CTD verlaufen sein. Erstens weil eine Fragmentierung durch Aufnahme eines Elektrons ausgeschlossen werden kann und zweitens eine Fragmentierung durch *electronic stopping* eher kleinere Fragmente begünstigen würde. Da rechtfertigt auch, dass man im Experiment des CTD an positiven Peptiden angenommen hat, dass *electronic stopping* nur eine untergeordnete Rolle spielt. Dies ist nicht der Fall, da im Gegenteil relativ große Fragmente entstehen. Die großen Fragmente wie das a_6 und das b_6 könnten ein Produkt des Prolin-Effekts sein. Die Frage, die offen bleibt, ist die geringe Intensität des Fragmentpatterns ein Produkt von RRKM-Verhalten oder ist der Effekt des CTD generell ineffizient. Es kann auch ein Zusammenspiel beider Szenarien zum beobachteten Ergebnis führen.

Das letzte Probenmolekül soll nun klären inwieweit oben genannte Hypothese zutreffend ist. Dazu wurde ein Peptid gewählt, dass von der Aminosäureanzahl etwas größer ist. Dabei handelt es sich um das Dekapeptid mit der Sequenz $\text{NH}_2\text{-Arg-Ile-Asn-Ala-Glu-Ile-Ile-Lys-Asp-Ile-COOH}$ (RINAEIIKDI) mit einer Gesamtmasse von 1183 Da. Durch die größere Anzahl an Bindungen, und damit an Schwingungen, sollte das RRKM-Verhalten deutlicher zum tragen kommen. D.h. es sollten weniger, oder zumindest weniger intensiv, Fragmentpeaks auftreten. Bedingt durch die zu erwartende Ladungsreduktion musste auch diese Substanz bei einem höherem Ladungszustand (hier zweifach negativ) vermessen werden. In Abbildung 4.29 ist das Ergebnis zu diesem Experiment aufgetragen. Zu erkennen

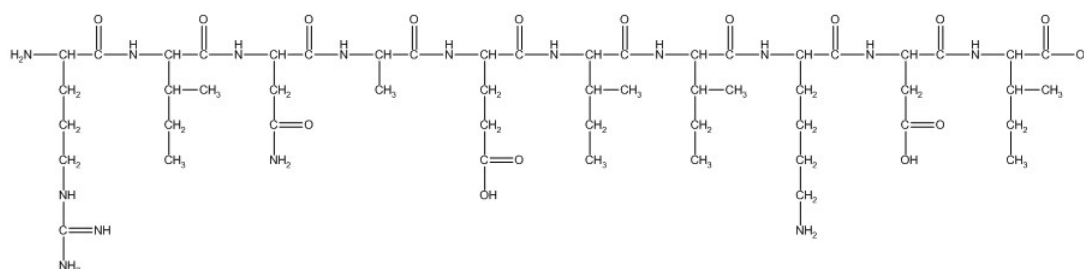


Abbildung 4.28: Sequenz und schematische Struktur des Dekapeptids $\text{NH}_2\text{-Arg-Ile-Asn-Ala-Glu-Ile-Ile-Lys-Asp-Ile-COOH}$ (RINAEIIKDI). Hier bildet die Arginin den N-Terminus und das Isoleucin den C-Terminus des Peptids.

ist, wie auch beim Angiotensin II, eher ein überschaubares Fragmentpattern. Die resultierende Fragmentierung weist eine geringe Intensität auf, deren größter Massenpeak ein Innerkettenfragment (AE) mit etwa 1,7 % ist. Man stellt aber auch fest, dass die Fragmentintensitäten größer sind als die Ladungsreduktion ($[\text{M}-2\text{H}]^-$), die am rechten Rand des Spektrum gerade noch zu erahnen ist. Das Spektrum zeigt vor allem große Fragmente (z.B. z_7 , c_8 und x_9) und Fragmente bei denen die Lysinseitenkette bevorzugt abgespalten wird ($z_6\text{-Lys}_{sc}\text{-OH}$ und $b_8\text{-Lys}_{sc}$). Der linke Teil des Spektrums zeigt neben den Innerkettenfragment AE zudem ein Fragment, welches nur aus der Glutaminsäure (E) besteht. Die interessanteste Auffälligkeit des Spektrums liefert aber das doppelt geladene Fragment von y_2 , da die Ladungen auf diesem Fragment recht nah zusammen stehen müssten.

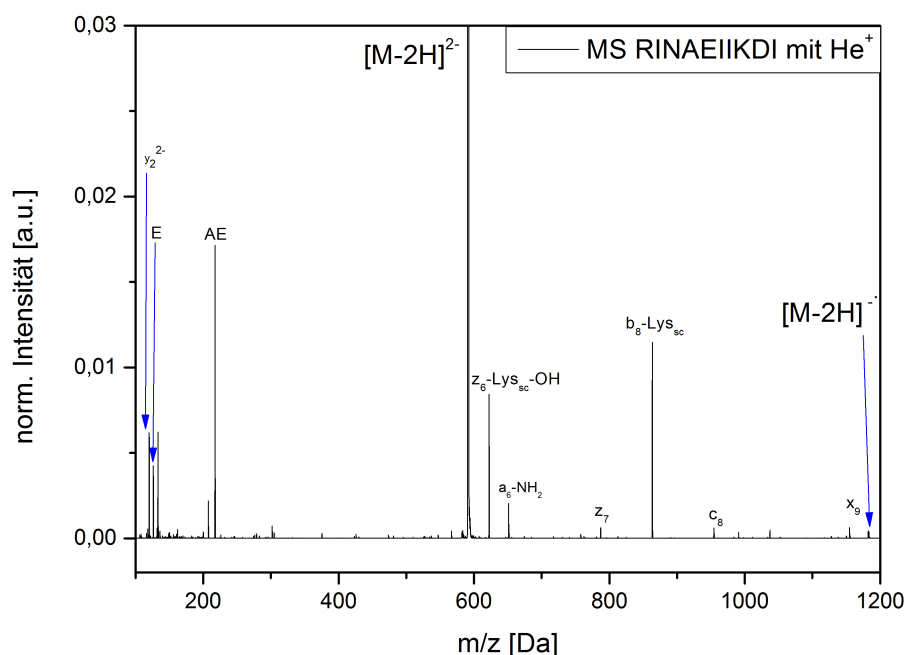


Abbildung 4.29: CTD-Spektrum vom zweifach negativ geladenen RINAEIIKDI. Das Spektrum wurde auf den Basispeak, auf $[M-2H]^{2-}$, normiert.

Leider bleiben die zuvor gestellten Fragen offen. Den Erwartungen entsprechend hätte die Intensität der ladungsreduzierten Spezies, das $[M-2H]^-$, im Vergleich zu den Fragmenten höher sein müssen, wenn man das Reaktionsverhalten von Angiotensin II zu Grunde legt. Letzter Punkt zeigt, dass der *charge transfer* sehr viel Energie in das Molekül einbringt und so offensichtlich nach dem CT gleich weiterfragmentiert wird. Als Kontrapunkt hierzu stehen aber die etwas größeren Fragmente im Massenbereich 600 - 1200 Da. Zur Erinnerung: wenn man davon ausgeht, dass der Mechanismus des *electronic stopping* greift, hätte dies kleine Fragmente zu Folge gehabt. Die Experimente an negativen Molekülionen mit schnellen atomaren Ionen zeigen, dass es über CT mehrheitlich zur Dissoziation und zur Ladungsreduktion der Muttermasse kommt. Es werden vor allem große Fragmente gebildet. Weiterhin konnte hier definitiv eine Beteiligung von Elektronen via ECD ausgeschlossen werden, da die Anlagerung von niederenergetischen Elektronen an negativ Peptidionen quasi unmöglich ist.

Zusammenfassend betrachtet zeigen die Versuche zur CTD an Peptiden kein klares Bild. Die Ergebnisse im positiv Modus des Massenspektrometers zeigen qualitativ, dass der *charge transfer* funktioniert, dies aber nur mit überschaubarem Erfolg. Zudem konnte ein schwerwiegender Effekt beobachtet werden. Bei den Spektren (Substanz P im positiv Modus) kann nicht vollends ausgeschlossen werden, dass Streu-Elektronen für die Ladungsreduktion das Fragmentpattern verantwortlich sind. Dies wird auch durch das Experiment mit dem Protein Cytochrom C gestützt. Hier konnte zeitgleich sowohl ein CT-Produkt als auch eine Ladungsreduktion beobachtet werden. Um diesen Elektronen basierenden Mechanismus zu umgehen, wurden weitere Versuche im negativ Modus durchgeführt. Das durchgeführte Experiment an Cytochrom C zeigt hier die zu erwartende Ladungsreduktion via *charge transfer*. Dennoch geben die weiteren Experimente an Angiotensin II und RINAEIIKDI weitere Rätsel auf. Die CTD ist scheinbar am Fragmentpattern beteiligt, dennoch ist die Ausbeute an den Produkten ausbaufähig. Ob dies ein Effekt nach der RRKM-Theorie ist oder aber einfach der CTD ineffizient ist, lässt sich anhand der Spektren nicht deutlich klären.

4.3 Elektronen Transfer Ionisation/Dissociation (ETI/D) an organischen Molekülen

Ausgehend von den Ergebnissen der CTD an Peptiden von positiven Molekülen, bei welchen der CT-Mechanismus an den neutralen Stellen des Peptidions ablaufen muss, stellt sich die Frage, welche Wechselwirkung sind zwischen neutralen Molekülen und schnellen Projektilionen zu erwarten. Das erste Problem, das gelöst werden musste, ist die Substanzklasse. Peptide scheiden aufgrund ihrer thermischen Instabilität aus. Zudem kann diese Substanzklasse nicht neutral im ESI-MS zu Verfügung gestellt werden. Daher musste ein neues Massenspektrometer aufgebaut werden, das es ermöglicht neutrale Moleküle in die Gasphase und in hoher Dichte in die Ionenquelle zu überführen, diese mit den Projektilionen wechselwirken zu lassen und schließlich massenspektrometrisch darzustellen (vgl. Kapitel 3.2 und Folgende). Die Wahl der Substanzen fiel auf kleine organische Moleküle, die sehr wohl thermisch als Neutrale in die Gasphase überführt werden können. Untersucht wurden neben rein aromatischen Systemen auch Mischsysteme aus einem aromatischen Teil und einem aliphatischen Teil, z.B. n-Hexylbenzol und n-Butylbenzol. Um einen Abschluss zu bilden wurde zudem ein zyklischer Aliphate, das Cyclohexan, untersucht. In diesem Abschnitt werden nun die Ergebnisse der ETI/D vorgestellt. Zu leichter Orientierung werden die Ergebnisse an den untersuchten Moleküle erst einzeln vorgestellt und abschließend erst im Vergleich diskutiert. Wie eingehend bei der CTD diskutiert, können auch für ETI/D ähnliche Argumente wie bei der CTD aufgeführt werden. Unterschied ist einzig, dass die Coulombabstoßung fehlt und das IP somit nicht stark ortsabhängig ist. Die folgenden Experimente werden mit unterschiedlichen Projektilionen durchgeführt, um den Einfluss des jeweiligen ionischen Akzeptors genauer zu studieren. Alle Projektilionen besitzen ein höheres IP als die Zielsubstanzen, daher könnte man annehmen, dass ein Resonanzeffekt evtl. von vornherein ausschließen ist. Jedoch können Elektronen auch aus anderen Molekülorbitalen als den HOMO transportiert werden: z.B. aus einem tieferen Molekülorbital. Insbesondere taucht die Frage auf inwieweit es Resonanzeffekte zu einem der Ionisationsenergie des Projektils isoenergetischen MO des neutralen Moleküls gibt. Ein solcher resonanter CT würde das Molekül mit einer definierten inneren Energie zurückklassen. Dies müsste sich in einer entsprechenden möglicherweise selektiven Fragmentierung beobachten lassen. Es sei von vornherein gesagt, dass die folgenden Ergebnisse keine Rückschlüsse auf den absoluten ETI/D-Querschnitt der jeweiligen Substanz geben können. Der Ionenstrom der Projektilionen wurde konstant gehalten, aber es stand keine Messmethode zu Verfügung um die Neutralteilchenanzahl zu messen. So sind die Gesamtintensitäten

qualitativ zu betrachten und nur die relativen Verhältnisse aus Fragmentationen zu Mutterionen zu diskutieren.

Das folgende Kapitel versucht die Frage zu beantworten: inwieweit der *electronic stopping*-Prozess an den Massenspektren beteiligt ist. Dazu wurde eine Abschätzung gemacht, die den Impulsübertrag der Projektionen auf das neutrale Molekül wiedergeben soll und welche Konsequenz sich daraus ergibt.

Von vornherein sei darauf hingewiesen, dass es neben dem resonanten *charge transfer* und dem *electronic stopping*, Hinweise auf einen dritten Mechanismus gibt. Da das folgende Kapitel (Kap. 4.3.1) aufzeigt, dass der *electronic stopping*-Mechanismus eher unwahrscheinlich ist und eher eine untergeordnete Rolle spielt, lässt z.B. das Spektrum des Cyclohexan mit Xenon aufgrund seiner starken Fragmentierung dies vermuten. Nun stellt man sich die Frage: warum? Ruft man sich aus Kapitel 2.4.4.5 in Erinnerung, dass es für einen CT unterschiedliche Reichweiten gibt (vgl. Abbildung 2.17), so kann man behaupten, dass der resonante CT und das *electronic stopping* zwei extreme Betrachtungen sind. Daher trägt ein streifender Stoß des Projektilions auch eine Berechtigung. Durch so einen streifenden Stoß des Projektils mit dem neutralen Molekül werden die Molekülorbitale des Moleküls stark beeinflusst. So kann es sein, dass das HOMO des Moleküls über das LUMO angehoben wird und das Molekül in einen angeregten Zustand zurück lässt. Dies konnte unter anderen in einem Versuch von Kimura et al. gezeigt werden [Kim85]. Da dieser Prozess mit einem enormen Energieeintrag in das Molekül einhergeht, lässt sich im Falle des Cyclohexan die starke Fragmentierung erklären.

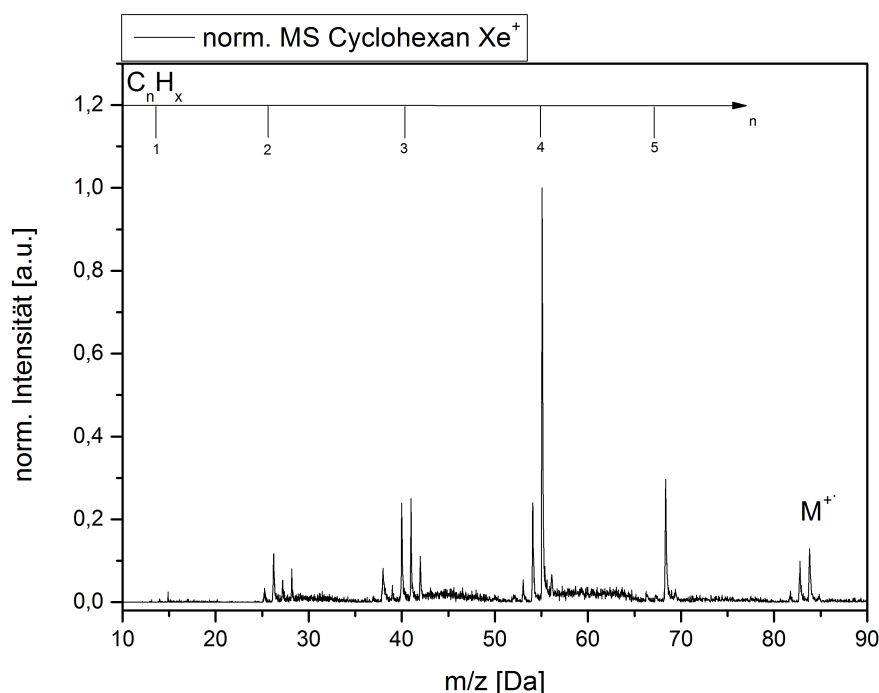


Abbildung 4.30: ETI/D-Spektrum von Cyclohexan, generiert mit Xenon. Das Spektrum zeigt eine starke Fragmentierung, die nicht mit dem *electronic stopping*-Prozess allein zu erklären ist.

4.3.1 Beteiligung des *electronic stopping*-Mechanismus?

Eine Frage die vorab geklärt werden soll ist: ist der Mechanismus des *electronic stopping* in den Untersuchungen zur ETD/I zu erwarten oder spricht etwas dagegen. Die Besonderheit des Aufbaus der Apparatur könnte eine Abschätzung darüber liefern, inwieweit das *electronic stopping* zu den jeweiligen Experimenten beiträgt. Da die Flugachse der Projektilen senkrecht zu Flugachse der Ionenflugrichtung ist, muss im Falle des *electronic stopping*-Mechanismus (also nahezu zentraler Stoß) ein Impulsübertrag von den schnellen Gasionen auf das Molekül-Target und wegen des Impulserhaltungssatzes berücksichtigt werden. Das Verhältnis der Quergeschwindigkeit und zu Fluggeschwindigkeit (bei ca. 850 eV Beschleunigungsenergie der Molekülionen) darf bei der hier verwendeten Apparatur (Flugstrecke von 450 cm und einem Detektorradius von 2 cm) maximal 0,5 Prozent betragen. Bestimmt man den maximalen möglichen Impulsübertrag von Gasionen auf das neutral Molekül ergeben sich Werte (vgl. Tab. 4.1), die eine Beteiligung von Fragmenten aus dem *electronic stopping*-Mechanismus an den Massenspektren nahezu ausschließen. Selbst beim Wasserstoffmolekülion resultieren Abweichungen von 18,57 % bis 39,29 % bei

einem maximalen Impulsübertrag durch einem zentralen Stoß. Es sei aber zu berücksichtigen, dass der zentrale Stoß weniger häufig ist als streifende Stöße. Selbst die Mehrheit der streifenden Stöße führen üblich dennoch zu einer höheren Seitenabweichung im Massenspektrometer von mehr als 0,5 % wie für die Detektion möglich. Ruft man sich in Erinnerung, dass diese Werte nur für den Extremfall gelten, kann eine Beteiligung dieses Mechanismus nicht zu 100 % ausgeschlossen werden. Sie geben aber eine gute Orientierung wie wahrscheinlich es ist, Fragmentierungsprodukte vom Mechanismus im Spektrum zu sehen.

