

**Untersuchung des Ionisations- und
Fragmentationsverhaltens organischer Proben mittels
Massenspektrometrie auf Basis der clusterinduzierten
Desorption/Ionisation**

Analysis of the ionisation and fragmentation behavior of organic
samples by means of clusterinduced desorption/ionisation mass
spectrometry

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.)

VON

PHILIP JOHANNES KELLER

JUNI 2024



FACHBEREICH 07
INSTITUT FÜR ANGEWANDTE PHYSIK

Eingereicht am:	25.06.2024
Dissertation angenommen am:	16.07.2024
Tag der mündlichen Prüfung:	27.08.2024
Erstgutachter:	Prof. Dr. Michael Dürr
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Stefan Schippers

Just breathe in and breathe out and begin

The Ghost Inside
„Avalanche“
in *Dear Youth*
2014

Zusammenfassung

In dieser Doktorarbeit wurde die Desorption/Ionisation mittels neutraler Cluster (engl.: **D**esorption/**I**onisation induced by **N**eutral **C**luster, kurz: DINEC) genutzt, um organische Moleküle hinsichtlich ihres Fragmentationsverhaltens, insbesondere unter Ionenbeschuss, massenspektrometrisch zu untersuchen. DINEC in Kombination mit der Massenspektrometrie (MS) hat sich als fragmentierungsarme und effiziente Methode zur Analyse organischer Moleküle bewiesen: Die bei DINEC verwendeten neutralen SO₂-Cluster desorbieren den Analyten ohne eine Fragmentierung zu induzieren. Gleichzeitig können diese die Ionisation des Analyten durch Protonierung und Elektronenabstraktion unterstützen. Über die Untersuchung des Fragmentationsverhaltens hinaus wurden in dieser Arbeit deshalb auch die bei DINEC aktiven Ionisationsprozesse näher untersucht.

So wurde bei Cluster-Beschuss das Ionisationsverhalten zweier Komplexarten, der Porphyrine und Ir(ppy)₃, untersucht: Es konnte beobachtet werden, dass Porphyrine in Abhängigkeit der Besetzung des Komplexzentrums unterschiedliche Ionisationsmechanismen zeigen. Die Konstitution der Porphyrin-Reste in Kombination mit dem Vorhandensein eines zentralen Metall-Ions führen zu Unterschieden im Ionisationsverhalten der einzelnen Porphyrine. Daneben haben DINEC-MS-Messungen des in organische Leuchtdioden (engl.: **o**rganic **l**ight-**e**mitting **d**iode, kurz: OLED) verwendeten Moleküls Ir(ppy)₃ einen Übergang des dominanten Ionisationsmechanismus von Protonierung zur Elektronenabstraktion im Laufe einer Messung gezeigt. An diesem Komplex wurde weiterhin gezeigt, dass der Ionisationsmechanismus vom bei der Probenpräparation verwendeten Lösungsmittel und damit von der Probenmorphologie beeinflusst wird. Ferner wurde beobachtet, dass sich in Mischungen von Ir(ppy)₃ mit anderen OLED-Materialien die Desorptions-/Ionisationseffizienz nicht proportional zu den Mischungsanteilen verhält; das Messsignal von Ir(ppy)₃ wird in diesen Mischungen überproportional unterdrückt, was auf einen weiteren Einfluss auf die Ionisationseffizienz hinweist.

Im Hauptteil der Arbeit wurde der sanfte Charakter der DINEC-MS genutzt, um die durch MeV-Ionen induzierte Fragmentierung von Peptidproben zu untersuchen. Dabei wurde beobachtet, dass es im Wesentlichen zu Bindungsbrüchen ausschließlich im Peptidrückgrat, den „spezifischen“ Brüchen, kommt. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Moleküle nur an ausgewählten Peptidbindungen (selektiv) fragmentiert werden.

Für ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen wurden verschiedene Einflüsse, beispielsweise der Art der einzelnen Aminosäuren und ihren Positionen im Peptid, auf die Selektivität der Brüche in den Peptiden untersucht. Abhängigkeiten bevorzugter Schnitte im Peptidrückgrat konnten dabei auf einzelne Aminosäuren und der Positionen im Molekül zurückgeführt werden. Die Experimente wurden darüberhinaus mit der gut etablierten Methode der kollisionsinduzierten Fragmentierung (engl.: **collision-induced defragmentation**, kurz: CID) verglichen. Dabei lassen sich Unterschiede sowohl in der Position, als auch in der Intensität der beobachteten Schnitte und insbesondere in der Art der beobachteten Schnitte feststellen. Daraus lässt sich, trotz der Gemeinsamkeiten bezüglich der spezifischen Schnitte, auf einen grundlegend unterschiedlichen Mechanismus schließen. Zusätzlich wurde das Fragmentationsverhalten hinsichtlich weiterer Parameter, wie der Fluenz zur Quantifizierung des Wirkungsquerschnitts und Ionenspezies des MeV-Ionenstrahls zum Einfluss des Energieverlustes auf das Fragmentationsverhalten, analysiert.

Abstract

In this doctoral thesis, **Desorption/Ionisation induced by Neutral Cluster** (DINeC) was employed to investigate organic molecules with regard to their ionization and fragmentation behavior, in particular after irradiation with swift heavy ions. DINeC in combination with mass spectrometry (MS) has proven to be a fragmentation-free and efficient method for analyzing organic molecules: The neutral SO_2 -clusters used in DINeC desorb the analyte without inducing any fragmentation, while promoting the ionization of the analyte by protonation or electron abstraction. Thus, in addition to the investigation of the fragmentation behavior of peptides the ionization processes operative in DINeC are investigated in more detail as well.

The ionization behavior of two complexes, porphyrins and $\text{Ir}(\text{ppy})_3$, were investigated by DINeC-MS: It was found that depending on the occupancy of the complex center the porphyrins exhibit different ionization mechanisms. The nature of the porphyrin residues in combination with the presence of a central metal ion leads to differences in the ionization behavior of the individual porphyrins. In addition, DINeC-MS spectra of the organic light emitting diode (OLED) material $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ have revealed a transition of the dominant ionization mechanism from protonation to electron abstraction during the course of a measurement. $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ also showed a dependence of the ionization mechanism on the solvent used for sample preparation which was interpreted in terms of different morphology of the crystals formed. Furthermore, it was observed that the desorption/ionization efficiency is not proportional to the respective mixing ratio when $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ is measured in mixtures of $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ with other OLED materials, pointing to further parameters which control the ionization mechanism. The signal intensity of $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ is disproportionately suppressed by the mixture, as one would expect a linear behavior.

In the main part of this thesis, the soft nature of DINeC-MS was employed to investigate the fragmentation behavior of peptide samples induced by MeV-ions. The observed fragments were predominately produced by specific cuts in the peptide backbone. Furthermore, it was found that in one molecule, only specific peptide bonds are cut. In order to develop a deeper understanding of these mechanisms, various influences, such as the nature of the individual amino acids of the peptides or their position in the peptide, on the selectivity of the cuts in the peptides were investigated. The results were further compared to the well established method of **collision-induced defragmentation** (CID). Differences in

the cut positions, in the fragment intensities as well as in the type of cuts were observed. As a result, a very different mechanism was concluded to be operative for the two fragmentation processes, despite the similarities concerning the specific cuts along the peptide backbone. In addition, the fragmentation behavior was analyzed with regard to various other parameters such as the fluence in order to quantify the cross sections, and the ion species of the MeV-ion beam in order to investigate the influence of the energy loss on the fragmentation process.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VII
Abstract	IX
Inhaltsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
2 Physikalische Grundlagen und Methoden	5
2.1 Massenspektrometrie mittels DINEC	5
2.1.1 Desorptionssmechanismus	5
2.1.2 Ionisationsmechanismus	7
2.1.3 Methoden der Massenspektrometrie	10
2.2 Wechselwirkung schneller Schwerionen mit Materie	14
2.2.1 Nuklearer Energieverlust	14
2.2.2 Elektronischer Energieverlust	17
2.3 Organische Moleküle	19
2.3.1 Peptide	19
2.3.2 Porphyrine und Ir(ppy) ₃	22
2.4 Fragmentierung von Biomolekülen	24
2.4.1 Kollisionsinduzierte Fragmentierung	25
2.4.2 Schwerioneninduzierte Fragmentierung	34
3 Experimentelles	37
3.1 Massenspektrometrische Analyse mittels DINEC	37
3.2 Probenpräparation	41
3.3 Erzeugung schneller Schwerionen	45
4 Ionisationsverhalten organischer Moleküle bei DINEC	47
4.1 DINEC-MS von Porphyrinen	47
4.2 DINEC-MS von Ir(ppy) ₃	54
4.2.1 Ionisationsverhalten von reinem Ir(ppy) ₃	54
4.2.2 Ionisationsverhalten von Ir(ppy) ₃ in Mischungen	63
5 Ioneninduzierte Fragmentierung von Peptiden	65
5.1 Spezifische Fragmentierung durch MeV-Ionen	65

