

# Peptidcluster in der Gasphase

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



vorgelegt von

Osama Abd Elrahman

Kiel, 2003

# Erklärung

Die vorgelegte Arbeit

Peptidcluster in der Gasphase

Ist nach Form und Inhalt (abgesehen von der Beratung durch meinen akademischen Lehrer, Prof. Dr.Dr. J. Grotemeyer) meine eigene Arbeit.

Osama Abd Elrahman

## **Widmung**

Der Seele meines Vaters, der dies gerne miterlebt hätte,  
meiner Mutter, die viele Opfer für mich erbracht hat,  
meiner Schwester  
und  
meiner Familie:  
besonders meiner Frau Samya, die mir immer zur Seite stand  
und meinen kleinen Töchtern Sarah und Sophia

## **Kurze Zusammenfassung der Promotionsarbeit (Peptidcluster in der Gasphase)**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels eines Laser-Massenspektrometers die Clusterbildung aufgrund nicht-kovalenter Wechselwirkungen, zwischen Matrixmolekülen und kurzkettigen Peptiden (Di-, Tri- und Tetrapeptiden) untersucht. Nach der Desorption mit einem IR-Laser werden die Moleküle mit einem Überschallgasstrahl (Jet) in die Ionisationskammer transportiert und dabei gleichzeitig in ihren inneren Freiheitsgraden abgekühlt. Dies ermöglicht die Bildung von schwach gebundenen Clustern.

In der vorliegenden Arbeit konnten mit der Kombination aus Laserdesorption von neutralen Molekülen in einen Jet und Multiphotonen-Ionisation thermolabiler Verbindungen Cluster aus Peptiden nachgewiesen werden. Diese Peptide werden nicht durch direkte Photoionisation gebildet, da die Moleküle über kein chromophores System verfügen. Um diese nicht chromophoren Peptide zu detektieren, wurden diese mit verschiedenen Derivaten der Benzoesäure bzw. Zimtsäure, die üblicherweise als Matrixsubstanzen in der Matrixunterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI) eingesetzt werden, vermessen.

In einer Vielzahl von Clusteruntersuchungen konnte erfolgreich gezeigt werden, dass:

- die Bildung von Peptidcluster mit Nanosekunden-Laserpulsen in der Gasphase möglich ist.
- die Bildung von protonierten homogenen Peptidclustern bzw. heterogenen Cluster der Matrix möglich ist.

Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass neben der Bildung von Clustern in der Gasphase, erstmalig auch Gasphasenreaktionen nachgewiesen werden konnten. Neben der einfachen Proton-Übertragung wurden auch Reaktionen zwischen dem Protonendonator und dem Peptid beobachtet.

Folgende Ergebnisse in Bezug auf Gasphasenreaktionen mit Tryptophan als Protonendonator sind hier aufgeführt.

- Die Wasserabspaltung aus dem ionisierten Peptid-Matrix-Cluster zeigt, dass man Peptid-Ketten-Verlängerungen und damit Peptidbindungen in der Gasphase beobachten kann.
- Die relative Signalintensität der Wasserabspaltungssignale nimmt bei Übergang von 260 nm zu 290 nm zu. Das bedeutet, dass die Reaktion der Peptidbindungsbildung eine geringere Aktivierungsenergie besitzt.
- Beim dissoziativen Protonentransfer wird das Proton vom Stickstoff des Indolrings des Tryptophans auf das Analytmolekül übertragen. Dies konnte durch Experimente mit geschützten Derivaten des Tryptophans bewiesen werden.
- Charakteristische Fragmentierungsbäume für Tri- und Tetrapeptide wurden mit Hilfe der Massenspektren dargestellt.

Basierend auf den Ergebnissen der Fragmentierungsreaktionen in zahlreichen Versuchen von Di- Tri und Tetrapeptiden mit Vanillinsäure als Matrix, und durch zusätzliche Experimente mit vollständiger Deuterierung des phenolischen Protons und des carboxylischen Protons der Vanillinsäure konnte bei den Di- Tri- und Tetrapeptiden unter identischen experimentellen Bedingungen nachgewiesen werden, dass der intramolekulare Protonentransfer von der N-terminalen Seite der Peptidkette zur C-terminalen Seite stattfindet.

## Abstract of the thesis (peptide cluster in the gaseous phase)

In this work the formation of clusters caused by non-covalent interactions between matrix molecules and short-chain peptides (i.e. di-, tri- and tetra-peptides) has been investigated by using a laser mass spectrometer. After the desorption achieved by using IR laser radiation the molecules are transported with the support of a supersonic jet into the ionisation chamber. Thus their internal degrees of freedom are cooled. As a result the formation of weakly bonded clusters are observed.

The formation of clusters in the gas phase consisting of peptides could be shown by using a combination of laser desorption and multi photon ionisation. Under the ionization conditions a direct ionization of these peptides is not possible because they lack an adequate chromophoric system. The cluster have been detected by mixing with several derivatives of benzoic acid and cinnamic acid, which are standard matrix substances to be used in the matrix assisted laser desorption / ionisation technique.

The measurements demonstrate that the formation of peptide clusters in the gas phase are possible by applying nano-second laser pulses. Additionally the formation of protonated homogenous peptide clusters respectively heterogeneous clusters of the matrix can be observed.

Besides the formation of clusters in the gas phase, a further result of this work shows the possibility of gas phase reaction in the cluster. The simple proton transfer reaction as well as reactions between then proton donator and the peptide are observed.

The following results regarding the gas phase reaction with tryptophan as a proton donator show:

- The separation of water from the ionised peptide-matrix-cluster shows that it is possible to observe the prolongation of the peptide chain and thus the formation of peptide bonding in the gas phase for the first time.
- The relative intensity of the signals of the separation of water increases when changing from 260 nm to 290 nm. This means, that the reaction of peptide bond-formation has a lower activation energy.
- During the dissociative proton transfer the proton is transferred from the nitrogen of the indole ring of tryptophan to the analyte molecule. This could be demonstrated in experiments with protected derivatives of tryptophan.
- Characteristic patterns of fragmentation pathway could be shown with help of mass spectra for tri- and tetra-peptides.

Based on the results of the fragmentation reactions in many experiments between di-, tri- and tetra-peptides and vanillic acid as matrix, and on additional experiments with complete deuteration of the phenolic proton and the carboxylic proton of the vanillic acid it could be demonstrated that the intramolecular proton transfer is performed from the n-terminal side of the peptide chain to the c-terminal side.

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Das Multiphotonen-Ionisations-Flugzeitmassenspektrometer .....</b>	<b>8</b>
2.1.1	Grundlagen der Flugzeitmassenspektrometrie.....	8
2.1.2	Verbesserung der Auflösung von Flugzeit-Massenspektrometer .....	10
2.1.3	Die Multiphotonen-Ionisation.....	13
2.1.4	Phänomenologische Beschreibung .....	13
2.1.5	Der einstellbare Grad der Fragmentierung.....	16
2.1.6	Apparativer Aufbau.....	22
<b>3</b>	<b>Clusterbildung.....</b>	<b>25</b>
3.1.1	Adiabatische Expansion eines idealen Gases.....	25
3.1.2	Theorie der Clusterbildung .....	35
3.2	Darstellung und Reaktivität schwach gebundener Cluster .....	37
3.2.1	Bedeutung von Cluster.....	37
3.2.2	Bindungsenergien von Clustern.....	38
3.2.3	Breakdown-Methode.....	40
3.2.4	Kinetic shift.....	40
3.3	Klassifikation und Intermolekulare Wechselwirkungen von Clustern .....	41
3.3.1	Klassifikation von Clustern.....	41
3.3.2	Intermolekulare Wechselwirkungen von Clustern.....	43
3.3.3	Laserdesorption intakte neutraler Moleküle in einen Überschallgasstrahl .....	48
3.3.4	Modellvorstellungen zum laserinduzierten desorptions-prozeß .....	50
3.3.5	Thermisches Desorptions-Modell .....	51
3.3.6	Nicht-thermische –nicht resonantes Desorptionsmodell.....	54
3.3.7	Nicht thermisches- resonantes Desorptionsmodell.....	57
3.3.8	Experimenteller Aufbau der Laserdesorption in einen Überschallgasstrahl....	59

<b>4</b>	<b>Peptidsynthese.....</b>	<b>62</b>
4.1	Peptidbindung und Bauprinzip .....	62
4.1.1	Nomenklatur .....	63
4.1.2	Ampholytcharakter, Löslichkeit und Hydratation .....	64
4.1.3	Strukturen der Polypeptide .....	65
4.1.3.1	Primärstruktur .....	66
4.1.3.2	Sekundärstruktur.....	67
4.1.3.3	Tertiärstruktur .....	72
4.1.4	Spaltung der Peptidbindung.....	73
4.1.4.1	Nicht enzymatische Methoden .....	73
4.1.4.2	Enzymatische Spaltungen.....	74
4.2	Biologische Funktionen und Bedeutungen.....	75
4.3	Peptidsynthese .....	79
4.3.1	Einleitung.....	79
4.3.2	Prinzip der Peptidsynthese.....	80
4.3.3	Synthesemethoden .....	83
4.4	.....	84
<b>5</b>	<b>Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden .....</b>	<b>85</b>
5.1	Untersuchungen von MALDI-Matrix Substanzen.....	85
5.2	Untersuchung zur Clusterbildung von MALDI-Matrizes mit Peptiden .....	93
5.2.1	Cluster Massenspektren von Dipeptiden mit MALDI-Matrizes .....	95
5.2.2	Cluster Massenspektren von Tripeptiden mit MALDI-Matrizes.....	104
5.2.3	Cluster Massenspektren von Tripeptiden mit weiteren MALDI-Matrizes.....	114
5.2.4	Cluster Massenspektren von Tetrapeptiden mit MALDI-Matrize.....	124
5.3	Untersuchungen zur Erklärung des Mechanismus des dissoziativen Protonen- transfers (dPT). .....	132
5.3.1	Experimente mit derivatisierten Matrizes: selektive Blockierung des hydroxyliischen Protons .....	133
5.3.2	Selektive Blockierung der aciden Matrixprotonen.....	137

<b>6</b>	<b>Untersuchungen der Bildung von Peptidbindungen in der Gasphase.....</b>	<b>140</b>
	Tryptophan Experimente .....	140
	6.1.1    Untersuchung zur Clustebildung von Tri-und Tetrapeptiden mit Tryptophan als Matrix. ....	151
	6.1.2    Einfluss der Ionisationswellenlänge auf die Wasser-enspaltung .....	159
	6.1.3    Untersuchungen zur Fragestellung welches Proton des Tryptophans auf das Peptidmolekül übertragen wird .....	161
<b>7</b>	<b>Protonentransfer über die Peptidbindung.....</b>	<b>165</b>
	7.1    Elektronentransfer (ET) .....	165
	7.1.1    Photoinduzierter Elektronentransfer .....	167
	7.1.2    Energetik des Elektronentransfers .....	168
	7.1.3    Charge resonance-Wechselwirkung und dissoziativer ET.....	169
	7.2    Protonentransfer (PT).....	171
	7.2.1    Intramolekularer Protonen Transfer in Peptiden.....	173
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>188</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>193</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>201</b>
	10.1    Anhang A .....	201
	10.2    Anhang B .....	208



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Taldefinitionen des Auflösungsvermögen .....	11
Abbildung 2-2: Ursachen der Signalverbreitung bei einem TOF-Experiment.....	12
Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Multiphotonen-Ionisation.....	14
Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der verschiedenen Modelle zur Multiphotonen-Ionisation .....	20
Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus .....	22
Abbildung: 2-6: Reflektron des Bruker-Franzen-TOF 1 .....	24
Abbildung 3-1: a) Die Verhältnisse von $p$ , $T$ und $\rho$ bei der adiabatischen Expansion eines idealen Gases in Abhängigkeit des reduzierten Düsenabstandes $x/d$ . b) Die Maxwell-Boltzmann-Geschwindigkeits-verteilung eines effusiven Strahls. ....	27
Abbildung 3-2: Schematisches $P,T$ -Diagramm zur qualitativen Beschreibung der homogenen Kondensation im Düsenstrahl. ....	30
Abbildung: 3-3 Messung der Bindungsenergie (BE) von Cluster. ....	39
Abbildung 3-4: Lennard - Jones-(6,12)- Potential.....	44
Abbildung 3-5: Elektrostatische Wechselwirkung bei der Wasserstoff-Brücke -O-H---OH <sub>2</sub> .47	
Abbildung 3-6: Zeitlicher Verlauf der Ionen-und Neutralteilchenemission bei Anwendung eines Desorptionslaserpulses .....	50
Abbildung 3-7: Versuchsaufbau zur Laserdesorption in einen Überschallgasstrahl .....	59
Abbildung 4-1: Aufbau eines Peptids am Beispiel eines Tripeptids .....	62
Abbildung 4-2: Struktur der Peptidbindung .....	63
Abbildung 4-3: Beispiele zur Bezeichnung cyclischer Peptide.....	64
Abbildung 4-4: Torsionswinkeln innerhalb eines Peptids .....	67
Abbildung 4-5: Ramachandran - Digramm (nach Edsall, Kendrew, Liquori, Nemethy, Ramachandran und Scheraga) .....	68
Abbildung 4-6: $\beta$ -Faltblattstruktur von Polypeptiden und Proteinen , Strangrichtung, Wasserstoffbrücken und Bindungswinkel .....	69

Abbildung 4-7: Antiparallele (a) und parallele (b) faltblattstruktur (nach Pauling und Corey).....	70
Abbildung 4-8: Wasserstoffbrücken Wechselwirkungen In der $\alpha$ –Helix.....	70
Abbildung 4-9: Rechts-Linksgängige $\alpha$ Helix .....	71
Abbildung 4-10: Tertiärstruktur mit Wechselwirkungen zwischen Peptidketten.....	73
Abbildung 4-11: Beispiele für selektive hydrolytische Spaltungen eines Polypeptids .....	74
Abbildung 4-12: Beispiele für selektive enzymatische Spaltung eines Polypeptids .....	75
Abbildung 4-13: Schutz eines Peptids vor enzymatischem Abbau .....	77
Abbildung 4-14: Schematische Darstellung der Festphasen-Peptidsynthese .....	81
Abbildung 4-15: Schematische Darstellung der Festphase-Peptidsynthesezyklus.....	82
Abbildung 4-16 .....	84
Abb. 5-1: Strukturformeln der verwendeten MALDI-Matrizes.....	86
Abb. 5-2: REMPI-ReTOF-MS von Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm.....	87
Abb. 5-2a: Fragmentierungsbaum der Vanillinsäure .....	88
Abb. 5-3: REMPI-ReTOF-MS von Ferulasäure bei $\lambda = 260$ nm.....	89
Abb. 5-4: REMPI-ReTOF-MS von Sinapinsäure bei $\lambda = 260$ nm.....	90
Abb. 5-5: REMPI-ReTOF-MS von 3,4-Dihydroxybenzoesäure bei $\lambda = 260$ nm.....	91
Abb. 5-6: REMPI-ReTOF-MS von 2,5-Dihydroxybenzoesäure bei $\lambda = 260$ nm.....	92
Abb. 5-7: Mechanismus zum dissoziativen Protonentransfer (dPT) .....	94
Abb. 5-8: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Ala und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm....	96
Abb. 5-9: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Ala-Gly und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm....	97
Abb.5-10: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Leu und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm ...	97
Abb. 5-11: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Leu-Gly und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm ..	98
Abb.5-12.: Prinzipielle Fragmentierungsmöglichkeiten eines Peptides im Massenspektrum zur Bildung von Sequenzen. ....	99
Abb.5-12a: Protonenaffinitäten einiger Aminosäuren.....	101

Abb. 5-13: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Ala-Gly-Gly und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	105
Abb. 5-14: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Ala-Gly und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	105
Abb. 5-15: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Gly-Ala und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	106
Abb. 5-16: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Gly-Gly und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	109
Abb. 5-17: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Leu-Gly und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	109
Abb. 5-18: REMUPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Gly-Leu und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	110
Abb. 5-19: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Gly-Gly und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	111
Abb. 5-20: Postulierter intramolekularer Ringschluss vom Tripeptid Ala-Gly-Gly .....	113
Abb. 5-21: REMPI-ReTOF-MS Spektren von Ala-Gly-Gly .....	113
Abb. 5-22: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Gly-Gly und 3,4-DHB bei $\lambda = 260$ nm	115
Abb. 5-23: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Leu-Gly und 3,4-DHB bei $\lambda = 260$ nm	116
Abb. 5-24: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Gly-Leu und 3,4-DHB bei $\lambda = 260$ nm	116
Abb. 5-25: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Gly-Gly und Ferulasäure bei $\lambda = 260$ nm .....	118
Abb. 5-26: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Leu-Gly und Ferulasäure bei $\lambda = 260$ nm .....	118
Abb. 5-27: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Gly-Leu und Ferulasäure bei $\lambda = 260$ nm .....	119
Abb. 5-28: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Gly-Gly und Sinapinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	120
Abb. 5-29: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Leu- Gly und Sinapinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	121

Abb. 5-30: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Gly-Leu und Sinapinsäure bei $\lambda = 260$ nm.....	121
Abb. 5-31: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Gly-Gly-Gly-Gly und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	125
Abb. 5-32: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Gly-Leu-Gly-Gly und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	125
Abb. 5-33: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Gly-Leu-Gly-Leu und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	126
Abb. 5-34: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Gly-Leu-Leu-Gly und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	126
Abb. 5-34 a: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Lys-Gly-Gly-Lys und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	129
Abb. 5-34 b: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Lys-Arg-Ser-Arg und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	130
Abb. 5-35: Schematische Darstellung der Blockierung der Hydroxylgruppe der Vanillinsäure .....	133
Abb. 5-36: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Ala und Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm.	134
Abb. 5-37: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Ala und Dimethoxybenzoesäuremethylester (DMB) bei $\lambda = 260$ nm .....	135
Abbildung 5-38: Schematische Darstellung der Blockierung des aciden-Protons der Vanillinsäure .....	137
Abb. 5-39: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Ala und Vanillinsäuremethylester (MeVan.) bei $\lambda = 260$ nm.....	138
Abb. 6-40: REMPI-ReTOF-MS vom Tryptophan-Cluster bei $\lambda = 260$ nm.....	141
Abb.6-41: Chemische Reaktionsgleichung der Wasserabspaltung und die Bildung der Peptidbindung. ....	143
Abb. 6-41a: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Gly und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	144

Abb. 6-42: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Ala-Gly und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	146
Abb. 6-43: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Ala und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	146
Abb. 6-44: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Leu-Gly und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	147
Abb. 6-45: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Leu und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	148
Abb. 6-46: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Leu-Leu und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	149
Abb. 6-46a: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Lys-Lys und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	150
Abb. 6-47: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Gly-Gly und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	151
Abbildung 6-47a: Allgemeine Fragmentierungsbaum eines Tripeptids.....	152
Abb. 6-48: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Lys-Gly-Gly und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	154
Abbildung 6-48a: Fragmentierungsbaum des Tripeptids Lys-Gly-Gly mit Tryptophan.....	154
Abb. 6-49: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Lys-Lys-Lys und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	155
Abbildung 6-49a: Fragmentierungsbaum des Tripeptids Lys-Lys-Lys mit Tryptophan.....	155
Abbildung 6-50: Allgemeiner Fragmentierungsbaum eines Tetrapeptids.....	156
Abb. 6-51: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Gly-Leu-Gly-Gly und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	157
Abbildung 6-51a: Fragmentierungsbaum des Tetrapeptids Gly-Leu-Gly-Gly mit Tryptophan.....	157
Abb. 6-52: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Gly-Leu-Gly-Leu und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	158
Abbildung 6-52a: Fragmentierungsbaum des Tetrapeptids Gly-Leu-Gly-Leu mit Tryptophan.....	158

Abb. 6-53: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Leu-Leu und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 260$ nm .....	159
Abb. 6-54: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Leu-Leu und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 275$ nm .....	160
Abb. 6-55: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Leu-Leu und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	160
Abb.6-56 strukturelle Aufbau des Tryptophan und Derivate .....	161
Abb. 6-57: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Lys-Lys und Tryptophan als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	162
Abb. 6-58: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Lys-Lys und Trp-Oet als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	163
Abb. 6-59: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Lys-Lys und Boc-Trp-OMe als Matrix bei $\lambda = 290$ nm .....	164
Abbildung 7-1: Photoinduzierter Elektronentransfer.....	167
Abbildung 7-2: Elektronentransfer in einem Cluster .....	171
Abb.7-3: REMPI-ReTOF-MS von Gly-Ala mit Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	174
Abb.7-4: REMPI-ReTOF-MS von Ala-Gly-Gly mit Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	176
Abb.7-5: REMPI-ReTOF-MS von Gly-Leu-Gly-Gly mit Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm .....	176
Abbildung 7-6 Schema zur Darstellung der deuterierten Vanillinsäure .....	178
Abb. 7-7: $^1\text{H-NMR}$ der deuterierten Vanillinsäure.....	179
Abb.7-8: REMPI-ReTOF-MS von deuterierte Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm.....	180
Abb.7-9: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Ala und deuterierte Vanillinsäure bei..... $\lambda = 260$ nm .....	181
Abb.7-10: Ausschnitt vom REMPI-ReTOF-MS des Dipeptids Gly-Ala und deuterierte Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm.....	182
Abb.7.11: Ausschnitt vom REMPI-ReTOF-MS des Dipeptids Gly-Ala und deuterierte Vanillinsäure bei $\lambda = 260$ nm.....	183
Abb: 7-12: REMPI-ReTOF-MS des Tripeptids Gly-Gly-Leu und deuterierte Vanillinsäure bei.....	

$\lambda = 260 \text{ nm}$ .....	184
Abb. 7-13: Ausschnitt vom REMPI-ReTOF-MS des Tripeptids Gly-Gly-Leu und deuterierte Vanillinsäure bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ .....	184
Abb. 7-14: Ausschnitt vom REMPI-ReTOF-MS des Tripeptids Gly-Gly-Leu und deuterierte Vanillinsäure bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ .....	185
Abb. 7-15: Ausschnitt vom REMPI-ReTOF-MS des Tripeptids Gly-Gly-Leu und deuterierte Vanillinsäure bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ .....	186
Abb.7-16: Ausschnitt vom REMPI-ReTOF-MS des Tetrapeptids Gly-Leu-Gly-Gly und deuterierte Vanillinsäure bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ .....	187





# 1 Einleitung

„I can hardly doubt that when we have some control of the arrangement of things on a small scale we will get an enormously greater range of possible properties that substances can have“

So äußerte sich R. P. Feynman hellseherisch zu den Perspektiven der Chemie, für die es ein vorrangiges Ziel sein sollte, molekulare Gebilde mit zunehmender Größe und Funktionalität herstellen zu können.

Die Forschung an Clustern hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einem eigenständigen Forschungsgebiet entwickelt<sup>1</sup>. Clusterforschung hat ihren Ursprung im 19. Jahrhundert mit Untersuchungen an Kolloiden, Aerosolen und Wolken<sup>2</sup>.

Dieser vermutlich ersten Arbeit über dieses Themengebiet folgten insbesondere in den letzten 25 Jahren mit der breiten Verfügbarkeit von Lasern viele weitere. Wesentliche Fortschritte bei der Erforschung von Clustern wurden durch den Einsatz abstimmbarer Laser zur Anregung und Ionisation ermöglicht<sup>3, 4</sup>.

Im Folgenden wird unter dem Begriff Cluster ein Ensemble von Atomen oder Molekülen verstanden, deren Anzahl  $N$  zwischen  $N=3$  und ca.  $N=10$  variiert<sup>5</sup>. Cluster sind aus Molekülen oder nackten Atomen bestehende Aggregate, wobei sich ein merklicher Teil der Einzelbestandteile an der Oberfläche des Aggregates befinden soll, was die Anzahl der Einzelbausteine begrenzt<sup>6</sup>. Zur Abgrenzung von metallischen Clustern werden Aggregate, die im Wesentlichen durch Dispersions- und elektrostatische Kräfte gebunden sind, auch als van der Waals-Cluster bezeichnet. Grundsätzlich ist zu differenzieren zwischen Clusterverbindungen und Clustern im eigentlichen Sinne. Die Charakterisierung von Clustern erfolgt nach Jortner<sup>130</sup> durch die mittlere Bindungsenergie pro Molekül und durch die Anzahl der Moleküle bzw. Atome, die an der Bildung des Clusters beteiligt sind. Die Einteilung erfolgt in Systeme mit schwacher Bindungsenergie (0.3-0.5 eV) bis hin zu

## 1. Einleitung

---

Systemen mit starker Bindungsenergie (2.0-4.0 eV). Explizit wird zwischen sechs Typen unterschieden. Im Einzelnen sind dies:

- Van der Waals- Cluster ( $BE \leq 0.3$  eV) bestehen aus Edelgasen oder Molekülen ohne permanentes Dipolmoment z.B.  $(Ar)_n$  oder  $(N_2)_n$ ,  $(CO_2)_n$ . Die zusammenhaltenden Kräfte sind dispersive sowie schwach elektrostatische Kräfte.
- Molekül-Cluster ( $BE \approx 0.3-1.0$  eV) enthalten Aggregate aus organischen Molekülen  $(M)_n$  oder anorganischen Molekülen mit abgeschlossener Elektronenschale z.B.  $(I_2)_n$ . Die wirkenden Bindungskräfte sind dispersive elektrostatische Kräfte.
- Wasserstoffbrücken-Cluster ( $BE \approx 0.3-0.5$  eV) werden aus Molekülen mit Wasserstoff und elektronegativen Elementen wie z. B.  $(H_2O)_n$ ,  $(HF)_n$  gebildet.
- Ionen Cluster ( $BE \approx 2.0-4.0$  eV) treten zwischen Molekülen auf, die aus Metallen der linken Seite des Periodensystems und elektronegativen Elementen der rechten Seite des Periodensystems. Z. B.  $(NaCl)_n$ ,  $(CaF_2)_n$ . Die zusammenhaltenden Kräfte sind ionische Bindungen mit Ladungs- - Ladungs- Wechselwirkung und Elektronenschaleneffekte.
- Valenz-Cluster ( $BE \approx 1.0-4.0$  eV) dieser Typ enthält Moleküle mit kovalenten Bindungen, wie  $C_n$ ,  $S_8$ ,  $As_4$ .
- Metal-Cluster ( $BE \approx 0.5-3.0$  eV) werden, wie der Name sagt, aus Metallen aus der linken Seite des Periodensystems gebildet z.B.  $Na_n$ ,  $Al_n$ ,  $Cu_n$ . Die Bausteine werden durch metallische Bindungen zusammengehalten.

Nach der Bindungsstärke werden die Cluster in zwei Kategorien eingeteilt. Zum einen schwach gebundene Cluster mit Bindungsenergien unter 1 eV. Dazu zählen die van der Waals Cluster, Molekülcluster und wasserstoffbrückengebundene Cluster, Zum anderen

stark gebundene Cluster mit Bindungsenergien zwischen 0,5 und 3 eV. Hierzu gehören ionische gebundene Cluster, Valenzgebundene Cluster und Metallcluster. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bildung schwach gebundener kurzkettiger Peptid (Di-, Tri- und Tetrapeptiden)-Cluster untersucht. Cluster können unter anderem durch eine Düsenstrahlquelle erzeugt werden, bei der ein Gas ins Vakuum expandiert und dabei Aggregate bildet oder durch Materialabtragung von einer Oberfläche (z.B. durch Laserverdampfung).

Das zunehmende Interesse an Cluster beruht auf der Möglichkeit, dass mit ihrer Hilfe neue Materialien synthetisiert und chemische Reaktionen auf neuartigen Wegen durchgeführt werden können. Ihre Erforschung führt auch zu einem besseren Verständnis der Eigenschaften der kondensierten Materie. Durch die Untersuchung der Entwicklung der physikalischen und chemischen Eigenschaften von Clustern in Abhängigkeit von deren Größe werden Einblicke in den Aufbau und die Funktion der kondensierten Materie erhalten. Dabei ist es von großem Vorteil, dass Cluster mit experimentellen Methoden untersucht werden können, deren Genauigkeit und Aussagekraft mit der von Experimenten an kleinen Molekülen vergleichbar sind. Auch können für Cluster die gleichen theoretischen Methoden verwendet werden, wie sie für Moleküle entwickelt wurden. Dazu gehören aufwendige *ab initio*-Verfahren zur Beschreibung der Clusterstruktur genauso wie stark vereinfachende empirische Potentialfunktionen. Dadurch ermöglicht die Clusterforschung den Übergang von der Atom- bzw. Molekülphysik zur Chemie und Physik der kondensierten Phase.

Cluster eignen sich auch vorteilhaft zur Untersuchung der komplexen Phänomene bei der Photosynthese, beim Sehprozess oder bei der Lichtenergiekonversion. Der photoinduzierte Ladungs- und Energietransfer ist für das Leben auf der Erde von größter Bedeutung <sup>[7]</sup>.

Die von der Sonne gelieferte Energie wird von den Photorezeptoren der Lebewesen absorbiert und an die Stellen im Organismus transportiert, an denen die chemischen Primärprozesse der Photosynthese einsetzen. Das dabei wichtigste Molekül ist wohl das Chlorophyll. Es dient sowohl als Antenne bei der Lichtabsorption wie zur primären Ladungstrennung im sog. Reaktionszentrum. Eine weitere wichtige Gruppe von Molekülen bei der Photosynthese sind die Carotinoide z. B. ( $\beta$ -Carotin). Diese Moleküle

komplementieren den spektralen Absorptionsbereich des Chlorophylls und ermöglichen dadurch eine effiziente Ausnutzung der Sonnenenergie.

Von besonderem Interesse ist die Analytik von biologisch relevanten Molekülclustern. Ihre spezifische Struktur und damit ihre Funktion nehmen sie oft erst in wässriger Lösung bei der Interaktion mit den umgebenden H<sub>2</sub>O-Molekülen an. Dabei bilden sich Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen dem Clustermolekül und den H<sub>2</sub>O-Molekülen, zwischen benachbarten H<sub>2</sub>O-Molekülen und über H<sub>2</sub>O-Moleküle auch zwischen verschiedenen Teilen des Clustermoleküls aus. Durch dynamische Prozesse wie dem Austausch von Protonen und H<sub>2</sub>O-Molekülen strebt das Gesamtsystem dabei dem Zustand minimaler freier Enthalpie mit einer ganz bestimmten Struktur des Clustermoleküls zu. Eine der sich daraus ergebenden Fragen ist etwa, wie viel H<sub>2</sub>O-Moleküle sich in der Nachbarschaft eines Enzyms befinden müssen, damit diese seine typischen Eigenschaften annimmt<sup>8</sup>.

Die Forschung biologischer Cluster ermöglicht den Zugang zu den Menschen direkt betreffenden Fragestellungen, wie die Weitergabe der Erbinformation, den Aufbau von Zellen und die Funktionsweise von im Organismus oft perfekt gelösten Phänomenen, wie Protonen-pumpen oder Reizweitergabe in Nervenbahnen.

Die Charakterisierung großer thermisch labiler Biomoleküle (Peptide, Proteine), die die Bausteine des Lebens auf molekular Ebene darstellen, rückt mit zunehmender Bedeutung der Molekularbiologie in den Mittelpunkt der chemischen Analytik. Zum Verständnis der Wirkungsweise von Biomolekülen muss deren Struktur aufgeklärt werden.

Die Massenspektrometrie liefert aussagekräftige Information in der chemischen Analytik zur Charakterisierung von sowohl organischen als auch anorganischen Stoffen. Der Anwendungsbereich der Massenspektrometrie reicht von der Molekulargewichtsbestimmung über die Strukturaufklärung einer Substanz mittels Analyse der gebildeten Fragmentationen bis hin zur Untersuchung der Mechanismen von Elementarreaktionen sowie dem Studium des zeitlichen Ablaufs von Zerfallsreaktionen von Ionen in der Gasphase. Physikalische Grundlage der Massenspektrometrie ist die Ablenkung geladener Teilchen durch elektrische und magnetische Felder.

Die massenspektrometrische Untersuchung von Molekülen setzt die Überführung der Probe in die Gasphase und deren Ionisation voraus. Mit zunehmender Größe und Polarität nimmt die Empfindlichkeit von Molekülen gegenüber höheren Temperaturen zu, so dass intakte gas-förmige Biomoleküle nicht mehr durch thermisches Aufheizen erzeugt werden können, da sie dabei zersetzt werden. Experimentell sind zwei Wege zur Bildung von Ionen größerer, thermisch labiler Moleküle gangbar. Verdampfung und Ionisation können einerseits in einem Schritt erfolgen, andererseits räumlich und zeitlich voneinander getrennt durchgeführt werden.

Die Entwicklung von massenspektrometrischen Einlassverfahren für thermisch labile Moleküle konzentrierte sich in den letzten Jahren im Wesentlichen auf den ersten Weg. Technologische Durchbrüche in der Massenspektrometrie waren stets dadurch charakterisiert, dass Substanzklassen mit höherem Molekulargewicht oder höherer Polarität untersucht werden konnten. Bei der Entwicklung der Elektrospray-Ionisation (ESI) gelang die Realisierung einer effektiven Direktkopplungsmethode mit der Flüssig-Chromatographie unter Erhaltung der typischen massenspektrometrischen Empfindlichkeit. Bei Entwicklung der Matrix unterstützten direkten Laserdesorption von Ionen (MALDI) gelang der Durchbruch zu Molekulargewichten im Bereich von mehr als 100 KD, zusammen mit einer Empfindlichkeitssteigerung, die heute bis in den Attomol-Bereich reicht<sup>9</sup>.

Nachteilig wirkt sich bei den einstufigen Verfahren die Tatsache aus, dass der während der Ionisation auf das Molekül übertragene Energiebetrag nicht variiert werden kann. Diese Methoden sind sehr gut zur Bestimmung des Molekulargewichts geeignet, aufgrund der fehlenden Fragmentation in den Massenspektren erlauben sie aber keine Rückschlüsse auf die chemische Struktur der Verbindung.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Untersuchungen zur Clusterbildung organischer Moleküle in der Gasphase wurde ein zweistufiges Verfahren, kombiniert mit der Multi-photonen- Ionisation (MUPI), eingesetzt. Der prinzipielle Vorteil der Trennung des Desorptionsschritts von der Ionisation liegt darin, dass jeder Teilschritt für sich optimiert werden kann. Weiterhin wird dadurch eine größere Flexibilität sowohl bei der Verdampfung der Neutralen im ersten Schritt als auch bei der Ionisation im zweiten Schritt erzielt.

Für die Desorption der Peptidprobe in die Gasphase wurde die Laserverdampfung in einen Argonüberschallgasstrahl verwendet. Die Verdampfung mit einem IR-Laser erlaubt die Überführung der thermisch labiler Peptidsmoleküle intakt in die Gasphase. Vor der Ionisation wurden die neutralen Moleküle durch den Überschallgasstrahl in ihren inneren Freiheitsgraden abgekühlt. Die Abkühlung ist erforderlich für eine Clusterbildung und ermöglicht unter anderem eine erhöhte Detektion des Molekülionensignals. Bei der hier eingesetzten Multiphotonen-Ionisation (MUPI) mit sichtbarem oder UV-Licht nimmt ein neutrales Molekül mehrere Photonen auf. Besonders effizient ist dieser Ionisationsprozess, wenn das Molekül resonant bei der Ionisationswellenlänge absorbiert.

Resonante Absorption bedeutet, dass die Photonenenergie der Energiedifferenz zwischen dem elektronischen Grundzustand und einem elektronisch angeregten Zustand des neutralen Moleküls entspricht. Herausragende Eigenschaft der MUPI für die massenspektrometrische Charakterisierung von größeren, thermisch labilen Molekülen ist die Möglichkeit, dem Molekül während der Ionisation unterschiedlich hohe Energiebeiträge zuzuführen. Realisiert wird dies in erster Linie durch Variation der Lichtintensität. Niedrige Laserintensitäten führen vorwiegend zur Bildung sowohl von monomeren Molekülionen als auch höhere Clustern der Molekülionen. Höhere Lichtintensitäten führen zur Fragmentierung des Molekülions. In diesem Fall erlaubt das im Massenspektrum beobachtete Fragmentierungsmuster Rückschlüsse auf die chemische Struktur des untersuchten Moleküls.

Zusätzlich zur Intensität kann bei der MUPI die Wellenlänge variiert werden. Durch geeignete Wahl der Wellenlänge kann dadurch einerseits im Idealfall das Molekülion mit nur geringer innerer Energie gebildet werden, so dass im Massenspektrum bei geringen Lichtintensitäten das Molekülion mit höchster Intensität gebildet wird. Andererseits eröffnet die Variation der Wellenlänge die Möglichkeit der selektiven Ionisation von thermolabilen Verbindungen aus einem Gemisch von Substanzen mit unterschiedlicher Ionisierungsenergie heraus.

Die Peptid- und Proteinanalytik stellt zur Zeit das wichtigste Anwendungsgebiet der neuen schonenden MS-Ionisierungsverfahren in der Biochemie dar. Von zentraler Bedeutung in

biologischen Systemen sind die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Aminosäuren bzw. den Peptiden. Besonders die Untersuchungen von nicht-kovalenten Wechselwirkungen wie die van der Waals-Wechselwirkung und Wasserstoffbrückenbindungen sind in biologischen Systemen wie die DNA vorzufinden. Diese nicht-kovalente Wechselwirkungen regulieren viele biologisch relevante Interaktionen, wie z.B. die Rezeptor-Ligand-Enzym/Effektor- oder auch die Enzym/ Inhibitor-Wechselwirkung.

Die Ionisation stellt eine erhebliche Störung des Cluster-Systems dar und kann zu intramolekularen Reaktionen wie Protonentransfer-Prozessen führen. Deshalb wurde in dieser Arbeit besonders die Clusterbildung aufgrund nicht-kovalenter Wechselwirkungen zwischen Matrixmolekülen, die bei MALDI eingesetzt werden, und kurzkettigen Peptiden (Di-, Tri- und Tetrapeptiden), die, da die Moleküle über kein chromophores System verfügen, nicht durch direkte Photoionisation gebildet wurden, untersucht .

## 2 Das Multiphotonen-Ionisations-Flugzeitmassenspektrometer

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Clusterbildung organischer Moleküle in der Gasphase wurden in einem Reflektron-Flugzeitmassenspektrometer (RETOF) mittels Multiphotonen-Ionisation (MUPI) durchgeführt. Die Verbindung von resonanter Multiphotonen-Ionisation (REMPI) und Flugzeitmassenspektrometrie wird als Lasermassenspektrometrie bezeichnet. Bei der resonanten Multiphotonen-Ionisation wird die Zielsubstanz mittels eines intensiven Laserpulses zunächst angeregt und anschließend ionisiert. Dadurch wird ihr UV-Spektrum in den Ionisationsschritt einbezogen, was in einer hohen Selektivität des Ionisationsschrittes resultiert. Die Flugzeitmassenspektrometrie garantiert kurze Massenzeiten ( $<1\text{msec}$ ). Somit ermöglicht sie in der Form der Lasermassenspektrometrie die zeitaufgelöste Multikomponenten-Analyse von Spurenstoffen selbst in komplexen Mischungen.

Die Multiphotonen-Ionisation mit gepulstem Laserlicht bietet sich für den Einsatz in der Flugzeitmassenspektrometrie an, da sie eine gepulste Methode darstellt, im Gegensatz zu den kontinuierlichen Massenanalysatoren wie zum Beispiel Sektorfeld- oder Quadrupolmassenspektrometern, da alle Ionen innerhalb der kurzen Dauer des Laserpulses (typischerweise 5-10 ns) gebildet werden.

### 2.1.1 Grundlagen der Flugzeitmassenspektrometrie

Das Prinzip der Flugzeitmassenspektrometrie (TOF-MS) basiert auf den unterschiedlichen Zeiten, die Ionen mit unterschiedlicher Masse aber gleicher kinetischer Energie zum Durchlaufen einer bestimmte Driftstrecke benötigen. Innerhalb sehr kurzer Zeit werden an einem definierten Ort Ionen erzeugt und durch ein elektrisches Feld beschleunigt.



Dabei durchlaufen die Ionen mit der Masse  $m$  und der Ladung  $z$  eine Potentialdifferenz  $U$  und gewinnen die kinetische Energie

$$E_{\text{kin.}} = e \cdot U = \frac{1}{2} \cdot m v^2 \quad (2.1)$$

Bei einfach geladenen Ionen entspricht  $z$  der Elementarladung  $e$ . Die so gewonnene kinetische Energie ist für alle Ionenmassen gleich groß; aufgrund ihrer unterschiedlichen Geschwindigkeiten  $v$  erreichen sie aber nach Durchlaufen einer feldfreien Driftstrecke das Nachweissystem je nach Masse zu verschiedenen Zeiten. Die Gesamtflugzeit von Ionen der Masse  $m$  in einem Flugzeit-Massenspektrometer ist gegeben durch:

$$t_{\text{ges}} = a \sqrt{m} + b \quad (2.2)$$

Die Konstante  $a$  hängt von den eingestellten Spannungen des Experiments ab, der Korrekturfaktor  $b$  beinhaltet die endlich schnellen Response der Triggerdiode, des Detektors und der Signalverarbeitung. Die Eichung des TOF-MS erfolgt durch Ionen bekannter Masse. Mit den gemessenen Flugzeiten für diese Massen können die Parameter  $a$  und  $b$  durch lineare Regression bestimmt werden. Wie bisher gezeigt wurde, zeichnet sich ein TOF-MS zunächst vor allem durch seinen einfachen apparativen Aufbau aus. Lange Zeit behinderte das geringe Auflösungsvermögen eine weitere Verbreitung von diesen Geräten. Durch die Einführung eines elektrostatischen Reflektorfeldes durch B.A Mamyrin<sup>11</sup> konnte die Massenauflösung im TOF deutlich gesteigert werden. Im Zusammenspiel mit moderner Lasertechnik sicherte sich die Flugzeitmassenspektrometrie eine wichtige Rolle in der physikalischen und analytischen Chemie.

Als Ionisationsmethode ist die laserinduzierte Multiphotonen-Ionisation sehr gut zur Erzeugung von Ionen in einem Flugzeitmassenspektrometer geeignet, da die verwendeten gepulsten Laser kurze Pulsdauern (typischerweise <10 ns), gute Fokussierbarkeit (Fokussdurchmesser ~100 μm) und hohe Photonendichten aufweisen. Flugzeitmassen-

spektrometer zeichnen sich im Vergleich zu anderen Massenspektrometertypen durch die folgende vorteilhaften Eigenschaften aus:

- einfache Handhabung und relative geringe Kosten
- einen theoretisch unbegrenzten Massenbereich; dieser wird in der Praxis meist nur durch den verwendeten Ionendetektor limitiert
- sehr hohe Transmissions-Eigenschaften, da durch den einfachen Aufbau und die zeitliche Detektion der Ionen die Verluste im Massenseparator äußerst gering sind; d.h., ein hoher Prozentsatz der erzeugten Ionen wird am Detektor nachgewiesen, woraus eine hohe Nachweiswahrscheinlichkeit resultiert
- hohe Aufzeichnungsraten für die Massenspektren (bis zu 100 Massenspektren pro Sekunde).
- im Gegensatz zu Sektorfeld- oder Quadrupolgeräten wird für jeden Laserpuls ein Massenspektrum über den gesamten Massenbereich erhalten.

### 2.1.2 Verbesserung der Auflösung von Flugzeit-Massenspektrometer

Das Auflösungsvermögen stellt eine wichtige Eigenschaft zur Charakterisierung der Qualität eines Massenspektrometers dar. Es gibt an, bis zu welchem Bereich zwei Peaks unterschiedlicher Masse im Spektrum noch als zwei getrennte Peaks erkennbar sind. Allgemein ist das Auflösungsvermögen  $R$  definiert als das Verhältnis einer Masse  $m$  zu der gerade noch trennbaren Massendifferenz  $\Delta m$  bei dieser Masse.

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (2.3)$$

Das bedeutet konkret für ein Auflösungsvermögen von  $R=500$ , dass das Signal bei der Masse 500 noch eindeutig von der Masse 501 ( $m + \Delta m$ ) getrennt werden kann. Wichtig bei der Angabe des Massenauflösungsvermögens ist die zugrunde liegende Taldefinition, ab wann zwei Signale als voneinander getrennt zu betrachten sind. Üblicherweise wird eine 50%-Taldefinition zur Angabe des Auflösungsvermögens herangezogen.

## 2. Das Multiphotonen-Ionisations-Flugzeitmassenspektrometer

---

Das bedeutet, dass zwei gleiche hohe Peaks als getrennt angesehen werden, wenn die sie trennende Talsohle höchstens 50% der Peakshöhe beträgt.

Bei benachbarten Peaks, die sich sehr stark in ihrer Intensität unterscheiden, genügt dieses Auflösungsvermögen im Grenzfall aber nicht zur tatsächlichen Trennung der Signal; deshalb findet auch die 10%-Taldefinition des Auflösungsvermögen (bezeichnet als  $R_{10\%}$ ) weite Verbreitung. Dies bedeutet, dass zwei gleich hohe Signale als getrennt betrachtet werden, wenn die Talsohle 10% der Peakshöhe nicht übersteigt. Von der Taldefinition hängt die gerade noch trennbare Massendifferenz  $\Delta m$  ab, so dass  $R_{50\%}$  immer größer als  $R_{10\%}$  ist.

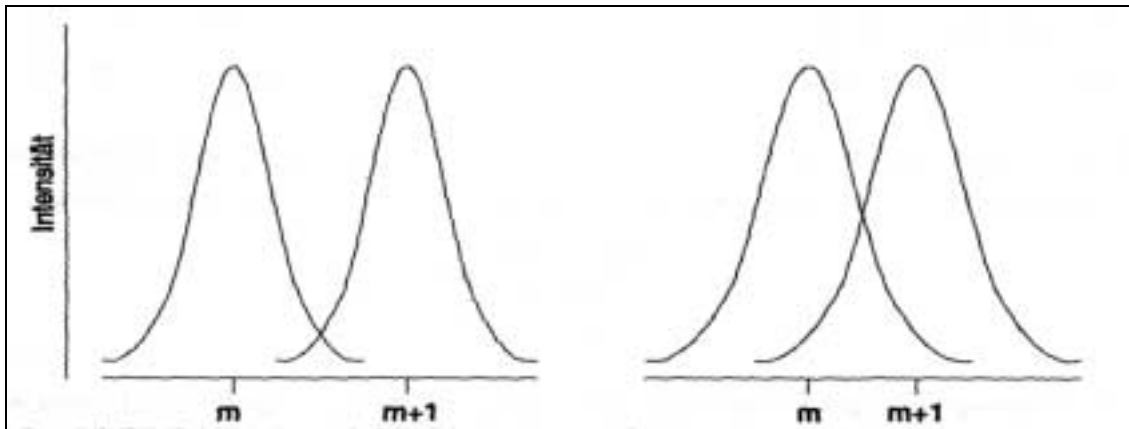


Abbildung 2-1 Taldefinitionen des Auflösungsvermögen

Für das Flugzeitmassenspektrometer ergeben sich für das Auflösungsvermögen unter Berücksichtigung der Formeln für die Flugzeit 2.2 und der Auflösung 2.3 folgende Gleichungen:

$$R = \frac{t(m+1) - t(m)}{FWHM} \cdot m \quad (2.4)$$

Das Auflösungsvermögen  $R$  wird bestimmt durch die Differenz der Flugzeiten  $t$  der Ionen der Masse  $m+1$  und  $m$ , dividiert durch die Halbwertsbreite  $FWHM$  (Full Width at Half Maximum) des gaußförmiges Signals, multipliziert mit der Masse  $m$  des Ions. Die Festsetzung der Signalbreite, hier  $FWHM$ , ist also die Breite bei 50% der Peakshöhe.

## 2. Das Multiphotonen-Ionisations-Flugzeitmassenspektrometer

---

Das erste Flugzeit-Massenspektrometer wurde 1948 von Cameron et al. gebaut<sup>110</sup>. Eine wesentliche Verbesserung der Auflösung erreichten Wiley und McLaren im Jahr 1955 durch die Einführung eines zweistufigen Abzugsfeldes<sup>102</sup>.

Die zweite Beschleunigungsstrecke wurde von den Autoren zur Einstellung des Ortsfokus auf die Detektorebene eingesetzt. Trotz dieser apparativen Verbesserungen bleibt das Auflösungsvermögen linear TOF-Massenspektrometer aber auf 300-500 beschränkt. Für die geringe Auflösung sind drei Faktoren verantwortlich:

- die Zeitunschärfe bei der Bildung der Ionen, bedingt durch die Laserpulsdauer
- die Energie- oder Ortsunschärfe bei der Ionenerzeugung, hervorgerufen durch die endliche Ausdehnung des Laserfokus
- die dreidimensionale Boltzmann-Verteilung der Anfangsgeschwindigkeit der Ionen (wovon nur die Geschwindigkeiten in und gegen die Flugrichtung signifikant beitragen; die dadurch entstehende „turn-around-Zeit“ bei einem Abzug entgegen der anfänglichen Flugrichtung wird von dem elektrostatischen Reflektor nicht korrigiert<sup>103</sup>. Dieser Fehler kann durch Verwendung eines Überschallgasstrahls aber minimiert werden.

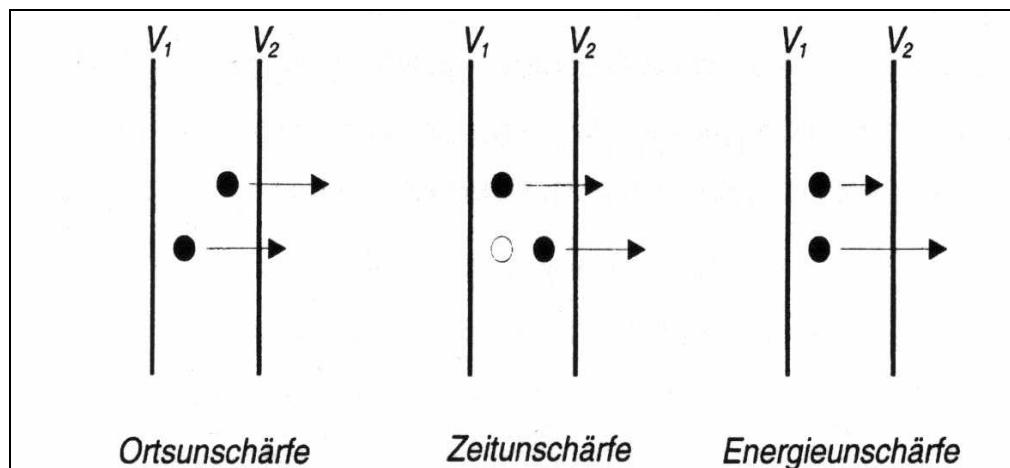


Abbildung 2-2 Ursachen der Signalverbreitung bei einem TOF-Experiment

### 2.1.3 Die Multiphotonen-Ionisation

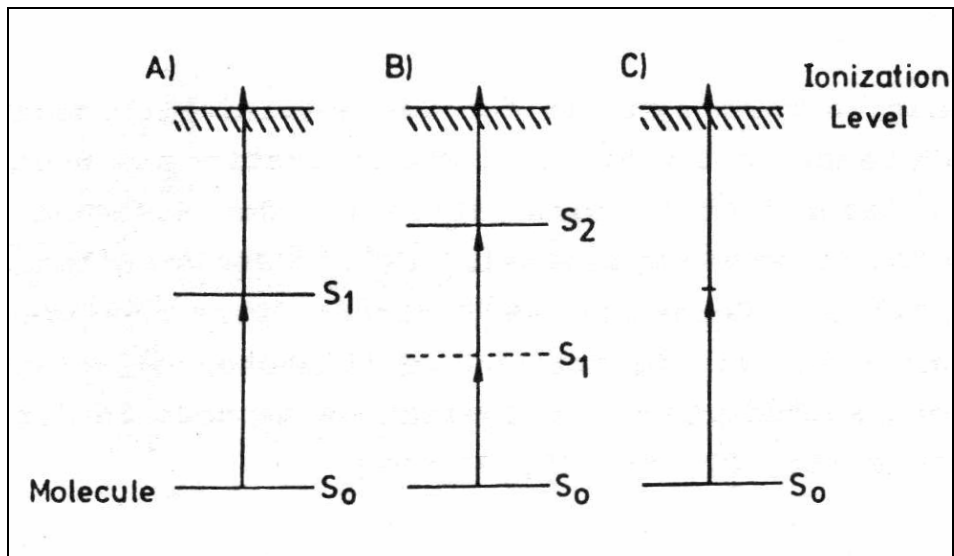
In der Ionenquelle werden die in den Jet desorbierten neutralen Moleküle durch Laserlicht ionisiert. Die Ionisation von neutralen Molekülen mit Laserlicht in Kombination mit dem Massennachweis der entstehenden Ionen wurde erstmalig 1978 in den Arbeitsgruppen von Schlag<sup>57</sup> und Bernstein<sup>142</sup> durchgeführt. Seitdem gewinnt die Multiphoton-Ionisation zunehmend an Bedeutung.

Die Kombination der Laserdesorption von Neutralen in einen Jet mit der Multiphotonen-Ionisation wird zur Untersuchung thermolabiler Verbindungen in den Arbeitsgruppen von Grotemeyer<sup>143, 144</sup> und Lubman<sup>162</sup> angewendet. In der Arbeitsgruppe von Zare<sup>163</sup> wird ein ähnlicher experimenteller Aufbau, allerdings ohne Jet verwendet. Die Verwendung von MUPI als Ionisationsmethode in der Flugzeitmassenspektrometrie bringt viele apparative Parameter zu einem Optimum. Die Ionisationsdauer bei MUPI ist gleich oder kleiner der Zeitdauer des Laserpulses, also typischerweise  $< 10$  ns. Der Ionisationsort kann genau definiert werden. Die Ortsunschärfe der Ionenbildung kann durch Fokussierung des Laserstrahls auf etwa  $100 \mu\text{m}$  begrenzt werden. Bei hohen Photonendichten erfolgt mit MUPI die Bildung hoher Ionendichten zeitlich und räumlich gut eingegrenzt, wodurch eine maximale Auflösung im RETOF erreicht wird. Im Folgenden wird die Multiphotonen-Ionisation kurz phänomenologisch beschrieben.

### 2.1.4 Phänomenologische Beschreibung

Ein Molekül kann bei ausreichend hoher Lichtintensität innerhalb sehr kurzer Zeit mehrere Photonen absorbieren. Wird bei diesem Prozess die Ionisationsenergie (IE) überschritten, dann gibt das Molekül ein Elektron ab, das Molekül wird also ionisiert, und es wird somit das Molekülion  $M^+$  gebildet. Im Allgemeinen ist die Absorption mehrerer Photonen durch ein Molekül ein Prozess von nur geringer Wahrscheinlichkeit, da die Wirkungsquerschnitte klein sind. Die Effizienz dieses Prozesses wird jedoch drastisch erhöht, wenn die Photonenenergie in Resonanz mit reellen elektronischen Zuständen des Moleküls ist. Die Zunahme an Effizienz wird auch durch die Betrachtung der Lebensdauer des beteiligten

angeregten Zwischenzustandes verständlich. Der Wechselwirkungsquerschnitt wird geringer, je kürzer das System im angeregten Zustand verweilt, da die Wahrscheinlichkeit der Absorption eines weiteren Photons geringer wird. Die Lebensdauer virtueller Molekülzustände kann mit Hilfe der Unschärferelation abgeschätzt werden ist um Größenordnungen kleiner als die angeregter reeller Eigenzustände des Moleküls. Man erwartet somit höhere Wechselwirkungs-querschnitte im Falle der resonanten Multiphotonen-Ionisation im Vergleich zum nichtresonanten Prozess. Resonanz bedeutet, dass die Photonenenergie der Energiedifferenz zwischen dem elektronischen Grundzustand ( $S_0$ ) und einem angeregten Zustand ( $S_n$ ) dem Molekül entspricht. In diesem Fall spricht man von der bereits erwähnten resonanten Multiphotonen-Ionisation, abgekürzt REMPI.



**Abbildung 2-3 Schematische Darstellung der Multiphotonen-Ionisation**

Abbildung 2-3 zeigt eine schematische Darstellung der Multiphotonen-Ionisation. Durch Absorption von zwei oder mehreren Photonen wird die Ionisierungsenergie des Moleküls überschritten.

In Abb. 2-3 A) und B) sind als Beispiele sowohl die resonanz-verstärkte Zwei-Photonen-Ionisation (1+1) über den ersten elektronisch angeregten Zustand ( $S_1$ ) als auch die resonanz-verstärkte Drei-Photonen-Ionisation (2+1) über den zweiten elektronisch angeregten Zustand ( $S_2$ ) dargestellt. Abb.2-3 C) gibt die nicht-resonante Zwei-Photonen-Ionisation wieder.

Für die resonante Multiphotonen-Ionisation müssen folgende Voraussetzungen erfüllt werden:

1. Das Molekül muss bei der gewählten Wellenlänge absorbieren
2. Die Übergangswahrscheinlichkeit der Absorption in diesen Zwischenzustand sowie auch für die Absorption weiterer Photonen aus dem Zwischenzustand muss ungleich Null sein
3. Die Lebensdauer des angeregten Zwischenzustands muss genug groß sein, so dass die Absorption weiterer Photonen und damit die Ionisation möglich wird
4. Durch die Absorption mehrerer Photonen muss die Ionisationsenergie überschritten werden

Die resonante MUPI kann für Atome sowie leichtflüchtige aber auch schwerflüchtige Moleküle im Massenbereich bis 2000 Da als selektive Ionisations-Methode eingesetzt werden. Dazu wird die Photonenenergie auf die Absorptionsbande einer bestimmten Verbindung abgestimmt, so dass nur diese aus einem Gemisch von Verbindungen ionisiert wird. Dass diese Methode sogar die isotopenselektive Ionisation ermöglicht, wurde von Boesl et al. am Beispiel des Benzolmoleküls nachgewiesen<sup>56</sup>. Durch geeignete Wahl der Ionisationswellenlänge konnte dabei das  $^{12}\text{C}_6\text{H}_6$ -Molekül (Masse 78 Da) und das  $^{13}\text{C}_1^{12}\text{C}_5\text{H}_6$ -Molekül (Masse 79 Da) isotopenselektiv ionisiert werden. Die selektive Ionisation von größeren Molekülen (Masse > 200 Da) wurde von Grotemeyer gezeigt<sup>163</sup>.

Durch Veränderung der Wellenlänge und damit der Photonenergie wurden aromatische Aminosäuren aufgrund ihrer unterschiedlichen Ionisierungsenergien selektiv ionisiert. Die für kleinere Moleküle beobachtete Feinselektivität geht allerdings bei diesen größeren Systemen verloren. Durch die große Zahl der internen Freiheitsgrade liegen die reellen Anregungsniveaus so eng beieinander, dass über einen großen Wellenlängen-Bereich reelle Übergänge möglich sind.

Die Ionisierungsenergie der meisten organischen Moleküle liegt in der Größenordnung von 7 bis 10 eV. Für eine resonanzverstärkte Ionisation mit zwei Photonen müssen in einem Einfarben-Experiment Photonenenergien von 3,5 bis 5 eV, d.h. Wellenlänge von 355 bis

248 nm, gewählt werden. In der Multiphotonen-Ionisations-Flugzeitmassenspektrometrie werden daher in der Regel durchstimmbare UV-Laser eingesetzt.

Eine Abschätzung der Wellenlänge, bei der Resonanzverstärkung auftritt, kann an Hand der Absorptionsbanden in den UV/VIS-Spektren der Probe getroffen werden.

Fernerhin unterscheidet man bei der Mehrphotonen-Ionisation zwischen Ein- und Mehrfarben-Experimenten. Bei Ein-Farben-Prozessen stammen alle aufgenommen Photonen aus einem Laserpuls, d.h. sie haben die gleiche Wellenlänge. Bei mehrfarbigen Prozessen stammen die Photonen aus Pulsen verschiedener Laser und sie besitzen daher in der Regel unterschiedliche Wellenlängen. Im zweiten Fall lassen sich die Überschussenergien minimieren und somit z.B. die Ionisationsenergien bestimmen. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Messungen ist die resonante Ein-Farben-Zwei-Photonen-Ionisation zum Einsatz gekommen.

### 2.1.5 Der einstellbare Grad der Fragmentierung

Eine besonders wichtige Eigenschaft der Multiphotonen-Ionisation für deren Anwendung in der Massenspektrometrie ist der einstellbare Grad der Fragmentierung, d.h. man hat die Möglichkeit, das Ausmaß der Fragmentierung der untersuchten Verbindungen zu steuern. Realisiert wird dies durch die Variation der Laserintensität und damit der Zahl der vom Molekül absorbierten Photonen.

Die Variation der Photonenenergie bietet die Möglichkeit, Molekülionen mit bestimmter, genau definierter Überschussenergie zu erzeugen, deren Fragmentierungsverhalten analysiert werden kann. Das eröffnet die Möglichkeiten der Untersuchung der Kinetik von Ionenzerfällen, die nicht nur der Strukturanalyse, sondern auch der Aufklärung chemischer Prozesse dienen.

In der Praxis wird die Fragmentierung über die Veränderung der Lichtintensität des Ionisierungslasers, also über die Zahl der Photonen geregelt. Bei geringen Laserleistungen im Bereich um  $10^5 \text{ W/cm}^2$  wird bei organischen Verbindungen zumeist ausschließlich das Molekülion gebildet. Man spricht in diesem Fall von **weicher Ionisation**. Es werden nur so viele Photonen absorbiert, wie zum überschreiten des Ionisationspotentials notwendig sind.



Die innere Energie der Ionen ist dann gering, sodass keine Fragmentierung stattfindet. In dem Massenspektrum, das in diesem weichen Ionisationsmodus aufgenommen wird, kann sehr schnell das Molekülion eindeutig zugeordnet und damit das Molekulargewicht der untersuchten Probe bestimmt werden.

Durch die Einfachheit des Spektrums können auch Verunreinigungen oder Gemische schnell identifiziert werden. Daneben ermöglicht der Erhalt des Intakten Molekülions die Untersuchung molekülspezifischer Eigenschaften wie des Zwischenzustandsspektrums oder des Ionisationspotentials. Eine Erhöhung der Intensität des Ionisierungslaser (auf  $10^6$  W/cm<sup>2</sup> bis  $10^8$  W/cm<sup>2</sup>) führt dazu, dass das Molekülion seinerseits ein oder mehrere Photonen absorbiert. Die dadurch hervorgerufene Erhöhung der internen Energie des Molekülions resultiert im Allgemeinen in einer Fragmentierung des Molekülion. Man spricht in diesem Fall von **partiell harter Ionisation**.

Die Auswertung der Fragmentensignale im Massenspektrum ergibt Hinweise auf die chemische Struktur der Probenmoleküle. Weitere Erhöhung der Laserintensität ( $> 10^9$  W/cm<sup>2</sup>) führt schließlich zur Fragmentierung des Molekülions bis in einzelne Atome. Man spricht in diesem Fall von **harter Ionisation**. Bislang wurden mehrere Mechanismen zur Erklärung dieser Fragmentierungsreaktionen vorgeschlagen Allgemein akzeptiert ist heute das **Leiter-Wechsel-Modell** (engl. Ladder-switching-model), das sowohl durch experimentelle Befunde als auch theoretische Studien unterstützt wird. Dieses Model geht davon aus, dass in jedem ionischen Zustand nach Überschreiten der Dissoziationsschwelle die Dissoziation wahrscheinlicher als die Absorption ist. Die durch Dissoziation entstehenden Fragmentionen können ihrerseits weitere Photonen absorbieren bis die nächste Dissoziationsschwelle überschritten wird. In Abbildung 2-4. ist die Bildung von Fragmentionen aus dem Molekülion nach dem Leiter-Wechsel-Mechanismus dargestellt.

Zunächst absorbiert das Molekül Photonen einer geeigneten Wellenlänge und wird ionisiert. Ist die interne Energie des Molekülions nach der Ionisation nur geringfügig größer als die Ionisierungsenergie und kleiner als die Auftrittsenergie des betrachteten F<sub>1</sub>-Fragmentions, so tritt keine Fragmentierung auf. Absorbiert das Molekülion ein oder mehrere Photonen mit einer höheren Gesamtenergie, dann treten Fragmentierungsreaktionen auf, sobald die Auftrittsenergie der entsprechenden Fragmentionen überschritten wird. Die Fragmentionen

können nun Photonen auf ihrer Absorptionsleiter absorbieren und in Folge dessen ihrerseits fragmentieren. Es kommt also zu einem „Wechsel“ von der Absorptionsleiter des Moleküls auf die des Fragmentions. Dieser Absorptions-Fragmentierungs-Mechanismus kann bei ausreichender Lichtintensität und typischen Laserpulsdauern von 5 bis 10 ns mehrfach durchlaufen werden und schließlich zur kompletten Fragmentierung des Moleküls in seine Atome führen.

Das zweite Modell zur Erklärung der Fragmentierungsreaktionen ist das **Autoionisations-Leitermodell**, das in Anlehnung an Multiphotonen-Ionisationsprozesse in Atomen entstand; es ist das älteste Modell. Dieses Modell basiert auf der Annahme, dass das Molekül auf einer Leiter autoionisierender Zustände weit über die Ionisationsschwelle hinaus absorbiert, bis schließlich aus einem hoch angeregten Zustand heraus die Ionisation mit gleichzeitiger Fragmentierung erfolgt. Im Allgemeinen wird diese Absorptionsleiter jedoch durch direkte Ionisation unterbrochen. Dieses Modell spielt eine Rolle bei der Multiphotonen-Ionisation mit Laserpulsen im Subpikosekunden- und Femtosekundenbereich, da es überhaupt nur für sehr hohe Laserintensitäten und hohe Ionisationsquerschnitte zutreffen kann.

Das dritte Modellvorstellung zur Erklärung der Fragmentierungsreaktionen ist das **Molekülion-Leiter-Modell**. Das Modell besagt, dass im Molekül nach Absorption einer genügenden Anzahl von Photonen zunächst die Ionisation stattfindet. Erst das Ion absorbiert weitere Photonen, was schließlich zur Fragmentierung führt. Im Gegensatz zum Modell des Leiter-Wechsel-Modells erfolgt die Absorption dabei nur im Molekülion. In Abhängigkeit von der Pulsintensität und der Pulsdauer entsteht jeweils eine gewisse Verteilung von Molekülionen mit unterschiedlichen inneren Energien, die nach Ende des Laserpulses zerfallen und zu einem im Massenspektrum beobachtbaren Fragmentierungsmuster führen.

Um den Nachweis zu führen, dass die Absorption im Ion der dominierende Prozess für die Fragmentierung eines Moleküls ist, muss gegen die Prozesse der Autoionisationsleiter und der Ionisierung neutraler Fragmente diskriminiert werden. Dies gelang erstmals Boesl et al. mit einem Zwei-Farben-Experiment am Benzol.

El Sayed und Mitarbeiter konnten später die Ergebnisse bestätigen und dabei ebenfalls zeigen, dass die Absorption der neutralen Fragmente für Benzol keinen Beitrag zum Fragmentenstrom liefert. In dem von Boesl et al. durchgeführten Experiment wurde das Benzol durch zwei UV-Photonen über einen kurzlebigen (Lebensdauer 7 ns) Zwischenzustand ionisiert; die Lichtintensität wurde so gewählt, dass durch den ersten Laser alleine keine Fragmentierung zu beobachten war. Diese wurde induziert durch das im sichtbaren Wellenlängenbereich liegende Licht eines zweiten Lasers, d.h. eine Ionisation nur durch den zweiten Laser fand nicht statt. Dieser zweite Lichtpuls konnte zeitlich gegen den ersten soweit verzögert werden, dass alle Ionisations- und Autoionisationsprozesse abgeschlossen waren.

Das Hinzufügen des zweiten Lichtpulses führte zu intensiver Fragmentierung, gleichzeitig nahm die Intensität des Molekülions ab, so dass die Gesamtionenzahl konstant blieb. Damit konnte eine Ionisation der Fragmente durch den zweiten Laser ausgeschlossen werden. Die Messung bewies also, dass im Molekülion eine Weiterabsorption mit anschließender Fragmentierung stattfindet. Wurden die beiden Laser nicht verzögert, sondern gleichzeitig eingestrahlt, so blieben sowohl das Fragmentierungsmuster als auch der Gesamtionenstrom unverändert, was bedeutet, dass auch bei synchronem Einstrahlen beider Laser die Weiterabsorption mit nachfolgender Fragmentierung vom Ion aus erfolgt. Mit diesem Experiment konnten Boesl und Mitarbeiter erstmals die Dominanz der Photoabsorption im Ion für den Fragmentierungsprozess von Benzol nachweisen.

In der Folgezeit wurde dieses Modell von mehreren Arbeitsgruppen für die verschiedensten Moleküle bestätigt. Dieses Modell kann auch beobachtet werden, wenn die Laserpulsdauer kürzer als die für die Dissoziation des angeregten Molekülions benötigte Zeit ist, d.h. typischerweise mit Laserpulsen im Bereich weniger Pikosekunden, vorausgesetzt, dass die Laserintensität ausreichend hoch ist.

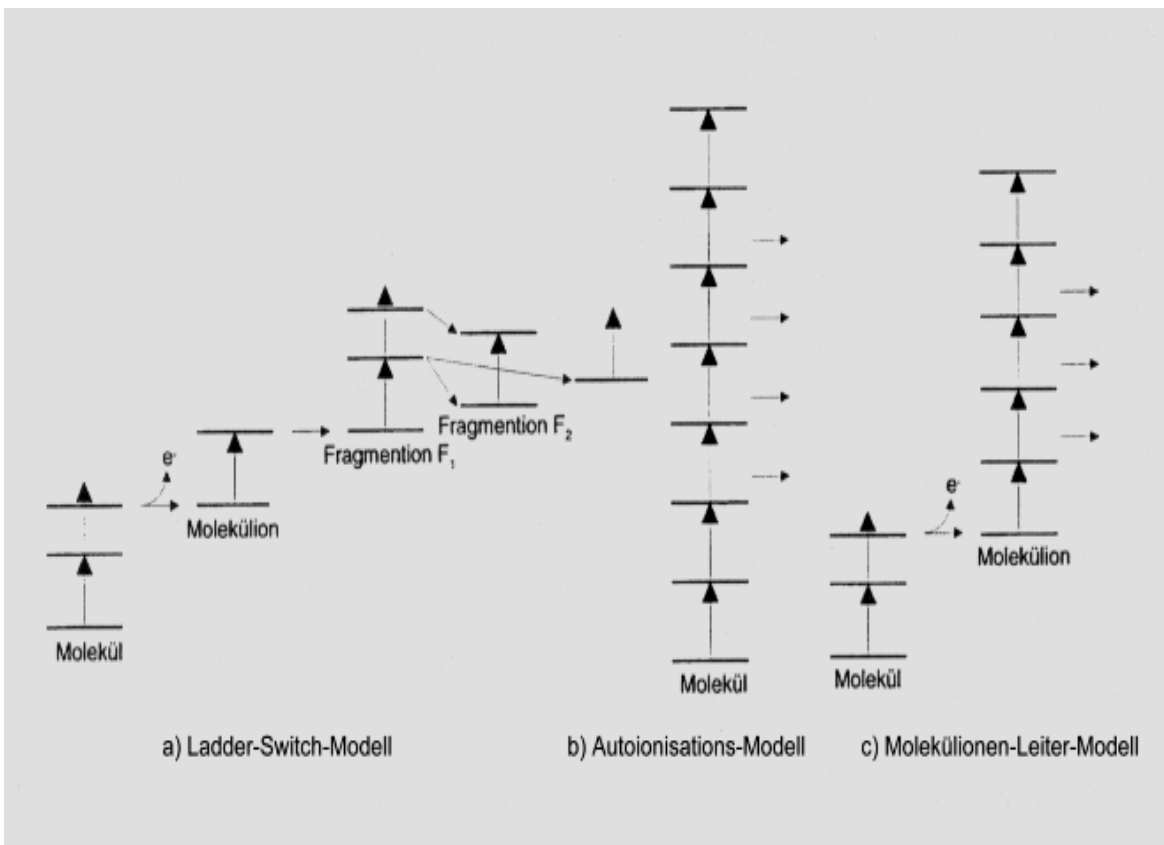


Abbildung 2-4 Schematische Darstellung der verschiedenen Modelle zur Multiphotonen-Ionisation

Die Verwendung von MUPI als Ionisationsmethode in der Flugzeitmassen-spektrometrie bringt viele apparative Parameter zu einem Optimum. Die Ionisationsdauer bei MUPI ist gleich der Zeitdauer des Laserpulses oder kleiner als diese, also typischerweise <10 ns. Der Ionisierungsort kann genau definiert werden.

Die Ortsunschärfe der Ionenbildung kann durch Fokussierung des Laserstrahls auf etwa 100 µm begrenzt werden. Bei hohen Photonendichten erfolgt mit MUPI die Bildung hoher Ionendichten zeitlich und räumlich gut eingegrenzt, wodurch eine maximale Auflösung in RETOF erreicht wird.

Die Multiphotonen-Ionisation bietet viele Vorteile, die gerade bei der Untersuchung von Biomolekülen von großem Nutzen sind. Zunächst einmal handelt es sich um eine Ionisierungsmethode, bei der dem Molekülion nur eine geringe, genau definierte Überschussenergie übertragen wird. Die Überschuss-Energie beträgt zwischen 0 und 3 eV

und teilt sich auf in die kinetische Energie des Photoelektrons und die verbleibende innere Energie im Molekülion. Die niedrige innere Energie verhindert größtenteils die Fragmentierung auch labiler Biomoleküle. Es kann somit das Molekülion detektiert werden. Durch Änderung der Photoenergie oder durch Änderung der Lichtintensität kann die Fragmentierung direkt beeinflusst werden.

Durch die Verstärkung der Ionisation bei der Anregung über einen realen Zwischenzustand um Zehnerpotenzen können aus einem Gemisch bestimmte Moleküle selektiv ionisiert werden.

Durch resonante Anregung gelingt es sogar, Moleküle der gleichen chemischen Verbindung, die sich nur in der Anzahl ihrer  $^{13}\text{C}$ -Isotope unterscheiden, selektiv zu ionisieren. Diese Selektivität geht bei größeren Molekülen allerdings verloren, da sie sehr viele Freiheitsgrade besitzen. Die verschiedenen realen Anregungsniveaus liegen dann sehr eng beieinander, so dass bei endlicher Linienbreite des Ionisationslasers immer reelle Übergänge getroffen werden. Durch Abkühlung der Moleküle kann hier eine Limitierung der Übergänge durch eine Reduzierung der besetzten Zustände in gewissem Umfang erreicht werden.

Die Entwicklung von Lasern als schmalbandige, hochintensive Lichtquellen ermöglicht es, Photonen genau definierter Energie zu MUPI einzusetzen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Messungen sind mit der zuvor beschriebenen „einfarbigen“ resonanten zweiphotonen-Ionisation durchgeführt worden.

In der Ionenquelle werden die neutralen Moleküle mit einer ultravioletten Strahlungsquelle zunächst in einen elektronisch angeregten Molekülzustand gebracht, um dann innerhalb der Lebensdauer dieses Zustandes mit einem zweiten Photon aus dem gleichen Laserpuls ionisiert zu werden. Da eine Untersuchung der intakten Moleküle erfolgen soll, sind geringe Strahlungsintensitäten eingesetzt worden.

### 2.1.6 Apparativer Aufbau

Alle in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden mit einem Reflektron-Flugzeitmassenspektrometer des Typs TOF 1 der Bruker-Franzen Analytik GmbH durchgeführt worden. Seit der Inbetriebnahme im Jahr 1988 sind an diesen Prototypen geringfügige Modifikationen vorgenommen worden. Ein Schema der experimentellen Anordnung ist in der Abbildung 2-5 gezeigt.