Ein vorausschauender Blick auf das Massenspektrum des Toluols, welches mit Xenon

Tabelle 4.1: maximale prozentuale Abweichung ($\frac{\Delta x}{L}$ (Δx Seitenabweichung zu Flugstrecke L)) für einen Impulsübertrag bei einem zentralen Stoß

	%tuale Abweichung				
	H ₂ ⁺	He ⁺	N ₂ ⁺	Ar ⁺	Xe ⁺
Ethanol	39,29	55,37	146,49	174,94	317,14
Toluol	27,78	39,15	103,58	123,70	224,25
Mesitylen	24,32	34,28	90,69	108,30	196,35
Anthracen	19,97	28,15	74,48	88,94	161,24
Diphenylbutadien	18,57	26,17	69,23	86,76	149,79
n-Butylbenzol	23,02	32,44	85,82	102,49	185,80
n-Hexylbenzol	20,93	29,50	78,05	93,21	168,98
Cyclohexan	29,06	40,96	108,36	129,41	234,60

generiert wurde (vgl. Abbildung 4.31), unterstützt die These, dass der *electronic stopping*-Prozess nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die Fragmentierung des Toluols ist hier sehr schwach und zeigt überwiegend das Mutterion und das Tropyliumion.

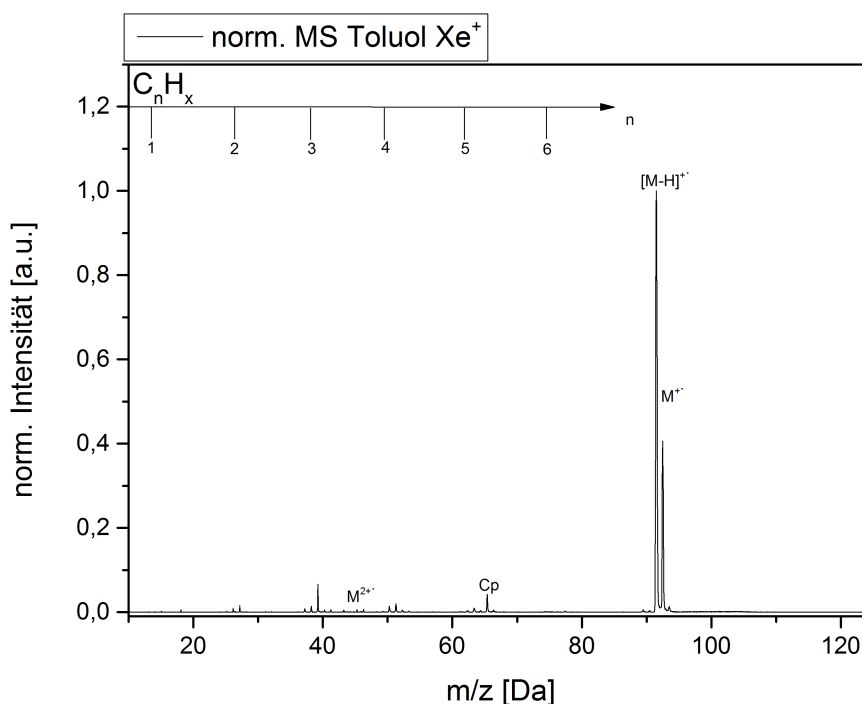


Abbildung 4.31: ETI/D-Spektrum von Toluol, generiert mit Xenon. Da Xenon das größte Atom dieser Messreihe ist, sollte dementsprechend die Wirksamkeit des *electronic stopping* auch hier am größten sein. Das Spektrum zeigt aber wenig Fragmentierung, speziell im kleinen Massenbereich, wo erwartungsgemäß die Fragmente des *electronic stopping* intensiv erscheinen sollten.

4.3.2 Ethanol

Das Ethanol (46 Da) stellt das kleinste untersuchte Molekül dar und besitzt mit 10,48 eV das größte erste Ionisierungspotential aller der in diesen Kapitel untersuchten Substanzen. Die Massenspektren von Ethanol ionisiert durch CT mit Ar^+ , He^+ , Xe^+ , H_2^+ und N_2^+ sind in den Abbildungen 4.32 bis 4.36 gezeigt. Betrachtet man die Spektren nähergehend zeigen sich optisch nur geringe Unterschiede zwischen gebildeter Muttermasse und gebildeten Fragmenten. Alle folgen dem selben Muster und bilden vier Segmente. Ganz links in den Spektren findet man das Fragmentpattern zu CH_x , rechts davon liegt das OH-Kation. Im mittleren Bereich der Spektren ist das Pattern zu C_2H_x und CH_xOH_y zu finden. Ganz rechts im Spektren befindet sich die Muttermasse des Ethanols mit seinen H-Loss-Fragmenten. Die Exposition mit den Projektilionen von Helium, Argon, Stickstoff, Wasserstoff und Xenon zeigt nur ein sehr kleines Mutterion, aber starke H und 2H Abspaltung vom Mutterion und zwei weitere unterschiedliche Fragmentierungsmuster für die

Primärionen. Zum einen erfolgt die Abspaltung von einer C_1H_x -Einheit, die bevorzugt bei CT mit Ar-, N_2 - und H_2 -Projektilen einhergeht. Zum anderen zeigt sich eine Abspaltung der Hydroxygruppe (OH) mit Xe- und He-Projektilen. Des weiteren zeigen sich H-Loss-Fragmente (wie $[M-H]^{+\cdot}$ und $[M-2H]^{+\cdot}$) sowie C_1H_x -Fragmente in allen Spektren von Ethanol.

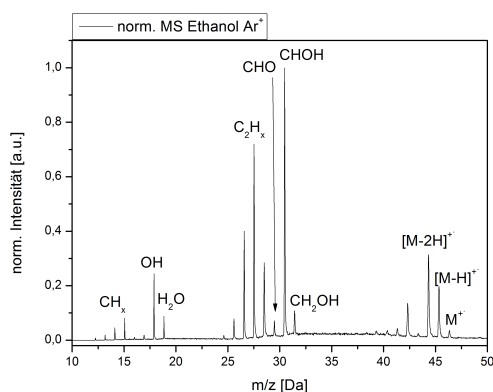


Abbildung 4.32

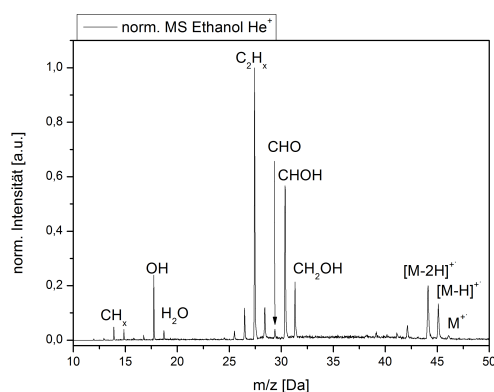


Abbildung 4.33

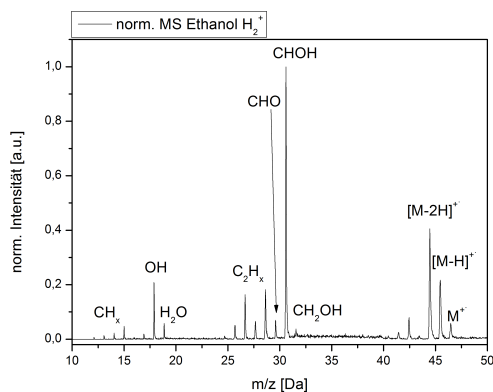


Abbildung 4.34

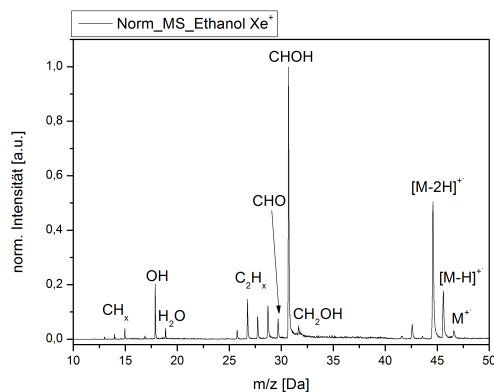


Abbildung 4.35

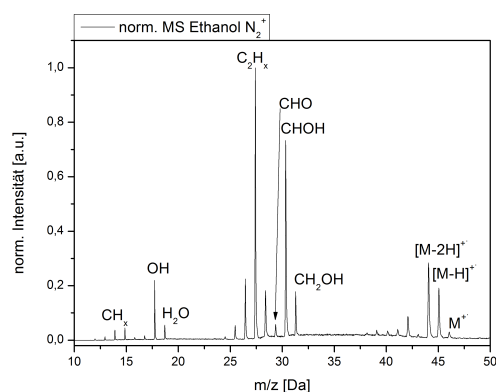


Abbildung 4.36

Die Abbildungen zeigen die normierten Massenspektren von Ethanol, die mit unterschiedlichen Projektilionen (H_2^+ , N_2^+ , He^+ , Xe^+ und Ar^+) aufgenommen wurden. Bei den Massenspektren wurde immer auf den Basispeak normiert.

Ein Frage ist, ob nun *charge transfer* oder aber *electronic stopping* vorliegt? Ruft man sich in Erinnerung, dass die maximale Energie, die frei werden könnte, dem Ionisierungspotential des Projektils minus der Ionisierungsenergie des Moleküls entspricht (Resonanzeffekt), erscheint es im ersten Moment unwahrscheinlich, dass man eine Fragmentierung bis hin zum CH_x -Fragment zu beobachten kann. Nimmt man hingegen ein EMS-Spektrum von Ning et al. hinzu, erkennt man die verschiedenen Ionisierungspotentiale des Ethanol [NLH⁺08]. Der Vergleich mit den Rekombinationsenergien der Projektilionen und den Bindungsenergien zeigt eindeutig eine Übereinstimmung. So ist der *charge transfer* eines Elektrons vom neutralen Ethanol auf das Projektilion durchaus möglich. Der zweite Mechanismus des *electronic stopping* kann es auch hier geben. Dieser Mechanismus kann weit mehr Energie in das System überführen und vor allem zu kleinen Fragmenten führen. Aber aus der Tabelle 4.1 ist ersichtlich, dass dieser Mechanismus, kaum zu den Massenspektren (Abb. 4.32 - 4.36) beiträgt. Stellt man die Summe der Fragmente der Muttermasse gegenüber, kann man zumindest abschätzen wie hoch der Grad der Fragmentierung ist. Dazu wurde, wie in der nachfolgenden Abbildung 4.37, für jedes Spektrum das Verhältnis aus der Gesamtheit der Fragmente und der Muttermasse bestimmt. Dieses Verhältnis wird gegen das aufsteigende Ionisierungspotential der Gase aufgetragen.

Wie man der Abbildung 4.37 entnehmen kann liegen alle Werte der Verhältnisse deutlich über eins. Dies bedeutet, dass mehr Fragmente als Muttermasse nachgewiesen wurde und demnach Ethanol stark fragmentiert. Interessant erscheint, dass es scheinbar keine direkte Korrelation zwischen dem Ionisierungspotential und der Fragmentbildung gibt. Der Wasserstoff ist das Projektil mit dem zweithöchsten IP, aber hat das kleinste Verhältnis

aus Fragment zu Muttermasse. Diese Komplexität des Zusammenhangs in Abbildung 4.37 zeigt, dass das IP der atomaren Projektionen nicht der einzige Parameter ist, sondern auch Resonanzen zu Molekülorbitalen eine Rolle spielen können. Es fällt auf, dass N_2^+ im Verhältnis von H_2^+ mehr Fragmente erzeugt obgleich doch die Ionisierungsenergie von H_2 höher liegt als die von N_2 . Eine mögliche Erklärung ist ein Franck-Condon-Effekt (FC-Effekt) beim schnellen CT: Da die atomaren Ionen hochenergetisch sind und zudem sich nur ein Elektron bewegt, kann dieser Prozess als FC-Prozess, also bei festen Kernkoordinaten ablaufend, betrachtet werden. Während sich bei $\text{N}_2^+ + e \rightarrow \text{N}_2$ sich die Bindungsstärke nur von 2,5 auf 3 verändert, aber bei $\text{H}_2^+ + e \rightarrow \text{H}_2$ von 1 auf 2 kann man davon ausgehen, dass bei H_2^+ , als schnelles Ion, wegen der starken Geometrieänderung bei der Rekombination der Ladung nur ein Teil der Überschussenergie an das Molekül weitergegeben werden kann.

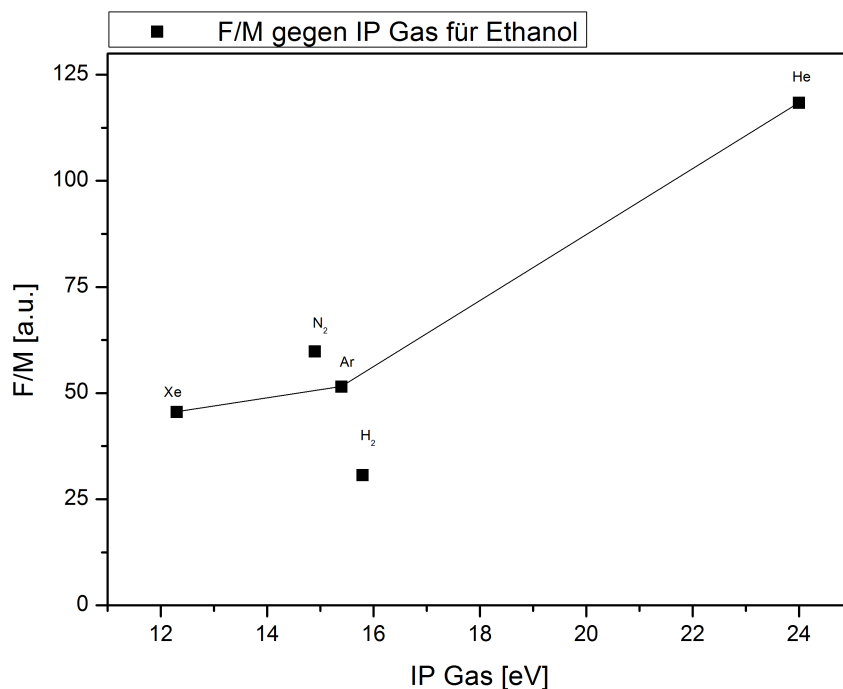


Abbildung 4.37: Für Ethanol als Probegas: Das Verhältnis aus dem Integral der Fragmentionen und dem Integral der Mutterionen aufgetragen gegen das aufsteigende IP der schnellen kationischen Projektile. Es ergibt sich keine einheitliche Beziehung zwischen IE und der Fragmentierungsstärke.

4.3.3 Toluol

Das erste einfache aromatische System, welches dann untersucht wurde, ist das Toluol. Das Toluol besitzt im Gegensatz zum Ethanol ein kleineres Ionisierungspotential von 8,82 eV und besitzt eine Masse von 92,14 Da. Die entstandenen Massenspektren zeigten neben der Muttermasse auch eine Reihe an Fragmenten, die über den zu erwartenden H-Lost (91 Da) - Toluol neigt zur Siebenringbildung und Abspaltung eines Protons - bis hin zu ein C_1 -Fragment reichen. Zudem zeigte das Toluol überraschenderweise auch Massenpeaks, die nur mit einer doppelten Ladung erklärbar sind. Insbesondere bei den Experimenten mit Helium als Projektilion (vgl. Abbildung 4.39), treten doppelt geladene Toluolionen auf. Dies ist auch in der Literatur bekannt, wo das *appearance potential* für die zweifach geladene Muttermasse von Toluol als 24,5 eV, also identisch zur Ionisierungsenergie des Heliums, angegeben wird [AO72].

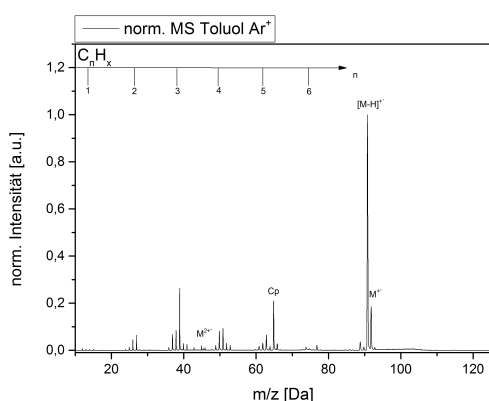


Abbildung 4.38

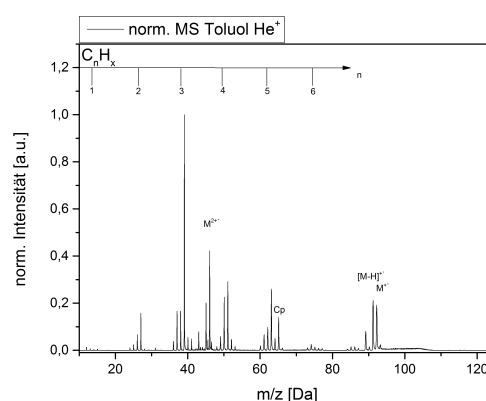


Abbildung 4.39

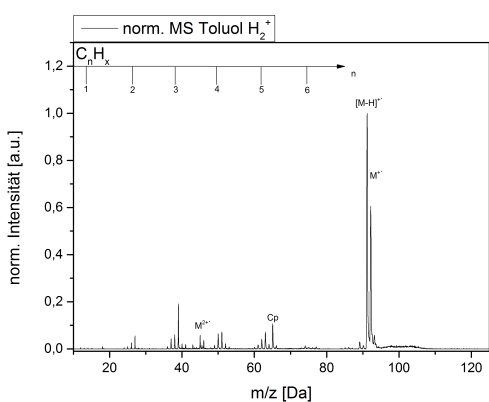


Abbildung 4.40

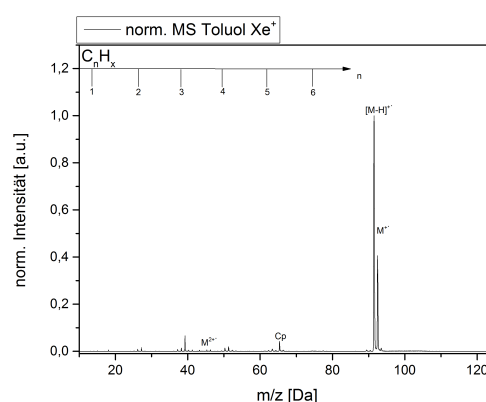


Abbildung 4.41

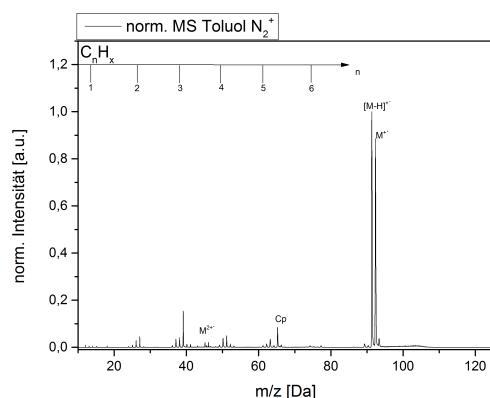


Abbildung 4.42

Die Abbildungen zeigen die normierten Massenspektren von Toluol, die mit unterschiedlichen Projektionen aufgenommen wurden. Bei den Massenspektren wurde immer auf den Basispeak normiert.