5.1.1	Fragmentanalyse	65
5.1.2	Wirkungsquerschnitte und Fragmenthäufigkeit	70
5.2	Selektive Fragmentierung zwischen Aminosäureeinheiten	71
5.2.1	Fragmentierung induziert durch SHI	71
5.2.2	Vergleich mit den Schnittpositionen bei CID-induzierter Fragmentierung	85
5.2.3	Fragmentierung in Abhängigkeit der Ionenart	89
5.2.4	Folge- und Nebenreaktionen nach MeV-Ionen-Beschuss	92
5.2.5	Weiterführende Experimente mit ausgewählten Aminosäu- resequenzen	93
5.3	Spezifische Fragmentierung nach keV-Ionen-Beschuss	95

Literaturverzeichnis	i
-----------------------------	----------

Anhang	xxv
Anhang A: Strukturformeln der untersuchten Peptide	xxv
Anhang B: Fragmentverteilungen mittels SHI bestrahlter Peptide	xxix
Anhang C: Spektrum und Fragmentverteilungen mittels CID fragmen- tierter Proben	xxxv
Anhang D: Fragmentierung in Abhängigkeit von der SHI-Fluenz	xliii

Danksagung	xliv
-------------------	-------------

1 | Einleitung

Die modernen Naturwissenschaften bedienen sich einer großen Anzahl ganz unterschiedlicher analytischer Methoden. Unter anderem befindet sich in diesem „Werkzeugkasten“ der Analytik seit nun knapp 100 Jahren die Massenspektrometrie, bei der über die Messung des Masse/Ladungs-Verhältnisses von Ionen Aussagen über die Zusammensetzung eines untersuchten Stoffes getroffen werden können [1, 2]. Eine hohe Relevanz dieser Methode in der Analytik wird durch die Vergabe von drei Nobelpreisen in dieses Themengebiet unterstrichen: Francis William Aston erhielt 1922 für die Entdeckung der Isotope nicht-radioaktiver Elemente den Chemie-Nobelpreis [3], für die Entwicklung der Ionenfalle erhielt Wolfgang Paul 1989 den Nobelpreis in Physik [4] und im Jahr 2002 wurde John Bennet Fenn und Koichi Tanaka der Nobelpreis in Chemie für die Entwicklung von Methoden zur Identifikation und Strukturanalyse biologischer Makromoleküle verliehen [5, 6]. Verbesserungen in den verwendeten Desorptionstechniken, den Detektorsystemen und zusätzlicher Einsatz von Computerprogrammen erweitern stetig die Einsatzmöglichkeiten der Massenspektrometrie; sei es bezüglich des messbaren Massenbereichs, der Scangeschwindigkeit des Massenbereichs, der Massengenauigkeit oder der Massenauflösung [7]. Eine besondere Herausforderung bei der Probenpräparation sind Proben organischer Moleküle, da es bei dem für die Massenspektrometrie benötigten Übergang in die Gasphase und bei der notwendigen Ionisation zu Fragmentationsprozessen und anderen Nebenreaktionen kommen kann, die den Ausgangszustand des zu untersuchenden Systems verändern [8].

Die Desorption/Ionisation mittels neutraler Cluster (engl.: **D**esorption/**I**onisation by **N**eutral **C**luster, kurz: DINEC) hat sich in dieser Fragestellung als äußerst sanft und damit fragmentationsarm erwiesen [9–14]. Bei dieser Methode werden SO_2 -Cluster auf die Probenoberfläche geschossen, die beim Auftreffen dem Analyt-Ion eine Übergangsmatrix bieten, die die Desorption unterstützt und diese somit bei geringer Clusterenergie ermöglicht [9, 15, 16]. Das abgelöste Molekül wird zusätzlich durch das Abdampfen von SO_2 -Molekülen gekühlt [9, 16]. Analyt-Moleküle der Probe werden dadurch extrem sanft von der Oberfläche desorbiert und eine Fragmentierung wird weitgehend unterdrückt. Zusätzlich schafft SO_2 eine saure Umgebung auf der Probenoberfläche, in der die Ionisation insbesondere

durch Protonierung unterstützt wird. Es kann aber auch Ionisation durch Elektronenabstraktion oder durch beide Mechanismen gleichzeitig erfolgen [15,17,18]. Der Ionisationsprozess als fundamentaler Prozess der DINEC-MS wird in dieser Arbeit deshalb am Beispiel zweier Komplex-Verbindungen, Porphyrinen und $\text{Ir}(\text{ppy})_3$, genauer untersucht (Abbildung 1.1(a) und (b)).

Der sanfte Desorptionsmechanismus erlaubt es, insbesondere auch durch externen Stimuli induzierte Fragmente in den Proben zu untersuchen. Dazu zählt auch der Beschuss der Proben mit schnellen Schwerionen (engl.: **swift heavy ions**, kurz: SHI) oder aber mit Ionen im keV-Bereich, wie sie bei der Sekundärionen-Massenspektrometrie typischerweise verwendet werden. Die Wechselwirkung der Ionen mit Materie ist für verschiedene Gebiete wie die Medizin, Materialwissenschaft, Teilchenphysik und Biologie von Interesse [19–25]. Insbesondere das Beispiel der Tumorthherapie mit hochenergetischen Ionen zeigt, dass die Interaktion zwischen Materie und energiereicher Ionenstrahlen für den Menschen vorteilhaft instrumentalisiert werden kann [26–30].

In dieser Arbeit wurde insbesondere die Anregung und die damit einhergehende Fragmentierung von Peptiden durch schnelle Schwerionen mit kinetischen Energien im MeV-Bereich mittels DINEC-MS untersucht (Abbildung 1.1(c) und (e)). In ersten Arbeiten zur SHI-induzierten Fragmentierung von Peptiden wurden dabei überraschenderweise bevorzugt Schnitte am Peptidrückgrat (die sogenannte „spezifische“ Fragmentierung) beobachtet (Abbildung 1.1(f)) [31]. Die Auswertung der Schnittpositionen hinsichtlich der Peptidstruktur und der chemischen Umgebung durch die Aminosäurereste, die ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist, zeigt darüberhinaus eine hohe Selektivität (Abbildung 1.1(g)). Weiterhin wurde bei der Fragmentierung überwiegend a/x- und c/z-Fragmente und kaum b/y-Fragmente beobachtet. Dies steht im klaren Gegensatz zur Fragmentierung mittels der kollisionsinduzierten Fragmentation (engl.: **collision-induced dissociation**, kurz: CID) in einer Paul-Falle bei kinetischen Energien von ungefähr 1 – 5 eV/u, die zum direkten Vergleich herangezogen wurde (Abbildung 1.1(d),(f) und (g)) [32–34]. Es wurde deshalb trotz der Ähnlichkeit bezüglich der spezifischen Fragmentierung entlang des Peptidrückgrats auf einen grundsätzlich unterschiedlichen Fragmentierungsprozess geschlossen.