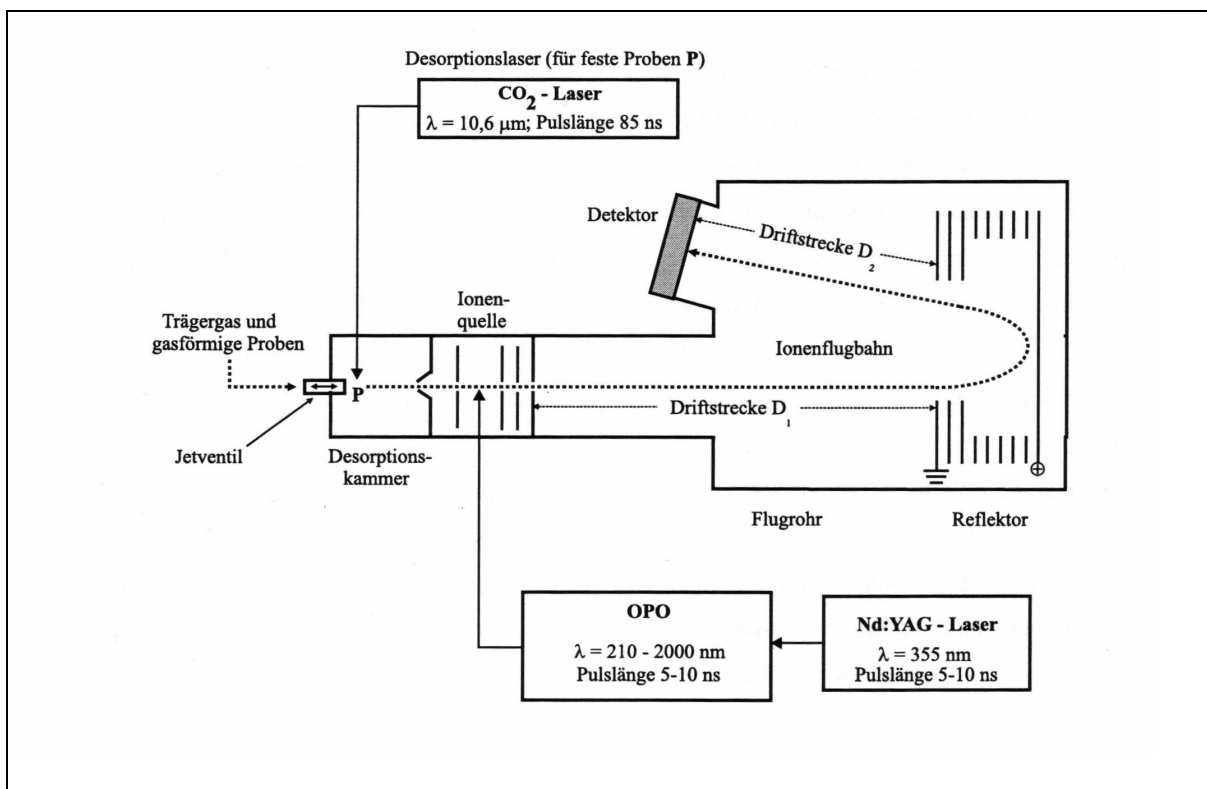


Abbildung 2-5 Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus

Das TOF 1 besteht, wie in Abbildung dargestellt, aus Einlasssystem, Desorptionskammer und Ionenquelle sowie einem Flugrohr. In dem sich an eine erste Driftstrecke der Reflektor und die zweite Driftstrecke anschließen. Der Probeneträger wird mittels einer Schubstange aus Edelstahl durch eine Schleuse in das Hochvakuum der Desorptionskammer eingeführt. Desorptionskammer und Ionenquelle sind durch einen Skimmer miteinander verbunden, dessen Öffnungsdurchmesser je nach eingesetztem Typ 0,5-1,5 mm beträgt. Durch den Skimmer werden die äußeren, weniger gut gekühlten Bereiche des Jets abgetrennt, so dass

nur die sehr stark abgekühlten Moleküle aus dem Zentrum des Molekularstrahls in die Ionenquelle gelangen (siehe Abbildung 3-7).

In den beiden Kammern herrscht ein Druck von ca.  $2 \times 10^{-6}$  mbar. Das Flugrohr ist über ein Plattenventil mit der Ionenquelle verbunden; der Druck beträgt hier ca.  $2 \times 10^{-7}$  mbar. Der Probenträger befindet sich direkt vor der Öffnung des Jetventils, durch welche das Trägergas Argon expandiert wird. Für die Untersuchung der Feststoffe und Feststoffgemische wurde die Technik der IR-Laserdesorption eingesetzt. Hierbei wird die feste Probe mittels eines gepulsten  $\text{CO}_2$ -Lasers in den Überschallgasstrahl desorbiert. Bereits bei der Desorption entstehende positiv geladene Ionen werden durch eine am Eingang der Ionenquelle befindliche Repellerplatte, an die ein Potential von etwa +850 V angelegt ist, am Eindringen in die Ionenquelle gehindert. Die desorbierten Probenmoleküle werden durch das Jetgas mitgerissen, und gleichzeitig erfahren sie eine Abkühlung ihrer inneren Freiheitsgrade.

In der Ionenquelle werden die neutralen Probenmoleküle ionisiert. Die Ionenquelle besteht aus einer zweistufigen Beschleunigungsregion mit nachgeschalteter Ionenoptik, die eine hohe Transmission der erzeugten Ionen bewirkt. Diese Ionen werden durch Potentialdifferenzen von 300 V bzw. 800 V zweifach beschleunigt und passieren zunächst eine elektrische Einzellinse, die mit einem Potential von etwa -600 V betrieben wird und eine Minimierung der Ionenstrahldivergenz bewirkt. Horizontale und vertikale Ablenkplatten sorgen für eine Korrektur der Flugrichtung. An den Ablenkplatten werden Potentiale von -15 V bis +15 V derart angelegt, dass der Ionenstrahl optimal in den Reflektor hineingeführt wird.

Der dreistufige Reflektoraufbau des Bruker-Franzen-TOF 1 ist mit einem angelegten Gesamtpotential von 770 V in der Abbildung 2-6 dargestellt. Die ersten beiden Stufen mit angelegten Potentialdifferenzen von 80 V und 340 V sorgen für eine Abbremsung der Ionen. Die letzte Stufe, die mit einem Potentialgradienten in der Größenordnung von 20 V/cm betrieben wird, sorgt für eine Energiefokussierung. Eine zusätzliche räumliche Fokussierung des Ionenstrahls wird durch das inhomogene elektrische Feld des Reflektors bewirkt.

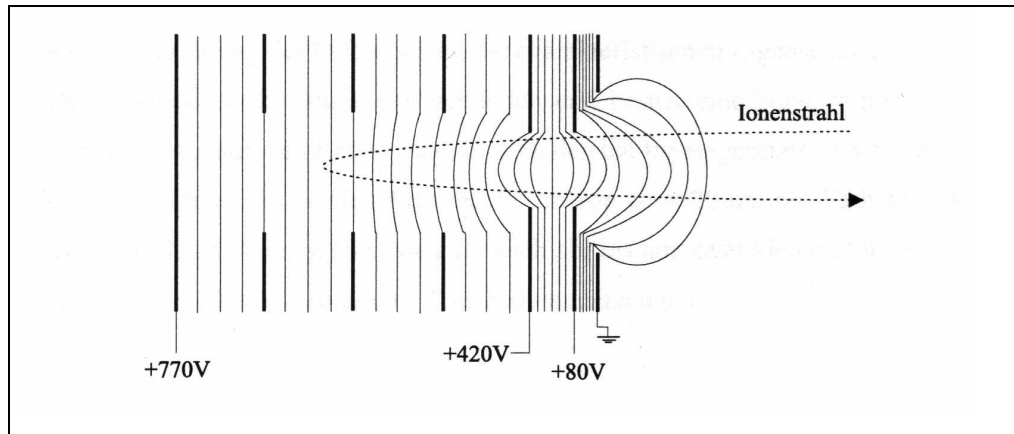


Abbildung 2-6 Reflektron des Bruker-Franzen-TOF 1

Die Detektion der Ionen erfolgt mit Hilfe eines Microsphere-Plates-Detektors (MSP), der mit einer Spannung von maximal 2.90 kV betrieben wird. Die Aufzeichnung, Digitalisierung und Mittelung der Massenspektren wird mit einem Lecory LSA 1000 Series (High Speed Signal Digitizer / Analyzer).

Zur Ionisation mit ns-Pulsen wird der mit dem frequenzverdoppelten Strahl eines Nd:YAG-Laser (Modell Quanta Ray PRO-230-30) gepumpten OPO („Optischer Parametrischer Oszillator“) der Firma Spektra Physics (Modell MOPO-730) eingesetzt.

Die ausgesandte Strahlung des OPOs besitzt die charakteristischen Eigenschaften eines Lasers; sie ist monochromatisch, kohärent, eng gebündelt und besitzt eine hohe Photonendichte. Im Vergleich zu den häufig eingesetzten Farbstofflasern deckt der OPO einen vielfach größeren Wellenlängenbereich ab; bis auf zwei kleine „Lücken“ läßt sich Strahlung kontinuierlich von 210 nm bis über 2000 nm erzeugen



## 3 Clusterbildung

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der massenspektrometrischen Untersuchung intakter Moleküle bzw. daraus entstehenden schwach gebundenen Clustersystem. Diese Systeme werden durch den Einsatz eines Überschallgasstrahls experimentell zugänglich.

Mit einer freien Überschallexpansion lassen sich spektroskopisch „kalte“ Atome und Moleküle erzeugen, die sich dann ihrerseits zu van der Waals Molekülen, bzw. zu Clustern zusammenschließen können. Die Moleküle sind nämlich zum einen von ihrer Umgebung vollständig isoliert und haben sich zum anderen auf ungefähr 2 Kelvin bezüglich ihrer Rotationstemperatur abgekühlt<sup>24</sup>.

Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen für das Verständnis eines Überschallstrahls und zur Bildung von Clustern ausführlich behandelt.

### 3.1.1 Adiabatische Expansion eines idealen Gases

Bei der adiabatischen Expansion eines Gases mit dem Anfangsdruck  $p_0$  auf  $p$  durch eine Düse des Durchmessers  $d$ , wird ein Teil der ungeordneten Wärmebewegung der Teilchen, bestimmt durch  $p_0$ ;  $T_0$ , in gerichtete Translationsenergie umgewandelt. Geht man von isentropischen Bedingungen aus, folgt aus dem Energieerhaltungssatz für das ideale Gas vor und nach der Expansion:

$$H_0 + \frac{1}{2}mv_0^2 = H + \frac{1}{2}mv^2 \quad (3.1)$$

$H$  ist die Enthalpie des Gases und  $\frac{1}{2}mv^2$  die kinetische Energie der Strömung. Der Index "0" kennzeichnet den Zustand vor der Expansion. Da im thermischen Gleichgewicht vor der

### 3. Clusterbildung

---

Expansion keine Strömungsgeschwindigkeit vorliegt, ist  $v_0 = 0$ . In Gl. (3.2.1.1.1) kann die Enthalpie durch den Term  $H = c_p T$ , mit  $c_p$  der Wärmekapazität des Gases bei konstantem Druck, substituiert werden:

$$c_p T_0 = c_p T + \frac{1}{2} m v^2 \quad (3.2)$$

Diese Beziehung offenbart, dass mit der Abnahme der Temperatur des Gases durch die adiabatische Expansion eine Zunahme der kinetischen Energie der Atome im Strahl verbunden sein muss. Für den Fall  $T = 0$  wäre demnach die maximale kinetische Energie mit  $E_{kin}^{max} = c_p T_0 = \frac{5}{2} k_B T_0$  erreicht. Mit Festlegung der Machzahl  $M$ , als Verhältnis der Strömungsgeschwindigkeit  $v$  zur lokalen Schallgeschwindigkeit  $u$ , erhält man durch Einsetzen von:

$$M = \frac{v}{u} \quad u = \sqrt{\frac{\kappa k_B T}{m}} \quad k_B = c_p - c_v \quad \kappa = \frac{c_p}{c_v}$$

in Gl.3 2.1.1.2 und Umformen die Beziehung:

$$\frac{T}{T_0} = \left(1 + \frac{\kappa - 1}{2} M^2\right)^{-1} \quad (3.3)$$

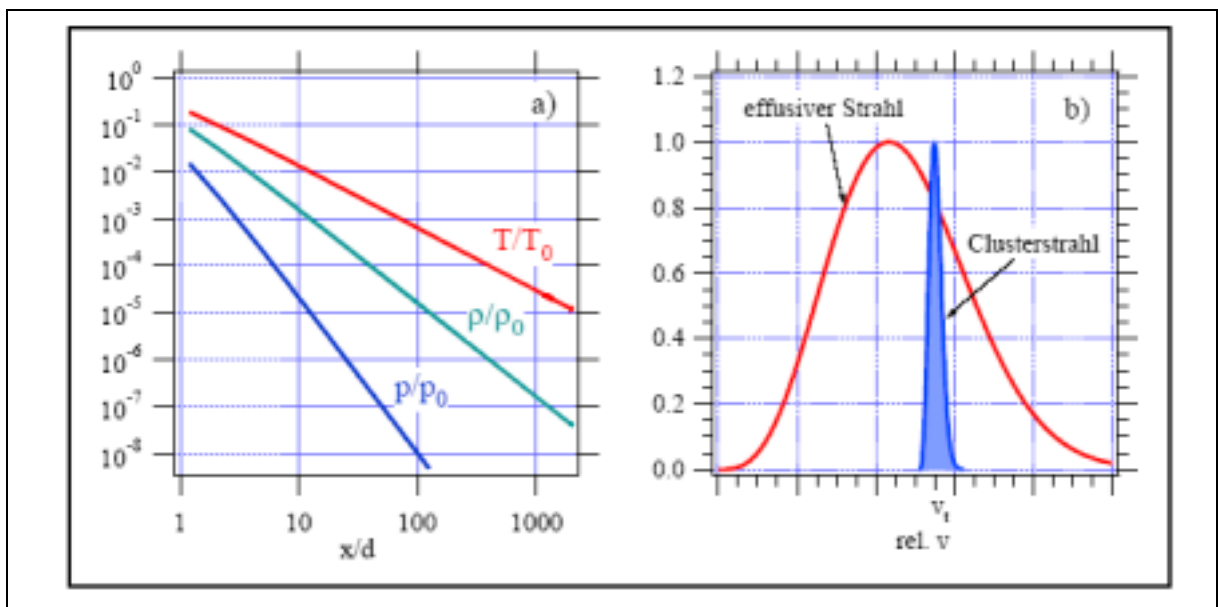
Als  $k_B$  wird die Boltzmannkonstante und als  $\kappa$  der Adiabatenkoeffizient bezeichnet, welcher das Verhältnis der Wärmekapazitäten bei konstantem Druck  $c_p$  und Volumen  $c_v$  widerspiegelt. Über die Poissonschen Gleichungen lassen sich die thermodynamischen Variablen Druck  $p$ , Temperatur  $T$  und Dichte  $\rho$  wie folgt miteinander verknüpfen:

$$\frac{T}{T_0} = \left(\frac{p}{p_0}\right)^{\frac{\kappa-1}{\kappa}} = \left(\frac{\rho}{\rho_0}\right)^{\kappa-1} \quad (3.4)$$

### 3. Clusterbildung

Ein hoher Kühlungseffekt tritt demnach durch Senkung von  $T_0$  oder Erhöhung von  $p_0$  ein. Durch die Verbindung der Gl. (3.4) mit (3.3) wird ein direkter Zusammenhang von  $T$ ,  $p$  und  $\rho$  mit  $M$  hergestellt. Außerdem hängt  $M$  von der zurückgelegten Flugstrecke  $x$  sowie  $d$  ab und kann näherungsweise mit  $M = const * \left(\frac{x}{d}\right)^{k-1}$  angegeben werden. Ist sie bestimmbar, lassen sich die thermodynamischen Variablen errechnen. Die Abbildung 3-1 a skizziert das Verhalten von  $T$ ,  $p$  und  $\rho$  in Abhängigkeit des reduzierten Abstands von der Düse ( $x/d$ ).

In Abbildung 3-1 b sind die Maxwell'sche Geschwindigkeitsverteilung in Strahlrichtung für einen effusiven ( $M=0$ ) und für einen gerichteten Strahl ( $M>0$ ) abgebildet (beides nach Ref. [25]).



**Abbildung 3-1a) Die Verhältnisse von  $p$ ,  $T$  und  $\rho$  bei der adiabatischen Expansion eines idealen Gases in Abhängigkeit des reduzierten Düsenabstandes  $x/d$ . b) Die Maxwell-Boltzmann-Geschwindigkeitsverteilung eines effusiven Strahls.**

Die Graphik verdeutlicht den zu erwartenden steilen Abfall von  $p$ ,  $T$  und  $\rho$  bei der Expansion des Gases ins Vakuum mit zunehmender Entfernung von der Düse, was gleichbedeutend mit dem Anstieg von  $M$  ist. Das Wachstum von  $M$  dauert bis zum Erreichen der sog. *Endmarchzahl* an. Sie gibt an, bei welcher Entfernung von der Düse keine Stöße mehr im Strahl stattfinden und somit  $p$ ,  $T$  und  $\rho$  konstant bleiben.

Sie wird ausgedrückt als

$$M_{end} = const * (p_0 d)^{\frac{1-\kappa}{\kappa}} \quad (3.5)$$

Die Pionierarbeit auf dem Gebiet der Clustererzeugung mittels Überschallmolekularstrahlen, die von Kantrowitz und Grey<sup>115</sup> im Jahr 1951 entwickelt wurden, leistete E.W. Becker bereits 1956, der Cluster von H<sub>2</sub>, Ar und N<sub>2</sub> durch adiabatische Expansion der entsprechenden Gase erzeugte. Seither hat sich die Überschallmolekularstrahlen zu der am häufigsten eingesetzten Methode zur Erzeugung schwach gebundener Cluster entwickelt<sup>88,89, 114</sup>. Dieses Verfahren ist insbesondere für gasförmige oder flüchtige Verbindungen geeignet. Der Überschallgasstrahl, auch Jet genannt, entsteht durch die Expansion eines unter hohem Druck stehenden Gases durch eine Düse ins Vakuum.

Die Expansion kann kontinuierlich oder gepulst erfolgen. Durch Verwendung eines gepulsten Ventils kann der Gasdurchsatz verglichen mit dem kontinuierlichen Einlass erheblich verringert werden. Die Expansion geschieht so schnell, dass praktisch kein Wärmeaustausch mit der Umgebung stattfindet. d.h. sie ist adiabatisch. Während der Expansion des Gases durch die Düse und unmittelbar dahinter ereignen sich viele Stöße zwischen den Gasmolekülen. Die schnelleren Teilchen stoßen die vor ihnen fliegenden, langsameren Teilchen an und übertragen dabei Translationsenergie.

Es resultieren hieraus kleine Relativgeschwindigkeiten, sodass weitere Stöße aufgrund der schnell abnehmenden Teilchendichte, bedingt durch die Expansion, nicht mehr vorkommen. Die stoßfreie Zone wird bereits weniger Düsendurchmesser hinter der Düse erreicht. Bei den beschriebenen adiabatischen Expansionen wird somit die ungerichtete thermische Energie der Moleküle durch Stöße in eine gerichtete, einheitliche, über Schallgeschwindigkeit liegende Strömungsgeschwindigkeit umgewandelt, sodass die Teilchen im Überschallgasstrahl eine enge Geschwindigkeitsverteilung besitzen.

Es findet in diesem Sinne eine Kühlung der Moleküle im Überschallgasstrahl statt<sup>115</sup>. Die den Molekularstrahl charakterisierende Größe ist die **Knudsenzahl K**

$$K = \frac{\lambda_0}{d} \quad (3.6)$$

Hierbei entspricht  $\lambda_0$  der mittleren freien Weglänge der Gasteilchen und  $d$  dem Öffnungsdurchmesser. Die *Knudsenzahl*  $K$  wird also durch das Verhältnis von mittlerer Freier Weglänge (im Bereich vor der Düse) zum Düsendurchmesser angegeben. Von einem Überschallstrahl spricht man immer dann, wenn  $K$  kleiner als 1 ist. Also notwendige Bedingung für die Ausbildung eines Überschallgasstrahl muss die mittlere freie Weglänge der Teilchen in der Düse sehr viel kleiner sein als der Düsendurchmesser, da ansonsten beim Durchströmen des Gases durch die Öffnung ins Vakuum zu wenig Stöße zwischen den Gasteilchen stattfinden würden.

Während der adibatischen Expansion kommt es infolge der Umwandlung thermischer Energie der Gasteilchen in Translationsenergie der gerichteten Strömung während der Stoßprozesse zur Abkühlung der Gasteilchen in ihren Freiheitsgraden. Diese Temperatur Abnahme ist jedoch nicht für alle Freiheitsgrade gleich stark.

Die theoretische Behandlung der Clusterbildung durch homogene Kondensation im Strahl wird von Wegener und Parlange diskutiert<sup>26</sup>. Eine qualitative Betrachtung dieses Phasenüberganges im Bild eines übersättigten Gases soll anhand von Abbildung 3-2 demonstriert werden.

Das zu expandierende Gas befindet sich zunächst in einem Gleichgewichtszustand, charakterisiert durch den Punkt  $p_0, T_0$  in Abbildung 3-2. Während der Expansion läuft es entlang der Adiabate, schneidet dabei die temperaturabhängige Gleichgewichts-Dampfdruckkurve  $P_D(GG)$  im Punkt A und tritt in die Übersättigungszone (schraffiert) ein.

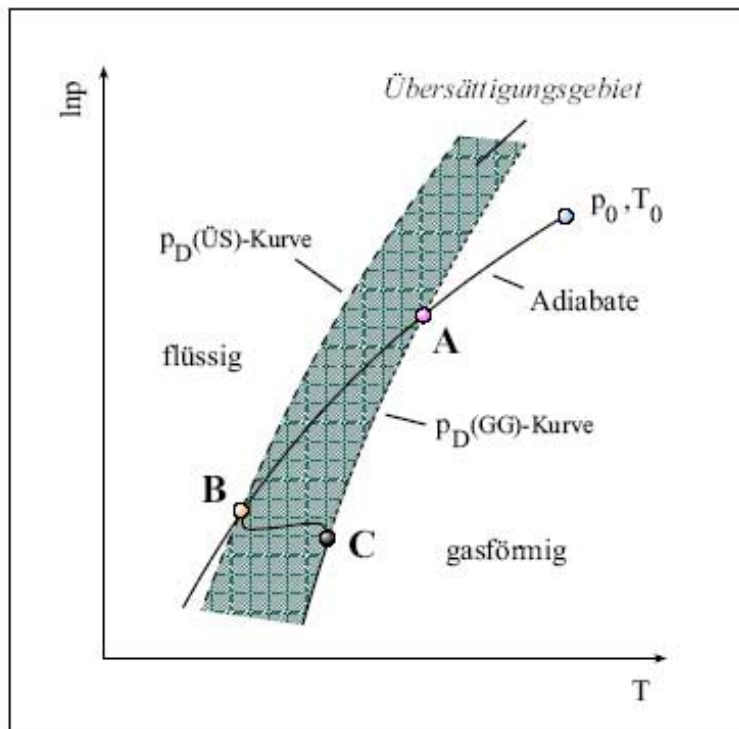


Abbildung 3-2 Schematisches P,T-Diagramm zur qualitativen Beschreibung der homogenen Kondensation im Düsenstrahl. Das Gas bewegt sich zunächst entlang der Adiabate und tritt am Punkt A in das -Übersättigungsgebiet ein. Angekommen an B, setzt spontane Kondensation ein, das Gas kühlt sich ab und erreicht C.

Gelangt es zum auf der Übersättigungsdampfdruckkurve  $p_D(\text{ÜS})$  gelegenen Punkt B, setzt spontane Kondensation ein, d. h. die Bildung von Clustern. Die bei jeder Bindungsknüpfung freiwerdende Energie heizt den Cluster schrittweise auf, was zum Abknicken der Expansionskurve von der Adiabate führt. Die Kondensation der Gasmoleküle endet, wenn der Gleichgewichtszustand C hergestellt ist. Die effiziente Abkühlung des Clusters kann durch das Verdampfen von Bestandteilen eintreten. Folglich sind bereits die am Nachweis- oder Reaktionsortankommenden Cluster nur noch ein Abbild ihrer ursprünglichen Konfiguration. Das bedeutet, dass sich die durch die Erzeugung bedingte breite Größenverteilung über den gesamten Zeitraum hinweg ständig ändert. Schließlich beeinflusst die Ionisierung des Clusters selbst die Größenverteilung, da durch den unmittelbaren Energieeintrag in das System eine Fülle von Fragmentierungsreaktionen sowie weitere Verdampfungsprozesse ausgelöst werden.

### 3. Clusterbildung

---

Beispielsweise dauert es in einem kleinen Edelgascluster  $\text{Ar}_7$  nach seiner Ionisierung zum positiven Teilchen nur ca. 6 ps, bis das erste Argonatom verdampft wird. 50 ps später haben vier weitere Atome den Cluster verlassen<sup>27</sup>.

Die Temperatur des Clusters und die Bestimmung seiner Größe sind zwei wichtige, aber sehr schwierig zu kontrollierende Parameter. Eine detaillierte Studie über den Einfluss der Düsengeometrie auf die Clusterbildung in Abhängigkeit der kontrollierbaren Expansionsparameter  $P_0$  und  $T_0$  und der Versuch, mit Hilfe des empirisch entwickelten Modells der *corresponding jets* Voraussagen für die Clustergröße zu treffen, sind von Hagena und Obert beschrieben worden<sup>28</sup>.

Die Temperatur eines großen Clusters ( $n > 30$ ) kann nach Haberland<sup>91</sup> wie folgt abgeschätzt werden:

$$\tau^{-1} = \nu g e^{-\frac{D}{k_B T}} \quad (3.7)$$

mit  $\tau$  der durch das Experiment bestimmten Lebensdauer des Clusters,  $\nu$  der charakteristischen Schwingungsfrequenz,  $g$  dem "Entartungsgrad" (entspricht etwa der sich an der Oberfläche des Clusters befindlichen Teilchen  $N_s = 4N^{2/3}$  mit  $N$  der Gesamtteilchenzahl im Cluster) und  $D$  der Dissoziationsenergie.

Anhand eines Zahlenbeispiels kann dies verdeutlicht werden: ein  $(\text{CO}_2)_{60}^+$ -Cluster fliege durch ein Massenspektrometer und benötige  $\tau = 1\mu\text{s}$ , um zum Detektor zu gelangen. Unter Vernachlässigung der inneren Freiheitsgrade des Moleküls, mit  $\nu \approx 10^{12} \text{ s}^{-1}$  und  $g \approx N_s = 39$  erhalten wir für das Verhältnis  $D/k_B T \approx 17:48$ . Mit  $D \approx 0.21 \text{ eV}$  muss der Cluster kälter sein als  $k_B T = 12 \text{ meV} \approx 139 \text{ K}$ , damit kein Molekül durch Verdampfung auf der Flugstrecke verloren geht. Hat der Cluster 100  $\text{CO}_2$ -Moleküle muss die Temperatur unter 133K sinken.

Da im Allgemeinen die Wirkungsquerschnitte  $\sigma$  für den Energietransfer von Rotations- und Vibrationsenergie in Translationsenergie bei elastischen Stößen<sup>115</sup> der Relation

### 3. Clusterbildung

---

$\sigma_{vib} < \sigma_{rot} < \sigma_{trans}$  genügen, bleibt nach erfolgter Expansion, die nur eine kurze Zeit beansprucht, pro Freiheitsgrad mehr Vibrations als Rotationsenergie und wiederum mehr Rotations- als Translationsenergie übrig; Rotation, Vibration und Translation sind nicht mehr miteinander im thermischen Gleichgewicht.

$$T_{trans} < T_{rot} < T_{vib} \quad (3.8)$$

Die Translationstemperatur  $T_{trans}$  liegt in der Größenordnung einiger Kelvin (K), die Rotationstemperatur  $T_{rot}$  bei einigen 10 K und die Vibrationstemperatur  $T_{vib}$  beträgt bis zu 100K. Da im inneren des Jets die meisten Stöße stattfinden, ist die Abkühlung hier am effektivsten.

Der Überschallgasstrahl ist in der bisher beschriebenen Form für viele empfindliche Experimente noch völlig ungeeignet. Erst die Einführung einer Molekular-strahltechnik mit Hilfe eines leistungsfähigen trichterförmigen Kollimators (Skimmers), werden die äußeren Bereiche abgetrennt, und nur die stoßfreien im Zentrum des Expansionskegel am besten gekühlten Moleküle erreichen die Ionenquelle. Die äußere Form des Skimmers verhindert, dass die abgetrennten Bereiche des Jets in Form von Schockwellen den Gasstrahl stören.

In der Praxis müssen an einen solchen Skimmer hohe Anforderungen gestellt werden, da dieser auch ein großes Hindernis für den Überschallgasstrahl darstellt. Deshalb muss zunächst die Frage untersucht werden, welche Eigenschaften ein idealer Skimmer haben sollte.

Es wurde gezeigt, dass der Skimmer einen starken Einfluss auf die Intensität des Molekularstrahls hat. Mit einem  $\text{CO}_2$ -Jet konnte von Anderson<sup>116</sup> gezeigt werden, dass bei einem mit flüssigem Stickstoff gekühltem Skimmer eine Intensitätszunahme um den Faktor drei gegenüber dem ungekühlten stattfindet. Dieser Effekt ist auf eine Kondensation der  $\text{CO}_2$  Moleküle an der Skimmeraußenwand und eine damit verbundene Abnahme der Stöße an der Skimmerlippe zurückzuführen.



### 3. Clusterbildung

---

Der Skimmer erzeugt in einem Überschallgasstrom, wie jedes andere Hindernis auch, dessen Dimensionen senkrecht zur Flussrichtung groß gegenüber der mittleren freien Weglänge sind, eine Schockwelle, die sich an die Spitze des Skimmers anlegt. Diese Schockwelle hat eine Schichtdicke vom 2-bis 10-fachen der freien Weglänge.

Nach Anderson<sup>116</sup> kommt es bei sehr kleinen Düsen-Skimmer Abständen zu sehr hohen Teilchendichten innerhalb des Skimmers, was zu einem „Verschlucken“ der Schockwelle führt. Diese breitet sich dann erst hinter dem Skimmer, also innerhalb der eigentlichen Messkammer, aus.

Bei steigender Distanz springt die Schockwelle dann vor die Skimmeröffnung und führt wegen der schnellen Aufheizung vor und in der Skimmermündung zum Zusammenbruch des Molekulargasstrahls. Vergrößert man den Abstand noch weiter, wird die Gasdichte an der Skimmeröffnung immer geringer und damit nimmt auch die Schockwelle mehr Raum ein, so dass nun der Skimmer weiter in jener versinkt.

Solange die Skimmerlippe noch aus der Schockwand herausragt, haben wir so genannte „free-Jet“ Bedingungen. Wenn der Düsen-Skimmer Abstand noch größer wird, wird auch die Schockwelle weiter nach vorne wandern und der Skimmer ist für den Überschallgasstrahl kaum noch zu erreichen. Wenn man zu noch größeren Abständen übergeht, dann gewinnen auch die Kollisionen mit dem Hintergrundgas zu Einfluss, so dass die Strahlintensität hinter dem Skimmer weiter absinkt.

Für die ideale Geometrie des Skimmers müssen die Oberfläche, die Skimmerlippe, der Innen- und Außenwinkel, sowie die Skimmerhöhe genau aufeinander und auf den speziellen Zweck abgestimmt werden. Die Skimmeroberfläche sollte dabei möglichst glatt sein, um die Zahl der Reflexionen von Gasteilchen gering halten zu können.

Die Skimmerlippe muss außerdem möglichst scharf sein, da hier leichte Reflexionen die Strahlintensität stark herabsetzen können. U. Bossel<sup>117</sup> konnte zeigen, dass die Intensität mit zunehmender Lippendicke abnimmt. Das Strömungsbild vor dem Skimmer ist sehr komplex. Man muss einerseits den äußeren Skimmerwinkel möglichst klein halten, um dem Überschallgasstrom wenig Hindernis zu bieten. Andererseits muss der Innenwinkel groß genug sein, um Kollisionen innerhalb des Skimmers zu vermeiden.

### 3. Clusterbildung

---

Dies ist besonders wichtig, da der hier verwendete Skimmer sehr weit in den Expansionskegel hineinragt und der Strahl hinter der Skimmerlippe noch immer leicht divergent ist.

Außerdem muss bei der Wahl des Winkels berücksichtigt werden, dass die entstehende Schockwelle nicht nur an der Skimmerlippe anliegt, sondern dass die Schicht der zwischen Schockwelle und Wand liegenden Moleküle dünn genug ist, so dass kein „spill-over“ in der Skimmeröffnung stattfinden kann. Für den inneren Winkel ist es die Flussdichte vor der Skimmeröffnung ausschlaggebend. Es lässt sich zum Beispiel berechnen<sup>117</sup> welche Trajektorien die Moleküle besitzen, die in einen vorgegebenen Skimer einströmen.

Wie schon oben erwähnt, kommt es bei der Expansion zu Kollisionen der Gasteilchen mit der Rückwand der Kammer und damit zu diffusen Reflexionen. Es bildet sich hier also eine Schockwelle in einem Abstand von der Wand aus, der von der jeweiligen Kammergeometrie abhängt. Außerdem bildet sich noch eine Grenzschicht aus, die an der Skammerwand entlang einen Gegenstrom bildet. Wenn der Skimmer nun zu kurz ist, kann es entweder zu dem „spill-over“ kommen, so dass die Strahlbildung ganz unterbunden wird.

Es muss also eine Skimmerlänge gefunden werden, bei dem solche Effekte auch bei starken Verdünnungen nicht auftreten können. Deshalb wird in der hier benutzten Apparatur ein Skimmer von 40 mm Länge verwendet. Dieser Skimmer führte auf Grund seiner hervorragenden Eigenschaften zu sehr kalten und clusterreichen Molekularstrahlen.

Die Verwendung eines Überschall-Molekularstrahls (Jet) in Kombination mit einem Skimmer wurde erstmals 1951 von Kantrowitz und Grey<sup>115</sup> beschrieben. Diese Kombination findet seitdem breite Anwendung in der Spektroskopie, da es mit Hilfe eines Jets möglich ist, Vibrations-, Rotations- und Translations- Temperaturen stark zu erniedrigen. Die Verwendung dieser Technik erlaubt die Aufnahme hochaufgelöster Zwischenzustands-Spektren, da die thermische Verbreiterung der Absorptionsbanden vermieden wird.

#### 3.1.2 Theorie der Clusterbildung

Wie schon in Kapitel 3.1.1 erwähnt wurde, werden in einem Überschallgasstrahl sehr leicht zahlreiche Clustern gebildet. Diese können aber nur entstehen, wenn sie mit Hilfe eines Dreierstoßes ihre Stoß -und Bindungsenergie so weit abgeben können, dass ein stabiler Komplex entsteht. Es ist aber auch möglich<sup>118, 119</sup>, dass einem langlebigen metastabilen Dimer erst später durch einen Stoß mit einem dritten Teilchen Energie entzogen wird. Empirisch kann die Zahl der Dimeren zuverlässig abgeschätzt werden aus folgender Gleichung:

$$X = \frac{P_v^{5/3} D^{2/3}}{T_v^{7/3}}$$

X= Zahl der Dimeren

P<sub>v</sub>= Druck vor der Düse

D= Düsendurchmesser

T<sub>v</sub>= Temperatur vor der Düse

Aus dieser Gleichung ergibt sich eine hohe Cluster und Dimerenkonzentrationen, wenn der Düsendurchmesser(D)vergrößert oder der Druck vor der Düse(P<sub>v</sub>) erhöht wird. Bei so einer Druckerhöhung muss natürlich auch das Partialdruckverhältnis von Probe und Trägergas konstant gehalten werden.

Die beste Methode zur Bildung von Clustern ist die Verwendung einer langen Düse mit einem großen Lochdurchmesser. Hier überwiegen nach Knuth<sup>120</sup> in der ersten Zone hinter der Düse Dreierstöße mit denen die Cluster gebildet werden. Daran schließt sich eine Zone an, in der Zweistöße überwiegen und die Cluster wieder zerstört werden. Bei einer Verlängerung der Düse wird nun die erste Zone vergrößert und es können sich mehr Cluster ausbilden. Die Moleküle und Cluster „heizen“ sich dadurch aber auch wieder etwas auf. Die Düsenlochlänge muss nun immer im richtigen Verhältnis zum Lochdurchmesser stehen. Denn in einem zu langem Loch entstehen Turbulenzen und ein starkes Druckgefälle<sup>121</sup>,

### 3. Clusterbildung

---

andererseits aber auch zahlreiche höhere Cluster. Bei zu kurzen Bohrungen kann sich dagegen kein gerichteter Strahl mehr ausbilden und die Teilchenzahl im Strahl nimmt stark ab.

Eine andere Möglichkeit zur Clusterbildung ergibt sich, wenn sich die Düsenöffnung innerhalb eines flachen ( $<90^\circ$ ) Kegels befindet. Bei der Expansion entstehen dann durch Reflexionen an der Kegelwand zahlreiche Dreierstöße mit dem Überschallgasstrahl, aber es können sich so nur „warme“ Cluster bilden. Zur Erzeugung kalter Cluster sollte die Düse also immer eine glatte und senkrechte Bohrung aufweisen.

Nach O.F. Hagen<sup>122</sup> entstehen Cluster auch bei der Verwendung eines flachen Skimmers, was sich aber wiederum auf Dreierstöße mit der dort vorhandenen stehenden Druckwelle erklären lässt. Diese hier beschriebene Art von Stößen führt aber auch zu einer starken Erwärmung der Moleküle und Cluster und kann für eine Messung daher nicht verwendet werden. In einem Überschallgasstrahl befinden sich die Cluster immer sehr nahe am Strahlzentrum. Sobald man diesen Bereich nach Außen weiter verlässt, findet man nur noch monomere und wenige dimere Moleküle vor. Höhere Cluster sind hier kaum noch vorhanden. Aus diesem Grund ist es von entscheidender Wichtigkeit, dass Düsenloch, Skimmer und die Ionenoptik exakt aufeinander ausgerichtet sind.

Infolge der Abkühlung der inneren Freiheitsgrade der Gasteilchen während der Expansion und der Angleichung ihrer Geschwindigkeiten wird die Bildung schwach gebundener Cluster durch Stoßprozesse ermöglicht. Denn es resultieren kleine Relativgeschwindigkeiten der Probenmoleküle, so dass die Wahrscheinlichkeit für die Rekombination zu Clustersystemen  $M_n$  erhöht, wenn die überschüssige Energie durch einen dritten Stoßpartner (z.B. Trägergasatom, Wand der Düse) abgeführt werden kann.

Die bei der Clusterbildung freiwerdende Bindungsenergie jedoch führt zu einer Erwärmung des kalten Jets und somit kommt es zu einem Zerfall der gebildeten Cluster. Um diesen zu reduzieren, verwendet man ein einatomiges Trägergas, üblicherweise einem Edelgas (He, Ar), dem nur ein geringer Prozentsatz an Probegas beigemischt wird. Bei diesem sogenannten „**Seeded beam- Verfahren**“ ist die Wahrscheinlichkeit für Stöße der Probenmoleküle untereinander klein, und bei den Stößen mit den Trägergasatomen ist nur eine Umwandlung der inneren Energie in der kinetische Energie der Expansion möglich, so dass eine maximale Abkühlung der inneren Energie der Moleküle erfolgt. Stöße der Probenmoleküle untereinander werden zwar dadurch seltner, und es findet eine geringere

Bildung von Clustersystemen statt, jedoch verteilt sich nun die Bindungswärme auf eine größere Zahl von Atomen, so dass insgesamt ein kalter Molekularstrahl entsteht, in dem die gebildeten Cluster stabilisiert und weiteren Untersuchungen zugänglich sind.

## 3.2 Darstellung und Reaktivität schwach gebundener Cluster

### 3.2.1 Bedeutung von Cluster

Die Untersuchung von Clustern gewinnt in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Cluster, sowohl neutraler als auch ionische, geben aus verschiedenen Gesichtspunkten interessante Antworten auf chemische und physikalische Fragen.

Untersuchungen an Clustern berühren eine Vielzahl von Forschungsgebieten<sup>123, 124</sup>. Neben den allgemeinen grundlegenden Fragestellungen zur Natur der intermolekularen Wechselwirkungen ist für die Chemie vor allem die Möglichkeit, Solvationsvorgänge auf mikroskopischer Ebene in isolierten Systemen zu untersuchen, vom großen Interesse. Ein weiterer Schwerpunkt liegt in der Klärung des Einflusses der Wasserstoff-Brückenbindung in biologisch relevanten Systemen (z. B. Struktur von Enzymen).

Cluster stellen ein Bindeglied zwischen Festkörpern und isolierten einzelnen Molekülen dar. Einzelne Moleküle in der Gasphase sind experimentell gut zugänglich.

Viele für einzelne Moleküle gelöste Fragestellungen, für die ein Vorliegen der Probe in der Gasphase Voraussetzung für experimentelle Untersuchungen ist, sind mit derzeitigen Mitteln bei Festkörpern nicht zu ermitteln. Vor allem Eigenschaften wie Ionisierungsenergie, Ionisationspotential, rotatorische, vibronische und elektronische Zustände sind nur von Molekülen, nicht aber von Festkörpern experimentell zu ermitteln. Durch Untersuchung von Clustern können hier Hinweise auf das Verhalten in den Festkörpern erhalten werden.

Interessant ist auch der Übergang von Moleküleigenschaften, wie Symmetrie der Punktgruppe und diskrete Vibrationszustände, zu Festkörpereigenschaften einer Verbindung, wie

Symmetrie der Raumgruppe und Zustanddichte bei Anregung durch Photonen, Elektronen oder Excitonen. Durch Untersuchung verschieden großer Cluster versucht man hier, den Übergang vom Molekül zum Festkörper zu erforschen.

Die Grundlagenforschung erhofft sich aus der Clusterexperimente neue Ansätze für das Verständnis von Festkörpern und Oberflächen. Untersuchungen an Clusteraggregaten sollen zur Klärung der Fragen beitragen, ob sich die Eigenschaften der Materie mit zunehmender Aggregation kontinuierlich ändern und wie viele Bausteine( d.h. welche Clustergröße) zur Beobachtung makroskopischer Eigenschaften mindestens erforderlich sind<sup>8, 126</sup>.

Neben diesen grundlegenden Forschungen ist vor allem die katalytische Wirksamkeit vieler Cluster von Interesse, da Cluster eine große Zahl von Oberflächenatomen bzw. -Molekülen haben, die in einer großen Reaktivität dieser Systeme resultiert. Viele chemisch wichtige Umsetzungen lassen sich durch Cluster katalysieren. Eine bekannte Gruppe von Katalysatoren stellen z. B. metalorganische Cluster dar, die bei verschiedenen industriell verwendeten Techniken zum Einsatz kommen<sup>127</sup>. Als Beispiel ist der für Hydrierungen eingesetzte Wilkinson-Katalysator<sup>128</sup> nur zu erwähnen.

Durch die Verwendung von Clustern als Katalysatoren lassen sich bestimmte Produkte bei geringerem Energieeinsatz synthetisieren. Cluster wird bei der Herstellung von Aerosolen, Plasma -Injektionen und bei der Supraleitfähigkeit eingesetzt. Silbercluster finden Anwendung in der Photographie, wobei das Starten dem Entwicklungsprozess eine kritische Größe von mindestens  $n=4$  benötigt<sup>129</sup>.

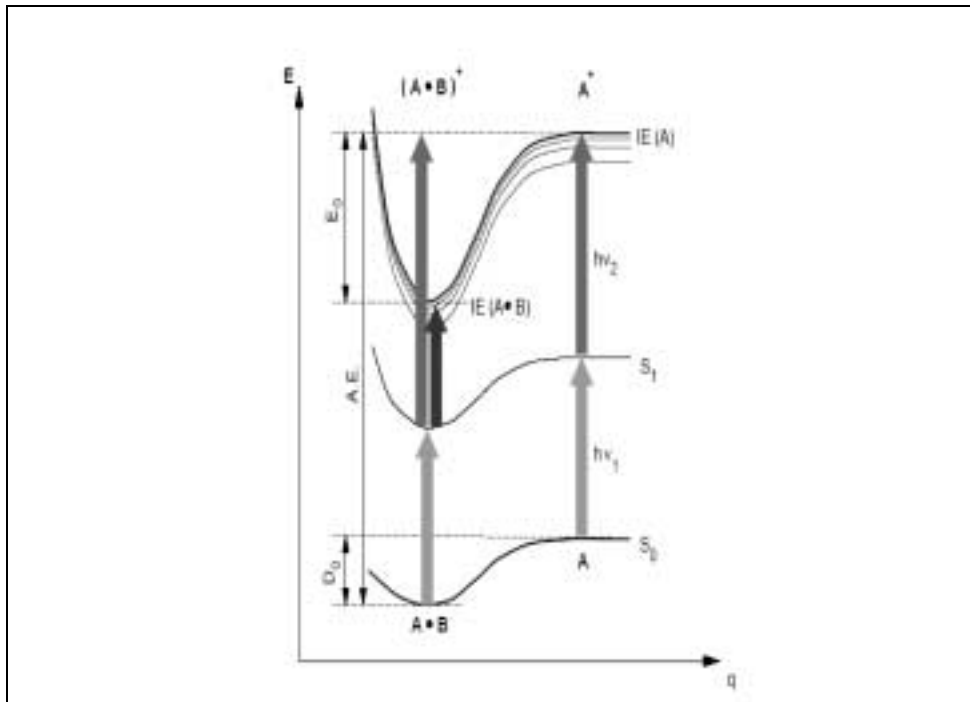
#### 3.2.2 Bindungsenergien von Clustern

Die Bindungsenergien (BE) von isolierten, d.h. nicht in Wechselwirkung mit anderen Systemen stehenden Clustern sind wesentliche Parameter bei der mikroskopischen Beschreibung von intermolekularen Wechselwirkungen.

Im Folgenden soll das Prinzip der Messung der BE von Cluster dargestellt werden. Die Energetik einer Dissoziationsreaktion eines Hetero-Dimers, welches aus zwei Molekülen A

### 3. Clusterbildung

und B besteht, kann durch einfache Basisreaktionen beschrieben werden (Siehe auch Abbildung 3-3):



**Abbildung 3-3 Messung der Bindungsenergie (BE) von Cluster.** Potentiale zweier Moleküle A und B, bzw. der Kationen  $A^+$  und  $B^+$ , im Abstand  $q$ .  $D_0$  ist die Bindungsenergie (BE) des neutralen Clusters AB,  $E_0$  die BE des kationischen Clusters  $(A \cdot B)^+$ .  $IE(A)$  und  $IE(A \cdot B)$ : Ionisationsenergien des Monomers A und des (Hetero)dimers AB.  $A \cdot E$ : *appearance energy*. Details siehe Text.

$$D_0 = A \cdot E - IE(A) \quad (3.9)$$

$$E_0 = A \cdot E - IE(A \cdot B) \quad (3.10)$$

$D_0$  ist die Bindungsenergie des neutralen Dimers  $A \cdot B$ , und  $E_0$  die des geladenen Clusters  $(A \cdot B)^+$ ,  $IE(A)$  und  $IE(A \cdot B)$  sind die jeweiligen Ionisationsenergien des Monomers A und des (Hetero) dimers  $A \cdot B$ , und  $A \cdot E$  ist die sogenannte *appearance energy*, also die Energie, bei der erstmals Fragmente des Dimer-Kations  $(A \cdot B)^+$  auftreten. Unter der Annahme, dass die Aktivierungsenergie für die Rückreaktion, d.h. die Assoziationsreaktion des Radikalkations  $A^+$  und des neutralen Moleküls B gleich Null ist (Born-Haber-Kreisprozess<sup>35</sup>), können die

### 3. Clusterbildung

---

Bindungsenergien  $E_0$  und  $D_0$  aus der gemessenen A.E., sowie der Ionisationsenergien  $IE(A)$  und  $IE(A\cdot B)$ , direkt berechnet werden.

Es sind diverse thermodynamische Methoden zur Bestimmung der BE wie etwa *high pressure mass spectrometry* (HPMS)<sup>36</sup>, Infrarot-Absorptionsspektroskopie in Gasgemischen<sup>37</sup>, oder bolometrische Methoden<sup>38</sup> bekannt. Bei diesen wird in einem Gasgemisch ein thermisches Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren erzeugt, und dann das Konzentrationsverhältnis der beiden Spezies bei verschiedenen Temperaturen bestimmt.

Diese Methoden sind entweder nur auf kleine Cluster anwendbar oder geben keine Auskunft über die Energetik einzelner, isolierter Cluster. In diesem Fall können spektroskopische Methoden, wie die im Folgenden beschriebene *Breakdown*-Methode.

#### 3.2.3 Breakdown-Methode

Die *Breakdown*-Methode<sup>39, 40</sup> arbeitet mit PIE-Spektroskopie und wurde erfolgreich zur Bestimmung einer Reihe von Dissoziationsenergien von neutralen und kationischen Dimeren angewendet<sup>42, 43-47</sup>. Nach Photoionisation eines Clusters  $A\cdot B$  wird die Energiedifferenz zwischen der Photonenenergie und der AIE des Clusters im Ion deponiert.

Überschreitet diese Energiedifferenz die Bindungsenergie  $E_0$  im Cluster-Kation, so kommt es zur Dissoziation. Dieser Prozeß kann durch simultane Beobachtung des Ionenstroms auf der Clustermasse  $m(A\cdot B)^+$  (Mutter“-Masse) und der Masse des geladenen Fragments  $m(A^+)$  („Tochter“-Masse) nachgewiesen werden. Die Auftritts-energie (*appearance energy*, A.E.) der Dissoziationsprodukte lässt sich aus dem *Breakdown-Graphen* ermitteln, wo der auf den Gesamtionenstrom normierte Ionenstrom auf dem Tochtermasse-Kanal als Funktion der Photonenenergie aufgetragen wird.

#### 3.2.4 Kinetic shift

Bei der Bestimmung einer Bindungsenergie über den Nachweis eines Zerfallsprozesses muss beachtet werden, dass die ermittelte Auftrittsenergie (A.E.) von Fragmenten bei großen Molekülen und Clustern oft größer ist als die tatsächliche Dissoziationsschwelle.



Die Ursache dieser *kinetic shift* (kinetische Verschiebung) ist, dass die Zerfallsrate von Clustern knapp oberhalb der Dissoziationsschwelle so gering sein kann, dass aufgrund der begrenzten Nachweiswahrscheinlichkeit des Detektors und innerhalb der begrenzten Beobachtungszeit kein Zerfall nachgewiesen wird. Der Einfluss der kinetischen Verschiebung kann durch Abschätzung typischer Zerfallsraten mit der RRKM-Theorie<sup>53, 54,55</sup> erfasst werden

## 3.3 Klassifikation und Intermolekulare Wechselwirkungen von Clustern

Zunächst soll definiert werden, was unter einem Cluster zu verstehen ist. Cluster sind Aggregate aus Molekülen oder Atomen, die durch schwache intermolekulare Kräfte zusammengehalten werden, wobei sich ein merklicher Teil der Einzelbestandteile an der Oberfläche des Aggregates befinden soll, was die Anzahl der Einzelteile begrenzt<sup>125</sup>.

### 3.3.1 Klassifikation von Clustern

Nach Art der Bausteine kann man zwei Gruppen von Clustern unterscheiden. Die *Homo*-Cluster bestehen aus lauter gleichen Untereinheiten, z. B. (Benzol)<sub>x</sub>, die *Hetero*-Cluster aus verschiedenen Bausteinen z. B. [Benzol-Ar].

Von grundsätzlichem Interesse sind Bindungseigenschaften in Clustern. Durch Untersuchungen in der Gasphase kann die Bindungsenergie von Clustern ermittelt werden, die Hinweise auf die Art der Bindungen und die Struktur von Clustern geben.

Die Charakterisierung von Clustern erfolgt nach Jortner<sup>130</sup> durch die mittlere Bindungsenergie Pro Molekül und durch die Anzahl der Moleküle bzw. Atome, die an der Bildung des Clusters beteiligt sind. Die Einteilung erfolgt in Systeme mit schwacher Bindungsenergie (0.3- 0.5 eV) bis hin zu Systemen mit starker Bindungsenergie (2.0- 4.0 eV). Explizit wird zwischen sechs Typen unterschieden. Im Einzelnen sind dies:

### 3. Clusterbildung

---

- Van der Waals- Cluster ( $BE \leq 0.3 \text{ eV}$ ) bestehen aus Edelgasen oder Molekülen ohne permanentes Dipolmoment z.B.  $(\text{Ar})_n$  oder  $(\text{N}_2)_n$ ,  $(\text{CO}_2)_n$ . Die zusammenhaltenden Kräfte sind disperse sowie schwach elektrostatische Kräfte.
- Molekül-Cluster ( $BE \approx 0.3\text{-}1.0 \text{ eV}$ ) enthalten Aggregate aus organischen Molekülen  $(\text{M})_n$  oder anorganischen Molekülen mit abgeschlossener Elektronenschale z.B.  $(\text{I}_2)_n$ . Die wirkenden Bindungskräfte sind disperse elektrostatische Kräfte.
- Wasserstoffbrücken-Cluster ( $BE \approx 0.3\text{-}0.5 \text{ eV}$ ) werden aus Molekülen mit Wasserstoff und elektronegativen Elementen wie z. B.  $(\text{H}_2\text{O})_n$ ,  $(\text{HF})_n$  gebildet.
- Ionen Cluster ( $BE \approx 2.0\text{-}4.0 \text{ eV}$ ) treten zwischen Molekülen auf, die aus Metallen der linken Seite des Periodensystems und elektronegativen Elementen der rechten Seite des Periodensystems wie z. B.  $(\text{NaCl})_n$ ,  $(\text{CaF}_2)_n$ . Die zusammenhaltenden Kräfte sind ionische Bindungen mit Ladungs-Ladungs-Wechselwirkung und Elektronenschaleneffekte.
- Valenz-Cluster ( $BE \approx 1.0\text{-}4.0 \text{ eV}$ ) dieser Typ enthält Moleküle mit kovalenten Bindungen, wie  $\text{C}_n$ ,  $\text{S}_8$ ,  $\text{As}_4$ .
- Metal-Cluster ( $BE \approx 0.5\text{-}3.0 \text{ eV}$ ) werden, wie der Name sagt, aus Metallen aus der linken Seite des Periodensystems gebildet z.B.  $\text{Na}_n$ ,  $\text{Al}_n$ ,  $\text{Cu}_n$ . Die Bausteine werden durch metallische Bindungen zusammengehalten.

Nach der Bindungsstärke werden die Cluster in zwei Kategorien eingeteilt. Zum einen schwach gebundene Cluster mit Bindungsenergien unter 1 eV. Dazu zählen die van der Waals Cluster, Molekülcluster und wasserstoffbrückengebundene Cluster. Zum anderen stark gebundene Cluster mit Bindungsenergien zwischen 0,5 und 3 eV. Hierzu gehören ionische gebundene Cluster, Valenzgebundene Cluster und Metallcluster.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bildung schwach gebundene kurzkettigen Peptiden (Di-, Tri- und Tetrapeptiden)-Cluster untersucht. In den folgenden Abschnitten soll daher auf die „Allgemeine Intermolekulare Wechselwirkungen“ innerhalb der Clustermolekülen und danach besonders auf die Wechselwirkung zwischen neutralen

Molekülen bzw. zwischen einem Ion und einem Molekül im van der Waals -Cluster als Beispiel für schwache gebundene Clustern näher eingegangen werden.

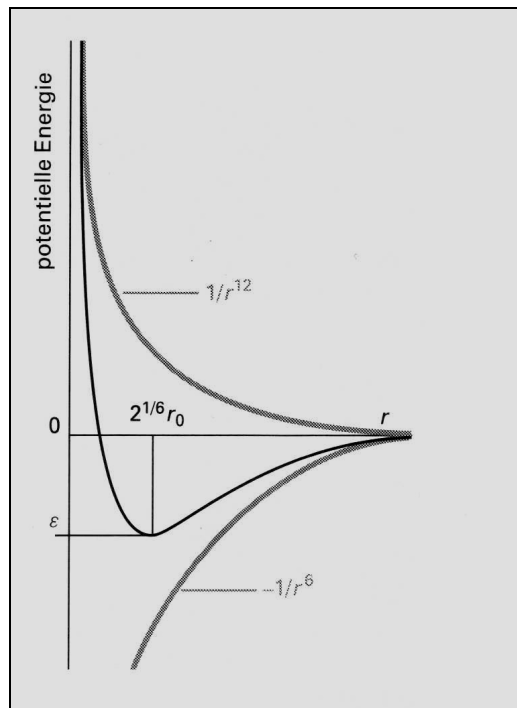
#### 3.3.2 Intermolekulare Wechselwirkungen von Clustern

Für den Zusammenhalt der Moleküle im Cluster sind verschiedene intermolekulare Wechselwirkungen verantwortlich, die sich in anziehende (attraktive) und abstoßende (repulsive) Kräfte aufteilen lassen. Wenn sich zwei Moleküle einander nähern, erfahren sie eine Änderung in ihrer potentiellen Energie. Bis zu einem bestimmten Abstand nimmt die potentielle Energie ab, durchläuft ein Minimum an den so genannten Gleichgewichtabstand. Nähern sich die Moleküle weiter an, so nehmen die repulsiven Kräfte zu, und die potentielle Energie steigt ins Unendliche an.

Unter Verwendung der Born- Oppenheimer- Näherung kann die potentielle Energie als Funktion der Kernabstände dargestellt werden. Hierzu verwendet man Lennard –Jones- (12.6) –Potential, bei dem ein langreichweitiger, anziehender Term von einem kurzreichweitigem repulsiven Term subtrahiert wird:

$$V(r) = 4\varepsilon \left[ \left( \frac{r_0}{r} \right)^{12} - \left( \frac{r_0}{r} \right)^6 \right] \quad (3.11)$$

Dabei bedeuten  $V$  die potentielle Energie,  $r$  ist der Abstand der Kerne,  $\varepsilon$  tiefe des Potentialtopfes und  $r_0$  ist die Nullstelle der Funktion  $V(r)$ , Das Minimum der Potentiellen Energie liegt bei  $r = 2^{\frac{1}{6}} r_0$  (siehe Abbildung 3-4).



**Abbildung 3-4 Lennard - Jones-(6,12)- Potential.**

Das Lennard–Jones–Potential ist hauptsächlich auf Systeme ohne permanentes Dipolmoment anwendbar. Der repulsive Term in der 12. Potenz enthält sowohl die Elektron-Elektronabstoßung, als auch die Kern-Kern-Abstoßung. Der attraktive Term in der 6. Potenz enthält mehrere elektrostatische Kräfte, die im Folgenden näher betrachtet werden sollen.

*a) Coulombenergie*

Sie beschreibt die Wechselwirkung von geladenen Teilchen oder Teilchen mit permanenten Dipol- oder Quadrupolmoment. Betrachtet man lediglich den einfachsten Fall von zwei Punktladungen  $q_1$  und  $q_2$  mit unterschiedlichem Vorzeichen, so erhält man das Coulombsche Gesetz:

$$V(r) = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r} \quad (3.12)$$

### 3. Clusterbildung

---

Betrachtet man die Wechselwirkungsenergie zwischen Dipolen oder Quadrupolen, so stellt man fest, dass die Potenz von  $r$  ansteigert. Genau Auskunft über den Zusammenhang zwischen Reichweite der Kraft und Art der Wechselwirkung gibt die folgende Tabelle:

Art der Wechselwirkung	$V * \alpha$
Ladung x Ladung	$r^{-1}$
Ladung x Dipol	$r^{-2}$
Dipol x Dipol	$r^{-3}$
Quadrupol x Quadrupol	$r^{-5}$

#### **r- Abhängigkeit der elektrostatischen Wechselwirkungsenergie**

#### *b) Induktionsenergie*

bringt man unpolare Moleküle in ein elektrisches Feld, so kommt es zu einer Ausrichtung der Ladungen von Kernen und Elektronen, wobei ein induzierter Dipol entsteht. Den gleichen Effekt beobachtet man, wenn sich ein polares Molekül einem polarisierbaren Molekül nähert. Durch die Wechselwirkung der beiden Moleküle bildet das polarisierbare Moleküle einen induzierten Dipol aus. Dabei ist der Betrag des Dipolmomentes gegeben durch

$$\mu_{\text{induziert}} = \alpha E \quad (3.13)$$

Die Stärke des induzierten Dipols  $\mu$  hängt von der Polarisierbarkeit  $\alpha$  des Moleküls und der elektrischen Feldstärke  $E$  ab.

Wird der induzierte Dipol von einem Polaren Molekül erzeugt, so treten diese Moleküle in Wechselwirkung miteinander und ziehen sich an. Die Stärke dieser attraktiven Wechselwirkung hängt zum einen vom Betrag des Dipolmoments des polaren Moleküls und zum anderen von der Polarisierbarkeit des unpolaren Moleküls ab. Der induzierte Dipol folgt in seiner Orientierung dem induzierten Dipol, diese gegenseitige Ausrichtung führt zu der attraktiven Wechselwirkung. Für die mittlere Wechselwirkungsenergie gilt:

$$V(r) = -\frac{\mu^2 \alpha}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \quad (3.14)$$

#### *c) Dispersionsenergie (London- Energie)*

London- Kräfte existieren zwischen allen Atomen und Molekülen ohne permanentes Dipol- oder Quadrupolmoment (z.B. Edelgase). Der Effekt lässt sich nur mit Hilfe der Quantenmechanik beschreiben. Anschaulich lassen sich Dispersionskräfte als induzierte Dipol-Induzierte Dipol Wechselwirkung erklären, die durch die Korrelation der Ladungsdichtefluktuationen in den benachbarten Atomen oder Molekülen zustande kommt. Dabei induziert ein momentaner Dipol einen Dipol in einem anderen Molekül.

Eine gute Näherung zur Beschreibung der Dispersionskräfte liefert die London- Formel:

$$V(r)_{disp.} = -\frac{3}{2(4\pi\epsilon)^2} \left\{ \frac{I_a I_b}{I_a + I_b} \right\} \frac{\alpha_a \alpha_b}{r^6} \quad (3.15)$$

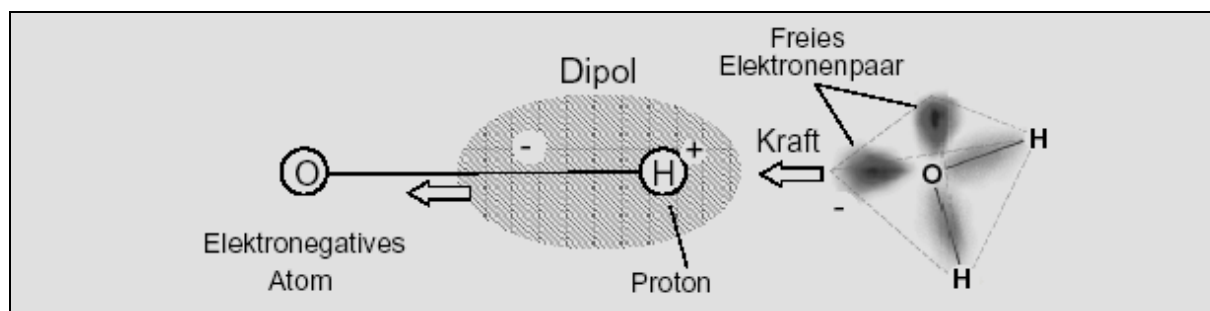
Hierbei sind  $I_a$  und  $I_b$  die ersten Ionisierungsenergien und  $\alpha$  entspricht dem Polarisierbarkeitsvolumen. Mit zunehmender Annäherung der Moleküle treten aufgrund der gegenseitigen Durchdringung ihrer Elektronenhüllen abstoßende Kräfte auf.

#### d) Wasserstoffbrückenbindung

Die Wasserstoffbrückenbindung ist mit einer Bindungsenergie von 0.1-1.0 eV stärker als die oben beschriebenen Wechselwirkungen in Clustern, ist aber immer noch deutlich schwächer als die klassischen kovalente Bindungen (2.0-5.0 eV).

Die H-Brückenbindung setzt sich aus mehreren der zu Beginn dieses Abschnitts diskutierten Wechselwirkungen zusammen. Den dominierenden Beitrag zur intermolekularen Bindung liefern attraktive Coulomb – Kräfte zwischen den beiden Molekülen bei festgehaltener Ladungsverteilung (Ladungsverteilung der ungestörten Moleküle), sprich elektrostatische Wechselwirkung zwischen Ladungen, Dipolen, Quadrupolen, etc.

Dies ist in Abbildung 3-5 in einfacher Form für eine H-Brücke zwischen einer O-H Gruppe und einem Wassermolekül veranschaulicht.



**Abbildung 3-5 Elektrostatische Wechselwirkung bei der Wasserstoff-Brücke -O-H...OH<sub>2</sub>**

Das elektronegative Atom (in Abbildung 3-5 ein O-Atom) zieht negative Ladungsdichte vom H-Atom der O-H Gruppe ab. Dadurch entsteht eine positive Partiaalladung an der H-Position und ein permanenter elektrischer Dipol. Freie Elektronenpaare anderer Moleküle erfahren hierdurch eine Anziehung. Aus der vorgegebenen Anordnung der Multipole folgt die bevorzugte Richtung der H-Brücken. Wasserstoffbrückenbindungen treten zwischen Molekülen mit stark polarisierten Bindungen auf und können wie folgt formuliert werden:



X und A sind in der Regel ein stark elektronegatives Element (X=O, N, S, Halogene), X ist kovalent an H gebunden, die gepunktete Linie symbolisiert die Wasserstoffbrückenbindung

und ist B ein beliebiges Element. Die Wasserstoffbrückenbindung besitzt einige charakteristische Eigenschaften, die kurz beschrieben werden sollen<sup>132</sup>:

1. Der Abstand  $R_{HA}$  ist deutlich kleiner als die Summe der Van- der Waalsschen Radien der Atome H und A.
2. Der XH Gleichgewichtskernabstand wird vergrößert gegenüber dem freien Molekül.
3. Die XH- Streckschwingung erfährt eine Verschiebung zu längeren Wellenlängen (Rotverschiebung), zudem nimmt die Intensität deutlich zu.
4. Infolge gegenseitiger Polarisierung ist das Dipolmoment des H- Brücken-gebundenen Komplexes größer als die Vektorsumme der Dipolmomente der Bestandteile entspricht (z. B. HCl Monomer: 1.14D; Dimer 1.50D<sup>131</sup>).
5. Die Elektronendichte am Brücken- Wasserstoffatom wird bei der Ausbildung der einer Wasserstoffbrückenbindung reduziert. Dieser Effekt äußert sich experimentell in Form verringerter NMR- Verschiebungen (reduzierte Abschirmung des Protons).

Für den Zusammenhalt im Cluster sind elektrostatische Kräfte, die durch beschrieben, verantwortlich. Je nach Art der Moleküle, die an der van der Waals Bindung beteiligt sind, liefern die unterschiedlichen Energien verschieden starke Beiträge zur Bindung.

#### 3.3.3 Laserdesorption intakte neutraler Moleküle in einen Überschallgasstrahl

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Technik der Laserdesorption intakter Moleküle (Laser Evaporation of intact Molecules, LEIM) zur Untersuchung der Biomoleküle verwendet. Mit LEIM werden, wie die Name sagt, neutrale isolierte Moleküle in der Gasphase erzeugt, die erst in einem zweiten Schritt ionisiert werden. Die Kopplung von LEIM mit verschiedenen Ionisationsverfahren wird noch ausführlich beschrieben.

Im Gegensatz zur reinen adiabatischen Expansion, die nur für gasförmige oder leicht flüchtige Substanzen geeignet d.h. Zur Erzeugung von Edelgasclustern oder



### 3. Clusterbildung

---

Molekülclustern durch das „Seeded Beam -Verfahren“, entstehen bei LEIM nicht nur neutral Cluster, sondern in geringem Maße auch positive und negativ geladene Cluster.

Grundsätzlich wird bei der Laserdesorption die Probe mit einem Laserstrahl beschossen. Die Desorption der meist in eine Matrix eingebetteten Probenmoleküle kann sowohl mit Infrarot-Lasern<sup>133</sup> als auch mit UV-oder sichtbarer Strahlung<sup>134</sup> erfolgen.

Beim Desorptionsvorgang werden sowohl Ionen als auch Neutrale desorbiert. Die Arbeitsgruppen von Levine et al.<sup>30</sup> sowie Vastola et al.<sup>31</sup> konnten als erste nachweisen, dass bei der Laserdesorption neben Ionen auch neutrale Moleküle gebildet werden. Dabei zeigte sich, dass die Neutralen nach Ende des Laserpulses noch über einen Zeitraum von einigen 100  $\mu\text{s}$  in die Gasphase emittiert werden. Auch bei Verkürzung der Pulsdauern wurde Neutralendesorption über die Pulsdauer hinaus beobachtet<sup>32</sup>.

Untersuchung zum zeitlichen Verhalten der Ionen- und Neutralen- desorption für die IR-Laser- desorption wurden von Cotter et al.<sup>33</sup> durchgeführt. Die Probe wurde mit einem unfokussierten  $\text{CO}_2$ -Laser (10,6  $\mu\text{m}$ ) mit 40 ns Pulsdauer und 100-500 mJ Energie desorbiert. Die desorbierten Neutralen wurden mit einem gepulsten Elektrostrahl zur zeitaufgelösten Messung ionisiert. Die Desorption der Neutralen setzte gegenüber der Ionenbildung 10  $\mu\text{s}$  später ein und hielt über insgesamt 500  $\mu\text{s}$  an.

Die Halbwertbreite der Neutralendesorption beträgt 100  $\mu\text{s}$ , das ist 2500-mal so lange als der Laserpuls.

Die Desorption von Ionen dagegen war bereits 30  $\mu\text{s}$  nach Ende des Desorptionlaser-pulses beendet. Die Halbwertbreite des Ionensignals beträgt 1  $\mu\text{s}$ , ist also 25-mal so lange als der Laserpuls. d.h, die desorption von Neutralen findet also später als die der Ionen mit einer deutlich breiteren Verteilung statt. Die absoluten Zeiten hängen dabei noch von der Art der Probemoleküle ab. Die Ergebnisse wurden von Röllgen et al.<sup>34</sup> bestätigt. Eine schematische Darstellung dieser Ergebnisse ist in Abbildung 3-6 wiedergegeben.

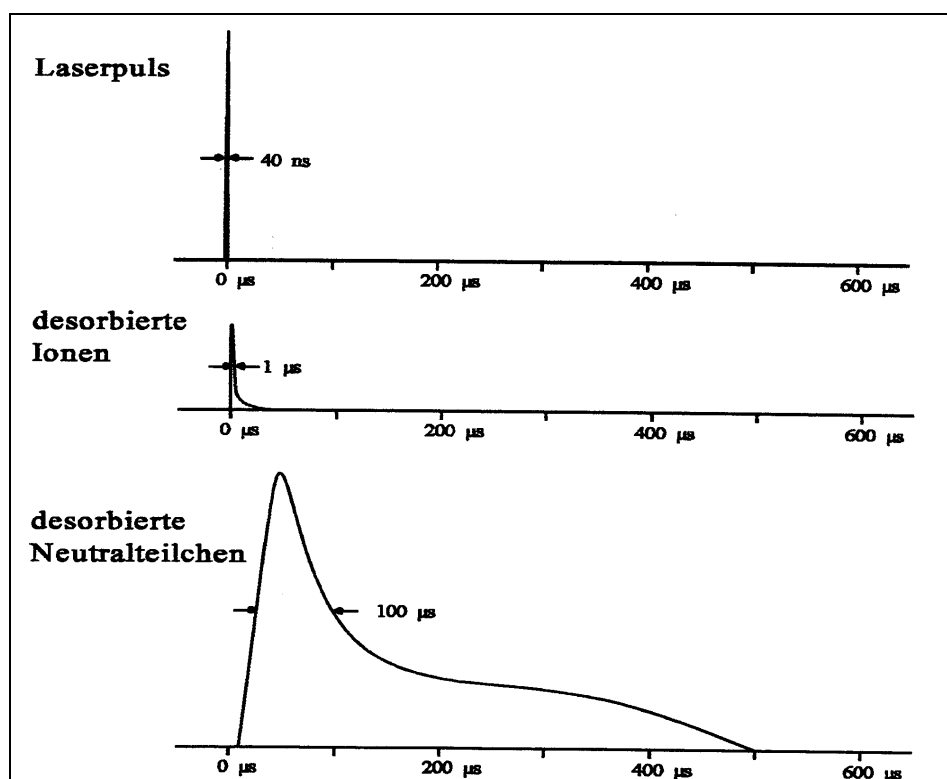


Abbildung 3-6 Zeitlicher Verlauf der Ionen- und Neutralteilchenemission bei Anwendung eines Desorptionslaserpulses

Bei der Laserdesorption von Molekülen beträgt das Verhältnis von Neutralenmolekülen zu Ionen typischerweise  $10^4 : 1$ .<sup>135</sup> Entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute an neutralen Molekülen hat neben den Charakteristika des Desorptionslasers vor allem die Probenpräparation.<sup>41</sup> Um das Verhältnis von neutralen Molekülen und gebildeten Clustern zu Ionen auszunutzen, wurde von Schlag et al. ein Tandemverfahren aus Laserdesorption in einen Überschallgasstrahl und anschließender Multiphotonen-Ionisation entwickelt.<sup>132,136</sup> Diese wurde auch für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente eingesetzt, da es sich bei den untersuchten Substanzen um schwer-flüchtige, thermisch labile organische Feststoffe handelt. Für die Desorption wurde in diesem fall ein  $\text{CO}_2$ -Laser ( $10.6 \mu\text{m}$ ) eingesetzt.

### 3.3.4 Modellvorstellungen zum laserinduzierten desorptions-prozeß

Es existiert eine Vielzahl von Theorien zur Beschreibung des laserinduzierten Desorptionsprozesses. Zumeist wurden diese Modelle aus experimentellen Ergebnissen für die Desorption von Ionen abgeleitet. Die Ausbeuten desorbierter Teilchen und der

Desorptionsmechanismen sind von experimentellen Parametern stark abhängig. Die Wellenlänge-Pulsdauer und Intensität des Desorptionslasers spielen dabei eine große Rolle, ebenso wie die Moleküleigenschaften der Probe, die Probenvorbereitung und die Darstellung auf dem Probenträger.

Ausführliche Übersichten sind von Grottemeyer<sup>164</sup> und Boesl<sup>62</sup> angefertigt worden. Unterberücksichtigung der neuesten Modelle werden die wichtigsten Modellvorstellungen hier kurz dargestellt.

Im Wesentlichen können die Modelle in drei Kategorien eingeteilt werden:

- thermische Desorption<sup>48</sup>,
- nicht-thermische –nicht resonante Desorption<sup>49</sup> und
- nicht-thermische –resonante Desorption<sup>50</sup>.

Alle Modelle lassen sich in ihren wesentlichen Punkten durch experimentelle Ergebnisse belegen. Zur Bestätigung der einzelnen Modelle werden z.B. das Auftreten von neutralen Molekülen bei der Desorption, die kinetische Energieverteilung der Neutralen und Ionen, das zeitliche Verhalten der Desorption von Neutralen und Ionen, die Neutralen und Ionenausbeute sowie die Wellenlängenabhängigkeit der Desorption, herangezogen.

#### 3.3.5 Thermisches Desorptions-Modell

Bei einem thermischen (exakter: Isothermischen) Desorptionsprozess bilden Substrat (Matrix) und Probe ein Wärmebad. Probe und Substrat besitzen die gleiche Temperatur, sie befinden sich im thermischen Gleichgewicht. Für die im Rahmen dieser Untersuchungen desorbierten Proben mit maximalen Schichtdicken von 100 µm stellt die Probe ihr eigenes Substrat dar. Die Vorstellung, dass der Laserinduzierte Desorptionsprozess thermischer Natur ist, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen aus experimentellen Daten abgeleitet.

Den Begriff thermisch induzierte Desorption wurde zunächst von Kistemaker et al.<sup>51</sup> verwendet, der mit einem CO<sub>2</sub>-Laser Ionen und Moleküle desorbierte. Die

laserinduzierte thermische Desorption beruht auf der Annahme, dass die Oberfläche je nach Eigenschaft der Probemoleküle und des Substrats einen Teil der Laserenergie aufnimmt.

Die aufgenommene Photonenergie wird sehr schnell, d.h. im Femto-bis Pico-sekundenbereich in Wärme umgewandelt.<sup>52</sup> Cotter et al.<sup>29,63</sup> schloss aus der gegenüber dem Laserpuls verzögerten Emissionszeit von Neutralen (siehe Abbildung 3-6), dass eine Thermalisierung nach dem Laserpuls auftritt. Ebenfalls für dieses Modell sprachen die lange anhaltenden Emissionszeiten insbesondere für Neutrale, die auch von Röllgen<sup>34</sup> beobachtet wurden.

Die thermische Desorption von Neutralen wurde von Hall et al.<sup>68</sup> als Konkurrenz- Reaktion zwischen Fragmentierung und Desorption intakter Moleküle beschrieben. Die Autoren nahmen an, dass die Geschwindigkeitskonstanten für beide Prozesse von der Aufheizrate abhängig sind und in Form der Arrhenius-Gleichung wiedergegeben werden können; die Geschwindigkeitskonstante für die Desorption  $k_{des}$  lautet dann wie folgt:

$$k_{des} = v_{des} \cdot e^{-E_{des}/RT}$$

Unter der Annahme, dass die kritische Energie für die Fragmentierung  $E_{frag}$  kleiner als die kritische Energie für die Desorption  $E_{des}$  ist, dominiert bei niedrigen Aufheizraten die Zersetzung des Moleküls. Genau dies ist bei der herkömmlichen thermischen Desorption von Biomolekülen mit elektrischer Aufheizung zu beobachten. In einer weiteren Näherung wird angenommen, dass der präexponentielle Faktor für die Desorption  $v_{des}$  größer als der präexponentielle Faktor für die Fragmentierung  $v_{frag}$  ist d.h.  $v_{des} > v_{frag}$ .

Unter dieser Voraussetzung kreuzen sich die  $K(E/t)$ -Kurven<sup>[a]</sup> bei höheren Aufheizraten, so dass die Desorption der intakten Neutralen der dominierende Prozess ist. Es entsteht ein Thermisches Gleichgewicht zwischen Substrat und Probe. Es wird eine gleichmäßige Verteilung der Energie auf alle Freiheitsgrade angenommen. Bei großen Molekülen ergibt sich daraus das Problem, dass dem Molekül eine große Menge an Wärme zugeführt werden

---

<sup>[a]</sup> Die  $k(E/t)$ -Kurven beschreiben die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Aufheizrate.

mus. Diese hohen Temperaturen sollten bei großen Biomolekülen zwangsläufig zur Fragmentierung führen.