Die Spektren (Abbildungen 4.38 bis 4.42) des Toluols variieren vor allem in der Intensität ihrer Fragmente. Im Massenspektrum in der Abbildung 4.41 sind durch die Xenonionen kaum Fragmente entstanden. Die Intensität der Fragmente nimmt dann über den Stickstoff, Argon und Wasserstoff kontinuierlich, gemäß ihrer Rekombinationsenergie, zu. Das Spektrum in Abb. 4.39 für Helium als Projektion zeigt entsprechend die höchsten Intensitäten des Fragmentpatters, erkennbar an der Bildung den C_3H_x -Fragmenten, die in diesen Spektrum die größte Intensitäten aufweisen. Auffällig erscheint jedoch bei allen Spektren, dass neben den zu erwartenden H-Loss (91 Da) auch ein reiner Muttermassenpeak (92 Da) zu sehen ist. Dennoch ist in jedem Spektrum die Intensität des vermutlich gebildeten Tropylium-Ions größer. Das hier der Siebenring gebildet wird erkennt man auch am gebildeten Cyclopentadienylkation bei m/z 65 gemäß Abbildung 4.43.

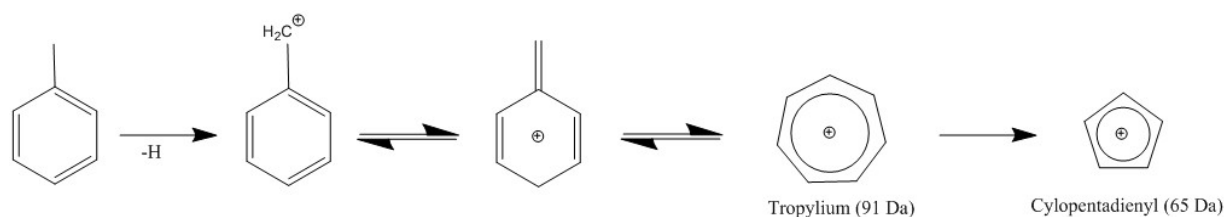


Abbildung 4.43: Bildung des Siebenring aus dem Toluol mit anschließenden Verlust von von Ethin zur Bildung des Cyclopentadyenylkations.

Eine Ausnahme zeigt sich wiederum im Spektrum des Toluols mit Heliumionen. Hier ist das Verhältnis aus Muttermasse und Tropyliumion scheinbar 1:1 und mit eher geringer Bildungswahrscheinlichkeit ($\sim 20\%$). Vielmehr wird durch den Einsatz mit Heliumionen

auch das zweifach geladene Toluol gebildet ($\sim 40\%$). Eine weitere Ausnahme ist im Spektrum mit den Xenonionen zu sehen. Hier hat sich das Verhältnis aus Muttermasse und Tropyliumion gedreht. Während dieses Verhältnis für Argon, Stickstoff und Wasserstoff zu Gunsten des Tropyliumions steht, ist bei Xenon die Muttermasse intensiver. Bei Betrachtung eines HeI-Photoelectron-Spektrums von Toluol [Kim81, AFL72] liegen die jeweiligen Ionisierungsenergien der tiefer liegenden Zustände nicht perfekt resonant zu den Rekombinationsenergien der Gasionen. Dies könnte eine Erklärung für die geringe Fragmentierung des Toluols sein. Auch in den Versuchen des Toluols mit den Projektilionen liess sich eine Abschätzung bezüglich der Detektierbarkeit der *electronic stopping*-Produkte durch eine Rechnung machen, auch wenn die Spektren aufgrund der geringen Fragmentierung darauf hindeutet, dass dieser Mechanismus keinen großen Anteil an der Zusammensetzung des Patterns hat. Wie der Tabelle 4.1 zu entnehmen ist, ist auch hier für jede Gasionsorte der Implusübertrag beim zentralen Stoß sehr groß.

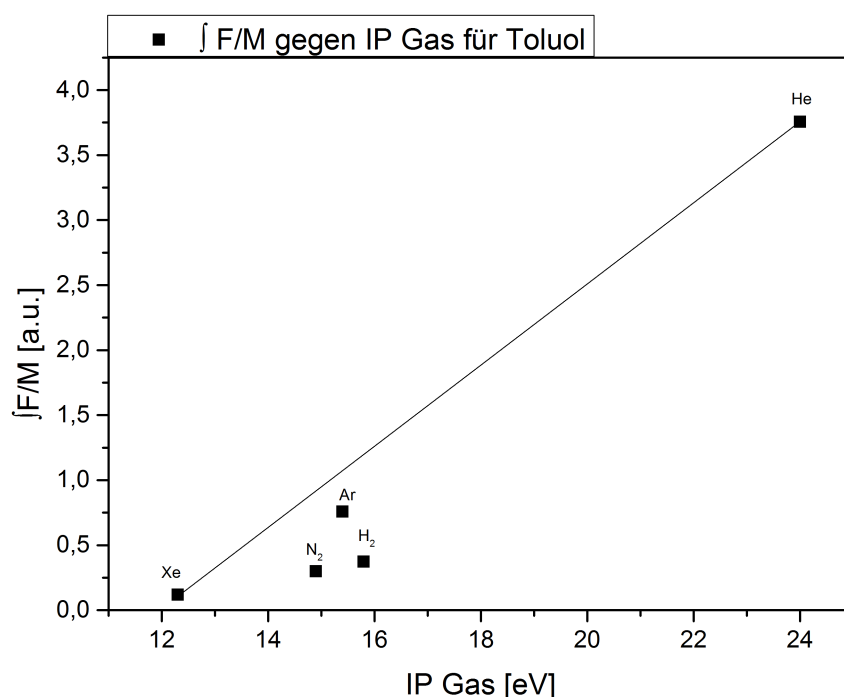


Abbildung 4.44: Für Toluol als Probe: Aufgetragen ist das Verhältnis aus dem Integral der Fragmente und dem Integral der Muttermasse in Abhängigkeit gegen das aufsteigende IP der Projektilen. Deutlich zu erkennen ist, wenn mehr Überschussenergie vorliegt je mehr Fragmentierung tritt auf. Ausnahme bildet auch hier der Stickstoff und der Wasserstoff.

Die Abbildung 4.44 zeigt nochmals die eher schwache Fragmentierung auf. Deutlich ist zu erkennen, dass das Projektilion des Xenons die geringste Fragmentierung auslöst. Während mit Wasserstoff, Stickstoff und Argon zwar zunimmt, bleibt diese doch im Verhältnis zur gebildeten Muttermasse klein. Einzig Helium scheint mehr Fragmente zu produzieren als Muttermasse gebildet wird, Für Helium liegt der Wert für das Verhältnis aus Fragmenten/Muttermasse über eins ($\sim 3,7$).

4.3.4 Mesitylen

Aufbauend auf den Experimenten mit Toluol wurde das Mesitylen untersucht. Im Vergleich zum Toluol hat das Mesitylen zwei weitere Methylgruppen in meta-Stellung und hat mit einem Ionisierungspotential von 8,4 eV ein etwas kleineres IP als Toluol (8,82 eV). Auch in der Messreihe von Mesitylen (Abbildungen 4.45 bis 4.49) erkennt man eine komplette Fragmentierung, von der Muttermasse (120 Da) bis hin zu einer C_1H_x -Einheit. Der präferierte Fragmentierungskanal ist neben der H-Abspaltung die Abspaltung einer CH_x -Einheit, sodass überwiegend Fragmente der C_8H_x -Einheit entstehen. Ausnahme bildet hier die Exposition mit Wasserstoffmolekülonen als Projektile. Hier ist das Fragment C_2H_x das stark präferierte Fragmentierungsprodukt.

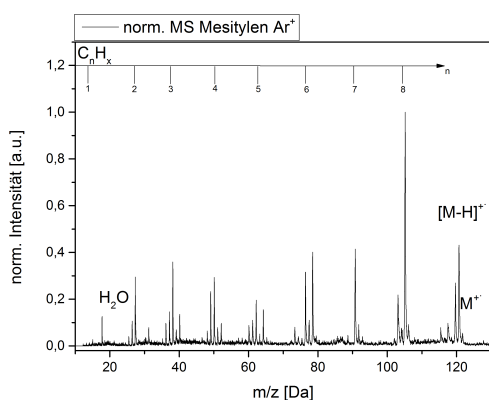


Abbildung 4.45

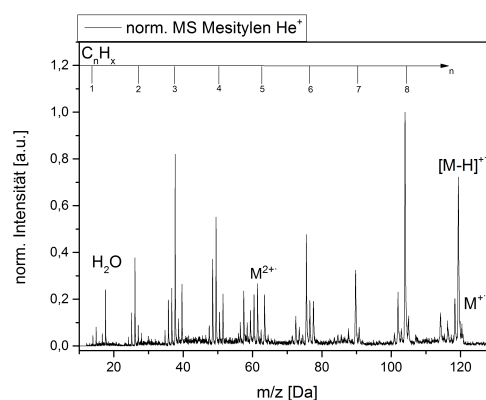


Abbildung 4.46

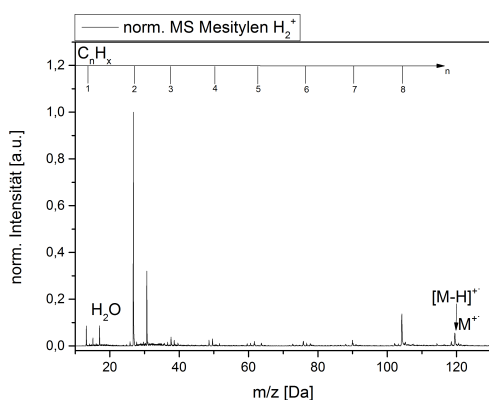


Abbildung 4.47

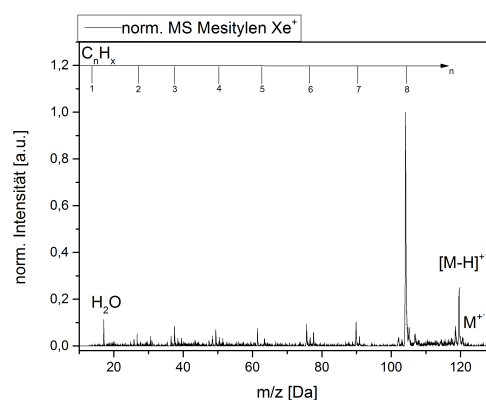


Abbildung 4.48

Eine nähere Betrachtung der Spektren zeigt gewisse Ähnlichkeiten zwischen den mit Argon und Stickstoff generierten Spektren. Der einzige Unterschied liegt in der der Intensität der Muttermasse und der Intensität des C_8H_x -Fragments. Das aus der Exposition mit Heliumionen entstandene Massenspektrum von Mesitylen zeigt vor allem eine starke

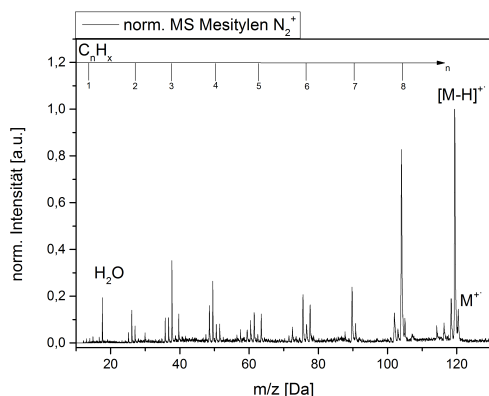


Abbildung 4.49

Die Abbildungen zeigen die normierten Massenspektren von Mesitylen, die mit unterschiedlichen Projektilionen aufgenommen wurden. Bei den Massenspektren wurde immer auf den Basispeak normiert.

Fragmentierung zu kleineren Fragmenten. Im Bereich der C_5H_x -Fragmente gibt es auch Anzeichen für eine doppelt geladene Muttermasse. Ein anderes Bild zeichnen die Massenspektren für die Einwirkung der Wasserstoffmolekülionen und der Xenonionen. Es scheint, dass durch die Wasserstoffmolekülionen ein einziger sehr starker Fragmentierungskanal bevorzugt wird, sodass über wiegend ein $C_2H_2^+$ -Fragment gebildet wird. Auf der anderen Seite zeigt das Spektrum von Mesitylen mit Xe^+ , ein sehr intensiven Peak bei $C_8H_9^+$. Über alle Spektren hinweg ist zu erkennen, dass die Bildung der Muttermasse nicht bevorzugt wird. Dies lässt sich auch in der Abbildung 4.50 erkennen. Jeder Wert über das Verhältnis Fragment zu Muttermasse ist deutlich über eins. Vielmehr ist die Abspaltung einer Methylgruppe präferiert. Dies könnte ein Anzeichen für die Bildung eines Siebenrings, welcher in seiner kationischen Form stabil ist. Ausnahme ist hier wiederum das Spektrum in Abbildung 4.47. Im Experiment mit Xenon lässt sich anhand eines HeI-PE-Spektrums [KT74] ein perfekt resonanter *charge transfer* aus einen kationischen angeregten Zustand auf das Xenonion vermuten. Hier liegt eine HeI-PE-Bande für eine Ionisierungsenergie des Mesitylen bei ca. 12,5 eV, welche gut mit der Rekombinationsenergie für Xenon (12,3 eV) übereinstimmt. Für die anderen Projektile ist das HeI-PE-Spektrum in den benötigten Energiebereichen leider wieder nicht aussagekräftig genug, da sich entweder viele elektronische Zustände überlagern oder die molekularen Energiezustände des Mesitylens im Bereich der HE-IP unbekannt sind. Dennoch lässt sich auch in diesen Experimenten ein Ladungstransfer vermuten. Wie in den Experimenten (siehe Ethanol und Toluol) zuvor lässt sich eine Beteiligung des *electronic stopping*-Mechanismus an den Massenspektren aus Gründen der Impulserhaltung nahezu ausschließen (vgl. Tabelle 4.1).

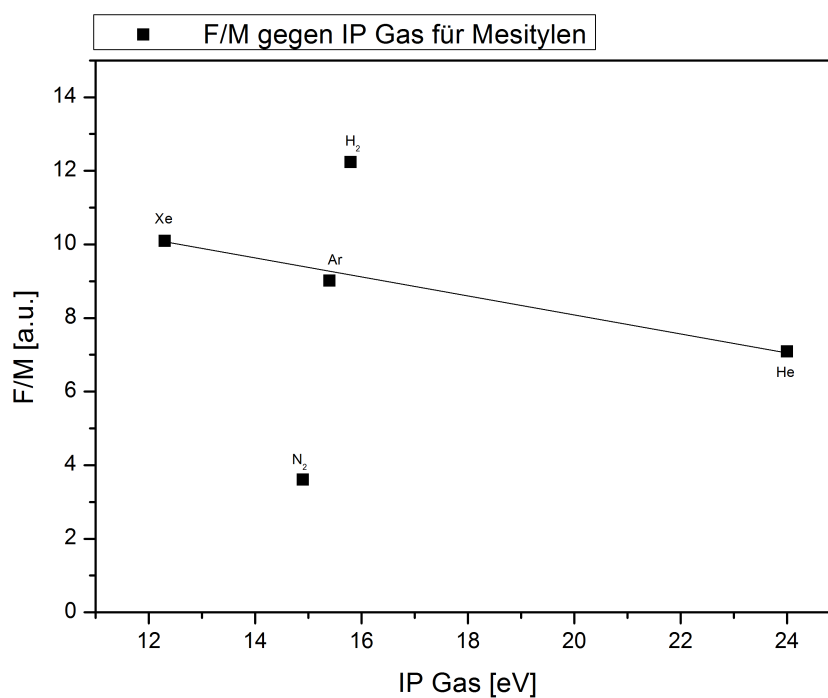


Abbildung 4.50: Aufgetragen ist das Verhältnis aus dem Integral der Fragmente und dem Integral der Muttermasse in Abhängigkeit gegen das aufsteigende IP der Projektile.

4.3.5 Anthracen

Eine weitere Messreihe wurde mit dem polyzyklisch-aromatischen Kohlenwasserstoff (PAK) Anthracen aufgestellt. Das Anthracen ist ein System aus drei annelierten Benzolringen. Einerseits lässt diese rigide sehr stabile Struktur wenig Fragmentierung erwarten. Andererseits hat dieses Molekül ein Ionisierungspotential von nur 7,5 eV, das Geringste IP aller untersuchten Substanzen, also theoretisch die größte Energiedifferenz zu den IPs der Projektilionen. Ein erster Blick auf die Massenspektren in den Abbildungen 4.51 bis 4.54 zeigt große Ähnlichkeiten untereinander. Auf ein intensiven Muttermassenpeak folgt nur eine schwache Fragmentierung in nahezu alle C_nH_x -Einheiten mit Ausnahme des $C_{13}H_x$ -Patterns, welches in keinem der Spektren zu finden ist.