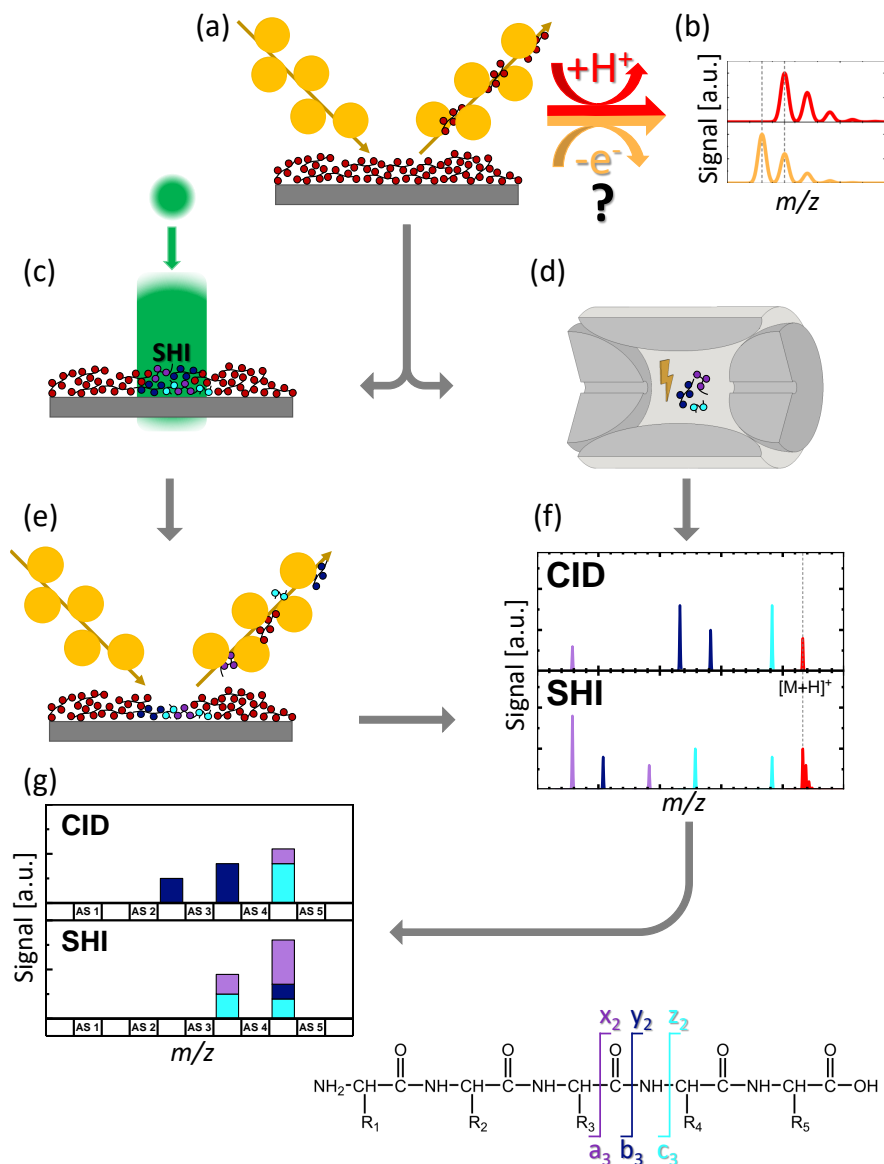


Abbildung 1.1: Zusammenfassung der in dieser Arbeit untersuchten Prozesse: (a) Bei DINEC-MS desorbieren SO_2 -Cluster Moleküle von der Oberfläche, ohne selbst Fragmentation zu induzieren. Neben der Analyse der Ionisation durch Protonierung oder Elektronenabstraktion von Komplexen (b) wurde im Schwerpunkt das Fragmentationsverhalten von Peptiden untersucht. Dazu wurden Peptid-Proben mit schnellen Schwerionen ($E_{\text{kin}} \approx 5 \text{ MeV/u}$) bestrahlt (c) und im Anschluss mittels DINEC-MS analysiert (e). Zum Vergleich wurden desorbierte Ionen in einer Paul-Falle kollisionsinduziert fragmentiert (d). Der Vergleich der Fragmentspektren beider Fragmentierungsarten (f) gibt Aufschluss über den Einfluss einzelner Aminosäuren der Peptidsequenzen auf die selektive Fragmentation (g) und zeigen Ähnlichkeiten beziehungsweise Unterschiede der zugrundeliegenden Anregungsmechanismen auf.

2 | Physikalische Grundlagen und Methoden

In diesem Kapitel werden die clusterinduzierte Desorption/Ionisation für die Massenspektrometrie, sowie weitere ausgewählte massenspektrometrische Methoden vorgestellt. Darüber hinaus werden die Wechselwirkungen zwischen schnellen Schwerionen und Materie, die verwendeten Molekülklassen und die aus dem Ionenbeschuss resultierenden Fragmentationsarten vorgestellt.

2.1 Massenspektrometrie mittels clusterinduzierter Desorption/Ionisation

Die Methode der clusterinduzierte Desorption/Ionisation von Biomolekülen mittels SO_2 -Cluster wird für den nahezu fragmentierungsfreien Übergang aus der festen Phase in die Gasphase genutzt. Die dabei zum Teil ionisierten Moleküle können daraufhin weiter verwendet werden, um zum Beispiel dünne Schichtsysteme per Deposition auf ein Substrat aufzubringen [35], insbesondere werden sie aber zur massenspektrometrischen Analyse genutzt. Auf letzteres wird in den nächsten zwei Kapiteln 2.1.1 und 2.1.2 näher eingegangen, die sich mit der Desorption und Ionisation mittels SO_2 -Cluster beschäftigen, während in Kapitel 2.1.3 ausgewählte Methoden der massenspektrometrischen Analyse vorgestellt werden.

2.1.1 Desorptionssmechanismus

Die Verwendung neutraler Cluster hat sich als hervorragende Methode für die intakte Desorption von Analytmolekülen erwiesen [9, 10]. Um Adsorbate intakt von der Probenoberfläche abzulösen, müssen mehrere Kriterien erfüllt werden: Zum einen darf der Energieübertrag auf das Adsorbat nicht so hoch sein, dass kovalente Bindungen im Molekül gebrochen werden, zum anderen muss er aber dennoch groß genug sein, um das Oberflächenpotential zu überwinden, über das das Molekül an die Oberfläche bindet. Bei der in dieser Arbeit verwendeten clusterinduzierten Desorption/Ionisation wird dies durch die Verwendung von SO_2 -Cluster ermöglicht, deren Energiedichte pro Molekül $< 0,8$ eV beträgt [9, 36]. Im

Vergleich zu anderen gängigen Clustern, die beispielsweise in der Sekundärionen-Massenspektrometrie (engl.: **secondary ion mass spectrometry**, kurz: SIMS) eingesetzt werden, wie Ar, C oder auch CO₂, zeichnen sich SO₂-Cluster zusätzlich durch das hohe Dipolmoment von 1,6 D der einzelnen SO₂-Moleküle aus [37–41]. Das hohe Dipolmoment der SO₂-Moleküle im Cluster stabilisiert über elektrostatische Wechselwirkungen polare Moleküle, sodass der Cluster insbesondere für polare Moleküle als Transfermatrix dient [16]. Hierdurch reicht die vergleichsweise geringe Energiedichte der SO₂-Cluster aus, den Analyten zu desorbieren. Die Abbildungen 2.1(a)-(c) stellen den Desorptionsprozess schematisch dar: In Abbildungen 2.1(a) trifft der SO₂-Cluster auf die Probenoberfläche. Beim Auftreffen auf die Probenoberfläche wird die kinetische Energie des Clusters umverteilt, sodass sich die lokale Temperatur kurzzeitig stark erhöht [9], wie in Abbildung 2.1(b) dargestellt löst sich das Adsorbat im Cluster. Durch Abdampfen von SO₂-Molekülen wird das im SO₂-Cluster eingebettete Analyt-Molekül gekühlt und folglich stabilisiert, vergleiche Abbildung 2.1(c). Nach etwa 20 ps ist davon auszugehen, dass das Molekül eine geringere Temperatur als vor der Desorption hat und damit in dieser Zeit keine Schwingungsmodi des Peptids angeregt werden können, die zu einer Fragmentation führen würden [9]. Das Ion befindet sich nun unfragmentiert in der Gasphase, trägt aber teilweise noch SO₂-Addukte mit sich, welche mittels einer Time-of-Flight-Massenanalyse (kurz: ToF) beobachtet werden können [9, 15]. Die SO₂-Moleküle, die nicht bis zum Eintreffen in der Ionenfalle abgedampft sind, werden im Akkumulationsschritt mit dem

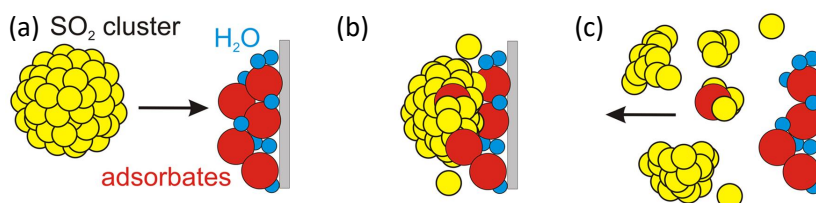


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Desorptionsprozesses bei DINEC. (a) Der SO₂-Cluster trifft auf der Probenoberfläche auf. (b) Die kinetische Energie des Clusters wird umverteilt, ein Teil des Clusters verdampft und der Cluster zerbricht. Analyt-Moleküle werden in den Bruchstücken des SO₂-Clusters eingeschlossen und in diesem als Übergangsmatrix stabilisiert. (c) Die stabilisierten Moleküle werden von der Probenoberfläche gelöst und befinden sich nun in der Gasphase. SO₂-Addukte können mittels einer Time-of-Flight-Messung (kurz: ToF) beobachtet werden [9, 15]. Diese SO₂-Addukte werden in einer Ionenfalle durch Stöße entfernt. Nachdruck aus Referenz [15], mit der Genehmigung von AIP Publishing.

inerten Hintergrundgas Helium kollidieren (vergleiche Kapitel 2.1.3). Diese Kollisionen führen zur Entfernung aller SO₂-Addukte am Analyt-Ion. Für DINEC konnte unter den in Abschnitt 2.1.3 beschriebenen experimentellen Bedingungen eine Desorptionsrate von bis zu 0,24 ng/s bestimmt werden [42, 43].