Die Energie muss dem Probenmolekül deshalb so übertragen werden, dass die Bindungen zur Oberfläche gebrochen werden, bevor interne Fragmentierung auftritt. Es muss die Umverteilung der Energie auf die inneren Freiheitsgrade vermieden werden. Dies kann durch extrem schnelles aufheizen erreicht werden. Im Hinblick auf die im Rahmen dieser durchgeführten Untersuchungen zum Desorptionsprozess ist bemerkenswert, dass ein thermische Desorptionprozess unabhängig von der Wellenlänge des Desorptionslaser. Auch Beuhler et al.<sup>58</sup> gehen davon aus, dass die Desorption und die Fragmentierung konkurrierende Prozesse sind. Die Desorption besitzt die höhere Aktivierungsenergie, so dass bei kleiner Aufheizrate die Fragmentierung dominiert. Der Ansatz über die Aufheizraten ist von mehreren Autoren diskutiert worden.<sup>59</sup>

Die Aufheizraten, die für eine Bevorzugung der Desorption bei diesen **Rapid Heating Methoden** benötigt werden, liegen bei  $10^3$  K/s<sup>60</sup>. Extrem hohe Aufheizraten von bis zu  $10^{11}$  K/s lassen sich durch die Methode des explodierenden Drahtes erzielen<sup>61</sup>. Mit der Laserdesorption sind theoretische Aufheizraten von bis zu  $10^{15}$  zu errechnen. Die unmittelbar bestrahlte Probe wird dadurch zunächst auf etwa 10 000 K aufgeheizt, kühlt aber in 100 ps auf 1 000 K ab. Solch hohe Aufheizraten führen zur Desorption von neutralen Molekülen<sup>62</sup>. Die experimentelle Bestimmung von Aufheizraten und Oberflächentemperatur ist bis jetzt mit größeren Fehlern behaftet<sup>63</sup>. Für die Desorption mit einem CO<sub>2</sub>-Laser, wie er auch für die Experimente in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde von Zare et al.<sup>72</sup> mit Hilfe eines spezielle entwickelten Widerstandsthermometer eine Aufheizrate von  $10^8$  K/s ermittelt<sup>64</sup>. Es wurden Versuche um die Oberflächentemperaturen während der Desorption zu bestimmen, von der Gruppe Kistemaker<sup>65</sup> durchgeführt.

Anhand der kinetischen Energien und der Energieverteilung der desorbierten Ionen kann die Temperatur der Oberfläche bestimmt werden<sup>66</sup>. Läuft der Desorptionsschritt schneller ab als der Energieaustausch zwischen Probe und Matrix/Substrat, so werden reduzierte Translations- und Rotations-energien für die desorbierten Moleküle erwartet<sup>67</sup>.

Experimentell wurde eine Energieverteilung von 0,25 eV für verschiedene organische Moleküle gefunden. Zusammen mit Ergebnissen von Cotter et al.<sup>63</sup>, die die zeitliche Abnahme der mittleren Energie von desorbierten Kaliumionen untersucht, wurde auf eine Oberflächentemperatur von weniger als 600 K geschlossen.

Die beobachteten Energieverteilungen bestätigen das Modell der thermischen Desorption. Allerdings muss beachtet werden, dass die gemessene Energieverteilung durch weitere Faktoren beeinflusst worden sein kann. Stöße der desorbierten Teilchen in der Gasphase verändern die thermische Verteilung.

Zudem bewirkt der Dichtegradient oberhalb der Oberfläche eine durch Stöße verursachte adiabatische Abkühlung der Moleküle. Nicht- isothermes Verhalten von Probe und Substrat führt ebenfalls zu verringerter innerer Energie der desorbierten Moleküle<sup>69</sup>.

Das Modell der thermischen Desorption wird durch verschiedene experimentelle Ergebnisse bekräftigt. Ein wesentlicher Hinweis auf eine thermische Desorption sind die langanhaltenden Emissionszeiten von neutralen Molekülen nach dem Laserpuls im Gegensatz zur unmittelbaren Desorption der Ionen. Auch aus der Energieverteilung der Moleküle lässt sich auf eine thermische Desorption schließen. Die abgeschätzten Oberflächentemperaturen von über 500 K sind jedoch immer noch so groß, dass für thermolabile Moleküle starke Fragmentierungsreaktionen zu beobachten sein sollten.

Im Hinblick auf die durchgeführten Untersuchungen zum Desorptionsprozeß ist bemerkenswert, dass ein thermischer Desorptionsprozeß unabhängig von der Wellenlänge des eingesetzten Desorptionslasers ist.

#### 3.3.6 Nicht-thermische –nicht resonantes Desorptionsmodell

Um die Probleme des thermischen Desorptionsmodells zu überwinden wurden Modelle der nichtthermischen-nichtresoanten Desorption aufgestellt. Die Begriffe „resonant“ und „nicht resonant“ beziehen sich auf das Probenmolekül beziehungsweise auf die Probe/Matrix-Mischung. Unter nichtthermischer Desorption versteht man Modelle, die nicht von der

### 3. Clusterbildung

---

Ausbildung eines isothermen Gleichgewichts zwischen Probe und Substrat ausgehen. Unabhängig davon kann die Desorption sehr wohl durch thermische Belastung der Probe herbeigeführt.

Beim konventionellen Aufheizen einer Probe durch eine Wärmequelle geht man davon aus, dass die Energieumverteilung auf die internen Freiheitsgrade des Moleküls schneller erfolgt als die Desorption. Für die Desorption von einzelnen Moleküln resultieren daraus sehr hohe Temperaturen, die bei größeren, thermolabilen Molekülen zu der pyrolytischen Zersetzung der probe führen.

Zur Überwindung dieses Problems schlugen Beuhler und Friedmann<sup>58</sup> die Technik des extrem schnellen Aufheizens („rapid heating“) der Probe vor (z.B. durch Laser)<sup>70,71</sup>, und wendeten sie erfolgreich zur Desorption der thermolabilen Aminosäure Arginin an. Die Autoren gehen davon aus, dass die extrem hohen Aufheizraten zur Desorption der Probe führen, bevor die zugeführte Energie auf die internen Freiheitsgrade der Proben-moleküle umverteilt wird.

Ein weiteres Modell der nichtthermischen Desorption beschreibt bindungsselektive Prozesse an Grenzflächen bei der Laserdesorption thermische labilen Molekülen wurde von Zare und Levine<sup>72</sup> aufgestellt. Dabei gehen die Autoren<sup>72</sup> davon aus, dass bei sehr hohen Aufheizraten der Substratoberfläche ( $>10^8$  K/s) die Desorption in einem nicht thermischen Prozess stattfindet, d.h. Probe und Substrat besitzen nicht die gleiche Temperatur. Diesem Modell liegt die Absorption des Laserlichts durch das Substrat zu Grunde. Als Folgeprozess der Absorption im Substrat wird eine Energieübertragung vom Phononenfeld des Substrats in die Van-der-Waals Bindung zwischen Substrat und Adsorbat (Probe) angenommen. Da die niederfrequenten van-der-Waals Moden schlecht mit den hochfrequenten Schwingungsmoden des Moleküls koppeln, kann nur ein begrenzter Energieaustausch zwischen Substrat und Probemolekül stattfinden; Hier stellt die van der Waals Bindungen ein Nadelöhr (bottleneck) für den Energiefluß dar. Wird nun durch den Desorptionslaser mehr Energie nachgeliefert als durch das Nadelöhr fließen kann, so kann der van der Waals Bindung mehr Energie zugeführt werden als dem Molekül . Es kommt zur selektiv Bindungsspaltung und damit zur Desorption des intakten neutralen Probemoleküls auf Grund seiner relativ niedrigen inneren Temperatur. Voraussetzung bei diesem Modell ist die

### 3. Clusterbildung

---

Absorption des Substrats und eine geringe Absorption der Probe bei der Desorptionswellenlänge.

Ein weiteres Modell wurde von Linder und Seydel<sup>73</sup> als Desorptionsmodell aufgestellt. Dieses Modell geht von der Ausbildung mechanischer Schockwellen in der Probe aus und berücksichtigt die Rolle der Desorptionswellenlänge nicht explizit, so dass sich die Klassifizierung als nicht thermisch- nicht resonantes Desorptionsmodell in wesentlich auf den nicht thermischen Aspekt bezieht. Sie untersuchten die 266 nm Laserdesorption von Ionen in der Transmissions-Geometrie, d.h. der Desorptionslaserstrahl trifft auf die Rückseite der Probe. Aus der Tatsache, dass die Desorption von Ionen und Neutralen von der Vorderseite der Probe beobachtet werden kann, schlossen die Autoren, dass eine mechanische Störung der Probe auftritt.

Die mechanische Störung führen sie auf die Ausbildung von Schockwellen in der Probe zurück. Die Autoren zeigten, dass für hohe Laserleistungen ( $10^{11}$  W/cm<sup>2</sup>) in einer dicken Probe (20 µm) Schockwellen ausgebildet werden, während für niedrige Laserintensitäten ( $10^8$  W/cm<sup>2</sup>) und dünne Schichten (1µm) ein thermisches Verhalten vorliegt. Matthias et al. zeigten, dass die Menge an Probe, die durch einen Laserpuls desorbiert wird zur Stärke der Schockwelle korreliert und nicht zur Intensität des Laserpulses<sup>74</sup>. Die Schockwellen induzierte Desorption wurde auch von anderen Arbeitsgruppen als nicht thermischer Desorptionsmechanismus vorgeschlagen<sup>75, 76, 77</sup>.

Thermische induzierte mechanische Spannungen, wie sie bei der thermischen Belastung von Glas beobachtet werden<sup>78</sup>, wurden auch als Ursache der Desorption von Molekülen aus einer Oberfläche angesehen.<sup>79</sup>

Durch die thermische Ausdehnung der Probe entstehen Spannungsbrüche an der Oberfläche. An der Bruchkanten wird das Material zerstäubt und als einzelne Moleküle in die Gasphase desorbiert<sup>80</sup>. Absorption von Licht an einer Fehlstelle oder Verunreinigung in einem transparenten Material führt ebenfalls zu einer starken Spannung, die zum Bruch der Oberfläche und damit zur Zerstäubung des Materials führen kann<sup>81</sup>. Der Effekt entspricht der Zerstörung von optischen Komponenten durch intensives Laserlicht. Die



nichtthermischen-nichtresonanten Desorptionsmodelle gehen von einer Desorption der Moleküle ohne Thermalisierung zwischen Probe und Substrat aus. Der Mechanismus der Desorption kann durch verschiedene Ursachen wie z. B. Plasmonen, Schockwellen oder thermisch bedingte mechanische Spannungen induziert werden. Durch diese Modelle kann das intakte Desorbierten der Moleküle erklärt werden.

#### 3.3.7 Nicht thermisches- resonantes Desorptionsmodell

Resonante Desorptionsmodelle wurden zuerst für die Vorgänge bei der Matrix unterstützte Laserdesorption von Ionen (MALDI) großer Moleküle aufgestellt. Grundlage ist, dass die Probe oder das Probe/Matrix-Gemisch bei der Wellenlänge des Desorptionslasers absorbieren.

Die Modelle gehen von einer Abhängigkeit des Desorptionsprozesses von der Wellenlänge des verwendeten Laserlicht aus. Je nach Wellenlänge werden spezifisch Rotation, Vibration oder elektrische Übergänge in den Probe bzw. der Matrixmoleküle angeregt. Für den Fall der Anregung des kristallinen Gefüges der Matrix mittels eines UV-Laserpulses absorbieren die Moleküle, unter Übergang in einen elektrisch angeregten Zustand, ein Lichtquant. Bei häufig angewendeter Wellenlänge von 355 nm bei Maldi-Experimenten, stellt das konjugierte  $\pi$ -Elektronenssystem der Phenylgruppe der Matrix die chromophore Gruppe bei der Absorption dar.

Der elektronische Übergang ist nach dem Franck-Condon-Prinzip erlaubt und ist vom Typ  $\pi\pi^*$ , daher zeigt er bei dieser Wellenlänge einen großen Absorptionskoeffizienten  $\epsilon_{\max}$ . Da viele der UV-MALDI-Matrixsubstanzen über funktionelle aromatische Carbonsäuregruppen verfügen, kommt je nach Desorptionswellenlänge neben Anregung der  $\pi$ -Elektronensysteme auch zusätzlich zur Anregung der  $n\pi^*$ -Absorption durch die Nichtbindenden Elektronen der Carbonylgruppe. Im Gegensatz dazu liegen die Absorptionsbanden bei organischen Lösungsmitteln der Carbonylgruppe der Matrix im kurzwelligen Ultravioletten, wobei sie einen kleinen Absorptionskoeffizienten aufweisen.

Bestimmend für die Intensität und die spektrale Lage der Absorptionsbanden ist die Größe des Übergangsmoments. Durch Überlagerung von elektronischen und Schwingungsübergängen kommt es zur Feinstruktur in dem elektronischen Spektrum. Nach dem Franck-Condon-Prinzip erfolgt die elektronische Anregung wesentlich schneller als die der Schwingung. Dadurch bleiben die Geometrie und die kinetische Energie der Schwingungen unverändert. Die elektronischen Zustände werden also von Schwingungs- und Rotationszuständen überlagert.

Ein moleküldynamisches Modell zur Beschreibung der Laserverdampfung organischer Kristallvolumina unter Annahme eines „breathing sphere“-Ansatzes wurde von Zhigilei et al.<sup>86, 87</sup> entwickelt. Durch die Prozesse der inneren Umwandlung innerhalb von ca. einer Picosekunde gefolgt von einem langsameren Prozess der Kühlung der vibratorisch heißen Moleküle, kommt es bei der Absorption ultravioletter Laserstrahlung zu starker vibratorischer Anregung im elektronisch angeregtem Zustand.

Der „breathing sphere“-Ansatz basiert auf der Ratenverteilung der elektronischen Anregungsenergie auf drei translatorische und einen integralen inneren vibratorischen Freiheitsgrad. Berücksichtigt man die Kopplung des Vibrationsfreiheitsgrads mit den durch den Laser erzeugten Kristallphononen, so wird der Energietransfer vom Molekül auf die Gitternachbarn in das Modell miteinbezogen. Die im angeregten Molekül deponierte Vibrationsenergie geht also als kinetische innere Vibrationsenergie in das Modell mit ein.

Ein weiteres Resonantes Desorptionsmodell für die Vorgänge bei der Matrix unterstützte Laserdesorption von Ionen (MALDI), die als *Ablation* bezeichnet, wurde von Dreisewerd<sup>88</sup> vorgestellt. Hierbei handelt es sich um das Herauslösen von Clustern aus der Oberfläche.

Alle diese Modellvorstellungen zur Desorption versuchen, aus experimentellen Ergebnissen ein Modell abzuleiten. Für den Mechanismus der Laserdesorption gibt es eine Vielzahl von theoretischen Modellen und experimentellen Ergebnissen. Durch welche Modelle die experimentellen Ergebnisse am umfassendsten wiedergegeben sind, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

#### 3.3.8 Experimenteller Aufbau der Laserdesorption in einen Überschallgasstrahl

Alle untersuchten Proben sind ohne weitere Reinigungsschritte verwendet worden. Für die Messungen mit den Probenträgern aus Edelstahl, die eine ebene Oberfläche aufweisen, wurde die Probensubstanz bzw. das Probengemisch zunächst in eine Matrix aus Polyethylen eingebettet. Dann wurde ein kleiner Zusatz von Graphitpulver dazugegeben, um die Absorption der CO<sub>2</sub>-Laserstrahlung zu steigern. Das Gemisch wurde fein zerrieben und im Sinne einer besseren mechanischen Stabilität und damit längeren Verfügbarkeit der Probe mit einem IR- Presssatz für Kaliumbromid- Preßlinge der Firma Graseby Specac zu einer Tablette gepresst. Den Versuchsaufbau zur Desorption zeigt Abbildung 3-7.

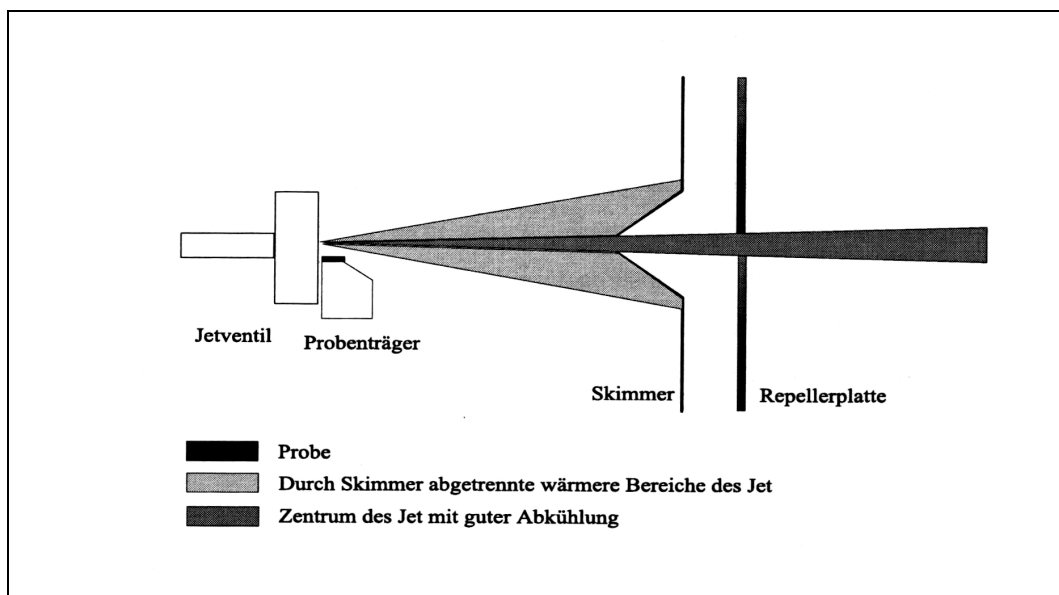


Abbildung 3-7: Versuchsaufbau zur Laserdesorption in einen Überschallgasstrahl

Das Probengemisch wurde auf den Probenträger aufgebracht, und mittels einer Schubstange durch eine Hochvakuum-Schubstangendurchführung in die Hochvakuum Desorptions-kammer des Flugzeitmassenspektrometers eingebracht.

Die Probe wurde, ca. 1mm unterhalb der Düse eines gepulsten Jet-Ventil positioniert. Der Durchmesser der Düsenöffnung des eingesetzten Ventils betrug ca. 100 µm und als

### 3. Clusterbildung

---

Trägergas wurde Argon eingesetzt. Um die adiabatische Expansion des Trägergases nicht zu stören, ist eine Kante des Probenträgers zusätzlich leicht abgeschrägt.

Die Desorption der in eine Matrix eingebetteten Probenmoleküle, kann sowohl mit Infrarot-Lasern<sup>89</sup>, als auch mit ultraviolettem oder sichtbarem Licht erfolgen<sup>90</sup>.

Für die Desorption der Biomoleküle wurde in dieser Arbeit ein gepulster CO<sub>2</sub>-Laser (10,6  $\mu\text{m}$ , 943  $\text{cm}^{-1}$ ) der Firma Alltec (Modell AL 854) eingesetzt. Die Pulsenergie betrug etwa 200 mJ; die zusätzlich durch eine Irisblende verringert werden konnte. Damit die Moleküle intakt in das expandierende Trägergas desorbiert werden und dabei möglichst geringe Überschussenergien erhalten, wurde eine Pulsenergie von ca. 5 mJ und einer Wiederholrate von 10 Hz eingesetzt. Die Fokussierung des Laserstrahls mit einer Germanium-Linse (Brennweite 100 mm), sorgt für eine Bestrahlung der Probenoberfläche in der Größenordnung von  $10^{-4} \text{ cm}^2$ .

Die Probemoleküle wurden als intakte Neutrale in den Argon Jet desorbiert. Dieser bewirkte neben die für eine Clusterbildung erforderlichen Abkühlung ihrer inneren Freiheitsgrade auch den Transport der desorbierten Probenmoleküle durch einen Skimmer in die Ionenquelle des Massenspektrometers, in der die Probenmoleküle anschließend mittels Zwei-Photonen-Ionisation ionisiert wurden. Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, wurden durch den Skimmer die äußeren, weniger gut gekühlten Bereiche des Jets abgetrennt, somit gelangten nur die gut gekühlten Moleküle aus dem Zentrum des Jetstrahls in die Ionenquelle.

Die Repeller-Platte in der Ionenquelle lag auf etwa +850 V und verhinderte so das Eindringen von während der Desorption gebildeten Ionen und Clusterionen in die Ionenquelle. Wichtig für die Cluster Untersuchung bei der Desorption in dem Jet ist die Geometrische Anordnung der Probe vor dem Ventil. Die Probe sollte unmittelbar vor dem Ventil, aber etwa 1 mm nach unten versetzt angebracht werden, um eine mögliche hohe Ausbeute an Neutralen im Zentrum des Jets zu erhalten, die in die Ionenquelle gelangen. Mit dieser Anordnung, der Laserdesorption neutraler Moleküle in einen Überschallgasstrahl,

### 3. Clusterbildung

---

können thermisch labile Substanzen, z.B. Biomoleküle, intakt als Neutrale in die Gasphase überführt werden.

## 4 Peptidsynthese

### 4.1 Peptidbindung und Bauprinzip

Ein Peptid bestehe wie in (Abbildung 4-1) aus einzelnen Aminosäuren, die alternierend über Amino- und Säuregruppe verknüpft sind. Dieses Bauprinzip führt dazu, dass  $\alpha$ -Aminogruppe der ersten Aminosäure (N-terminale Aminosäure) und die Carboxylgruppe der letzten Aminosäure (C-terminale Aminosäure) liegen in freier Form vor.

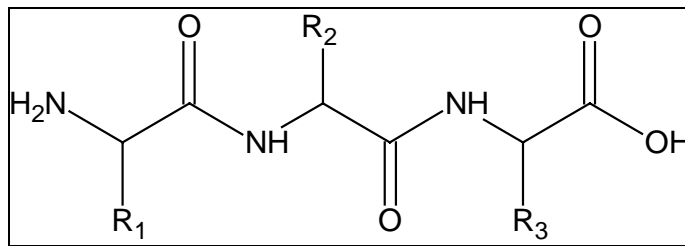


Abbildung 4-1: Aufbau eines Peptids am Beispiel eines Tripeptids

Die Peptidbindung als N-Substituierte Säureamidbindung ist stark resonanzstabilisiert. Die Mesomerie (Abbildung 4-2) bedingt einen Partiiellen Doppelbindungscharakter (etwa 40%) der Amidbindung, der Abstand zwischen dem C- und dem N-Atom beträgt 0.132 nm (vgl. 0.125 nm der C=N-Doppelbindung gegenüber 0.147 nm einer C-N-Einfachbindung). Die C=O-Doppelbindung besitzt damit auch  $\approx 40\%$  Einfachbindungs-Charakter. Als Konsequenz ist die C-N-Bindung der Amidgruppe in Peptiden relativ starr und nicht frei drehbar. Die *trans*-Form ist im allgemein um 8 KJ/mol stabiler als die *cis*-Form, Ausnahme machen Peptidbindungen, die von N-Substituierten Aminosäuren (Prolin, hydroxyprolin) ausgehen. Die beiden Formen (Abbildung 4-2) der Amidgruppe lassen sich mit Hilfe der IR-Spektroskopie unterscheiden.

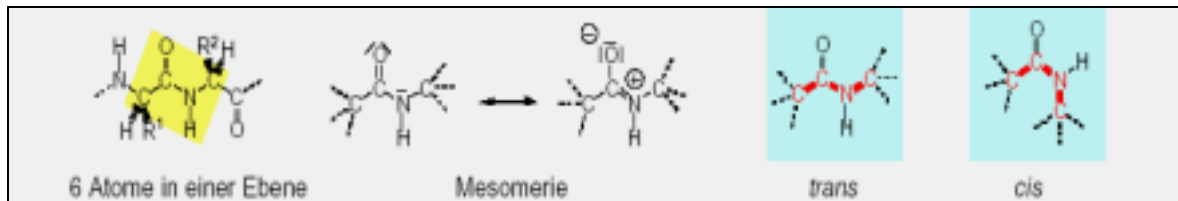
Bei cyclischen Peptiden mit kleiner Ringstruktur muss zumindest ein Teil der Peptidbindungen in der *cis*-Form vorliegen. Bei cyclischen Dipeptiden liegen alle

## 4. Peptidsynthese

---

Peptidbindungen in der *cis*-Form vor, cyclische Tetrapeptide enthalten zwei *cis* und zwei *trans*- Peptidgruppen.

An der Bildung natürlich vorkommender Peptide und Proteine sind die 20 durch den genetischen Code programmierten *proteinogenen Aminosäuren* beteiligt.



**Abbildung 4-2: Struktur der Peptidbindung**

Die unterschiedlichen Reste R bedingen die Variabilität der Peptide und Proteine; bei einer Peptidkette aus 100 Aminosäuren ergeben sich bereits  $20^{100}$  Möglichkeiten der Verknüpfung.

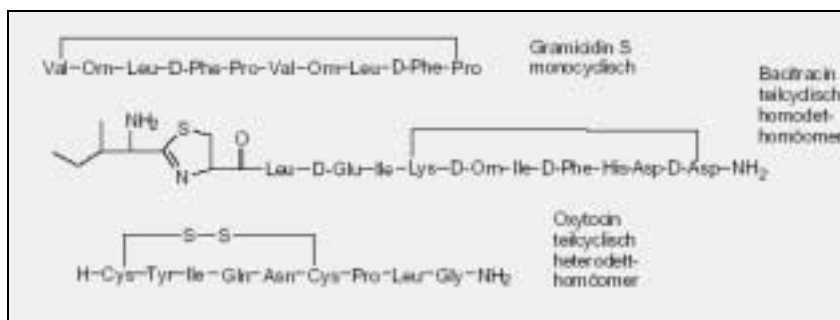
### 4.1.1 Nomenklatur

Nach der Zahl der Aminosäurebausteine werden Peptide als Dipeptid, Tripeptid, Tetrapeptid, etc. bezeichnet. Nach ihrer Größe teilt man Peptide drei Gruppen ein: Oligopeptide mit weniger als 10 Aminosäuren, Polypeptide ab 10 Aminosäure und Proteine, die bei etwa 50-100 Aminosäure beginnen.

Peptide, die nur von Aminosäuren gebildet werden, heißen *homöomere Peptide*. *Heteromere Peptide*<sup>18</sup> sind aus Aminosäuren und Pseudoaminosäuren aufgebaut. Zu ihnen gehören z. B. die Depsipeptide, die alternierend amidartig und esterartig verknüpfte Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren enthalten. Cyclische Depsipeptide werden auch als *Peptolide* bezeichnet. Nach Art der Bindungen in den Peptiden werden außerdem *homodete* und *heterodete* Peptide unterscheiden. Homodete Peptide enthalten nur Amidbindungen, heterodete Peptide daneben auch andere Bindungen, wie z. B. Disulfidbrücken<sup>23</sup>.

*Lineare Peptide* sind unverzweigt, *verzweigt-kettige Peptide* können durch Reaktionen der Seitenketten gebildet werden. Innerhalb der cyclischen Peptide (Abbildung 4-3) unterscheidet man teilcyclische und mono-, bi- bis polycyclische Peptide, Peptide, deren Aminosäure-Ketten zum Ring geschlossen sind, oder solche, die über Disulfid -Brücken zum Ring geschlossen sind wie z.B. Insulin.

Häufig enthalten Cyclopeptide ungewöhnliche Aminosäuren, optische Antipoden der normalen proteinogenen L- Aminosäuren oder wie die Peptolide Hydroxycarbonsäuren. Von Mikroorganismen ausgeschiedene Cyclopeptide haben oft antibiotische Wirkung (Actinomycine, Gramicidine, Polymyxine, Tyrocidine, etc). Viele Cyclopeptid-Alkaloide sind Gifte (Amanitin, Phalloidin). Ein Polycyclisches Peptid-Enzym ist die Ribonuclease<sup>19</sup>.



**Abbildung 4-3: Beispiele zur Bezeichnung cyclischer Peptide.**

Die Peptide werden fortlaufend nach ihren Aminosäurenkomponenten, beginnend bei der aminoterminalen (N- terminalen) Säure, benannt. Die Reihenfolgen der Aminosäuren im Peptid heißt die *Sequenz*.

#### 4.1.2 Ampholytcharakter, Löslichkeit und Hydratation

Die Ladung eines Peptids wird durch dessen Gehalt an sauren und basischen Gruppen und den PH-Wert der Lösung bestimmt, die Iminogruppe–NH-selbst neigt von pH 0 bis pH 14 nur geringfügig zur Ionisation und Protonierung. Peptide besitzen daher ebenso wie die



Aminosäuren einen isoelektrischen Punkt **pI**, bei dem sie im elektrischen Feld nicht wandern und ihre Löslichkeit in Wasser am geringsten ist, und wirken als *Ampholyte*.

Der isoelektrische Punkt der Peptide kann beträchtlich schwanken. Sie wirken wie die Aminosäuren als Puffer und lassen sich elektrophoretisch trennen.

Die Löslichkeit eines Peptids wird durch den pH-Wert und die Salzkonzentration bestimmt. Die Löslichkeit erhöht sich mit steigender Salzkonzentration bis zu einem Optimum (Einsalz-Effekt), bei weiterer Erhöhung der Salzkonzentration setzt die Löslichkeit wieder herab (Aussalzeffekt). Die Polypeptidketten der Proteine sind in ihrer wässrigen Umgebung so angeordnet, dass die polaren Aminosäuren an der Oberfläche sitzen (vgl. Tertiärstruktur, Kapitel 4.1.3.3).

Die polaren Gruppen, darunter vor allem die ionogenen, treten in Wechselbeziehungen mit dem Wasser, wobei jede Aminosäure durchschnittlich drei Moleküle Wasser bindet. Die inneren (hydrophoben) Aminosäuren sind im Allgemeinen nicht hydratisiert (solvatisiert). Es bilden sich verschiedene Hydratschichten um das Proteinmolekül, deren Wasser unterschiedlich gebunden ist. Dieses gebundene Wasser unterscheidet sich in seinen thermodynamischen Eigenschaften von dem normalen „freien“ Wasser der Umgebung.

Die unterschiedliche Beweglichkeit des gebundenen und des „freien“ Wassers lässt sich anhand der Relaxationszeiten NMR-spektroskopie verfolgen. Man rechnet durchschnittlich mit einer Hydrathülle von 0.2 bis 0.6 g Wasser pro Protein. Diese Hydrathülle bleibt auch im kristallinen Zustand erhalten. Durch hohe Salz- oder Wasserstoffionen-Konzentration wird die Hydrathülle teilweise abgebaut, da die Elektrolyte selbst Wasser binden. Es kommt zum Ausfallen der Proteine infolge Aggregation (Aussalzeffekt).

### 4.1.3 Strukturen der Polypeptide

Bei den Polypeptiden werden mehrere Strukturebenen unterscheiden. Unter *Primärstruktur* wird die Sequenz der Aminosäuren in der Peptidkette verstanden. Diese Definition schließt andere kovalente Bindungen oder Wechselbindungen als die Amidbindung aus.

Die Mikrokonformation bestimmter Teile der Polypeptidkette wird als Sekundärstruktur bezeichnet. Die *Sekundärstruktur* ist die lokale räumliche Anordnung der Polypeptidkette und beschreibt die geordneten Bereiche der Peptidkette, z. B. helikale, nichthelikale, sowie Faltblattstrukturen. Die Definition erfasst nicht die Konformation der Seitenketten und Wechselwirkungen mit anderen Segmenten. Daneben können Peptide auch ungeordnet als statistisches Knäuel (random coil) vorliegen.

Unter Tertiärstruktur wird die Makrokonformation der gesamten Polypeptidkette verstanden. Sie umfasst die gesamte räumliche Anordnung unter Berücksichtigung der Seitenketten der Aminosäuren. Durch Bildung von Assoziaten aus mehreren Untereinheiten selbständiger Peptide kommt es zur Ausbildung der Quartärstruktur eines Proteins. Sie beschreibt die gegenseitige räumliche Anordnung dieser Untereinheiten zueinander.

### 4.1.3.1 Primärstruktur

Die *Primärstruktur* beschreibt ausschließlich die Sequenz der Aminosäuren und wird durch Angabe der N- und C-terminalen Aminosäure eindeutig bestimmt. Die Reihenfolge der Aminosäuren steuert die Faltung der Peptidkette, die die korrekte, aktive Konformation ergibt. Für die Aufklärung der Primärstruktur eines Peptids (Sequenzanalyse) sind, abhängig von der Zusammensetzung, folgende Schritte erforderlich:

1. Isolierung eines homogenen Peptids mit anschließend mittels Massenspektrometer Molmassenbestimmung und Aminosäureanalyse.
2. gegebenenfalls ist die Spaltung in Einzelketten und deren Isolierung erforderlich, die Reduktion von Disulfidbrücken, Blockierung der Mercaptogruppen mit nachfolgender neuerlicher Aminosäureanalyse und Endgruppenbestimmung.
3. Selektive Spaltung der Ketten, Isolierung der Fragmente mit anschließend Aminosäureanalyse, Endgruppenbestimmung und abschließender Sequenzbestimmung.

### 4.1.3.2 Sekundärstruktur

Die *Sekundärstruktur* beschreibt die sterische Anordnung der Aminosäuren in der Peptidkette und ist aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der planaren CO-NH-Bindung letztendlich eine Folge der Primärstruktur. Die C<sup>α</sup>-C- und die N-C<sup>α</sup>- Bindung hingegen können im Wesentlichen frei um ihre Achse rotieren, und diese Drehbarkeit ermöglicht eine Vielzahl von Konformationen einer Peptidkette. z. B. bei einem Protein mit 170 Aminosäuren sind damit Konformationen in der Größenordnung von 10<sup>80</sup> möglich. Der Rotationswinkel um die C<sup>α</sup>-C-Bindung wird mit als Torsionswinkel N-C-C-N mit  $\Psi$ , der um die N-C<sup>α</sup>-Bindung mit  $\Phi$  und der um die N-CO-Bindung mit  $\omega$  bezeichnet.  $\Psi$  und  $\omega$  sind 0, wenn die beiden planaren Amidgruppen in einer Ebene liegen (siehe Abbildung 4-4).

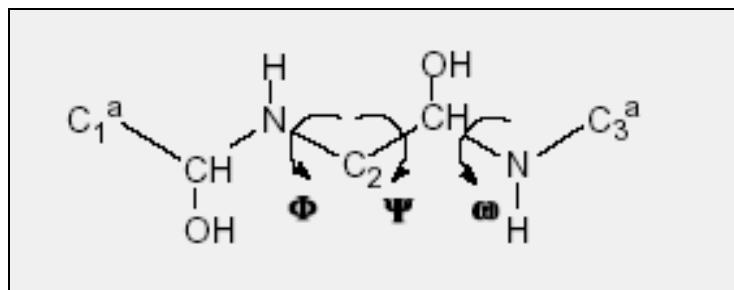


Abbildung 4-4: Torsionswinkeln innerhalb eines Peptids

Aus sterischen Gründen ist nicht jede beliebige Konformation und Winkeleinstellung erlaubt<sup>17</sup>, es gibt vielmehr energetisch bevorzugte Konformationen.

Darüberhinaus können durch nichtkovalente Bindungen insbesondere Wasserstoffbrücken, bestimmte Anordnungen stabilisiert werden.

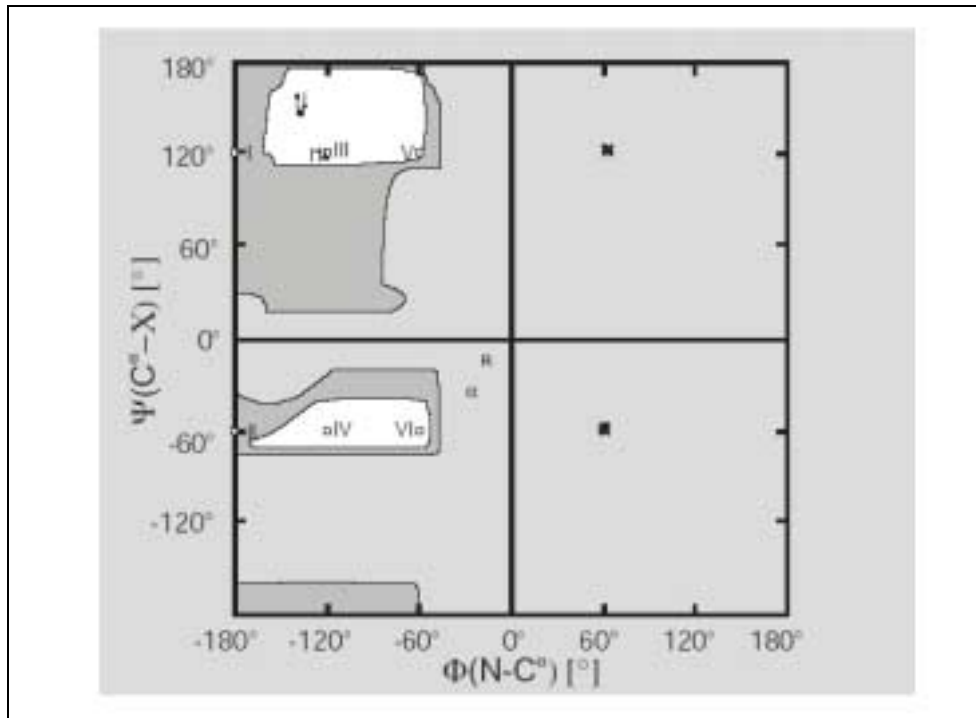
Aus Röntgenuntersuchungen und Modellbetrachtungen entwickelten L. Pauling und E.J. Corey das *Faltblatt* und die *Helix* als geordnete Sekundärstrukturen mit maximaler Stabilisierung durch Wasserstoffbrücken. In manchen Proteinen liegen etwa 75% der Aminosäuren in Form einer dieser Sekundärstrukturen vor. Ramachandran et al. haben alle möglichen Konformationen eines Peptids durchgerechnet.

Die Ramachandran-Diagramme (Abbildung 4-5), die durch Auftragen von  $\Phi$  gegen  $\Psi$  erhalten werden, lassen Bereiche erkennen, in denen unter Berücksichtigung noch

## 4. Peptidsynthese

---

tolerierbarer Abstände zwischen nicht miteinander verbundenen Atomen sich die wichtigsten geordneten Strukturen befinden.



**Abbildung 4-5: Ramachandran - Diagramm (nach Edsall, Kendrew, Liquori, Nemethy, Ramachandran und Scheraga)**

Vollständige Analysen der räumlichen Struktur sind ausschließlich röntgenographisch an kristallinen Peptiden und Proteinen möglich. Relative genaue Hinweise auf das Vorliegen bestimmter Sekundärstrukturen in gelösten Peptiden und Proteinen lassen sich jedoch auch durch chiroptische Methoden gewinnen. Große Anstrengungen werden zur Zeit unternommen, mit Hilfe statistischer Methoden in Computerprogrammen aus der Kenntnis der Aminosäuresequenz bzw. der jeweiligen benachbarten Aminosäuren die Sekundärstruktur vorauszusagen. Diese und durch Hinzuziehen weiterer physikalischer Daten verbesserter Methoden haben sich jedoch nur als relative treffsicher bei der Voraussage von Helixstrukturen erwiesen.

### 4.1.3.2.1 Faltblattstrukturen

Bei der *Faltblattstruktur* (pleated sheet,  $\beta$ -Konformation, Abbildung 4-6) werden die Polypeptidketten durch senkrecht zu den Ketten stehende Wasserstoffbrücken zusammengehalten, die Winkel  $\Phi$  und  $\Psi$  besitzen entgegengesetzte Vorzeichen. Die aus der Faltblattebene herausgehenden lipophilen Reste R üben zusätzlich eine Anziehungskraft aufeinander aus. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass solche Aminosäuren bevorzugt Flatblattstruktur auszubilden, die eine geringe Tendenz zur Helixbildung zeigen (Gly, Ser, Asp).

Die Strukturen können innerhalb einer Kette oder auch zwischen verschiedenen Polyketten ausgebildet werden.

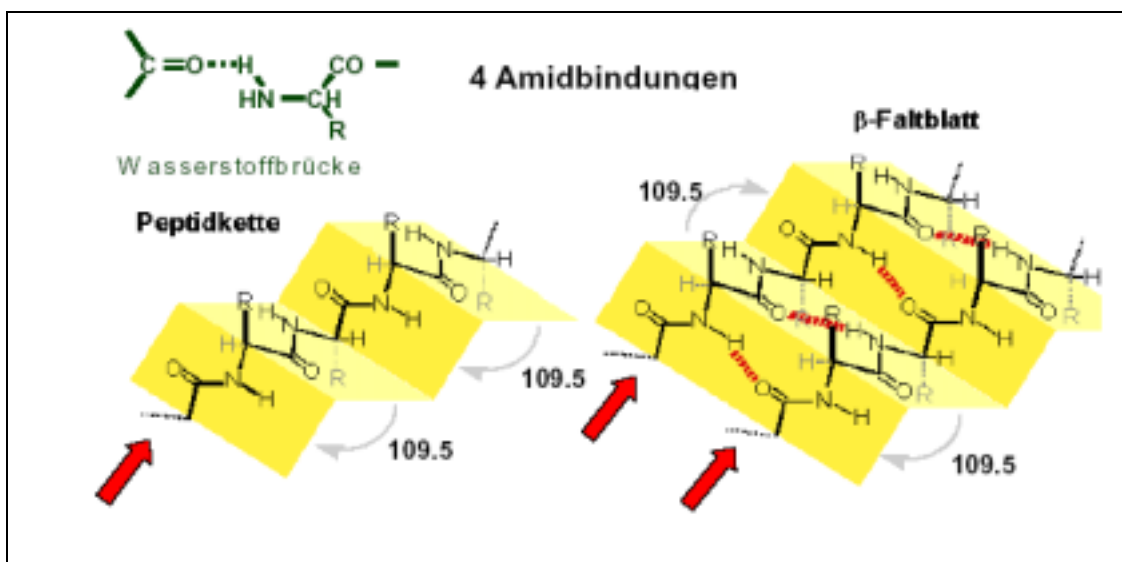


Abbildung 4-6:  $\beta$ -Faltblattstruktur von Polypeptiden und Proteinen, Strangrichtung, Wasserstoffbrücken und Bindungswinkel

Die Ketten können parallel oder antiparallel nebeneinander angeordnet sein (Abbildung 4-7).

Faltblattstrukturen sind im Allgemeinen nicht flach, sondern rechtsgängig verdrillt.

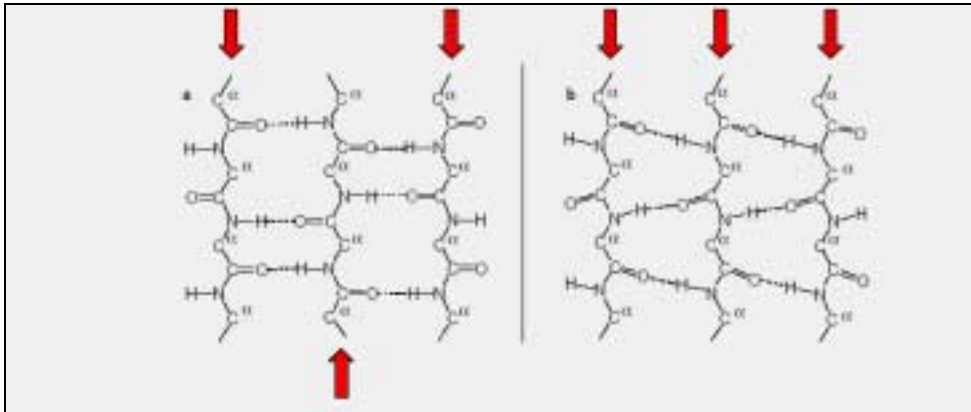


Abbildung 4-7: Antiparallele (a) und parallele (b) falblattstruktur (nach Pauling und Corey).

### 4.1.3.2.2 Helixstrukturen

Die Spiralstruktur der *Helix* kommt dadurch zustande, dass die Winkel  $\Phi$  und  $\Psi$  das gleiche Vorzeichen und für jedes  $C^\alpha$ -Atom bei einem Helixtyp jeweils den gleichen Wert besitzen.

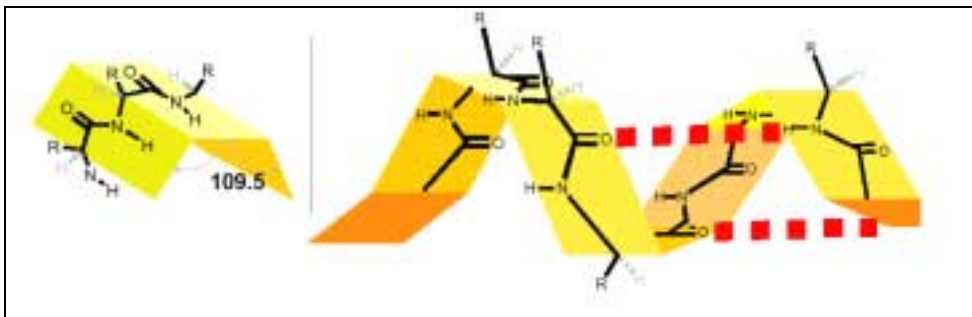


Abbildung 4-8: In der  $\alpha$ -Helix bildet sich jeweils zwischen der CO-Gruppe des Restes  $n$  und der NH-Gruppe des Restes  $(n+4)$  eine Wasserstoffbrücke aus.

Eine Helix wird durch die Zahl  $n_r$  charakterisiert, wobei  $n$  die Zahl der Aminosäureeinheiten pro Spirallengang und  $r$  die Anzahl der Atome des durch die Wasserstoffbrücken gebildeten Rings ist. Die intrachainaren Wasserstoffbrücken (Abbildung 4-8) werden z. B. zwischen der 1. und 3. [3,0<sub>10</sub>- Helix], 1. und 4. [3,6<sub>13</sub>- Helix] oder 1. und 5. Peptidbindung [4,4<sub>16</sub>-Helix] ausgebildet. Die Höhe  $h$  der Spirale pro Windung ergibt sich aus  $n \cdot d$ , dem Anstieg der Spirale pro Aminosäurerest. Diese Steighöhe pro Windung beträgt bei der [3,6<sub>13</sub>- Helix] 0.54 nm

## 4. Peptidsynthese

---

Eine Helix kann sowohl von Peptiden aus L- oder von solche aus D-Aminosäuren gebildet werden, *nicht* dagegen von Peptiden, die sowohl D- und L-Aminosäuren enthalten. Die Seitenketten R der Aminosäuren stehen radial zur Achse der Schraube. Eine Helix kann rechts- oder linksgängig sein.

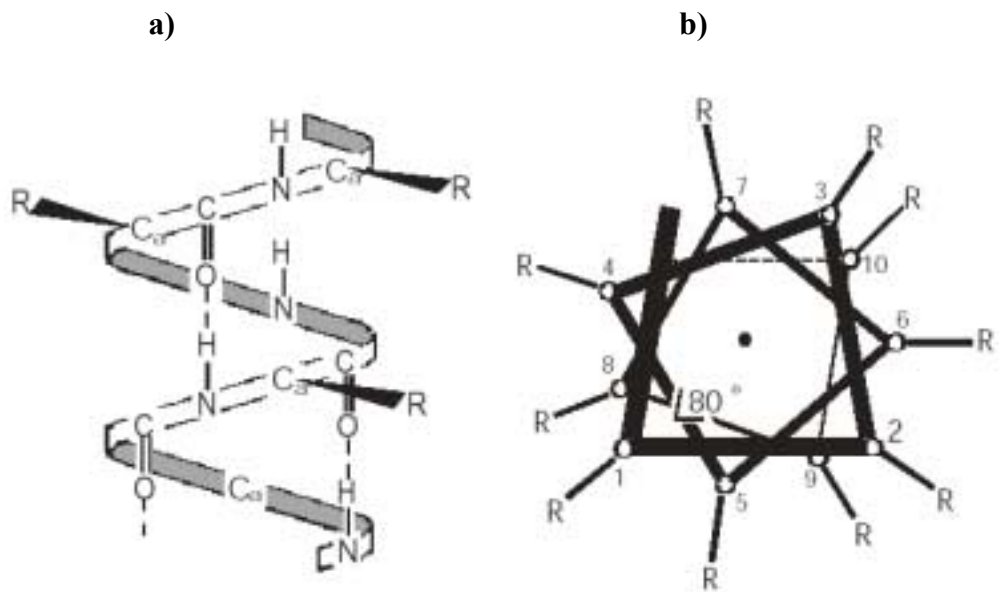


Abbildung 4-9: a) Rechtsgängige Helix

b) Aufsicht auf eine Linksgängige α-

Helix O C<sup>α</sup>- Atome, die Striche zwischen ihnen stellen die Peptidbindung dar, R Seitenketten; ≥ Achse der Spirale

Die α -Helix ist die energetisch -stabilste Sekundärstruktur, wie von Pauling und Corey postuliert wurde. Die linksgängige α –Helix dreht aufwärts im Uhrzeigersinn, beendet nach jeweils 3.6 Aminosäureeinheiten eine Windung und besitzt eine „Ganghöhe“. Rechts- und Linksschraube sind zueinander Enantiomere. Die Tendenz zur α –Helixbildung hängt wesentlich von der Aminosäuren-Zusammensetzung und -Sequenz ab. Nach Scheraga lassen sich Aminosäuren in:

*Helixbildende* (Val, Gln, Ile, Ala, Trp, Met, Leu, Glu ),

*indifferente* (Lys, Try, Asp, Thr, Arg, Cys, Phe) und

*helixbrechende Aminosäuren* (Gly, Ser, Pro, Asn) einteilen.

Eine Sonderstellung sowohl in der α –Helix als auch der Faltblattstruktur nehmen Prolin und Hydroxyprolin ein, die als sekundäre Amine Abweichungen von der Idealkonformation

induzieren und die Helix- Struktur durch einen Knick in der Peptidkette unterbrechen. Die Tendenz zur Helizität lässt sich am besten an Polyaminosäuren, die nur aus einer Aminosäure bestehen, studieren. Polyalanin bildet bei pH=7 in wässriger Lösung spontan eine Helix aus, bei Polylysin entstehen hingegen Zufallsstrukturen, die erst bei pH=12, wenn die Seitenketten ungeladen sind, spontan Helixbildung geben. Aus Polyisoleucin entsteht aufgrund sterischer Hinderung keine Helix, ebenso nicht aus Polyprolin.

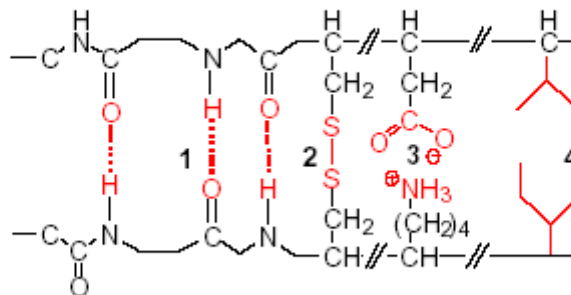
### 4.1.3.3 Tertiärstruktur

Die native, biologisch aktive dreidimensionale Struktur und Anordnung einer Peptidkette im Raum bezeichnet man als *Tertiärstruktur*. Nur durch die Ausbildung einer spezifischen Raumstruktur erreicht die Natur die hohe Präzision, mit der unterschiedliche biologische Funktionen der Proteine ablaufen. Nach thermo-dynamischen Überlegungen soll die dreidimensionale Struktur eines nativen globulären Proteins im physiologischen Milieu die Konformation des gesamten Systems mit der niedrigsten Freien Energie sein.<sup>17</sup>

Die durch Faltung der Peptidkette gebildete dreidimensionale Struktur eines Proteins wird von der Summe der Wechselwirkungen der Aminosäurereste determiniert. Damit charakterisiert die Primärstruktur die Tertiärstruktur vor allem durch Zwänge der Freiheiten der Drehung, die rigide planare Struktur der Peptidbindung, die erlaubten Winkel der C<sup>α</sup> – C- und C<sup>α</sup>-N-Bindungen aufeinander folgender Reste. Als stabilisierende Faktoren gibt es:

- a) H-Brücken zwischen Peptidgruppen wie für die Sekundärstruktur.
- b) H-Brücken zwischen den Seitenketten der Aminosäuren,
- c) Dipolkräfte zwischen polaren Gruppen und positiven und negativen Ionengruppen wie CO<sub>2</sub><sup>-</sup> und NH<sub>3</sub><sup>+</sup> und
- d) Van- Der- Waals- Kräfte zwischen den unpolaren Seitenketten und hydrophobe Wechselwirkungen.





**4-10: Tertiärstruktur mit Wechselwirkungen zwischen Peptidketten: 1 Wasserstoffbrücke, 2 Disulfidbindung zwischen Cysteinresten, 3 Ionenbeziehung zwischen Asparagin- und Lysin- Seitenkette, 4 hydrophobe Wechselwirkung zwischen einem Valin- und Isoleucinrest**

Mit Kernresonanzspektroskopie und Röntgenstrukturdaten wird die Tertiärstruktur von Polypeptidketten aufgeklärt.

### 4.1.4 Spaltung der Peptidbindung

#### 4.1.4.1 Nicht enzymatische Methoden

Die Amid-Gruppe ist gegenüber Alkali relativ stabil, längeres Erhitzen z.B. mit  $Ba(OH)_2$ -Lösung im Autoklaven führt jedoch zu vollständig racemisierten Aminosäuren. Wesentlich größere Bedeutung besitzt die säurekatalysierte Hydrolyse. Die einzelnen Peptidbindungen unterscheiden sich etwas hinsichtlich ihrer Stabilität in Abhängigkeit der Reste R der beteiligten Aminosäuren. Zuerst werden Bindungen gespalten, an denen Asparaginsäure, Asparagin, Serin, oder Threnin beteiligt sind, am schwersten lassen sich dagegen die Amidbindungen von Isoleucin, Leucin oder Valin spalten. Daher lässt sich säurekatalysierte Hydrolyse partiell, wenn auch recht unspezifisch durchführen. Man kann die Bedingungen jedoch so auswählen, dass hauptsächlich Peptidbruchstücke entstehen. Bei säurekatalysierter Hydrolyse von Polypeptiden wird Tryptophan meist zerstört, eine Totalhydrolyse lässt sich mit halbkonz. Salzsäure bei  $105^\circ C$  erreichen.

## 4. Peptidsynthese

---

Für eine selektive hydrolytische Spaltung der Peptide wurden spezielle entwickelt. So wird durch Bromcyan BrCN im sauren Milieu bei Raumtemperatur die Peptidbindung spezifisch hinter Methionin spezifisch gespalten (Abbildung 4.1.11). Bei höherer Temperatur reagiert in ähnlicher Weise auch Iodacetamid [ICH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>]. Durch oxidative Bromierung mittels N-Bromsuccinimid [NBS] lassen sich Peptidbindungen hinter Tryptophan und deutlich lang-samer hinter Tyrosin und Histidin spalten.

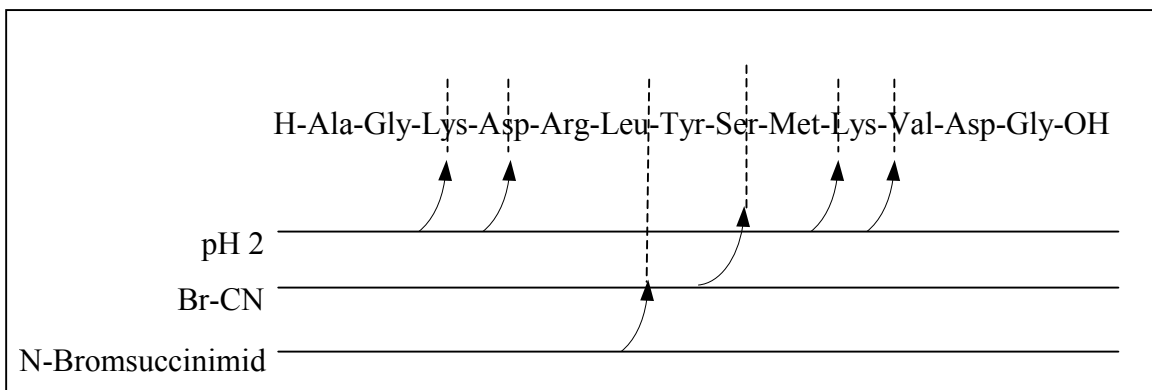


Abbildung 4-11: Beispiele für selektive hydrolytische Spaltungen eines Polypeptids

### 4.1.4.2 Enzymatische Spaltungen

Proteasen (Peptidasen) sind hydrolytisch wirkende Enzyme, die enzymatische Spaltung der Peptidbindungen kann entweder vom Ende der Kette (Exopeptidasen, N-terminales Ende mit Aminopeptidasen, C- terminales Ende mit Carboxypeptidasen) oder selektiv im Inneren des Peptids (Endopeptidasen) erfolgen. Die Exopeptidasen haben Bedeutung für die schrittweise Spaltung eines Peptids, der Abbau durch Endopeptidasen führt zu Bruchstücken. Pepsin, Papain und Subtilisin sind relativ unspezifische Endopeptidasen, zum selektiven Abbau dienen vor allem (Abbildung 4.1.12) Trypsin Trypsin, Chymotrypsin sowie das bakterielle Themolysin.

Trypsin (aus Schweinepankreas) spaltet C-terminal ausschließlich nach den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin, während durch Chymotrypsin vorzugsweise die Peptidbindungen nach den aromatischen Aminosäuren

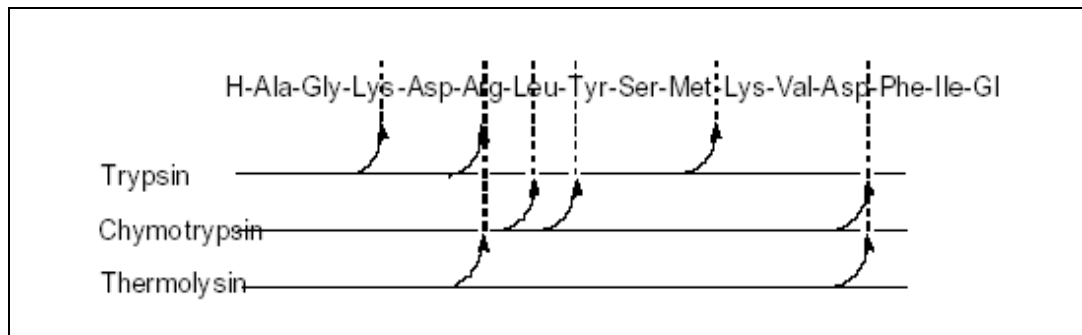


Abbildung 4-12: Beispiele für selektive enzymatische Spaltung eines Polypeptids

Tyrosin, Tryptophan und Phenyl-alanin, daneben aber auch nach Leucin und anderen Aminosäuren gespalten werden. Thermolysin spaltet die Amidbindungen von Leucin und Isoleucin.

## 4.2 Biologische Funktionen und Bedeutungen

Peptide spielen eine entscheidende Rolle in vielen physiologischen Prozessen, sei es als Neurotransmitter, Hormone oder Antibiotika

Peptide und Proteine gehören zu den Grundbausteinen des Lebens. Betrachtet man die Nukleinsäuren als den Konstruktionsplan, so sind die Proteine das Material, das zur Realisierung der Bauanleitung dient. Sie erfüllen Funktionen als Strukturelemente, als Enzyme für Stoffwechselfvorgänge, als Rezeptoren und Hormone sowie inter- und intrazelluläre Signalstoffe. Viele Wirkstoffe wie Immunoglobuline, Antibiotika, tierische und pflanzliche Toxine, etc., sind Peptide bzw. Proteine. Sie sind die Hauptbestandteile der Biomasse in den Zellen und machen zusammen mit den Nukleinsäuren mehr als 2/3 der Trockenmasse der Zelle aus. Peptide haben eine zentrale Stellung in lebenden Organismen. Zur Verdeutlichung seien hier zwei wichtige Funktionen angesprochen.

Enzyme sind Katalysatoren, die chemische Reaktionen in Organismen ermöglichen. Es sind Proteine mit meistens weit mehr als 100 Aminosäuren. Die Enzyme werden als Abbild des

## 4. Peptidsynthese

---

Codes der DNS aufgebaut und können deswegen nur aus den 20 verschiedenen Aminosäuren bestehen, die den verschiedenen Basentriplets des genetischen Codes entsprechen.

Im Gegensatz dazu stehen die Peptidhormone, die sich von der Größe her meistens im Bereich der Oligo – und Polypeptide befinden. Sie nehmen wichtige Steuerfunktionen wahr, indem sie Informationen z. B zwischen Nervenrezeptoren übermitteln. Da ein Hormon eine Signalfunktion hat und eine gezielte Wirkung entfalten soll, ist eine kurze Lebensdauer erforderlich. Um das zu erreichen, werden die Hormone durch spezielle Enzyme sehr schnell wieder abgebaut. Im Gegensatz zu den Enzymen sind diese Peptide keine direkten Abbilder des genetischen Codes der DNS. Deshalb enthalten die kleineren natürlichen Peptide oft sehr ungewöhnliche Aminosäuren<sup>10</sup> und können im Peptidgerüst modifiziert sein.

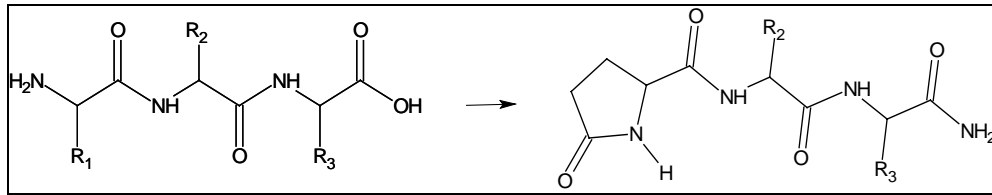
Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Clusterbildung und Intra bzw. Intermolekularreaktionen von kleinen Oligopeptiden. Der Grund besteht darin, dass es generell viele Probleme bei der Aufklärung natürlicher Peptide dieser Größe gibt. Synthetische Peptide spielen bei der Erforschung der Hormonwirkung eine wichtige Rolle.

Benötigt ein Organismus ein Peptid über längere Zeit, so muss es durch Blockieren der Termini vor einer enzymatischen Spaltung geschützt sein. Dieses ist zum Beispiel bei den Peptidantibiotika und Toxinen (Giften) oft der Fall<sup>21</sup>. Viele Peptidhormone sind ebenfalls terminal blockiert.

In (Abbildung 4-13) sind die verschiedenen Möglichkeiten zur Erhöhung der enzymatischen Stabilität<sup>23</sup> von Peptiden zusammengestellt.

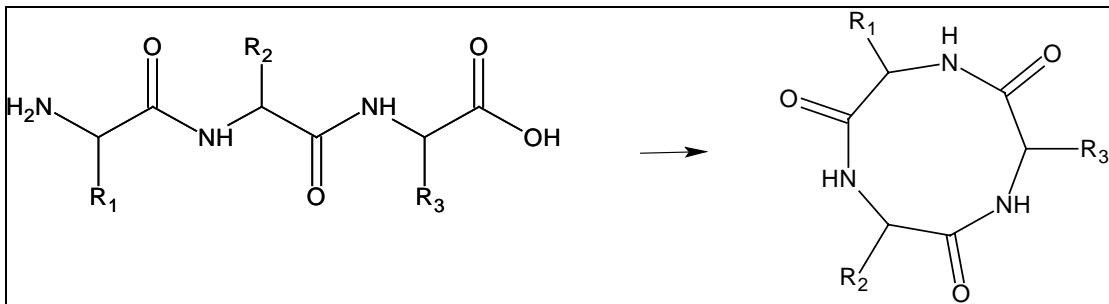
## 4. Peptidsynthese

### 1. Deraktivierung von N- und C-Terminus



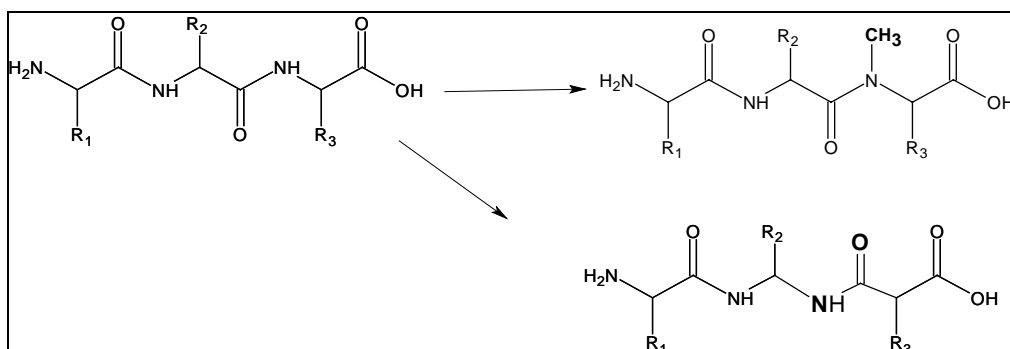
terminal blockierte Peptide

### 2. Cyclisierung



Cyclopeptide

### 3. Modifikation der Peptidbindung



Pseudopeptide.

Abbildung 4-13: Schutz eines Peptids vor enzymatischem Abbau

#### 4. Peptidsynthese

---

Die Modifikationen 1. und 2. kommen sowohl in natürlichen Peptiden als auch bei Synthesepeptiden vor.

Das Blockieren der Termini wird entweder durch Ringschluss zum Cyclopeptid erreicht (z. B. Tentoxin, Gift eines Pilzes) oder durch eine Derivatisierung von N- und C-Terminus (z. B. TRH, Thyreotrypin-Releasing-Hormon, aus dem Hypothalamus). Die dritte Modifikation der Peptidbindung wird in der Synthese angewendet. Es ergibt sich die Möglichkeit durch Synthese von modifizierten Peptidanaloga genauere Untersuchungen über die Wirkungsweise vorzunehmen. Eine wesentliche Bedeutung hat die enzymatische Stabilität, da sich ansonsten in einem Organismus wegen des vorzeitigen Abbaus kaum eine Wirkung beobachten läßt<sup>12</sup>. Dabei werden die natürlich vorkommenden terminalen Modifikationen auch synthetisch genutzt. Eine große Ähnlichkeit der unnatürlichen Analoga zu dem natürlichen Hormon ist auch pharmakologisch wegen zu vermeidender Nebenwirkungen interessant.

Von zentraler Bedeutung ist außerdem die biologisch wirksame Konformation des Hormons, die der Schlüssel zur Erforschung der Struktur des Rezeptors ist<sup>15</sup>. Da Peptidhormone selbst in Lösung keine definierte Tertiärstruktur besitzen, wird dieses durch die Synthese von Hormonanaloga erreicht, die in Beweglichkeit des Peptidgerüsts eingeschränkt sind. Eine solche Fixierung wird durch eine Cyclisierung erreicht (Abbildung 4-13). Eine weitere Möglichkeit besteht im Einbau von Aminosäuren, deren Beweglichkeit stark eingeschränkt ist. Aus Untersuchungen der Konformation dieser Hormonanaloga mit zweidimensionalen NMR-Techniken und dem Vergleich mit der Wirkung dieser Substanzen lassen sich anschließend Rückschlüsse auf die biologisch aktive Konformation des Hormons ziehen.

Diese Ziele führen zu Peptiden mit „unnatürlichen“ Modifikationen<sup>22</sup>, wobei dieser Ausdruck nicht ganz korrekt ist, da diese Modifikationen teilweise auch in der Natur vorkommen. Peptide mit den Modifikationen unter 1. (Abbildung 4-13) werden als terminal blockierte Peptide bezeichnet, jene mit Modifikation unter 2. als Cyclopeptide und die mit den Modifikationen unter 3. als Pseudopeptide. Die Cyclopeptide können auch als ein Spezialfall der terminal blockierten Peptide betrachtet werden.

### 4.3 Peptidsynthese

Einige der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Peptide wurden im Labor mittels eines semi-automatischen Peptid-Synthesizers von der Firma Novasyn Gem hergestellt

#### 4.3.1 Einleitung

Seit der Pionierarbeit von R.B Merrifield<sup>13</sup> ab 1963 auf dem Gebiet der Festphasensynthesen haben synthetische Peptide enorm an Bedeutung gewonnen.

Synthetische Peptide sind kaum mehr aus den verschiedensten Forschungsbereichen wegzudenken, seien es in der Biochemie, der Immunologie oder in der Chemie und in der Pharmaforschung<sup>[16]</sup>.

Erst die Entwicklung der automatischen Festphasensynthesen hat es erlaubt, auch längere oder modifizierte Peptide mit guten Ausbeuten und in relative kurze Zeit zu erhalten. Der entscheidende Vorteil der Festphasensynthese besteht darin, dass die Reagenzien in großen Überschuss in den Reaktionen eingebracht werden und dadurch die Kinetik enorm beschleunigt wird.

Eine einfache Filtration erlaubt es anschließend, die überschüssigen Reagenzien sowie die nach der Reaktion entstandenen Abfallprodukte zu eliminieren<sup>20</sup>.

Somit eignet sich diese Technik ausgezeichnet für die Automation, da keine schwierige Auftrennung vom Reaktionsgemisch zwischen den einzelnen Etappen notwendig ist.

Im Folgenden werden kurz das Prinzip und die Chemie der automatischen Peptidsynthese umrissen.

### 4.3.2 Prinzip der Peptidsynthese

Die automatische Peptidsynthese besteht im Prinzip darin, ausgehend von einem Syntheseharz die gesamte Peptidssequenz durch schrittweise Hinzufügen der einzelnen Aminosäuren zu realisieren (auch lineare Synthese genannt)<sup>14</sup>. Bis zum Ende der Synthese bleibt das zu synthetisierende Peptid fest auf dem Harz verankert. Jede einzelne Addition einer Aminosäure enthält 3 Folgerreaktionen (Abbildung 4-14):

- **Entschützung**
- **Aktivierung und**
- **Kopplung**

Als Rohmaterial stehen die käuflichen geschützten Aminosäuren zur Verfügung. Diese enthalten zum einen eine Schutzgruppe auf den reaktiven Seitenketten, um ungewünschte Nebenreaktionen zu vermeiden. Desweiteren ist die  $\alpha$ -Aminogruppe geschützt, um eine gleichzeitige Addition von mehreren Aminosäuren zu verhindern.

Diese N-Terminale Schutzgruppe wird in der Etappe der **Entschützung** abgespalten um eine freie, reaktive Aminosäure auf dem wachsenden Peptid zu erhalten, die im Folgenden die Reaktion mit der nächsten Aminosäure eingehen kann. Dabei bleiben die Seitenketten-schutzgruppen natürlich erhalten. Nun wird die nächste Aminosäure, ebenfalls mit den Schutzgruppen versehen, in großem Überschuss hinzugefügt. Damit die Carboxyl-Gruppe dieser Aminosäure mit der entstandenen Aminogruppe reagieren kann, muss sie aktiviert werden<sup>16</sup>.

Diese **Aktivierung** wird durch Zugabe einer Aktivierungssubstanz erreicht, die die Carboxylgruppe in einen aktiven Ester verwandelt. Dieser aktivierte Ester der Aminosäure kann so mit der  $\alpha$ -Amino-Gruppe des Peptides reagieren und eine neue Amidbildung ausbilden.



#### 4. Peptidsynthese

Diese **Kopplung** führt also zu einem um eine Aminosäure verlängerten Peptid. Dieser Prozess wird anschließend mit der nächsten Aminosäuren wiederholt; der nächste Zyklus beginnt wieder mit der Entschützung der  $\alpha$ -Amino-Gruppe der soeben eingebundenen Aminosäure. Das folgende Diagramm stellt diesen Syntheseprozess schematisch dar.

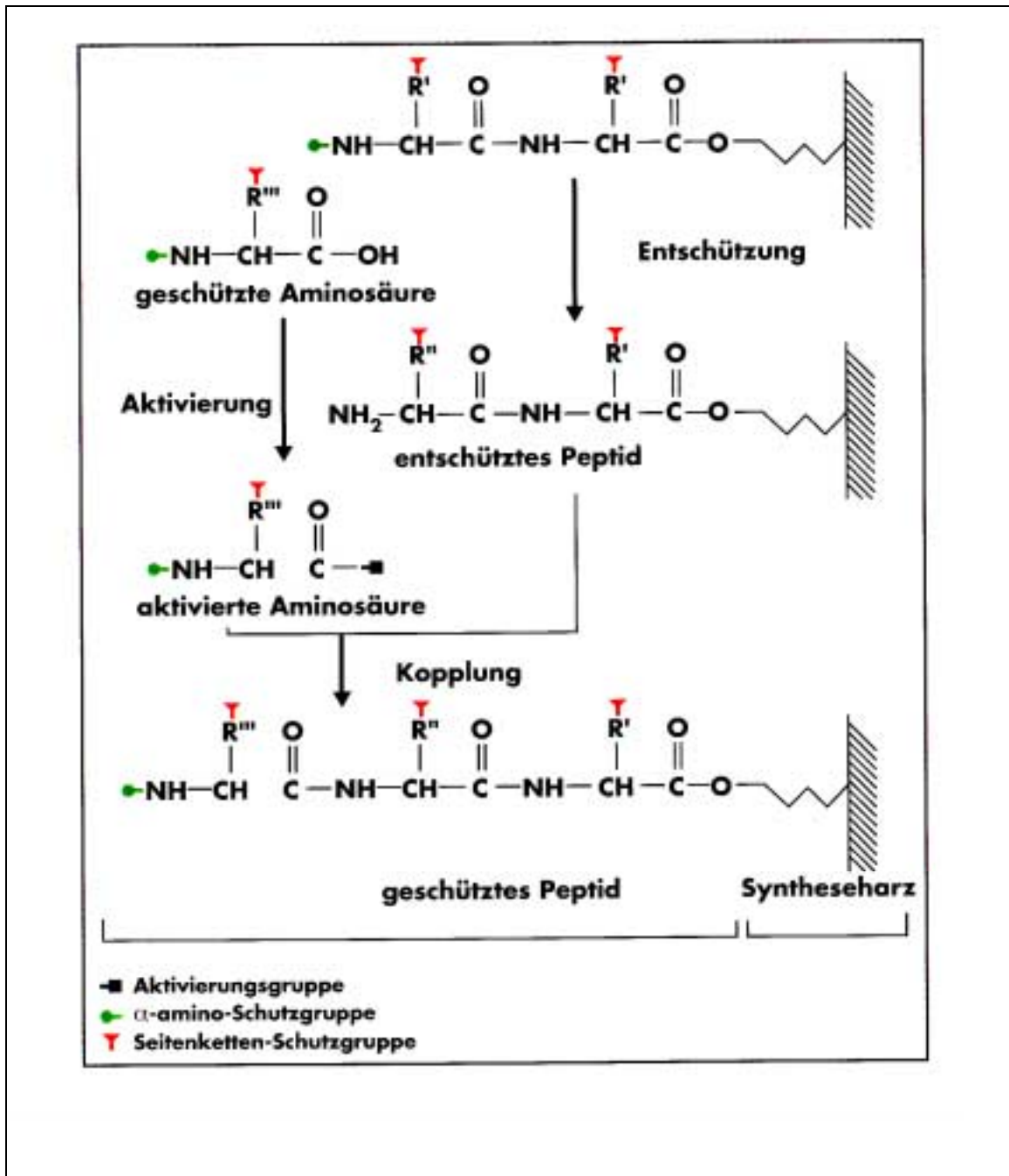


Abbildung 4-14: Schematische Darstellung der Festphasen-Peptidsynthese

## 4. Peptidsynthese

---

Nach Beendigung der einzelnen Aminosäure-Additionen liegt das Peptid noch geschützt und an das Syntheseharz gebunden vor. Daher müssen noch die Seitenkettenschutzgruppen entfernt und das Peptid vom Harz abgespalten werden. Die so erhaltene Lösung des Rohpeptids steht nun für weitere Bearbeitungsschritte (zum Beispiel Aufreinigung) zur Verfügung. Nachfolgendes Schema (Abbildung 4-15) verdeutlicht den kompletten Syntheseprozess.