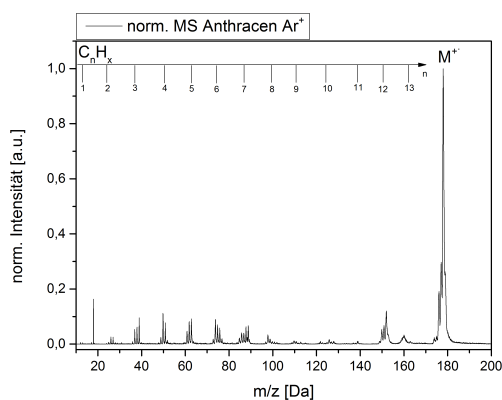


Abbildung 4.51

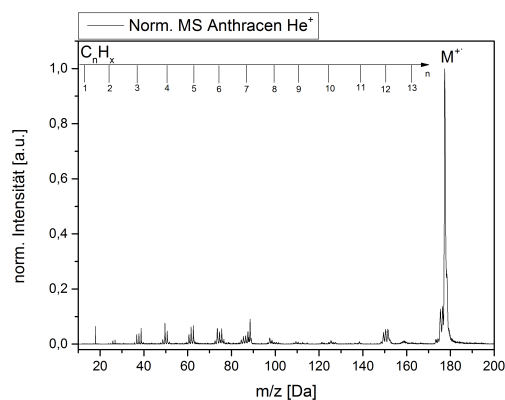


Abbildung 4.52

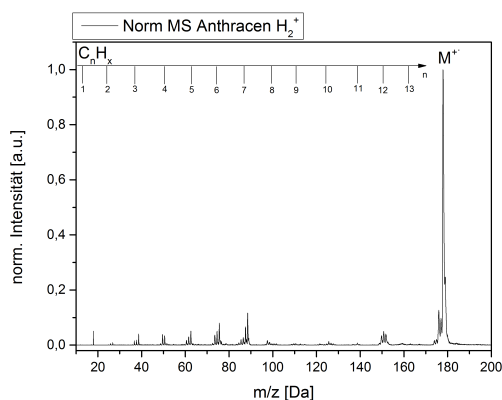


Abbildung 4.53

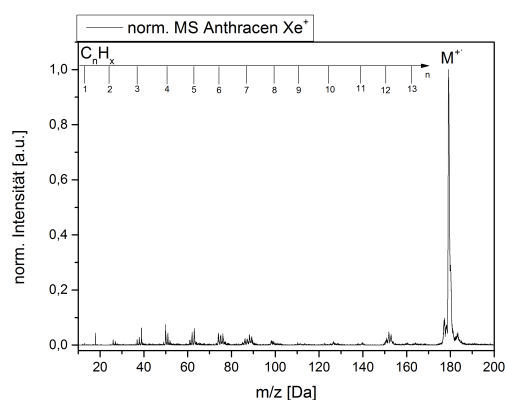
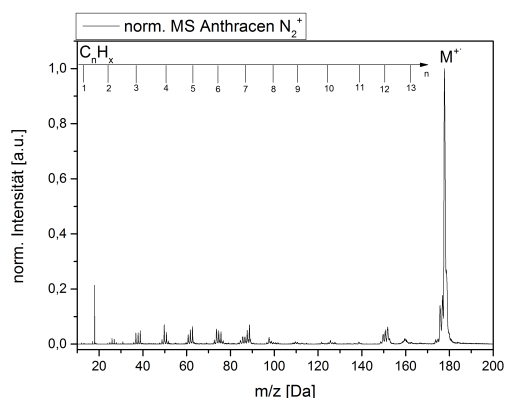


Abbildung 4.54

**Abbildung 4.55**

Die Abbildungen zeigen die normierten Massenspektren von Anthracen, die mit unterschiedlichen Projektilionen aufgenommen wurden. Bei den Massenspektren wurde immer auf den Basispeak normiert.

Im Falle des Anthracen lässt sich aus der geringen Fragmentierung vermuten, dass nach Ionisierung in einen angeregten kationischen Zustand das Mutterion $[M^+]$ relativ stabil ist und so nur wenige Fragmentationen entstehen. Der Vergleich der Rekombinationsenergien der Projektilionen mit einem HeI-PE-Spektrum von Anthracen [KMOH88] zeigen gute Übereinstimmungen mit den jeweiligen Banden (vgl. Tab. 4.2). So kann man aufgrund der guten Übereinstimmung den Ladungstransfer-Mechanismus für Anthracen als einzig wirksamer Prozess annehmen. Seltsam erscheint die Tatsache dennoch, dass die Fragmentierung für alle Primärionen, also auch für He^+ , sehr schwach ist. Nimmt man aufgrund des hohen elektronischen Energiezustands der Primärionen auch eine hohe interne Energie an, die nach der Ionisierung im Molekül verbleibt, sollte diese noch genügend Potential besitzen eine Fragmentierung auszulösen. Vor allem sollte das Potential zur Fragmentierung mit der Rekombinationsenergie der verschiedenen Gasionen wachsen, da in Anthracen immer höhere angeregte Zustände adressiert werden könnten und folglich mehr interne Energie im Molekül zurückbleibt. Als erstes Argument hierfür könnte man RRKM-Theorie hinzuziehen. Zur kurzen Erinnerung besagt die RRKM-Theorie, dass ein Molekül je größer es wird, genauer die Zustandsdichte zu nimmt, schneller die überschüssige interne Energie über alle Schwingungen im Molekül verteilen kann. Was aber gegen eine Erklärung ausschließlich über den RRKM-Mechanismus steht, ist zunächst die Größe des Moleküls von 24 Atomen und deren rigide Vernetzung. Die resultierende Schwingungszustandsdichte würde nicht ausreichen um die interne Energie so gut zu verteilen, dass keine Fragmente entstehen. Das Hauptargument für eine geringe Fragmentierung könnte in der hohen Stabilität des Anthracens liegen. Immerhin müssen zwei Bindungen gebrochen werden,

um ein Fragment zu erzeugen. Da die Radikastelle in Anthracen gut delokalisiert ist, also die Dissoziationsenergie nicht stark reduziert, kann man annehmen, dass die Dissoziationsenergie zur Abspaltung einer C_xH_y -Gruppe mehr als 6 eV benötigt werden. In der Abbildung 4.56 wird nochmal die schwache Fragmentierung dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass für jedes Projektil kein Wert für das Verhältnis aus Fragment zu Muttermasse über eins ist. Die Werte liegen bis auf Argon auf der ungefähren selben Höhe. Dies könnte ein Indiz für einen einheitlichen Relaxtionsmechanismus der überschüssigen Energie sein. Obgleich die geringe Intensität von Fragmenten den Beitrag von Fragmentio-

Tabelle 4.2: Vergleich der Rekombinationenergien der Projektilionen mit den Banden des Anthracens aus einem HeI-PES

Ion	RE Ion [eV]	Bande HeI-PES [eV][KMOH88]
Xe ⁺	12,3	12,2
N ₂ ⁺	14,9	15,0
Ar ⁺	15,4	15,3
H ₂ ⁺	15,8	15,9
He ⁺	24,5	—

nen aus einem *electronic stopping*-Mechanismus praktisch ausschließt, soll dazu nochmals Stellung bezogen werden. Dies kann mit den berechneten Werten zum Verhältnis aus Quer-/Flugrichtungsgeschwindigkeit in der Tabelle 4.1 zu einem gewissen Grad widerlegt werden. Die Werte zeigen für einen hypothetischen zentralen Stoß, also maximale Impulsübertragung, eine Abweichung von ~ 20 % für Wasserstoff bis 161 % für Xenon. Für eine Nichtberücksichtigung von *elcetric stopping*-Produkte sprechen auch die Massenspektren selbst. Die Erwartung an möglichen Fragmenten aus diesen Mechanismus sollten eher zu in starker Fragmentierung zu kleinen Massen führen. Das Ergebnis einer geringen Fragmentierung am Anthracens unterstützt ganz stark die Annahme, dass *electronic stopping*-Fragmente praktisch nicht zu den hier gezeigten Massenspektren beitragen. Auch einen Vergleich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Schalthölter et al. zeigen für das *electronic stopping* gänzlich andere Massenspektren (vgl. [PBH⁺10, PHTS14]). Hier zeigen sich auch zum Beispiel doppelt und dreifach geladene Fragmente durch den Einsatz mit Projektilionen wie Wasserstoff und Helium.

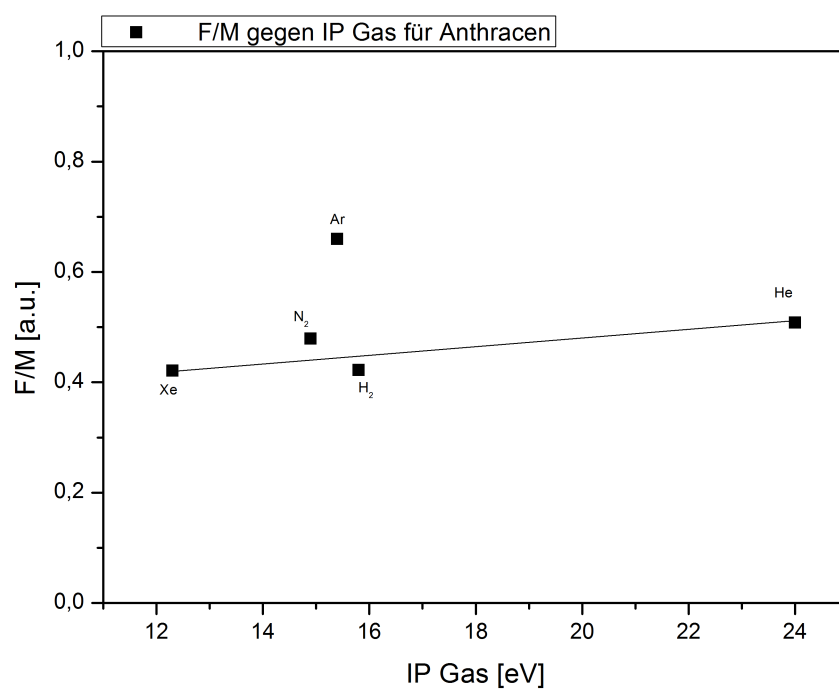


Abbildung 4.56: Aufgetragen ist für den CED-Mechanismus an Anthracen das Verhältnis aus dem Integral der Fragmente und dem Integral der Muttermasse in Abhängigkeit gegen das aufsteigende IP der Projektile.

4.3.6 Diphenylbutadien

Ein weiteres Molekül, das den Experimenten mit schnellen Gasionen unterzogen wurde, ist das Diphenylbutadien (DPBD). Es ist das Größte von allen untersuchten Molekül in dieser Messreihe und besitzt ein erstes Ionisierungspotential bei ca. 8 eV. Das besondere am Molekül sind zwei Phenylreste die mit einer Butadienyl-Brücke verbunden sind. Genau diese Butadienylgruppe kann die Schwachstelle sein, da bei einem Fragmentierungsschritt nur eine Bindung gebrochen werden muss. Ein kurzer Blick auf die Massenspektren des DPBDs (Abb. 4.57 bis 4.61) zeigt in der Tat genau die erwartete starke und vielfältige Fragmentierung. Das mit Xenonionen generierte Massenspektrum fällt durch seinen veräuschten Charakter auf (vgl. Abb. 4.60). In jedem dieser Spektren lässt sich ein komplettes Fragmentierungspattern der C_yH_x -Einheiten von $C_{15}H_x$ bis hin zum CH_x erkennen.

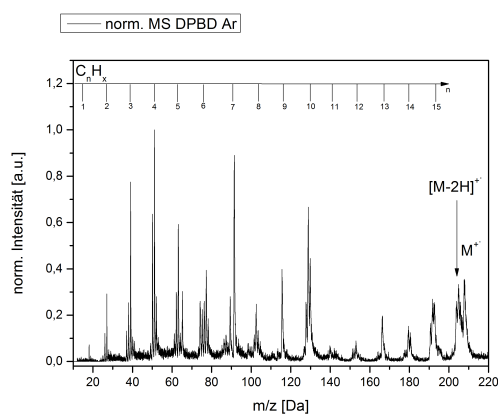


Abbildung 4.57

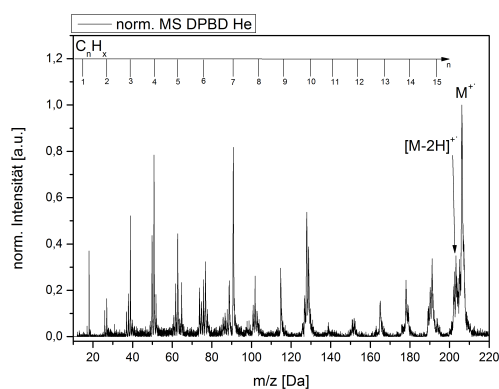


Abbildung 4.58

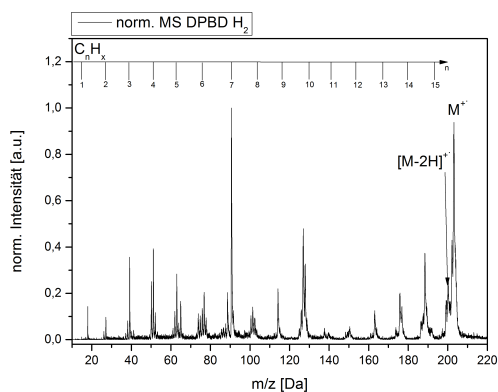


Abbildung 4.59

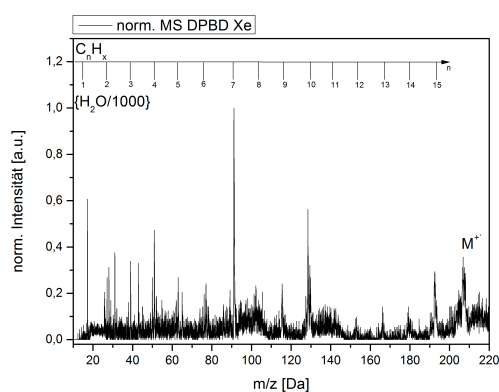


Abbildung 4.60

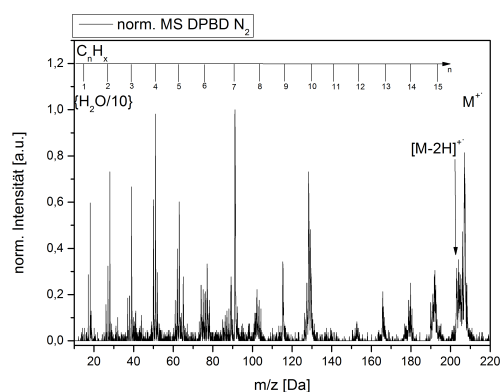


Abbildung 4.61

Die Abbildungen zeigen die normierten Massenspektren von Diphenylbutadien, die mit unterschiedlichen Projektilionen aufgenommen wurden. Bei den Massenspektren wurde immer auf den Basispeak normiert.

Bei genauerer Betrachtung sind es in jedem Spektrum drei Fragmente, die meist die intensivsten Peaks bilden. Das sind neben den $C_{10}H_x$ -, C_7H_x - und das C_4H_x -Fragmentpattern. Die Vermutung ist dabei zulässig diese im Zusammenhang mit der Butadienylgruppe zu bringen. Bricht eine Phenylgruppe ab, bleibt eine $C_{10}H_x$ -Einheit zurück. Brechen beide Phenylgruppen ab - die C_4H_x -Einheit. Bricht eine Butadienylgruppe nach ersten C-Atom in der Kette bildet sich ein C_7H_x -Pattern und ein C_9H_x -Pattern. Die C_7 -Einheit wird vermutlich den Siebenring bilden, die weit aus stabilere Spezies als ein Neunring, wenn dieser überhaupt gebildet werden kann. Die Abbildung 4.62 gibt Auskunft darüber in welchen Maße die Fragmentierung nach jeweiliger Exposition mit den schnellen Gasion abgelaufen ist. Bemerkenswert ist, dass die Fragmentierungsintensität nach rechts abnimmt, obgleich die Differenzenergie der IPs von Stoßion zu Molekül zunimmt. Die Frage nach dem *charge transfer* lässt sich wiederum mit einem PE-Spektrum beantworten. Nach Hudson et al. [HRD76] liegen die Banden der Photoelektronen noch in guter Übereinstimmung mit den Rekombinationenergien der Projektilionen. Dabei liegt die Ionisationsenergie von Xenon in bester Übereinstimmung mit einem kationischen angeregten Zustand vor. Der Überlapp mit dem Banden des PE-Spektrums nimmt dann kontinuierlich von Stickstoff zum Wasserstoff ab. Einen Vergleich mit Helium kann aus dem Spektrum der HeI-Photoelektronen natürlich leider wieder nicht gezogen werden. Zieht man einen Vergleich zum Anthracen, dessen Fragmentierung eher schwach ausgefallen ist, kann man eine Aussage bezüglich Fragmentierungswahrscheinlichkeit nach einem Ladungstransfer treffen. Unterschieden wird dabei zwischen einem zyklischen und rein aromatischen System und einem System, welches zwar konjugierte Doppelbindungen besitzt, aber einerseits wegen einer Alkdieryl-

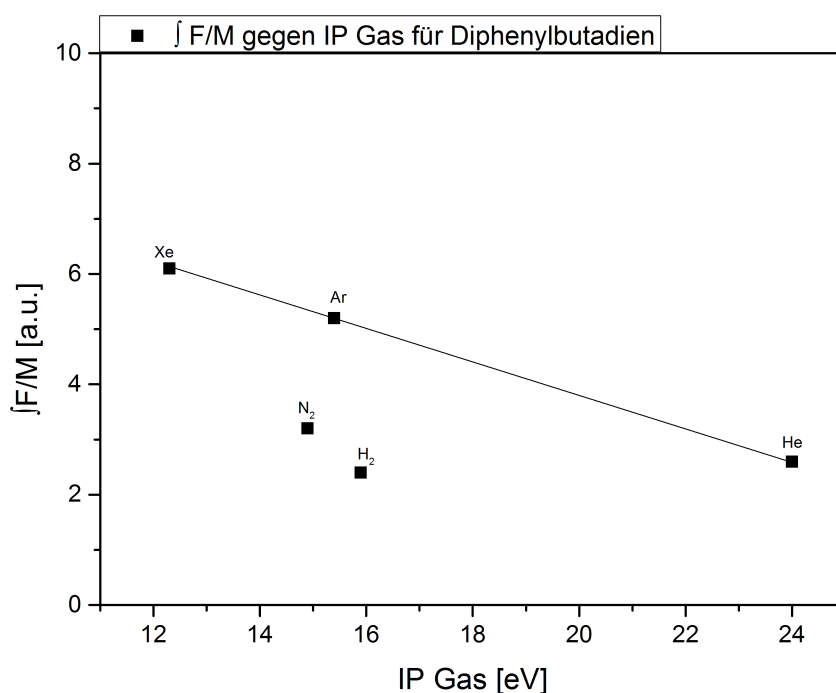


Abbildung 4.62: Aufgetragen ist das Verhältnis aus dem Integral der Fragmente und dem Integral der Muttermasse in Abhängigkeit gegen das aufsteigende IP der Projektilen.

gruppe nicht komplett aromatischen Charakter aufweist und andererseits nur einen Bindungsbruch zur Erzeugung von Fragmenten benötigt. Durch einen Ladungstransfer kann ein aromatisches System ein Radikalstelle besser stabilisieren als eine Kette von konjugierten Doppelbindungen. Dies spiegelt sich auch in beiden Experimenten wieder. Während Anthracen überwiegend den Muttermassenpeak ausbildet, ist beim DPBD intensive Fragmente zu beobachten, die im Zusammenhang mit der Butadienylgruppe stehen. Ein Vergleich mit der Tabelle 4.1 lässt den Mechanismus des *electronic stoppings* weitestgehend ausschließen.