2.1.2 Ionisationsmechanismus

Da in der Massenspektrometrie Ionen benötigt werden, ist es essentiell, den Analyten in einer ionisierten Form vorliegen zu haben. Bei ionischen Flüssigkeiten und Salzen, wie zum Beispiel dem Farbstoff Methylenblau, liegen die organischen Moleküle als Ionen vor und es bedarf keiner zusätzlichen Ionisation [44, 45]. Auch Alkali-Ionen von Alkalisalzen lassen sich aus bestimmten Matrizen mittels SO₂-Cluster desorbieren und können als solche in positiven Massenspektren detektiert werden [46, 47].

Experimente mit Alkalimetallen zeigten aber einen zusätzlichen Effekt: So ermöglichen SO₂-Cluster, dass Alkaliadsorbate, die von einer Metalloberfläche desorbiert wurden, eine Ladungstrennung im Cluster erfahren. Dabei nimmt ein Fragment des einschlagenden SO₂-Clusters ein Elektron des Alkaliadsorbaten auf, während der Rest des Clusters das Alkali-Kation umschließt und stabilisiert [17, 46, 48]. Diese Abstraktion von Elektronen wird auch bei Komplexmolekülen wie Porphyrinen oder Ir(ppy)₃ beobachtet [18, 49]; diese Thematik wird in Kapitel 4 weiter vertieft. Aufgrund der niedrigen Elektronenaffinität von 1,1 eV der SO₂-Moleküle muss es sich bei der Elektronenabstraktion um einen endothermischen Prozess handeln [50, 51]. Die hohe Übergangstemperatur während des Clustereinschlags auf der Probenoberfläche von mehreren Tausend Kelvin für wenige Pikosekunden begünstigt die endotherme Trennung der Ladungen und damit die Ionisierung [9, 52]. Zusätzlich stabilisieren die SO₂-Addukte das gebildete Ion.

Für Probenmoleküle ohne vorliegende Ladung und ohne Metallatom für eine Elektronenabstraktion, kann die Ionisation auch durch eine Protonenaufnahme oder -abgabe erfolgen. Die Protonenaufnahme stellt für organische Proben bei DINEC den wichtigsten Ionisationsprozess dar. SO₂ bildet zusammen mit dem Restwasser auf der Probenoberfläche schweflige Säure und damit eine saure Umgebung (SO₂ + H₂O ⇌ H₂SO₃) [10, 15, 48, 49, 53]; dies unterstützt die Protonenaufnahme. Moleküle, insbesondere organische Moleküle mit einer Vielzahl basischer funktioneller Gruppen, können auch mehr als ein Proton aufnehmen. Peptide zeigen in DINEC-MS Spektren typischerweise, neben der einfach protonierten Spezies

$[M+H]^+$, noch die doppeltprotonierte Spezies $[M+2H]^{2+}$ [13]. Es wurde gezeigt, dass die Signalintensität bei Proben, welche die Protonenaufnahme als Mechanismus benötigen, lediglich geringfügig vom pH-Wert der Ausgangslösung abhängt [54]. Dies verdeutlicht neben weiteren Beobachtungen, dass der Cluster primär für die Ionisation verantwortlich ist.

Neben der Protonierung ist auch die Ionisation durch Adduktbildung mit Erd-/Alkalikationen, wie Lithium, Natrium, Kalium oder Magnesium und Calcium möglich. Insbesondere die Spezies $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ und $[2M+Ca]^{2+}$ sind häufig vertreten [55]. Beispielhaft ist in Abbildung 2.2 ein DINEC-MS-Spektrum einer Angiotensin-II-Probe mit unterschiedlich ionisierten Angiotensin-II-Molekülen dargestellt.

Neben der positiven ist auch die negative Ionisation möglich; in einigen Systemen werden sogar hauptsächlich negativ geladene Analyte beobachtet. Zusätzlich zur Elektronenaufnahme steht grundsätzlich auch die Protonenabgabe zur Verfügung. Insbesondere letztere ist aufgrund der sauren Umgebung im Vergleich zur Protonenaufnahme typischerweise unterdrückt [54].

DINEC wurde in dieser Arbeit verwendet, da es sich im Vergleich mit anderen gängigen massenspektrometrischen Methoden durch seine fragmentarme Desorption und Ionisation auszeichnet. Daher kann davon ausgegangen werden, dass

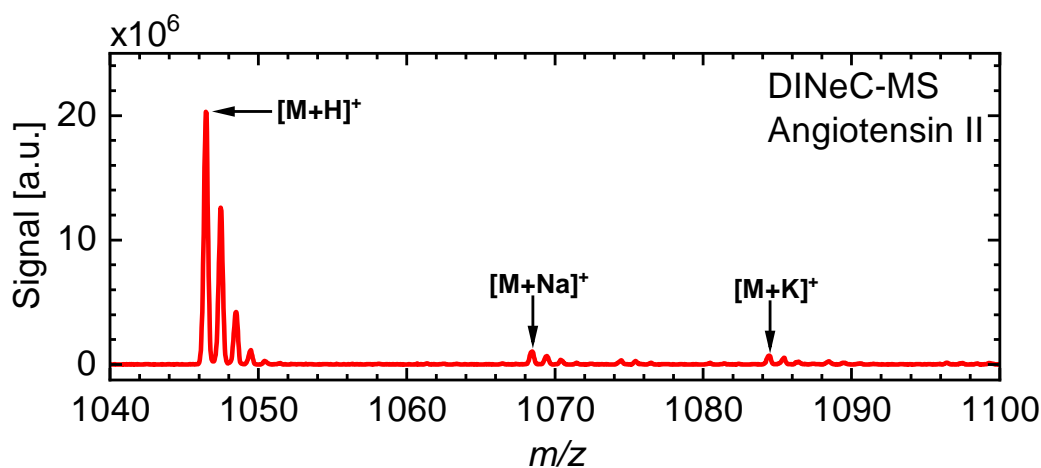


Abbildung 2.2: DINEC-MS Spektrum positiver Ionen einer Angiotensin-II-Probe. Neben dem protonierten Mutterpeak $[M+H]^+$ bei $m/z = 1046,5$ sind auch die Peaks mit Natriumaddukt $[M+Na]^+$ bei $m/z = 1068,5$ sowie mit Kaliumaddukt $[M+K]^+$ bei $m/z = 1084,5$ zu erkennen. Es sind keine SO_2 -Addukte erkennbar, da diese durch Stöße mit dem Hintergrundgas der Ionenfalle entfernt wurden [9, 15]. Für alle Ionen ist die für Angiotensin II erwartete Isotopenverteilung zu beobachten.

Fragmente, die im Massenspektrometer detektiert werden, durch Einflüsse auf die Probe und Reaktionen mit der Probe entstanden sind und nicht durch den Desorptions-/Ionisationsmechanismus selbst.

Verwandte Prozesse

Weitere verwandte Methoden zur Desorption und Ionisation des Analyten finden sich in SIMS und matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (engl.: **matrix-assisted laser desorption/ionization**, kurz: MALDI) wieder. Die Sekundärionen-Massenspektrometrie verwendet Primärionen mit einer Energie von typischerweise 2 – 20 keV zum Beschuss von Probenoberflächen [56, 57]. Beim Auftreffen der Primärionen wie Cs^+ , Ar^+ , Bi^+ , aber auch Ar_{1000}^+ und Bi_3^+ , werden aus der Probe unter anderem Sekundärionen abgelöst [57, 58]. Diese können im Falle von organischen Proben elektronisch geladene $[\text{M}]^+$ beziehungsweise $[\text{M}]^-$, aber auch die de-/protonierten Spezies $[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}-\text{H}]^-$ sein. Dadurch, dass bei den einzelnen Einschlägen die kinetische Energie der Primärionen sehr lokal deponiert wird, wird typischerweise Fragmentation beobachtet [57], die Stärke der Fragmentierung hängt von der Wahl des Primärions und dessen kinetische Energie ab. Da bei SIMS geladenen Projektilen verwendet werden, kann der Primärpartikel-Strahl fokussiert und gerastert werden. Die Oberfläche kann somit ortsaufgelöst massenspektrometrisch untersucht werden [2, 56, 57].