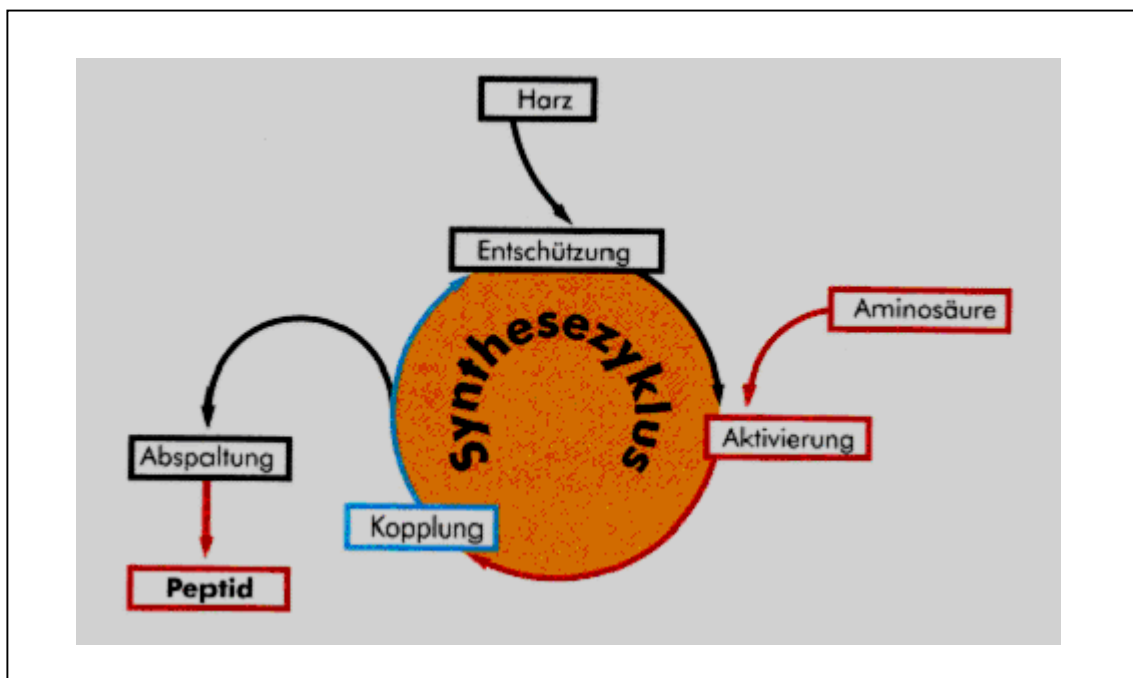


Abbildung 4-15: Schematische Darstellung der Festphasen-Peptidsynthesesyklus

Seit der Entdeckung der Festphasenchemie für Peptidsynthesen sind erhebliche Fortschritte auf dem Gebiet der Entwicklung von geeigneten Maschinen und der Chemie der Peptidsynthese gemacht worden. Die Benutzung von modernen Synthesemaschinen macht zeitaufwendige Manipulation sowie den Kontakt mit den teilweise sehr aggressiven Chemikalien überflüssig.

### 4.3.3 Synthesemethoden

In der modernen Festphasenchemie für Peptidsynthese werden noch zwei verschiedene Technologien angewendet. Die ältere ist die sogenannte Boc-Chemie, bei der die Alpha-Amino-Schutzgruppe eine t-Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc) ist. Diese Boc-Gruppe ist durch Säurebehandlung (TFA=Trifluoressigsäure) abspaltbar; dadurch ergibt sich, dass die Seitenketten-Schutzgruppen und die Harzbindung von dieser Behandlung (die jeweils bei den Entschützungsreaktion notwendig ist) nicht betroffen sein dürfen, um ungewünschte Nebenreaktionen oder den Verlust des Peptids zu vermeiden.

Hier liegt auch der größte Nachteil dieser Chemie:

Nach der Synthese wird die Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen sowie des Syntheseharzes durch flüssiges HF durchgeführt. HF ist eine sehr aggressive (bei Normaldruck gasförmige) Chemikalie, die sogar Glas angreift und daher eine spezielle Apparatur notwendig macht. Die Toxizität von HF ist ebenfalls ein zu berücksichtigender Faktor bei der Wahl der Chemie. Ein weiterer Nachteil dieser Synthesemethode ist, dass in jedem Zyklus eine Etappe der Neutralisierung des bei der Entschützung entstandenen TFA-Salzes (Abbildung 4-16) des wachsenden Peptids notwendig ist. Diese Technik ist aber preiswerter als die etwas später entwickelte, alternative Synthesemethode.

Bei dieser, der so genannten Fmoc-Chemie, besteht die  $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe aus einer 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Gruppe. Der entscheidende Vorteil dieser Gruppe ist, dass sie unter relativen milden basischen Bedingungen (Piperidin) abspaltbar ist, so dass man die Seitenkettenschutzgruppen und die Harzbindung so wählen kann, dass diese unter ebenfalls milden sauren Bedingungen (TFA) abzuspalten sind.

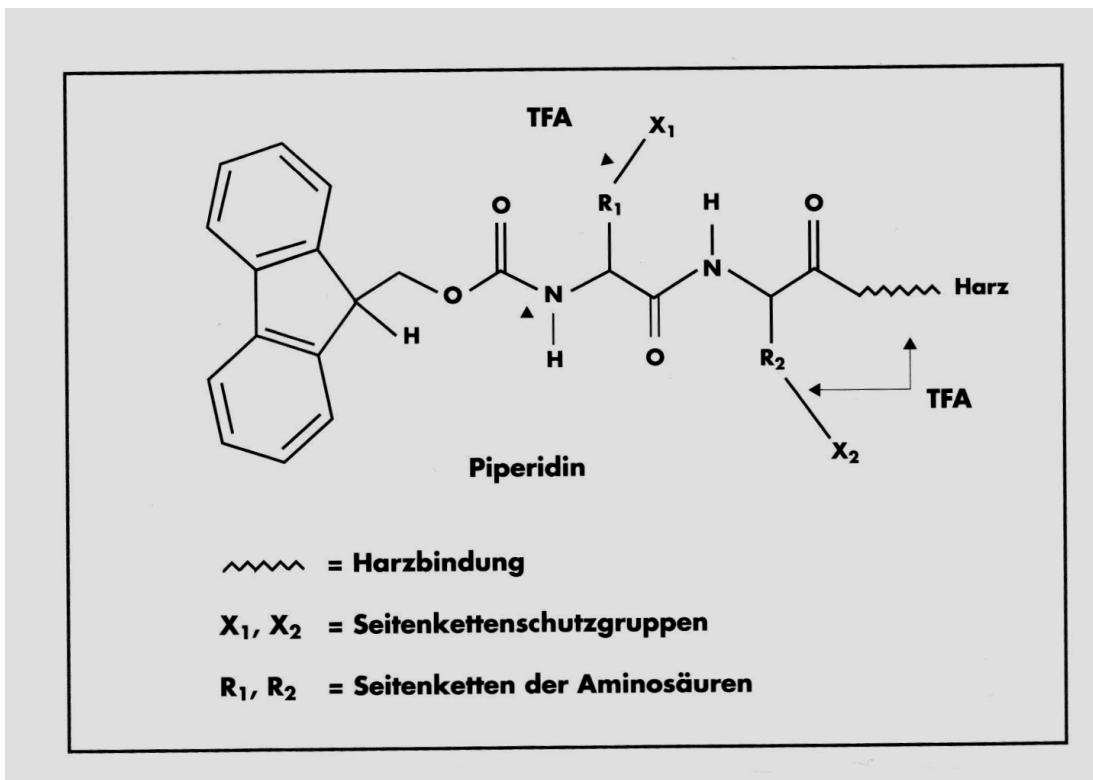


Abbildung 4-16

Einige der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Peptide wurden mittels dieser Fmoc-Chemie hergestellt, der zwar teuren, aber dafür milderen Synthesemethode. Die milderen Bedingungen machen keine Spezialapparatur notwendig; vor allem aber entstehen weniger Degrationsprodukte im Rohpeptid, woraus im Allgemeinen eine höhere Ausbeute und ein reineres Produkt resultiert.

Die Aufarbeitung der Rohpeptide besteht, je nach gewünschter Reinheit, in einer Reihe von Etappen, die von der einfachen Präzipitation mit anschließenden Waschetappen bis hin zu mehrfachen HPLC-Reinigungsschritten gehen können.

## 5 Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

### 5.1 Untersuchungen von MALDI-Matrix Substanzen

Neben den Glycopeptiden und Nukleinsäuren stellt die Peptid- und Proteinanalytik zur Zeit das wichtigste Anwendungsgebiet der neuen schonenden MS-Ionisierungsverfahren in der Biochemie dar. Von zentraler Bedeutung in biologischen Systemen sind die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Aminosäuren bzw. den Peptiden. Besonders die Untersuchungen von nicht-kovalenten Wechselwirkungen wie die van der Waals-Wechselwirkung und Wasserstoffbrückenbindungen sind in biologischen Systemen wie die DNA vorzufinden. Diese nicht-kovalente Wechselwirkungen regulieren viele biologisch relevante Interaktionen, wie z.B. die Rezeptor-Ligand, Enzym/Effektor-, Enzym/ Inhibitor-Wechselwirkung.

In den folgenden Experimenten sollen mögliche Clusterbildungen, aufgrund nicht-kovalenter Wechselwirkungen, zwischen Matrixmolekülen und kurzkettigen Peptiden (Di-, Tri- und Tetrapeptiden), die nicht durch direkte Photoionisation gebildet worden sein können, da die Moleküle über kein Chromophores System verfügen, untersucht werden. Entgegen den bisher von Meffert<sup>103, 126</sup>. durchgeführten Untersuchungen konnte durch den Umbau der Apparatur, indem der Abstand zwischen Desorptions- und Ionisationskammer verkürzt wurde, die Ionisation mit ns-Laserpulsen erfolgen.

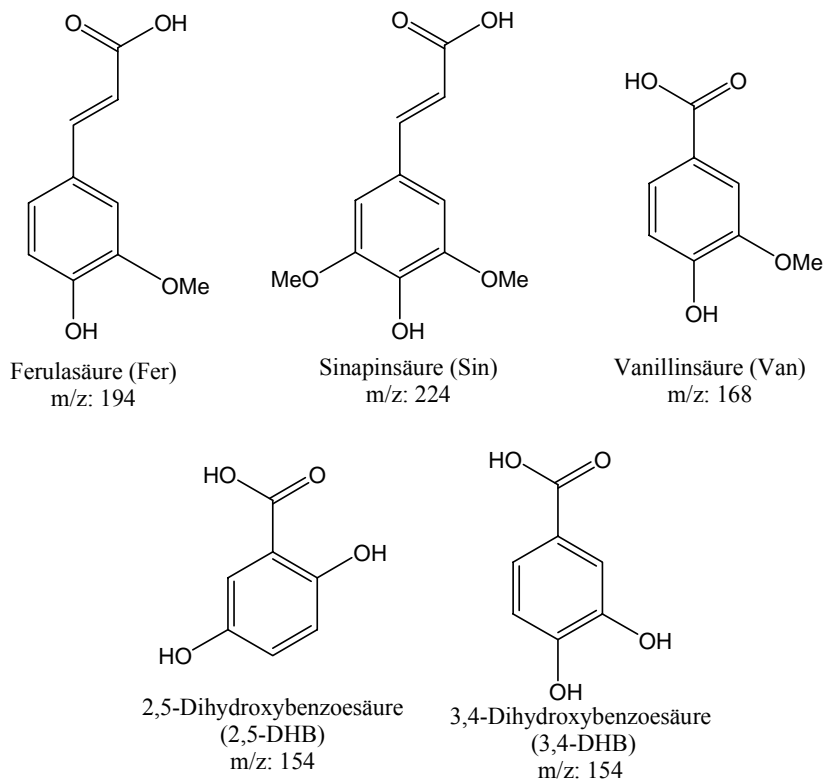
Durch Verkürzung der adiabatischen Expansions-strecke von Desorptionskammer zur Ionisationskammer, konnten die durch IR-Laser desorbierten Moleküle die Skimmeröffnung optimal im Mittelpunkt treffen. Die Erhöhung der Teilchenzahl in der Ionisationskammer ermöglicht nun eine effektive Steigerung der Ionisationswahrscheinlichkeit und eine Signalintensitätsverbesserung bei der Ionisation mit ns-Laser-Pulsen.

## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

---

Eine Fragmentierung“ in Folge weiterer Absorption im Molekülion als Ursache für die schlechten Signalintensitäten der Molekülionen und vor allem Clustern im Falle der ns-MUPI“ konnte durch Experimente mit verminderter Pulsenergie des ns-Lasers ausgeschlossen werden.

Die meisten eingesetzten MALDI-Matrizes besitzen ein Ionisationspotential in der Größenordnung von 7-10 eV, d.h. es sind für Wellenlängen von 260 nm (4.77 eV) bis 337 nm (3.68 eV) mindestens zwei Photonen zur Ionisation der Matrix erforderlich. Häufig eingesetzte Matrizes sind aromatische Zimtsäurederivate bzw. Derivate der Benzoesäure.



**Abb. 5- 1: Strukturformeln der verwendeten MALDI-Matrizes**

Sie weisen folgende Charakteristika auf:

- Chromophores System (Aromat) zur Absorption der Laserstrahlung.
- Säure-, Alkoholfunktion, als Protonendonator.

## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

Als Matrixsubstanz wurden Vanillinsäure, Sinapinsäure, Ferulasäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure verwendet.

Aufgrund der Strukturformel ist ersichtlich, dass die zuvor aufgeführten Matrizes befähigt sind über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen und/oder Wasserstoffbrücken homogene Cluster bzw. heterogene Cluster zwischen Analytmolekül und Matrix auszubilden.

Da die hier verwendeten Matrizes Feststoffe sind, wurde bei der Probenpräparation den Matrizes zusätzlich Polyethylen zur Stabilisierung des Presslings und Graphit zur Erhöhung des Desorptionsquerschnitts beigemischt. Die feste Probe wurde durch einen gepulsten CO<sub>2</sub>-Laser (10.6  $\mu$ m) in einen Argon-Überschallgasstrahl (Jet) desorbiert. Die neutralen Moleküle und Cluster wurden im Jet zur Ionisationskammer transportiert und mittels MUPI ionisiert.

Die Ionisation der Matrizes erfolgte mit ns-Laserpulsen bei 260 nm (Pulsdauer 10ns, 4.77 eV, Energie/Puls  $\sim$  200-300 $\mu$ J). Abbildung 5.2 zeigt das Spektrum der reinen Vanillinsäure.

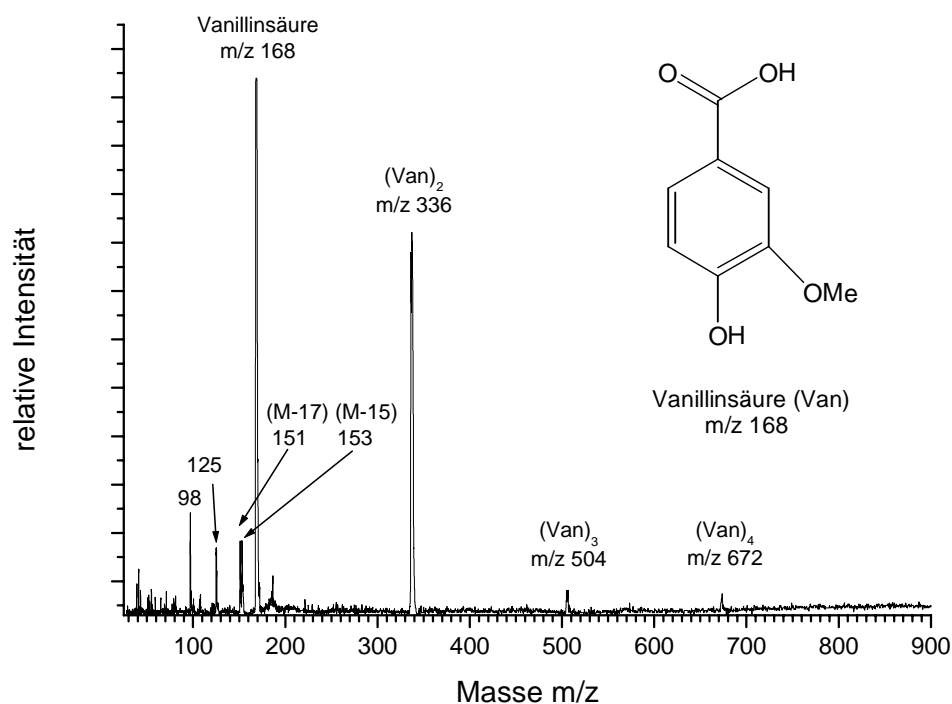


Abb. 5- 2: REMPI-ReTOF-MS von Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

Das Signal des Molekülions bei  $m/z$  168 bildet zugleich den Basispeak im Spektrum. Bei  $m/z$  336, 504, 672 sind die Signale der homogenen Cluster (Dimer, Trimer und Tetramer) zu beobachten. Somit wird deutlich, dass die Abkühlung der Inneren Freiheitsgrade der Gasteilchen während der adiabatischen Expansion die Bildung schwach gebundener homogener Cluster ermöglicht. Zusätzlich wird im Spektrum deutlich, dass das Monomer fragmentiert, indem die Carboxylgruppe (M-44) bei  $m/z$  124 sowie die Methylgruppe der Methoxygruppe (M-15) bei  $m/z$  153 und die Hydroxylgruppe (M-17) bei  $m/z$  151 abgespalten werden. Die Bildung des Molekülions erfolgt durch die Absorption von zwei Photonen. Eine weitere Absorption von einem Photon führt zur Fragmentierungsreaktionen. Für die Bildung der Fragmente bei  $m/z$  124 und 98 wird ein viertes Photon gebraucht.

In Abbildung 5-2a ist der Fragmentierungsbaum der Vanillinsäure dargestellt.

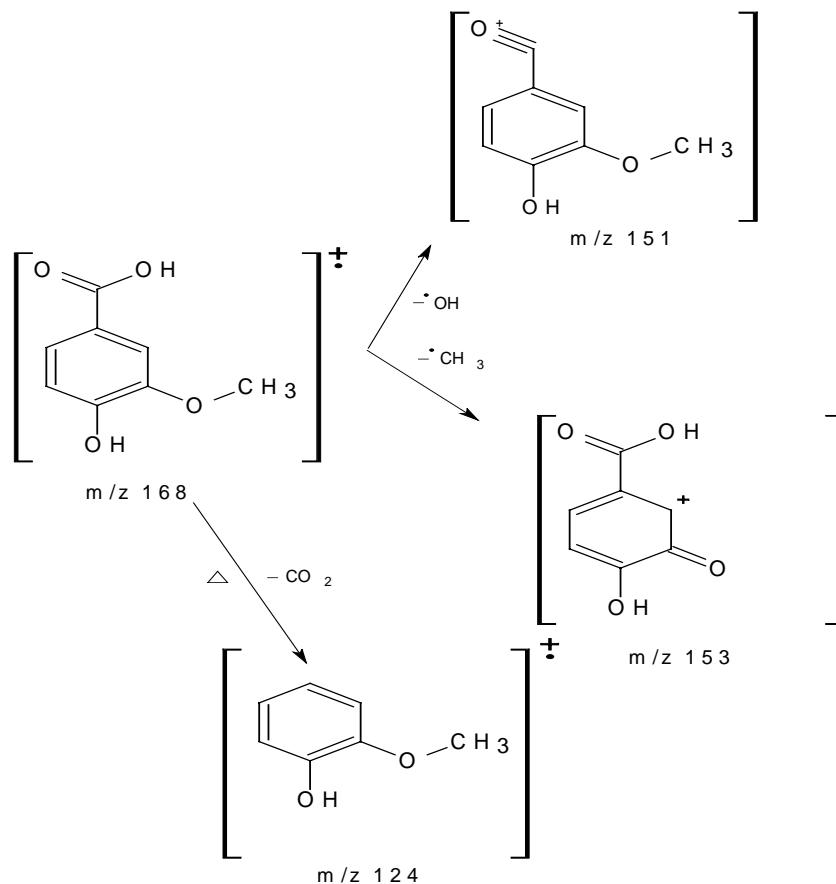
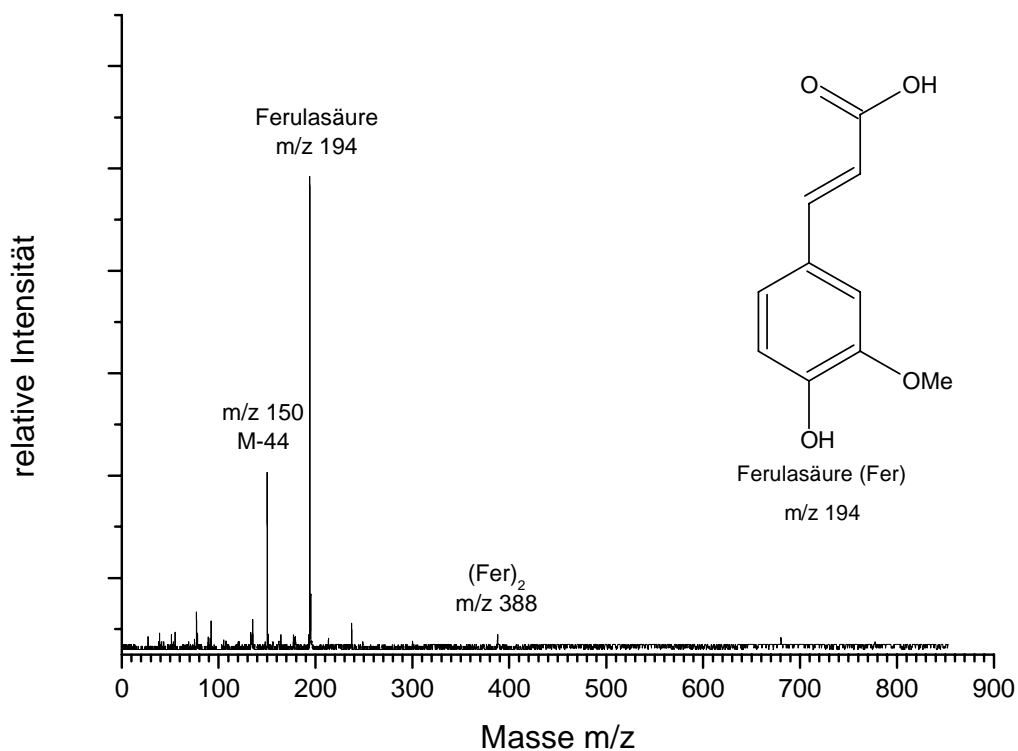


Abb. 5- 2a: Fragmentierungsbaum der Vanillinsäure



In weiteren Messreihen wurden die in Abbildung 5.1 aufgeführten MALDI-Matrizes auf Bildung von homogenen Clustern untersucht.

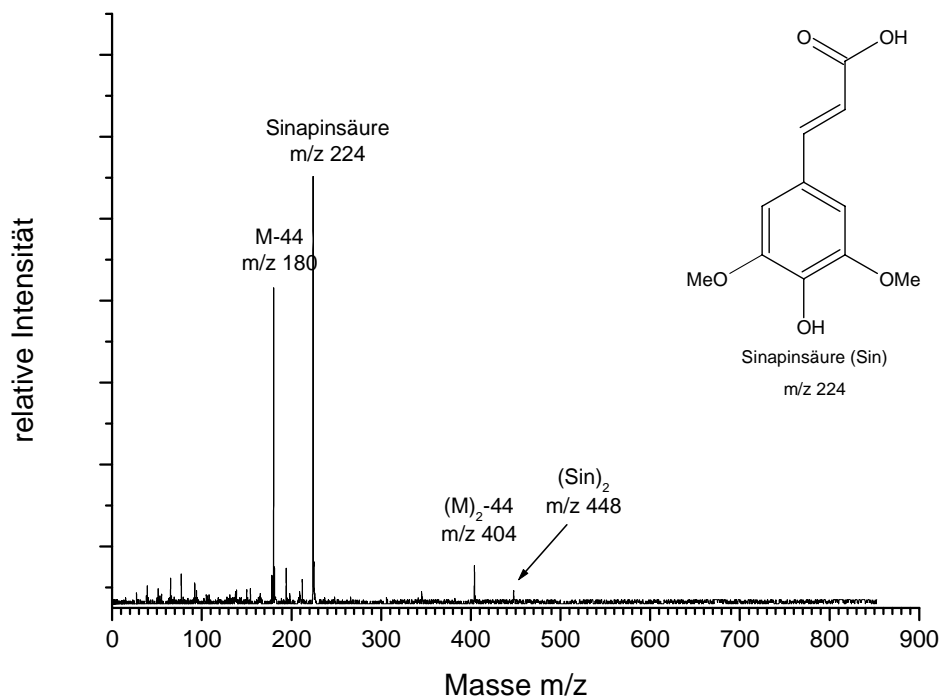


**Abb. 5- 3: REMPI-ReTOF-MS von Ferulasäure bei  $\lambda = 260$  nm**

Man sieht deutlich den Molekülpeak der Ferulasäure bei einem m/z von 194. Durch Decarboxylierung erhält man zusätzlich das Fragmentation bei m/z 150. Auch die Ferulasäure bildet einen homogenen Cluster mit der Masse von 388, wobei die Signalintensität des Clusters im Vergleich zum Vanillinsäure-Dimer eine sehr geringe Intensität zeigt.

Auch im Falle der Sinapinsäure beobachtet man, dass der Molekülpeak den Basispeak bildet und die Bildung des Matrix-Dimers zu erkennen ist. Das Sinapinsäure-Dimer fragmentiert

bei der Ionisation unter Abspaltung der Carboxyl-Gruppe. Dabei entsteht ein Fragmention von  $m/z$  404.



**Abb. 5- 4: REMPI-ReTOF-MS von Sinapinsäure bei  $\lambda = 260$  nm**

Analog zu den bereits erwähnten Matrizes konnte bei 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Abbildung 5.5, die Bildung des homogenen Clusters gezeigt werden. Dagegen konnte bei 2,5-Dihydroxybenzoesäure die homogene Clusterbildung nicht detektiert werden. Ebenso ist die Fragmentierung der Benzoesäure-Derivate unterschiedlich. Während 3,4-Dihydroxybenzoesäure unter Abspaltung der Hydroxygruppe fragmentiert, verliert 2,5-Dihydroxybenzoesäure die Carboxylgruppe.

Im Allgemeinen fragmentieren die sauren MALDI Matrizes unter Abspaltung der Säuregruppe und es entsteht damit in dem Massenspektrum das (M-44) Signal.

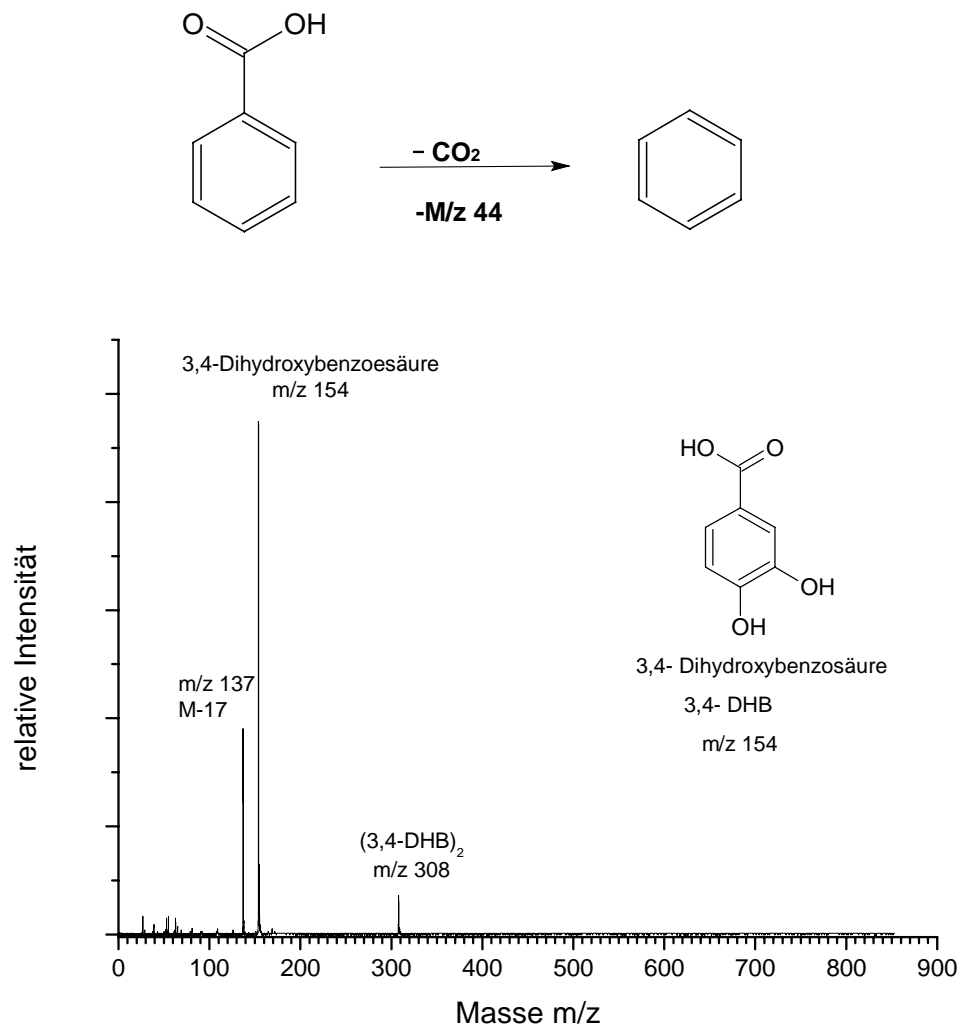
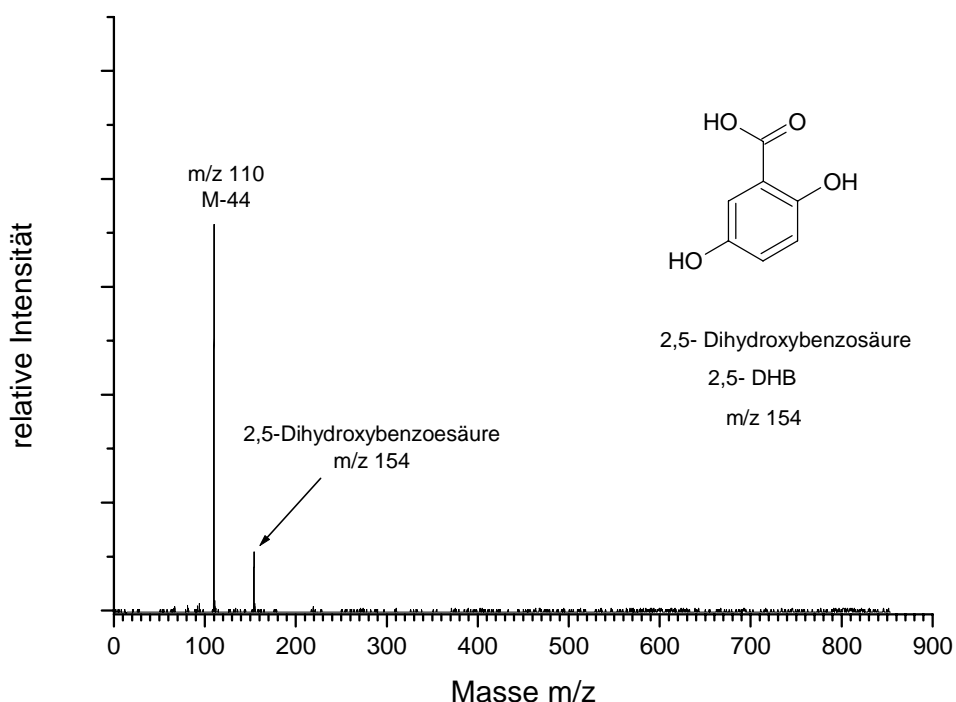


Abb. 5-5: REMPI-ReTOF-MS von 3,4-Dihydroxybenzoensäure bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$



**Abb. 5-6: REMPI-ReTOF-MS von 2,5-Dihydroxybenzoesäure bei  $\lambda = 260$  nm**

Im Gegensatz zu Zimtsäurederivate konnte im Falle der Benzoesäurederivate 3,4-Dihydroxybenzoesäure und Vanillinsäure deutliche Signalintensitäten der homogenen Cluster detektiert werden. Die Benzoesäurederivate besitzen angeregte Zwischenzustände mit langer Lebensdauer, d.h. die intramolekularen Prozesse, die zur Depopulation der Zustände führen, verlaufen langsam. Bei den Zimtsäurederivaten führen sehr schnelle Prozesse zu einer raschen Depopulation der angeregten Zustände, so dass durch Einsatz von ns-Laserpulsen nur eine geringe Anzahl von angeregten Molekülen ionisiert wird. Daraus folgt, dass die Clustersignale mit einer geringen Intensität auftauchen.

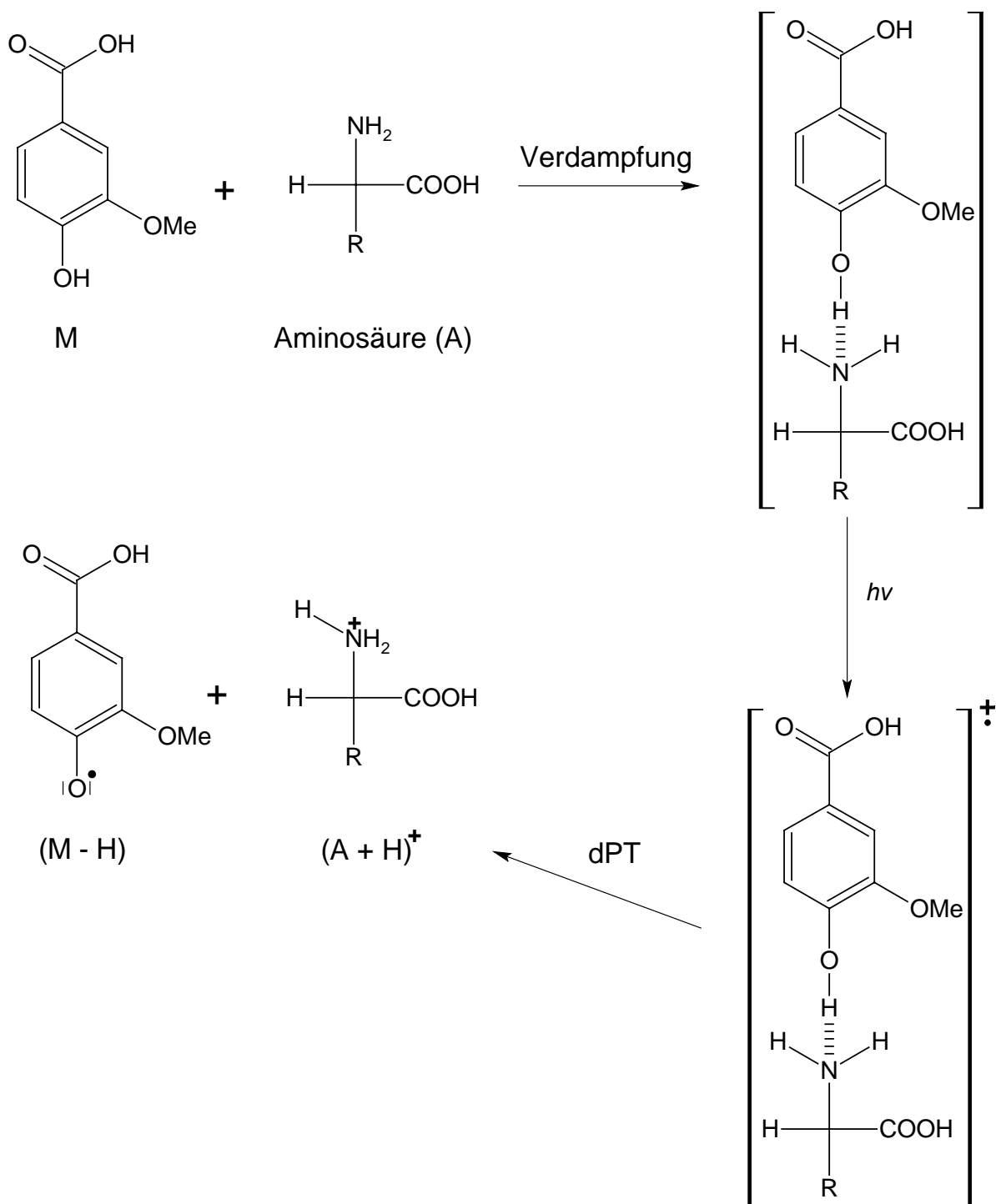
Dieses Problem könnte durch den Einsatz von fs-Laser behoben werden<sup>126</sup>, weil hierbei durch die sehr schnellen Pulse die Ionisation aus dem angeregten Zustand verstärkt werden kann.

Somit ist es nahe liegend, die Bildung von heterogenen Clustern zwischen Matrixmolekülen und Peptiden (Di-, Tri-, Tetrapeptide) zu untersuchen.

## 5.2 Untersuchung zur Clusterbildung von MALDI-Matrizes mit Peptiden

Nachdem die Bildung von homogenen Gasphasenclustern von MALDI-Matrixverbindungen gezeigt werden konnte, soll nun in den nachfolgenden Experimenten, die Bildung von heterogenen Clustern zwischen MALDI-Matrizes und Di-, Tri-, Tetrapeptiden untersucht werden. Da die hier verwendeten Peptide kein chromophores System besitzen, ist man auf das Vorhandensein der Matrizes angewiesen.

Wie schon in Kapitel 5.1 beschrieben, weisen die verwendeten MALDI-Matrizes ein chromophores System zur Absorption der Laserlichts vor. Die aromatische Matrixkomponente bestimmt die Ionisation des im Jet gebildeten Clusters. Im Ion des heterogenen Clusters erfolgt dann ein Protonentransfer vom Matrix-Radikalkation auf das Analytmolekül und anschließend zerfällt das Clusterion unter Freisetzung der protonierten Spezies. In Abbildung 5.7 ist der Mechanismus des dissoziativen Protonentransfers aufgeführt. Exemplarisch soll dies zwischen Vanillinsäure und einer allgemeinen Aminosäure dargestellt werden.



**Abb. 5-7: Mechanismus zum dissoziativen Protonentransfer (dPT)**

Als allgemeine energetische Voraussetzung für einen dissoziativen Protonentransfer zwischen Analytmolekül und MALDI-Matrix muss folgende Bedingung erfüllt sein, damit die Bildung protonierter Aminosäuren durch dPT möglich ist:

$$PA (M - H)^{\cdot} - PA (A) + D [(M - H)^{\cdot} - (A + H)^+] < 0$$

D = erforderliche Energie zur Dissoziation  
des Matrixradikals

In dem angenommenen Mechanismus des dPT für die beobachtete Bildung protonierter Aminosäuren ist die Protonenaffinität der eingesetzten Aminosäure bzw. die Protonenaffinität des entsprechenden Matrixradikals PA (M-H)<sup>·</sup> von großer Bedeutung. Nur wenn die Protonenaffinität der betreffenden Aminosäure größer als die des entsprechenden Radikals [Matrix-H]<sup>·</sup> der verwendeten Matrixverbindung ist, kann ein Protonentransfer im heterogenen Dimer stattfinden.

Die Protonenaffinität nimmt mit wachsendem organischem Rest zu, da der Induktive-Effekt eine Erhöhung der Elektronendichte des Stickstoffatoms zur Folge hat. Bojesen<sup>92</sup> konnte anhand von unimolekularen Zerfalls-Experimenten die relative Reihenfolge der Protonenaffinität der 20 α-Aminosäuren festlegen. Lias et al.<sup>93</sup> konnte diese Ergebnisse anhand berechneter Protonenaffinitäten bestätigen.

### 5.2.1 Cluster Massenspektren von Dipeptiden mit MALDI-Matrizes

In den nachfolgenden Experimenten sollte die Fragestellung nach homogenen und heterogen Clusterbildung sowie des protonierten Analytmoleküls geklärt werden.

Hierbei wurde gezielt auf die Clusterbildung zwischen den in Tabelle 5.1 aufgeführten Dipeptiden und den in Abbildung 5.1 aufgeführten MALDI-Matrizes geachtet.

In den durchgeführten Experimenten wurden Dipeptide mit verschiedenen aminoterminalen Resten und unterschiedlicher Protonenaffinität eingesetzt (Bsp. Ala-Gly bzw. Gly-Ala).

## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

Tabelle 5.1

Dipeptid	m/z	Dipeptid	m/z
Ala-Gly	146	Gly-Ala	146
Arg-Gly	231	Gly-Arg	231
Gly-Glu <sup>a</sup>	204	Glu-Gly	204
Leu-Gly	188	Gly-Leu	188
Ser-Gly	163	Gly-Ser	163
Lys-Gly	204	Gly-Lys	204
Gly-Gly	132		

a)  $\beta$ -Endorphin

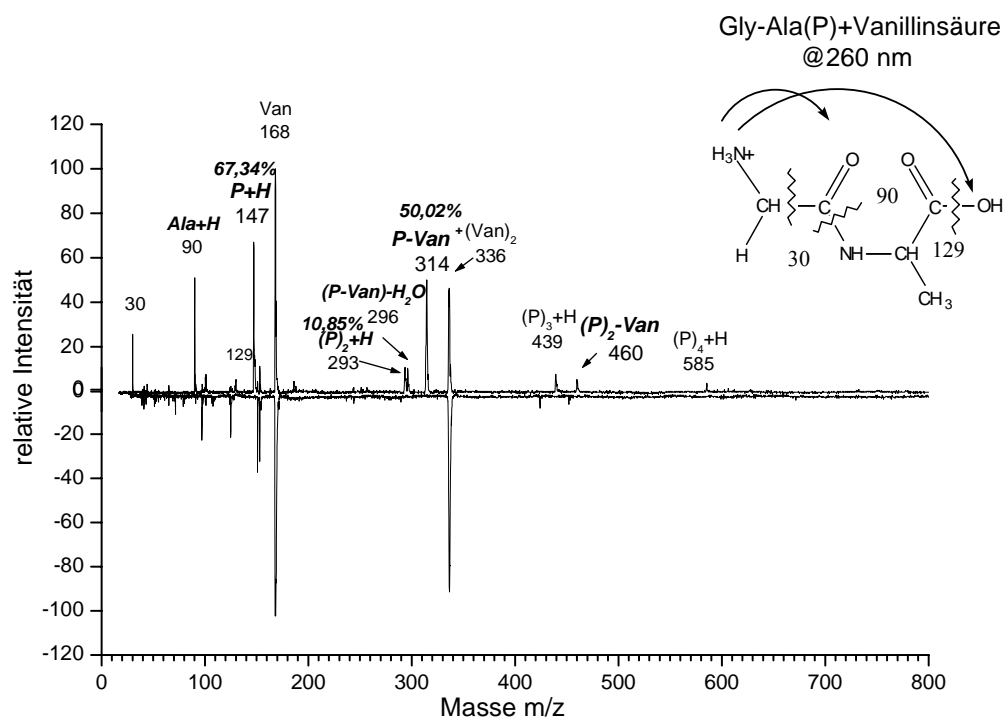


Abb. .5-8: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Ala und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm



## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

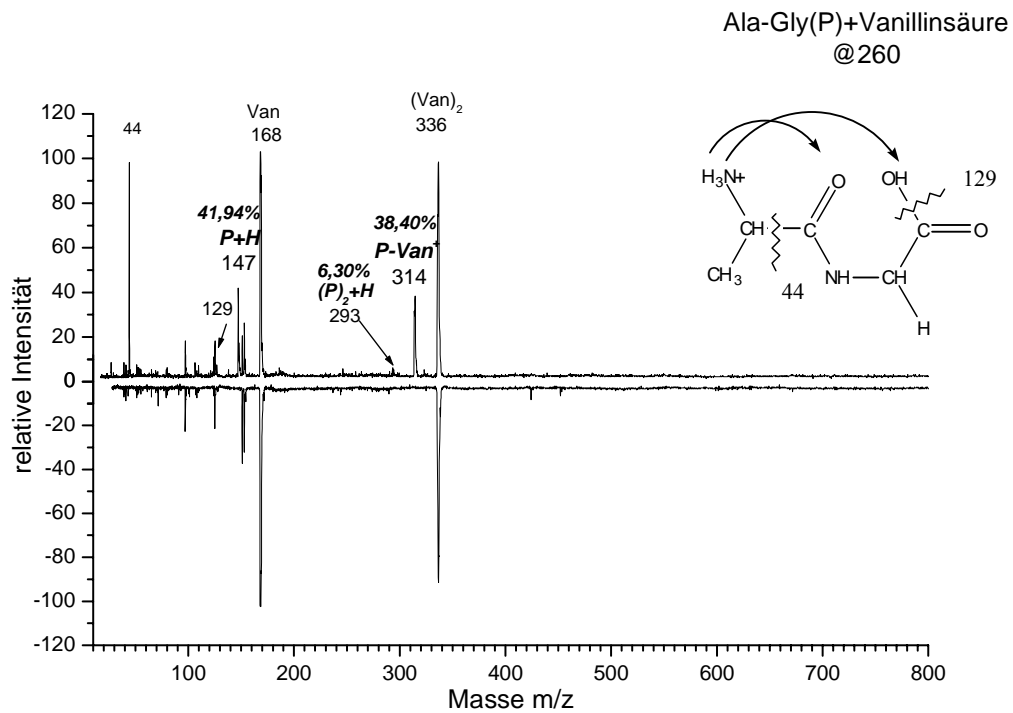


Abb. 5-9: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Ala-Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

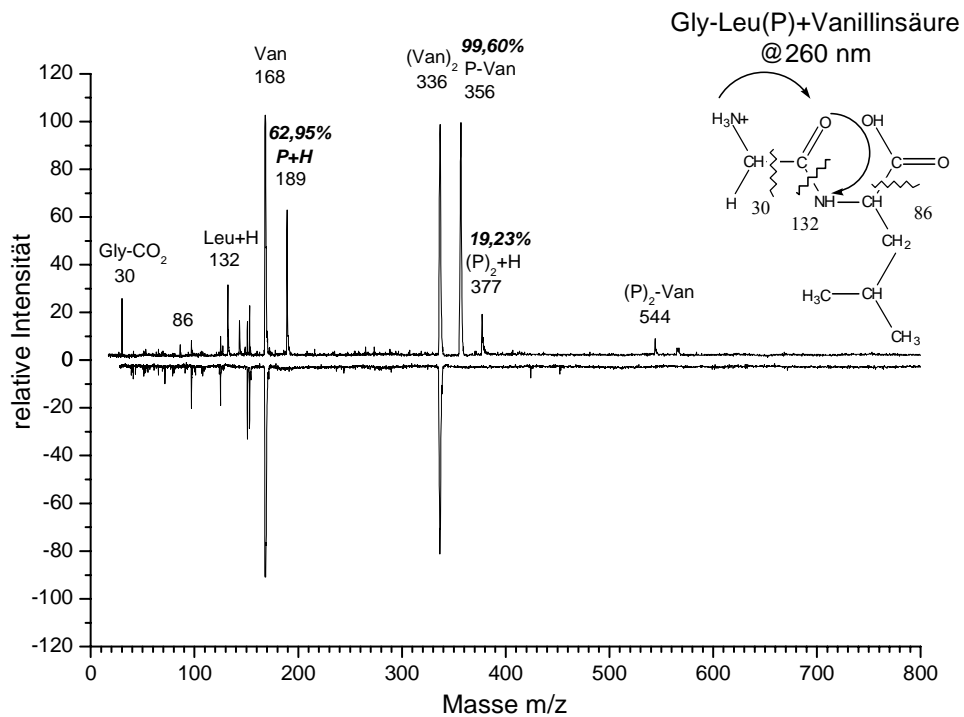
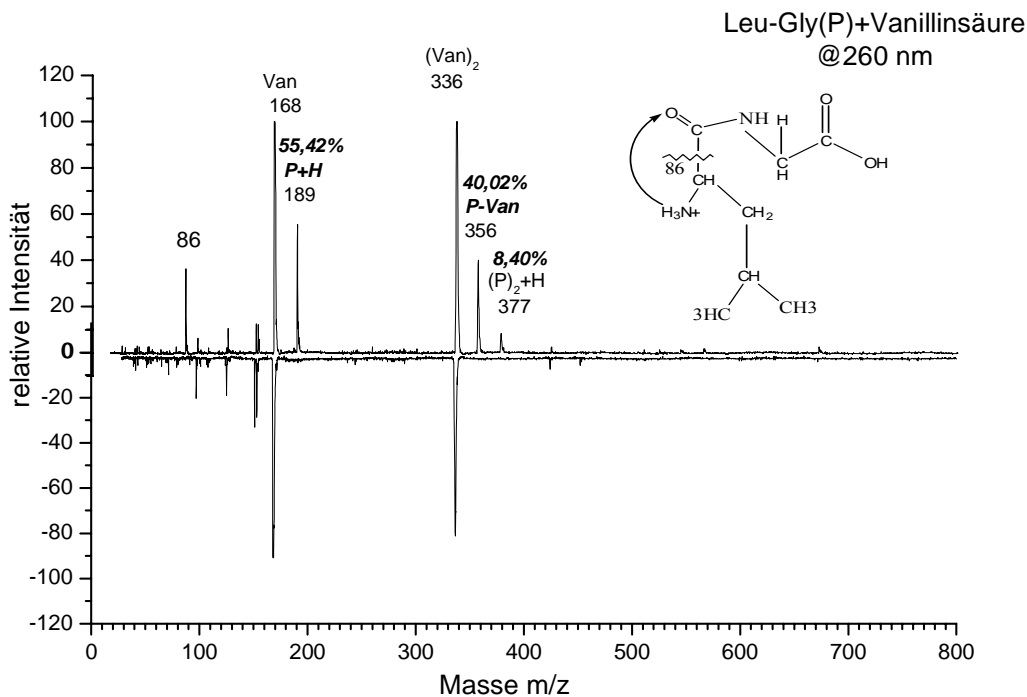


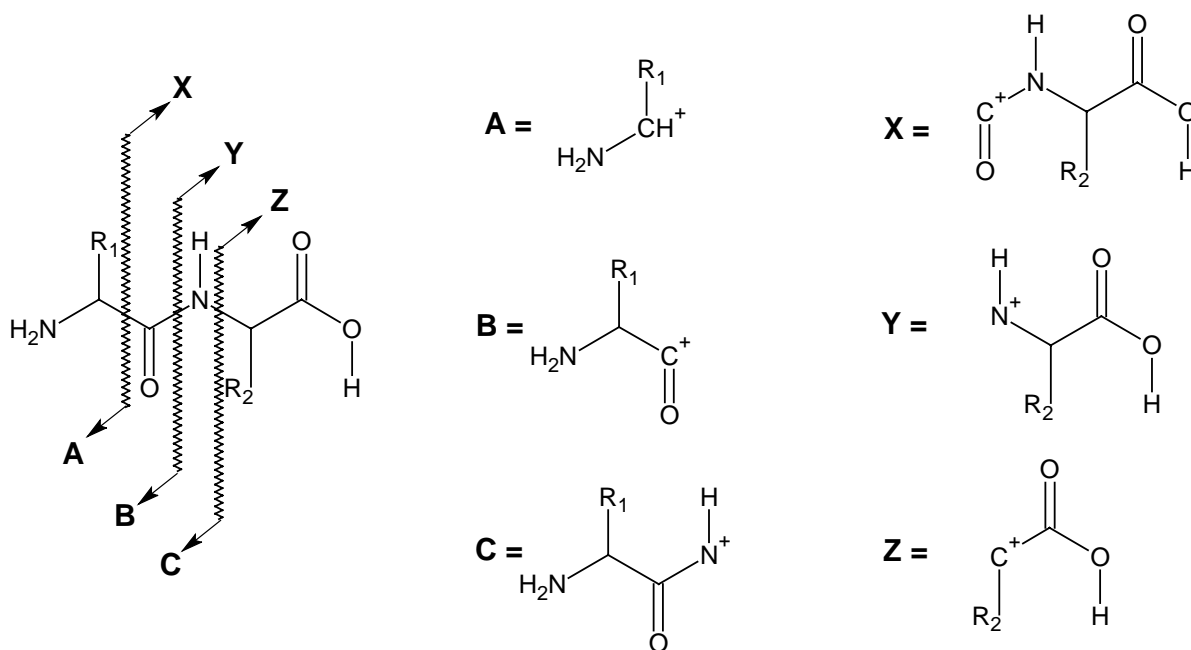
Abb.5-10: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Leu und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm



**Abb. 5-11: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Leu-Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm**

In den Abbildungen 5.8 und 5.9 wurden erhaltenen Massenspektren von Vanillinsäure als Matrix und den Peptiden Gly-Ala und Ala-Gly dargestellt. Neben dem homogenen Matrixdimer ( $m/z$  336) konnte auch die Bildung des heterogenen 1:1 Clusters ( $m/z$  314) zwischen dem Matrixmolekül und den Dipeptiden bzw. einem 2:1 Cluster aus Vanillinsäure und zwei Dipeptiden ( $m/z$  460) beobachtet werden. Zusätzlich wurde im Falle des Dipeptides Gly-Ala die Bildung höherer homogene Aggregate aus protonierten Dimeren ( $m/z$  293), Trimeren ( $m/z$  439) und dem protonierten Tetrameren ( $m/z$  585) beobachtet. Besonders Interessant ist das Signal der Wasserabspaltung bei  $m/z$  296 vom heterogenen Cluster aus Vanillinsäure und Dipeptid Gly-Ala. Dieses Phänomen lässt auf die Bildung einer Peptidbindung in der Gasphase schließen. Genauere Untersuchungen zur Erklärung dieses Phänomens sind in Kapitel 6 aufgeführt.

Durch die Anwendung der weichen MUPI konnte die Fragmentierung der zu untersuchenden Substanzen minimiert werden. Aus einer allgemeinen Betrachtung der Fragmentierungsmöglichkeiten eines Peptides ergeben sich sequenzspezifische Ionen. In dem folgendem Schema soll dies kurz dargestellt werden.



**Abb.5-12.: Prinzipielle Fragmentierungsmöglichkeiten eines Peptides im Massenspektrum zur Bildung von Sequenzionen.**

Die Fragmentierungsreaktionen bei Peptiden treten vor allem an den Bindungen entlang der Peptidkette auf, die in drei verschiedene Bindungsarten eingeteilt werden können (siehe Abbildung 5.12) : (i) die vom Carbonyl-Kohlenstoff ausgehende C-C-Bindung, unter Bildung von einem Acyliminium-Ion (A) (ii) die von Carbonyl-Kohlenstoff ausgehende C-N-Bindung (die sogenannte Peptidbindung), unter Bildung von einem Acylium-Ion (B) und (iii) die weitere vom Amid-Stickstoff ausgehende N-C-Bindung.

Zur Kennzeichnung dieser Bruchstücke bedient man sich in der Massenspektrometrie einer Nomenklatur, die von Roepstorff et al.<sup>[83]</sup> vorgeschlagen wurde. Verbleibt bei der Spaltung die Ladung am N-terminalen Fragment, so werden die entsprechenden Fragmente als A-, B- bzw. C- Typ klassifiziert, verbleibt die Ladung am C-terminalen Ende, so werden die Fragmente entsprechend als X-, Y- und Z-Fragmente bezeichnet. Alle diese Fragmente können entstehen, aber ein Studium der veröffentlichten Spektren zeigt klar die bevorzugte Neigung der Amidbindung zum Bruch unter Ausbildung von Fragmenten des Typs Y und B<sup>85</sup>.

Ist der Bindungsbruch von einer Wasserstoffübertragung begleitet, so wird jedes übertragene H-Atom mit einem Strich symbolisiert, und zwar auf der linken Seite des

## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

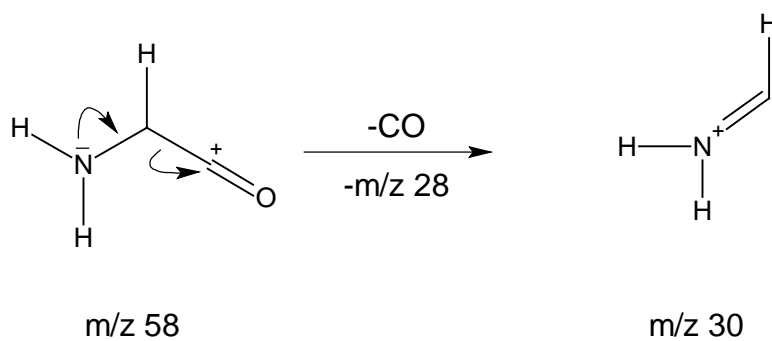
---

Symbols für einen Verlust, auf der rechten Seite des Symbols für ein zusätzliches H-Atom. Ein C<sup>''</sup>-Fragment ist damit ein C-Fragment, das zwei zusätzliche H-Atome trägt.

Ein zusätzlicher, tiefgestellter Index gibt die Zahl der in dem Fragmention enthaltenen Aminosäurereste an, daher läuft dieser Index für die A, B und C-Serien in umgekehrter Reihenfolge wie für die X, Y und Z-Serien.

Andere Fragmentierungsreaktionen können auch durch Umlagerungsreaktionen, besonders bei aromatischen Aminosäuren auftreten. Die bekannteste ist die McLafferty-Umlagerung bei der es zur Bildung von Ionen kommt, die durch das aromatische Ringsystem der Aminosäuren mesomeriestabilisiert sind.

Wie aus früheren Untersuchungen bekannt ist<sup>[84]</sup>, treten in den Massenspektren von Peptiden im unteren Massenbereich Fragmentionen auf, die den decarbonylierten Acyliumionen entsprechen.



Diese Art von Fragmentierungsmuster wurde bei dem Dipeptid Gly-Ala in Abbildung 5.8 beobachtet. Analoge Beobachtungen wurden auch bei der Fragmentierung der umgekehrten Peptidsequenz Ala-Gly gemacht. Das Acyliumion, bei  $m/z\ 44$ , entstammt allerdings hier von der Alanin-Untereinheit des Dipeptids.

Desweiteren bemerkt man den bevorzugten Bindungsbruch der Amidbindung zwischen Gly-Ala und erhält ein Hauptfragment ( $m/z\ 90$ ) des protonierten Alanins.

## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

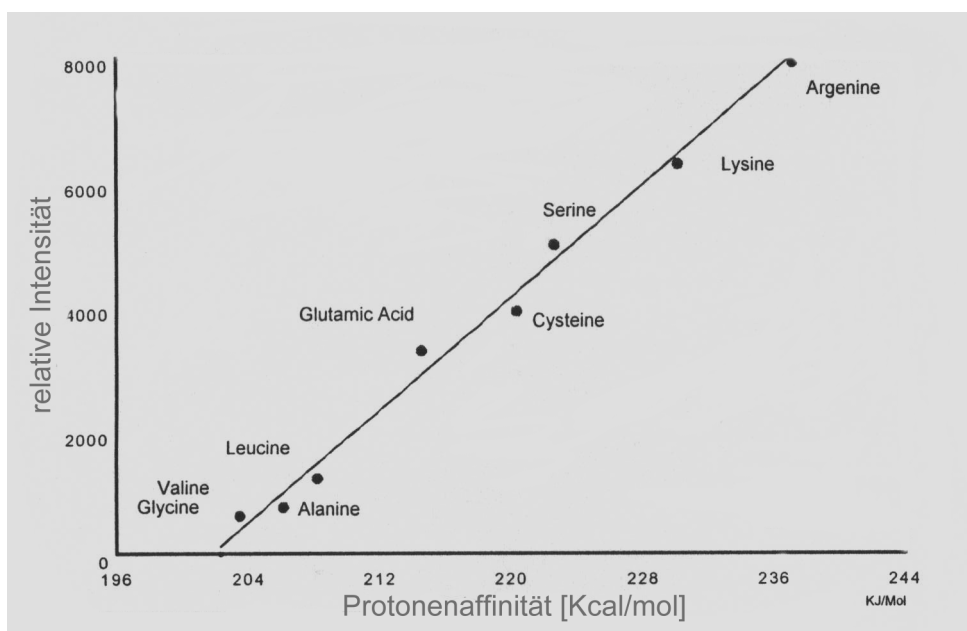
---

Das deutet darauf hin, dass ein intramolekularer Protonentransfer, von der N-terminalen zur C-terminalen Aminosäure stattfindet.

Allgemein wurden bei Dipeptiden häufig C-terminale Ionen mit relativ hohen Intensitäten beobachtet. Überwiegend kann man, wenn C-terminale Ionen überhaupt gebildet werden, Y (Bindungsbruch der Peptidbindungen) und Y' Ionen z.B. das Signal bei m/z 90 im Falle Gly-Ala mit Vanillinsäure als Matrix bzw. das Signal bei m/z 132 im Falle von Gly-Leu mit Vanillinsäure.

Zusätzlich zu dem intramolekularen Protonentransfer im Monomer, findet zwischen dem Dipeptid und der Matrix bzw. einem weiteren Dipeptid, ein Intracluster Protonentransfer zu einem protonierten Peptidmolekül bei m/z 147 (hier dPT; siehe Kapitel 4.2) statt.

Aus bisher bekannten Untersuchungen<sup>93, 93a, 93b, 94,94a</sup> wurden für einzelne Aminosäure unterschiedliche Protonenaffinitäten (PA) in der Gasphase gefunden.



**Abb.5-12a: Protonenaffinitäten einiger Aminosäuren**

In Abhängigkeit der Protonenaffinität konnte ein Anstieg der Signalintensität Massenspektrum der protonierten Aminosäure beobachtet werden. In Analogie hierzu wurden

## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

systematische Untersuchungen zum Einfluss der Protonenaffinität der N-terminalen Aminosäure der Dipeptiden auf die Intensität des Analytmoleküls zu überprüfen.

Für kleine Peptide liegen sehr begrenzte Informationen über Ihre Protonenaffinitäten, genauere Daten liegen in der Literatur nicht vor<sup>98</sup>.

Tabelle 5.2:

Dipeptid	P + H <sup>+</sup>	homogener Cluster	heterogener Cluster
Ala-Gly	41.94 %	6.30 %	38.40 %
Gly-Ala	67.34 %	10.85 %	50.02 %
Arg-Gly	41.20%	5.56%	5.82%
Gly-Arg	38.65%	9.64%	5.00%
Glu-Gly	48.21%	11.82%	4.05%
Gly-Glu	74.86%	12.10%	22.05%
Gly-Gly	36.10%	12.56%	18.65%
Gly-Leu	62.95%	19.23%	99.60%
Leu-Gly	55.42%	8.40%	40.02%
Gly-Lys	98.40%	19.74%	26.85%
Lys-Gly	80.83%	26.01%	21.41%
Gly-Ser	20.90%	5.56%	14.11%
Ser-Gly	35.40%	6.45%	9.85%

Entgegen den Erkenntnissen der Untersuchungen von einzelnen Aminosäuren konnte eine Zunahme der Signalintensität des protonierten Dipeptids beim Übergang zu einem Peptid mit höherer Protonenaffinität der C-terminalen Aminosäure festgestellt werden.

Für Gly-Glu mit Glycin als N-terminaler Rest, der eine geringere Protonenaffinität als Glutaminsäure besitzt, ist die relative Signalintensität des protonierten Peptids nahezu

doppelt so hoch (Gly-Glu 74.86 %: Glu-Gly 48.21 %) wie das Dipeptid mit Glutaminsäure als N-terminalen Rest und Glycin als C-Terminus.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse in weiteren Untersuchungen an z.B. den Dipeptiden (Gly-Lys vs. Lys-Gly), (Gly-Ala vs. Ala-Gly), (Gly-Leu vs. Leu-Gly).

Bei den Dipeptiden Gly-Arg und Arg-Gly wird trotz unterschiedlicher Protonenaffinität der einzelnen Aminosäuren [ $PA(\text{Arg}) \gg PA(\text{Gly})$ ], kaum ein Unterschied in der relativen Signalintensität der protonierten Dipeptide beobachtet.

Ausnahme bilden die relativen Signalintensitäten der Dipeptide Gly-Ser (20.90 %) und Ser-Gly (35.40%). Zurückführen lässt sich das auf den +M-Effekt der Hydroxylgruppe am  $\beta$ -C Atom des Serins. Im Gegensatz dazu übt der +M-Effekt, bei den Aminosäuren Glutamin und Lysin aufgrund der langen Alkylkette, keinen Einfluss auf die Protonenaffinität der Amino-gruppe am  $\alpha$ -C-Atom der jeweiligen Aminosäure aus.

Die direkte Bildung protonierter Dipeptide ist nicht möglich, da ausschließlich nichtaromatische Aminosäuren eingesetzt wurden, die keine Absorption im untersuchten Wellenlängenbereich aufweisen. Die Bildung protonierter Dipeptide erfolgt offenbar durch dissoziativen Protonentransfer in den heterogenen Dimeren.

Die relativen Signalintensitäten der heterogenen Dimere korrelieren mit den Steigerungen der Signalintensitäten der protonierten Dipeptide. So zeigt der heterogene Cluster aus Gly-Leu mit Vanillinsäure eine relative Signalintensität von 99.60 % die nahezu der Intensität des Basispeaks entspricht. Analoge Ergebnisse konnten auch bei den homogenen Clustern gemacht werden. Die Bildung der protonierten Dipeptid-Dimere lässt sich mit Hilfe des postulierten Reaktionsmechanismus (Abbildung 5-7) durch einen dissoziativen Protonentransfer im Ion des entsprechenden heterogenen Trimers vom Matrixmolekül und Dipeptid-Dimer erklären.

### 5.2.2 Cluster Massenspektren von Tripeptiden mit MALDI-Matrizes

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Bildung heterogener Cluster zwischen MALDI-Matrizes und Dipeptiden bei der Laserdesorption in einen Jet stattfindet und dass, in Abhängigkeit von der Protonenaffinität des Analyten sowie der Matrixverbindung, die Bildung protonierter Analytmoleküle durch dissoziativen Protonentransfer erfolgt, soll nun die Bildung heterogener Cluster aus Tripeptiden und MALDI-Matrizes bzw. die Bildung homogener Cluster untersucht werden.

In den durchgeführten Clusterexperimenten wurden gezielt Tripeptide mit aminoterminalen Resten möglichst unterschiedlicher Protonenaffinität eingesetzt, um den Einfluss die Protonenaffinität auf die relative Signalintensität der gebildeten protonierten Tripeptid zu untersuchen.

Hierzu wurden die in Tabelle 5.3 aufgeführten Tripeptide mit Vanillinsäure als Matrix untersucht:

Tabelle 5.3:

Tripeptid	m/z	Tripeptid	m/z
Ala-Gly-Gly	203	Gly-Leu-Gly	245
Gly-Ala-Gly	203	Gly-Gly-Leu	245
Gly-Gly-Ala	203	Lys-Gly-Gly	260
Gly-Gly-Gly	189	Gly-Lys-Gly	260
Leu-Gly-Gly	245	Gly-Gly-Lys	260



## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

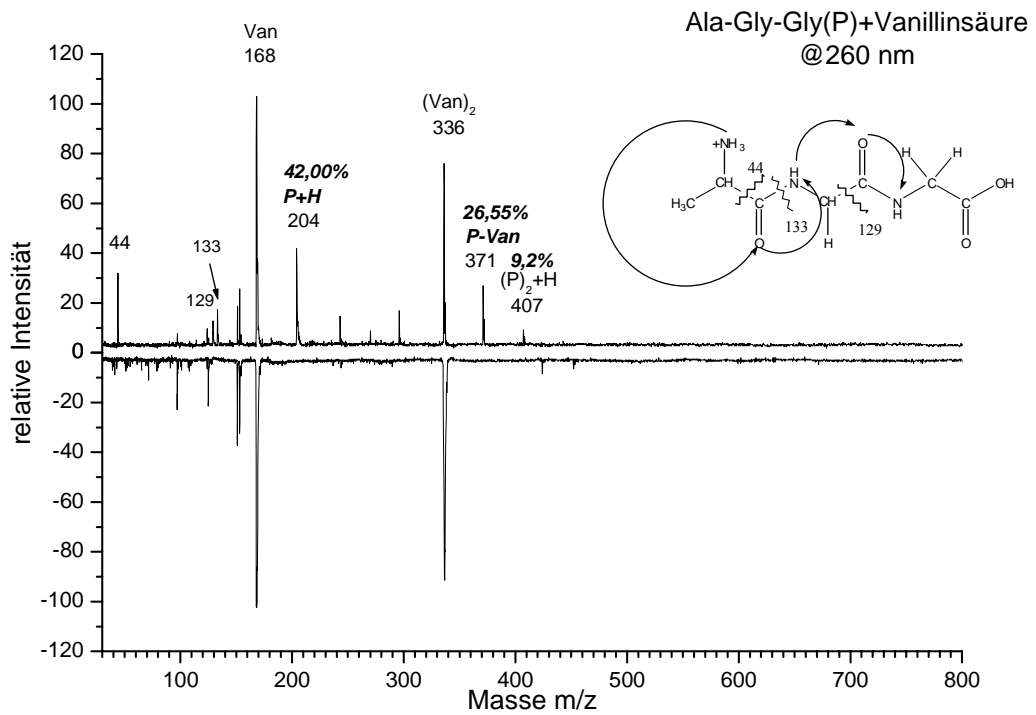


Abb. 5-13: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Ala-Gly-Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

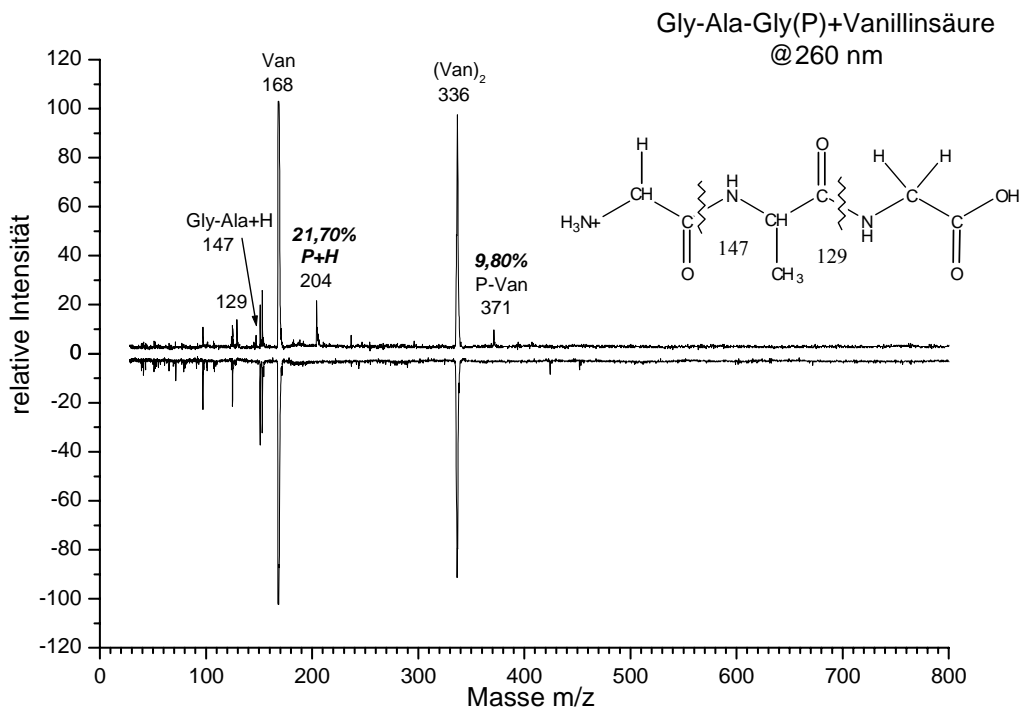


Abb. 5-14: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Ala-Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

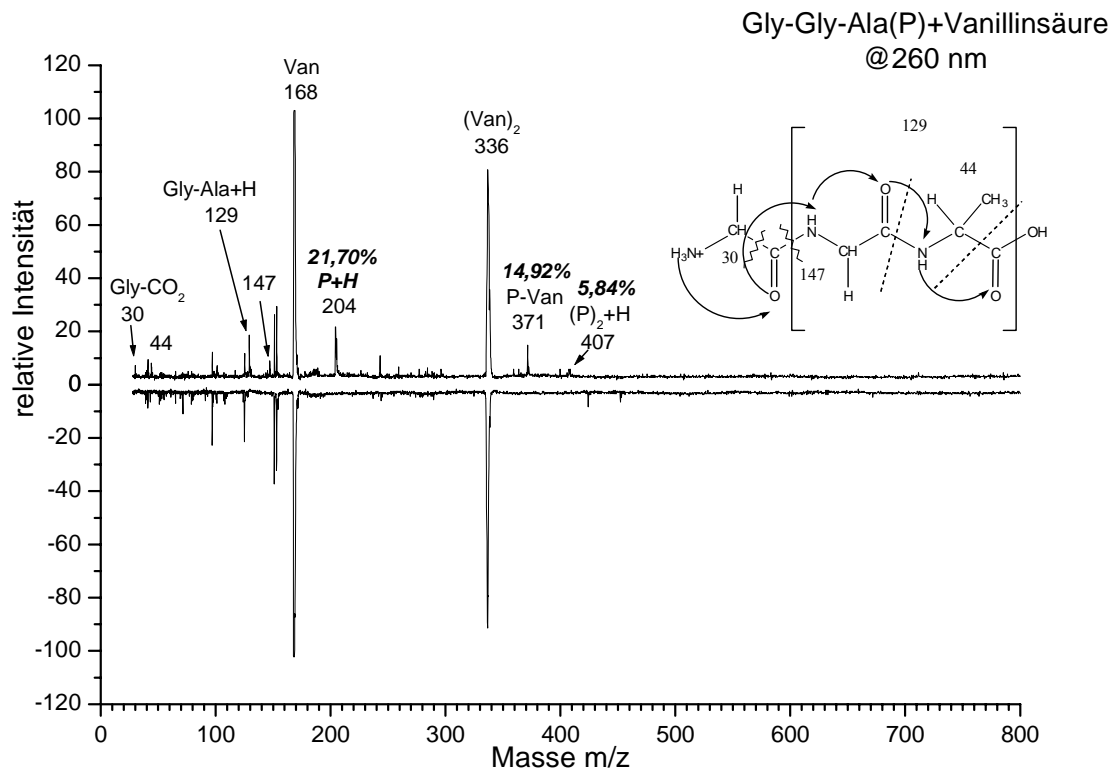


Abb. 5-15: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Gly-Ala und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

Auch in den Experimenten mit den nächst größeren Peptidmolekülen, den Tripeptiden, konnte die Bildung heterogener bzw. homogener Cluster und protonierter Peptidmoleküle beobachtet werden. Anhand der Beispielserie Ala-Gly-Gly, Gly-Ala-Gly bzw. Gly-Gly-Ala konnte die Bildung der protonierten homogenen Cluster bei  $m/z$  407 sowie der heterogene Cluster bei  $m/z$  371 zwischen Vanillinsäure und den Tripeptiden beobachtet werden.

Analog zu den Dipeptiden fragmentieren die Tripeptide bevorzugt durch den Bruch der Peptidbindung. Somit ist eine Sequenzierung größerer Peptide durch die Massenspektrometrie möglich. Deutlich ist die Bildung von A- und B-Sequenz-Ionen im Massenspektrum zu erkennen. Allerdings werden bei diesen Verbindungen die C-terminalen Sequenz-Ionen mit höherer Intensität gebildet.

Bei der hier untersuchten Tripeptidserie Ala-Gly-Gly, Gly-Ala-Gly bzw. Gly-Gly-Ala sind die höchsten relativen Signalintensitäten der C-terminalen Sequenz-Ionen-Fragmente bei  $m/z$  129, 133 und 147 aufzufinden. Neben den Fragmenten der C-terminalen Sequenz-Ionen werden auch N-terminale Sequenz-Fragmente gebildet.

Besonders Auffällig im Fragmentierungsmuster ist das Auftreten des  $A_1$ -Ions, des Acyliumions bei  $m/z$  30 des Tripeptids Gly-Gly-Ala. Dies ist ein Hinweis auf den Bruch der Peptidbindung zwischen Glycin und dem Rest des Tripeptids, wobei das Glycin unter Abspaltung von  $CO_2$  weiter fragmentiert (decarboxyliert).

Gleichzeitig deutet das, auf die Bildung von X-Ionen hin, die ebenfalls durch den Bruch der Peptidbindung entsteht. Bei dem Tripeptid Ala-Gly-Gly dagegen bildet das Fragmentation des Alanins das  $A_1$ -Ion mit dem  $m/z$  44.

Im Allgemeinen konnte die Bildung eines C-Ions bzw. eines Z-Ionen-Fragments bei der Tripeptidserie Ala-Gly-Gly, Gly-Ala-Gly bzw. Gly-Gly-Ala nicht nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu den Dipeptiden konnten völlig andere Beobachtungen hinsichtlich des Einflusses der Protonenaffinität der N-terminalen Aminosäure gemacht werden. Mit den untersuchten Tripeptiden wurden relativ intensive Signale der protonierten Peptidmoleküle detektiert, falls der N-terminalen Aminosäure des Tripeptides höheren Protonenaffinität verfügt.

Für Ala-Gly-Gly mit Alanin als N-terminalen Rest, der eine geringfügig höhere Protonenaffinität als Glycin besitzt, ist die Zunahme der relativen Signalintensität des protonierten Tripeptids (42.00 %) deutlich zu beobachten. Bei Gly-Ala-Gly dagegen, wo Alanin in der Mitte des Tripeptids liegt, konnte eine ersichtliche Abnahme der relativen Signalintensität des protonierten Tripeptids (21.70 %) detektiert werden.

Besonders deutlich wird beim Vergleich der beiden Tripeptide Gly-Ala-Gly (21.70 %) und Gly-Gly-Ala (21,70 %), dass die Signalintensität der protonierten Spezies sich nicht weiter verändert und sogar identisch bleibt.

Daraus lässt sich schließen, dass die N-terminale Aminosäure, durch die Protonenaffinität die Signalintensität des Tripeptids bestimmt.

In Analogie zu dem vorherigen Experiment ist auch bei den Tripeptidserien Leu-Gly-Gly, Gly-Leu-Gly und Gly-Gly-Leu der zu erwartende Einfluss der Protonenaffinität der N-terminalen Aminosäure zu beobachten.