4.3.7 n-Butylbenzol

Aus der Erfahrung mit DPBD stellt sich die Frage ob die Fragmentierung einer Zielsubstanz mit einer aliphatischen Seitenkette besser funktioniert als mit einer konjugierten Doppelbindungskette. Dazu wurde das Molekül n-Butylbenzol ausgewählt. Das n-Butylbenzol besitzt ein Ionisierungspotential von ca. 8,7 eV, das somit nur maginal kleiner ist als das von Toluol. Erwartungsgemäß sollte im Falle einer Fragmentierung der aromatische Teil des Moleküls als intensivster Peak in den Massenspektren zu sehen sein. Genau dies zeigen auch alle Massenspektren (vgl. Abbildung 4.63 bis 4.67).

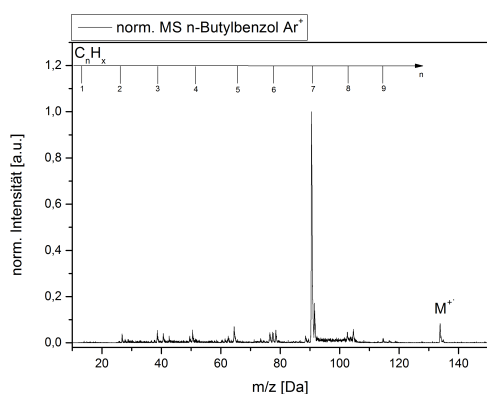


Abbildung 4.63

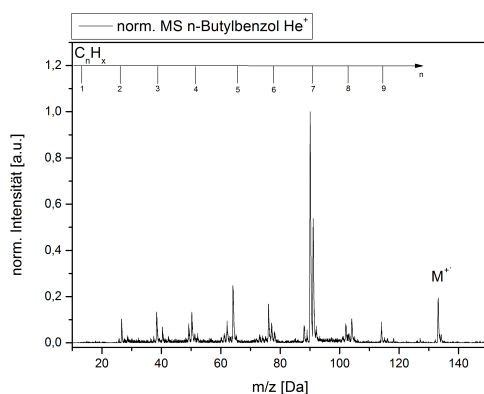


Abbildung 4.64

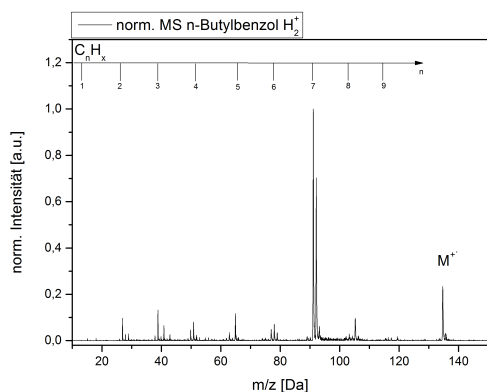


Abbildung 4.65

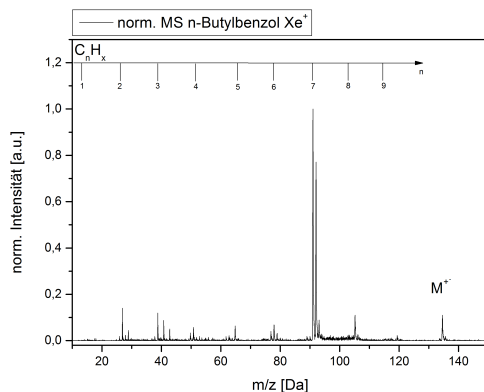


Abbildung 4.66

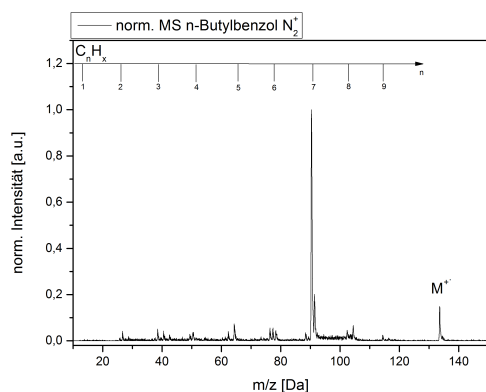


Abbildung 4.67

Die Abbildungen zeigen die normierten Massenspektren von n-Butylbenzol, die mit unterschiedlichen Projektionen aufgenommen wurden. Bei den Massenspektren wurde immer auf den Basispeak normiert.

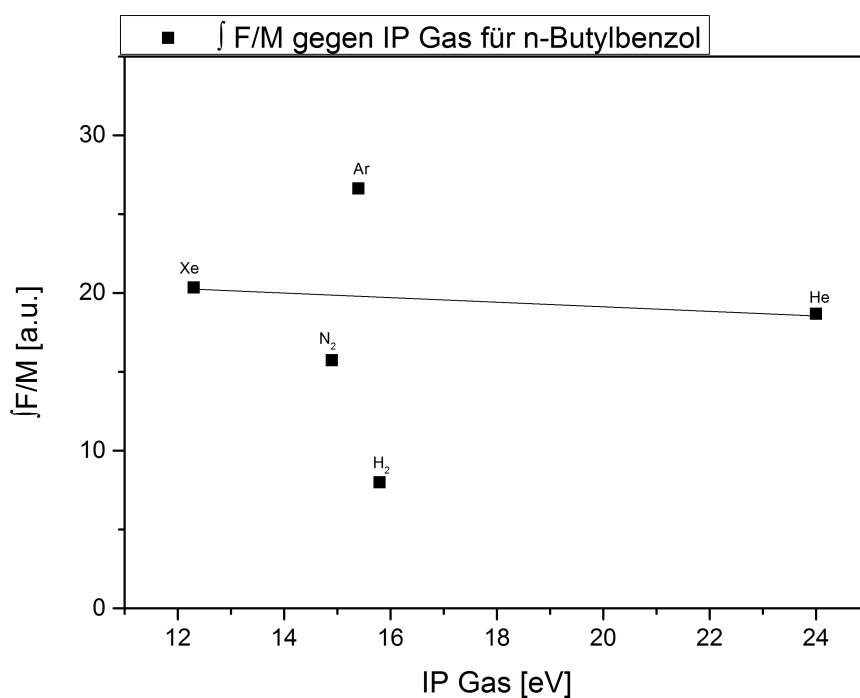


Abbildung 4.68: Aufgetragen ist das Verhältnis aus dem Integral der Fragmente und dem Integral der Muttermasse in Abhängigkeit gegen das aufsteigende IP der Projektile.

Ein weiterer Blick auf die Massenspektren des n-Butylbenzols zeigt neben zwei sehr intensiven C_7H_x -Peaks nur geringe Fragmentierung anderer Fragmenteinheiten. Selbst die

Muttermasse des Moleküls zeigt mit durchschnittlich 20 % eher eine geringe Intensität. Das n-Butylbenzol hat demnach einen favorisierten Fragmentierungskanal, der zunächst fast unabhängig von der eingebrachten Energiemenge angesprochen wird. Dieser Fragmentierungskanal kann nur beschriftet werden, wenn eine C_3H_x -Einheit abgespalten wird. Hieraus ergibt sich die Frage, an welcher Stelle des Moleküls erfolgt der Ladungstransfer auf das Projektilion? Das n-Butylbenzol-Molekül bietet hier zwei Möglichkeiten an. Zum Einen könnte der *charge transfer* aus dem aromatischen Ring erfolgen, oder aber aus der Alkylkette. Beim Vergleich mit den Spektren von Toluol offenbart sich eine gewisse Ähnlichkeit. Dies lässt die Annahme zu, dass der Ladungstransfer überwiegend am Ring stattfindet. Dies lässt sich auch mit dem HeI-PE-Spektrum von Toluol begründen, wenn man berücksichtigt, dass das erste Ionisierungspotential bei Alkylbenzolen, mit länger werdender Alkylkette, nicht wesentlich kleiner wird. So ist dies auch für die energetisch tiefer liegenden Elektronen als ungefähr gleich anzunehmen. Dies wiederum bedeutet, es werden annähernd die selben Niveaus wie im Toluol angesprochen. Folglich ist das Produktpattern dem Toluol ähnlich. Zwar sind neben der Muttermasse auch größere Fragmenteneinheiten als C_7H_x , also C_8H_x und C_9H_x , zu sehen, aber mit einer sehr geringen Intensität. Diese könnten aus dem Ladungstransfer von den Primärionen auf die Alkylkette stammen. Aus der Abbildung 4.68 erkennt man eine ausgeglichene Fragmentierung bei Verwendung verschiedener Projektilionen, was die These eines favorisierten Fragmentierungskanals unterstützt. Nur die Spektren von Ar^+ und H_2^+ weichen nur geringfügig davon ab. Das Verhältnis der Intensitäten der Fragmente zur denen der Muttermasse liegen bei den verwendeten Projektilionen eng zusammen. Die Werte aus dieser Abbildung deuten eher auf eine moderate Fragmentierung hin. Welche Beteiligung das *electronic stopping* an den Spektren hat, kann letztendlich wieder nur grob abgeschätzt (vgl. Tabelle 4.1) werden.

4.3.8 n-Hexylbenzol

Das letzte zum Teil aromatische Molekül ist das n-Hexylbenzol. Das erste Ionisierungspotential ist nicht bekannt sollte aber nicht viel kleiner sein als das von n-Butylbenzol. Ausgehend von den Versuchen an Toluol und n-Butylbenzol sollte sich das n-Hexylbenzol sehr ähnlich verhalten. D.h. es sollte wiederum eine intensive Fragmenteinheit bei C_7H_x gebildet werden. Alle anderen Fragmente und zusätzlich der Muttermassenpeak bei 161 Da sollten in den Massenspektren nur schwach auftreten. Die mit den üblich Projektilionen aufgenommenen Massenspektren des n-Hexylbenzols sind in den Abbildungen 4.69 bis 4.73 zu finden. Wie zu erwarten zeigen die Spektren die Einheit C_7H_x als intensivsten Massenpeak. Aber im Vergleich zum n-Butylbenzol zeigen die Fragmentpattern bei C_2H_x und C_3H_x einen stärkeren Anteil. Das Muttermassensignal hingegen ist in den Spektren des n-Hexylbenzols noch schwächer als in den n-Butylbenzol-Spektren.

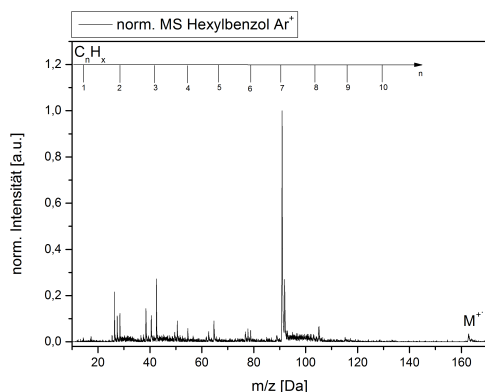


Abbildung 4.69

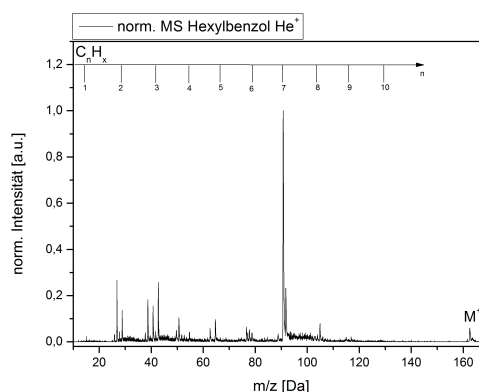


Abbildung 4.70

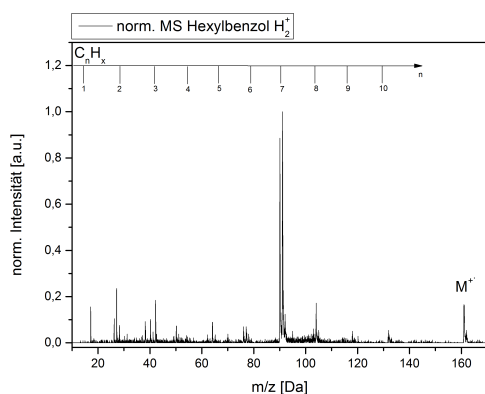


Abbildung 4.71

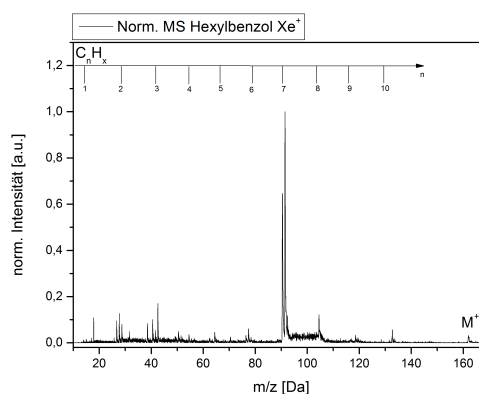


Abbildung 4.72

Wie Eingangs erwähnt, wurde das C_7H_x Signal ja schon als dominantes Fragment erwarten. Diesbezüglich lassen sich die selben Begründungen für das Auftreten dieser Spezies aufzäh-

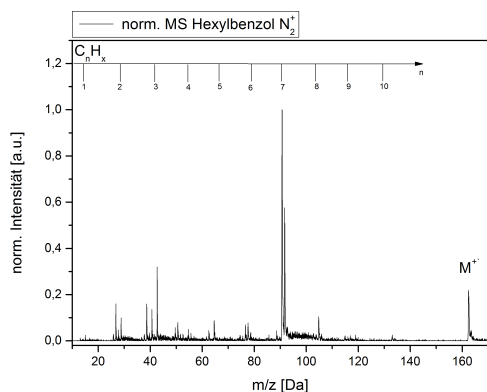


Abbildung 4.73

Die Abbildungen zeigen die normierten Massenspektren von n-Hexylbenzol, die mit unterschiedlichen Projektionen aufgenommen wurden. Bei den Massenspektren wurde immer auf den Basispeak normiert.

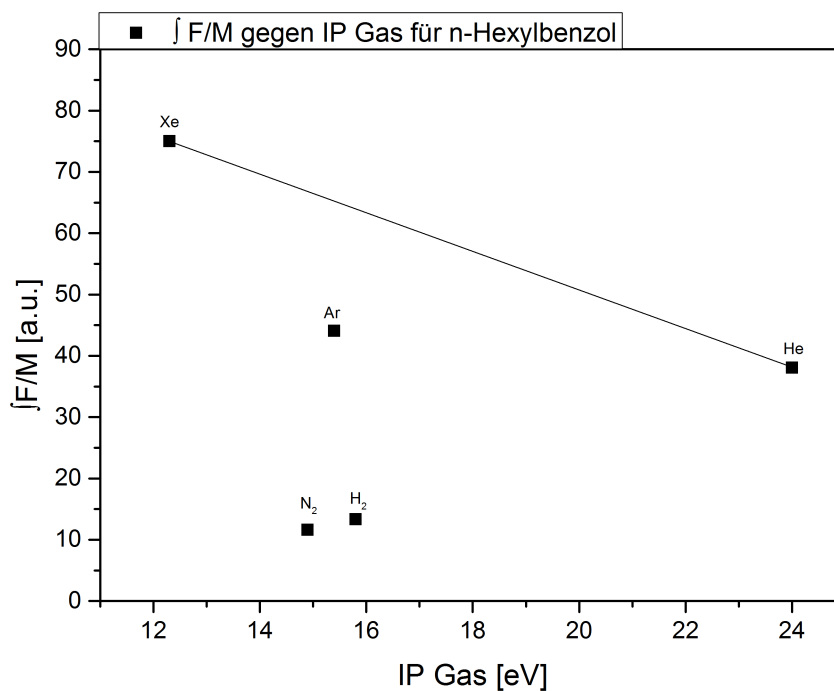


Abbildung 4.74: Aufgetragen ist das Verhältnis aus dem Integral der Fragmente und dem Integral der Muttermasse in Abhängigkeit gegen das aufsteigende IP der Projektile.

len, wie bei n-Butylbenzol. D.h. der Ladungstransfer findet überwiegend zum Ring und auf den selben angeregten kationischen Niveaus statt. Die geringe Intensität der Muttermasse

und die leicht stärkere Fragmentierung in C_2 und C_3 liegt vermutlich in Ladungsübertrag zur Alkylkette begründet. Der präferierte Kanal für die Fragmentierung des Hexylbenzols ist die Abspaltung eines Pentylrestes. Gegebenenfalls könnte der Pentylrest auch als Ganzes abgespalten werden, der dann in die zwei Fragmenteinheiten zerfallen kann. Für diese Abspaltung könnte dann der Ladungstransfer von der Alkylkette zum Phenyl-Ring verantwortlich sein. Das stärkere Auftreten der C_2H_x und C_3H_x -Fragmentationen gegenüber dem n-Butylbenzol legt aber nahe, dass sie aus einem CT auf die Hexylkette stammen. Das *electronic stopping* sollte auch hier kaum zu den Massenspektren des n-Hexylbenzols beitragen (vgl. Tabelle 4.1).