Bei MALDI wird der Analyt in einer Matrix eingebettet, die bei Laserbestrahlung Energie absorbiert und anschließend mit dem Analyten verdampft [59–61]. Bei MALDI ist somit die Wahl der Matrix wichtig, da diese den Analyten ohne Nebenreaktion einbetten und in die Gasphase überführen soll; gleichzeitig muss die Matrix die Energie des einfallenden Lasers effizient absorbieren [62]. Außerdem sollte die Matrix selbst einen möglichst geringen Beitrag zum Massenspektrum leisten [8]. Dieser Aspekt ist leider in der Praxis nicht beliebig gut umsetzbar und erschwert so die Interpretation von Massenspektren im Massebereich der Matrix, die typischerweise bei $m/z = 120 - 250$ liegen [2, 55, 63]. Im direkten Vergleich mit DINEC-MS ist insbesondere die Notwendigkeit einer zusätzlichen Matrix ein Nachteil der MALDI. Trotz dieser Randbedingungen hat sich MALDI als verlässliche Desorptions- und Ionisationsmethode etabliert und wird typischerweise auch für die Analyse von Peptiden genutzt [2, 56, 64].

Eine weitere in der MS eingesetzte Desorptionsmethode ist DESI (engl., **desorption electrospray ionization**), die auf der Verwendung eines Elektrosprays zur Ionisation der Analyten basiert: DESI nutzt geladene Tröpfchen aus Lösungsmittel, um

Analyt-Ionen von einer Oberfläche abzulösen [56, 65]. Die Lösung wird durch versprüht und über eine anliegende Hochspannung ionisiert. Diese Methode ist dann geeignet, wenn der Analyt in eben diesem Lösungsmittel gut gelöst und ionisiert werden kann. DESI wird für die Untersuchung von dünnen organischen Schichten, Gewebeproben, Medikamenten oder Blutuntersuchungen verwendet [55, 65]. Bei der Analyse von Peptiden mittels DESI entstehen zumeist mehrfach geladene Ionen und unter Umständen deren Fragmente [2, 66, 67].

Die größten Unterschiede zwischen DESI und DINEC liegen darin, dass mittels DINEC quantitative Analysen durchgeführt und auch unpolare Moleküle wie Polymere massenspektrometrisch untersucht werden können [16, 43, 68, 69].

2.1.3 Methoden der Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse der Analyt-Ionen müssen diese massenspezifisch getrennt und detektiert werden. Hierbei werden die Ionen immer nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt. Die technische Umsetzung der Analysatoren kann sich dabei stark unterscheiden: Die älteste Form des Massenanalysators verwendet für die Auftrennung ein Magnetfeld (B), welches von den Ionen durchlaufen wird (sogenanntes Sektorfeld-Massenspektrometer). Zuvor werden die Ionen über ein elektrisches Feld mit der Beschleunigungsspannung (U) auf eine einheitliche Energie gebracht. Die Trajektorie der Ionen wird durch das Magnetfeld abgelenkt, wobei Ionen mit kleinerem m/z stärker abgelenkt werden. Es gilt Gleichung 2.1 mit dem Ablenkungsradius r , der magnetischen Flussdichte B und der Beschleunigungsspannung U :

$$m/z = \frac{r^2 \cdot B^2}{2 \cdot U} \quad (2.1)$$

Flugzeit-Massenanalysatoren (engl.: **time-of-flight**, kurz: ToF) bedienen sich eines anderen physikalischen Konzepts zur Massentrennung: Über eine Beschleunigungsspannung werden die Ionen im Vakuum beschleunigt und deren Flugzeit t_{ToF} in einem feldfreien Raum bis zum Eintreffen im Detektor aufgenommen [2, 55]. Das Massenspektrum ergibt sich nach $t_{\text{ToF}} \propto \sqrt{m/z}$ somit aus dem Detektorsignal als Funktion der Flugzeit. Um für die Ionentrajektorien einen definierten Startzeitpunkt zu realisieren, müssen diese in Form von Paketen durch den Analysator geschickt werden. Dies kann beispielsweise durch eine dem Analysator vorangestellte Paul-Falle geschehen. Anstatt einer Ionenfalle können auch diskrete Desorptions-Methoden wie MALDI oder SIMS verwendet werden.

Eine wie in dieser Arbeit verwendete Paul-Falle kann darüber hinaus auch als eigenständiger Massen-Analysator verwendet werden. Das Funktionsprinzip ist dabei ähnlich wie das der Quadrupol-Analysatoren: Die Paul-Falle ist eine zylindrische Quadrupol-Falle und besteht aus einem hyperbolischen Ring und zwei ebenfalls hyperbolisch geformten Endkappen [2, 55, 67, 70, 71]. Diese drei Elektroden spannen somit ein kleines Volumen für die Ionen-Akkumulation auf.

Über eine angelegte Wechselspannung können Ionen auf dreidimensionalen cyclischen Bahnen gehalten werden, die von ihrem m/z -Verhältnis abhängen. Ein Hintergrundgas wie He oder Ar ermöglicht es, die Ionen beim Eintritt in die Falle über Stöße abzubremesen, um deren überschüssige kinetische Energie, die zu Kollisionen mit den Elektroden der Falle oder zur Durchquerung der Falle führen würde, aufzunehmen. Der Auswurf der Ionen in einen Detektor erfolgt durch das Verändern der Amplitude oder Frequenz der an der Ringelektrode anliegenden, hochfrequenten Wechselspannung [72]. Die Kriterien für eine stabile Trajektorie innerhalb der Falle kann in einem Diagramm, wie in Abbildung 2.3 gezeigt, dargestellt werden. Es werden üblicherweise die zwei Parameter a_z und q_z verwendet, die für einfach geladene Ionen die Stabilitätskriterien beschreiben [72].

$$a_z = -\frac{8 \cdot e}{4\pi^2 \cdot f^2 \cdot m \cdot r_0^2} \cdot U \quad (2.2)$$

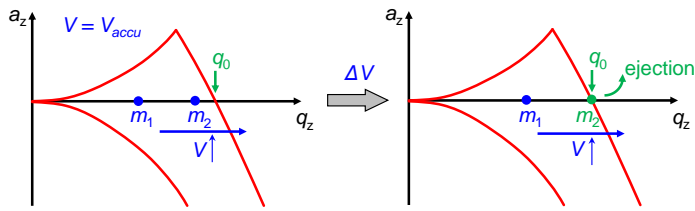
$$q_z = \frac{4 \cdot e}{4\pi^2 \cdot f^2 \cdot m \cdot r_0^2} \cdot V \quad (2.3)$$

mit

- e : Elementarladung
- m : Masse des Ions
- r_0 : Fallenradius; hier $r_0 \approx 1$ cm
- f : Frequenz der Fallenspannung
- U : Gleichspannungsanteil der Fallenspannung
- V : Wechselspannungsanteil der Fallenspannung

In Abbildung 2.3 wird der Bereich, in dem die Ionen stabil in der Falle gehalten werden, durch rote Linien begrenzt [73]. Die Lage der als blaue Punkte eingezeichneten Ionen mit unterschiedlichen Massen m_1 und m_2 ($m_1 > m_2$) im Stabilitätsdiagramm wird hier für den Fall ohne Gleichspannungsanteil ($U = 0$) gezeigt. Bei einem „Cutoff-Scan“ wird der Wechselspannungsanteil V erhöht, um Ionen mit einer bestimmten Masse das Verlassen der Ionenfalle zu ermöglichen; dargestellt

(a) Cutoff-scan



(b) Resonance scan

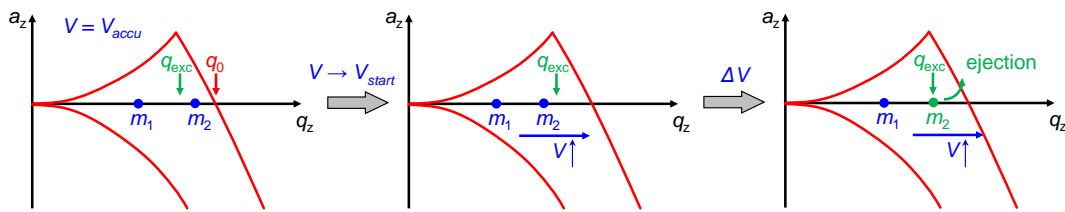


Abbildung 2.3: Stabilitäts-Diagramm für eine Quadrupol-Ionenfalle. Ionen (blaue Punkte) sind für einen von a_z und q_z aufgespannten Bereich stabil (in rot umrandet). Die stabil in der Falle gehaltenen Ionen können durch eine Variation der Amplitude der Wechselspannung V ausgeworfen werden. (a) Ionen mit $q_z > q_0$ sind außerhalb des roten Bereichs nicht stabil und verlassen die Falle (grüner Punkt). (b) Eine höhere Massenauflösung wird durch die resonante Anregung bei q_{exc} erreicht. Die Wechselspannungsamplitude wird zunächst erhöht ($V = V_{start}$) um einen Auswurf über die Cutoff-Bedingung zu verhindern. Abbildung mit Änderungen aus Quelle [74].

in Abbildung 2.3(a). Die Erhöhung des Wechselspannungsanteils V führt zu einer Erhöhung der Parameter q_z der Ionen in der Falle. Ionen mit $q_z > q_0$ sind in der Falle nicht stabil und verlassen diese in z -Richtung [72].