In den Massenspektren wurde eine kontinuierliche Zunahme der relativen Signalintensitäten der protonierten Tripeptide von Glycin als N-terminale Aminosäure hin zu Leucin zu beobachten, entsprechend einem gleichmäßigem Anstieg in der Protonenaffinität um ca.  $6,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Wie bei der zuvor beschriebenen Tripeptidserie Gly-Ala-Gly und Gly-Gly-Ala ist auch hier keine weitere Veränderung der relativen Signalintensitäten des protonierten Tripeptids zu erkennen, wenn ein Austausch in der Aminosäuresequenz durchgeführt wurde.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass für die Tripeptide die Ausbildung Wasserstoffbrücken-gebundene Dimere über die freie Amino-Gruppe der N-terminalen Aminosäure erfolgt, und in diesen heterogenen Dimerionen ein dissoziativer Protonentransfer vom Matrixmolekül auf das Tripeptidmolekül, lokalisiert am N-terminalen Ende des Peptids, stattfindet.

## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

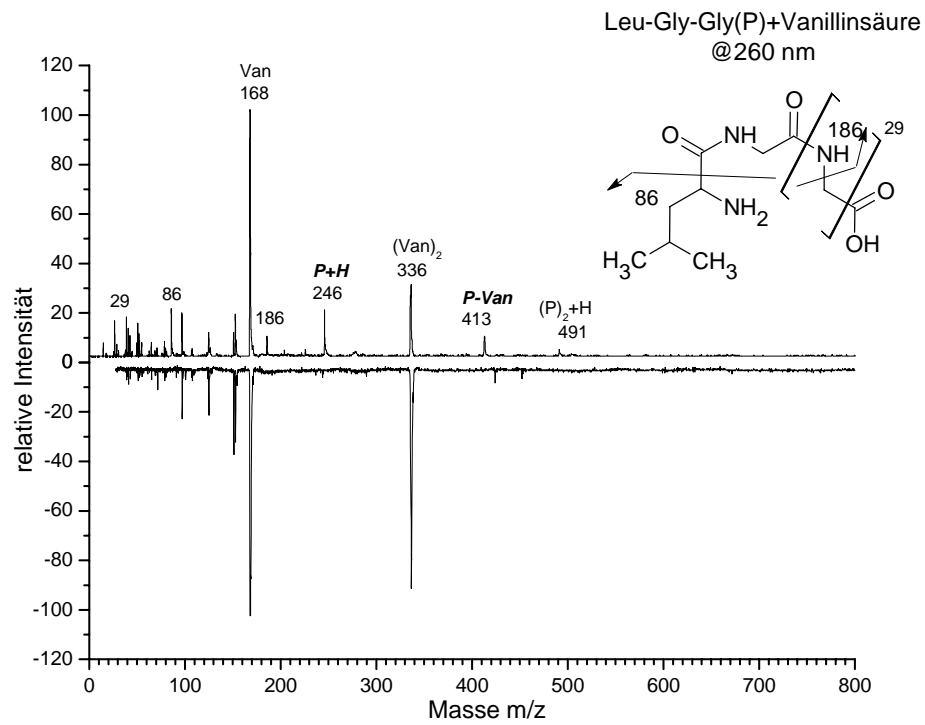


Abb. 5-16: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Gly-Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

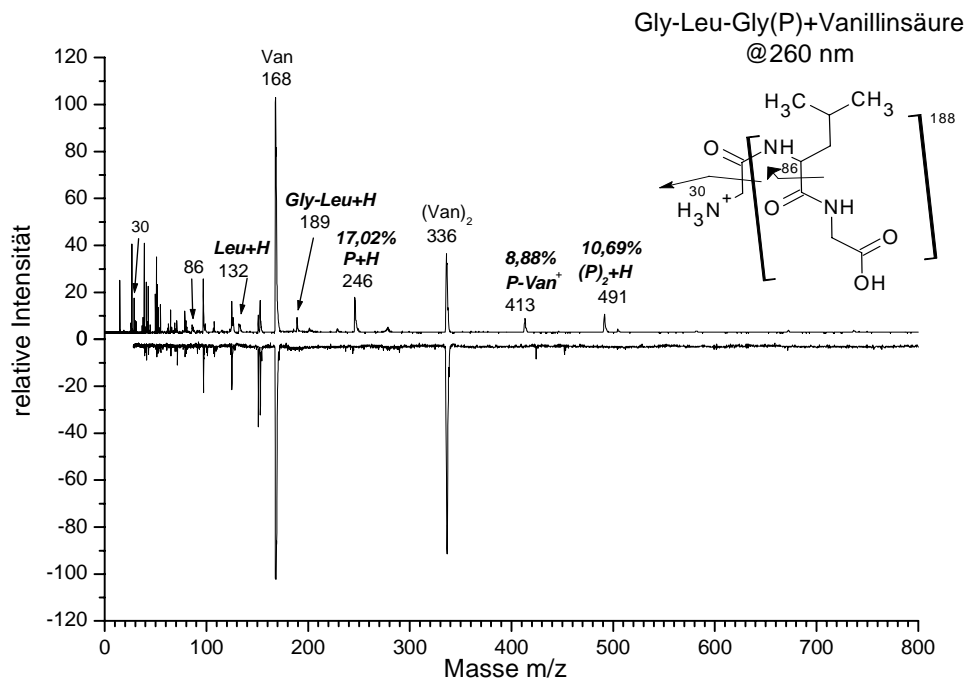


Abb. 5-17: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Leu-Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

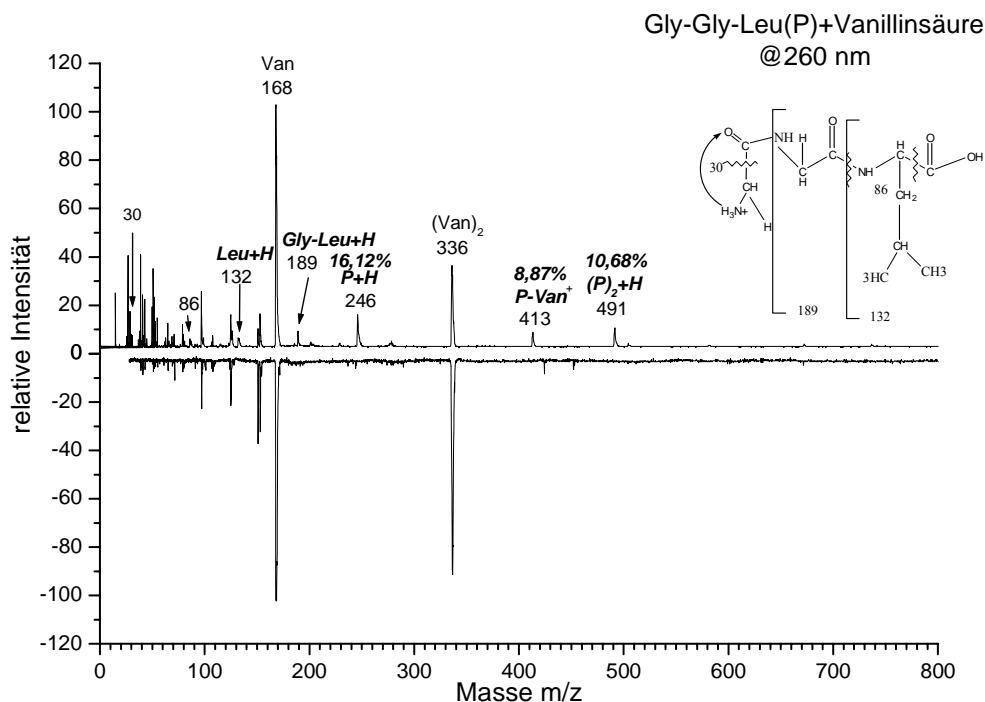


Abb. 5-18: REMUPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Gly-Leu und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$

Analog zu den Dipeptiden und den Tripeptiden Ala-Gly-Gly fragmentiert das Tripeptid Gly-Gly-Leu bevorzugt durch den Bruch der Peptidbindung. Daraus folgt, dass beim Tripeptid Gly-Gly-Leu die Signale der Fragmentionen mit  $m/z$  189 für Gly-Leu + H<sup>+</sup> und  $m/z$  132 für Leucin + H<sup>+</sup> auftreten. Gleichzeitig wird beim N-terminalen Glycin die Bildung vom Acyliumion  $m/z$  30 detektiert. Während das C-terminale Leucin unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> fragmentiert (decarboxyliert) und das Acylium von Leucin bildet.

Weitere Indizien für den Fragmentierungsmechanismus bietet das Tripeptid Leu-Gly-Gly. Hier beobachtet man das selten eintretende Z-Fragment bei  $m/z$  186. Ähnliches Fragmentierungsmuster auf der N-terminalen Seite bietet das Fragment A<sub>1</sub> bei  $m/z$  86. Das Signal bei  $m/z$  132 deutet auf die Spaltung des Leucins aus dem Tripeptid hin. Bei den Tripeptidserien Gly-Leu-Gly bemerkt man die typischen Fragmentierungsmuster (A, X und Y) für Tri-peptide.

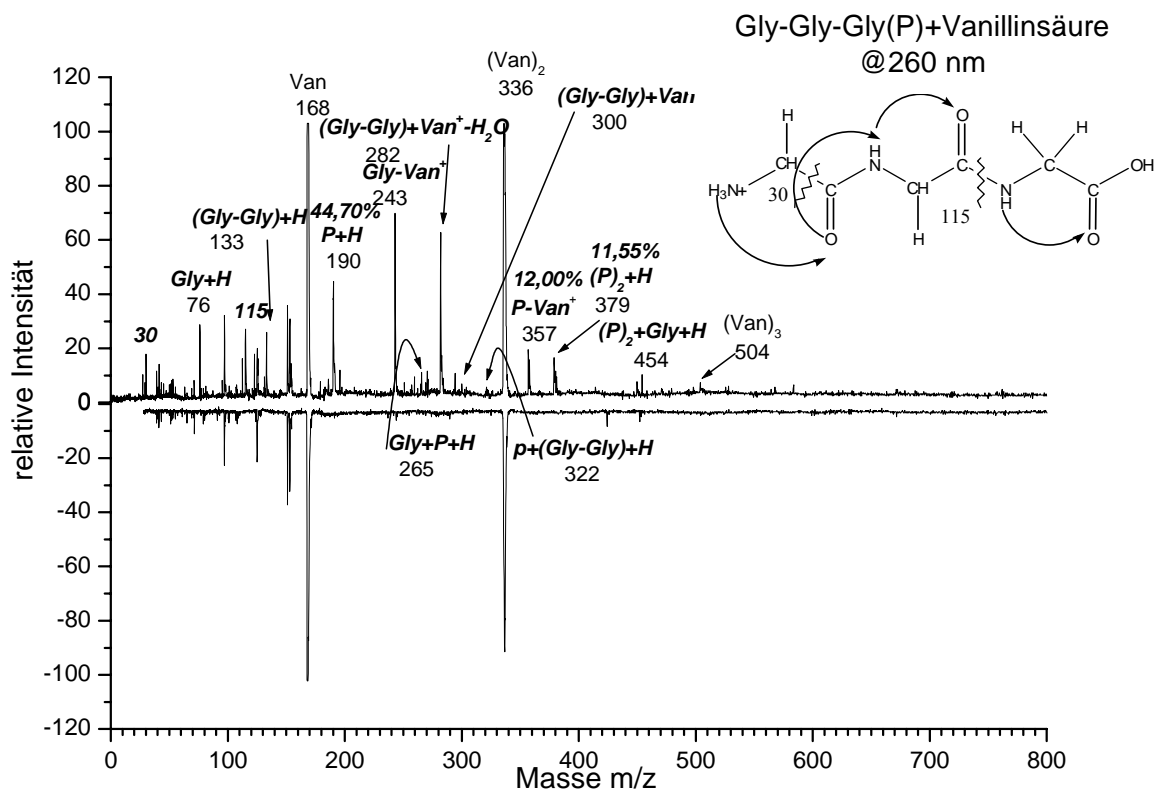


Abb. 5-19: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Gly-Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

Im Massenspektrum des Tripeptids Gly-Gly-Gly (Abbildung 5.19) trat ein bisher noch nicht beobachtetes Phänomen auf. Neben den bisher bekannten homogenen und heterogenen Clustern des Tripeptids wurden heterogene Cluster aus den einzelnen Fragmentionen des Tripeptids und/bzw. mit dem Matrixmolekül gefunden. Besonders auffällig ist das Signal bei  $m/z$  282, das durch die Abspaltung bei der Bildung eines Heterogenenclusters aus dem Fragmention Gly-Gly und Vanillinsäure entsteht. Dies weist auf die Bildung einer Amidbindung in der Gasphase hin.

Die detektierten heterogenen Cluster sind in Tabelle 5.4 mit den relativen Signalintensitäten aufgeführt.

Tabelle 5.4:

Heterogener Cluster	Masse (m/z)	relative Signalintensität
$(P)_2 + Gly + H^+$	454	10,30%
$P + (Gly-Gly)+H^+$	322	4,84%
$P + Gly + H^+$	265	6,94%
$Van^{++} + P$	357	19,52%
$Van^{++} + (Gly-Gly)$	300	6,94%
$Van^{++} + Gly$	243	69,87%

Insgesamt lassen die in den Clusterexperimenten von Tripeptiden mit Vanillinsäure erhaltenen Ergebnisse auf einen dissoziativen Protonentransfer zwischen Matrix und Analytmolekül schließen.

Im Rahmen dieser Experimente konnte im Gegensatz zu den Dipeptiden ein Zusammenhang zwischen den relativen Signalintensitäten der protonierten Tripeptide und den Protonenaffinitäten der N-terminalen Aminosäuren der Tripeptide gefunden werden. Eine Zunahme der Signalintensität des protonierten Tripeptids beim Übergang zu einem Tripeptid mit höherer Protonenaffinität der N-terminalen Aminosäure (siehe Abbildung 5-12a) konnte festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen deutlich, dass nahezu alle Tripeptide heterogene Cluster zwischen Tripeptid und Matrix bilden. Eine Ausnahme zeigt das Tripeptid Gly-Gly-Lys, bei dem weder ein heterogener noch homogener Cluster gemessen werden konnte.

Die Bildung homogener Cluster wurde nicht bei allen untersuchten Tripeptiden beobachtet. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Tripeptide in einer Konkurrenz Reaktion einen intramolekularen Ringschluss unter Ausbildung einer Peptidbindung eingehen, wobei Wasser frei gesetzt wird.

Abbildung 5.20 zeigt einen solchen postulierten intermolekularen Ringschluss anhand des Beispiels Ala-Gly-Gly.



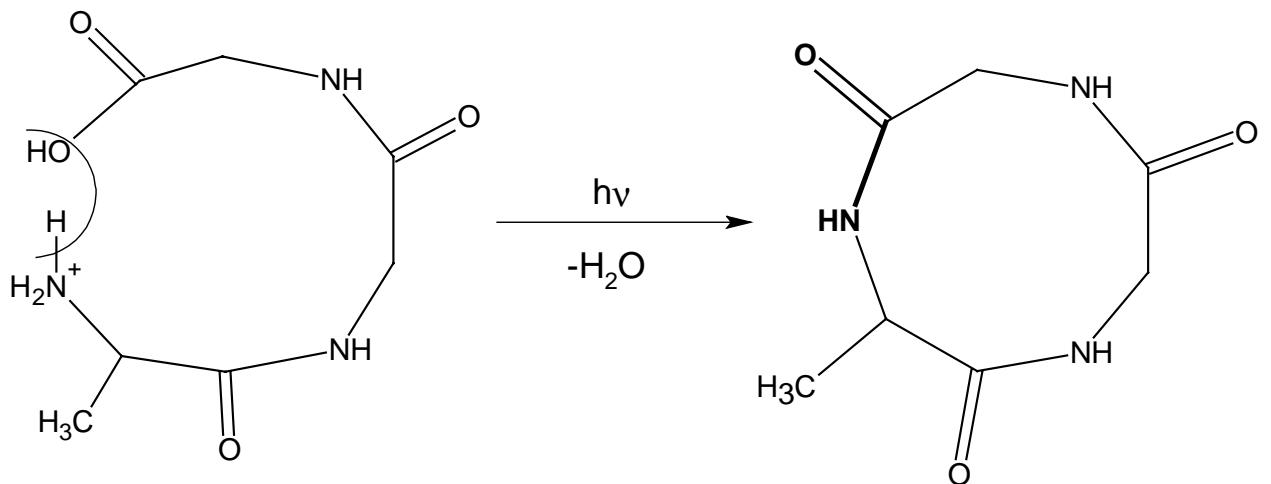


Abb. 5-20: Postulierter intramolekularer Ringschluss vom Tripeptid Ala-Gly-Gly

Deutlich wird dieses durch Betrachtung der Massenspektren (Abbildung 5.21) des Tripeptids Ala-Gly-Gly ( $m/z$  203) indem das Signal bei  $m/z$  185 die Abspaltung des Wassers darstellt. Das deutet auf intramolekularen Ringschluss des N- und C-terminalen Ende des Peptids hin.

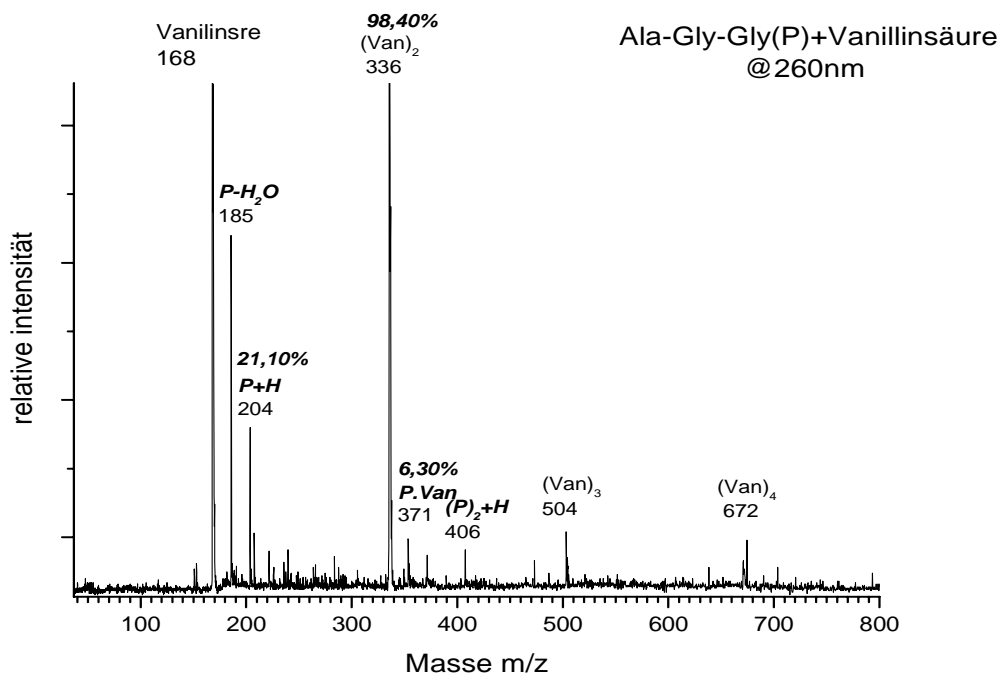


Abb. 5-21: REMPI-ReTOF-MS Spektren von Ala-Gly-Gly

Die Ergebnisse der aller durchgeführten Messungen mit Tripeptiden in bezug auf die relative Signalintensität, sind in Tabelle 5.5 aufgeführt.

Tabelle 5.5:

Tripeptid	P + H <sup>+</sup>	homogener Cluster	heterogener Cluster
Ala-Gly-Gly	42,00%	9,20%	26,55%
Gly-Ala-Gly	21,70%	-	9,80%
Gly-Gly-Ala	21,70%	5,84%	14,92%
Leu-Gly-Gly	23,50%	5,55%	9,91%
Gly-Leu-Gly	17,02%	10,69%	8,88%
Gly-Gly-Leu	16,21%	10,68%	8,87
Lys-Gly-Gly	42,45%	-	13,26%
Gly-Lys-Gly	37,40%	6,69%	5,63%
Gly-Gly-Lys	13,47%	-	-
Gly-Gly-Gly	44,70%	11,55%	12,00%

### 5.2.3 Cluster Massenspektren von Tripeptiden mit weiteren MALDI-Matrizes

Zusätzlich zu der bisher verwendeten Matrix (Vanillinsäure) wurden weitere Experimente mit 3,4-Dihydroxybenzoesäure (3,4-DHB) und mit den Zimtsäurederivaten Ferulasäure (Fer) und Sinapinsäure (Sin) durchgeführt.

Neben der Protonenaffinität der Peptide spielt auch die Acidität der Matrix eine bedeutende Rolle in den Protonierungsreaktionen für die Bildung protonierter Peptide. Es hat einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktionswärme. Dies steht in Einklang mit der energetischen Voraussetzung für einen dissoziativen Protonentransfer dPT.

Nur wenn die Protonenaffinität des betreffenden Peptides größer als die des entsprechenden Radikals [Matrix-H] der verwendeten Matrixverbindung ist, kann ein Protonentransfer im heterogenen Dimer stattfinden.

Je höher die Protonenaffinität des Peptides, (d.h. je größer die Unterschiede der Protonenaffinität von Peptid und Matrixradikal), desto energetisch günstiger ist die Reaktion und umso mehr protonierte Peptide können gebildet werden.

Um den Einfluss der angewendeten Matrixverbindungen auf die Bildung Homogener bzw. Heterogener-Cluster festzustellen, wurden weitere Experimente der Peptidserie Leu-Gly-Gly, Gly-leu-Gly und Gly-Gly-Leu mit anderen Matrixverbindungen (Benzosäurederivaten bzw. Zimtsäurederivaten) untersucht.

In den Abbildungen 5.22, 5.23 und 5.24 sind die entsprechenden Massenspektren mit 3,4-DHB als Matrix gezeigt.

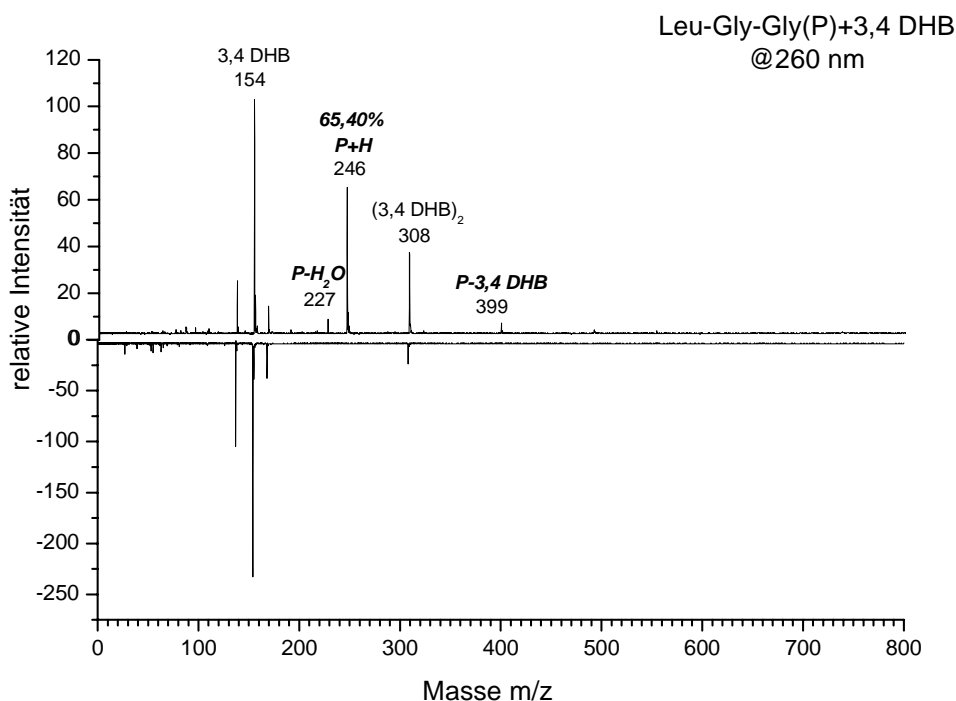


Abb. 5-22: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Gly-Gly und 3,4-DHB bei  $\lambda = 260$  nm

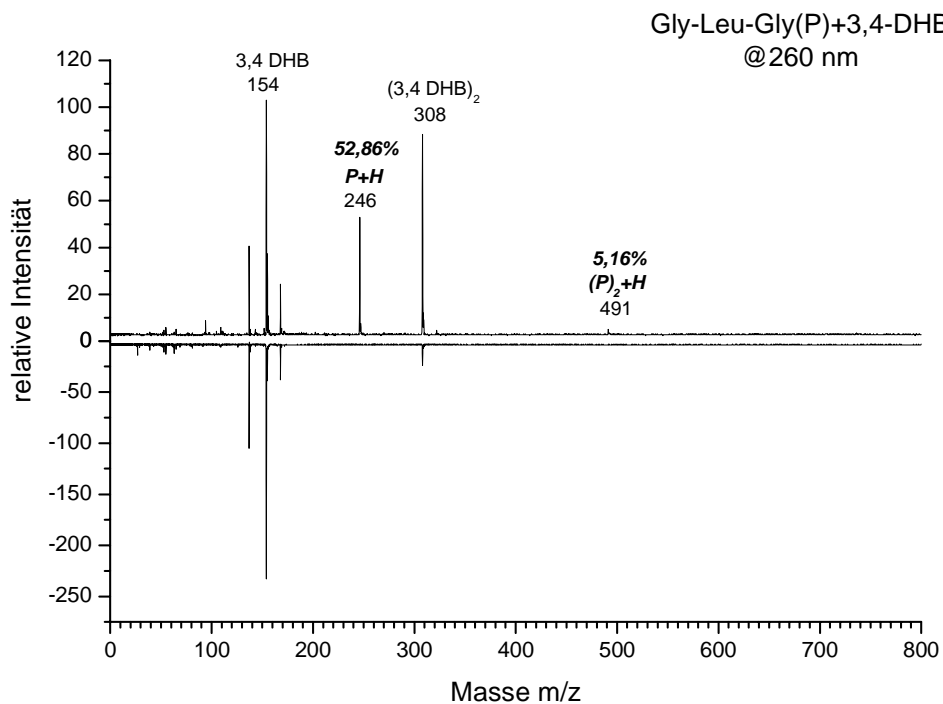


Abb. 5-23: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Leu-Gly und 3,4-DHB bei  $\lambda = 260$  nm

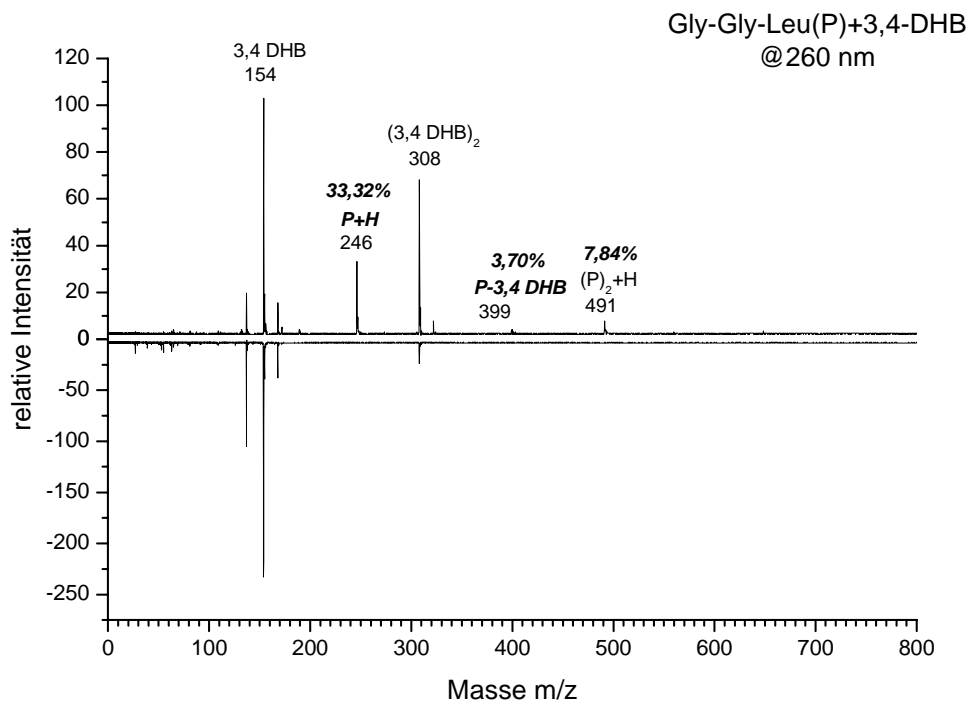


Abb. 5-24: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Gly-Leu und 3,4-DHB bei  $\lambda = 260$  nm

In den Experimenten mit 3,4-DHB wurden, analog zu den vorangegangenen Ergebnissen mit der Matrix Vanillinsäure, die Bildung von homogenen sowie heterogenen Clustern und protonierter Peptidmoleküle beobachtet. Auch hier ist erneut die Bedeutung der Protonenaffinität der N-terminalen Aminosäure des eingesetzten Peptids auf die relative Signalintensität des protonierten Peptids zu erkennen. Das resultiert in einer Zunahme der relativen Signalintensität des protonierten Peptids beim Übergang von Glycin zu Leucin als N-terminaler Rest.

Im Massenspektrum des Tripeptids Leu-Gly-Gly wurde die Bildung homogener Cluster nicht beobachtet. Außerdem erscheint ein Massensignal bei  $m/z$  227, was für eine Wasserabspaltung des Tripeptids spricht. Eine mögliche Erklärung wäre wie bereits in Kapitel 4.2.2 erwähnt, dass die Tripeptide in einer Konkurrenzreaktion einen intramolekularen Ringschluss unter Ausbildung einer Peptidbindung eingehen, wobei Wasser frei gesetzt wird.

Eine niedrige relative Signalintensität der heterogenen-Cluster, trotz eines extrem intensiven Signals des protonierten Peptids, weist auf nahezu vollständige Reaktion im Heterocluster gefolgt vom Zerfall des Clusterions hin, da (gemäß dem angenommenen Bildungsmechanismus des dPT) die protonierten Peptide aus den im Jet gebildeten heterogenen Dimeren im Anschluss die Ionisation gemäß dem angenommenen Bildungsmechanismus des dPT entstehen.

Im Falle des Tripeptids Gly-Leu-Gly konnten keine heterogene –Cluster detektiert werden. Zusätzlich konnten geringe Mengen des protonierten Peptid-Dimers nachgewiesen werden. Es kann also ein eindeutiger Einfluss der Protonenaffinität der N-terminalen Aminosäure des eingesetzten Peptids auf die Bildung heterogener Cluster festgestellt werden.

Entsprechende Ergebnisse wurden auch in den Experimenten mit der Derivat der Zimtsäure, der Ferulasäure erhalten. Die Abbildungen 5.25, 5.26 und 5.27 zeigen die Massenspektren der Peptidserie Leu-Gly-Gly, Gly-Leu-Gly und Gly-Gly-Leu mit Ferulasäure als Matrix.

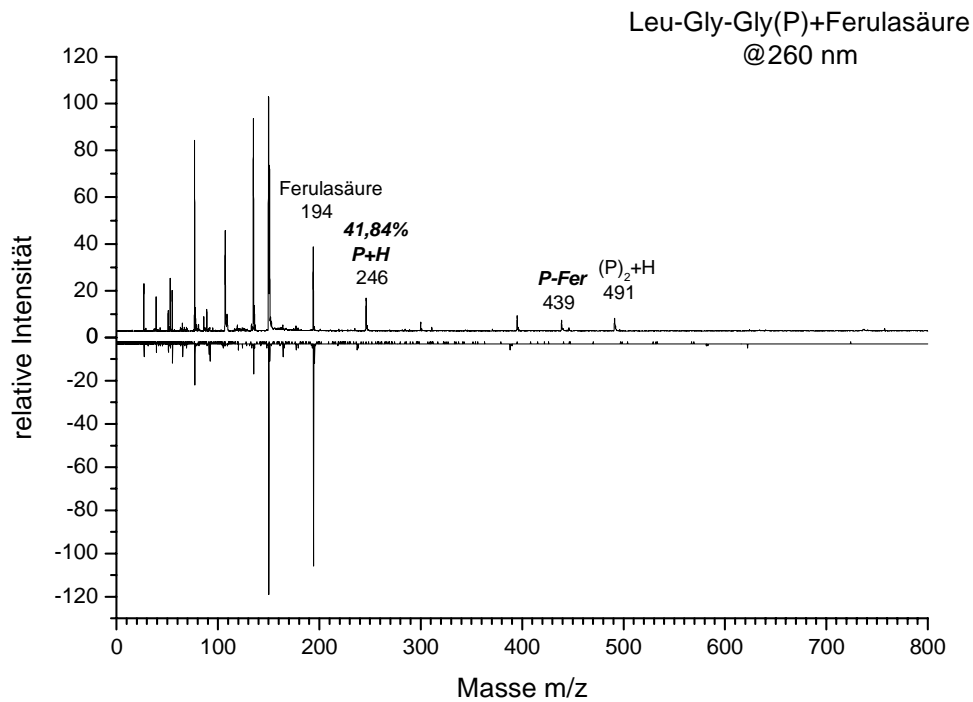


Abb. 5-25: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Gly-Gly und Ferulasäure bei  $\lambda = 260$  nm

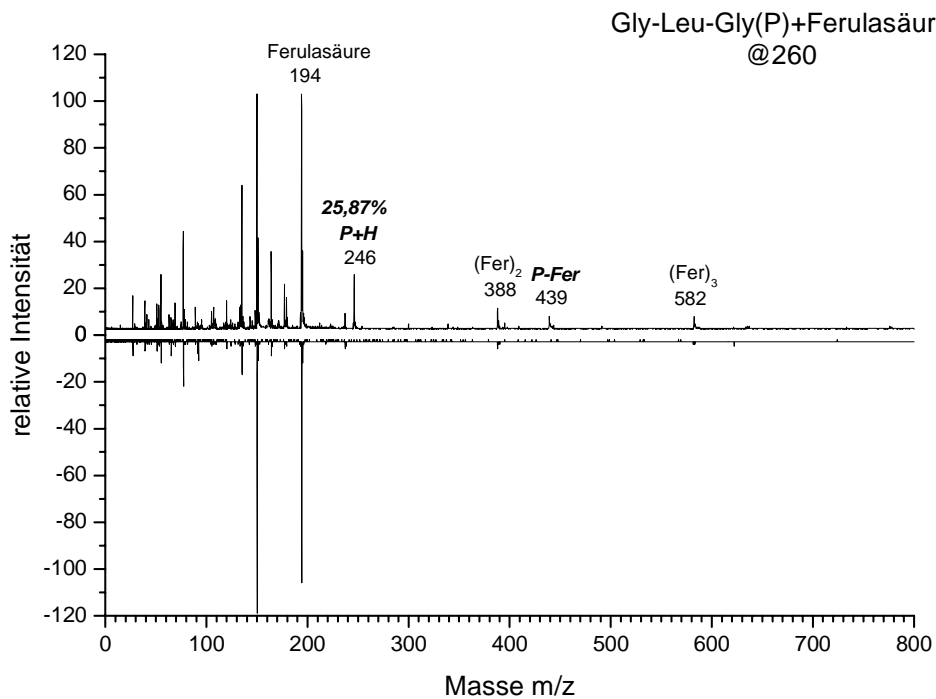


Abb. 5-26: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Leu-Gly und Ferulasäure bei  $\lambda = 260$  nm

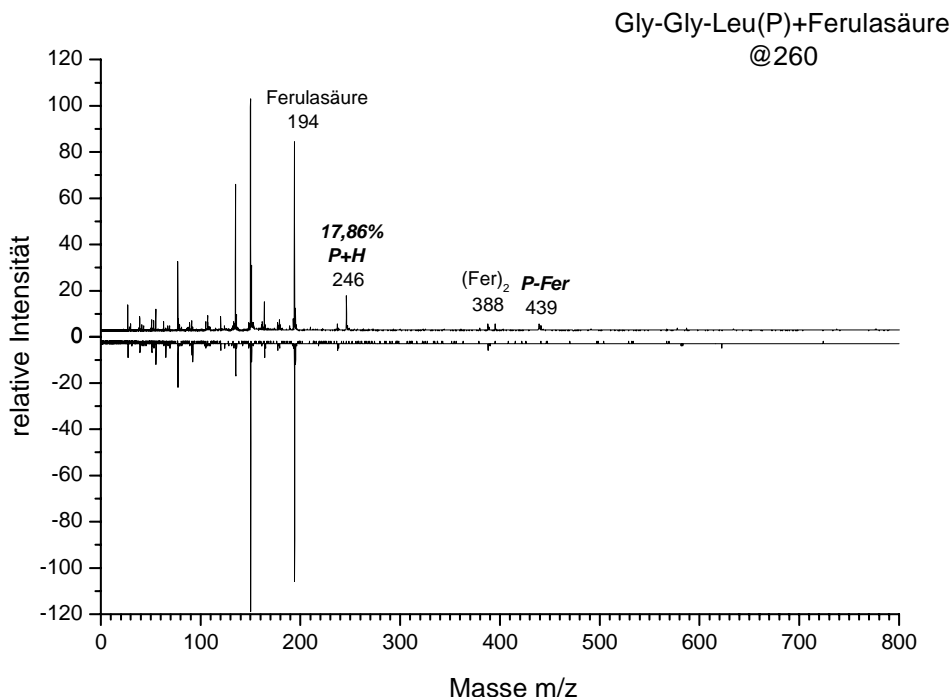


Abb. 5-27: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Gly-Leu und Ferulasäure bei  $\lambda = 260$  nm

In diesen ist ein dramatischer Rückgang der relativen Signalintensität des protonierten Peptids im Vergleich zu den entsprechenden Experimenten mit Sinapinsäure festzustellen.

Eine denkbare Erklärung wäre, dass das [Matrix -H]-Radikal der Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure) eine wesentlich niedrigere Protonenaffinität als das der Sinapinsäure besitzt, so dass die notwendige energetische Voraussetzung für einen dissoziativen Protontransfer (dPT)

$$PA(M-H) < PA(P)$$

nicht ganz erfüllt wird.

Trotz dieses Rückgangs der relativen Signalintensität des protonierten Peptids im Fall von Ferulasäure im Vergleich zu 3,4-DHB wurde eine Steigerung der relative Intensität dieses Signals mit Steigerung der Protonenaffinität der N-terminalen Aminosäure des angewendeten Peptids beobachtet. So wurden im Fall Leu-Gly-Gly 41,84% protoniertes Peptid detektiert, für Gly-Leu-Gly mit Glycin als N-terminalem Rest, der eine wesentlich

## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

geringere Protonen-Affinität als Leucin besitzt, ist 25,87% protoniertes Peptids gemessen. Das niedrigste Signal wurde bei Gly-Gly-Leu beobachtet, da es wurde nur 17,86% protoniertes Peptid.

Die Bildung der detektierten protonierten Peptide erfolgte also offensichtlich durch dPT in dem mit der Matrix gebildeten Heterodimer im Anschluss an die Multiphotonenionisation durch Protonentransfer vom Matrixradikalkation auf das Analytmolekül. Die Protonierung im wasserstoffbrückengebundenen Heterodimer erfolgt vermutlich bei den Tripeptiden im Gegensatz zu den Dipeptiden lokalisiert an der Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure des Peptids.

Auch in den Experimenten mit Ferulasäure konnte die Bildung heterogener Cluster bei allen Peptidserien beobachtet werden. Den Einfluss und die Bedeutung der Protonenaffinität der N-terminalen Aminosäure des eingesetzten Peptids wurde klar festgestellt, indem nur bei der Serie Leu-Gly-Gly ein protoniertes Dipeptid-Signal detektiert wurde.

Analogen Experimente wurden auch mit Sinapinsäure (3,5-Dimethoxyzimtsäure) als Matrixverbindung durchgeführt, um den Einfluss der eingesetzten Matrix zu untersuchen. Die Abbildungen 5.28, 5.29 und 5.30 zeigen repräsentativ die erhaltenen Massenspektren.

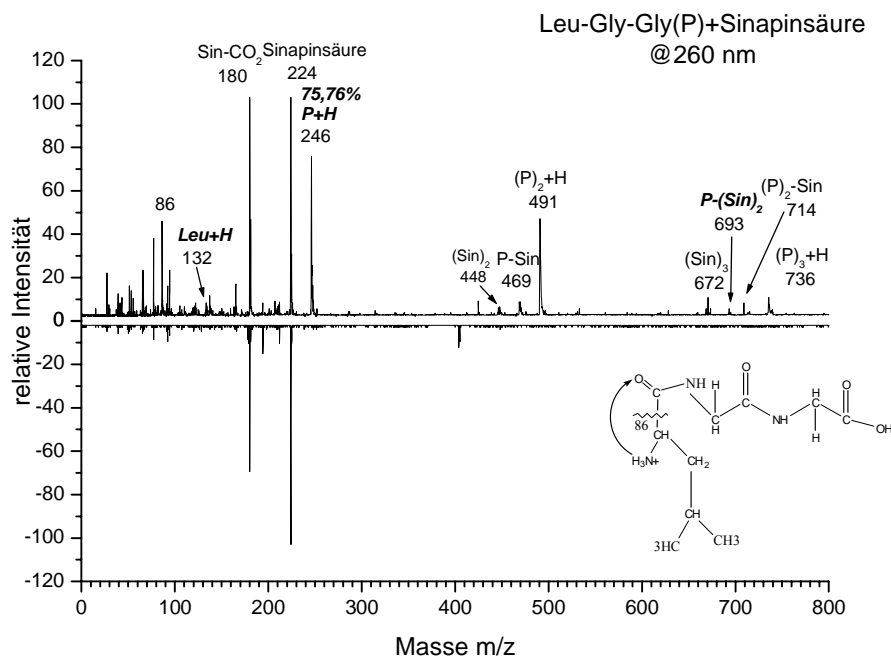


Abb. 5-28: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Gly-Gly und Sinapinsäure bei  $\lambda = 260$  nm



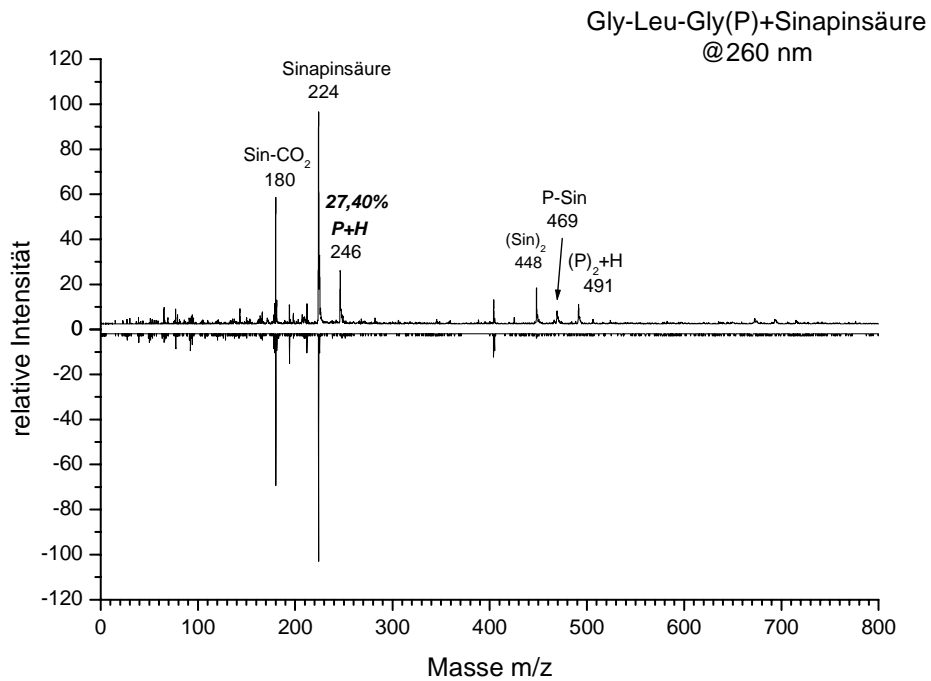


Abb. 5-29: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Leu- Gly und Sinapinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

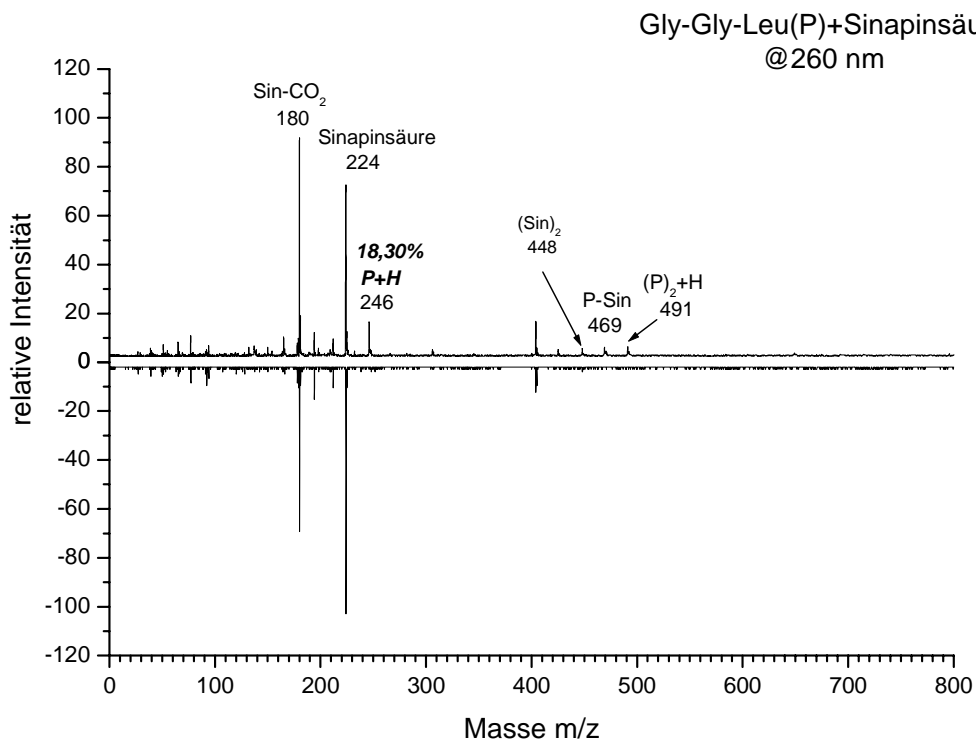


Abb. 5-30: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Gly-Gly-Leu und Sinapinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

Gegenüber den entsprechenden Experimenten mit Ferulasäure wurde eine wesentlich Steigerung in der relativen Signalintensität des protonierten Peptids beobachtet. Diese Steigerung beträgt im Fall von Leu-Gly-Gly mit Leu als N-terminalen Rest fast 35%. In den Massenspektren ist (wie bei den Tripeptiden bisher den Fall ist) eine kontinuierliche Zunahme der relativen Signalintensität des protonierten Peptids beim Übergang zu einem Peptid mit höherer Protonenaffinität der N-terminalen Aminosäure

Darüber hinaus trat im Massenspektrum des Tripeptids Leu-Gly-Gly ein bisher selten beobachtetes Phänomen auf. Neben der Bildung der bisher (1 zu 1) bekannten homogenen und heterogenen Clustern des Tripeptids wurden zusätzlich auch verschiedenen Homogener bzw. Heterogener-Trimer-Cluster detektiert. Dieses Phänomen wurde nicht im Fall der anderen beiden Tripeptide Gly-Leu-Gly und Gly-Gly-Leu mit Glycin als N-terminalen Rest, der wesentlich geringe Protonenaffinität als Leucin aufweist, beobachtet.

Ein relativ intensives Signal des protonierten Dipeptids in dem Spektrum von Leu-Gly-Gly bei  $m/z$  491, lässt sich durch den angenommenen dPT Mechanismus einfach erklären. Dieses entsteht durch Protonentransfer vom Matrixmolekül auf das Peptid-Dimer in dem entsprechenden heterogenen Trimer [Matrix-(Peptid)<sub>2</sub>], das ebenfalls in dem Spektrum bei  $m/z$  714 zu beobachten ist.

Da alle Versuchsreihen mit den Matrixverbindungen 3,4 DHB, Ferulasäure und Sinapinsäure unter analogen experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden, konnte ein Vergleich der jeweiligen Ergebnisse und darüber hinaus auch Annahmen hinsichtlich der Protonenaffinität der entsprechenden korrespondierenden Matrixradikale [Sin-H]<sup>•</sup> gemacht werden.

Die Ergebnisse der Messreihen mit Sinapinsäure zeigen, dass das betreffende Radikal der Sinapinsäure [Sin-H]<sup>•</sup> für *Leu-Gly-Gly* eine niedrigere Protonenaffinität als die Ferulasäure und 3,4 DHB besitzt, so dass die Reaktion in diesem Fall (gemäß der energetischen Voraussetzung der dPT) energetisch günstig ist.

Für die anderen Peptide (Gly-Leu-Gly und Gly-Gly-Leu) ist die Protonenaffinität des Matrix- Radikals von 3,4 DHB niedriger.

Die Gasphasen-Protonenaffinität von verschiedenen in der Maldi eingesetzten Matrices wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. In einem FT-ICR Massenspektrometer hat Zenobi<sup>95</sup> et al. die Natrium-Basizität von elf verschiedenen MALDI-Matrices gemessen. Dabei gab er die Natrium-Basizität der Matrices an, die ungefähr bei  $150\text{kJ Mol}^{-1}$  liegt. Die Matrix-Basizität sollte viel höher liegen, genauere Werte wurden nicht angegeben.

Ebenfalls wurden von Nelson et al.<sup>96</sup> und Burton et al. dies durch Reaktionen protonierte Matrixionen mit Referenzverbindungen bekannte Protonenaffinität ermittelt. Von Jørgensen et al.<sup>97</sup> wurde in einem Sektorfeld-Gerät mit Hilfe der kinetischen Methode die Gasphasen-Protonenaffinitäten für verschiedene MADI- Matrices untersucht. Dabei wurde das Verhältnis der Signalintensitäten doppelt und einfach protonierte Analytionen betrachtet.

Tabelle 5.6 stellt die Gasphasen-Protonenaffinität in kcal/mol für einige im Rahmen dieser Arbeit häufig eingesetzte Matrixverbindungen zusammen, die von den verschiedenen Arbeitsgruppen ermittelt wurden. Es ist jedoch zu beachten, dass für die Ermittlung dieser Werte eine Protonierung der Matrices vorausgesetzt. Der in dieser Arbeit angenommene Ionisations-Mechanismus, der dissoziative Protonentransfer dPT, impliziert aber die Protonierung des Analyten durch Molekülradikalkationen der Matrix.

Matrix	Zenobi	Nelson	Burton	Jørgensen	Grützmaker
3,4-DHB	----	----	----	----	$200.15 \pm 1.43$
Ferulasäure	----	----	$183 \pm 2.0$	210	----
Sinapinsäure	$213.8 \pm 3.2$	$210 \pm 2.0$	$204 \pm 4.0$	212	----
2,5-DHB	$204.2 \pm 3.5$	202.90	$204 \pm 4.00$	----	----

Tabelle 5.6: Die von verschiedenen Arbeitsgruppen ermittelte Gasphasen-Protonenaffinität der untersuchten MALDI-Matrixverbindungen in [kcal/mol].

Wie die Tabelle zeigt, wurden keine befriedigenden vollständigen Werte ermittelt. Die einzige für 3,4 DHB ermittelte Wert von Grützmaker wurde durch Messungen der Protonenaffinität entsprechender Matrixradikale durchgeführt, und steht somit in Einklang mit der in Rahmen dieser Arbeit beobachteten sehr hohen relativen Signalintensität protonierter Tripeptide bei Verwendung dieser Matrixverbindung.

### 5.2.4 Cluster Massenspektren von Tetrapeptiden mit MALDI-Matrize

Nachdem im Fall der Dipeptide und der Tripeptide gezeigt werden konnte, dass die Bildung heterogener Cluster mit den typischen in der MALDI eingesetzten Matrixverbindungen bei der Codesorption in einem Jet stattfindet, und in Abhängigkeit von der Protonenaffinität des Peptids sowie der Matrixverbindung, die Bildung protonierter Peptidmoleküle durch dissoziativen Protonentransfer (dPT) erfolgt, wurden zusätzliche Experimente mit den nächstgrößeren Peptidmolekülen, den Tetrapeptiden durchgeführt, um Hinweise darauf zu erhalten, wie sich die zunehmende Größe des Clusters auswirkt.

Die Abbildungen 5.31, 5.32, 5.33 und 5.34 zeigen repräsentativ die erhaltenen Massenspektren für den untersuchten Tetrapeptiden Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Leu-Gly-Gly, Gly-Leu-Gly-Leu und Gly-Leu-Leu-Gly mit Vanillinsäure als Matrix.

## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

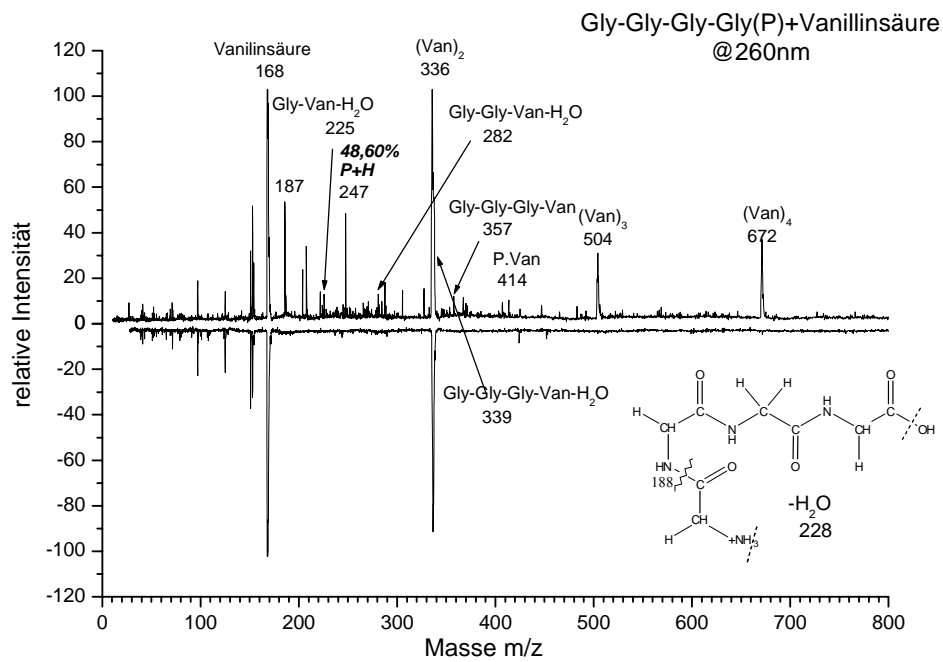


Abb. 5-31: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Gly-Gly-Gly-Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

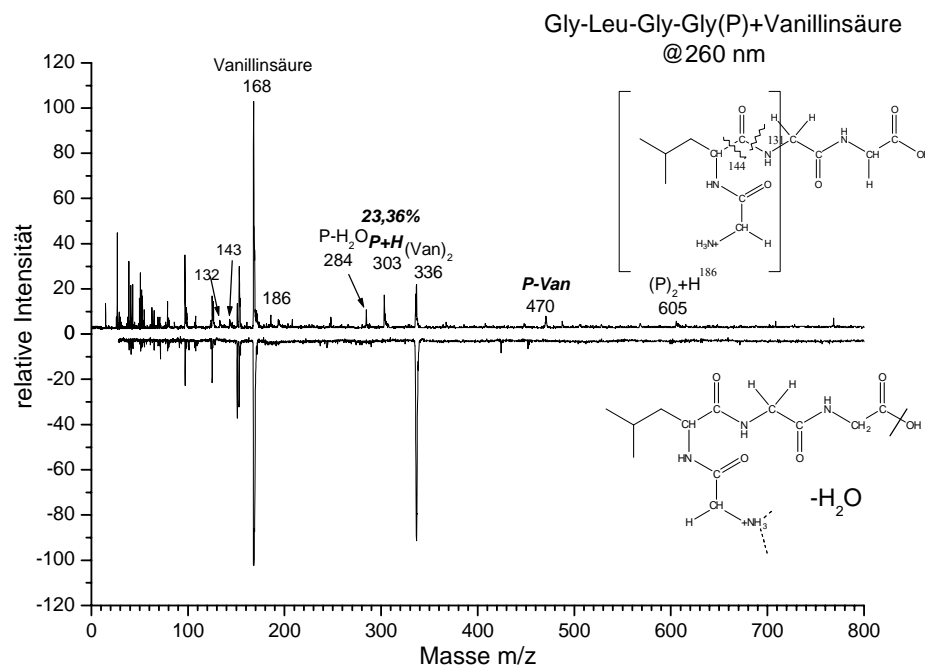


Abb. 5-32: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Gly-Leu-Gly-Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

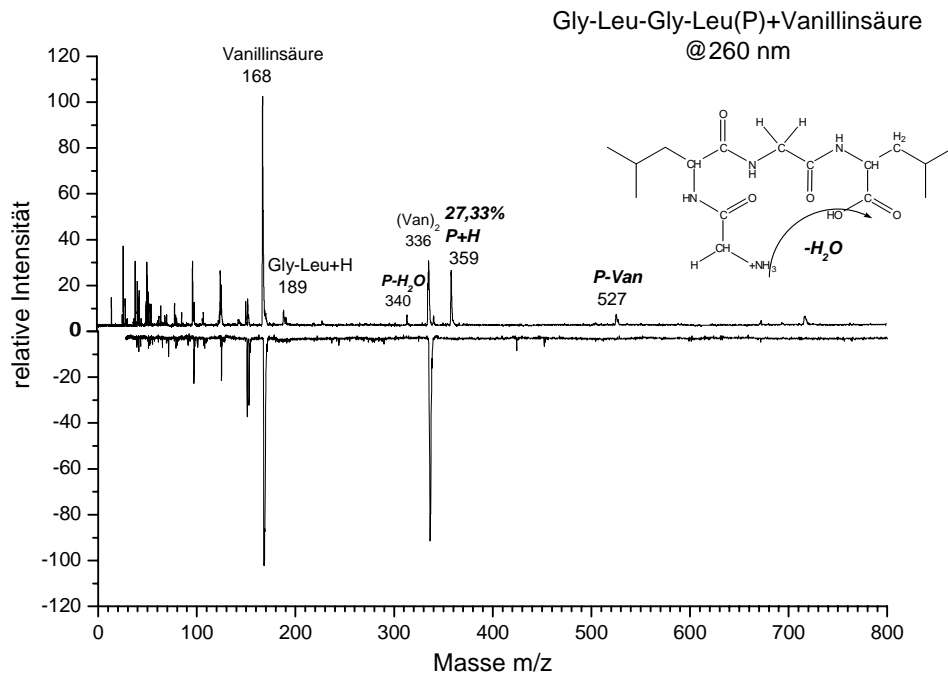


Abb. 5-33: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Gly-Leu-Gly-Leu und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

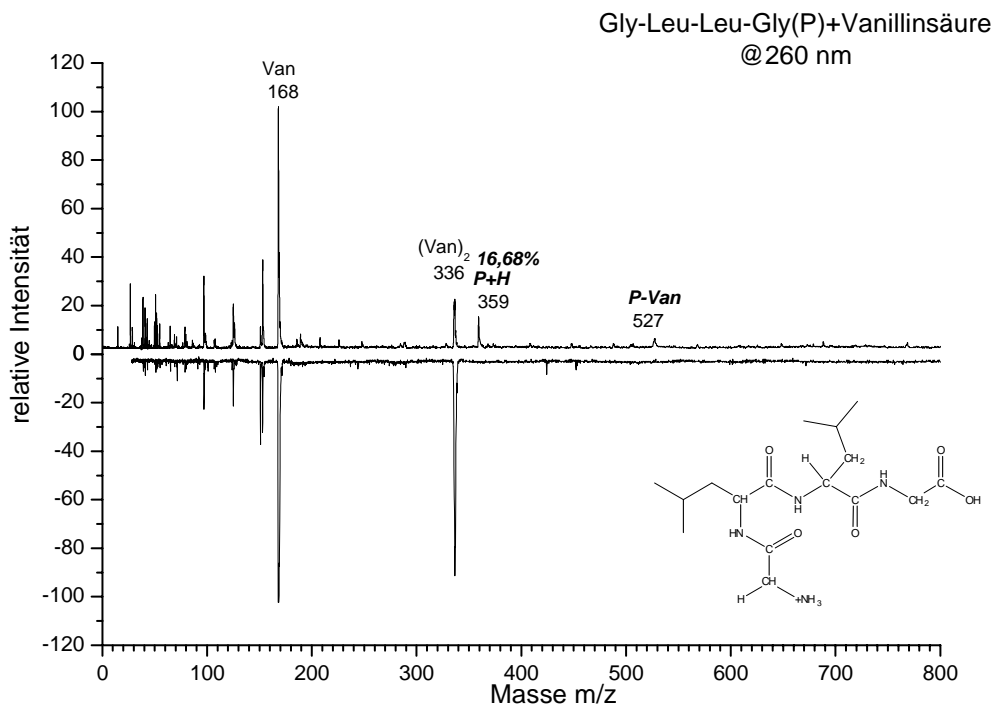


Abb. 5-34: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Gly-Leu-Leu-Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

Auch in den Experimenten mit den Tetrapeptidmolekülen konnte die Bildung homogener bzw. heterogener Dimere und protonierter Peptidmoleküle beobachtet werden. Tabelle 5.7 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Messungen von Tetrapeptiden mit Vanillinsäure als Matrix. Die relative Signalintensität des erhaltenen protonierten Tetrapeptid wurde angegeben.

Tabelle 5.7

Tetrapeptid	P+H
Gly-Gly-Gly-Gly	48.6%
Gly-Leu-Gly-Gly	23.36%
Gly-Leu-Gly-Leu	27.33%
Gly-Leu-Leu-Gly	16.68%
Lys-Gly-Gly-Lys	17.40%

Im Massenspektrum des Tetrapeptids Gly-Gly-Gly-Gly trat analog wie bei dem entsprechenden Tripeptid Gly-Gly-Gly das vorher in Tabelle 5.4 beobachtete Phänomen auf. Neben den bisher bekannten homogenen und heterogenen Clustern des Tetrapeptids wurden heterogene Cluster aus den einzelnen Fragmentionen des Tetrapeptids und/bzw. mit dem Matrixmolekül gefunden.

Besonders auffällig sind die Signale bei  $m/z$  339, 282 und 225, die durch die Bildung eines Heterogenenclusters aus dem Fragmention Gly-Gly-Gly, Gly-Gly bzw. Gly und Vanillinsäure entstehen und dabei wird Wasser freigesetzt. Dies weist auf die Bildung einer Amidbindung in der Gasphase hin. Die Amidbindung wird ausführlich in Kapitel 5 diskutiert.

Die detektierten heterogenen Cluster sind in Tabelle 5.8 mit ihrer entsprechenden Masse aufgeführt.

Tabelle 5.8

Heterogener Cluster	Masse (m/z)
$\text{Van}^{++} + \text{P}$	414
$\text{Van}^{++} + (\text{Gly-Gly-Gly})$	357
$[\text{Van}^{++} + (\text{Gly-Gly-Gly})] - \text{H}_2\text{O}$	339
$[\text{Van}^{++} + (\text{Gly-Gly})] - \text{H}_2\text{O}$	282
$[\text{Van}^{++} + \text{Gly}] - \text{H}_2\text{O}$	225

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass die relative Signalintensität des protonierten Peptids mit wachsender Größe zunimmt. Das lässt sich aus dem Vergleich zwischen den erhaltenen Ergebnissen von Tripeptiden und Tetrapeptiden erkennen.

Bei einer Steigerung der Peptidsequenz um nur eine Aminosäure wird die relative Signalintensität des protonierten Peptids erhöht. Die folgende Tabelle 5.9 ist eine Aufstellung dieser Werte für das Tripeptid im Vergleich zum Tetrapeptid.

Tabelle 5.9

Tripeptid	P+H	Tetrapeptid	P+H
Gly-Gly-Gly	44.70%	Gly-Gly-Gly-Gly	48.60%
Gly-Leu-Gly	17.47%	Gly-Leu-Gly-Gly	23.36%
Gly-Leu-Gly	17.47%	Gly-Leu-Gly-Leu	27.33%

Die Ergebnisse der bisher durchgeführten Tetrapeptid Experimente legen den Schluss nahe, dass die relative Signalintensität des protonierten Peptides mit wachsender Größe zunimmt. Diese Steigerung wurde aber nur bei Hinzufügung von Aminosäuren kleiner oder mittlerer Größen beobachtet.



## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

Bei der Addition von großen Aminosäuren wie z.B. Lysin (Lys) oder Arginin (Arg) trat das oben beschriebene Phänomen hingegen nicht auf. Abbildung 5.34a zeigt das erhaltene Massenspektrum des Tetrapeptids Lys-Gly-Gly-Lys mit Vanillinsäure als Matrix.

Dabei wird deutlich, dass die relative Signalintensität des protonierten Peptids im Vergleich zum entsprechenden Tripeptid Lys-Gly-Gly stark absinkt. Tabelle 5.9a gibt wieder eine Aufstellung dieser Werte für das Tripeptid im Vergleich zum Tetrapeptid an.

Tabelle 5.9a

Tripeptid	P+H	Tetrapeptid	P+H
Lys-Gly-Gly	42.45%	Lys-Gly-Gly-Lys	17.40%

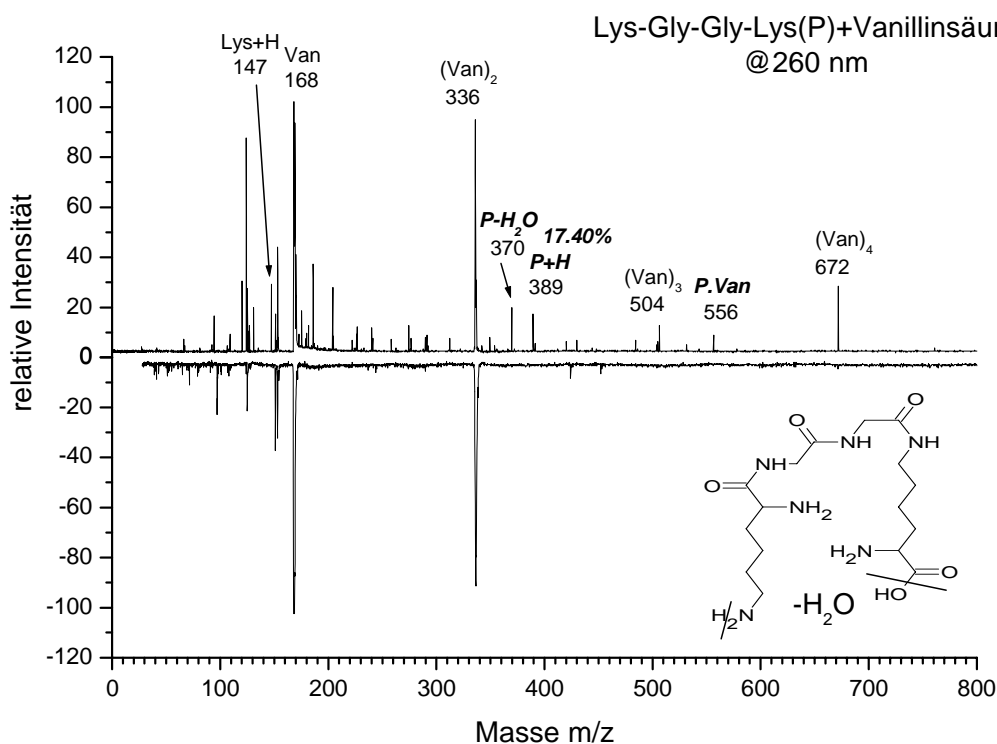


Abb. 5-34 a: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Lys-Gly-Gly-Lys und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

Die Bildung homogener Cluster wurde nicht beobachtet. Eine Erklärung ist, dass die Tetrapeptide in einer Konkurrenzreaktion zu einem intramolekularen Ringschluss zwischen dem N- und C-terminalen Ende des Peptides stehen, unter Ausbildung einer Peptidbindung,

## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

bei der Wasser frei gesetzt wird. Das Signal bei  $m/z$  370 zeigt deutlich diese Wasserabspaltung.

Um den Einfluss der Größe des eingesetzten Peptids auf die Clusterbildung zu studieren, wurde in einem zweiten Experiment das größere Tetrapeptid Lys-Arg-Ser-Arg, welches die größeren Aminosäuren (Lys,Arg) enthält, untersucht. Als Matrix wurde Vanillinsäure verwendet. Die Bildung sowohl heterogener Cluster aus Matrix-und Analytmolekül als auch homogener Cluster aus Analytmolekülen wurde dabei nicht beobachtet. Eine mögliche Erklärung wäre, dass aufgrund des sterischen Effekts des Peptides die Ausbildung wasserstoffbrückengebundener Dimere über die freie  $\text{NH}_2$ -Gruppe der aminoterminalen Aminosäure nicht vollständig erfolgt, obwohl Lysin als N-terminale Aminosäure mit die höchste Protonenaffinität besitzt. Abbildung 5.34b zeigt das erhaltene Massenspektrum.

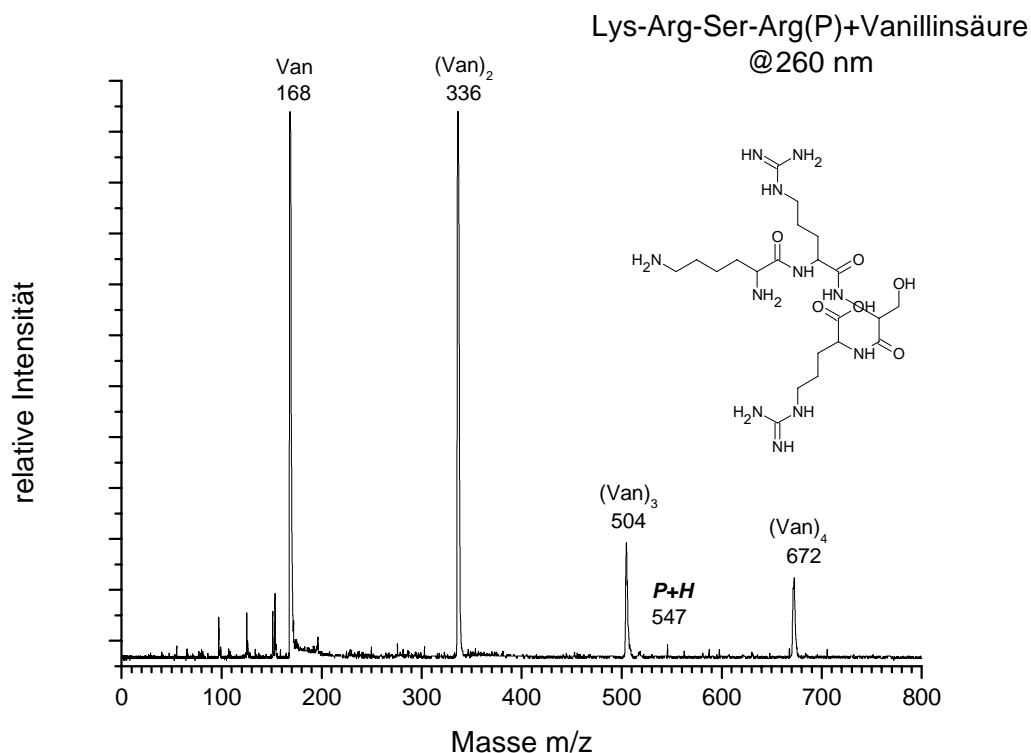


Abb. 5-34 b: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Lys-Arg-Ser-Arg und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

Wie die Abbildung zeigt, wurde die Bildung des protonierten Tetrapeptides bei  $m/z$  547 mit sehr geringer relativer Intensität detektiert. Die direkte Bildung dieses protonierten Analytmoleküls durch Photoionisation ist nicht möglich, da das Tetrapeptid keine aromatische Aminosäuren besitzt, die die Absorption des Laserlicht im untersuchten Wellenlängenbereich ermöglicht. Die Entstehung des protonierten Peptides aus den im Jet gebildeten heterogenen Dimeren im Anschluss an die Ionisation wurde aufgrund des sterischen Effekts gestört.

Ein Wasserabspaltung Signal durch einen intramolekularen Ringschluss zwischen des N- und C-terminalen Ende des Peptides unter Ausbildung einer Peptidbindung wie das üblich bei bisherigen untersuchten Tetrapeptide wurde nicht beobachtet, was wieder auf des sterischen Effekt des eingesetzten Peptides zurückzuführen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit wachsender Größe der Peptidsequenz sowohl die relative Signalintensität des protonierten Peptids als auch den intramolekularen Ringschluss des Peptids unter Freisetzung von Wasser zunimmt, soweit dieser Peptidsequenz kleinere bzw nicht sterisch zu anspruchsvolle Aminosäuren verfügt.

### 5.3 Untersuchungen zur Erklärung des Mechanismus des dissoziativen Protonentransfers (dPT).

Der im Rahmen dieser Arbeit postulierten Mechanismus des dissoziativen Protonentransfers,

der die Bildung protonierter Analytmoleküle voraussetzt (wie vorher in Kapitel 5.2 erwähnt), ist eine Intracluster Protonentransferreaktion in den heterogenen Dimeren, die im Anschluss an die Ionisation stattfindet, d.h. im Ion des heterogenen Dimers erfolgt ein Protonentransfer vom Radikalkation der Matrixmoleküle auf das Analytmolekül. Anschließend zerfällt das Clusterion unter Bildung des protonierten Analytmoleküls und des entsprechenden Matrix-Radikals, d.h. das Matrixradikalkation fungiert als Säure und überträgt ein Proton auf das neutrale Analytmolekül.

Es muss aber betont werden, dass eine direkte Ionisation des freien Analytmoleküls unter den eingesetzten Ionisationsbedingungen ( $\lambda = 260$  nm) nicht möglich ist, da es über kein entsprechendes Chromophor verfügt und daher keine Lichtabsorption im untersuchten Wellenlängenbereich zeigt. Diese experimentellen Gegebenheiten wurden mit Absicht ausgewählt.

Die im Rahmen dieser Arbeit häufig eingesetzten Matrixverbindungen sind Derivate der Benzoesäure bzw. Zimtsäure, die folgende Charakteristika haben

- Chromophores System (Aromat) zur Absorption der Laserstrahlung.
- Säure-, Alkohol oder Methoxygruppen als Protonendonator, somit verfügen sie über mehrere funktionelle Gruppen, welche im Falle des dissoziativen Protonentransfers dPT ein Proton übertragen könnten.

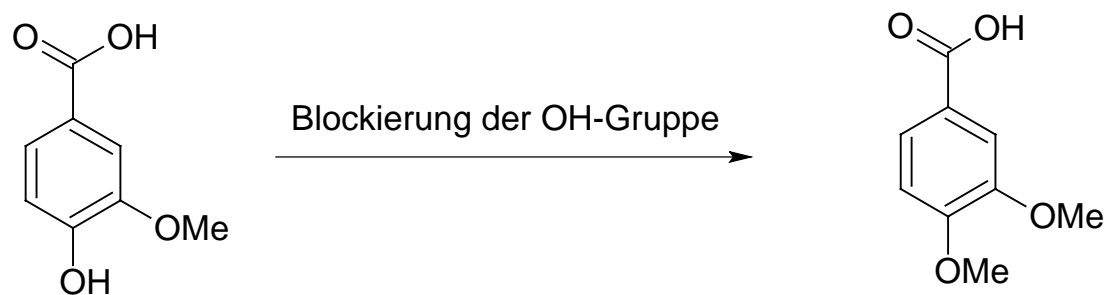
Die Annahme, dass die in MALDI eingesetzten Matrices über eine Säuregruppe verfügen müssen, wurde von Russel et al.<sup>99</sup> widersprochen, indem er auch Sinapinsäuremethylester als Matrix benutzt hat und durch die Untersuchung von Protonentransfer-Reaktionen zwischen elektronisch angeregten Matrixmolekülen und Analytmolekülen im Grundzustand.

Er kam zu dem Ergebnis, dass die am besten geeigneten MALDI-Matrizes Verbindungen sein sollten, die starke Säuren im angeregten Zustand sind, wie z.B. Phenole oder aromatische Amine<sup>137,138</sup>. Außerdem wurden MALDI-Spektren für z.B. Nitrobenzylalkohol, Nitrophenol und Thymin<sup>94,95,100</sup>, die keine Carboxylgruppe besitzen erhalten, aufgenommen.

In diesem Arbeitskreis<sup>139</sup> wurden theoretische Berechnungen zur Reaktionsenthalpie der Protonierung eines Peptids durch das Radikalkation verschiedener DHB-Matrix Isomere durchgeführt. Aus ihnen ging hervor, dass für alle Radikalkationen die Hydroxylgruppen acider als die Carboxylgruppen sind. Der Ursprung des Protons in dem Protonentransferprozess sollte also die Hydroxylgruppe und nicht die Carboxylgruppe sind.

### 5.3.1 Experimente mit derivatisierten Matrizes: selektive Blockierung des hydroxylischen Protons

Weitere zusätzliche Experimente zur Clusterbildung mit Peptide und derivatisierten Matrixsubstanzen wurden deshalb durchgeführt, um Hinweise darauf zu erhalten, welches Proton der Matrix (das acide Carboxylproton, das hydroxylische Proton oder wie von Allison<sup>140</sup> vorgeschlagen, ein Proton der Methoxygruppe) beim dissoziativen Protonentransfer übertragen wird. In diesen Experimenten wurden gezielt die Carboxylgruppen bzw. die Hydroxylgruppen der Matrix durch Veresterung bzw. Veretherung blockiert.