4.3.9 Cyclohexan

Das letzte Molekül, dass untersucht wurde, ist das Cyclohexan. Es unterscheidet sich von allem bisher untersuchten Molekülen dahingehend, dass diese Substanz keinen aromatischen Charakter aufweist. Es handelt sich also um einen reinen Aliphaten. Es hat mit circa 10 eV eine relativ großes Ionisierungspotential ([BK73]: 10,3 eV, [HL91]: 9,8 eV, [SM82]: 9,82 eV). Da hier der aromatische Charakter, wie z.B. im n-Hexylbenzol, fehlt, ist eine Einschätzung zur Fragmentierung zunächst schwierig. Im Vergleich zu aromatischen Ringsystemen wird man erwarten, dass Cyclohexan mehr fragmentiert. Bei einen Vergleich zu kettenartigen aliphatischen Molekülen, bei denen für die Beobachtung eines Fragments nur eine Bindung brechen muss, wird man weniger Fragmentierung erwarten. Betrachtet man die Massenspektren des Cyclohexans in den Abbildungen 4.75 bis 4.79 erkennt man zunächst recht unterschiedliche Fragmentpattern in Abhängigkeit der Projektilionen. Jedes Spektrum zeigt eine andere Intensität der Muttermasse im Verhältnis zu den Fragmenten. Zudem variiert der Basispeak von Spektrum zu Spektrum. So sind für Ar^+ und N_2^+ die C_3H_x -Einheit am Intensivsten und die C_2H_x -Einheit für He^+ . In den Massenspektren für Xe^+ und H_2^+ hingegen zeigt bei C_4H_x den intensivsten Massenpeak. Die Unterschiedlichkeit der Massenspektren legt nahe, dass die Projektilionen starke Resonanzeffekte mit unterschiedlichen Niveaus des Cyclohexans ausüben. Betrachtet man vor allem die Bildung der Muttermasse im Verhältnis zu den Fragmenten, so zeigt sich kein eindeutiges Bild. Insbesondere steht die Stärke der Fragmentierung nicht in direkter Beziehung zum maximalen Energieeintrag, wie man das ohne Resonanzeffekt erwarten würde. Es sieht so aus als ob jeweils durch den CT des jeweiligen Primärions ein anderer favorisierter Fragmentierungskanal angesprochen wird. Ein Vergleich mit dem He-I-Photoelektronenspektrum von Cyclohexan zeigt in zwei breiten Banden des PE-Spektrums Übereinstimmungen mit den Rekombinationsenergien der Projektilen zwischen 12 und 12,5 eV (Xe) und 14,2-16 eV (H_2 , Ar und N_2) [DD01], [Kim81]. Eine Resonanz mit dem Heliumkation lässt sich nur durch eine Rechnung von Deleuze et al. erahnen [DD01]. Die Tabelle 4.1 verdeutlicht durch die berechneten Werte, dass ein *electronic stopping*-Mechanismus eher unwahrscheinlich für die erhaltene Fragmentierung in den Massenspektren für Cyclohexan ist.

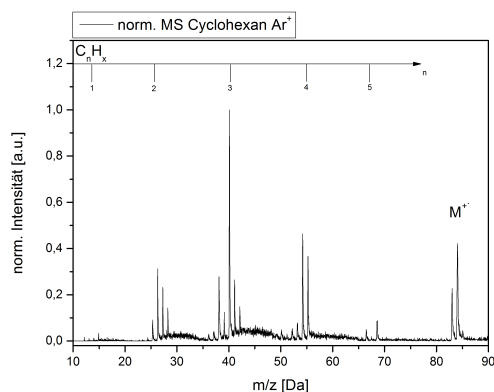


Abbildung 4.75

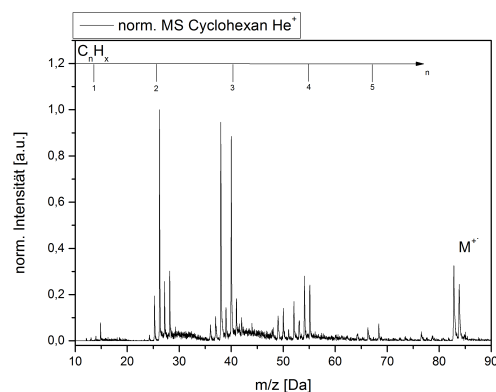


Abbildung 4.76

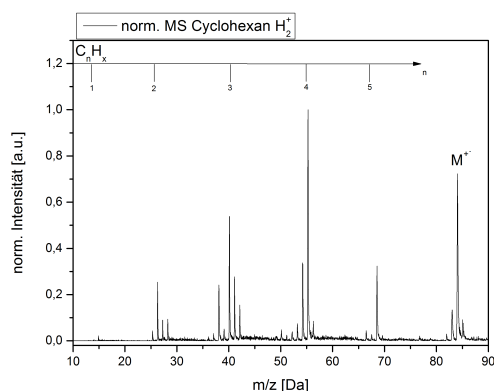


Abbildung 4.77

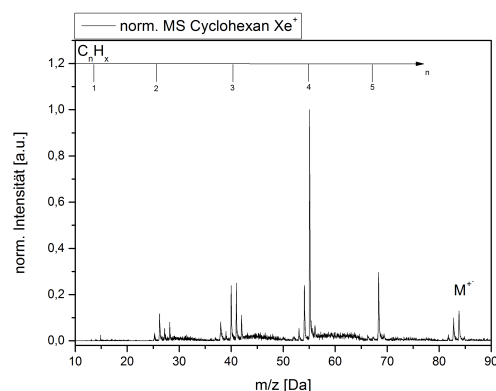


Abbildung 4.78

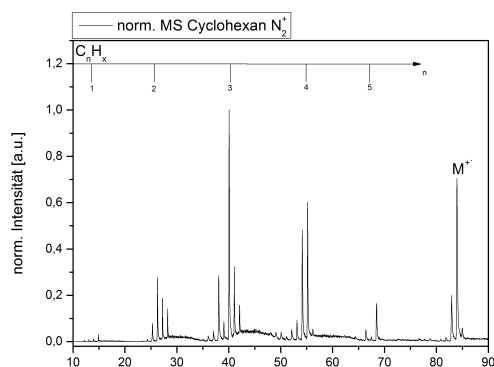


Abbildung 4.79

Die Abbildungen zeigen die normierten Massenspektren von Cyclohexan, die mit unterschiedlichen Projektilionen aufgenommen wurden. Bei den Massenspektren wurde immer auf den Basispeak normiert.

Mithilfe einer *charge transfer* eingeleiteten Dissoziation an neutralen Molekülen sollten Rückschlüsse auf die CTD an Oligopeptiden gezogen werden. Die Annahme, dass ein re-

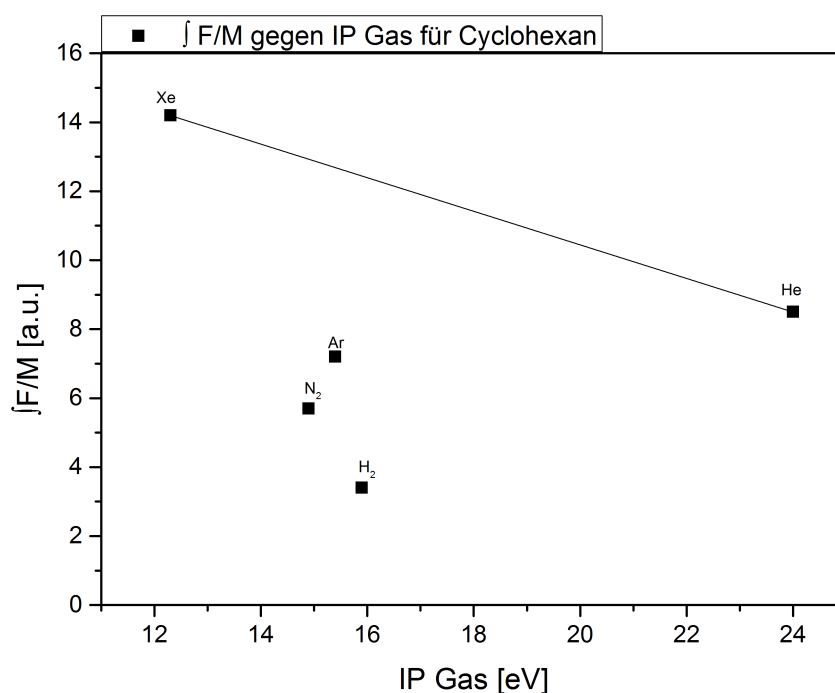


Abbildung 4.80: Aufgetragen ist das Verhältnis aus dem Integral der Fragmente und dem Integral der Muttermasse in Abhängigkeit gegen das aufsteigende IP der Projektile an Cyclohexan.

sonanter CT überwiegend an den neutralen Stellen des protonierten Peptids stattfinden sollten, wurde mit dieser Methode überprüft. Lässt man alle Ergebnisse aus diesem Kapitel nochmals Revue passieren, ist der Prozess des resonanten *charge transfers* an neutralen Molekülen eindeutig bewiesen und in gewissen Maße effizient. Die Ergebnisse zeigen vor allem die Präferenz von aromatischen System und deren Drang zur Siebenringbildung. Diese Dominanz der Aromaten ist auch für die Peptide bekannt, so zeigte die Arbeitsgruppe Jackson et al. [LJ17] und [HJ14], dass durch CTD an Peptiden überwiegend Fragmente entstehen, die in einem Zusammenhang mit einer aromatischen Aminosäure stehen. Dies könnte aber auch an einer Ladungswanderung der positiven Radikalstelle liegen. Der zweite, vielleicht auch bezüglich der Fragmentierung effizientere Mechanismus ist das *electronic stopping*. Dieser Mechanismus konnte bedingt durch den Aufbau der Apparatur (Primäri- on senkrecht zu der Flugrichtung der Targetmoleküle) weitgehend ausgeschlossen werden.

Beide Mechanismen, resonanter *charge transfer* und *electronic stopping*, sind genauer betrachtet Extremfälle der Fragmentierung von Molekülen. Während der langreichweitige

CT eher ein sanfter Methode ist, da diesbezüglich nur eine Überschussenergie (RE-IP) von wenigen Elektronenvolt überbleibt. Diese Überschussenergie sollte nicht ausreichen, um die untersuchten Moleküle bis hin zu kleinsten Fragmenten zu fragmentieren. Der *electronic stopping*-Mechanismus hingegen sollte nur zu kleinen Fragmenten führen, da die Projektilionenenergie voll in das Molekül übergeht. Demnach müsste es einen dritten Mechanismus geben, der zwischen beiden Extrema liegt und eine Erklärung liefert, dass trotz ohne *electronic stopping* zum Teil starke Fragmentierung auftritt. Bei streifenden Stößen, bei denen sich die Orbitale gerade so überlappen können, kann es bedingt durch die positive Ladung des Projektilions zur Verschiebung der Molekülorbitale im Molekül kommen, d.h. ein HOMO und ein LUMO können dabei ihre Plätze tauschen. Durch diese Verschiebung der Molekülorbitale wird deutlich mehr Energie frei, die zur Fragmentierung genutzt werden kann. So kommt man zum Ergebnis, dass die generierten Massenspektren der ETI/D-Experimente ein Produkt aus diesen dritten Mechanismus und einen resonanten CT sind.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von nicht kommerziellen Fragmentierungsmethoden bevorzugt angewendet auf Peptide. Dafür wurden folgende Methoden verwendet:

- Kühlung von laserangereten Peptiden zur Untersuchung von konsekutiven Reaktionskanälen
- die *charge transfer dissociation* (CTD) an protonierten Peptiden
- die CTD an deprotonierten Peptiden
- die *electron transfer ionization/dissociation* (ETI/D) an neutralen kleinen Kohlenwasserstoffen

Allen Experimente ist gemeinsam, dass sie sich mit der Fragmentierung von relativ großen Molekülen beschäftigen. Dabei geht es zum einen um eine möglichst vollständigen Fragmentierung, die für eine Sequenzanalyse ausreicht. Zum anderen geht es aber auch um ein Verständnis der Abläufe einschließlich der Diskussion der molekülinternen Prozesse vor dem Hintergrund bestehender Modelle.

Die ersten Experimente beruhten auf der Idee einer konsekutiven Fragmentierung von Peptiden mit einer hochenergetischen Anregung. Die Anregung besteht dabei aus der Absorption eines oder mehrerer Photonen der Wellenlänge 193 nm. Dabei findet man eine starke Fragmentierung, aber eine breite Lücke, zwischen Muttermassenpeak und den Fragmenten (meist im unteren Massenbereich). Als Folge ist der Satz an Fragmenten für eine Sequenzanalyse nicht ausreichend. Ausgehend von den Vorhersagen der RRKM-Theorie und dem Ladder-Modell wurde zur Erklärung dieses Sachverhalts die Hypothese aufgestellt, dass sich nach einem schnellen primären Dissoziationsschritt ein sekundärer metastabiler Zerfall anschließt.

Auf Basis dieser Annahme wurde ein Versuchsaufbau gewählt, der eben jene sekundären Zerfälle identifizieren und verhindern sollte. Dafür wurde das kommerzielle ESI-MS so modifiziert, das eine Photoanregung und nach Wunsch auch ein Stoß-Quenchen der Peptidmoleküle erfolgen konnte. Die Anregung erfolgte mit einem ArF-Excimer-Laser mit der

Wellenlänge 193 nm. Gleichzeitig wurde der Druck in der Ionenfalle durch einen Helium-Gaspuls schlagartig erhöht, sodass durch die resultierenden Stöße schnell (μs) Energie aus den Fragmenten der Photofragmentierung abgezogen und einen weiteren Fragmentierungsschritt verhindert werden konnte. Die Massenspektren zu diesen Versuchen zeigen eindeutig, dass in Oligopeptiden manche primäre Fragmente eine weitere sekundäre Fragmentierung ausführen. So zeigten sich mit Helium-Stoßgas eine Abnahme der Intensität von meist kleinen Fragmenten und eine Zunahme von mittleren und großen Fragmenten. In manchen Spektren tauchten sogar neue Fragmentpeaks auf, die in den Photofragment-Massenspektren ohne Helium-Stoßgas nicht zu sehen sind (z.B. vgl. Abb. 4.17 das $\text{M-Phe}_{sc}\text{-OH}$ -Fragment). Vor allem das Auftauchen von diesen mit Helium-Kühlen neu auftretenden Fragmentpeaks in den Massenspektren erweist sich in der Sequenzanalyse von Peptiden als nützlich. Diese Fragmente vervollständigen das Fragmentpattern eines Peptids und können somit die Identifikation erleichtern. Zudem können aus dem Quenchen des sekundären Schritts Informationen zum Dissoziationsmechanismus gesammelt werden, die zum weiteren Verständnis von Fragmentierungsprozessen von Peptiden beitragen können.

Ein weiteres Experiment an den Peptiden wurde mit Hilfe von schnellen meist atomaren Ionen durchgeführt. Hier galt es zu zeigen, wie gut die Methode des *charge transfer dissociation* (CTD) an protonierten und deprotonierten Peptiden funktioniert und ob sich die Fragmentierungsmethode zur Sequenzanalyse von Peptiden eignet. Die Motivation für die Experimente beruhte auf der Tatsache, dass durch die Wechselwirkung mit den schnellen Ionen via *charge transfer* eine Radikalstelle im Peptid erzeugt wird. Durch diese Radikalstelle erhoffte man sich eine Schwächung der Bindung und somit ein gänzlich anderes Fragmentierungsverhalten der Peptide im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden. Die Umsetzung des Experiments wurde durch eine erneute Modifikation des ESI-Massenspektrometers bewerkstelligt. Dazu wurde eine kommerzielle Ionenkanone (justierbar) oberhalb der Ionenfalle montiert, sodass die gefangenen Peptidionen in der Falle den schnellen Heliumionen ausgesetzt werden konnten. Im Falle der protonierten Peptide konnte der *charge transfer* durch eine Ladungserhöhung ($[\text{M}+\text{H}]^+ \rightarrow [\text{M}+\text{H}]^{2+}$) nur unter speziellen Umständen bei zwei Peptiden festgestellt werden. Leider konnten gerätebedingt (Kammerdruck zu hoch) die gewünschten Fragmente nicht erzeugt werden. Anders verhielt es sich mit den deprotonierten Peptiden. Im Gegensatz zu den positiv geladenen Peptiden, kam es hier zur einer Ladungsreduktion ($[\text{M}-\text{H}]^- \rightarrow [\text{M}-\text{H}]^{2-}$) und einer gewissen Anzahl an interessanten Fragmenten.

Das letzte Experiment resultierte aus Überlegungen zu der CTD an Peptiden. Vor allem die Wechselwirkung der protonierten Peptide mit den schnellen Kationen führt zwangsläufig einerseits zur Annahme, dass der *charge transfer*, aufgrund der Coulombabstoßung und der in seiner Nähe erhöhten Ionisierungsenergie, möglichst weit weg von der existierenden Ladung stattfinden sollte. Es stellte sich andererseits die Frage nach Resonanzeffekten zwischen den Ionisierungsenergien der Projektile und den molekularen Orbitalen. Um solche zu finden zu können, wurden auch neutrale Moleküle ionisiert und dissoziiert. So wurde im letzten Experiment die Wechselwirkung der schnellen Ionen (H_2^+ , He^+ , Ar^+ , N_2^+ und Xe^+) mit den neutralen Molekülen untersucht. Da es leider nicht möglich ist Peptide neutral in die Gasphase zu überführen, wurde kleine meist aromatische Kohlenwasserstoffe (bis Masse 200 Da) verwendet. Durch den Umstand, dass die neutralen Moleküle thermisch in die Gasphase gebracht werden müssen, musste zudem ein neues Massenspektrometer aufgebaut werden. Die Wahl fiel auf eine TOF-Massenspektrometer (vgl. Kapitel 3.8), welches wegen seiner guten Auflösung ausgesucht wurde. Zudem konnte durch den gewählten Aufbau einer zweiter Mechanismus, das *electronic stopping*, ausgeschlossen werden, dass dieser Mechanismus mit einer Impulsübertragung einhergeht und bei einem direkten Stoß die entstehenden Fragmentionen aus der linearen Flugbahn auslenken würde. So sind die entstandenen Massenspektren ein Produkt eines resonanten langreichweitigen *charge transfers*. Der Ladungsübertrag für den langreichweitigen CT sollte daher strikt resonant sein und die beteiligten schnellen Ionen sollten durch ihre Rekombinationsenergie entsprechend unterschiedliche Molekülorbitale des neutralen Moleküls ansprechen können. Bei diesen Prozess wird das Molekül nicht nur ionisiert sondern es wird im Molekül so viel Energie frei, wie es der Differenz der IPs entspricht. Ein weiterer Mechanismus liefert eine Erklärung für die zum Teil starke Fragmentierung der untersuchten Moleküle. Bei einer Wechselwirkung zwischen Ion und Molekül, bei der die MOs sehr stark gestört werden, aber noch kein voller Einschlag des Projektilions stattfindet, wird deutlich mehr Energie zur Fragmentierung frei. Die Vermutung für den Energieeintrag aller Mechanismen liegt dabei nahe, dass dies gemäß dem *ladder*-Modell geschieht. Besonders erscheint die Tatsache, dass bei den Alkylbenzolen eine besondere Präferenz zur stabilen Siebenringbildung gibt. Trotz der Dominanz der Aromaten für den *charge transfer* konnte mit der Untersuchung eines Aliphaten, dem Cyclohexan, gezeigt werden, dass der Ladungstransfer auch hier effizient erfolgen kann. Die Ergebnisse zeigen vor allem in Bezug auf den CTD an Peptiden, dass der Ladungstransfer auf den neutralen Teil eines protonierten Peptids als sehr wahrscheinlich anzusehen ist.