Eine erhöhte Massenauflösung und insbesondere ein effektiver Auswurf lässt sich durch eine resonante Anregung der Ionen innerhalb des stabilen Bereiches und den darauffolgenden Auswurf erreichen, wie in Abbildung 2.3(b) dargestellt [75]. Hierzu wird über die Amplitude der Wechselspannung V der Parameter q_z der Ionen zunächst reduziert ($V = V_{start}$). Anschließend wird über die Endkappen der Ionenfalle zusätzlich ein hochfrequentes elektrisches Feld mit geringer Amplitude angelegt. Je nach Wahl der Frequenz werden so Ionen mit einem bestimmten Wert $q_z = q_{exc}$ resonant angeregt und aus der Falle ausgeworfen. Eine ursprüngliche Reduzierung der Wechselspannungsamplitude ist notwendig, um die Ionen mit $q_z \geq q_{exc}$ bei der Variation von V nicht aus dem stabilen Bereich auszuwerfen, bevor sie einen resonanten Auswurf erfahren. Dies entspräche einem ungewollten

Cutoff-Scan, bei dem Ionen mit kleineren Massen parallel zu den resonant ausgeworfenen Ionen die Falle verlassen könnten. Für die Änderung des Parameters q_z der Ionen kann grundsätzlich neben der Amplitude der Wechselspannung V auch die Anregungsfrequenz f genutzt werden. Da das in dieser Arbeit genutzte Massenspektrometer aber den Ionenauswurf über eine feste Anregungsfrequenz und eine variable Wechselspannungsamplitude kontrolliert, wurde der Prozess in dieser Form vorgestellt [67]. Das Signal des nachgestellten Detektors als Funktion der eingestellten Spannungsamplitude beziehungsweise der Anregungsfrequenz ergibt über den Zusammenhang zur Ionenmasse in Gleichung 2.3 ein Massenspektrum. Neben der reinen Akkumulierung und massenselektiven Detektion können in der Falle auch vor dem Auswurf der Ionen Reaktionen induziert werden. Ein Beispiel, das vor allem für die Identifikation größerer Moleküle von enormer Bedeutung ist, ist die CID, die in Kapitel 2.4.1 näher erklärt wird [61].

Informationen über die Summenformel eines Analytmoleküls können darüber hinaus auch über die Isotopenverteilung des Moleküls gewonnen werden: Die Isotopenverteilung der Elemente zeigt sich auch in Massenspektren und folgt dabei der natürlichen Häufigkeit der stabilen Isotope. Mit einer Isotopenhäufigkeit von 98,9% für ^{12}C und 1,1% für ^{13}C ist bei organischen Molekülen insbesondere das Isotop ^{13}C für zusätzliche Peaks verantwortlich, vergleiche Abbildung 2.2 [39, 76]. Diese statistische Verteilung spiegelt sich in den Massenspektren durch einen entsprechenden Verschiebung des m/z -Wertes wieder: für $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ist diese Differenz $\Delta(m/z) = 1$. Die charakteristischen Isotopenverhältnisse der unterschiedlichen Elemente können damit Aufschluss über die Zusammensetzung des Moleküls geben. Ein in dieser Arbeit wichtiges Element ist Iridium, welches mit ^{191}Ir (37,3%) und ^{193}Ir (62,7%) zwei deutlich unterschiedliche Isotope und damit besonders charakteristische Isotopenmuster aufweist [39]. Die Kombination aus Ladungszustand und Isotopenverteilung gibt einen ersten, groben Aufschluss über das Molekül. Eine genaue Summenformel und Strukturformel lassen sich aus dem Massenspektrum nicht direkt ablesen, aber erste Aussagen über die mögliche Konstitution können getroffen werden. Nähere Informationen über den Aufbau eines Moleküls kann die CID und die damit einhergehende Fragmentationsanalyse liefern, vergleiche Kapitel 2.4.1.

2.2 Wechselwirkung schneller Schwerionen mit Materie

Die Mechanismen, die die Wechselwirkung zwischen schnellen Schwerionen und einer Festkörperprobe beschreiben, sind für das Verständnis der Ioneninduzierten Fragmentierung von Biomolekülen essentiell. Beim Ionenbeschuss eines Mediums findet ein Energieübertrag der kinetischen Energie der schnellen Ionen an das umgebende Medium statt. Der abgegebene Betrag der kinetischen Energie an die Umgebung hängt von ihrer Geschwindigkeit ab. Das Bremsvermögen S (engl.: stopping power) beschreibt hierbei für eine bestimmte kinetische Energie des eintreffenden Ions den Energieverlust pro zurückgelegter Wegstrecke als $S = -dE/dx$ [77]. Abbildung 2.4 zeigt in grau eine Simulation des gesamten Energieverlustes eines Gold-Ions in einer organischen Probe, deren Zusammensetzung dem Peptid Angiotensin II ($C_{50}H_{71}N_{13}O_{12}$) bei einer Dichte von $\rho_{\text{ATII}} = 1,1 \text{ g/cm}^3$ entspricht. Diese Simulation wurde mit dem SRIM-2013 Softwarepaket erstellt und zeigt das als Bragg-Peak bezeichnete Maximum des totalen Energieverlustes bei ungefähr 1 GeV [78, 79]. Der totale Energieverlust lässt sich dabei in zwei fundamentale Mechanismen unterteilen: Bei kinetischen Energien bis $\approx 100 \text{ keV}$ dominiert der nukleare Energieverlust (engl.: nuclear stopping), der durch elastische Kollisionen des einfallenden Ions mit den stationären Atomrümpfen des bestrahlten Materials beschrieben werden kann (in Abbildung 2.4 in rot dargestellt) [80]. Der Energieverlust des eintreffenden Ions erfolgt dabei durch einen Impulsübertrag auf die Atomrümpfe im Material. Da bei steigender kinetischer Energie des Ions die Interaktionszeit zwischen dem eintreffenden Ion und den Atomrümpfen des Materials reduziert wird, sinkt der nukleare Energieverlust bei hohen kinetischen Energien stark ab. Für Energien $> 1 \text{ MeV}$ tritt der Mechanismus des elektronischen Energieverlustes (engl.: electronic stopping) in den Vordergrund (in Abbildung 2.4 in grün dargestellt). Einfallende Ionen interagieren mit den Elektronen der bestrahlten Materie und regen diese in höhere Zustände an. Diese beiden Mechanismen der Wechselwirkung werden im Folgenden näher beschrieben.

2.2.1 Nuklearer Energieverlust

Das Auftreffen eines Ions auf Materie bei kinetischen Energien, die durch den nuklearen Energieverlust dominiert werden (im gewählten Beispiel der Gold-Ionen in Angiotensin II $< 100 \text{ keV}$), kann als eine Kaskade von einzelnen Stößen beschrie-

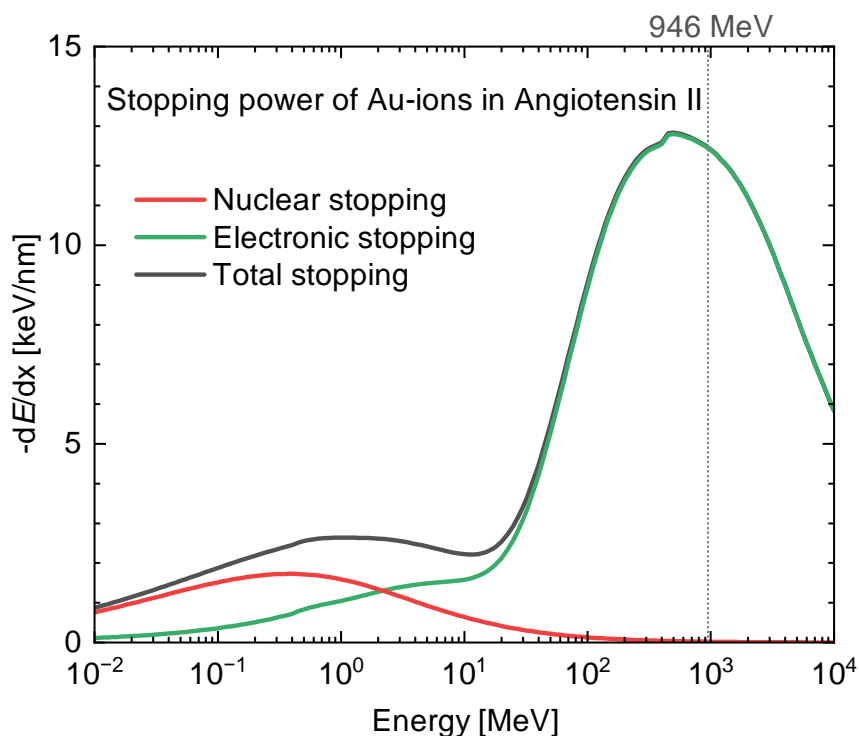


Abbildung 2.4: Energieverlust ($S = -dE/dx$) von Gold-Ionen in einer Probe, die der atomaren Zusammensetzung des Peptids Angiotensin II ($\rho_{\text{ATII}} = 1,1 \text{ g/cm}^3$) entspricht, in Abhängigkeit von der kinetischen Energie des einfallenden Ions. Der Gesamtenergieverlust (grau) unterteilt sich in den Beitrag der nuklearen Energieverlusts (rot) und den Beitrag des elektronischen Energieverlustes (grün). Die gestrichelte Linie zeigt die in dieser Arbeit verwendete kinetische Energie von 946 MeV an; dies entspricht einem fast ausschließlich elektronischen Energieverlust von 12,5 keV/nm. Diese Simulation wurde mit dem SRIM-2013 Softwarepaket erstellt [78, 79].