Vanillinsäure

3,4-Dimethoxybenzosäure

**Abb. 5-35: Schematische Darstellung der Blockierung der Hydroxylgruppe der Vanillinsäure**

Abbildung 5.35 zeigt die schematische Darstellung der Blockierung der Vanillinsäure durch Veretherung der Hydroxylgruppe in der 4. Position, dadurch entsteht die 3,4-Dimethoxybenzoesäure(DMB). Wie aus ihrer Struktur zu erkennen ist, ist das acidische Proton der Säuregruppe frei und steht damit als einziges übertragbares Proton auf das Analytmolekül zur Verfügung.

Abbildungen 5.36 und 5.37 zeigen deutlich den Einfluß dieser Blockierung auf die Bildung von homogenen sowie heterogenen Clustern und protonierten Peptidmolekülen. In Abbildung 5.36 ist das Massenspektrum von dem Dipeptid Gly-Ala mit der Vanillinsäure dargestellt, im Vergleich dazu zeigt die Abbildung 5.37 das Massenspektrum von dem gleichen Dipeptid mit dem Vanillinsäurederivat ,(3,4-Dimethoxybenzoesäure), indem das Proton die Hydroxylgruppe durch Veretherung blockiert.

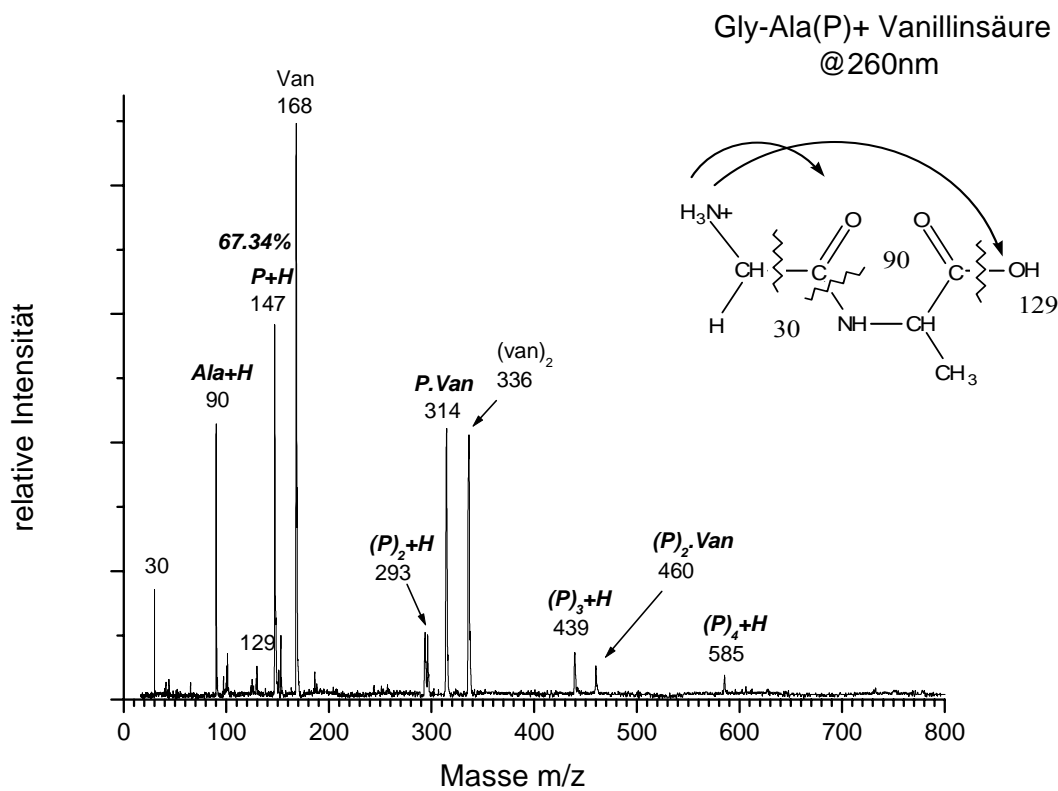
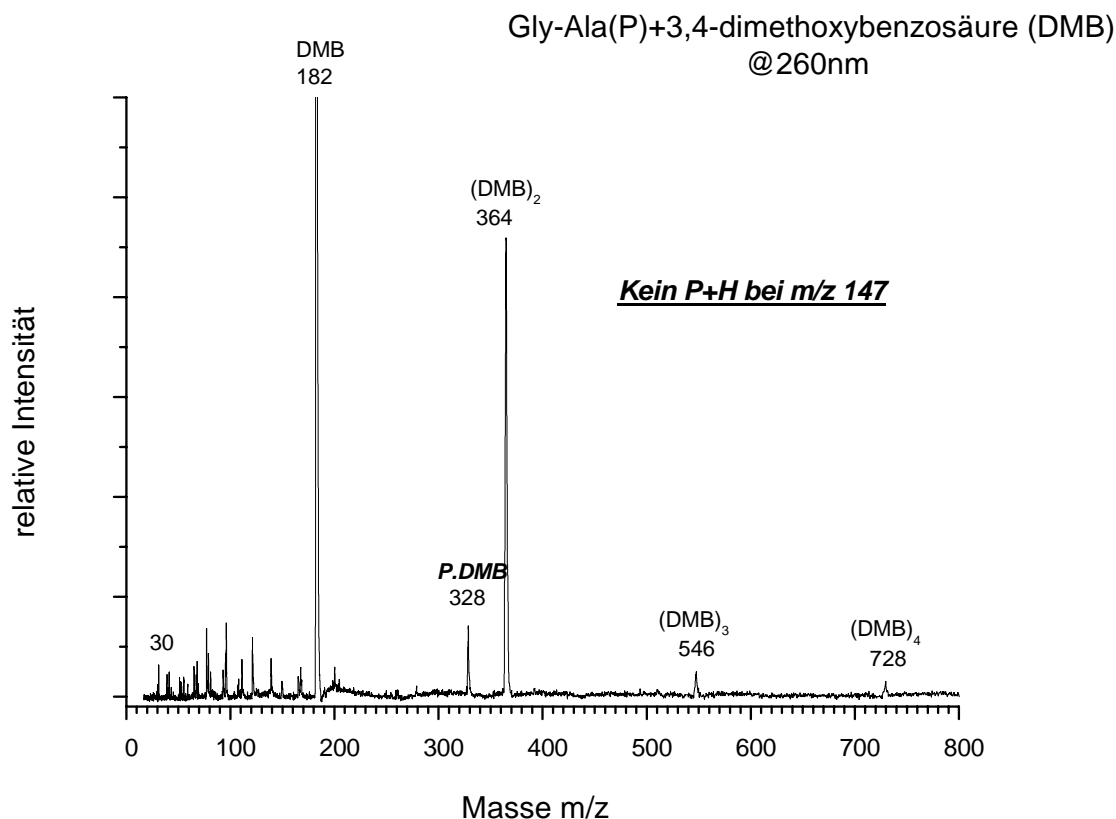
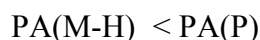


Abb. 5-36: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Ala und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$



**Abb. 5-37: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Ala und Dimethoxybenzoesäuremethylester (DMB) bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$**

In den beiden Spektren wurde die Bildung heterogener Cluster beobachtet. Jedoch weisen sie im Falle des Dipeptids mit 3,4-Dimethoxybenzoesäure (DMB) sehr viel geringere relative Signalintensität auf als in den entsprechenden Experimenten mit der Vanillinsäure. Eine denkbare Erklärung wäre, dass das [Matrix-H]-Radikal der 3,4-Dimethoxybenzoesäure (DMB) eine wesentlich höhere Protonenaffinität als das der Vanillinsäure besitzt, so dass die notwendige Voraussetzung (unter Vernachlässigung der Unterschiede der Bindungsdissoziationsenergien) für den dissoziativen Protonentransfer (dPT):



nicht mehr erfüllt wird, d.h die Reaktion wird energetisch weniger günstig.

Die Bildung von protonierten homogenen Analytmolekül-Cluster wurde im Fall des Dipeptids mit 3,4-Dimethoxybenzoesäure (DMB) nicht beobachtet, während im Falle der Vanillinsäure höhere protonierte homogene Analytmolekül-Cluster gebildet wurden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die homogenen Analytmolekül-Cluster über Wasserstoffbrückenbindungen erfolgen und zwar offenbar zum größten Teil über die Hydroxyl- Position.

Zudem konnte *kein protoniertes Dipeptids* im Fall des Dipeptid mit 3,4 Dimethoxybenzoesäure (DMB) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde ein sehr intensives Signal des protoniertes Dipeptids (67.34%) mit der Vanillinsäure detektiert. Der Grund ist, dass die Ausbildung H-Brücken-gebundener Heterocluster jetzt nur noch über die Carboxylgruppe möglich ist. Das carboxylische Proton wird aber offensichtlich nicht auf das Peptid übertragen.

Die deutlich geringeren relativen Signalintensität des heterogenen Clusters und die Nichtnachweisbarkeit von protoniertem Peptids im Fall des Dipeptid mit 3,4-Dimethoxybenzoesäure (DMB) sind eine Folge der erheblich geringeren gebildeten Mengen des heterogenen Clusters während des dissoziativen Protonentransfer-Prozess. Die Blockierung der Hydroxylgruppe von Vanillinsäure hat also einen großen Einfluss auf die Bildung heterogener Cluster zwischen Matrix und Peptid und somit auf die Bildung des protonierten Analytmoleküls.

Auf der Basis dieser Ergebnisse erfolgt also die Intracluster Protonentübertragung im dissoziativen Protonentransfer auf den Analyten ausschließlich über das hydroxyliche Proton und nicht das Proton der Carboxylgruppe der Matrix. Die freie Carboxylfunktion ist also für die Bildung das protonierte Peptid keine notwendige Voraussetzung.



### 5.3.2 Selektive Blockierung der aciden Matrixprotonen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch die Blockierung des hydroxylichen Protons im Matrixmolekül, die Bildung von heterogenen Clustern und protoniertem Analytmolekül nicht möglich war, was auf die Bedeutung des hydroxylichen Matrix-Protons für die Bildung protoniertem Analytmolekül durch dissoziativen Protonentransfer hindeutet.

Um weitere Hinweise darauf zu erhalten, welches Proton der Matrix im Falle des dissoziativen Protonentransfers auf das Analytmolekül übertragen wird, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, in dem selektiv die Carboxylgruppe der Matrix durch Veresterung blockiert wurde.

Wie bei dem vorherigem Experiment, bei welchem selektiv das hydroxyliche Proton der Matrix blockiert wurde, wurde auch hier der Einfluss der Blockierung untersucht sowohl auf die Bildung homogener Clustern als auch heterogener Dimere mit Analytmolekülen und insbesondere auf die Bildung protonierter Analytmoleküle.

Eine Übersicht über die selektive Blockierung des aciden Matrixprotons zeigt die Abbildung 5.38.

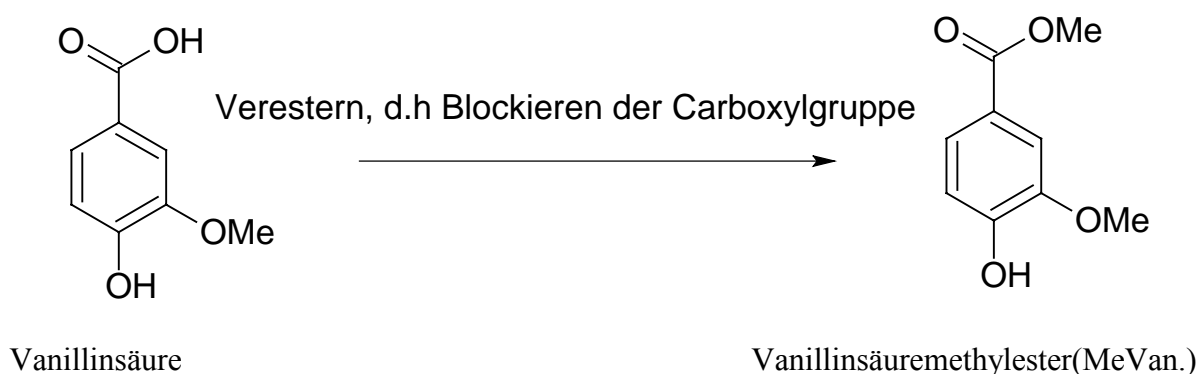


Abbildung 5-38: Schematische Darstellung der Blockierung des aciden-Protons der Vanillinsäure

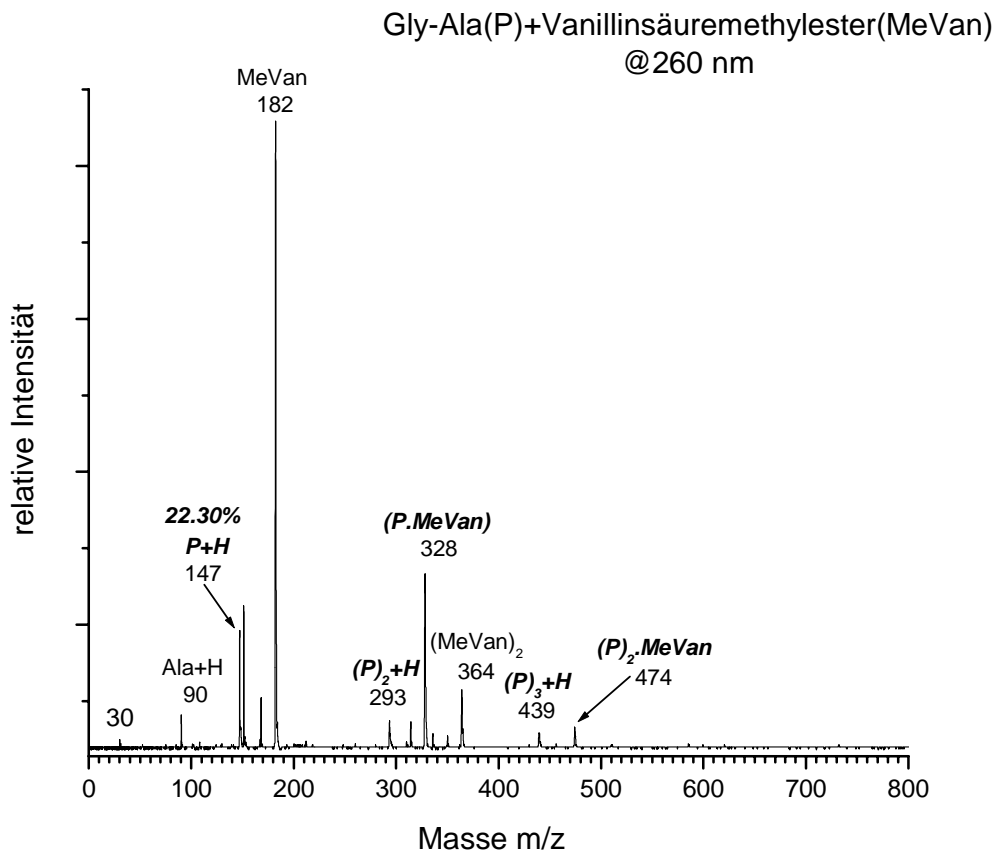
In Analogie zu dem Experiment mit der vorherigen modifizierten Matrixverbindung, bei welcher selektiv die Phenolfunktion (das hydroxyliche Proton am aromatischen Ring) der

## 5. Untersuchungen zur Clusterbildung von MALDI-Matrix-Substanzen mit Peptiden

Matrix blockiert wurde, wurden äquimolare Gemische von Matrixderivat und Dipeptid Gly-Ala in Polyethylen gepresst und in einen Argon-Jet codesorbiert.

Die Multiphotonen-Ionisation der desorbierten Moleküle und gebildeten Cluster wurde mit Nanosekunden-Laserpulsen der Wellenlänge 260 nm und einer durchschnittlichen Pulsenergie von ca. 150-200  $\mu\text{J}$  durchgeführt.

Abbildung 5.39 zeigt das für ein Gemisch von Vanillinsäuremethylester mit dem Dipeptid Gly-Ala erhaltene Massenspektrum.



**Abb. 5-39: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Ala und Vanillinsäuremethylester (MeVan) bei  $\lambda = 260$  nm**

In dem Spektrum sind sowohl die Bildung höherer homogener Cluster als auch höherer heterogener Dimere zu beobachten. Im Gegensatz zu dem vorherigen Experiment mit der 3,4-Dimethoxybenzoesäure (siehe Abbildung 5.37), in dem das Proton der Hydroxylgruppe durch Veretherung blockiert und kein protoniertes Dipeptid beobachtet wurde, wurde hier ein *protoniertes Dipeptid* bei  $m/z$  147 detektiert.

Im Vergleich aber zu dem Experiment mit der unmodifizierten freien Vanillinsäure (Abbildung 5.36) wurde eine deutliche Abnahme der relativen Signalintensität des protonierten Dipeptids (23.30%) und ein schwächeres Signal des heterogenen Dimers beobachtet. Dies könnte auf den zunehmenden sterischen Anspruch des eingeführten Methylester, d.h. eine sterische Hinderung bei der Clusterbildung zurückzuführen sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Blockierung der Carboxylgruppe von Vanillinsäure also offenbar einen Einfluss auf die Bildung heterogener Cluster zwischen Matrix und Peptid und in der Konsequenz auch auf die Bildung des protonierten Peptids durch dissoziativen Protonentransfer hat. Die freie Carboxylfunktion ist aber trotzdem für die Bildung des protonierten Peptids keine notwendige Voraussetzung. Die notwendige Voraussetzung für die Bildung protonierten Peptids ist aber eine freie Hydroxyl-Gruppe der Matrix.

Die Clusterungsexperimente mit selektiv blockierten Vanillinsäurederivaten (Methoxy- und Esterderivate) zeigen deutlich, dass das phenolische Proton aus dem aromatischen Ring und nicht das Proton der Carboxylfunktion der Matrix im dPT Prozess auf das Analytmolekül übertragen wird, (Umkehr der Basizität zwischen Lösung und Gasphase). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit dem von Meffert<sup>126</sup> in unsere Arbeitsgruppe mit deuterierten Matrixverbindungen durchgeführten Experimenten.

## 6 Untersuchungen der Bildung von Peptidbindungen in der Gasphase

### Tryptophan Experimente

Die Bildung heterogener Gasphasencluster von zahlreichen aromatischen Verbindungen, die in MALDI als Matrizes eingesetzt werden, konnte im Rahmen dieser Arbeit in REMPI Experimenten mit kurzkettigen Peptiden nachgewiesen werden. In den folgenden Experimenten wurde die Fragestellung untersucht, ob eine derartige Clusterbildung und die Intracluster Reaktionen prinzipiell auch für andere Matrizes gelten.

Chemische Eigenschaften, die die Matrizes besitzen sollten, sind ein aromatischer Ring als Chromophor für die Absorption der Laserstrahlung und eine Carbonsäure-Funktion als Protonenquelle für die Protonierung des Analytmoleküls.

Für diese Experimente bietet sich Tryptophan aus zweierlei Gründen an:

- Zum einen, weil es die oben genannten chemischen Eigenschaften, wie aromatischer Ring und Carbonsäure-Funktion besitzt
- Zum anderen werden bei früheren Experimenten mit MALDI-Matrizes Wasserabspaltungssignale beobachtet, die aus den gebildeten heterogenen Clustern entstanden.

Ersetzt man nun die MALDI-Matrizes durch eine aromatische Aminosäure wie z. B. Tryptophan und beobachtet immer noch eine Wasserabspaltung vom Heterocluster zwischen dem eingesetzten Peptid und Tryptophan, so zeigt dies eindeutig die Entstehung einer Peptidbindung in der Gasphase. Dies soll im Folgenden näher untersucht werden.

MALDI-Matrizes Verbindungen und Aminosäuren besitzen ein Ionisationspotential in der Größenordnung von 7-10 eV. Deshalb sind bei den Laserwellenlänge im Bereich von 260-290 nm, die in dieser Arbeit häufig verwendet werden, mindestens zwei Photonen zur Ionisation der Matrix erforderlich.

Das Massenspektrum von Tryptophan (Abbildung 6.40) zeigt die Anlagerung von bis zu 5 Tryptophanmolekülen zu einem Cluster. Diese Molekül-Clustern besitzen nur eine schwache Bindungsenergie von weniger als 1 eV. Trotzdem werden im Jet die Cluster der gerade desorbierten Moleküle gebildet.

Die innere Energie der Moleküle darf nicht zu hoch sein, da sonst eine sofortige Dissoziation der Cluster erfolgen würde. Bei der Desorption der Molekül in den Jet erfolgt demnach eine wirkungsvolle Abkühlung zumindest des Freiheitsgrades der Translation.

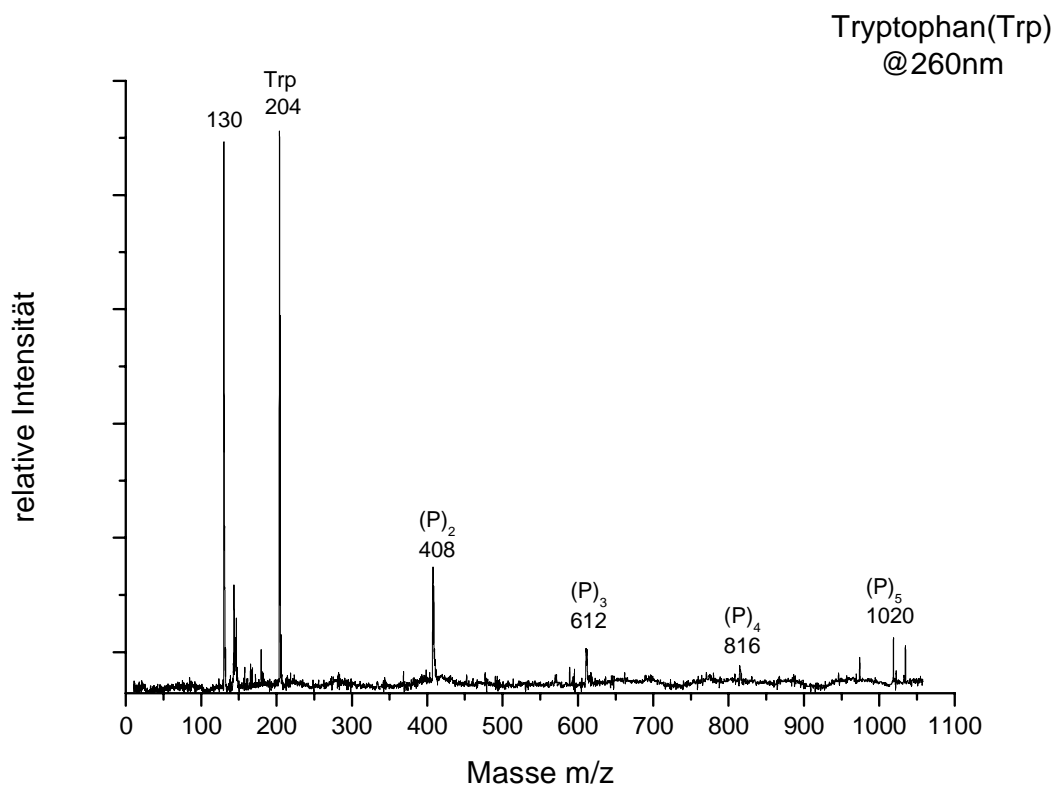


Abb. 6-40: REMPI-ReTOF-MS vom Tryptophan-Cluster bei  $\lambda = 260$  nm

Damit die Cluster aufgrund der geringeren Bindungsenergie nicht zerstört werden, und die Detektion von intakten Clustern gelingt, ist bei der Ionisation darauf zu achten, dass nur eine geringe Überschussenergie mitgegeben wird.

Bei den aromatischen Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Histidin) die als Matrizes benutzt werden können, treten häufig zwei Hauptfragmentierungs-Reaktionen auf, die zu intensiven Fragmenten führen.

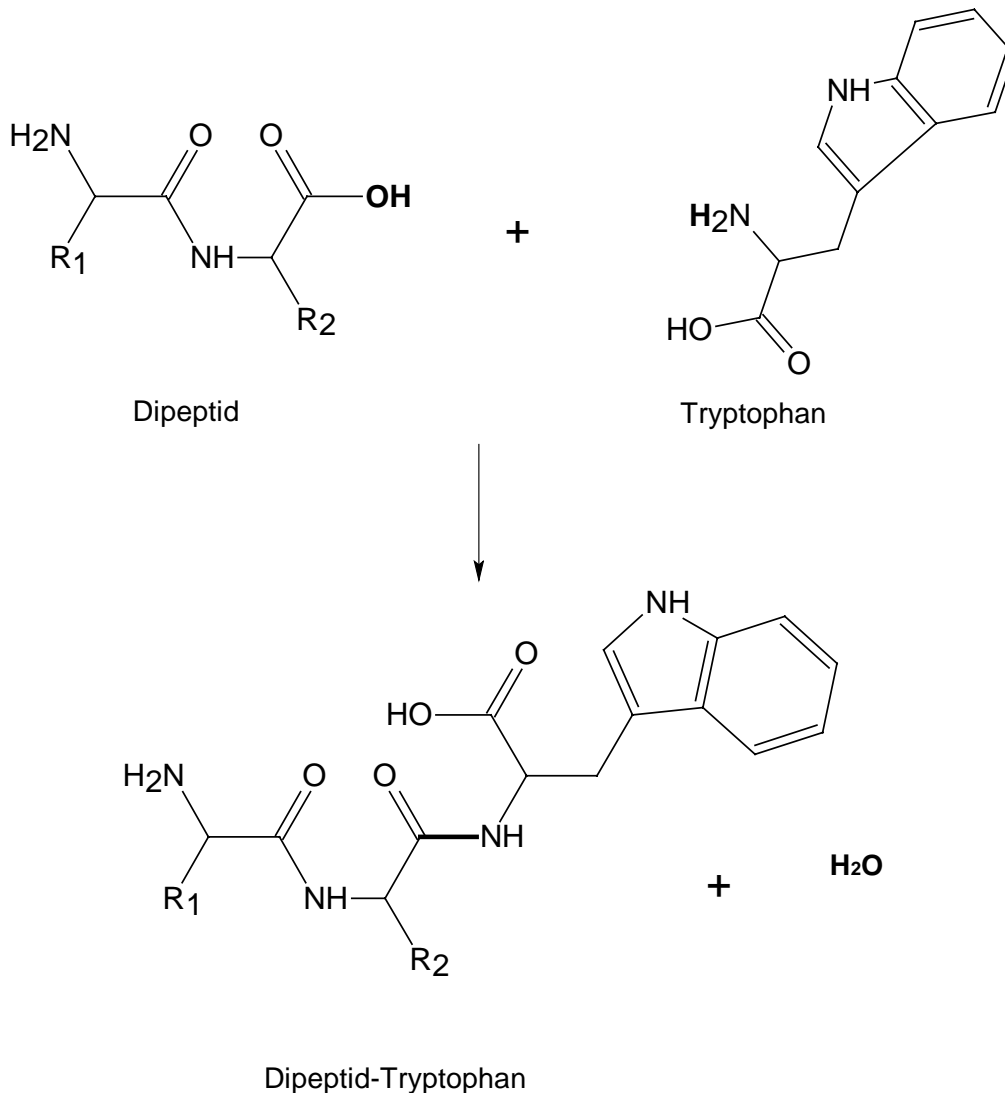
- Die erste Hauptfragmentierungsreaktion ist die Abspaltung der aromatischen Seitenkette, deren Ionisationsenergie niedriger ist, dabei verliert das Molekül die gesamte Aminosäurefunktion unter Bildung eines Aromaten-Ions.
- Die zweite Hauptfragmentierungsmöglichkeit tritt auf, wenn die Ladungsstabilisierung in der Seitenkette nicht begünstigt ist. Als Folge fragmentiert die Aminosäure unter Verlust der Säurefunktion zu einem Iminium-Ion. Die letztere Fragmentierungsreaktion ist für das Fragmentierungsmuster und die Analytik von Aminosäuren und Peptiden charakteristisch.

Im Falle von Tryptophan z. B. entsteht das Hauptfragment durch die Eliminierung der Aminosäurefunktion [M-74] unter Bildung des Chinolinium-Ions bei  $m/z$  130. Dieses Hauptfragment spielt eine große Rolle bei der Erklärung vieler Fragmentierungsmechanismen. Die Stärke dieses Signals deutet darauf hin, dass die Fragmentierungsschwelle nach Absorption eines Photons im Molekülion gerade erreicht wird.

In den nachfolgenden Experimenten wurde eine mögliche Clusterbildung von Tryptophan als Matrix mit Dipeptiden untersucht. Bei den Untersuchungen sollte festgestellt werden:

- Ob erstens überhaupt die Bildung von heterogenen Gasphasen-Clustern zwischen Tryptophan und dem Dipeptid im Jet erfolgt und
- Zweitens es weitere Hinweise auf die Bildung einer Peptidbindung gibt. Eine Peptidbindung ist im Spektrum daran zu erkennen, dass der heterogene Cluster Wasser abgespalten hat.

In Abbildung 6-41 ist die Bildung einer Peptidbindung anhand einer einfachen Reaktionsgleichung dargestellt.



**Abb.6-41: Chemische Reaktionsgleichung der Wasserabspaltung und die Bildung der Peptidbindung.**

Die Vorbereitung der Proben erfolgte wie in Kapitel (3.3.8) ausführlich beschrieben.

Die folgenden Messungen der Dipeptide erfolgten alle bei der 290 nm, da die Resonanzwellenlänge von Tryptophan 286 nm beträgt, aber der verwendete Laser die besten Ergebnisse bei 290 nm lieferte.

In Abbildung 6.41a ist das erhaltene Massenspektrum von dem Dipeptid Gly-Gly mit Tryptophan als Matrix.

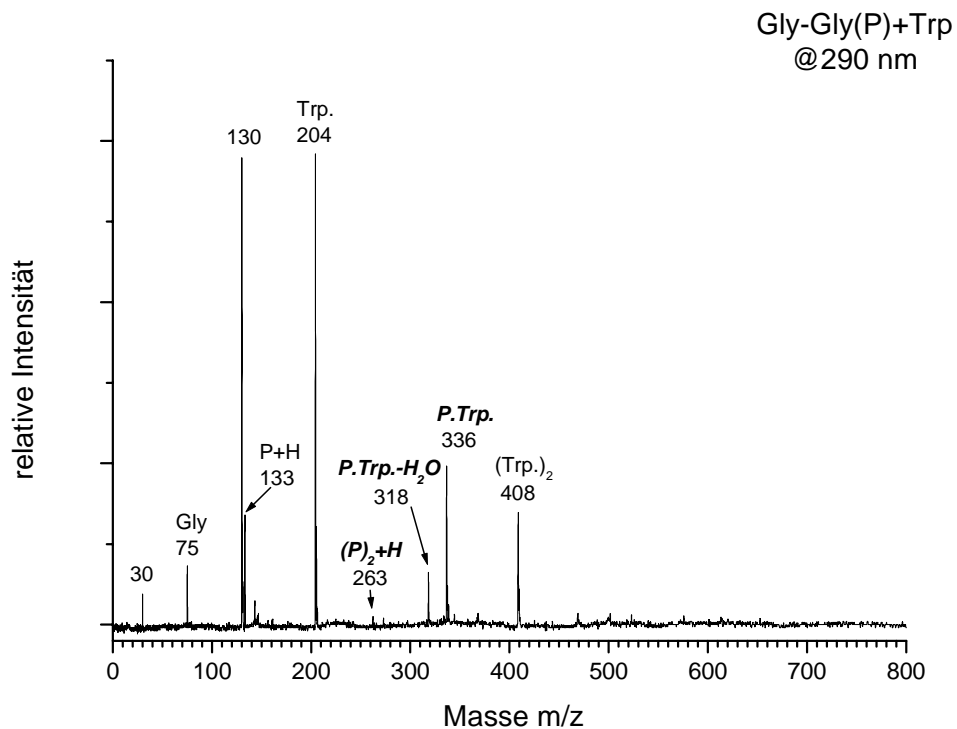


Abb. 6-41a: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Gly und Tryptophan als Matrix bei

$$\lambda = 290 \text{ nm}$$

Wie bei den anderen Experimenten mit den Matrizes, die üblicherweise in MALDI eingesetzt werden, zeigt auch das Spektrum von Tryptophan die Bildung homogener und heterogener Cluster.

Auch auf Tryptophan als Matrix lässt sich der in dieser Arbeit vorgeschlagene Mechanismus des dPT anwenden; beim Zerfall des heterogenen Clusters wird ein Proton von der Matrix (Tryptophan) auf das Peptid übertragen. Das Ganze findet im Anschluss an die Ionisation statt. Das Signal des protonierten Peptids ist bei  $m/z$  133 zu beobachten. Die Bildung einer Peptidbindung durch intermolekulare Wasserabspaltung des heterogenen Clusters zeigt das Signal bei  $m/z$  318.

Wie bei den vorherigen Experimenten mit den MALDI Matrizes treten in den Massenspektren von Dipeptiden mit Tryptophan im unteren Massenbereich Fragmentationen auf, die den decarboxylierten Acyliumionen entsprechen.



## 6. Untersuchungen der Bildung von Peptidbindungen in der Gasphase

---

Das Acyliumion, bei  $m/z$  30, entstammt von der Glycin-Untereinheit des Dipeptids. Das Glycin Signal bei  $m/z$  75 deutet auf die Spaltung der Peptidbindung innerhalb des Dipeptids hin.

In den nachfolgenden Experimenten sollte, im Vergleich zu MALDI Matrizes Versuchen, der Einfluss der Protonenaffinität der aminoterminalen Aminosäure auf die relative Signalintensität des protonierten Dipeptids untersucht werden.

Für diesen Zweck wurden zwei Dipeptidserien, Gly-Ala, Ala-Gly, Gly-Leu, Leu-Gly, die unterschiedliche Protonenaffinität der aminoterminalen Aminosäure aufweisen, ausgewählt und untersucht. Die Abbildungen 6.42 und 6.43 zeigen erhaltene repräsentative Spektren für die Serie Ala-Gly und Gly-Ala mit Tryptophan.

Die relativen Signalintensitäten des protonierten Dipeptids, des Wasserabspaltung Signal und des heterogenen Clusters sind in Tabelle 6.10 aufgeführt.

Tabelle 6.10

Dipeptid	P + H <sup>+</sup>	Wasserabspaltung %	heterogener Cluster
Ala-Gly	20.70 %	8.20%	22.84 %
Gly-Ala	48.27 %	19.40%	31.46 %

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass auch hier im Falle der Dipeptide Ala-Gly, Gly-Ala mit Tryptophan als Matrix in Analogie zu den Ergebnisse der entsprechenden Experimente mit den MALDI Matrizes eine Zunahme der Signalintensität des protonierten Dipeptids beim Übergang zu einem Dipeptid mit höherer Protonenaffinität der C-terminalen Aminosäure festgestellt wird.

6. Untersuchungen der Bildung von Peptidbindungen in der Gasphase

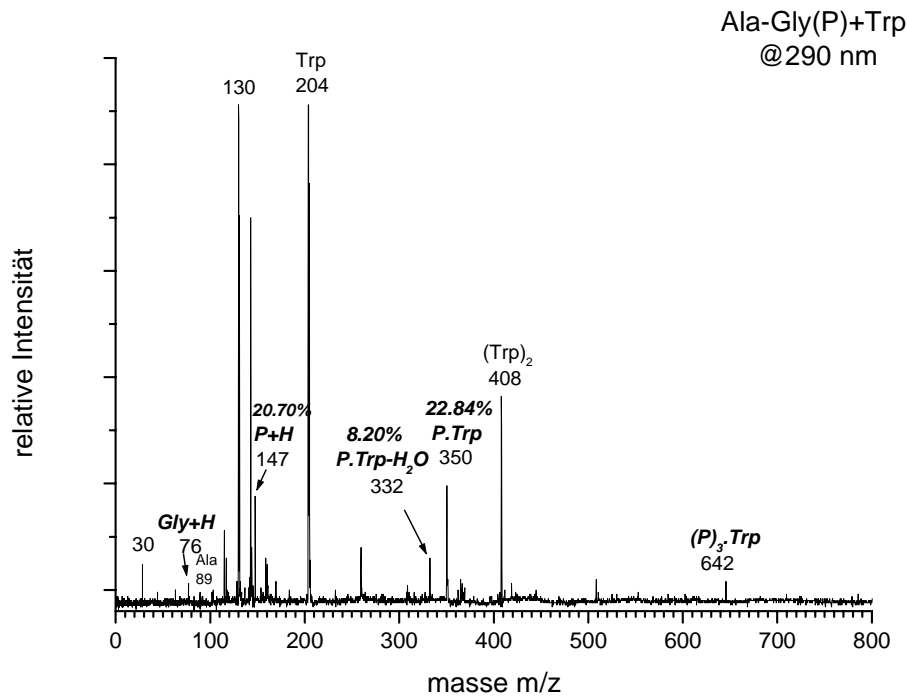


Abb. 6-42: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Ala-Gly und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 290$  nm

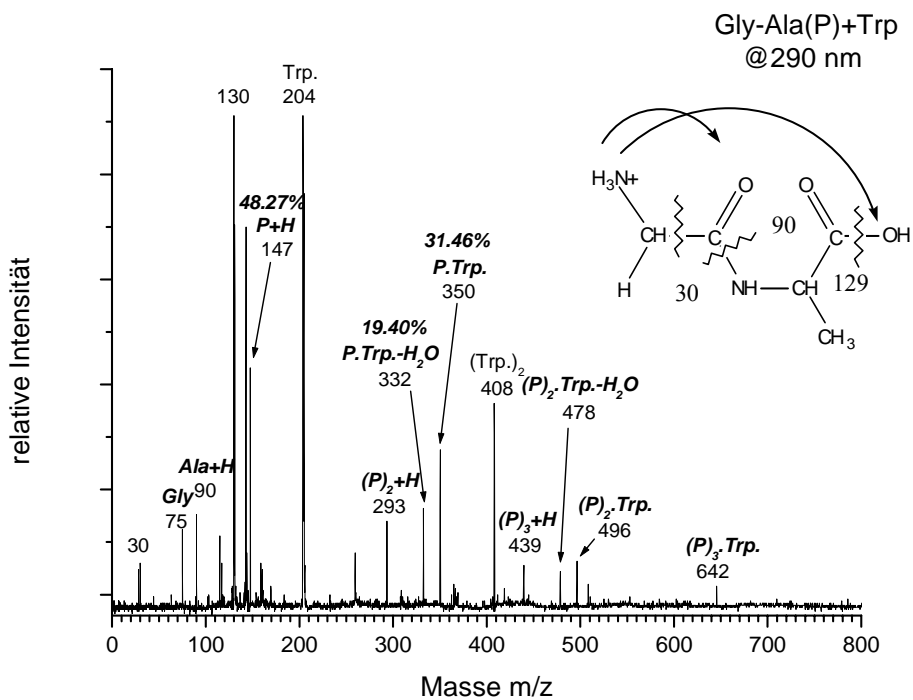


Abb. 6-43: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Ala und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 290$  nm

## 6. Untersuchungen der Bildung von Peptidbindungen in der Gasphase

In dem Spektrum von Gly-Ala mit Ala als C-terminalen Rest, der höherer Protonenaffinität aufweist, wurde eine steigende relative Signalintensität sowohl für den heterogenen Cluster als auch für das Wasserabspaltungssignal detektiert. Im Gegensatz zu dem entsprechenden Dipeptid Ala-Gly mit Gly als C-terminalem Ende wurde sogar ein Wasserabspaltungssignal bei  $m/z$  478 von dem höheren heterogenen Cluster beobachtet. Diese Ergebnisse lassen sich auf die Protonenaffinität der eingesetzten Aminosäuren zurückzuführen.

Bestätigt wurden diese Erkenntnisse in weiteren Untersuchungen an den Dipeptiden Leu-Gly vs. Gly-Leu, auch hier wurde erneut die offensichtliche Bedeutung der Protonenaffinität der eingesetzten Aminosäure des Dipeptids beobachtet.

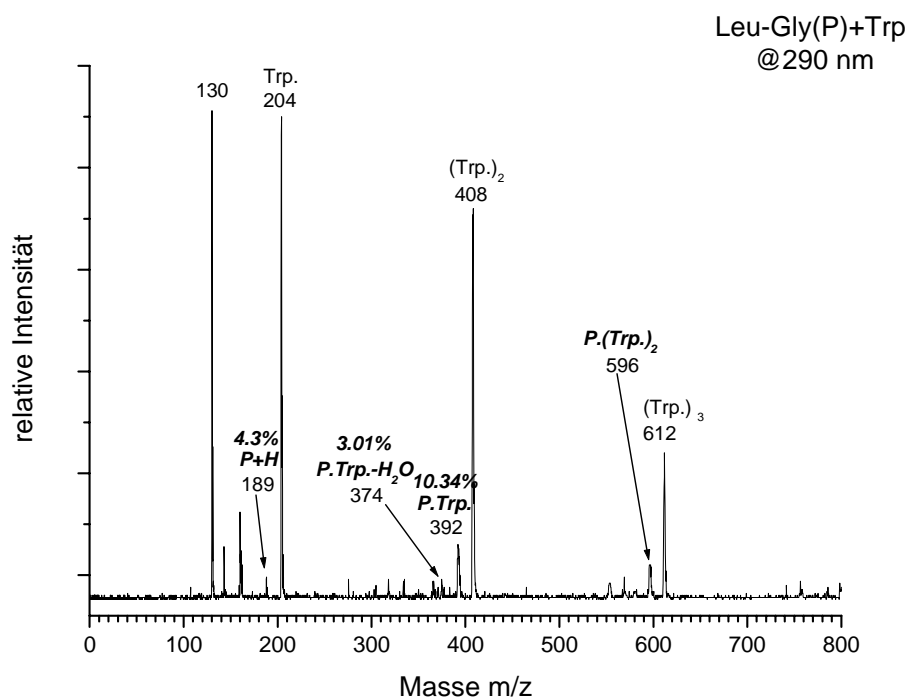


Abb. 6-44: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Leu-Gly und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 290$  nm

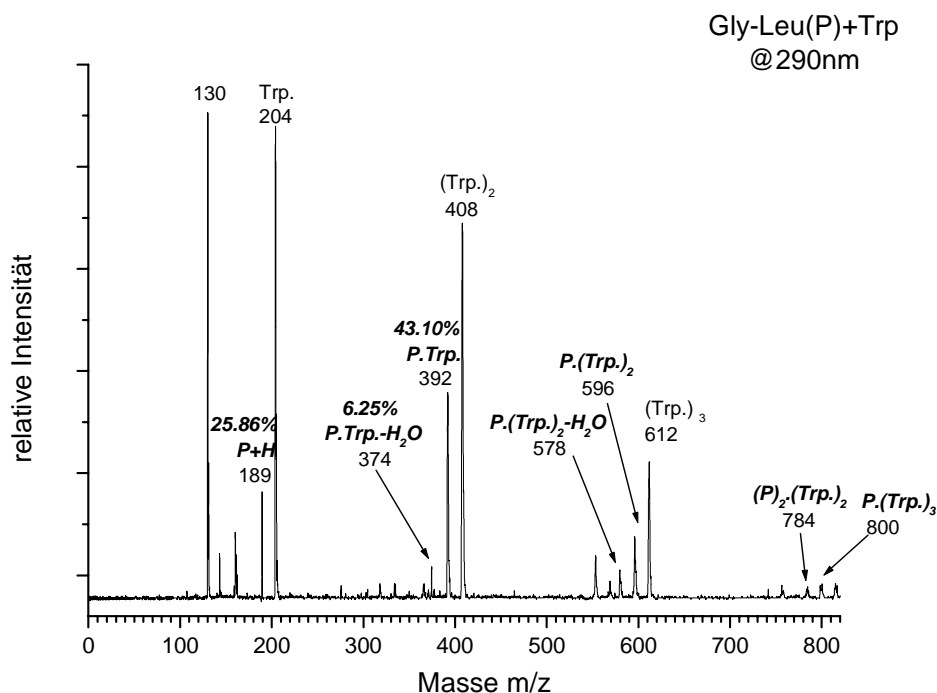


Abb. 6-45: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Leu und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 290 \text{ nm}$

Eine erhebliche Steigerung der Signalintensitäten des protonierten Dipeptids, des Wasserabspaltungssignals und des heterogenen Clusters wurde beim Übergang zu einem Dipeptid mit höherer Protonenaffinität der C-terminalen Aminosäure detektiert. Hier wurde auch im Falle des Dipeptids Gly-Leu mit Leucin als C-terminale Aminosäure, die eine wesentlich höhere Protonenaffinität aufweist als Glycin, Wasserabspaltungssignal von dem höheren heterogenen Cluster bei  $m/z$  578 beobachtet. Im Vergleich zum Gly-Leu konnte bei dem entsprechenden Dipeptid Leu-Gly dieses Signal nicht detektiert werden. Die relativen Signalintensitäten der protonierten Dipeptide, der Wasserabspaltungssignale und der heterogenen Cluster sind in Tabelle 6.11 wiedergegeben.

Tabelle 6.11

Dipeptid	P + H <sup>+</sup>	Wasserabspaltung %	heterogener Cluster
Leu-Gly	4.30 %	3.01%	10.34 %
Gly-Leu	25.86 %	6.25%	43.10 %

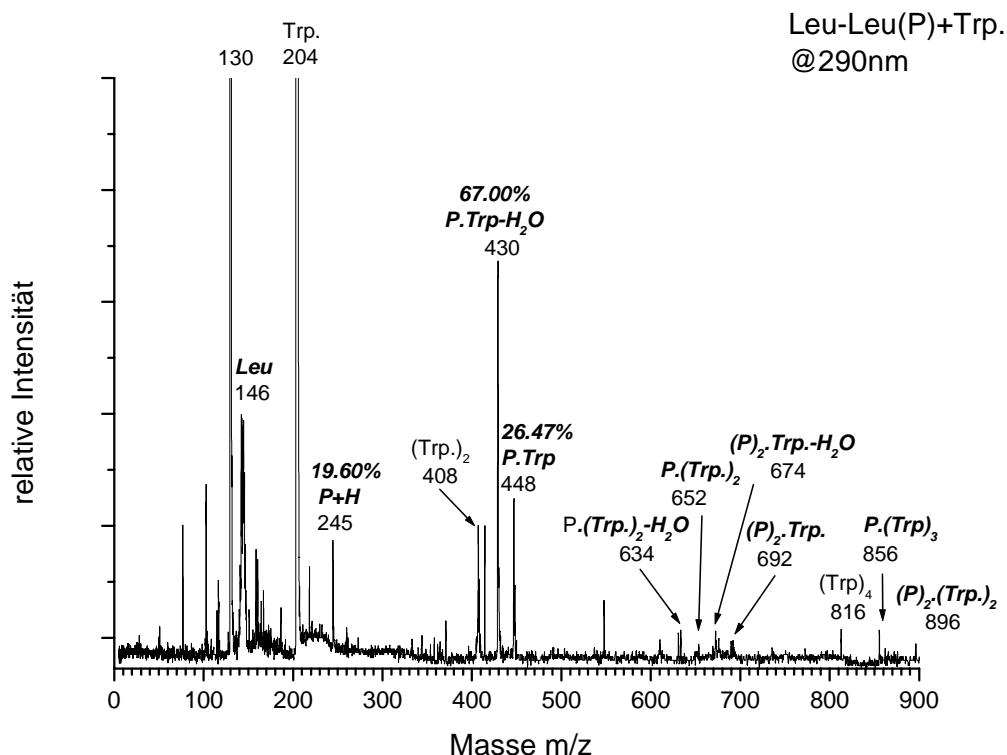


Abb. 6-46: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Leu-Leu und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 290$  nm

Der Einfluss der Protonenaffinität der eingesetzten Aminosäuren des Dipeptids auf das Wasserabspaltungssignals spiegelt das erhaltene Spektrum von Leu-Leu wieder (Abbildung 6.46). Hier wurde mit dem  $m/z$  430, Dipeptid minus Wasser, ein intensives relatives Signal mit der Intensität von 67% bezogen auf den Basespeak beobachtet. Zusätzlich ist die Bildung von höheren heterogenen Clustern z.B.  $m/z$  692  $(P)_2$ -Trp und  $m/z$  652  $P.(Trp)_2$  zu beobachten, die ebenfalls unter Bildung einer Peptidbindung Wasser abspalten.

Um den Einfluss der Protonenaffinität auf das Wasserabspaltungssignal genauer zu untersuchen, wurde ein weiteres Experiment mit dem Dipeptid Lys-Lys durchgeführt. Das erhaltene Massenspektrum zeigt die Abbildung 6.46a. Hier konnten erneut Wasserabspaltungssignale höhere heterogene Clustern nachgewiesen werden.

Entgegen der Erwartungen wurden bei dem Dipeptid Lys-Lys geringere relative Signalintensitäten der Wasserabspaltungssignale der heterogenen Cluster im Vergleich zu dem Dipeptid Leu-Leu gefunden.

## 6. Untersuchungen der Bildung von Peptidbindungen in der Gasphase

Eine mögliche Erklärung ist durch das Wasserabspaltungssignal bei  $m/z$  256 und 531 gegeben.

Die beiden Signale entstehen durch Wasserabspaltung der Dipeptid bzw. des protonierter homogenen Dipeptidscluster. Das lässt auf einen intramolekularen Ringschluss schließen. Das Dipeptid bzw. des protonierten homogenen Dipeptidsclusters geht wegen seiner räumlichen Größe in eine Konkurrenzreaktion zu der Intermolekularen Wasserabspaltungsreaktion des heterogenen Clusters unter Ausbildung einer Peptidbindung ein, wobei Wasser freigesetzt wird.

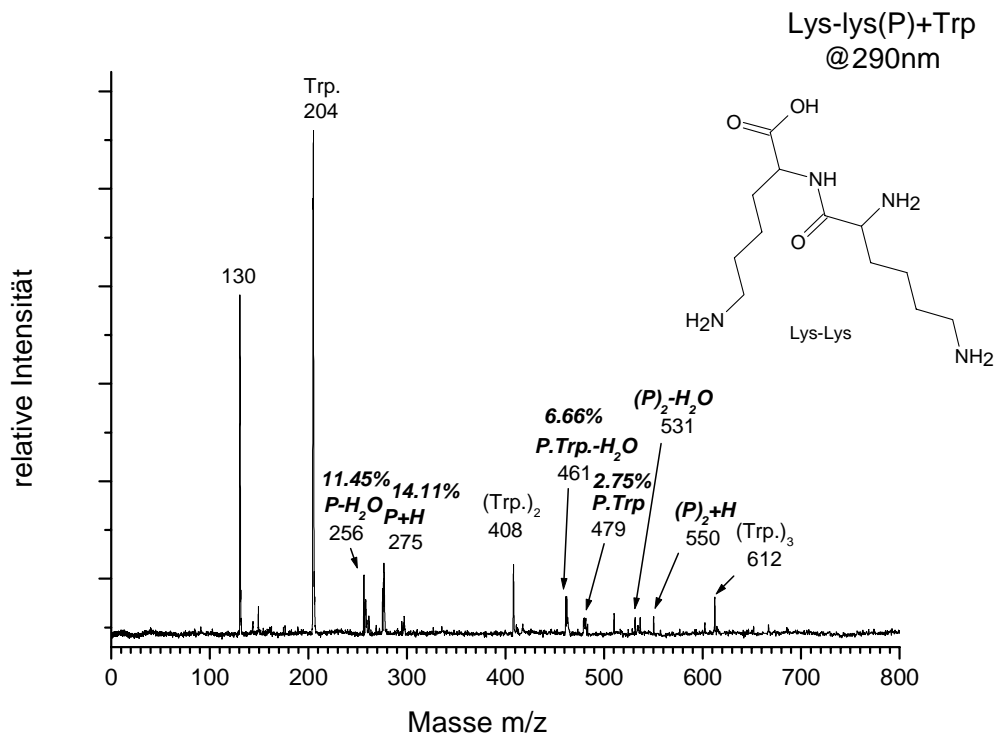


Abb. 6-46a: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Lys-Lys und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 290$  nm

### 6.1.1 Untersuchung zur Clusterebildung von Tri- und Tetrapeptiden mit Tryptophan als Matrix.

In Analogie zu den Dipeptiden konnte auch bei der Tri- und Tetrapeptiden mit Tryptophan als Matrix Wasserabspaltung von den heterogenen Clustern beobachtet werden. In den Abbildungen 6.47 bis 6.51 sind die dazugehörigen REMPI- Massenspektren bei 290 nm aufgeführt, wobei besonders Augenmerk auf die Wasserabspaltung gerichtet ist.

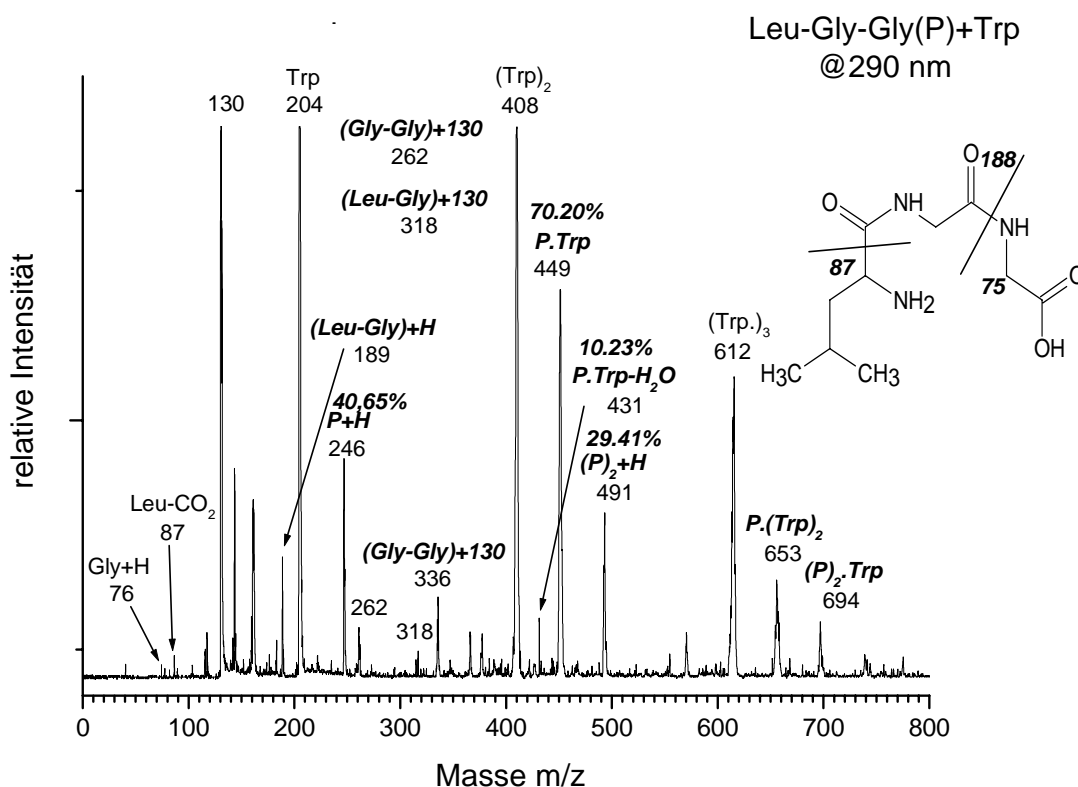
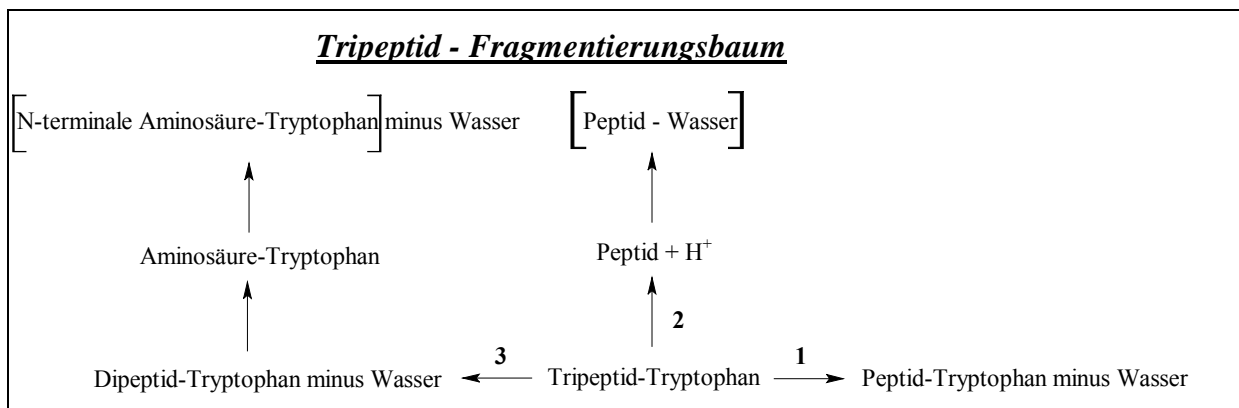


Abb. 6.47: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Gly-Gly und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 290 \text{ nm}$

Bei dem Tripeptid Leu-Gly-Gly mit Tryptophan ist deutlich beim  $m/z$  431 das Wasserabspaltungssignal des heterogenen Cluster zu erkennen.

In weiteren Experimenten mit den Tripeptiden Lys-Gly-Gly und Lys-Lys-Lys konnte ebenfalls die zuvor beobachtete Wasserabspaltung detektiert werden. Besonders auffällig sind die Fragmentierungsmuster der beiden Tripeptide, die in einem allgemeinen „Fragmentierungsbaum“ dargestellt werden sollen:



**Abbildung 6-47a: Allgemeine Fragmentierungsbaum eines Tripeptids**

Nach Bildung des heterogenen Clusters aus Peptid und Tryptophan besteht die Möglichkeit des Zerfalls über drei Äste des Fragmentierungsbaums.

- Der erste Ast repräsentiert die Bildung die Peptidbindung zwischen dem Peptid und der Matrix (Tryptophan) unter Abspaltung von Wasser.
- Als zweite Möglichkeit wird durch den dissoziativen Protonentransfer (dPT) das protonierte Peptid gebildet. Dieses wiederum kann in einem intramolekularen Ringschluss ebenfalls eine Peptidbindung ausbilden und spaltet dabei Wasser ab. Die Experimente zeigen, dass das Signal der Wasserabspaltung auf dem zweiten Zerfallsast nur bei größeren Peptiden (Abbildung 6.49 und 6.49a) beobachtet wird, weil bei diesen Peptiden aufgrund ihrer räumlichen Größe die N- und C-Terminalen Seiten sich genug nahe kommen, um Peptidbindung unter Wasserabspaltung einzugehen.



- Auf dem dritten Zerfallsast fragmentiert der heterogene Cluster zum heterogenen Dipeptid-Tryptophancluster unter Wasserverlust. Anschließend bricht die Peptidbindung in dem Dipeptid unter Bildung eines Heteroclusters der N-terminalen Aminosäure und der Matrix. In diesem Fall wird deutlich, dass die Peptidbindungsbildung in der Gasphase über die Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure mit der Matrix (Tryptophan) stattfindet. Abschließend fragmentiert der Heterocluster aus Aminosäure und Matrix unter Verlust von Wasser.

In Folgenden sind die erhaltenen Massenspektren der Tripeptide Lys-Gly-Gly und Lys-Lys-Lys mit Tryptophan als Matrix dargestellt. Unter jedem Spektrum ist zur Veranschaulichung der entsprechende Fragmentierungsbaum aufgeführt.

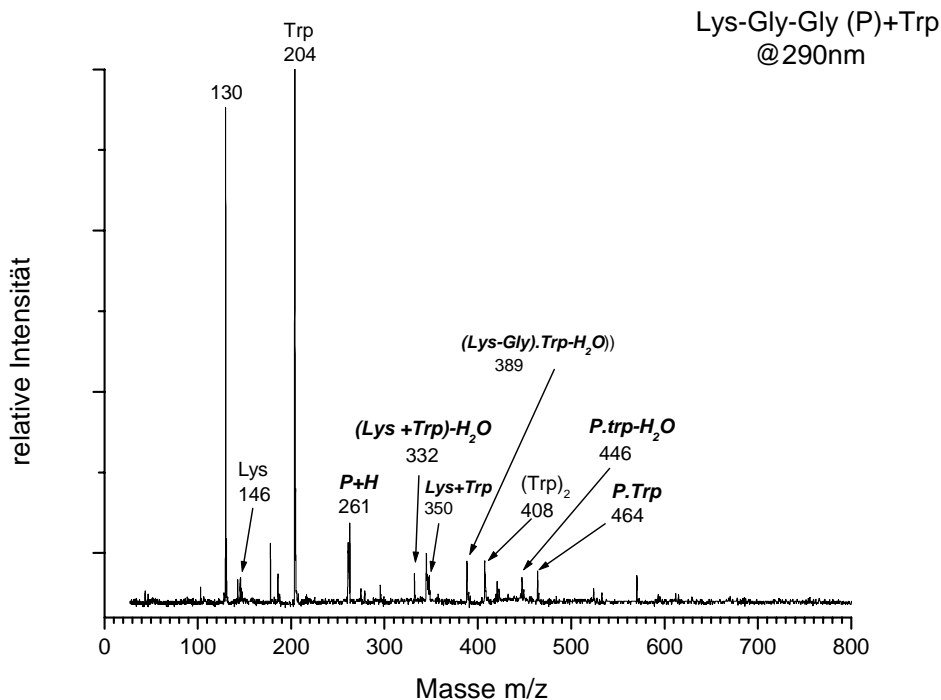


Abb. 6-48: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Lys-Gly-Gly und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 290 \text{ nm}$

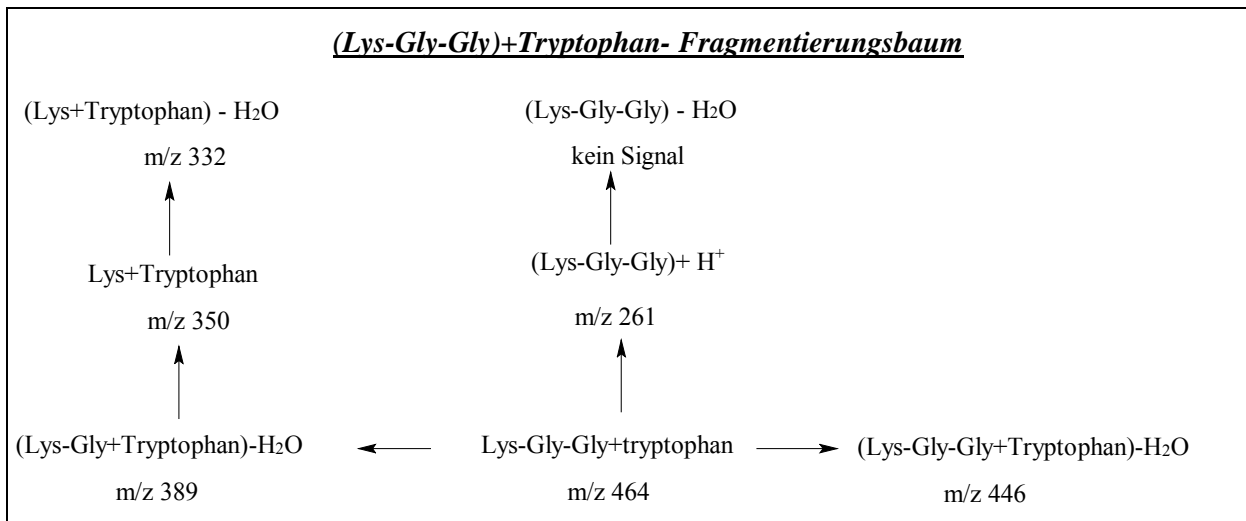


Abbildung 6-48a: Fragmentierungsbaum des Tripeptids Lys-Gly-Gly mit Tryptophan

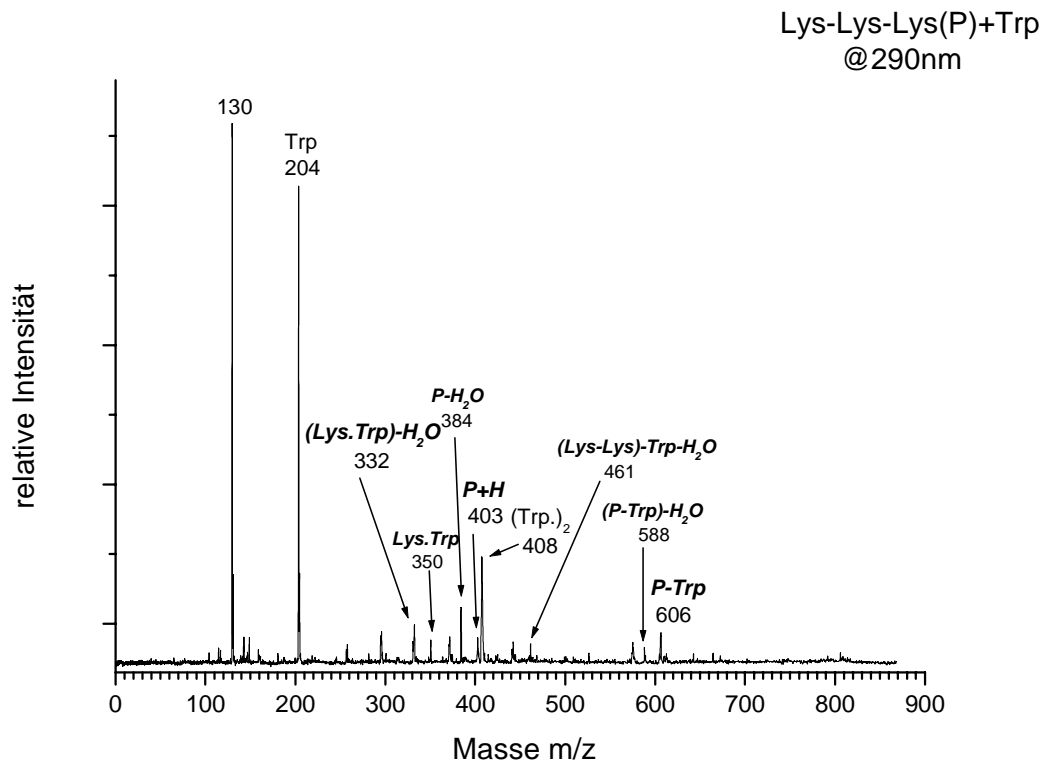


Abb. 6-49: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Lys-Lys-Lys und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 290 \text{ nm}$

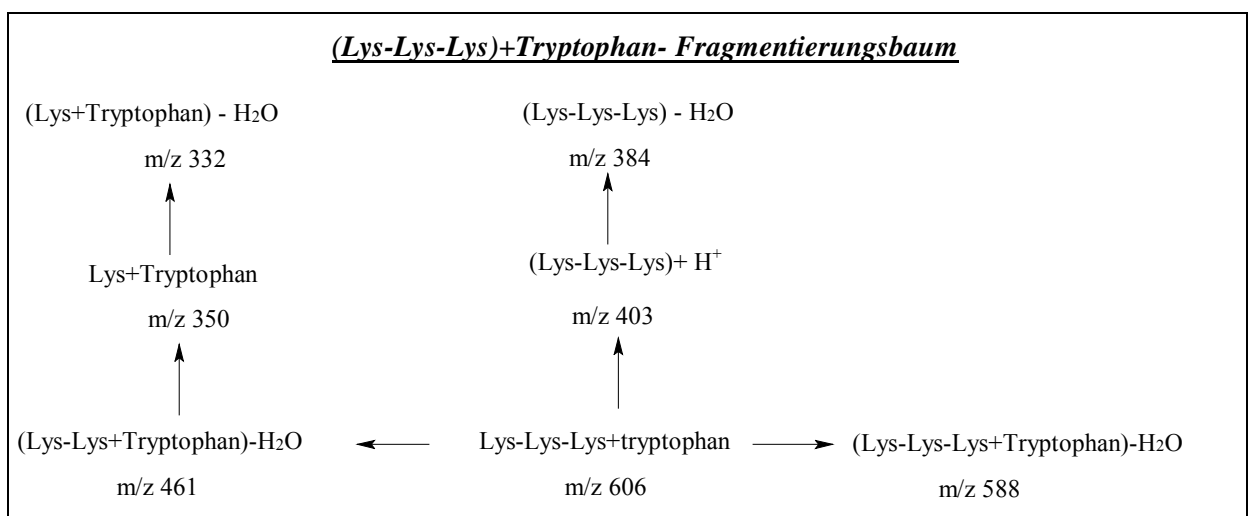
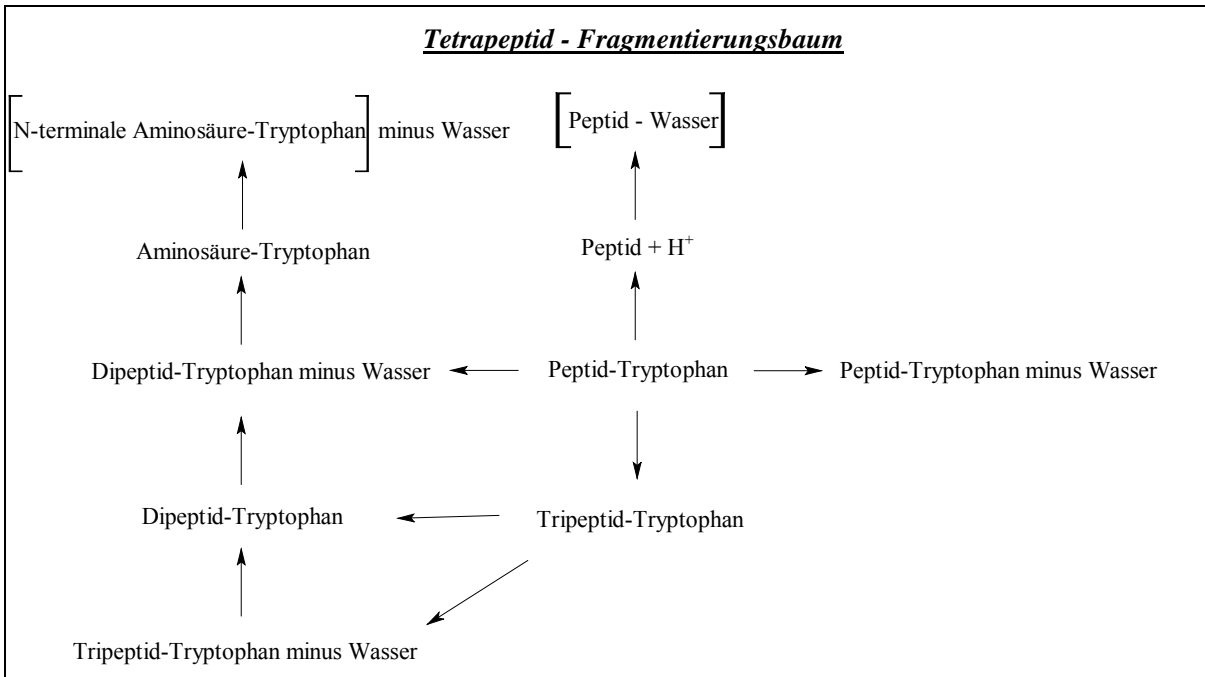


Abbildung 6-49a: Fragmentierungsbaum des Tripeptids Lys-Lys-Lys mit Tryptophan

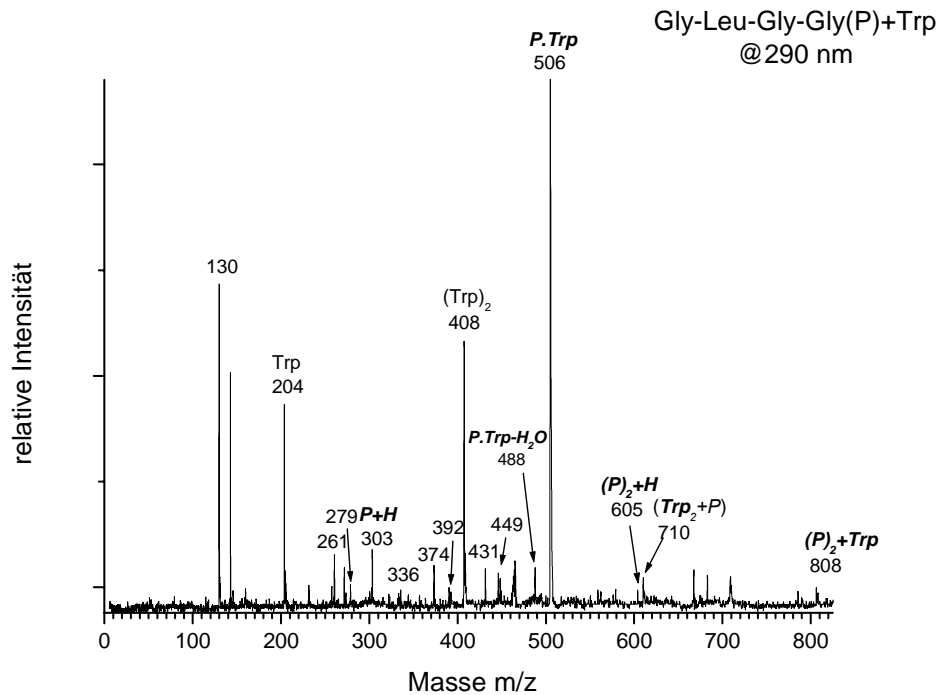
## 6. Untersuchungen der Bildung von Peptidbindungen in der Gasphase

In weiteren Versuchen wurde das Wasserabspaltungsphänomen bei den Tetrapeptiden untersucht, deren allgemeiner Fragmentierungsbaum und einige Beispiele in Abbildungen 4.50 bis 4.52a dargestellt ist. Die Fragmentierungsreaktionen verlaufen analog zu den Tripeptiden. Es kommt lediglich eine zusätzliche Stufe vom Tetrapeptid zum Tripeptid dazu.