Da die Ergebnisse zur konsekutiven Fragmentierung vielversprechend sind, sollte diese weiter verfolgt werden, da diese Methode das Potential hat die Sequenzanalyse von Peptiden zu vereinfachen und zu vervollständigen. Da die in dieser Arbeit getätigte Modifikation der Ionenfalle für Laserzugriff und Gaspulseinlass prototypartig ist, könnten Verbesserung auf technischer Seite zu noch intensiveren Fragmentierungen und aussagekräftigeren Ergebnissen führen. Es sollte auch eine Untersuchung erfolgen, die eine Aussage darüber liefert, wie die Abhängigkeit des gepulstes He-Druckes in der Falle mit dem Quenchen der Fragmentierungsschritte zusammenhängt. Vor allem das Auftreten bisher nicht sichtbarer Fragmente sollte dabei untersucht werden. Da diese offensichtlich besonders schnell weiter fragmentieren, braucht man schnellere Kühlraten, also höhere Helium-Gasdrücke in der Falle. Das Auftreten neuer Fragmente kann auch Rückschlüsse auf Mechanismen geben, die bisher noch nicht berücksichtigt wurden.

Auch zukünftig kann die CTD, sowohl an protonierten als auch deprotonierten Peptiden, erfolgversprechend für die Sequenzanalyse sein. Die Kombination evtl. entstehender Massenspektren aus dem CTD-Prozess für positive und negative Peptide könnten komplementäre Fragmentpattern liefern, die die Analyse der Sequenz verbessern können. Der erste Schritt dahin ist insbesondere den Neutralteilchenstrom in der Ionenfalle zu unterbinden, da diese unerwünschte Reaktionen hervorrufen können. Dies ist aber mit einem linearen ESI-MS-Aufbau, wie bei dieser Arbeit verwendet, nicht möglich. Hier sollte ein entsprechendes MS-Setup gewährleistet werden, in dem man den Neutralteilchenstrom ausschließt und die Ionen in einer Falle fangen kann.

Abkürzungsverzeichnis

Ar Argon

bzw beziehungsweise

C Coulomb

crm *charge residue model*

CT *charge transfer*

CTD *charge transfer dissociation*

CID *collision induced dissociation*

Da Dalton

DLG Dual Linear Gate

DPBD Diphenylbutadien

ECD *electron capture dissociation*

EMS *electron momentum spectroscopie*

ESI Elektrospray-Ionisation

ETI/D *elctron transfer ionization/dissociation*

eV Elektronenvolt

evm *ion evaporation model*

FT-ICR-MS *Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer*

H Wasserstoff

He Helium

HOMO	highest occupied molecular orbital
IP	Ionisierungspotenzial
IVR	<i>internal vibration redistribution</i>
kV	Kilovolt
l-Modell	<i>ladder</i> -Modell
ls-Modell	<i>ladder switch</i> -Modell
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MCP	Microkanalplatten
mg	Milligramm
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
MS	Massenspektrometer
μg	Mikrogramm
N	Stickstoff
nm	Nanometer
PAK	polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PE	Photoelektron
PES	Photoelektronspektroskopie
RE	Rekombinationsenergie
RRK-Theorie	Rice-Ramsperger-Kassel-Theorie
RRKM-Theorie	Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus-Theorie
UV	Ultra-Violett
vgl	vergleiche
Xe	Xenon

Literaturverzeichnis

- [AFL72] L. Asbrink, C. Fridh, and E. Lindholm. Electronic structure of toluene from photoelectron spectroscopy and a spindo calculation. *Chemical Physics Letters*, 15(4):567–570, 1972.
- [AO72] B. Andlauer and Ch. Ottinger. Dissociation lifetimes of molecular ions produced by charge exchange. *Zeitschrift für Naturforschung A*, 27(2), 1972.
- [Bat50] D. R. Bates. Dissociative recombination. *Physical Review*, 78(4):492–493, 1950.
- [BDHM84] William D. Bowers, Sherri Sue Delbert, Richard L. Hunter, and Robert T. McIver. Fragmentation of oligopeptide ions using ultraviolet laser radiation and fourier transform mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, 106(23):7288–7289, 1984.
- [BEUS89] Charles J. Barinaga, Charles G. Edmonds, Harold R. Udseth, and Richard D. Smith. Sequence determination of multiply charged peptide molecular ions by electrospray-ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 3(5):160–164, 1989.
- [BHB75] J. F. Brandts, H. R. Halvorson, and M. Brennan. Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry*, 14(22):4953–4963, 1975.
- [BHS10] Sadia Bari, Ronnie Hoekstra, and Thomas Schlathölter. Peptide fragmentation by kev ion-induced dissociation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(14):3376, 2010.
- [BHS11] Sadia Bari, Ronnie Hoekstra, and Thomas Schlathölter. Fast side-chain losses in kev ion-induced dissociation of protonated peptides. *International Journal of Mass Spectrometry*, 299(1):64–70, 2011.

- [BK73] P. Bruckmann and M. Klessinger. Photoelektronenspektren organischer verbindungen. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 2(3):341–354, 1973.
- [BMML75] P. F. Bente, F. W. McLafferty, D. J. McAdoo, and C. Lifshitz. Internal energy of product ions formed in mass spectral reactions. degrees of freedom effect. *The Journal of Physical Chemistry*, 79(7):713–721, 1975.
- [BNS82] U. Boesl, H. J. Neusser, and E. W. Schlag. Secondary excitation of ions in a multiphoton mass spectrometer. *Chemical Physics Letters*, 87(1):1–6, 1982.
- [BPG06] David M. Black, Anne H. Payne, and Gary L. Glish. Determination of cooling rates in a quadrupole ion trap. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 17(7):932–938, 2006.
- [BR99] Damon C. Barbacci and David H. Russell. Sequence and side-chain specific photofragment (193 nm) ions from protonated substance p by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 10(10):1038–1040, 1999.
- [BSHP11] Christian Bleiholder, Sándor Suhai, Alex G. Harrison, and Béla Paizs. Towards understanding the tandem mass spectra of protonated oligopeptides. 2: The proline effect in collision-induced dissociation of protonated ala-ala-xxx-pro-ala (xxx = ala, ser, leu, val, phe, and trp). *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 22(6):1032–1039, 2011.
- [BSP⁺08] S. Bari, P. Sobocinski, J. Postma, F. Alvarado, R. Hoekstra, V. Bernigaud, B. Manil, J. Rangama, B. Huber, and T. Schlathölter. Fragmentation of alpha- and beta-alanine molecules by ions at bragg-peak energies. *The Journal of Chemical Physics*, 128(7):074306, 2008.
- [BTHZ02] Bogdan A. Budnik, Youri O. Tsybin, Per Håkansson, and Roman A. Zubarev. Ionization energies of multiply protonated polypeptides obtained by tandem ionization in fourier transform mass spectrometers. *Journal of mass spectrometry : JMS*, 37(11):1141–1144, 2002.
- [BTYW03] Linda A. Breci, David L. Tabb, John R. Yates, and Vicki H. Wysocki. Cleavage n-terminal to proline: Analysis of a database of peptide tandem mass spectra. *Analytical chemistry*, 75(9):1963–1971, 2003.

- [BWW⁺90] U. Boesl, R. Weinkauff, K. Walter, C. Weickhardt, and E. W. Schlag. Tandem time of flight techniques and multiphoton mass spectrometry: The ladder switching in benzene. *The Journal of Physical Chemistry*, 94(23):8567–8573, 1990.
- [BZ00] Bogdan A. Budnik and Roman A. Zubarev. Mh_2^{+} ion production from protonated polypeptides by electron impact: Observation and determination of ionization energies and a cross-section. *Chemical Physics Letters*, 316(1-2):19–23, 2000.
- [CB77] H. N. Cheng and F. A. Bovey. Cis-trans equilibrium and kinetic studies of acetyl-l-proline and glycyl-l-proline. *Biopolymers*, 16(7):1465–1472, 1977.
- [CGMW96] K. A. Cox, S. J. Gaskell, M. Morris, and A. Whiting. Erratum to: Role of the site of protonation in the low-energy decompositions of gas phase peptide ions. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 7(8):759, 1996.
- [CMD⁺14] Konstantin Chingin, Alexander Makarov, Eduard Denisov, Oleksii Rebrov, and Roman A. Zubarev. Fragmentation of positively-charged biological ions activated with a beam of high-energy cations. *Analytical chemistry*, 86(1):372–379, 2014.
- [Cot92] R. J. Cotter. Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Analytical chemistry*, 64(21):1027A–1039A, 1992.
- [CPLS00] István P. Csonka, Blai Paizs, Gyrgy Lendvay, and Sándor Suhai. Proton mobility in protonated peptides: A joint molecular orbital and rrkm study. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14(6):417–431, 2000.
- [CTR05] Weidong Cui, Matthew S. Thompson, and James P. Reilly. Pathways of peptide ion fragmentation induced by vacuum ultraviolet light. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 16(8):1384–1398, 2005.
- [DD01] M. S. Deleuze and J. Delhalle. Outer-valence green’s function study of cycloalkane and cycloalkyl–alkane compounds. *J. Phys. Chem. A*, (105(27)):6695–6702, 2001.
- [Di 15] Francesco Di Giacomo. A short account of rrkm theory of unimolecular reactions and of marcus theory of electron transfer in a historical perspective. *Journal of Chemical Education*, 92(3):476–481, 2015.

- [DJSW96] Ashok R. Dongré, Jennifer L. Jones, Árpád Somogyi, and Vicki H. Wysocki. Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: Evidence for the mobile proton model. *Journal of the American Chemical Society*, 118(35):8365–8374, 1996.
- [DMH⁺68] Malcolm Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, and M. B. Alice. Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics*, 49(5):2240–2249, 1968.
- [DNB⁺82] W. Dietz, H. J. Neusser, U. Boesl, E. W. Schlag, and S. H. Lin. A model for multiphoton ionisation mass spectroscopy with application to benzene. *Chemical Physics*, 66(1-2):105–127, 1982.
- [FF70] F. H. Field and J. L. Franklin. *Electron impact phenomena and the properties of gaseous ions*, volume 1 of *Pure and applied physics*. Acad. Press, New York, NY, rev. ed. edition, 1970.
- [FMM⁺90] John B. Fenn, Matthias Mann, Chin Kai Meng, Shek Fu Wong, and Craig M. Whitehouse. Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*, 9(1):37–70, 1990.
- [GM93] L. Griffin and D. McAdoo. The effect of ion size on rate of dissociation: Rrkm calculations on model large polypeptide ions. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 4(1):11–15, 1993.
- [GM96] Douglas E. Goeringer and Scott A. McCluckey. Kinetics of collision-induced dissociation in the paul trap: A first-order model. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(3):328–334, 1996.
- [Gri08] Jennifer Griffiths. A brief history of mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 80(15):5678–5683, 2008.
- [Har97] Alex. G. Harrison. The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, 16(4):201–217, 1997.
- [HJ14] William D. Hoffmann and Glen P. Jackson. Charge transfer dissociation (ctd) mass spectrometry of peptide cations using kiloelectronvolt helium cations. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 25(11):1939–1943, 2014.

- [HL91] J. L. Holmes and F. P. Lossing. Ionization energies of homologous organic compounds and correlation with molecular size. *Organic Mass Spectrometry*, 26(6):537–541, 1991.
- [HRD76] Bruce S. Hudson, J. Neil A. Ridyard, and James Diamond. Polyene spectroscopy. photoelectron spectra of the diphenylpolyenes. *Journal of the American Chemical Society*, 98(5):1126–1129, 1976.
- [HSN17] Klavs Hansen, Camilla Skinnerup Byskov, and Steen Brøndsted Nielsen. Energy flow in peptides after uv photoexcitation of backbone linkages. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 19(30):19640–19645, 2017.
- [IT76] J. V. Iribarne and B. A. Thomson. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*, 64(6):2287–2294, 1976.
- [JDSW94] Jennifer L. Jones, Ashok R. Dongre, Arpad Somogyi, and Vicki H. Wysocki. Sequence dependence of peptide fragmentation efficiency curves determined by electrospray ionization/surface-induced dissociation mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, 116(18):8368–8369, 1994.
- [JMB88] Richard S. Johnson, Stephen A. Martin, and Klaus Biemann. Collision-induced fragmentation of $(m + h)^+$ ions of peptides. side chain specific sequence ions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 86:137–154, 1988.
- [Kas28] Louis Stevenson Kassel. The region of existence of unimolecular reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 50(5):1344–1352, 1928.
- [KH88] M. Karas and F. Hillenkamp. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry*, 60(20):2299–2301, 1988.
- [Kim81] K. Kimura. *Handbook of HeI photoelectron spectra of fundamental organic molecules: Ionization energies, ab initio assignments, and valence electronic structure for 200 molecules*. Tokyo, 1981.
- [Kim85] Kimura. Charge transfer in ion-molecule collisions at kev energy regime: Study of $h^{++}h$. *Physical review. A, General physics*, 32(2):802–809, 1985.
- [KMOH88] Takashi Kajiwara, Shigeru Masuda, Koichi Ohno, and Yoshiya Harada. Application of penning ionization electron spectroscopy to assignments of electron

- spectroscopic bands of anthracene. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (4):507, 1988.
- [KT74] T. Koenig and M. Tuttle. Photoelectron spectra of mesitylene derivatives. electronic interactions between arene ion groups. *The Journal of Organic Chemistry*, 39(9):1308–1311, 1974.
- [LJ17] Pengfei Li and Glen P. Jackson. Charge transfer dissociation (ctd) mass spectrometry of peptide cations: Study of charge state effects and side-chain losses. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 28(7):1271–1281, 2017.
- [Mar52a] R. A. Marcus. Lifetimes of active molecules. i. *The Journal of Chemical Physics*, 20(3):352–354, 1952.
- [Mar52b] R. A. Marcus. Lifetimes of active molecules. ii. *The Journal of Chemical Physics*, 20(3):355–359, 1952.
- [McL92] Scott A. McLuckey. Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 3(6):599–614, 1992.
- [MHKB90] Stephen A. Martin, James A. Hill, Carter Kittrell, and Klaus Biemann. Photon-induced dissociation with a four-sector tandem mass spectrometer. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 1(1):107–109, 1990.
- [MHP01] M. Mann, R. C. Hendrickson, and A. Pandey. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual review of biochemistry*, 70:437–473, 2001.
- [MM68] P. Mahadevan and G. D. Magnuson. Low-energy (1- to 100-ev) charge-transfer cross-section measurements for noble-gas-ion collisions with gases. *Physical Review*, 171(1):103–109, 1968.
- [MM05] J. Mitchell Wells and Scott A. McLuckey. Collision-induced dissociation (cid) of peptides and proteins. 402:148–185, 2005.
- [MR51] R. A. Marcus and O. K. Rice. The kinetics of the recombination of methyl radicals and iodine atoms. *The Journal of Physical Chemistry*, 55(6):894–908, 1951.

- [MR06] Joseph W. Morgan and David H. Russell. Comparative studies of 193-nm photodissociation and tof-tofms analysis of bradykinin analogues: The effects of charge site(s) and fragmentation timescales. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 17(5):721–729, 2006.
- [MYK05] Jeong Hee Moon, So Hee Yoon, and Myung Soo Kim. Photodissociation of singly protonated peptides at 193 nm investigated with tandem time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(22):3248–3252, 2005.
- [NLH⁺08] C. G. Ning, Z. H. Luo, Y. R. Huang, B. Hajgató, F. Morini, K. Liu, S. F. Zhang, J. K. Deng, and M. S. Deleuze. Investigation of the molecular conformations of ethanol using electron momentum spectroscopy. *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics*, 41(17):175103, 2008.
- [Pap95] Ioannis A. Papayannopoulos. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, 14(1):49–73, 1995.
- [PBH⁺10] J. Postma, S. Bari, R. Hoekstra, A. G. G. M. Tielens, and T. Schlathölter. Ionization and fragmentation of anthracene upon interaction with kev protons and alpha particles. *The Astrophysical Journal*, 708(1):435–444, 2010.
- [PDTG00] S. H. Pullins, R. A. Dressler, R. Torrents, and D. Gerlich. Guided-ion beam measurements of $\text{Ar}^+ + \text{Ar}$ symmetric charge-transfer cross sections at ion energies ranging from 0.2 to 300 eV. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 214(9):1025, 2000.
- [PHTS14] J. Postma, R. Hoekstra, A. G. G. M. Tielens, and T. Schlathölter. A molecular dynamics study on slow ion interactions with the polycyclic aromatic hydrocarbon molecule anthracene. *The Astrophysical Journal*, 783(1):61, 2014.
- [PS53] W. Paul and H. Steinwedel. "notizen: Ein neues massenspektrometer ohne magnetfeld". *Zeitschrift für Naturforschung A*, 8(7):448–450, 1953.
- [PS01] B. Paizs and S. Suhai. Theoretical study of the main fragmentation pathways for protonated glycylglycine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(8):651–663, 2001.

- [PS05] Béla Paizs and Sándor Suhai. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(4):508–548, 2005.
- [Ray82] Rayleigh. Xx. on the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 14(87):184–186, 1882.
- [RF84] P. Roepstorff and J. Fohlman. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical mass spectrometry*, 11(11):601, 1984.
- [RG07] Philip M. Remes and Gary L. Glish. Collisional cooling in a quadrupole ion trap at sub-ambient temperatures. *International Journal of Mass Spectrometry*, 265(2-3):176–181, 2007.
- [RLSW99] F. Remale, R. D. Levine, E. W. Schlag, and R. Weinkauf. Electronic control of site selective reactivity: A model combining charge migration and dissociation. *J. Phys. Chem. A*, 103(49):10149–10158, 1999.
- [RR27] Oscar Knefler Rice and Herman C. Ramsperger. Theories of unimolecular gas reactions at low pressures. *Journal of the American Chemical Society*, 49(7):1617–1629, 1927.
- [RR28] Oscar Knefler Rice and Herman C. Ramsperger. Theories of unimolecular gas reactions at low pressures. ii. *Journal of the American Chemical Society*, 50(3):617–620, 1928.
- [SFH89] Jeffrey I. Steinfeld, Joseph S. Francisco, and William L. Hase. *Chemical kinetics and dynamics*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1989.
- [SL89] E. W. Schlag and R. D. Levine. On the unimolecular dissociation of large molecules. *Chemical Physics Letters*, 163(6):523–530, 1989.
- [SLB⁺90] Richard D. Smith, Joseph A. Loa, Charles J. Barinaga, Charles G. Edmonds, and Harold R. Udseth. Collisional activation and collision-activated dissociation of large multiply charged polypeptides and proteins produced by electrospray ionization. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 1(1):53–65, 1990.