ben werden [80]. Der Energieübertrag E_{trans} während eines einzelnen Stoßes des einfallenden Ions mit einem Atom des Mediums in Ruheposition wird beschrieben durch [79, 81]:

$$E_{\text{trans, Nuk}} = 4 \cdot \frac{m_{\text{Ion}} \cdot m_{\text{Mat}}}{(m_{\text{Ion}} + m_{\text{Mat}})^2} \cdot E_{\text{kin}} \cdot \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.4)$$

mit

- m_{Ion} : Masse des einfallenden Ions
- m_{Mat} : Masse eines Atoms der ruhenden Materie
- E_{kin} : ursprüngliche kinetische Energie des Ions
- θ : Streuwinkel

Der Stoßparameter beschreibt den minimalen Abstand zwischen der ursprünglichen Trajektorie des Ions und dem betrachteten Atom [82]. Der Streuwinkel ist sowohl von diesem Stoßparameter als auch vom Streupotential $V(r)$ abhängig: Bei der Annäherung der geladenen Ionen an den Atomkern des bestrahlten Materials erfahren diese eine repulsive Kraft. Diese kann durch das Coulomb-Repulsions-Potential $V(r)$ in Abhängigkeit des Abstands r der betrachteten Atome wie in Gleichung 2.5 angenähert werden [77, 79, 83]:

$$V(r) = \frac{Z_{\text{Ion}} \cdot Z_{\text{Mat}} \cdot e^2}{r} \cdot \Phi\left(\frac{r}{a}\right) \quad (2.5)$$

mit

- Z_{Ion} : Kernladungszahl des einfallenden Ions
- Z_{Mat} : Kernladungszahl der ruhenden Materie
- e : Elementarladung
- $\Phi\left(\frac{r}{a}\right)$: Abschirmpotential
- r : Abstand zwischen Ion und betrachtetem Atom
- a : Abschirmungslänge

Dies beschreibt im Wesentlichen das Coulombpotential des Kerns, dessen Abschirmung durch die ungebundenen Elektronen durch $\Phi\left(\frac{r}{a}\right)$ berücksichtigt wird. Eine universelle Näherung für $\Phi\left(\frac{r}{a}\right)$ und a wurde von Ziegler, Biersack und Littmark eingeführt mit a_{uni} [79]:

$$\begin{aligned} \Phi\left(\frac{r}{a_{\text{uni}}}\right) = & 0,1818 \cdot e^{-3,2 \cdot \frac{r}{a_{\text{uni}}}} + 0,5099 \cdot e^{-0,9432 \cdot \frac{r}{a_{\text{uni}}}} \\ & + 0,2802 \cdot e^{-0,4028 \cdot \frac{r}{a_{\text{uni}}}} + 0,2817 \cdot e^{-0,2016 \cdot \frac{r}{a_{\text{uni}}}} \end{aligned} \quad (2.6)$$

$$a_{\text{uni}} = 0,88534 \cdot \frac{a_0}{Z_{\text{Ion}}^{0,23} + Z_{\text{Mat}}^{0,23}} \quad (2.7)$$

a_0 : Bohrscher Radius

Das universale Abschirmungspotential $\Phi\left(\frac{r}{a_{\text{uni}}}\right)$ sowie die universale Abschirmungslänge a_{uni} wurden von Ziegler, Biersack und Littmark experimentell ermittelt und verifiziert [84, 85].

Mittels Gleichungen 2.4 und 2.5 kann S_{Nuk} durch Integration über alle Stoßparameter ermittelt werden. Der mittlere nukleare Energieverlust $S_{\text{Nuk}}(E_{\text{kin}})$ kann aber auch durch Gleichung 2.8 weiter angenähert werden [79, 83]:

$$S_{\text{Nuk}}(E_{\text{kin}}) = \frac{\pi \cdot a_{\text{uni}}^2 \cdot \gamma \cdot E_{\text{kin}}}{\epsilon} S_{\text{Nuk}}(\epsilon) \quad (2.8)$$

mit

$$\gamma = \frac{4 \cdot m_{\text{Ion}} \cdot m_{\text{Mat}}}{(m_{\text{Ion}} + m_{\text{Mat}})^2} \quad (2.9)$$

$$\epsilon = \frac{a_{\text{Uni}} \cdot m_{\text{Mat}} \cdot E_{\text{kin}}}{Z_{\text{Ion}} \cdot Z_{\text{Mat}} \cdot e \cdot (m_{\text{Ion}} + m_{\text{Mat}})} \quad (2.10)$$

zusammen mit

$$S_{\text{Nuk}}(\epsilon) = \begin{cases} \frac{\ln(1 + 1,1383 \cdot \epsilon)}{2 \cdot [\epsilon + 0,01321 \cdot \epsilon^{0,21226} + 0,19593 \cdot \epsilon^{\frac{1}{2}}]} & \text{für } \epsilon \leq 30 \\ \frac{\ln(\epsilon)}{2 \cdot \epsilon} & \text{für } \epsilon > 30 \end{cases} \quad (2.11)$$

Der Ausdruck 2.11 beschreibt eine empirische Näherung, die die experimentellen Daten für einen weiten Bereich unterschiedlicher ϵ -Werte gut reproduziert.

2.2.2 Elektronischer Energieverlust

Im in Abbildung 2.4 gezeigten Beispiel ist für Ionen mit kinetischen Energien > 100 keV der nukleare Energieverlust nicht mehr dominant, sondern der elektronische Energieverlust trägt einen signifikanten Teil zum Energieverlust bei. Da in dieser Arbeit schnelle Schwerionen mit kinetischen Energien im GeV-Bereich verwendet werden, ist der elektronische Energieverlustmechanismus für die Betrachtung von großer Bedeutung. Hierbei gibt das einfallende Ion Energie an die Elektronen des Materials ab, indem es diese in höhere Zustände anhebt oder ganz von den Atomrümpfen löst. Aufgrund der kleinen Masse eines Elektrons ist der direkte Impulsübertrag gering und das schnelle Ion erfährt keine Ablenkung. Der elektronische Energieverlust kann durch die von Bethe und Bloch entwickelte Gleichung in Bornscher Näherung für vollständig ionisierte Projektile und nicht-relativistische Geschwindigkeiten ausgedrückt werden [82, 86, 87]:

$$S_{\text{trans, Elek}} = \frac{4 \cdot \pi \cdot Z_{\text{Ion}}^2 \cdot Z_{\text{Mat}} \cdot e^4 \cdot N_e}{m_e \cdot v^2 (4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0)^2} \cdot L \quad (2.12)$$

$$(2.13)$$

mit

- N_e : Elektronendichte der bestrahlten Materie
- m_e : Masse des Elektrons
- v : Geschwindigkeit des einfallenden Ions
- ϵ_0 : elektrische Feldkonstante
- L : Korrekturterm

mit dem Korrekturterm L

$$L = \ln \left(\frac{2 \cdot m_e \cdot v^2}{\langle I \rangle} \right) \quad (2.14)$$

mit

- $\langle I \rangle$: mittlere Ionisationsenergie der bestrahlten Materie

Aus Gleichung 2.12 lässt sich ableiten, dass sich der elektronische Energieverlust proportional zu $\propto \frac{1}{v^2}$ und damit $\propto \frac{1}{E_{\text{kin}}}$ verhält. Ebenso lässt sich erkennen, dass der elektronische Energieverlust quadratisch mit der Kernladungszahl des einfallenden Ions Z_{Ion} ansteigt; für maximalen Energietransfer sind somit schwere Elemente geeignet.