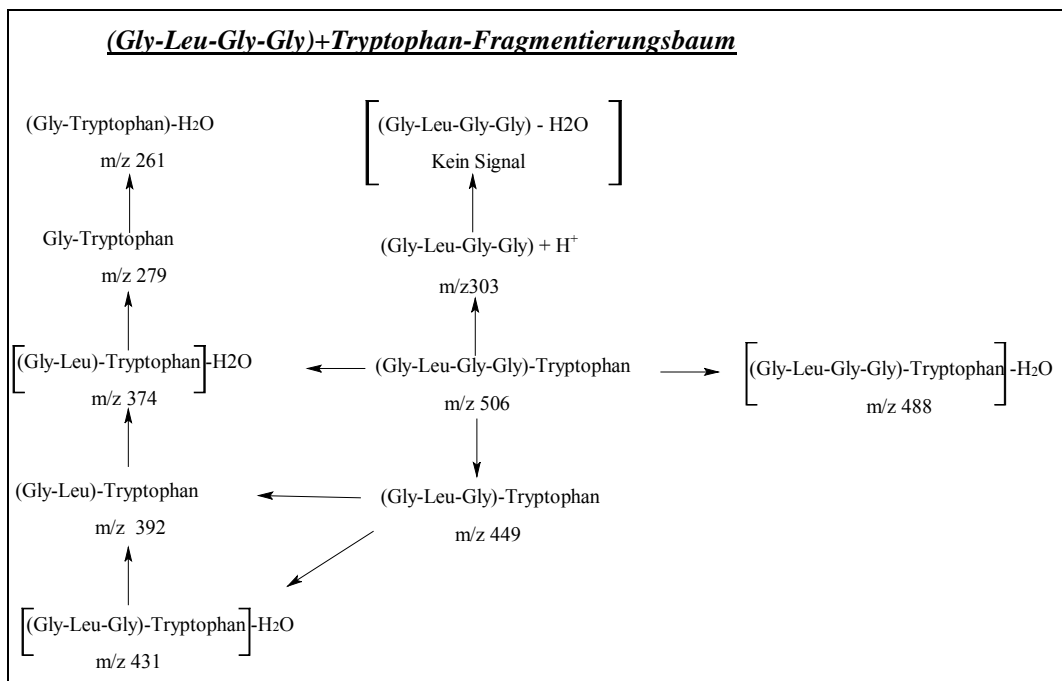


**Abbildung 6-50: Allgemeiner Fragmentierungsbaum eines Tetrapeptids**

## 6. Untersuchungen der Bildung von Peptidbindungen in der Gasphase



**Abb. 6-51: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Gly-Leu-Gly-Gly und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 290 \text{ nm}$**



**Abbildung 6-51a: Fragmentierungsbaum des Tetrapeptids Gly-Leu-Gly-Gly mit Tryptophan**

6. Untersuchungen der Bildung von Peptidbindungen in der Gasphase

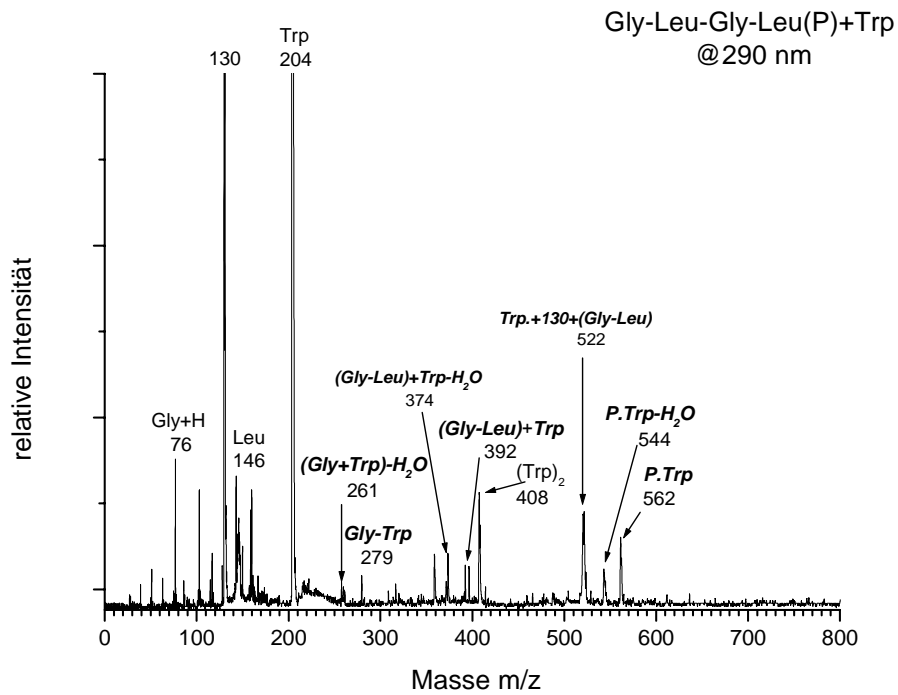


Abb. 6-52: REMPI-ReTOF-MS vom Tetrapeptid Gly-Leu-Gly-Leu und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 290 \text{ nm}$

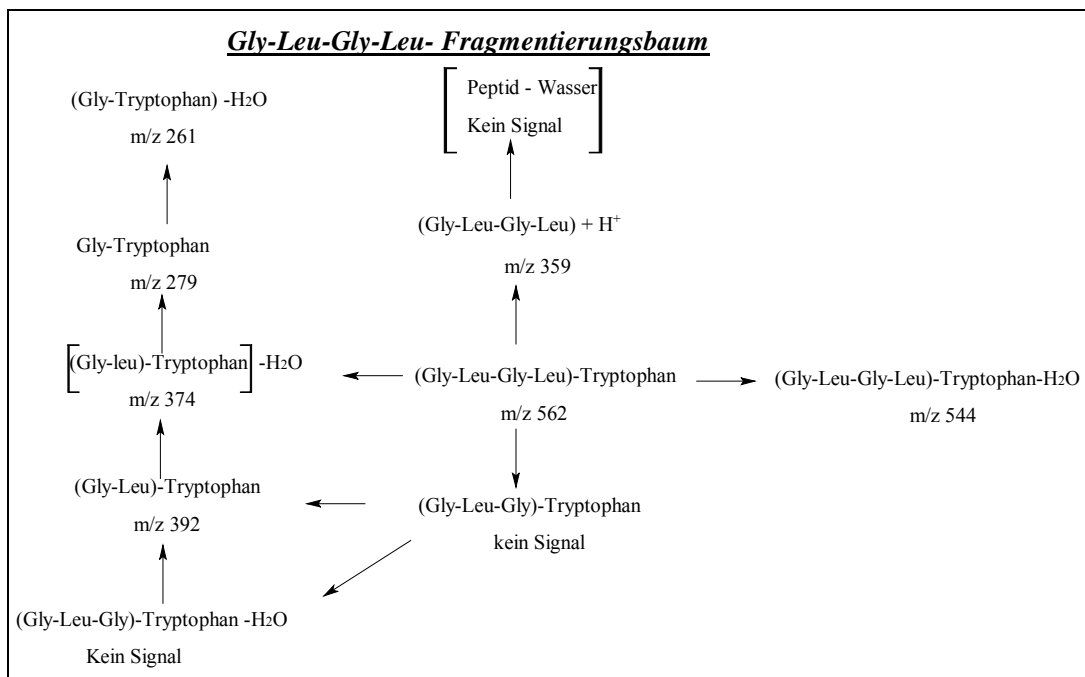


Abbildung 6-52a: Fragmentierungsbaum des Tetrapeptids Gly-Leu-Gly-Leu mit Tryptophan

## 6.1.2 Einfluss der Ionisationswellenlänge auf die Wasser-abspaltung

Das Tripeptid Leu-Leu-Leu wurde mit Tryptophan als Matrix bei verschiedenen Wellenlänge zwischen 260 bis 290 nm gemessen, umso eine Aussage über die Aktivierungsenergie der Wasserabspaltungsreaktion zu erhalten. Die unten dargestellten Spektren zeigen, dass die relative Signalintensität des Wasserabspaltungssignals wächst, wenn die Wellenlänge von 260 nm auf 290 nm erhöht wird. Das bedeutet, dass diese Reaktion eine geringe Aktivierungsenergie besitzt. In Tabelle 4.12 sind die erhaltenen Ergebnisse aufgeführt.

Wellenlänge [ $\lambda$ ]	[ $\lambda$ ] = 260 nm	[ $\lambda$ ] = 275 nm	[ $\lambda$ ] = 290 nm
relative Signalintensität	2.62%	4.81%	14.36%

Tabelle 6.12: relative Signalintensitäten der Wasserabspaltungssignale für das Tripeptid Leu-Leu-Leu mit Tryptophan als Matrix bei verschiedener Wellenlänge.

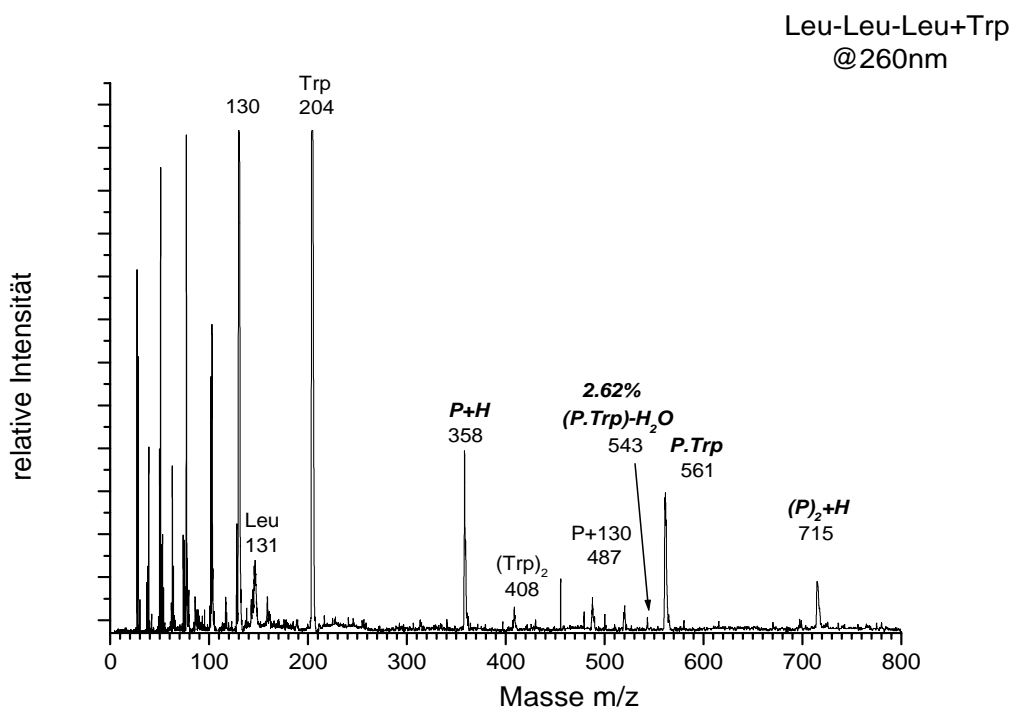


Abb. 6-53: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Leu-Leu und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 260$  nm

6. Untersuchungen der Bildung von Peptidbindungen in der Gasphase

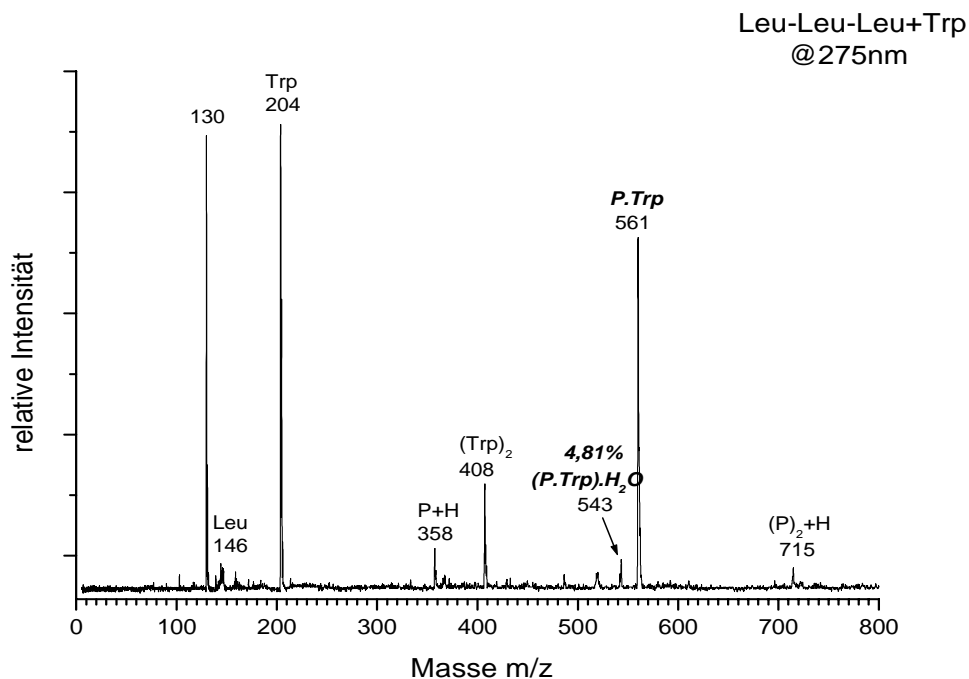


Abb. 6-54: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Leu-Leu und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 275$  nm

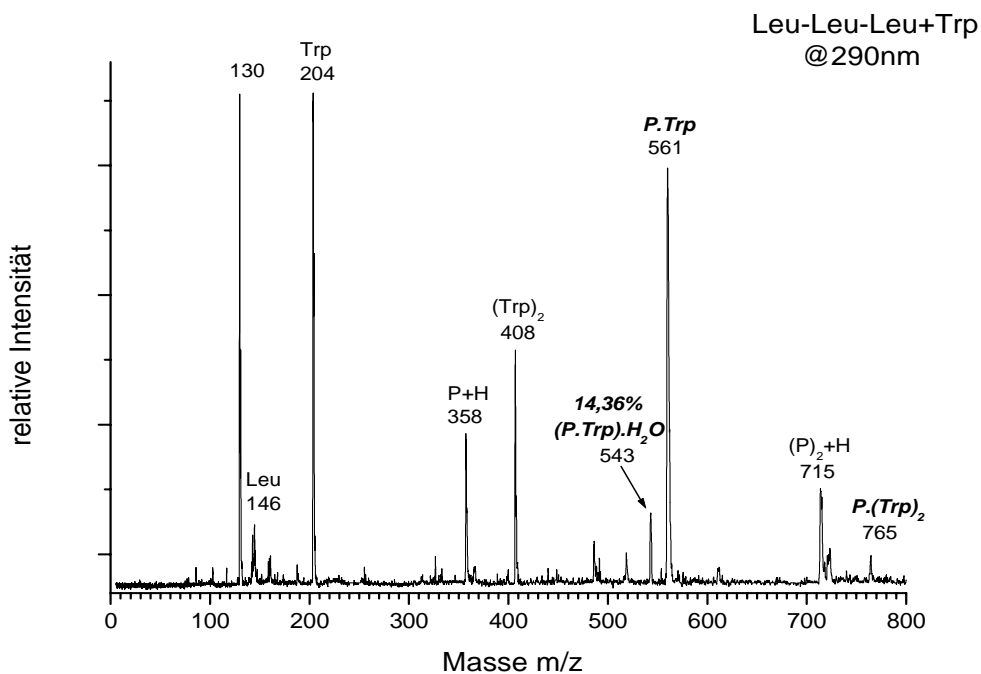


Abb. 6-55: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Leu-Leu-Leu und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 290$  nm



### 6.1.3 Untersuchungen zur Fragestellung welches Proton des Tryptophans auf das Peptidmolekül übertragen wird

Ähnlich wie bei der Vanillinsäure (Kapitel 5.3.1) wurde auch bei Tryptophan untersucht, welches Proton der Matrix (Tryptophan) auf das Analytmolekül beim dissoziativen Protonentransfer übertragen wird. Abbildung 6.56 zeigt den strukturellen Aufbau des Tryptophans mit den vorhandenen Protonendonatorstellen, sowie die Derivate des Tryptophans mit geschützten Funktionellengruppen. Außer dem Proton der Säuregruppe und der Aminogruppe, befindet sich ein weiteres Proton am Stickstoff des Indolrings.

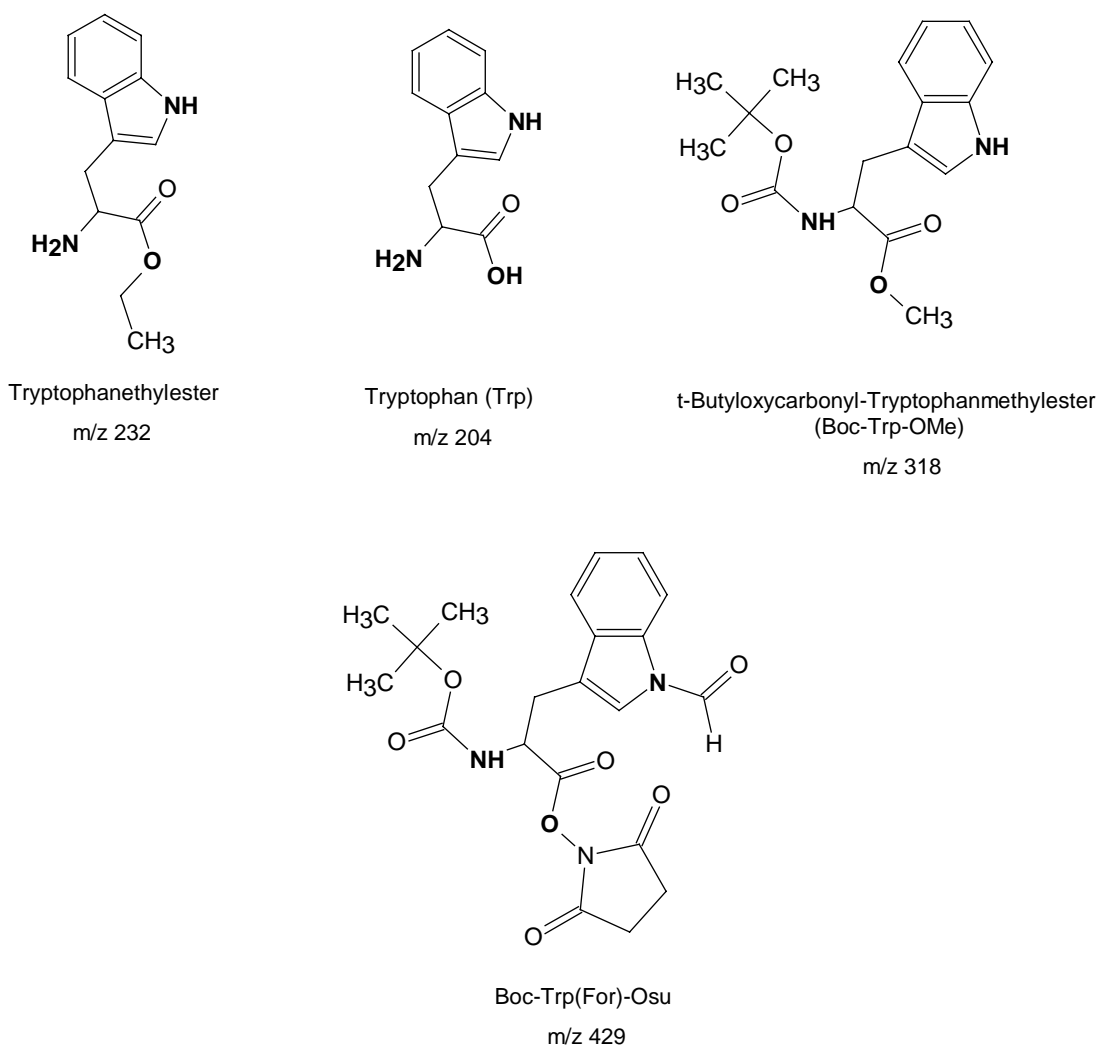


Abb.6-56 strukturelle Aufbau des Tryptophan und Derivate

Abbildung 6.57 zeigt das Massenspektrum des Dipeptids Lys-Lys mit Tryptophan. Von besonderem Interesse ist das protonierte Dipeptidsignal bei  $m/z$  275, das durch den dissoziativen Protonentransfer von der Matrix auf das Dipeptid entsteht.

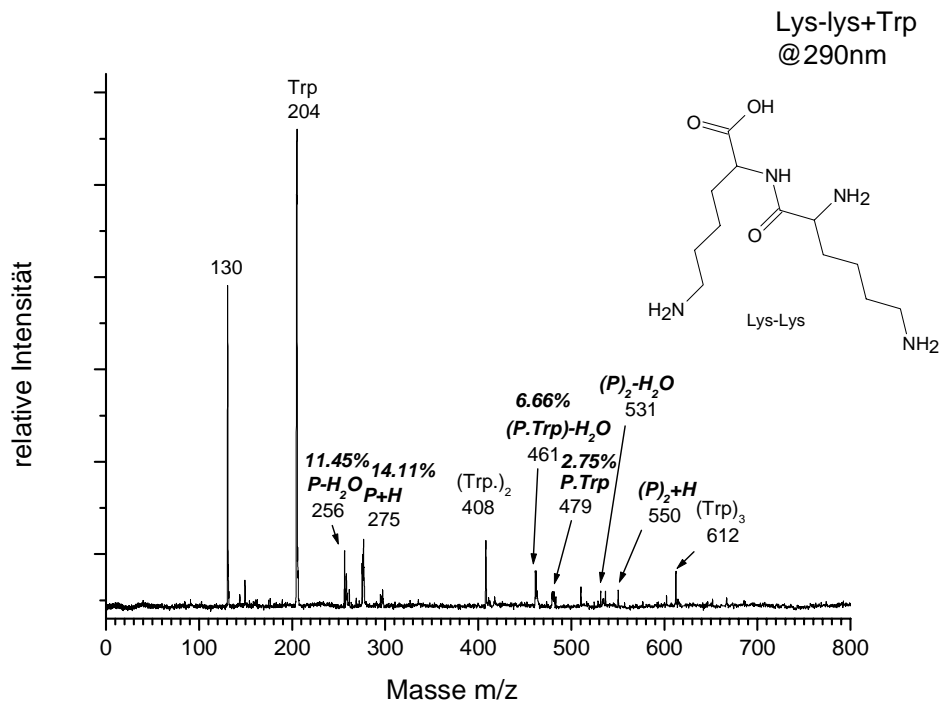


Abb. 6-57: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Lys-Lys und Tryptophan als Matrix bei  $\lambda = 290 \text{ nm}$

Unklar ist allerdings, von welcher funktionellen Gruppe des Tryptophans das Proton stammt. Um den Ort des Protonentransfers zu klären, wurden in verschiedenen Clusteruntersuchungen, die funktionellen Gruppen ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{NH}^-$ ,  $\text{NH}_2$ ) der Matrix geschützt.

Hierfür wurde zunächst das Proton der Carboxylgruppe durch Veresterung mit einer Ethylgruppe geschützt. Abbildung 6.58 zeigt das erhaltene Massenspektrum des Dipeptids Lys-Lys mit Tryptophanethylester. Deutlich wurde die Bildung des protonierten Dipeptids beobachtet. Somit lässt sich sagen, dass das übertragene Proton nicht von der Carboxylgruppe stammt.

In einem weiteren Experiment (Abbildung 6.58) wurde das Tryptophan an der Carboxylgruppe als Ethylester geschützt. Auch hier konnte das protonierte Dipeptid detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass das Proton nicht von der Carboxylgruppe übertragen wird.

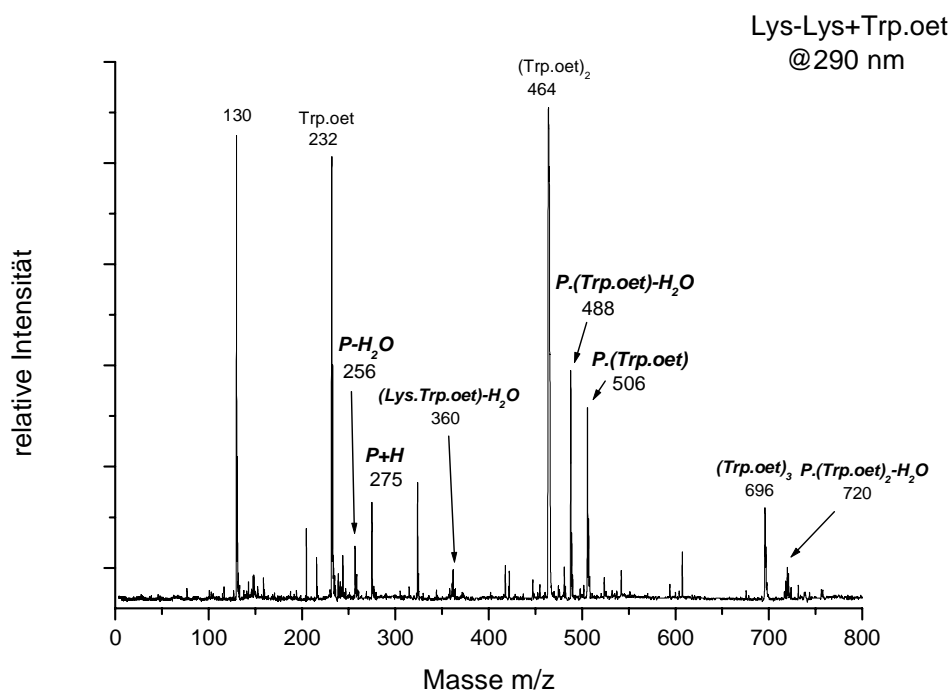


Abb. 6-58: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Lys-Lys und Trp-Oet als Matrix bei  $\lambda = 290 \text{ nm}$

Anschließend wurde Tryptophan zum einen als Methylester (Carboxylgruppe) und zum anderen durch Boc an der  $\text{NH}_2$  – Gruppe geschützt (Abbildung 6.59). Es konnte ebenfalls das protonierte Dipeptidsignal beobachtet werden.

Erst als das Proton am Stickstoff im Indolring mit Formylgruppe blockiert wurde, war das protonierte Analytsignal nicht mehr detektierbar (Abbildung 6.60). Daraus lässt sich folgern, dass beim dissoziativen Protonentransfer das Proton vom Stickstoff des Indolrings auf das Analytmolekül übertragen wird. Diese Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung mit den bereits in Kapitel 5.3.1 im Fall der Vanillinsäure, dass weder das Proton der Säuregruppe noch das Proton der Aminogruppe eine notwendige Voraussetzung für die Bildung protonierter Analytmoleküle im dissoziativen Protonentransfer sind.

6. Untersuchungen der Bildung von Peptidbindungen in der Gasphase

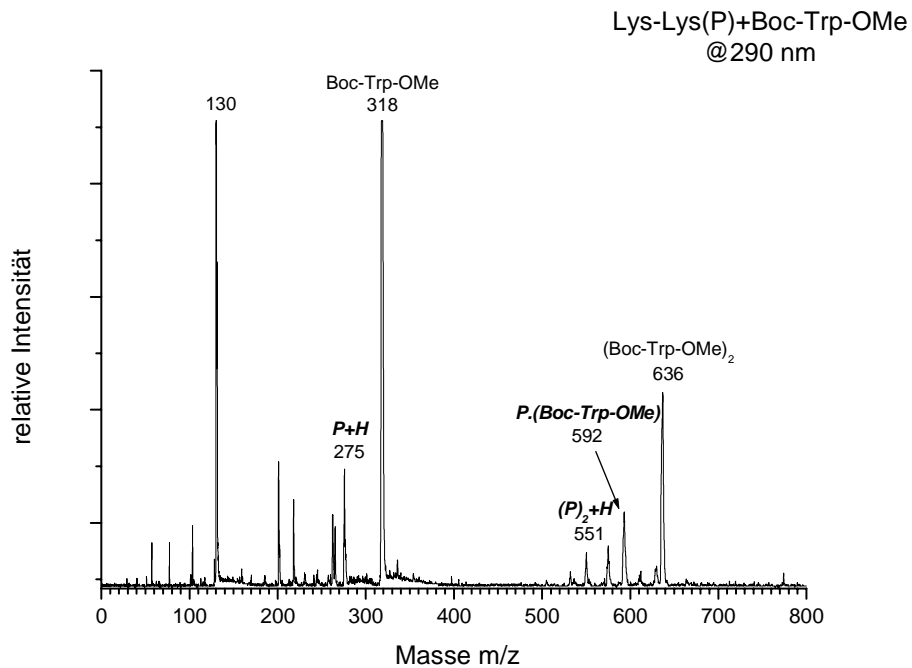


Abb. 6-59: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Lys-Lys und Boc-Trp-OMe als Matrix bei  $\lambda = 290$  nm

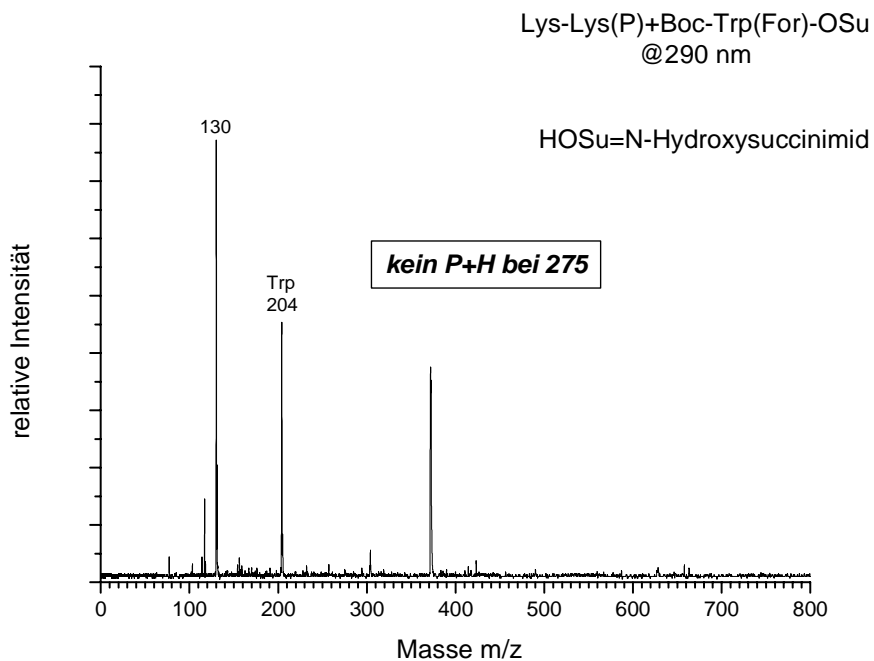


Abb. 6-60: REMPI-ReTOF-MS vom Tripeptid Lys-Lys und Boc-Trp(For)-OSu als Matrix bei  $\lambda = 290$  nm

## 7 Protonentransfer über die Peptidbindung

Der Ladungstransferprozess in der DNA und Proteinen über längere Distanz hat in dem letzten Jahrzehnt an Attraktivität zugenommen<sup>141</sup>. Der Prozess des Ladungstransfers spielt in biologischen und biochemischen Systemen eine bedeutende Rolle. Beispielsweise ist der transepitheliale aktive Transport von Peptiden im Darm ist mit einem Ladungstransfer verbunden<sup>145</sup>. Von besonderer Bedeutung sind die biochemischen Prozesse der ATP-ase, wobei der Protonenmotorische Kraft durch Übertragung von Ladung erzeugt wird<sup>146</sup>.

Das Phänomen des Ladungstransfers kann man grob in zwei Kategorien unterteilen. Hierzu muss man zum einen zwischen der Übertragung eines negativen Teilchens durch Elektronentransfer (ET), sowie die Übertragung eines positiven Teilchens durch den Protonentransfer (PT) unterscheiden.

### 7.1 Elektronentransfer (ET)

Schlag et al. zeigten, dass ein Ladungstransfer innerhalb eines Polypeptids mit hoher Effizienz stattfindet<sup>153-156</sup>. Um dieses Phänomen zu verstehen, wurde ein bifunktionelles Modell angenommen, dass ein Ladungstransfer innerhalb einer Polypeptidkette bei Raumtemperatur ermöglicht. In dem Modell des Ladungstransfer Prozesses spielt das  $C_{\alpha}$ -Atom einer Aminosäure im Peptid die zentrale Rolle. Jede  $C_{\alpha}$  hat eine N und C-Seite. Durch Schwingungsanregung der Carbonylgruppe auf der C-Seite und darauf folgender Ladungsübertragung von dem O-Atom auf das N-Atom am  $C_{\alpha}$ -Atom durch „Stoßübertragung“ wird die Ladung durch die gesamte Peptidkette ähnlich eines Pendels weitergereicht.

Ein Elektronentransfer (ET) ist ein fundamentaler Prozess, der vor oder während chemischer Reaktionen abläuft und durch Stöße oder elektronische Anregung initiiert wird. Einige Beispiele hierfür sind:

- Elektronenaustausch während der Bildung von Ionen in Lösung.
- Ladungstransfer bei Stößen zwischen Neutralen und Ionen in der Gasphase.
- *charge transfer to solvent*: Solvatisierung von Elektronen.
- Ladungstrennung Dissoziativer Elektronentransfer(dET) nach lokaler Ionisation von Molekülen oder Clustern.
- In Makromolekülen, etwa bei der Photosynthese.
- Ladungsdichteverchiebung in Molekülen nach elektronischer Anregung.
- Ladungswanderung in Festkörpern und Polymeren.

Es existiert keine einheitliche, auf alle diese Fälle anwendbare theoretische Beschreibung, da das Gebiet viel zu umfangreich ist. Man unterscheidet daher von Fall zu Fall beispielsweise zwischen ET in kondensierter Phase, ET an Grenzschichten, ET in Makromolekülen, etc. In der kondensierten Phase ist der ET einer der wichtigsten chemischen Elementarprozesse überhaupt. Eine für diesen speziellen Fall allgemein anerkannte Theorie, mit der sich ET Raten abschätzen lassen, stammt von Marcus<sup>147, 148</sup>

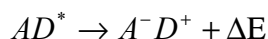
Eine Darstellung aller wesentlichen Aspekte von ET-Prozessen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. In den folgenden Abschnitten werden daher nur zwei ET Prozesse erörtert, die sich in der Gasphase (Molekularstrahl) untersuchen lassen und für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wesentlich sind.

ET-Phänomene lassen sich dann praktisch in *i) intramolekularen ET* und *ii) intermolekularen ET* einteilen. Die Unterscheidung, ob in einem Molekül ein *intramolekularer ET* oder lediglich eine Ladungsdichteverchiebung (z.B. aufgrund einer veränderten Elektronenkonfiguration) vorliegt, ist nicht immer eindeutig zu treffen.

### 7.1.1 Photoinduzierter Elektronentransfer

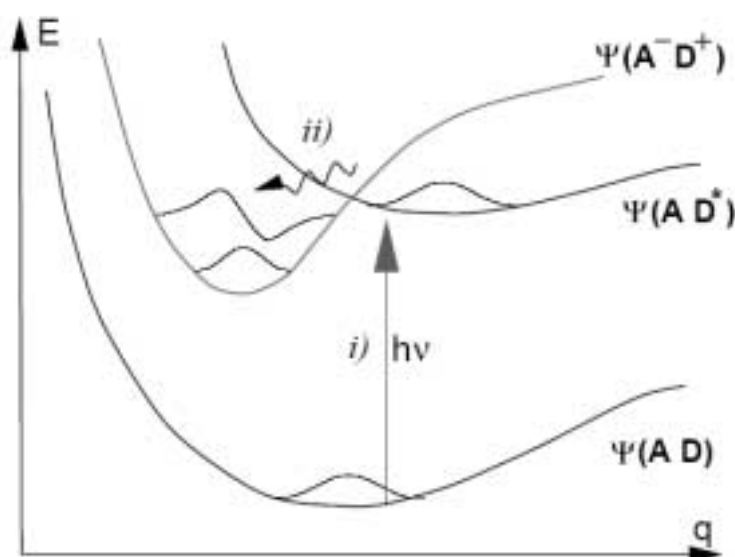
Bei diesem Prozess geht ein Elektron von einem elektronisch angeregten Donor  $D^*$  zu einem Akzeptor  $A$  über. Donor und Akzeptor können unterschiedliche Moleküle, aber auch verschiedene, räumlich getrennte Teile ein- und desselben Moleküls sein.

Im Folgenden wird lediglich der Fall der unterschiedlichen Moleküle bzw. des Clusters  $A D$  behandelt. Falls dies energetisch günstiger ist, entsteht aus einem lokal am Donor angeregten Cluster  $A D^*$  ein Ionenpaar  $A^- D^+$ .



Der Prozess des photoinduzierten ET ist in Abbildung 7.1 veranschaulicht. Welche Größen auf diesen Prozess Einfluss haben, wird im Folgenden erörtert.

In dem dargestellten Fall nimmt der Komplex nach Anregung schließlich den energetisch günstigeren, Ladungstrennten Zustand ein. Die Anregung des Donors wird hier durch ein Photon der Energie  $h$  innerhalb eines Clusters  $A D$  vollzogen, prinzipiell ist jedoch eine Anregung des Donors noch vor der Clusterbildung denkbar (ET nach Stoßreaktion).

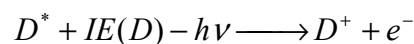


**Abbildung 7-1: Photoinduzierter Elektronentransfer. *i)* Anregung des  $AD$ -Komplexes. *ii)* Ladungstransfer führt auf eine energetisch günstigere Potentialfläche.**

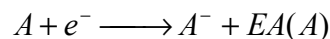
## 7.1.2 Energetik des Elektronentransfers

Die Erzeugung des Ionenpaares  $A^+D^+$  in der Gasphase kann gedanklich in folgende Schritte unterteilt werden:

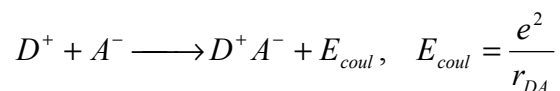
*a)* Ionisation des Donors  $D^*$  unter Aufbringung der Ionisationsenergie  $IE(D)$ . Da der Donor vorher bereits durch ein Photon der Energie  $h\nu$  elektronisch angeregt wurde, ist dies die zweite Schritt einer Zwei-Stufen-Ionisation.



*b)* Transfer des Elektrons zum Akzeptor, Bildung eines Anions unter Freisetzung der Elektronenaffinitäts-Energie  $EA(A)$ :



*c)* Freisetzung der Coulomb-Energie  $E_{\text{coul}}$  durch Annäherung der, bisher in Gedanken räumlich getrennten, funktionellen Gruppen  $D^+$  und  $A^-$  auf den intermolekularen Abstand  $r_{DA}$ :



Insgesamt beträgt also der freigesetzte Energieunterschied  $\Delta E$

$$\Delta E = E_{\text{coul}} + EA(A) - IE(D) + h\nu$$

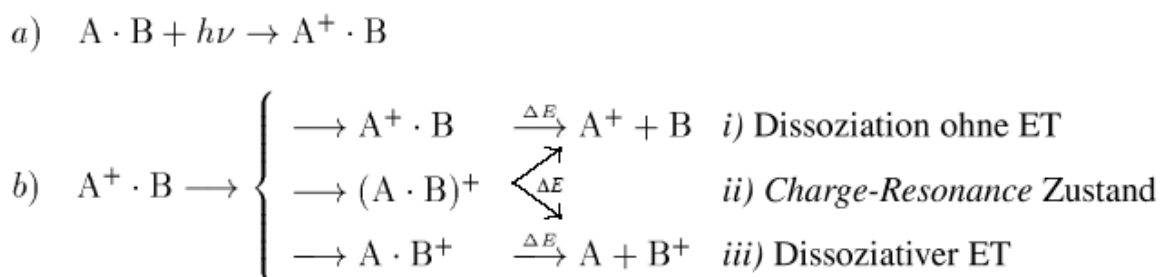
Findet der Prozess in Lösung statt, dann muss noch die Energie der Solvatisierung des Ionenpaares  $D^+A^-$  mit dem Dipolmoment  $r_{DA} q(e^-)$  berücksichtigt werden. Zudem wird die Coulombenergie durch die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  des als Kontinuum betrachteten Lösungsmittels verändert ( $E_{\text{coul.}} = e^2/\epsilon r_{DA}$ ). Die Wanderung eines Elektrons vom Donor  $D$  zum Akzeptor  $A$  kann stattfinden, wenn die Energiebilanz positiv ist. Die Transfer-Rate hängt dann vom Überlapp der Wellenfunktionen von  $A$  und  $D$  ab, der von Faktoren wie Abstand  $r_{DA}$  und angeregten Schwingungen beeinflusst wird. Der photoinduzierte ET lässt sich z.B. über eine rotverschobene Fluoreszenz des Energie ärmeren Ionenpaar-Zustandes nachweisen, oder aber mithilfe der Photoelektronen Spektroskopie<sup>149, 150</sup>.



## 7.1.3 Charge resonance-Wechselwirkung und dissoziativer ET

Nach Photoionisation liegen die Moleküle oder Cluster als Kationen vor. Unter geeigneten Umständen, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, findet in einem kationischen Cluster ein intermolekularer ET statt.

Folgende Reaktions-Gleichungen beschreiben die möglichen Prozesse in einem Cluster A B nach lokaler Ionisation des Moleküls A durch ein Photon  $h\nu$ :



Situation **b.i** ist der übliche Fall, bei dem der Cluster aus einem Chromophor A und einem Solvensatom oder -molekül B besteht. B hat eine deutlich höhere Ionisationsenergie als A. Ein ET findet in diesem Fall nicht statt. Durch Bestimmen der Energie  $\Delta E$ , bei der erstmals Fragmente  $A^+$  zu beobachten sind, lässt sich die ionische Bindungsenergie des Clusters  $A^+ \cdot B$  bestimmen.

Fall **b.ii** ist zu beobachten, wenn die beiden Moleküle A und B ähnliche Ionisationsenergien aufweisen. Dies führt zu einer *charge resonance* (CR)-Wechselwirkung, d.h. einer Delokalisierung eines Elektrons über beide Moleküle. Das Elektron hat dabei eine umso höhere Aufenthaltswahrscheinlichkeit bei dem Molekül mit der höheren IE, je größer die Differenz der IE der Moleküle A und B (bei gleichzeitig abnehmender CR-Wechselwirkung) ist. Die CR- Wechselwirkung ist bei Homodimeren maximal und kann zu beträchtlichen Bindungsenergien im kationischen Cluster führen.

Seien  $\psi(A)$  und  $\psi(B)$  jeweils die Gesamt-WF des Moleküls A und B, und  $\psi(A^+)$  und  $\psi(B^+)$  die WF der zugehörigen Kationen, dann kann man für die WF des Clusters-Kations in erster Näherung schreiben:

$$\Psi_+ = \alpha\Psi(A^+)\Psi(B) + \beta\Psi(A)\Psi(B^+)$$

und

$$\Psi_- = \alpha\Psi(A^+)\Psi(B) - \beta\Psi(A)\Psi(B^+)$$

mit  $\alpha^2 + \beta^2 = 1$ . Der bindende Zustand  $\Psi_+$  ist besetzt und hat eine niedrigere Energie als die einzelnen Zustände, d.h. die Ionisationsenergie für den Cluster A B ist abgesenkt. Der antibindende Zustand  $\Psi_-$  ist nicht besetzt, kann jedoch durch einen infrarot-induzierten und von einer Fragmentation gefolgt  $\Psi_- \leftarrow \Psi_+$  Übergang nachgewiesen werden<sup>151</sup>.

Dabei findet eine Ladungstrennung statt, und das Elektron verbleibt mit der Wahrscheinlichkeit  $\alpha^2$  bei Molekül B.

Bei **b.iii** schließlich liegt die IE des Moleküls B unter der IE des Moleküls A. Die *charge resonance*-WW nimmt bei zunehmender Differenz der Ionisationsenergien ab und das Elektron ist stärker auf dem Molekül A mit der höheren IE lokalisiert. Für die Präparation eines ladungstrennten Ausgangszustands mit dem Elektron auf dem Molekül B muss man erreichen, dass Molekül A trotz seiner höheren IE *selektiv* (lokal) ionisiert wird. Dies kann durch resonante Zwei-Photonen-Absorption geschehen, wie in Abbildung 6.2 gezeigt.

Anschließend findet dann ein ET von B nach A statt. Massenspektrometrisch wird der ET durch die Detektion des aus der Dissoziation des ionisierten Clusters hervorgehenden Fragments  $B^+$  nachgewiesen<sup>151, 152</sup>, wenn die kationische BE überschritten wird.

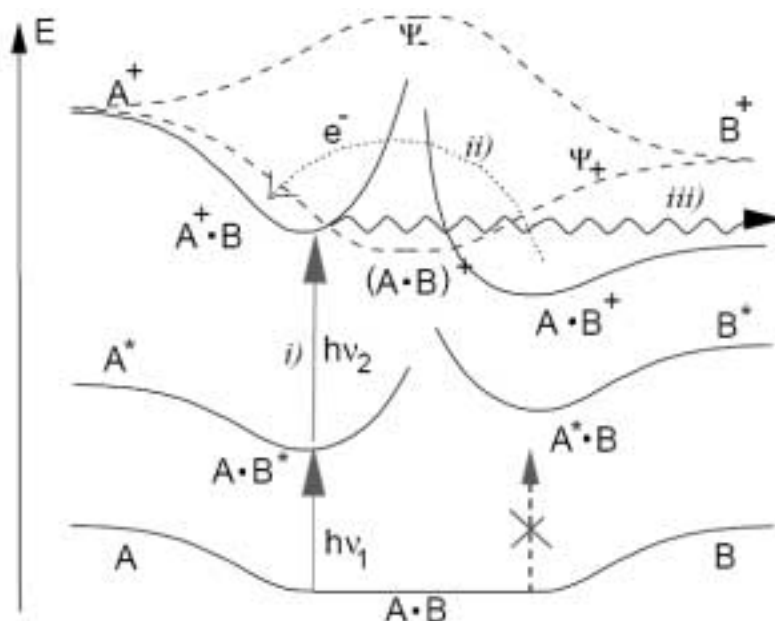


Abbildung 7-2 Elektronentransfer in einem Cluster A·B nach Zwei-Photonen-Ionisation. *i)* Lokale Ionisation des Clusters bei A. *ii)* Elektronentransfer von B zu A:  $A^+B \rightarrow A+B^+$ . *iii)* Die Bindungsenergie von  $A+B^+$  ist überschritten: Cluster dissoziiert unter Freisetzung von  $B^+$ .

## 7.2 Protonentransfer (PT)

Wie in Kapitel 5 beschrieben, konnte bereits ein Intermolekularer Protonentransfer als Ladungstransfer durch dPT in den Experimenten mit den Matrizes und den kurzkettigen Peptiden nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den Intermolekularer Ladungstransferprozessen finden in Peptiden Intramolekulare Ladungstransfers statt. Diese sind gegeben durch innere Wasserstoffbrücken, Ladungstransferinteraktionen, Ladungsdelokalisation und Ringschluss.

Von besonderem Interesse ist neben dem intermolekularen Protonentransfer der intramolekulare Protonentransfer entlang einer Peptidkette.

Diese Art der Interaktion von Peptiden und Proteinen mit Protonen wurde in den letzten Jahren sehr ausgiebig experimentell und theoretisch studiert<sup>153-157, 104</sup>. Zweifellos spielen solche Interaktionen in wässriger Umgebung eine entscheidende Rolle in allen biologischen Systemen. Beispielsweise fungieren Protonentransfers als erste katalytische Reaktion in

vielen enzymatischen Reaktionen<sup>153</sup>, im besondern bei der Hydrolyse von Amidbindung bis hin zum bioenergetischen Protonentransport (ATPase)<sup>158</sup>. Bedingt durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Wasser und dem Peptid erfolgt eine Änderung der Geometrie und Konformation, was wiederum zur Änderung der biologischen Aktivität führt.

Massenspektrometrische Gasphasenstudien von Protonenübertragungen erhielten ihre Wichtigkeit mit der Entwicklung von neuen verschiedenen Peptiden und Proteinen. Die Anwendungen von weichen Ionisationsmethoden wie Fast Atombombardement (FAB), Matrix-assisted Laserdesorption/Ionisierung (MALDI), und die Elektrospray Ionisierung (ESI) ermöglichten die Aufklärung des Übertragungsprozesses.

Oligopeptide und Proteine enthalten mehrere Bindungsstellen zur Assoziation von Protonen. Dies sind die terminalen Aminosäuregruppen, die Carbonyl Sauerstoffe, die Amidstickstoffatome vom Peptideketten Rückgrat und auch die Seitenketten (z.B bei Lysin, Arginin, Histidin). Die beste Position auf dem Peptideketten-Rückgrat, an dem das Proton gebunden werden kann, ist die terminale Aminosäuregruppe, aufgrund ihrer hohen Basizität<sup>159</sup>. Dies entspricht den in Kapitel 5.3 aufgeführten Ergebnissen bei der Übertragung des Protons vom Matrixmolekül auf das Analytmolekül. Eine weitere Bindungsstelle, die zur Aufnahme eines Protons sehr geeignet ist, ist der Carbonyl-Sauerstoff.

Die Wechselwirkung an der Bindungsstelle ist besonders effektiv, wenn das übertragene Proton von einem anderen Carbonyl-Sauerstoff stabilisiert wird. Die Interaktion eines Protons mit dem Carbonyl-Sauerstoff von der Amidgruppe führt zu zwei Strukturen: E/Z Isomere. Eine Isomer-Interconversion (Änderung) geschieht durch Proton-Isomerisierung um die Doppelbindung der Carbonylgruppe. Da dieser Prozess Energie liefert, wird dieser Schritt als Prozessentscheidend betrachtet<sup>156</sup>.

Eine weitere energetisch günstige Bindungsstelle für das zu übertragene Proton ist der Stickstoff der Amidgruppe. Von diesem Standort kann das Proton auf den Nachbarcarbonyl

Sauerstoff übertragen werden. Diese Übertragung hat eine sehr hohe Aktivierungsbarriere<sup>160</sup>, die den zuvor beschriebenen Übertragungsprozess hindert.

Mit Hilfe von theoretischen Modellen, die durch quantenmechanischen Rechnungen unterstützt wurden, konnten Versuche unternommen werden, den Protonenübertragungsprozess zu erklären. Von Suhai et al<sup>161</sup> wurde durch das „mobile Proton model“ angenommen, dass die Protonierung auf die energetisch günstigere Stickstoff Atom der Amidbindung zur Schwächung der Peptidbindung führt. In Folge dessen entstehen Fragmente von Typ  $b_n$  und  $y_n$  durch Abspaltung der Peptidbindung. Eine Protonierung des Amid-Sauerstoffs verstärkt die Peptidbindung, im Vergleich zur neutralen Spezies.

Auf der anderen Seite ist bekannt, dass die Protonierung am Stickstoff Atom der Amidbindung thermodynamisch ungünstiger als die Protonierung am Amid-Sauerstoff oder an der N-terminale Aminosäure der Peptidsequenz bzw. an der Seitenkette der basischen Aminosäuren wie z.B. Lysin, Arginin ist.

Quantenchemische Rechnungen zeigen, dass die Bindung des Protons im neutralen Cluster entweder über das N-oder das C-terminale Ende des Peptids erfolgt. Für die ionischen Cluster ist aber das N-terminale Ende des Peptids bevorzugt<sup>161</sup>.

Trotz dieser theoretischen Modelle konnte bisher keine genaue Aussage über den Mechanismus der Protonübertragung gemacht werden.

Experimentell konnte bereits von Meffert<sup>126</sup> gezeigt werden, dass die Protonenübertragung von dem Matrixmolekül auf die N-terminale Aminosäure der Peptidkette stattfindet.

### 7.2.1 Intramolekularer Protonen Transfer in Peptiden

Im Rahmen weiterer Experimente sollten zusätzliche Hinweise über den Verlauf des Intramolekularen Protonentransferprozesses gesucht werden. Hierzu wurden Untersuchungen an verschiedenen Di- bis Tetrapeptiden unternommen.

## 7. Protonentransfer über die Peptidbindung

Besonderes Augenmerk wurde in den nachfolgenden Massenspektren auf den Protonentransfer entlang der Peptidkette gerichtet. Zusätzlich auftretende Massensignale sowohl von homogenen als auch heterogenen Clustern werden in diesem Zusammenhang bewusst vernachlässigt.

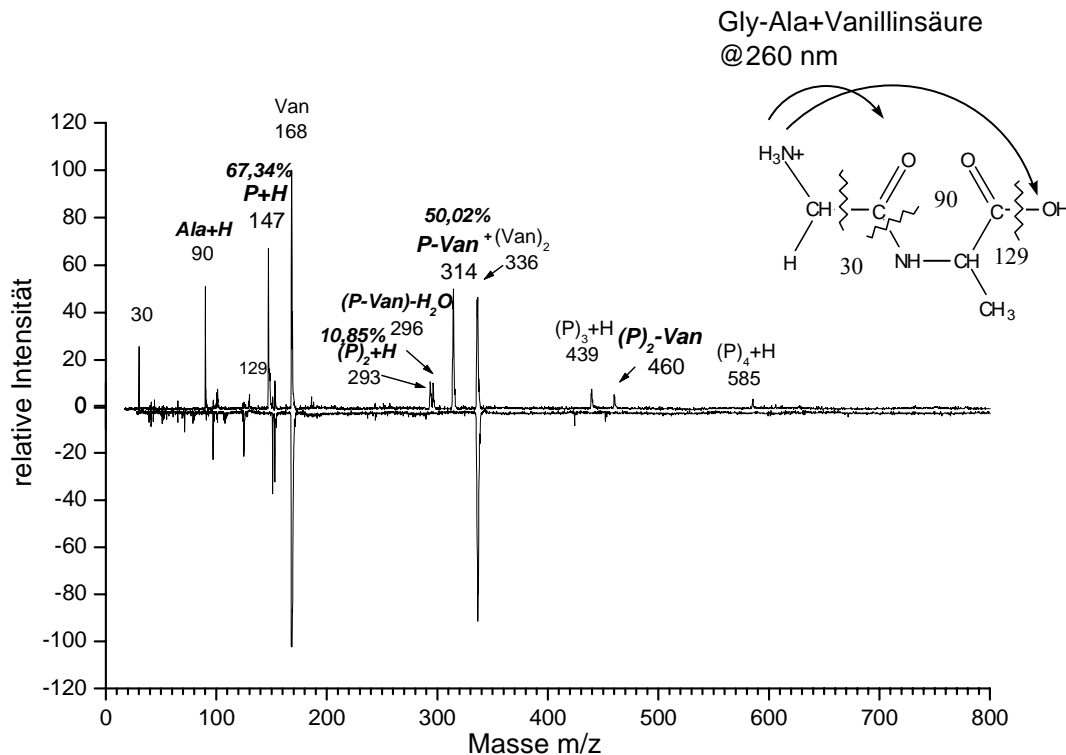


Abb.7-3: REMPI-ReTOF-MS von Gly-Ala mit Vanillinsäure bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$

In Abbildung 7.3 wird dargestellt, dass es zu einem Bindungsbruch zwischen der N-terminal und C-terminal Aminosäure an den Peptidbindung kommt. Deutlich wird dieses durch das Auftreten des Fragmentions  $m/z$  90, das dem protonierten Alanin entspricht. Das Massensignal bei  $m/z$  30 entsteht aus decarboxylierten sowie deprotonierten Acyliumion des N-terminalen Glycins. Dies ist ein signifikanter Hinweis auf den Protonentransfer von Glycin zu Alanin.

In weiteren Experimenten mit einfachen Dipeptiden konnten die Ergebnisse des Protonentransfers bestätigt werden. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 7.1 aufgeführt.

## 7. Protonentransfer über die Peptidbindung

---

Tabelle 7.1

Dipeptid	N-Fragment(m/z)	Acyliumion des N-Fragments(m/z)	Protoniertes C-Fragment(m/z)	Protoniertes Acyliumion des C-Fragments(m/z)
Gly-Leu	-	30	Leu+H (132)	86
Gly-Ser	-	30	Ser+H (106)	-
Ala-Gly	Ala (89)	44	Gly+H (76)	29
Gly-Glu	-	30	Glu+H (148)	102
Glu-Gly	-	102	-	29
Gly-Gly	Gly (75)	-	Gly+H (76)	29
Leu-Leu	Leu (146)	103, 131	Leu+H (147)	86, 114

a) Die Strukturformen mit den Fragmentierungsmustern sind im Anhang B aufgeführt.

Analog zu den Dipeptiden konnte bei Tri- und Tetrapeptiden, unter identischen experimentellen Bedingungen, ebenfalls der Intramolekulare Protonentransfer von der N-terminale Seite der Peptidkette zur C-terminalen Seite beobachtet wird. In den Abbildungen 7.4 und 7.5 sind exemplarisch die Massenspektren eines Tripeptids sowie Tetrapeptids aufgeführt.

## 7. Protonentransfer über die Peptidbindung

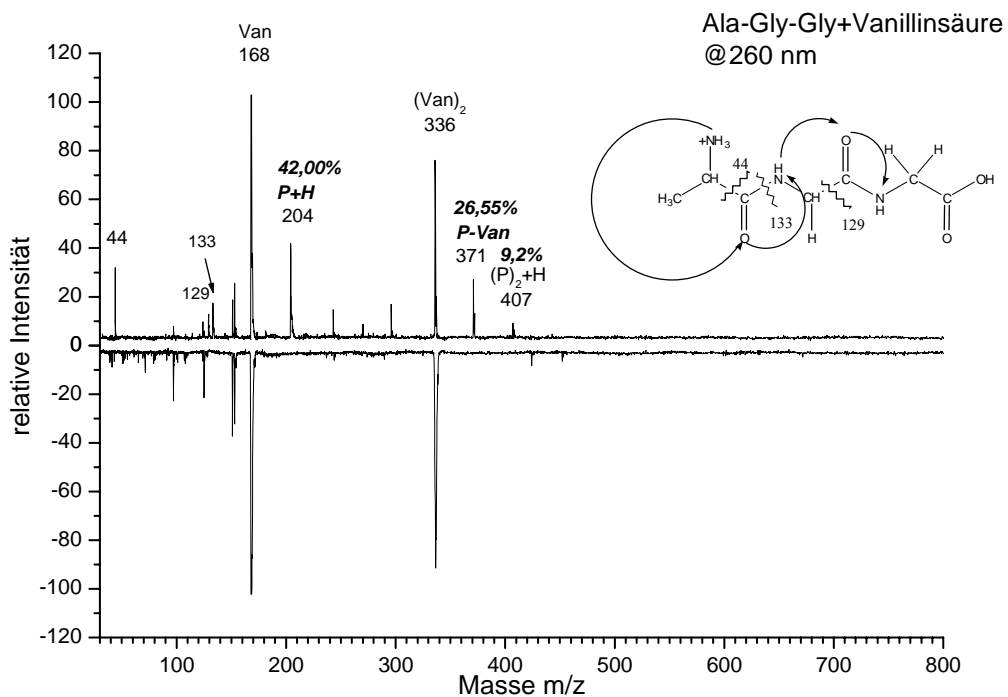


Abb.7-4: REMPI-ReTOF-MS von Ala-Gly-Gly mit Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

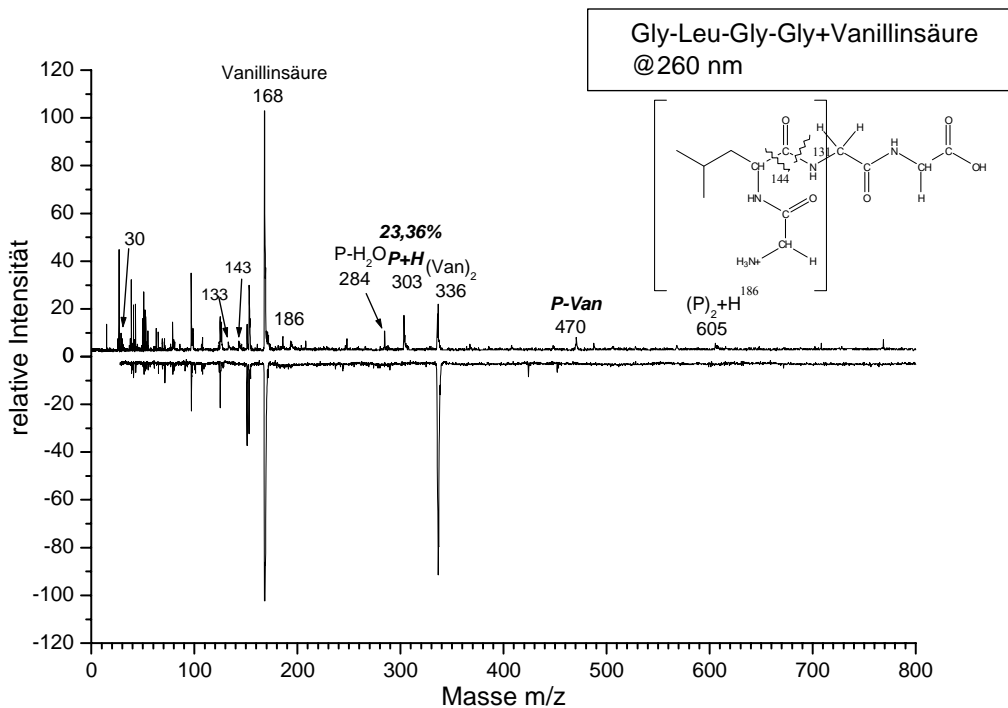


Abb.7-5: REMPI-ReTOF-MS von Gly-Leu-Gly-Gly mit Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm



## 7. Protonentransfer über die Peptidbindung

---

Neben dem Tripeptid Ala-Gly-Gly und dem Tetrapeptid Gly-Leu-Gly-Gly wurden weitere Untersuchungen an Tri- und Tetrapeptiden durchgeführt. Einige der erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7.2 dargestellt.

Tabelle 7.2

Tri-Tetrapeptid	N-Fragment(m/z)	Acyliumion des N-Fragments(m/z)	Protoniertes C-Fragment(m/z)	Protoniertes Acyliumion des C-Fragments(m/z)
Gly-Ala-Gly	Gly-Ala (129)	-	Ala-Gly+H (147)	-
Gly-Gly-Ala	-	30,	Gly-Ala+H (147)	44, 129
Gly-Gly-Leu	Gly-Gly (132)	30	Gly-Leu+H (189) Leu+H (132)	86
Gly-LeuGly	-	30	Leu-Gly+H (189)	86
Leu-Gly-Gly	Leu (147)	86	-	75,117, 144, 160
Gly-Lys-Gly	Gly (75)	30	-	185, 229
Gly-Gly-Lys	-	30	-	185, 229
Gly-Gly-Gly	Gly(75)	30	Gly-Gly+H (132)	115
Lys-Gly.Gly.Lys	-	102	Gly-Gly- Lys +H (260)	116
Gly-Leu-Gly-Gly		30, 143, 186	Gly-Gly+H (132)	-
Lys-Gly-Gly-Lys	Lys (146)	129	Gly-Lys+H (203)	186, 203

b) Die Strukturformen mit den Fragmentierungsmustern sind im Anhang B aufgeführt.

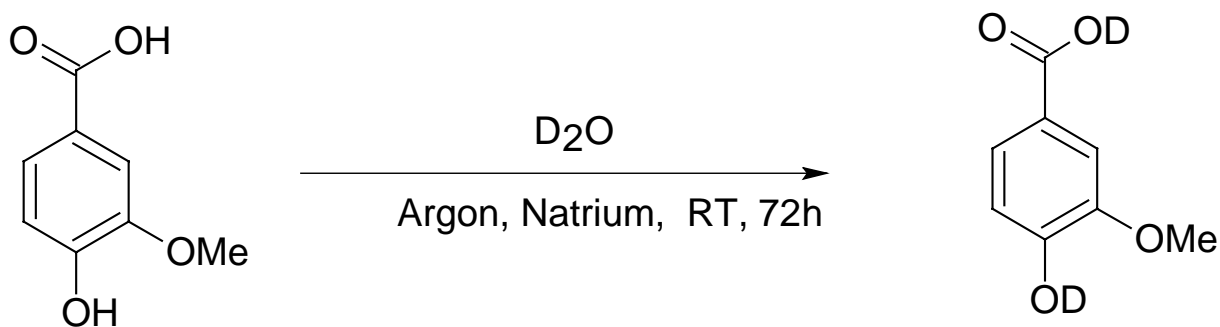
## 7. Protonentransfer über die Peptidbindung

---

Um sicher zu stellen, dass das Proton von der Matrix auf der C-terminale Ende der Aminosäure übertragen wird und anschließend der Transfer vom N-Terminus zum C-Terminus stattfindet, wurden weitere Untersuchungen zunächst mit der kleinsten Peptideneinheit, dem Dipeptid, und der deuterierten Vanillinsäure als Matrix durchgeführt.

Hierzu musste die Vanillinsäure in einer einfachen Synthese deuteriert werden. Die Darstellung der deutierten Vanillinsäure erfolgte wie in der Abbildung (7.6) schematisch dargestellt.

Die deuterierte Vanillinsäure wurde bei Raumtemperatur unter basischen Bedingungen, mit elementarem Natrium, durch Rühren in D<sub>2</sub>O unter Argon als Schutzgas hergestellt. Dabei wurde sowohl das hydroxylische Proton als auch das Säure Proton durch Deuterium ausgetauscht.



**Abbildung 7-6 Schema zur Darstellung der deuterierten Vanillinsäure**

Bestätigt wurde die vollständige Deuterierung des phenolischen Protons und des carboxylischen Protons der Vanillinsäure durch Aufnahme eines 300 MHz <sup>1</sup>H-NMR's in deuterio Methanol (CD<sub>3</sub>OD) siehe Abbildung. 7.7. Das Signal bei 4.9 ppm für die OH Gruppen der Vanillinsäure wurde in Spektrum nicht beobachtet.

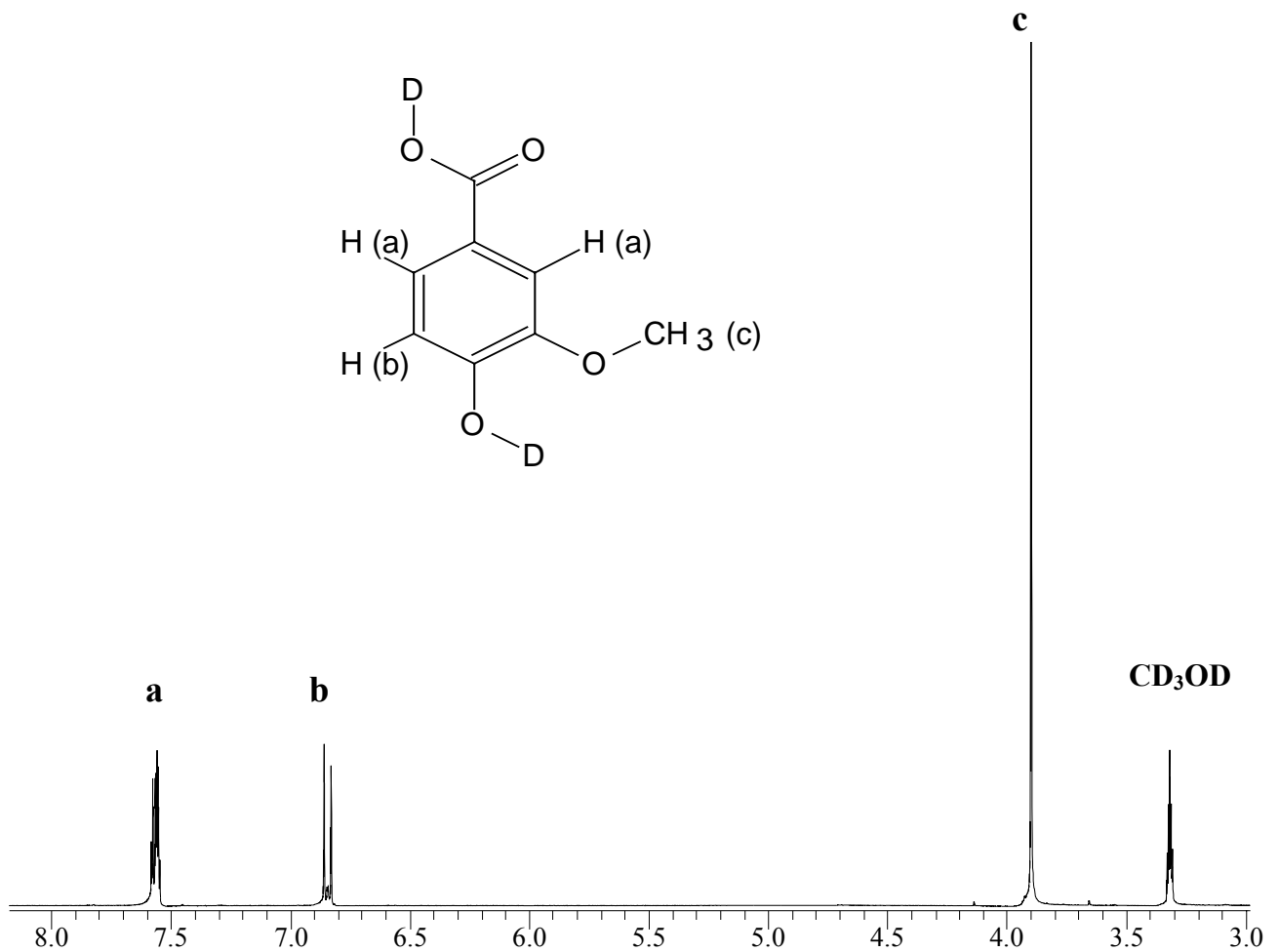
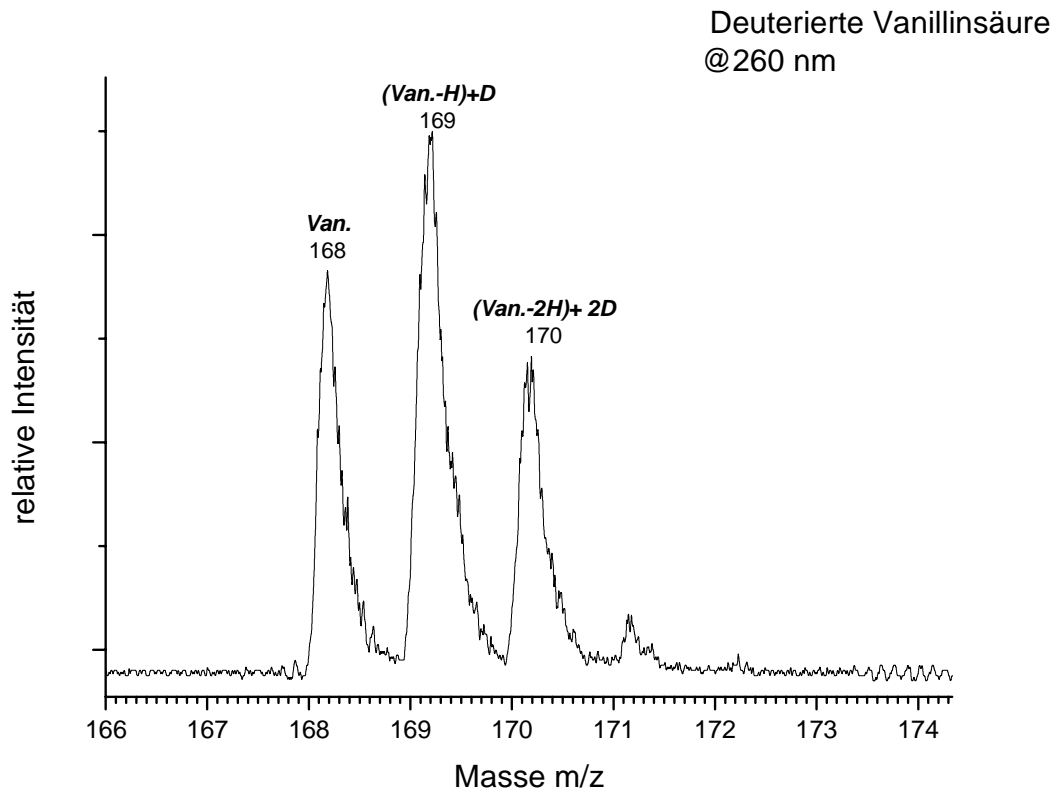


Abb. 7-7: <sup>1</sup>H-NMR der deuterierten Vanillinsäure

In Abbildung 7.8 ist der Austausch der beiden Protonen durch Deuterium zu beobachten. Der Peak bei  $m/z$  169 zeigt die einfach deutierte Vanillinsäure, zusätzlich ist das Signal bei  $m/z$  170 durch die zweifach deuterierte Vanillinsäure gegeben.

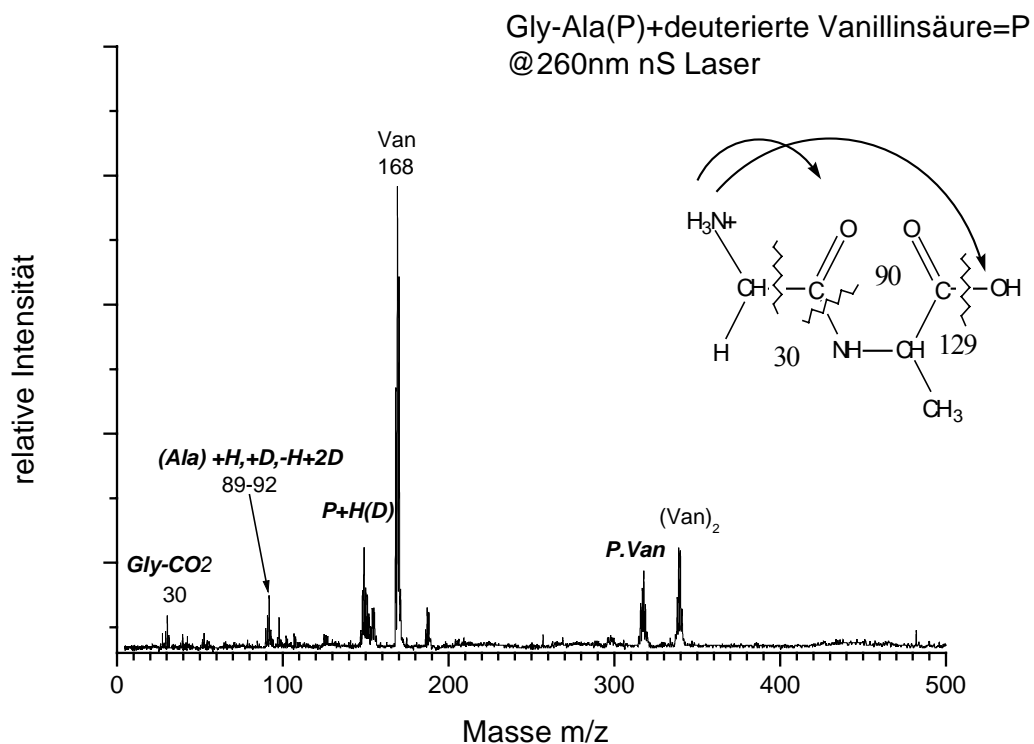


**Abb.7-8: REMPI-ReTOF-MS von deuterierte Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm**

Wie schon vorher beschrieben wurde, konnte Experimentell bereits gezeigt werden, dass die Protonenübertragung von dem Matrixmolekül auf der N-terminalen Aminosäure der Peptidkette stattfindet.

Falls der Protonentransfer aus den N-terminalen Aminosäuren zum C-terminalen Ende des Peptids erfolgt, sollte die Bildung von deuterierte C-terminalen Fragmente beobachten werden.

Die Abbildung 7.9 zeigt das für das Gemisch von deuterierter Vanillinsäure mit dem Dipeptid Gly-Ala erhaltene Massenspektrum



**Abb.7-9: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Ala und deuterierte Vanillinsäure bei**

$\lambda = 260 \text{ nm}$

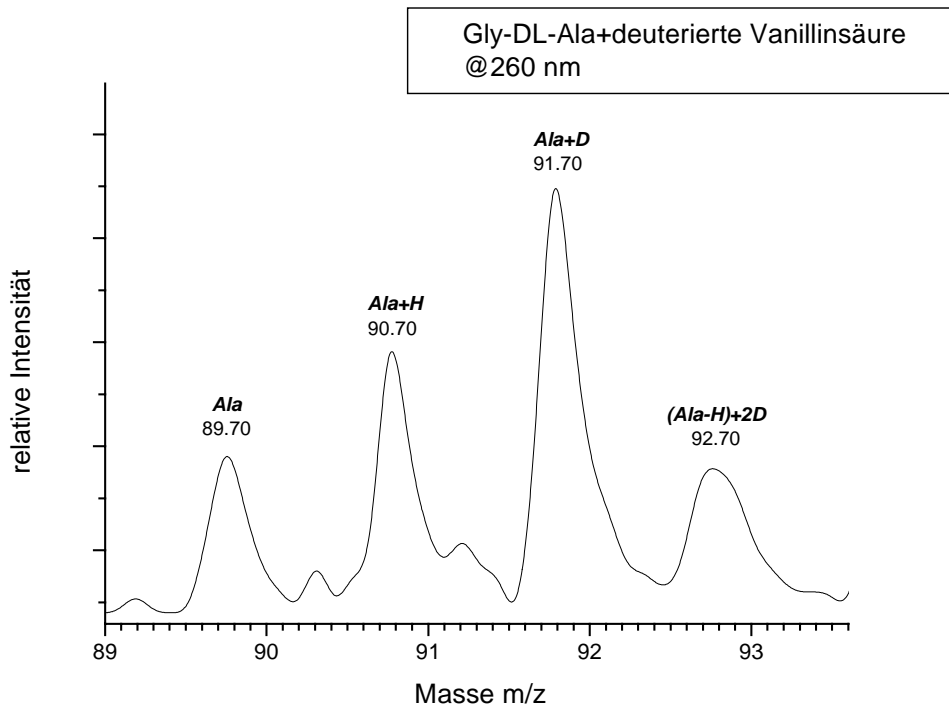
Neben dem homogenen Cluster der Matrix und dem heterogenen Cluster zwischen Matrix und dem Dipeptid wurde die Bildung des protonierten bzw. deuterierten Analytmoleküls sowie die protonierten bzw. deuterierten Fragmentionen des Dipeptids beobachtet. Besonders auffällig ist die vorgefundene und zugleich typische Signalbreite im Massenspektrum.

Wie zuvor erwähnt, sollte der Protonentransfer von der N-terminale Seite zur C-terminale Seite nachgewiesen werden, somit es ist Nahe liegend das C-terminal Fragmentation des Dipeptids Gly-Ala genauer zu betrachten (siehe Abbildung 7.10). Der Ausschnitt des Massenspektrums zeigt das C-terminal Fragmentation Ala. Da die Deutierung der Vanillinsäure nicht vollständig war, wurden Signale des einfach protonierten Fragments sowie des einfache und zweifach deutierten Ala-Fragment detektiert.

## 7. Protonentransfer über die Peptidbindung

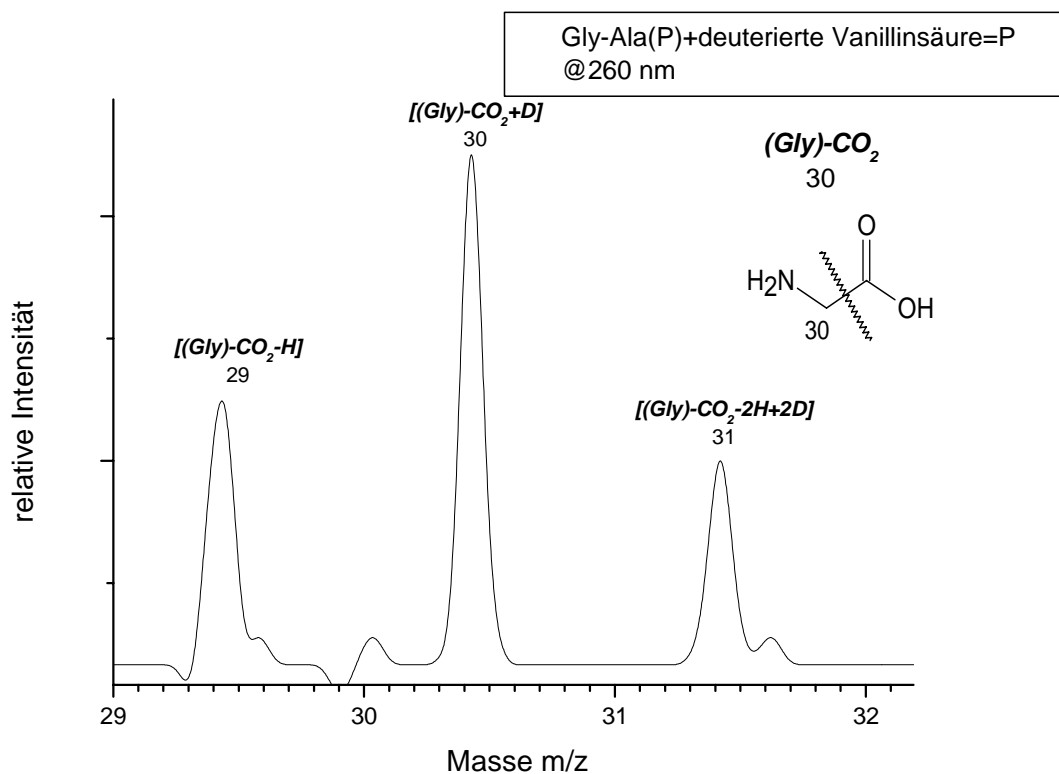
---

Dieser Signalsatz deutet auf den Protonen bzw. Deuterium Transfer von der N-terminale Aminosäure zur C-terminale Aminosäure entlang der Peptidkette hin.