- [SLE⁺90] R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, and H. R. Udseth. New developments in biochemical mass spectrometry: Electrospray ionization. *Analytical chemistry*, 62(9):882–899, 1990.
- [SM82] L. Wayne Sieck and Michael Mautner. Ionization energies and entropies of cycloalkanes. kinetics of free energy controlled charge-transfer reactions. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(18):3646–3650, 1982.
- [Son17] Sonnenberg M. *Fragmentierung von Peptiden durch CT mitschnellen Ionen: Versuch einer Effizienzsteigerung*. 2017.
- [SS15] Philipp A. M. Schmidpeter and Franz X. Schmid. Prolyl isomerization and its catalysis in protein folding and protein function. *Journal of molecular biology*, 427(7):1609–1631, 2015.
- [TCR07] Matthew S. Thompson, Weidong Cui, and James P. Reilly. Factors that impact the vacuum ultraviolet photofragmentation of peptide ions. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 18(8):1439–1452, 2007.
- [Tod91] John F. J. Todd. Ion trap mass spectrometer—past, present, and future (?). *Mass Spectrometry Reviews*, 10(1):3–52, 1991.
- [TWI⁺88] Koichi Tanaka, Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida, Tamio Yoshida, and T. Matsuo. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8):151–153, 1988.
- [WFM90] Evan R. Williams, Jorge J. P. Furlong, and Fred W. McLafferty. Efficiency of collisionally-activated dissociation and 193-nm photodissociation of peptide ions in fourier transform mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 1(4):288–294, 1990.
- [WM55] W. C. Wiley and I. H. McLaren. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. *Review of Scientific Instruments*, 26(12):1150–1157, 1955.
- [WM13] David M. Wardlaw and R. A. Marcus. Reprint of: Rrkm reaction rate theory for transition states of any looseness. *Chemical Physics Letters*, 589:23–25, 2013.
- [Wol13] Wolters N. *Sequenzielle Multiphotonen-Multichromophoren-Dissoziation an Peptiden*. 2013.

- [WS53] M. M. Wolff and W. E. Stephens. A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Review of Scientific Instruments*, 24(8):616–617, 1953.
- [WSM⁺96] R. Weinkauff, P. Schanen, A. Metsala, E. W. Schlag, M. Bürgle, and H. Kessler. Highly efficient charge transfer in peptide cations in the gas phase: Threshold effects and mechanism. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(47):18567–18585, 1996.
- [WSY⁺95] R. Weinkauff, P. Schanen, D. Yang, S. Soukara, and E. W. Schlag. Elementary processes in peptides: Electron mobility and dissociation in peptide cations in the gas phase. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(28):11255–11265, 1995.
- [WT SB00] Vicki H. Wysocki, George Tsaprailis, Lori L. Smith, and Linda A. Brei. Mobile and localized protons: A framework for understanding peptide dissociation. *Journal of mass spectrometry : JMS*, 35(12):1399–1406, 2000.
- [WWW⁺89] R. Weinkauff, K. Walter, C. Weickhardt, U. Boesl, and E. W. Schlag. Laser tandem mass spectrometry in a time of flight instrument. *Zeitschrift für Naturforschung A*, 44(12):1219–1225, 1989.
- [YF84] Masamichi Yamashita and John B. Fenn. Electrospray ion source. another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*, 88(20):4451–4459, 1984.
- [ZHF⁺00] R. A. Zubarev, D. M. Horn, E. K. Fridriksson, N. L. Kelleher, N. A. Kruger, M. A. Lewis, B. K. Carpenter, and F. W. McLafferty. Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations. *Analytical chemistry*, 72(3):563–573, 2000.
- [ZKM98] Roman A. Zubarev, Neil L. Kelleher, and Fred W. McLafferty. Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. a nonergodic process. *Journal of the American Chemical Society*, 120(13):3265–3266, 1998.
- [Zub04] Roman A. Zubarev. Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004 // 15(15 // 1):12–16, 2004.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Allgemeines Schema eines Massenspektrometers	4
2.2	Schematische Darstellung des verwendeten ESI-MS	7
2.3	Darstellung des Elektrospray-Verfahrens	9
2.4	Schematische Darstellung eines TOF-MS	12
2.5	Abzugsproblematik	13
2.6	Prinzip Reflektron	14
2.7	Peptidbindung	15
2.8	Roerpstorff-Fohlmann-Nomenklatur	19
2.9	Fragmente nach Johnson und Biemann	20
2.10	RRKM-Darstellung	25
2.11	Einfluss der Zustandsdichte	28
2.12	RRKM-Verhalten	33
2.13	ladder- und ladder switch-Modell	35
2.14	modifiziertes ladder-Modell	36
2.15	Zuwachs der internen Energie bei der Stoßfragmentierung	39
2.16	Multiphotenanregung	41
2.17	Reichweite des <i>charge transfers</i>	46
2.18	Barrierenunterdrückung	47
2.19	Einschritt- Anregungs- und Fragmentierungs-Modells	49
2.20	Konsekutiv-Modell	50
2.21	Fragmentpattern	51
3.1	Einfluss der Essigsäure	54
3.2	TrapDive	55
3.3	Lasereinkopplung	56
3.4	RF-Fallenverlauf	57
3.5	Trigger	58
3.6	Triggerschaltung	59
3.7	Triggerschaltung	61

3.8	Self-Built-MS	64
4.1	LWL	66
4.2	Vergleich der Massenspektrum LWL	67
4.3	LW	69
4.4	Vergleich der Massenspektren von LW	69
4.6	GW	71
4.5	Vergleich der Massenspektren von GW	72
4.7	GGG	73
4.8	Vergleich der Massenspektren von GGG	74
4.9	AAA	74
4.10	Vergleich der Massenspektren von AAA	76
4.11	LLL	77
4.12	Vergleich der Massenspektren von LLL	77
4.13	LLL	79
4.14	Vergleich der Massenspektren von LWM	80
4.15	Vergleich der Massenspektren von LWMR	81
4.16	LWMR	81
4.17	Vergleich der Massenspektren von RGPFP	83
4.18	alpha-Substanz 1B	84
4.19	Angiotensin III	86
4.20	Vergleich der Massenspektren von Angiotensin III	86
4.21	Abschätzung Coulombrepulsion Substanz P	90
4.22	CTD-Massenspektrum Substanz P M^+	92
4.23	CTD-Spektrum Substanz P M^{2+}	93
4.24	CTD-Spektrum von Cytochrom C	95
4.25	CTD-Massenspektren von Cytochrom C im negativ Modus	97
4.26	Angiotensin II	98
4.27	CTD-Spektrum von Angiotensin II im negativ Modus	99
4.28	RINAEIIKDI	100
4.29	CTD-Spektrum von RINAEIIKDI im negativ Modus	101
4.30	ETI/D-Spektrum von Cyclohexan mit Xenon	105
4.31	ETI/D-Spektrum von Toluol mit Xenon	107
4.32	Ethanol an Argon	108
4.33	Ethanol an Helium	108
4.34	Ethanol an Wasserstoff	108

4.35 Ethanol an Xenon	108
4.36 Ethanol an Stickstoff	109
4.37 Auftragung F/M für Ethanol	110
4.38 Toluol an Argon	111
4.39 Toluol an Helium	111
4.40 Toluol an Wasserstoff	111
4.41 Toluol an Xenon	111
4.42 Toluol an Stickstoff	112
4.43 Bildung des Tropylium-Ions	112
4.44 Auftragung F/M für Toluol	113
4.45 Toluol an Argon	115
4.46 Toluol an Helium	115
4.47 Toluol an Wasserstoff	115
4.48 Toluol an Xenon	115
4.49 Toluol an Stickstoff	116
4.50 Auftragung F/M für Mesitylen	117
4.51 Anthracen an Argon	118
4.52 Anthracen an Helium	118
4.53 Anthracen an Wasserstoff	118
4.54 Anthracen an Xenon	118
4.55 Anthracen an Stickstoff	119
4.56 Auftragung F/M für Anthracen	121
4.57 DPBD an Argon	122
4.58 DPBD an Helium	122
4.59 DPBD an Wasserstoff	122
4.60 DPBD an Xenon	122
4.61 DPBD an Stickstoff	123
4.62 Auftragung F/M für Diphenylbutadien	124
4.63 BB an Argon	125
4.64 BB an Helium	125
4.65 BB an Wasserstoff	125
4.66 BB an Xenon	125
4.67 BB an Stickstoff	126
4.68 Auftragung F/M für n-Butylbenzol	126
4.69 HB an Argon	128

4.70	HB an Helium	128
4.71	HB an Wasserstoff	128
4.72	HB an Xenon	128
4.73	HB an Stickstoff	129
4.74	Auftragung F/M für n-Hexylbenzol	129
4.75	Cyclohexan an Argon	132
4.76	Cyclohexan an Helium	132
4.77	Cyclohexan an Wasserstoff	132
4.78	Cyclohexan an Xenon	132
4.79	Cyclohexan an Stickstoff	132
4.80	Auftragung F/M für Cyclohexan	133

Anhang

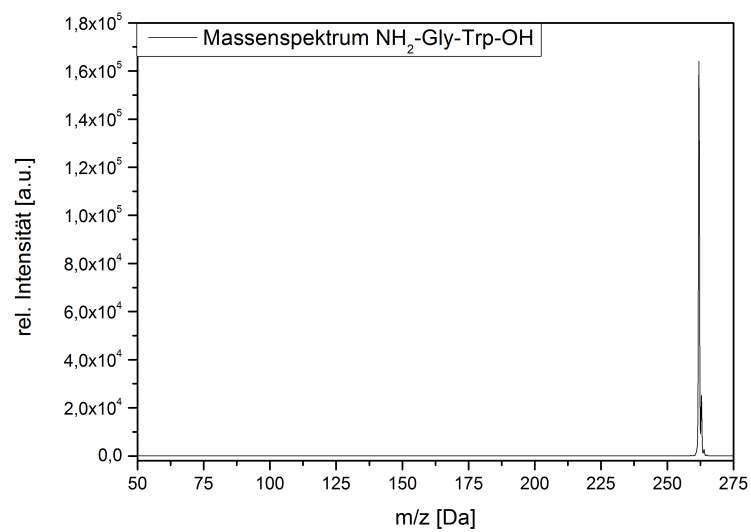


Abbildung 5.1: Massenspekttrum GW

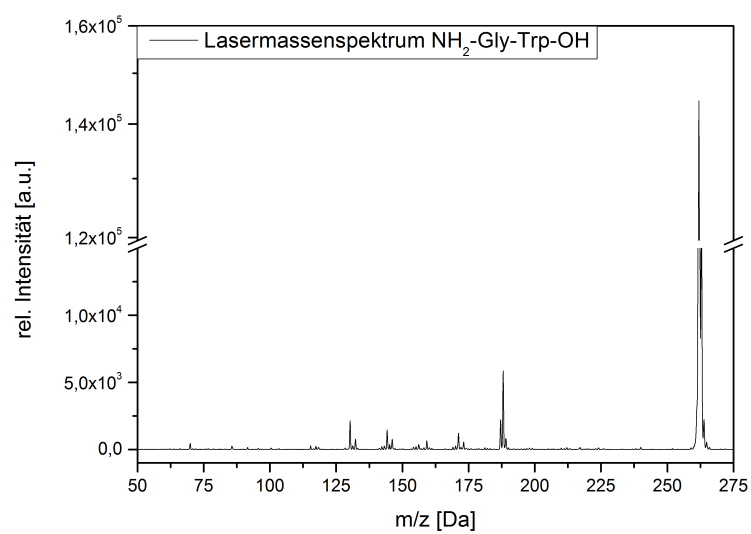


Abbildung 5.2: Lasermassenspektrum GW

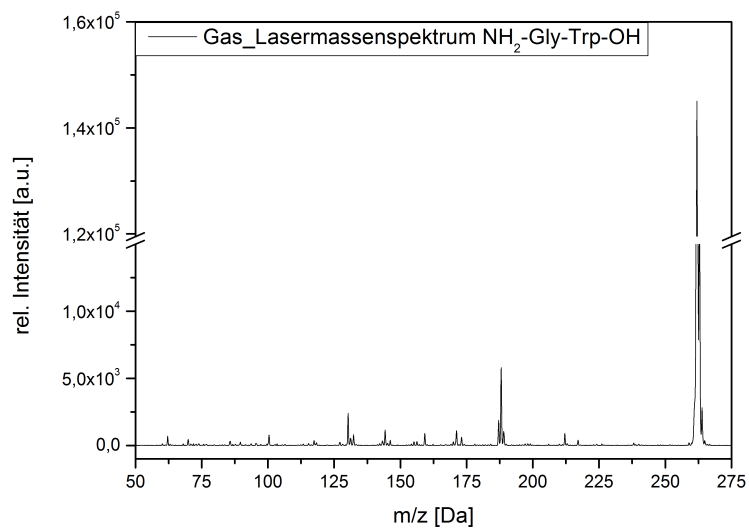


Abbildung 5.3: Gas-Lasermassenspektrum GW

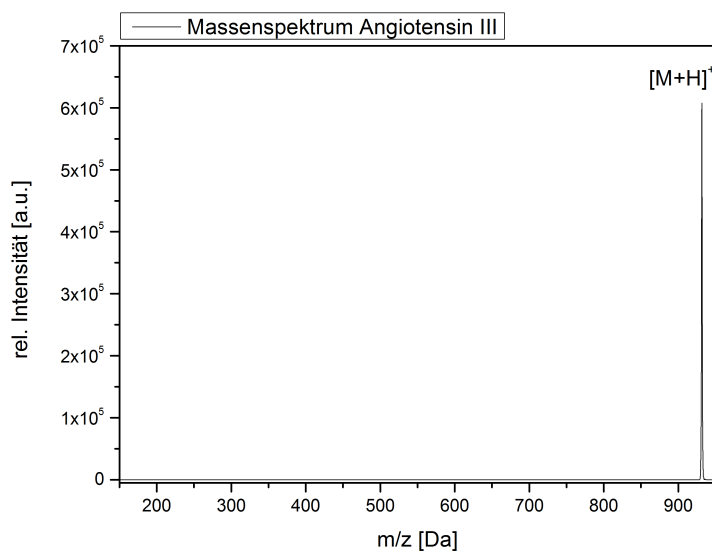


Abbildung 5.4: Massenspekttrum Angiotensin III

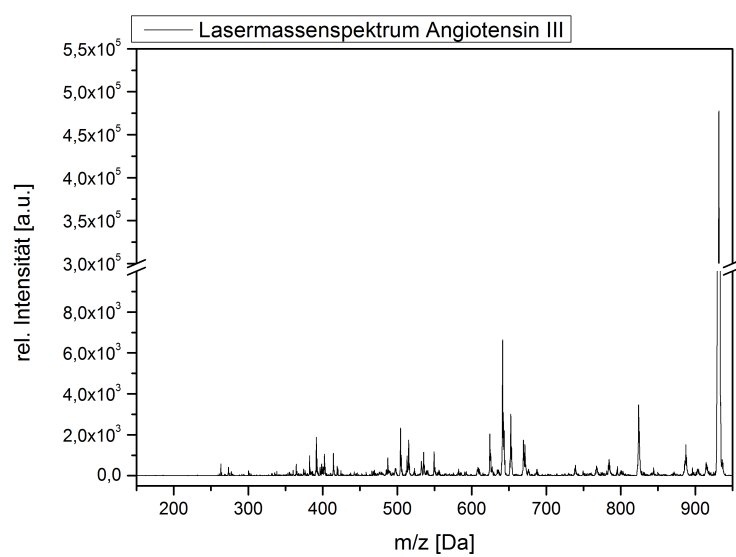


Abbildung 5.5: Lasermassenspektrum Angiotensin III

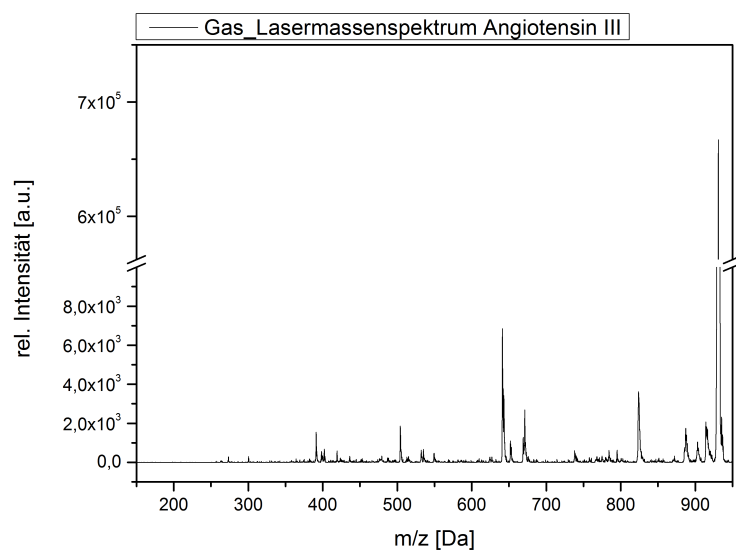


Abbildung 5.6: Gas-Lasermassenspektrum Angiotensin III

[Rechnungen]Rechnung zu Coulombpotenzial bei Substanz P

$$\Phi = \frac{Q}{4 * \pi * \epsilon_0 * R} \quad (5.1)$$

$$Q = 1,602 * 10^{-19} \text{ C}, \epsilon_0 = 8,8541 \text{ C/Vm}$$

Abstand R [m]	Φ [eV]
5,684E-09	0,25330855
5,537E-09	0,260033555
4,34E-09	0,331752488
3,745E-09	0,384460827
2,996E-09	0,480576034
2,247E-09	0,640768045
1,505E-09	0,956681592
7,49E-10	1,922304134

Näherung zum Impulsübertrag von schnellen Ionen auf Neutalmolekül

Beispiel für das Paar H_2^+ und Ethanol

$$E_{kin} = \frac{p^2}{2m} = U * e \quad (5.2)$$

$$p_{\%} = \frac{p_i}{p_m} = \sqrt{\frac{U_i * m_i}{U_m * m_m}} \quad (5.3)$$

i = Ion; m=Molekül

$U_i = 3000 \text{ V}$; $U_m = 850 \text{ V}$; $m_i = 3,347 * 10^{-27} \text{ kg}$ für H_2 und $m_m = 7,65 * 10^{-26} \text{ kg}$ für Ethanol

$$p_{\%} = 0,3929 \quad (5.4)$$