**Abb.7-10: Ausschnitt vom REMPI-ReTOF-MS des Dipeptids Gly-Ala und deuterierte Vanillinsäure bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$**

Ein weiterer Hinweis auf den Protonen Transfer von der N-terminalen Seite zeigt das decarboxylierte Acyliumion der N-terminalen Aminosäure Glycin, das ursprünglich bei m/z 30 erscheinen sollte (Abbildung 7.11). Aufzufinden waren lediglich das deprotonierte Acyliumion bei m/z 29, das einfach deuterierte Acyliumion (m/z 30) und das zweifach deuterierte Acyliumion (m/z 31).



**Abb.7.11:** Ausschnitt vom REMPI-ReTOF-MS des Dipeptids Gly-Ala und deuterierte Vanillinsäure bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$

Ebenso wie bei den Dipeptiden sollte die Darstellung des Protonentransfers innerhalb der Peptidkette eines Tripeptids sowie Tetrapeptids möglich sein. Deswegen wurden in weiterführenden Experimenten der Protonen Transfer anhand Tri- und Tetrapeptiden durchgeführt.

Anhand des Tripeptid Gly-Gly-Leu und des Tetrapeptid Gly-Leu-Gly-Gly ist der Protonentransfer über die vollständige Peptidsequenz in einem Massenspektrum zu erkennen. In den folgenden Abbildung von 7.12-7.15 ist die Protonen Übertragung vom N-terminalen zum C-terminalen Ende Peptidsequenz eindeutig zuzuordnen.

In Abbildung 7.12 ist das gesamte Massenspektrum des Tripeptid Gly-Gly-Leu aufgeführt. Von besonderem Interesse sind lediglich die angedeuteten Fragmente, durch die man den Protonen Transfer erklären kann. Hierfür wurden die Massenbereich von m/z 75 bis 78, 130 bis 136 und 160 bis 200 vergrößert dargestellt.

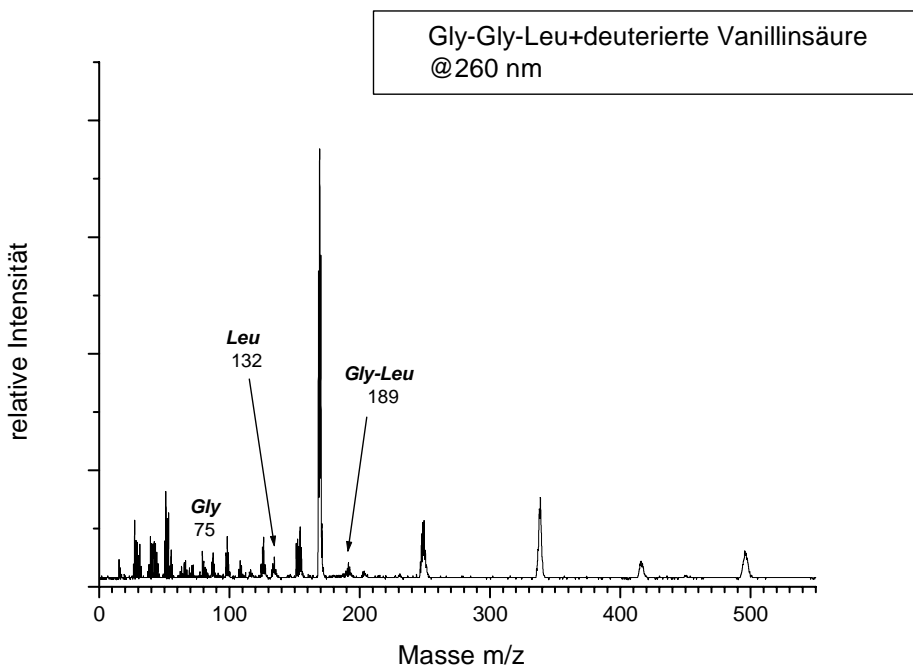


Abb. 7-12: REMPI-ReTOF-MS des Tripeptids Gly-Gly-Leu und deuterierte Vanillinsäure bei

$\lambda = 260 \text{ nm}$

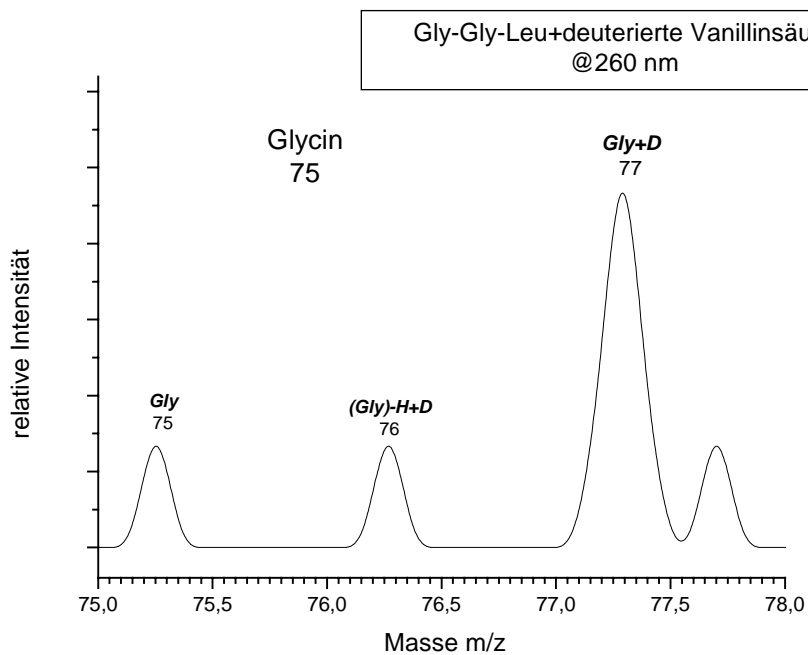


Abb. 7-13: Ausschnitt vom REMPI-ReTOF-MS des Tripeptids Gly-Gly-Leu und deuterierte Vanillinsäure bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$



## 7. Protonentransfer über die Peptidbindung

Bereits im ersten Massenbereich  $m/z$  75 bis 78 sieht man das protonierte bzw. deuterierte N-terminale Fragment Glycin. Im zweiten Massenbereich (Abbildung 7.14) von  $m/z$  160 bis 200 wurde das Proton bzw. das Deuterium vom N-terminalen Glycin zu dem Rest des Peptids Gly-Leu ( $m/z$  190-192) transferiert.

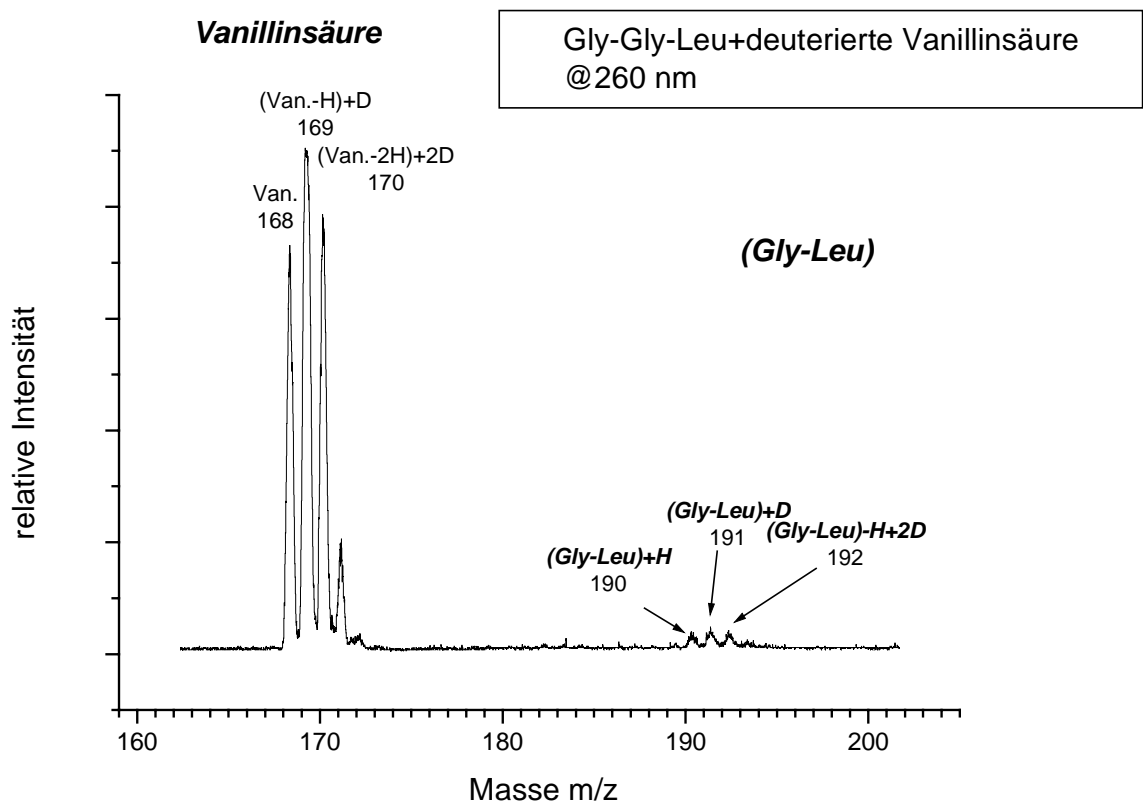
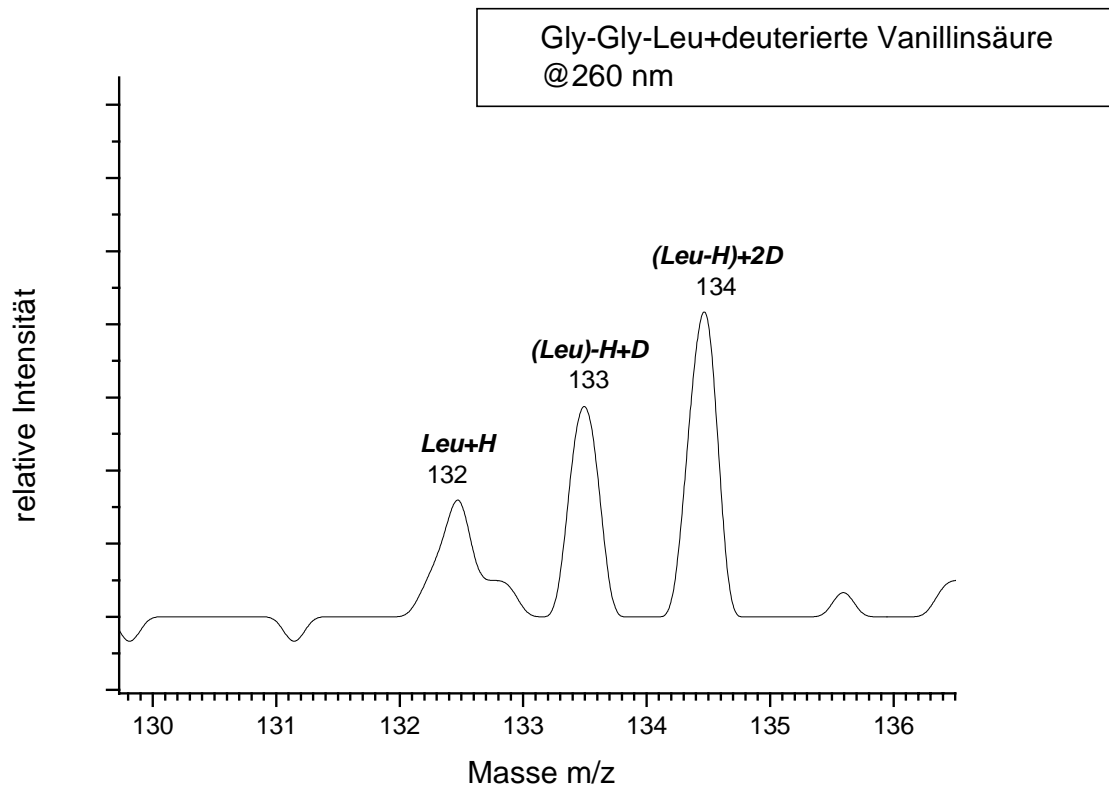


Abb. 7-14: Ausschnitt vom REMPI-ReTOF-MS des Tripeptids Gly-Gly-Leu und deuterierte Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

## 7. Protonentransfer über die Peptidbindung

---

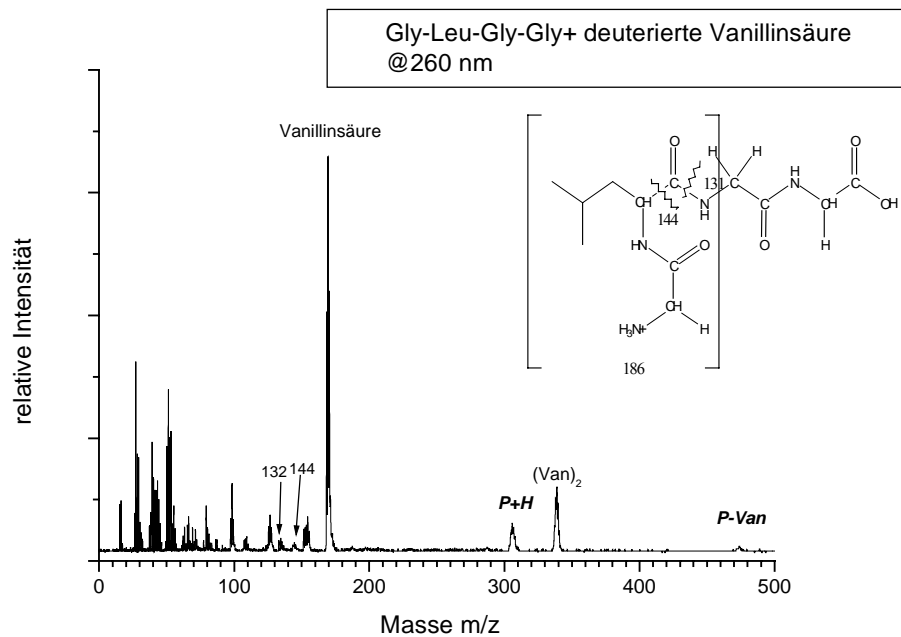
Abschließend wird das Proton bzw. das Deuterium auf das Fragmentation der C-terminalen Aminosäure Leucin übertragen (Abbildung 7.15).



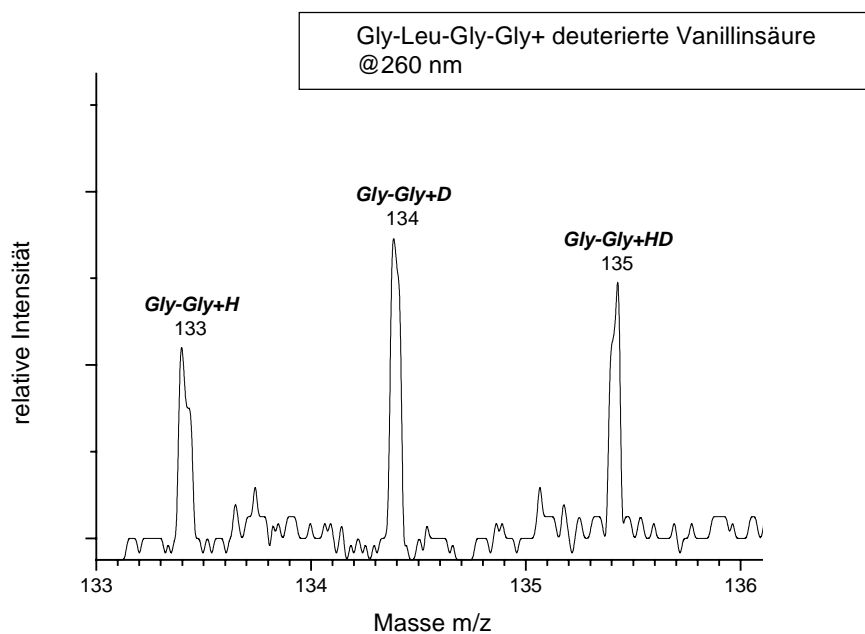
**Abb. 7-15: Ausschnitt vom REMPI-ReTOF-MS des Tripeptids Gly-Gly-Leu und deuterierte Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm**

Analoge Ergebnisse der Protonübertragung konnten beim Tetrapeptid Gly-Leu-Gly-Gly gefunden werden. Die dazu gehörigen Massenspektren sind in den Abbildungen 7.16-7.17 dargestellt.

## 7. Protonentransfer über die Peptidbindung



**Abb.7-16: Ausschnitt vom REMPI-ReTOF-MS des Tetrapeptids Gly-Leu-Gly-Gly und deuterierte Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm**



**Abb.7-17: Ausschnitt vom REMPI-ReTOF-MS des Tetrapeptids Gly-Leu-Gly-Gly und deuterierte Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm**

## 8 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels eines ReTOF-Massenspektrometers die Clusterbildung aufgrund nicht-kovalenter Wechselwirkungen, zwischen Matrixmolekülen und kurzkettigen Peptiden (Di-, Tri- und Tetrapeptiden) untersucht. Nach der Desorption mit einem IR-Laser werden die Moleküle mit einem Überschallgasstrahl (Jet) in die Ionisationskammer transportiert und dabei gleichzeitig in ihren inneren Freiheitsgraden abgekühlt. Dies ermöglicht die Bildung von schwach gebundenen Clustern.

Mit dem ursprünglichen ReTOF-Massenspektrometer war die Untersuchung der Peptidclusterbildung nur mit einem fs-Laser erfolgreich. Mit einem ns-Laser konnten keine Hinweise auf Peptidclusterbildung gefunden werden. Durch Umbau der Apparatur, wobei der Abstand zwischen der Desorptionskammer und der Ionisationskammer verkürzt wurde, konnten die mit dem IR-Laser desorbierten Moleküle wegen der kürzeren adiabatischen Expansionsstrecke die Skimmeröffnung optimal im Mittelpunkt treffen, was zu einer Erhöhung der Teilchenzahl in der Ionisationskammer führt. Dies ermöglicht eine effektive Steigerung der Ionisationswahrscheinlichkeit und somit eine Verbesserung der Signalintensität bei der folgenden Ionisation mit ns-Laser-Pulsen.

Die Multiphotonen-Ionisation bietet viele Vorteile, die gerade bei der Untersuchung von Biomolekülen von großem Nutzen sind. Zunächst einmal handelt es sich um eine Ionisierungsmethode, bei der dem Molekülion nur eine geringe, genau definierte Überschussenergie übertragen wird. Die Überschussenergie beträgt zwischen 0 und 3 eV und teilt sich auf, in die kinetische Energie des Photoelektrons und die verbleibende innere Energie im Molekülion. Die niedrige innere Energie verhindert größtenteils die Fragmentierung labiler Biomoleküle bzw. der Cluster. Es kann somit das Molekülion bzw. das Clusterion detektiert werden. Durch Änderung der Photonenergie, d.h. der Wellenlänge, oder durch Änderung der Lichtintensität kann die Fragmentierung direkt

beeinflusst werden. Eine Erhöhung des Absorptionsquerschnittes wurde durch das Beimischen von Graphitpulver während der Probenpräparation erreicht.

In der vorliegenden Arbeit konnten mit der Kombination aus Laserdesorption von neutralen Molekülen in einen Jet und Multiphotonen-Ionisation thermolabiler Verbindungen Cluster aus Peptiden untersucht werden. Diese Peptide werden nicht durch direkte Photoionisation gebildet, da die Moleküle über kein chromophores System verfügen. Um diese nicht chromophoren Peptide zu detektieren, wurden diese mit verschiedenen Derivaten der Benzo-säure bzw. Zimtsäure, die üblicherweise als Matrixsubstanzen in der Matrixunterstützen Laserdesorption/Ionisation (MALDI) eingesetzt werden, vermessen.

In einer Vielzahl von Clusteruntersuchungen konnte erfolgreich gezeigt werden, dass:

- Die Bildung von Peptidcluster mit ns-Laser in der Gasphase
- Die Bildung von protonierten homogenen Peptidclustern bzw. heterogenen Cluster der Matrix

möglich ist.

Mit Hilfe der durchgeführten Untersuchungen zur Clusterbildung wurde die Bildung des protonierten Analytmoleküls durch dissoziativen Protonentransfer (dPT) vom Matrixradikalkation im Anschluss an die Multiphotonenionisation beobachtet.

Im Falle der Dipeptide nimmt das protonierte Peptidmolekül (P+H) Signal mit steigender Protonenaffinität der C-terminalen Aminosäure zu. Dagegen findet man bei Tri- und Tetrapeptiden eine anwachsende Signalintensität, des P+H-Signals, bei zunehmender Protonenaffinität der N-terminalen Aminosäure. Weiterhin beobachtet man, dass die relative Signalintensität des protonierten Peptids mit wachsender Größe zunimmt.

Unklar war allerdings, von welcher funktionellen Gruppe der Matrizes das Proton stammt. Um den Ort des Protonentransfers zu klären, wurde in verschiedenen selektiven Blockierungsversuchen des Protons der Carboxylgruppe sowie des phenolischen Protons der Matrix die Protonenübertragung studiert.

Es konnte gezeigt werden, dass das phenolische Proton aus dem aromatischen Ring und nicht das Proton der Carboxylfunktion der Matrix im dPT Prozess auf das Analytmolekül übertragen wird (Umkehr der Basizität zwischen Lösung und Gasphase).

Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch Deuterierungsversuche mit vollständig deuterierter Matrix (Vanillinsäure). In den erhaltenen Massenspektren wurden deutlich deuterierte Peptidsignale als auch deuterierte Fragmentensignale gefunden.

Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass neben der Bildung von Clustern in der Gasphase, auch Gasphasenreaktionen nachgewiesen werden konnten. Neben der einfachen Proton-Übertragung wurden auch Reaktionen zwischen dem Protonendonator und dem Peptid beobachtet. Ist der Protonendonator eine Aminosäure z.B. Tryptophan, kommt es zur Wasserabspaltung aus dem ionisierten Cluster und damit zur Bildung einer Peptidbindung zwischen der Aminosäure und dem eingesetzten Peptid. Die Tatsache, dass trockene feste Proben verwendet wurden, lässt darauf schließen, dass keine direkte chemische Bindung zwischen Matrixmolekül und Probenmolekül vor der Untersuchung im Massenspektrometer stattgefunden hat. Folgende Ergebnisse in Bezug auf Gasphasenreaktionen mit Tryptophan als Protonendonator sind hier aufgeführt.

- Die Wasserabspaltung aus dem ionisierten Peptid-Matrix-Cluster zeigt, dass man Peptid-Ketten-Verlängerungen und damit die Bildung Peptidbindungen in der Gasphase beobachten kann.
- Die relative Signalintensität der Wasserabspaltungssignale nimmt bei Übergang von 260 nm zu 290 nm zu. Das bedeutet, dass die Reaktion der Peptidbindungsbildung eine geringere Aktivierungsenergie besitzt.

- Beim dissoziativen Protonentransfer wird das Proton vom Stickstoff des Indolrings des Tryptophans auf das Analytmolekül übertragen. Dies konnte durch Experimente mit geschützten Derivaten des Tryptophans bewiesen werden.
- Charakteristische Fragmentierungsbäume für Tri- und Tetrapeptide wurden mit Hilfe der Massenspektren dargestellt.

Wie bereits erwähnt konnte der Intermolekulare Protonentransfer als Ladungstransfer durch dPT in den Experimenten mit den Matrices und den kurzkettigen Peptiden nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den Intermolekularen Ladungstransferprozessen finden in den Peptiden Intramolekulare Ladungstransfers statt. Diese sind gegeben durch innere Wasserstoffbrücken, Ladungstransferinteraktionen, Ladungsdelokalisation und Ringschluss.

Basierend auf den Ergebnissen der Fragmentierungsreaktionen in zahlreichen Versuchen von Di- Tri und Tetrapeptiden mit Vanillinsäure als Matrix, und durch zusätzliche Experimente mit vollständiger Deuterierung des phenolischen Protons und des carboxylischen Protons der Vanillinsäure konnte bei den Di- Tri- und Tetrapeptiden unter identischen experimentellen Bedingungen nachgewiesen werden, dass der Intramolekulare Protonentransfer von der N-terminalen Seite der Peptidkette zur C-terminalen Seite stattfindet.

Die oben beschriebenen neuen Erkenntnisse werfen wiederum viele neue Fragestellungen auf, die genauer untersucht werden müssen. Einige dieser Fragen wären z.B.:

- Ob die Bildung der Peptidbindung auch mit anderen Aminosäuren oder Peptiden als Matrix möglich ist.
- Ob die Bildung der Peptidbindung in der Gasphase auch bei größeren Peptiden möglich ist.
- Wie der Protonentransferprozess bei Aminosäuren mit aromatischer Seitenkette wie z.B. Tyrosin, Tryptophan, Histidin und Phenylalanin abläuft.

Zur Klärung dieser Fragen sind Lebensdauermessungen am angeregten Zustand durch Laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) sowie der Einsatz von Ionisationslasern mit höheren Photonendichten geeignet. Die Erhöhung der Photondichte kann bei gleich bleibender Energie durch eine Verkürzung der Laserpuls-Dauer vom Nanosekunden (ns) über den Pikosekunden (ps)-in den Femtosekunden (fs)-Bereich erreicht werden.



## 9 Literaturverzeichnis

- 1 Joshua Jortner Level structure and dynamics of clusters  
Ber.Bunsenges.Phys.Chem 88 (1984)188.
- 2 A.W. Caslleman Jr., K. Bowen Jr. Clusters: structure, energetics, and  
dynamics of intermedate states of matter J.Phys. Chem.100 (1996) 12911.
- 3 H.J. Neusser, Int. J.Mass Spectrom. Ion Proc. 79, 141 (1987)
- 4 S.H. Lin, Y.Fujimura, H.J. Neusser, E,W.Sclag, Multiphoton Spectroscopy  
of Molecules, Quantum Electronics, Principles and Applications (Academic  
Press, New York, 1984)
- 5 F.A Cotton, J.Chem.Ed.(1983), 60, 713.
- 6 M.R. Hoare, Adv. Chem.Phys. (1979), 40, 49.
- 7 H.Haken, H.C. Wolf Moleülphysik und Quantenchemie Springer Berlin  
(1991).
- 8 E. G. Robertson, J.P. Simons, Conformational and supramolecular  
landscapes in small biomolecules and their hydrated clusters, PCCP, (2001),  
3, 1-18.
- 9 W.D. Lehmann, Massenspektrometrie in der Biochemie,Spektrum  
Akademischer Verlag Berlin (1996).
- 10 H. Musso, Angew.Chem. 95, 827 (1983)
- 11 B.A.Mamyrin, V.I. Kaarataev, D.V. Shmikk, V.A. Zagulin, sov.phy.JETP  
37, (1973), 45.
- 12 J.R. Chapman, Computers in Mass spectrometry; Academic Press, New York  
(1987)
- 13 R.B. Merrifield, Festphasen-Synthese (Nobel- Vortrag), Angew. Chem. 97,  
801 (1985).
- 14 M.Bodanszky und A. Bodanszky, the practice of peptide Synthesis, Springer  
Verlag (1994).
- 15 W.König, Peptide and Protein Hormones, VCH verlagsgesellschaft  
Weinheim (1993).
- 16 P.Lloyd-Williams, F. Alberico, E. Giralt, Chemical Approaches to the  
Synthesis of Peptides and Proteins, CRC Press, Inc. (1997).

- 17 R.M. Kamp, T.Choli-Papadopoulou, B.Wittmann-Liebold, Protein Strukture Anaylsis. Preparation, Characteriziation and Microsequencing. Springer, Heidelberg (1997).
- 18 H.D. Jakubke, peptide. Chemie und Biologie, Spektrum, Heidelberg (1996).
- 19 Th. Wieland, The toxic peptides of Amanita phalloides. Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe, Bd. 25, 214 (1967), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 20 E.Atherton *et al.*, Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford (1989).
- 21 Th. Wieland und M. Bodanszky, The World of Peptides, Springer Verlag, Berlin heidelberg (1991).
- 22 R.L. Lundblad und C.M. Noyes, Chemical Reagents for protein Modification, Vol. 1 und 2, CRC Press, Boca Raton (1984).
- 23 K.hamaguchi, The Protein Molecule. Conformation, Stability and Folding, Springer-Verlag (1993).
- 24 T.P. Martin, Angew.Chem, 98, 197 (1986).
- 25 Popple, R.A., C. D. Finch, K. A. Smith und F. B. Dunning, J. Chem. Phys., 104(21): 8485-8489,( 1996).
- 26 Wegener, P. P. und J. – Y. Parlange, naturwiss., 57(11):525-5330, (1970).
- 27 Sáenz, J. J., J. M. Soler und N. Garcia, Surf. Sci., 156:121-125, (1985).
- 28 Hagen, O. F. und W. Obert, J. Chem. Phys., 56(5):1793-1802, (1972).
- 29 R.B. von Bremen, M.Snow, R.J. Cotter; Int. J. Mass Spectrom.Ion Proc. 49 (1983) 35.
- 30 L.P. Levine, J.F.Ready, E.Bernal, J. Appl.phys.38, (1968), 107.
- 31 F.J Vastola, A.J. Pirone, Adv. Mass Spectrom. 4 (1968), 107.  
F.J. Vastola, R.O. Mumma, Org. Mass Spectrom.6 (1972), 1373.
- 32 R.J. Cotter, Anal.Chem.53, (1981), 719.
- 33 R.B van Bremen, M. Snow, R.J. Cotter, Int.J. Mass Spectrom. Ion Proc. 49, (1983),35.
- 34 R.S.Toll,F.W. Röllgen, Z. Naturforsch.37a.(1982),.9.
- 35 G. M. Barrow, G. W. Herzog, *Physikalische Chemie* (Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig, (1984).

- 36 P. R. Kemper, P. Weis, M. T. Bowers, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 160, 17 (1997).
- 37 S. S. Hunnicutt, T. M. Branch, J. B. Everhart, D. S. Dudis, *J. Phys. Chem.* 100, 2083(1996).
- 38 L. Oudejans, R. E. Miller, *J. Phys. Chem. A* 101, 7582 (1997).
- 39 J. R. Grover, E. A. Walters, J. K. Newman, M. G. White, *J. Am. Chem. Soc.* 107, 7329 (1985).
- 40 C. Lifshitz, N. Ohmichi, *J. Phys. Chem.* 93, 6329 (1989).
- 41 J R:C Beavis, J.Linder, J.Grotemeyer, E.W.Sclag, *Chem. Phys.Letters* 146 (1988) 310.
- 42 H. Krause, B. Ernstberger, H.J. Neusser, *Chem. Phys. Lett.* 184, 411 (1991).
- 43 J. R. Grover, E. A. Walters, J. K. Newman, M. G. White, *J. Am. Chem. Soc.* 107, 7329 (1985).
- 44 C. Lifshitz, N. Ohmichi, *J. Phys. Chem.* 93, 6329 (1989).
- 45 N. Ohmichi, Y. Malinovich, J. P. Ziesel, C. Lifshitz, *J. Phys. Chem.* 93, 2491 (1989).
- 46 H. J. Neusser, H. Krause, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 131, 211 (1994).
- 47 B. Ernstberger, H. Krause, A. Kiermeier, H. J. Neusser, *J. Chem. Phys.* 92, 5285 (1990).
- 48 J.F.Ready, „Effects of high Power Laser Radiation“, Academic Press, New York,(1971), S.140.
- 49 F.Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion phy.* 45 (1983) 305.
- 50 H.J. Heinen, *Int. J. Mass Spectrom. Ion phy.* 38 (1981) 308.
- 51 M.A. Postmus, P.G. Kistemaker, H.L.C. meuzelaar, M.C. Ten Nover de Braw, *Anal. Chem.* 50(1978) 985.
- 52 A.N Shibanov in „Laser Analytical Spectroscopy“, (V.S. letokover, Hrsg.), Adam Hilger, Bristol, 1985, S. 353.  
C.Thomson, H.T. Grahn, H.J. Maris, *J. tauc, phys.Rev.* 34B (1986) 4129.
- 53 R.A. Marcus, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 92, 209 (1988).
- 54 W. Forst, *Chem. Rev.* 71, 339 (1971).
- 55 R. A. Marcus, O. K. Rice, *J. Phys. Colloid. Chem.* 55, 894 (1951).
- 56 U.Boesl, H.J. Neusser, E.W.Schlag; *Chem. Phys. Lett.*61 (1979) 62.

- 57 U.Boesl, H.J. Neusser, E.W.Schlag; Z. Naturforsch. 33A (1978) 1546
- 58 R.J. Beuhler, E.Flanigan, L.J. green, L.Friedman, J. Am. Chem. Soc. 96 (1974) 3990.
- 59 R.J Beuhler, L.Friedman, Int. J. Mass Spetrom. Ion Proc.78 (1987) 1. I.S.T. Tsong, J.W. Christiansen, S.H. Lin, B.V. King, in "Mass Spectrometry in the Analysis of Large Molecules "(C.N. McNeal, Hrsg.) S.67, J.Wiley&Sons, Chichester, (1986). R.R. Luchese, in "Mass Spectrometry in the Analysis of Large Molecules "(C.N. McNeal, Hrsg.) S. 151, J. Wiley&Sons, Chichester, (1986).
- 60 H.Udseth, L. Friedman, Anal. Chem. 53 (1981) 29.
- 61 D.P. Ross, O.H. Zinke, in "Exploding Wires" (W.G. Chace, Hrsg.), Plenum Press, new York, Vol. 4,(1968),S. 147.
- 62 R.B Hall, J. Phys. Chem.91 (1987) 1007.
- 63 R.J. Cotter, J.C. Tabet; Int. J. Mass Spectrom. .Ion phys. 53 (1983) 151.
- 64 R.Zenobi, J.H. Hahn, R.N. Zare, Chem.Phys. Lett. 150 (1988) 361.
- 65 G.J.Q. Vav der Peyl, W.J. Van der Zonde, K. Bederski, A.J.H. Boerboom, P.G. Kistemaker, Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.47 (1983) 3.
- 66 G.J.Q. Vav der Peyl, W.J. Van der Zonde, K. Bederski, A.J.H. Boerboom, P.G. Kistemaker, Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.47 (1983) 3.
- 67 R.R Luchese, J.C. Tully, J. Chem.Phys. 81 (1984) 6313.
- 68 R.B. Hall, S.J. Bares in "Chemistry and Structure at Interfaces " R.B. Hall und A.B Ellis (Hrsg), Verlag Chemie (1986), S. 120.
- 69 R.R Luchese, J.C. Tully, J. Chem.Phys. 80 (1984) 3451.  
C.J.S.Simpson, J.P. hardy, Chem.Phys. Lett. 130 (1986) 175.
- 70 J.P. Cowin, D.J. Auerbach, C. Becker, L. Wharton; Surf. Sci. 78 (1978) 545.
- 71 G.Wedler, H.Ruhmann; Surf.Sci. 121 (1982) 464.
- 72 R.N Zare, R.D. levine; Chem.Phys.Lett. 136 (1987) 593.
- 73 B.Linder, U.Seydel; Anal. Chem. 57 (1985) 895.
- 74 S.Petzholt, A.P. Elg, M. Reichling, J. reif, E. matthias, Appl.Phys.Lett. 53 (1988) 2005.

- 75 R.D. Mcfarlane; Proc. 26 th ANN. Conf. Mass Spectrom. Allied Topics, ST. Louis, USA, (1978), S. 490.
- 76 M.J. Guinan,; J. Nucl. Mat. 53 (1974) 171.
- 77 I.S. Bitensky, E.S. Parilis; Nucl. Instrum. Methods 21b (1987) 26.
- 78 D.P.H. hasselmann, J. Am. Ceram. Soc. 46 (1963) 229; 52 (1969) 157.
- 79 R.Bullough, J.J. Gilman, J. Appl. Phys. 37 (1966) 2283.
- 80 F.Bartoli, M. Kruer, L. Esterowitz, R. Allen, J. Appl. Phys. 44 (1973) 3713.  
R.C. Estler, N.S. Nogar, Appl.Phys.Lett. 52 (1988) 2205.
- 81 G.H.Connors, R. Y. Thomposen, J.Appl.Phys.37 (1966) 3434.
- 82 A.Vertes, R.Gijbels, R.D. Levine; Rapid Commun. Mass. Spectrom. 4 (1990) 228
- 83 P.Roepstoff, J. Fohlman; Biomed. Mass Spectrom. 11, 601 (1984)
- 84 M.barber, R.S.Bordoli, R.D. Sedgwick und L.W Tetler, org. Mass Spectrom. 16, 270 (1981).
- 85 P.Roepstoff, J. Fohlman; Biomed. Mass Spectrom. 11, 604 (1984)
- 86 ZHigilei, L. V., P.B.S. Kodali, B.J. Garrison, J. Phys. Chem. B 101 (1997) 2028
- 87 ZHigilei, L. V., Leveugle, E., B.J. Garrison, Chem. Rev.103, (2003), 321-347
- 88 K. Dreisewerd,The Desorption Process in MALDI, Chem. Rev., (2003), 103, 395-425
- 89 U.Boesel, J. Grotemeyer, K. Walter, E.W Schlag, Anal. Instrum.16 (1987) 159.
- 90 E.Stenhagen, S. Abrahamsson, F.W. Mc Lafferty, Registry of Mass Spectral Data, J. Willey&Sons, new York, (1974).
- 92 G. Bojeesen, J. Am. Chem. Soc. (1987), 109, 5557.
- 93 S.G. Lias, J.F. Liebman, R. D. Levin, J. Phys. Chem .Ref. Data (1984), 13, 695.
- 93a Green MK, Lebrilla CB. Mass Spectrom. Rev., (1997); 16, 53.
- 93b Harrision AG.Mass Spectrom. Rev. (1997); 16:201.
- 94 W. David, J. Brodbelt, J. Am. Soc. MS (2003), 14(4), 383-392

- 94a J-F Gal, P-C Maria, E.D.Raczvánska, *JMS* (2001), 36(7), 699.
- 95 J. Zhang, R. Knochenmuss, E. Stevenson, R. Zenobi *IJMS* (2002), 213(2-3), 237-250.
- 96 C.M. Nelson, K.Crellin, J.Berry, J.L. Beauchamp, L. M. Smith, Proc. 44<sup>th</sup> ASMS Conf. Mass Spectrometry and Allied Topics, Portland, OR (1996), P. 733.
- 97 T.J.D. Jørgensen, H. Rahbek, T. Vulpius, G. Bojesen, 13th International MassSpectrometry Conference, Budapest, Hungary (1994).
- 98 Strittmatter EF, Williams ER. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* (1999); 185-187:935.
- 99 M.Gimon, L. Preston, T. Soulouki, M.White, D. Russel, *Org. Mass Spectrom.* (1992), 27, 827.
- 100 R.C. Beavis, B.T Chait, *Rapid Commun. Mass Spektrom.* (1989), 3, 233.
- 101 A.E. Cameron, D.F. Eggers Jr; *Rev. Sci. Instrum.* 19, (1948), 605.
- 102 W. C Wiley, I.H. McLaren; *Rev. Sci Instrum.* 26, (1995), 1150.
- 103 A. Meffert, J. Grotemeyer, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* (1998).
- 104 F. Tureček, E. A Syrstad; *J. Am. Chem. Soc.* (2003), 125, 3353- 3369.
- 114 H.Haberland in *Clusters of Atoms and Molecules I*, H. Haberland (Ed), Springer Series in Chemical Physics 52, Springer Verlag, Berlin Heidelberg (1994), S. 207f.
- 115 A.Kantrowitz, J.Grey, *Rev.Sci.Instrum.* (1951), 22,328.
- 116 J.B.Anderson, Andres, J.B. Fenn, *Advances in Chem. Phys.*, 10, 275 (1966).
- 117 U. Boesl, *Deutsche Luft -und Raumfahrt, Forschungsberichte*, 71-50 DFVLR Göttingen, (1971).
- 118 J. B. Anderson, *Molecular Beams and Low Density Gas dynamics*, P. Wegner, Marcel Bekker Inc., New York (1974).
- 119 R. G. Gordon, Y. T. Lee, J. O. Herschenbach, *J. Chem. Phys.*, 54, 2393 (1971)
- 120 E.L.Knuth, *J. Chem. Phys.*, 66,3515 (1977)
- 121 G. Bittner, W. Kretschmer, W. Schuster, *Nucl. Instr. A. Meth.*, 167, 1 (1979)
- 122 O. F. Hagena, *Surface Science*, 106, 101 (1981)
- 123 A. W. Castleman Jr. und R. G. Keesee, *Ann. Rev. Phys. Chem.* 37, 525 (1986)

- 124 M.S. Ahmed und R.C. Dunbar, *J. Chem. Phys.* 89, 4829 (1988)
- 125 M.R. Hoare, *Adv. Chem. Phys.* 40 (1979) 49.
- 126 A. Meffert, Dissertation, Julius-Maximilians -Universität Würzburg (1998).
- 127 Ch.Elschenbroich , A. Salzer, *Organometallchemie*, 3. Auflage, Teubner Verlag, Stuttgart (1990), S. 450 f.
- 128 F. H. Jardine, *Progr. Inorg. Chem.* (1981), 28, 63.
- 129 P. Fayet, F. Granzer, G.Hegenbart, E. Moisar, B. Pischel, L. Wöste, *Z. Phys.* (1986), D3, 299.
- 130 J.Jortner, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* (1984), 88, 188.
- 131 K. Imura, T. Kasai und R. Naaman, *Chem. Phys. Lett.*, 159, (1996), 356-360)
- 132 *Römp- Chemie- Lexikon*, J. Falber und M. Regtiz (Hersg.), 9. Aufl., (1991)
- 133 U.Boesel, J.Grotemeyer, K.walter, E.W. Schlag, *Anal.Instrum.*(1987),16,151.
- 134 G.R.Kinsel, J.Linder, J. Grotemeyer, E.W. Schlag, *J.phys.Chem.* (1991), 95, 7824.
- 135 R.J. Cotter, *Anal Chem Acta* (1987), 195, 45.
- 136 W.e. Henke, H. von Weyssenhoff, H. L. Selzle, E.W.Schlag, *Z.Naturforsch.* (1985), A40, 674.
- 137 D. huppert, M.Gutman, K. J. Kaufmann, *Adv. Chem. Phys.* (1981), 47, 643.
- 138 M. A. White, D.H. Russel, *Proc. 39th. ASMS Conf. Mass Spectrom. And Allied Topics*, Nashville, TN (1991), P. 366.
- 139 R. Finsterer, Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg (1995).
- 140 Pao-Chi Liao, J.Allison, *J. Masse Spectrom.* (1995), 30,408.
- 141 Sheh-Yi Sheu, E. W. Schlag, Dah-Yen Yang, and H. L. Selzle, *J. Phys. Chem. A* (2001), 105, 6353-6361.
- 142 L.Zandee, R.B. Bernstein, D.A. Lichtin; *J.Chem. Phys.*69 (1978) 3427.
- 143 J. Grotemeyer, E.W. Schlag; *Acc. Chem. Res.* 27 (1989) 399.
- 144 J.Grotemeyer, J. Linder, C. Köster, E.W. Schlag; *J. Mol.struct.* 217 (1990) 51.
- 145 J. Kudritzki, Dissertation, FU Berlin (2000).
- 146 L.Stryer, *Biochemie*, 5., Aufl. Spektrum Akadimischer Verlag (1991).
- 147 *Electron Transfer Reactions*, R. A. Marcus, in *Chemische*

- Elementarprozesse*, Ed: H.Hartmann, (Springer-Verlag, New York, (1968) S. 348.
- 148 H. Heitele, *Angew. Chem.* 105, 378 (1993).
- 149 G. Markovich, O. Cheshnovsky, *J. Phys. Chem.* 98, 3550 (1994).
- 150 T. Chakraborty, S. Sun, E. C. Lim, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 10050 (1994).
- 151 K. Rademann, B. Brutschy and H. Baumgartel, *Chem. Phys.* 80, 129 (1983).
- 152 C. E. H. Dessent, M. A. Johnson, I. Becker, O. Cheshnovsky, *Electron Transfer and Charge Separation in Clusters* (John Wiley and Sons, Inc., Advances in Chemical Physics, V. 106, Electron Transfer from Isolated Molecules to Biomolecules, Part One, Ed.: J. Jortner, M. Bixon, (1999).
- 153 Hur, O.; Nicks, D.; Casino, P.; Dunn, M. F. *Biochemistry* (2002), 41, 9991.
- 154 Csonka, I. P.; Paizs, B.; Lendvay, G.; Suhai, S. *Rapid Commun. Mass Spectrom* (2000), 14, 417.
- 155 Paizs, B.; Csonka, I. P.; Lendvay, G.; Suhai, S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2001), 15, 637.
- 156 Paizs, B.; Suhai, S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2001), 15, 2307.
- 157 Rodriguez, C. F.; Cunje, A.; Shoeib, T.; Chu, I. K.; Hopkinson A. C.; Siu K. W. M. *J. Phys. Chem. A* (2000), 104, 5023.
- 158 (a) Tomashek, J. J.; Brusilow, W. S. A. *J. Bioenerg. Biomembr.* (2000), 32, 493. (b) Senior, A. E. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* (1990), 19, 7.
- 159 Cassady, C. J.; Carr, S. R.; Zhang, K.; Chung-Phillips, A. *J. Org. Chem.* (1995), 60, 1704.
- 160 P.Kulhánek, E. W. Schlag, and J. Koča, *J. phys.Chem. A* (2003), 107, 5789-5797.
- 161 J. Grotemeyer, DPG Frühjahrstagung (2003), Hannover.
- 161 L. Li, D.M. Lubman; *Anal. Chem.* 60 (1988) 2591.
- 162 J.H. Hahn, R. Zenobi, J.L. Bada, R.N. Zare; *science* 239 (1988) 1523.
- 163 J.Grotemeyer; Habilitationsschrift, Fachbereich für Chemie, Biologie und Geowissenschaft der technischen Universität München (1989)
- 164 C.Karner, A. Mandel, F. Träger, *Appl.Phys.*38 A (1985) 19.
- H.J. Coufal, R.K.Grygier, D.E. Horne, J.E. Fromm, *J. Vacuum Sci. Technol.* A5 (1987) 2875



# 10 Anhang

## 10.1 Anhang A

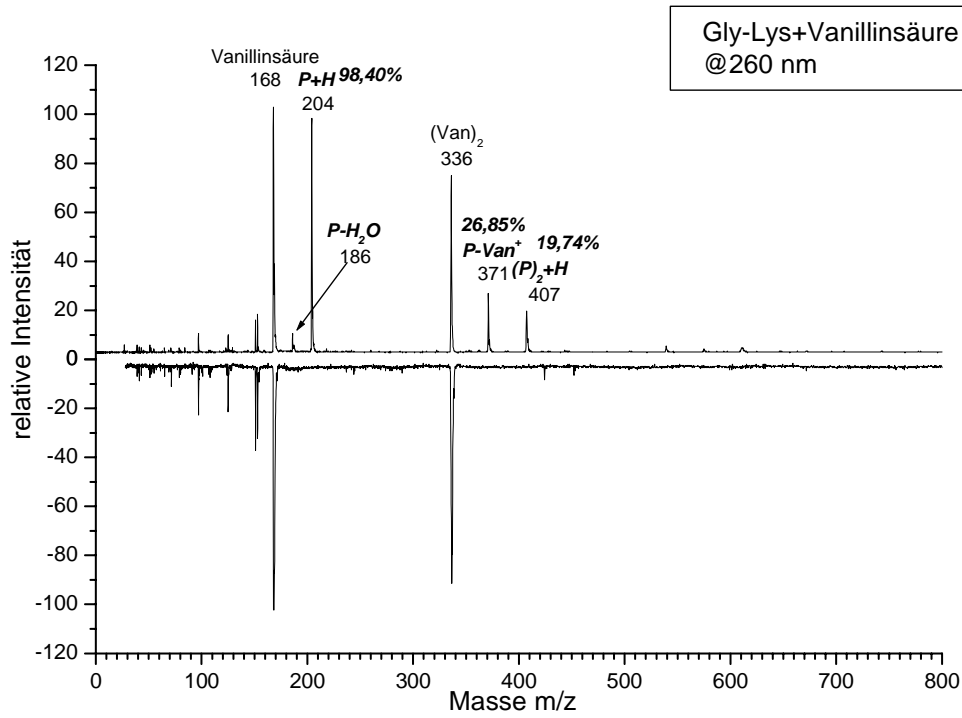


Abb. .A.A.1: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Lys und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

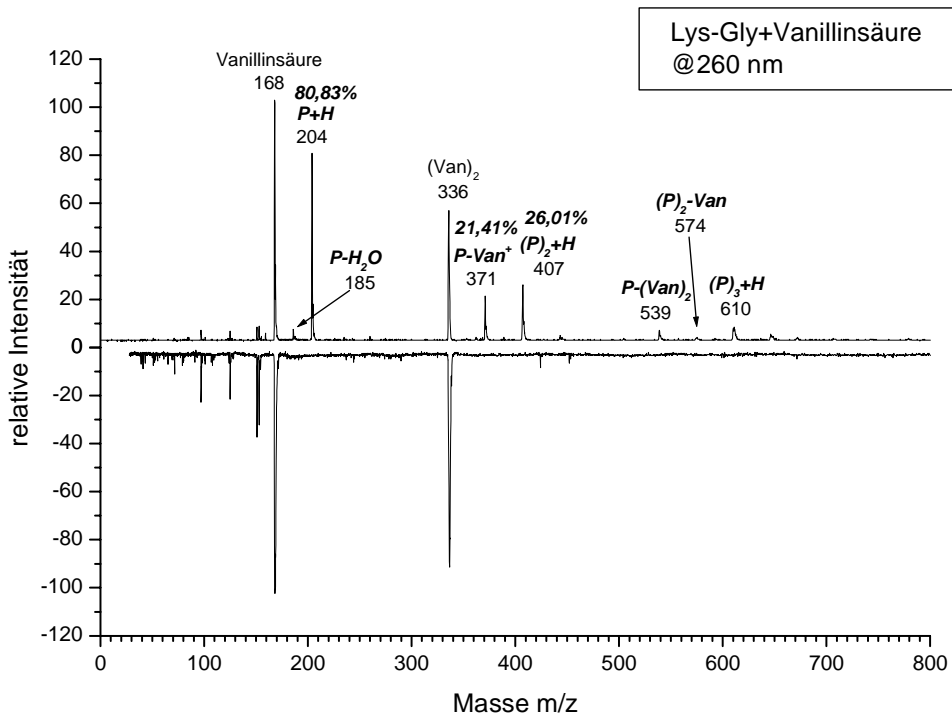


Abb.A.A.2: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Lys-Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

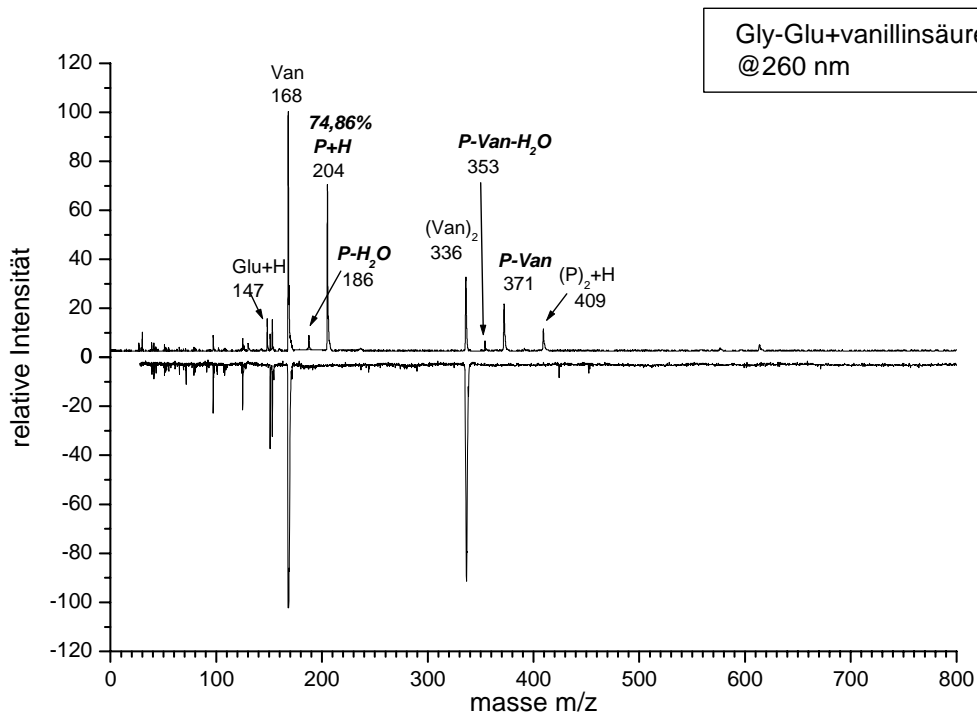


Abb.A.A.3: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Glu und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

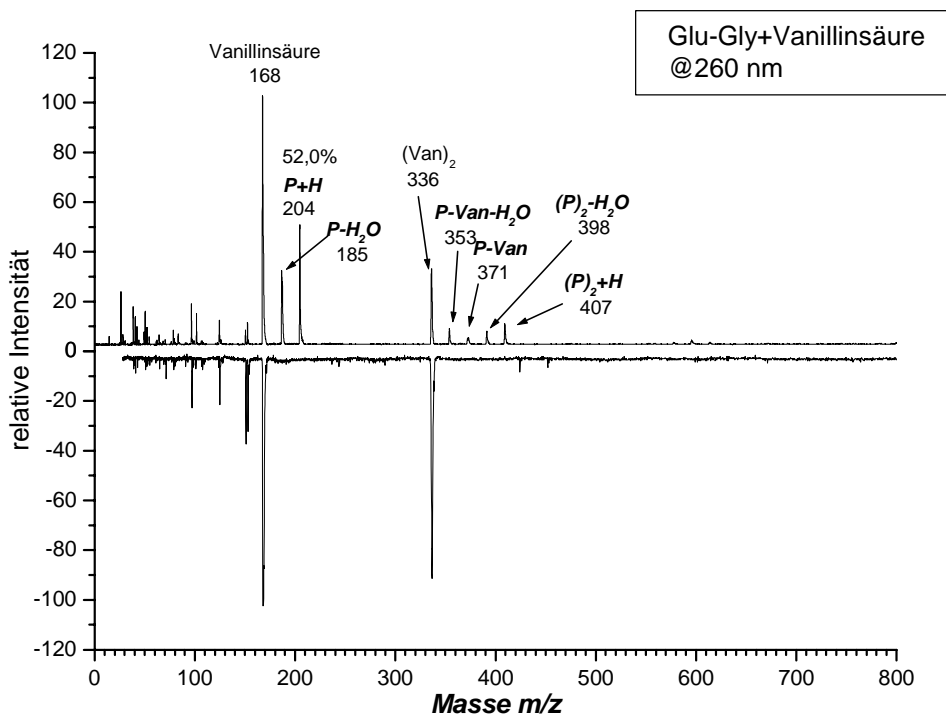


Abb.A.A.4: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Glu-Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

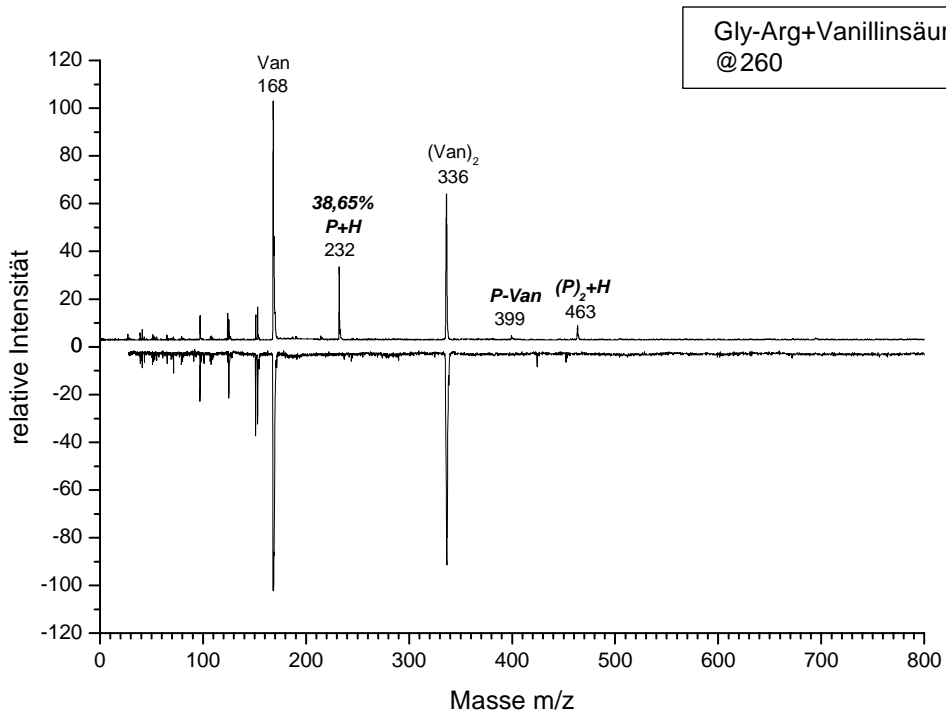


Abb.A.A.5: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly –Arg und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

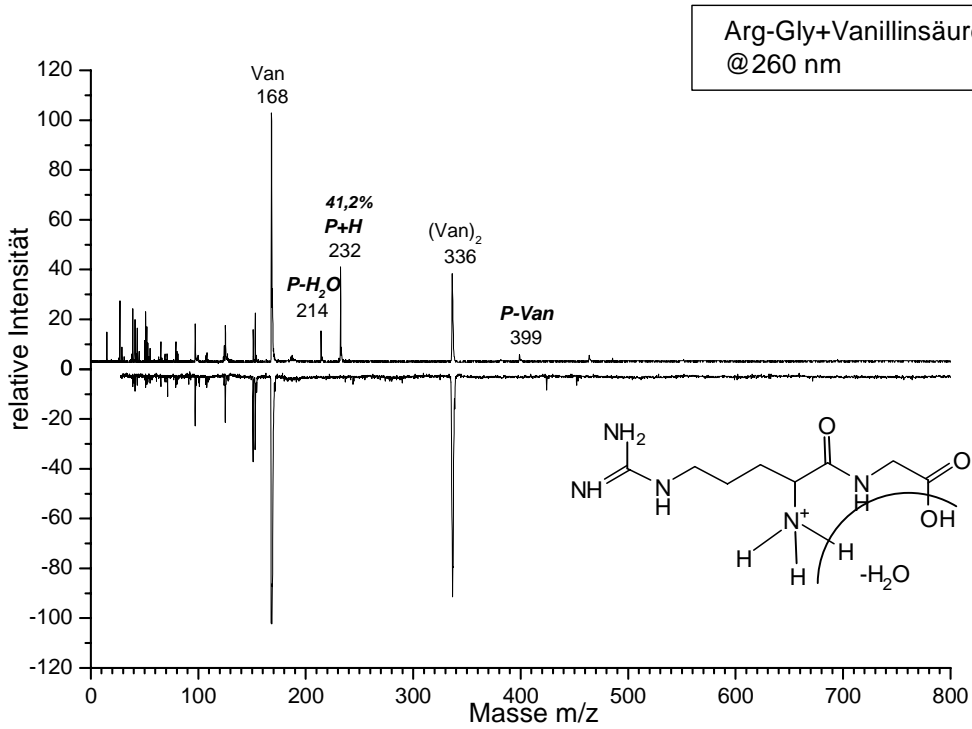


Abb.A.A.6: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Arg -Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

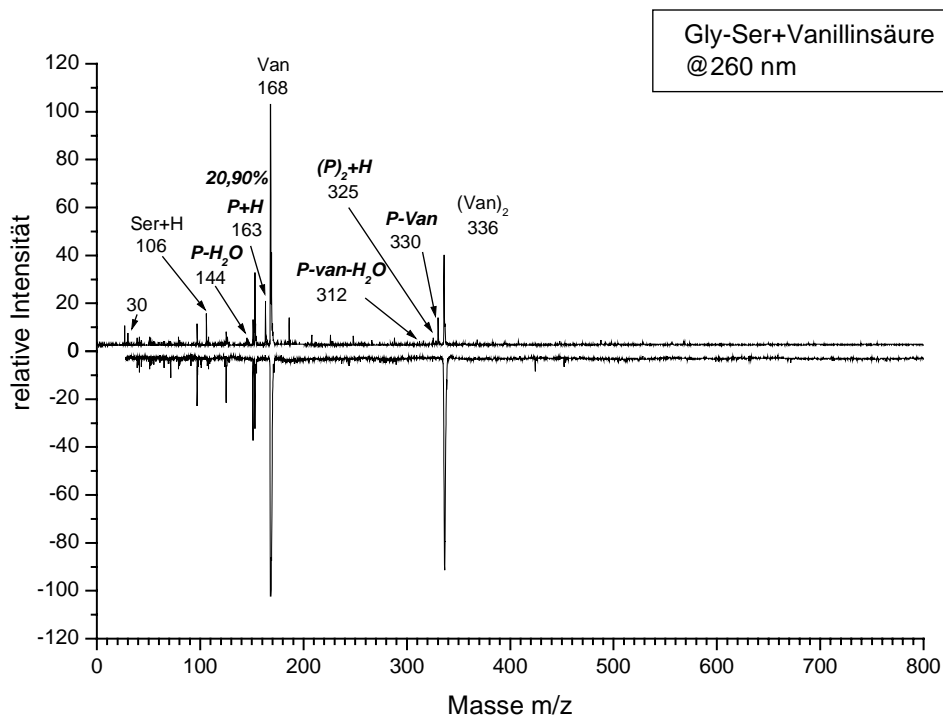


Abb.A.A.7: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Ser und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

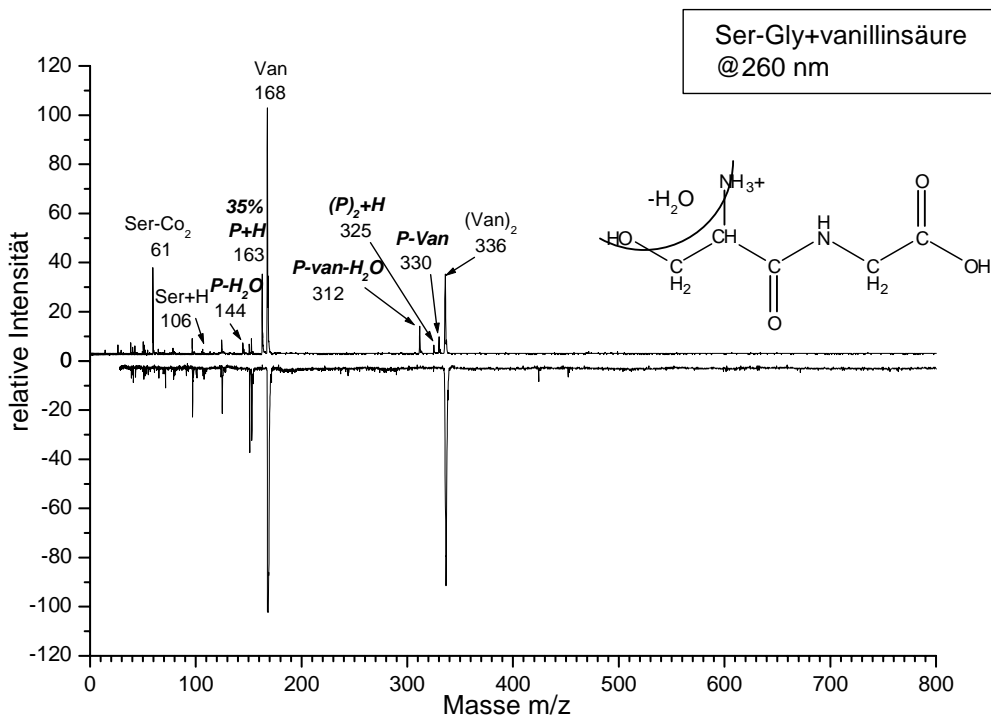
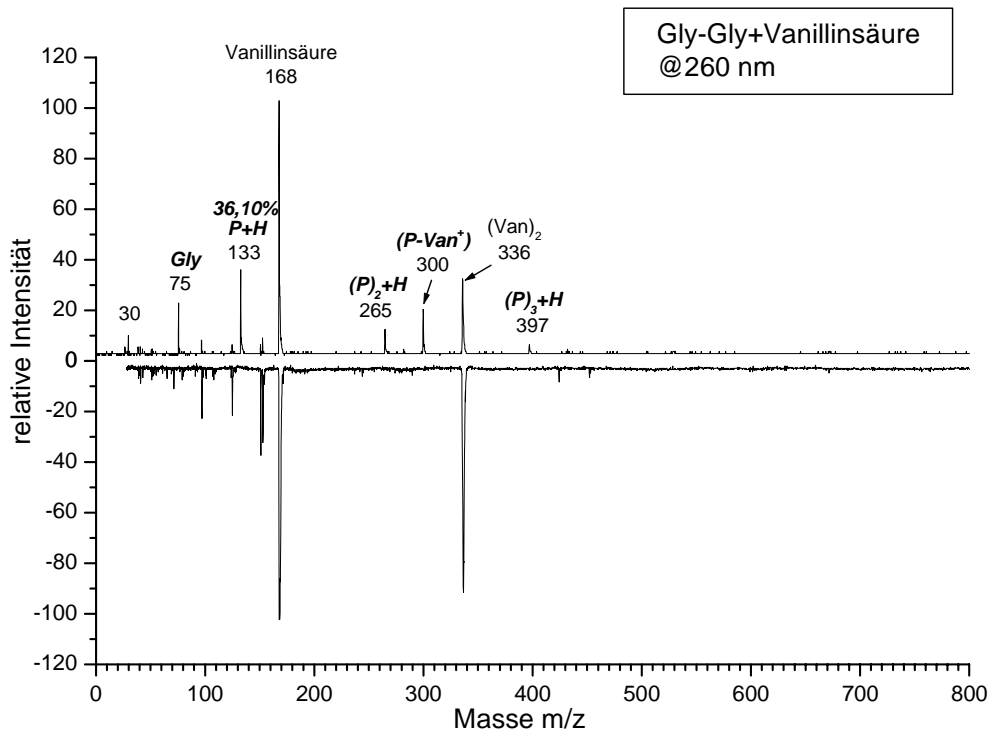


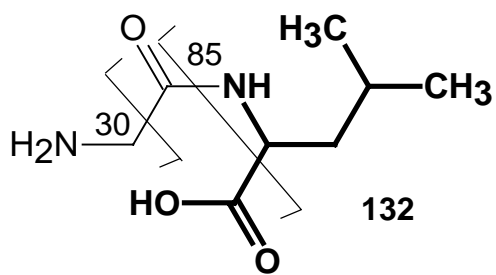
Abb.A.A.8: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Ser -Glyund Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

Abb.A.A.9: REMPI-ReTOF-MS vom Dipeptid Gly-Gly und Vanillinsäure bei  $\lambda = 260$  nm

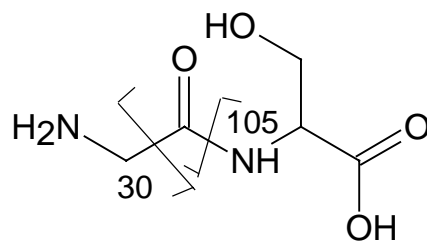


## 10.2 Anhang B

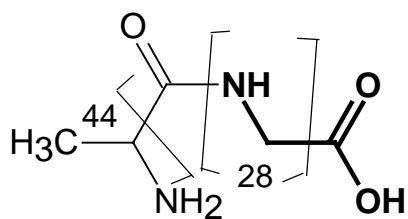




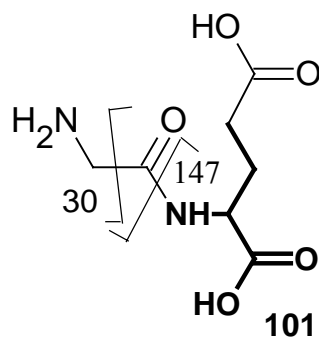
Gly-Leu



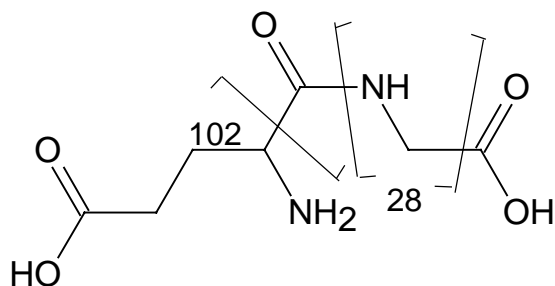
Gly-Ser



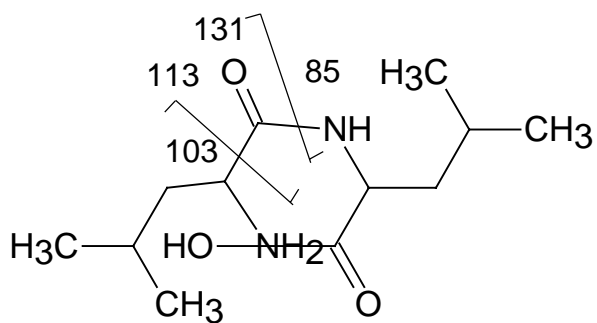
Ala-Gly



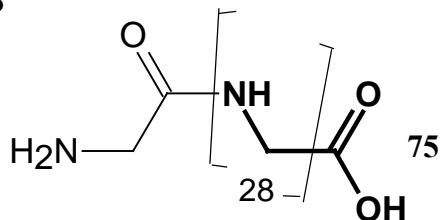
Gly-Glu



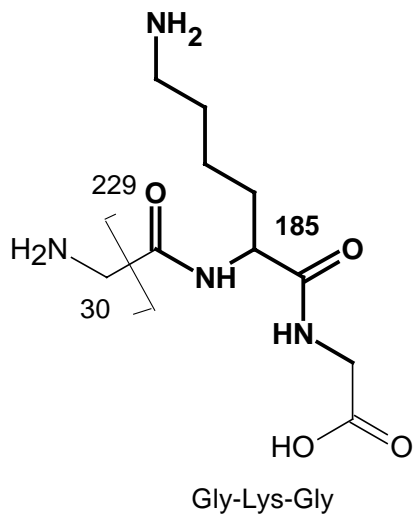
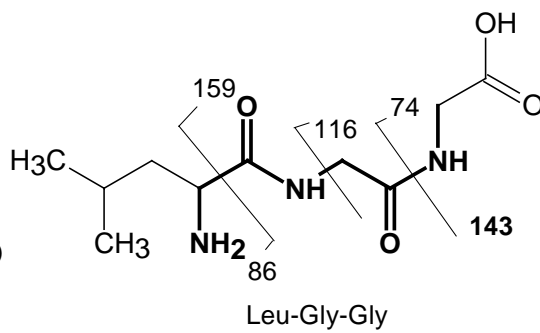
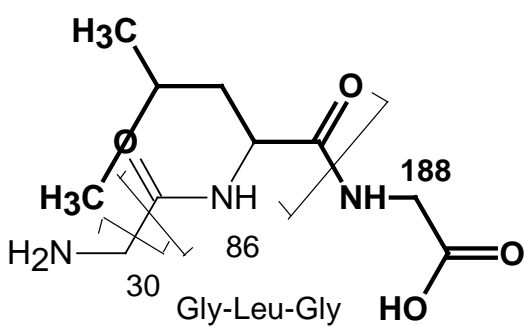
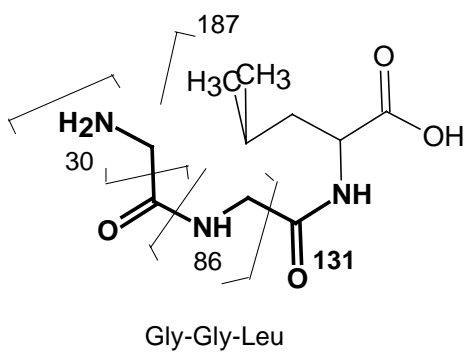
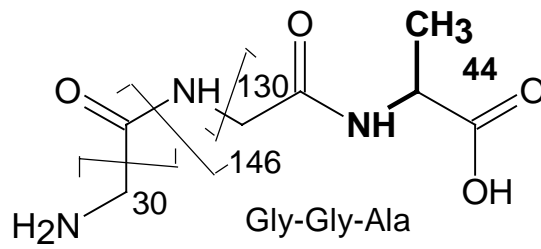
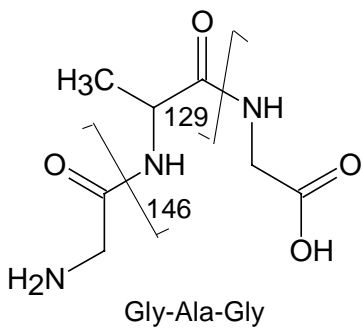
Glu-Gly

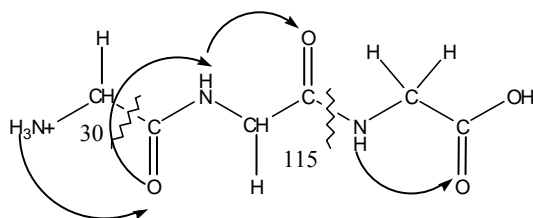
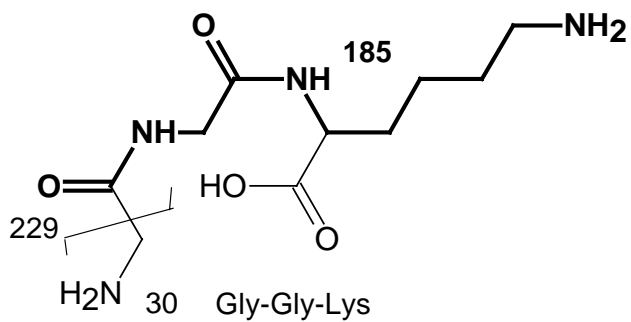


Leu-Leu

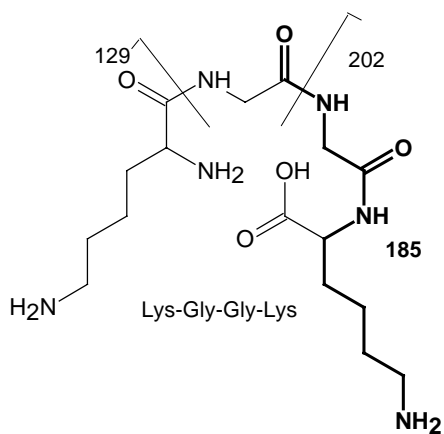
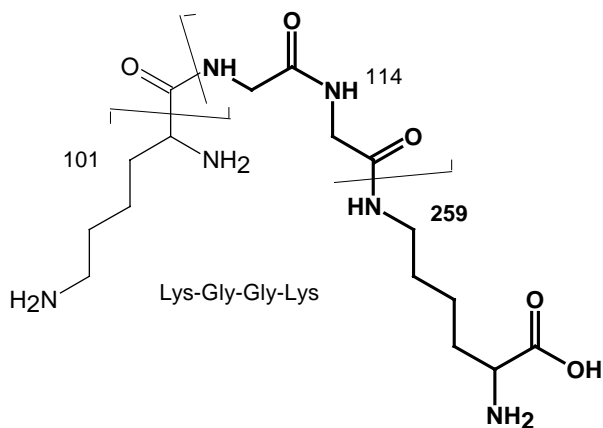


Gly-Gly





Gly-Gly-Gly



## Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Dr. J. Gttemeyer herzlich für das interessante Thema dieser Arbeit, das er mir gegeben hat, für die Gelegenheit in seiner Arbeitsgruppe viel und vielfältiges über Massenspektrometrie zu lernen und für die Betreuung und dauerhafte Unterstützung.

Ich danke, A. Kulle, Z. Altug, Dr. F. Gunzer, T. Muskat, Dr. A. Uphoff, M. Riese, besonders möchte ich hier Timo Liebig für die wissenschaftlichen und anregenden Diskussionen danken.

C. Grun danke ich für die Einarbeitung am Gerät.

Ohne die tatkräftige Hilfe der technischen Mitarbeiter des Hauses, besonders U. Eggers und M. Karstens aber auch K. Warns und natürlich Herrn Will und die Mitarbeiter der Werkstatt wäre vieles nicht möglich gewesen.

Schliesslich möchte ich noch meiner Frau danken, die mir in dieser Zeit vieles Abgenommen, sich um mich und die Kinder gekümmert hat und mir ein gutes Klima ermöglicht hat.

Sie hatte viel Geduld mit mir.





Dank

Eid