Vollständig ionisierte Projektile sind allerdings nur bei sehr hohen Energien zu erwarten. Ein alternatives Modell von Lindhardt und Scharff, das den Energieverlust teilweise ionisierter Projektile beschreibt, basiert auf dem elektronischen Energieverlust eines Ions, das sich durch ein freies Elektronengas bewegt [88, 89]:

$$S_{\text{trans, Elek}} = \frac{8 \cdot \pi \cdot N_e \cdot a_0 \cdot Z_{\text{Ion}}^{\frac{7}{6}} \cdot Z_{\text{Mat}} \cdot e^2}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \left(Z_{\text{Ion}}^{\frac{2}{3}} + Z_{\text{Mat}}^{\frac{2}{3}} \right)^{\frac{3}{2}}} \cdot \frac{v}{v_0} \quad (2.15)$$

mit

- v_0 : Anfangsgeschwindigkeit des einfallenden Ions

Gleichung 2.15 berücksichtigt den Impulsübertrag der Elektronen der bestrahlten Materie auf das einfallende Ion. Ebenso wird Wechselwirkung der Atomrümpfe der Materie mit den Restelektronen des Ions berücksichtigt. Zusammenfassend lässt sich aus der Gleichung 2.15 erkennen, dass der elektronische Energieverlust für relativ kleine kinetischen Energien zunächst mit $\sqrt{E_{\text{kin}}}$ ansteigt. Für große Energien zeigt Gleichung 2.12, dass der elektronische Energieverlust mit $\propto 1/E_{\text{kin}}$ abnimmt. Bei einer Energie ergibt sich somit ein Maximum des totalen Energieverlustes, das als Bragg-Peak bezeichnet wird. In der beispielhaften Simulation der Bestrahlung des Angiotensin II aus Abbildung 2.4 liegt dieses Maximum bei 500 MeV und einem Energieverlust von 12,8 keV/nm.

2.3 Organische Moleküle

Der Begriff „Organische Moleküle“ oder „Organik“ im Allgemeinen beschreibt eine kohlenstoffhaltige Verbindung, die neben Wasserstoff (H) auch andere Atome wie Stickstoff (N), Sauerstoff (O) und Schwefel (S) enthalten kann [90, 91]. Die Besonderheit der organischen Moleküle stellt die Vielzahl an Verbindungen, die sich aus den wenigen Bausteinen bilden lassen, dar [92]. Neben Molekülen wie Lipiden, Phosphorsäuren und Zucker bilden auch die Aminosäuren und die daraus aufgebauten Peptide beziehungsweise Proteine Grundbausteine für Leben [90, 91]. Aber auch die Komplexierung von organischen Molekülen um ein Zentralion, wie der Eisen-Komplex Hämoglobin, ist biologisch wichtig [90]. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Molekülarten der Peptide und Komplexe sollen im Folgenden kurz eingeführt werden.

2.3.1 Peptide

Peptide bestehen aus Aminosäuren, genauer auch Aminocarbonsäuren, die in Kondensationsreaktionen miteinander reagiert haben. Der Name Aminocarbonsäure beschreibt hier den Aufbau schon in seinem Grundgerüst: Eine primäre Aminogruppe ist an einem Kohlenstoff (dem α -C-Atom) gebunden, an dem wiederum der aminosäurespezifische Rest und eine Carboxylgruppe gebunden ist; vergleiche Abbildung 2.5 und 2.6. Unter Wasserabscheidung können zwei Aminosäuren eine Peptidbindung eingehen und so Polypeptide wie Proteine (Polypeptide mit > 100 Aminosäuren) bilden [93]. Die Nomenklatur für die so entstandene Aminosäuresequenz von Peptiden sieht grundsätzlich die Benennung

aus Richtung der Aminogruppe (N-Terminus stets links dargestellt) entlang des Peptidrückgrats zur terminalen Carbonsäure (C-Terminus stets rechts) vor [94]. 20 dieser Aminosäuren sind in der Biologie und damit im menschlichen Stoffwechsel vertreten; sie werden als „proteinogen“ bezeichnet. Diese natürlich vorkommenden Aminosäuren (vergleiche Abbildung 2.5) können nach der Eigenschaft

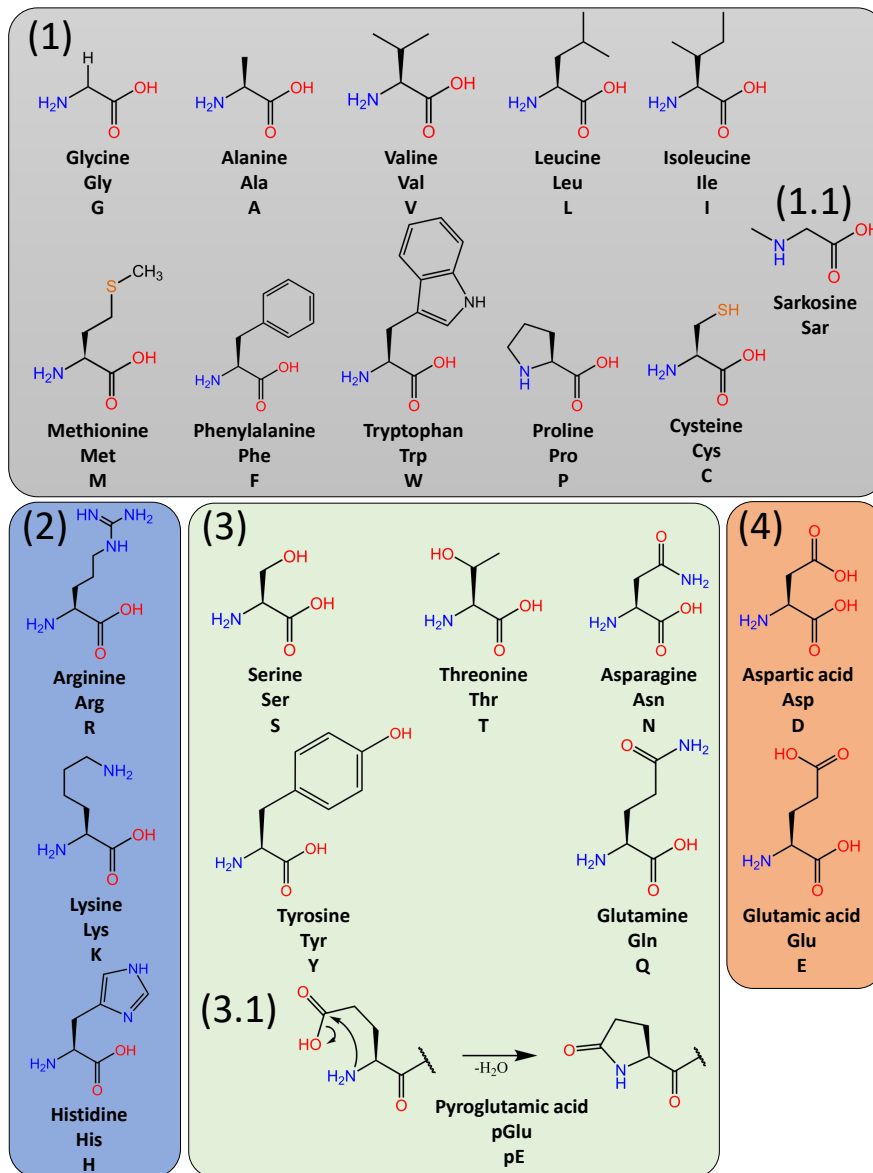


Abbildung 2.5: Übersicht der Strukturen der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren. Zusätzlich zu den proteinogenen Aminosäuren sind die Aminosäuren Sarkosin in (1.1) und pyroGlutaminsäure einschließlich Reaktionsmechanismus in (3.1) dargestellt. Die Aminosäuren wurden in die folgenden Gruppen eingeteilt [90]: (1) unpolare und neutrale Reste; (2) basische Reste; (3) polare und neutrale Reste; (4) saure Reste.

ihres funktionellen Rests weiter unterteilt werden. Für die Betrachtung in dieser Arbeit ist insbesondere die Unterteilung nach saurem, neutralem oder basischem Charakter wichtig. Diese Unterteilung ordnet die Interaktion der Aminosäure mit dem ionisierenden Proton in DINEC-MS, Kapitel 2.1.1, und/oder die Beeinflussung der Fragmentierung, wie in Kapitel 2.4 näher beschrieben, ein.

Neben den proteinogenen Aminosäuren gibt es auch Aminosäuren mit anderen denkbaren Resten, aber auch natürlich vorkommende Derivate von Aminosäuren. Eines dieser Derivate ist das Sarkosin (Sar), welches den Aminosäurerest nicht am α -C-Atom, sondern direkt an der Aminogruppe trägt (vergleiche (1.1) in Abbildung 2.5). Sar ist somit auch ein Derivat des Glycins, bei dem die Aminogruppe methyliert wurde, und kann somit auch als *N*-Methylglycin bezeichnet werden.

Ein weiteres Derivat, Pyroglutaminsäure (pGlu), wird bei einer intramolekularen Reaktion der Glutaminsäure gebildet (vergleiche (3.1) in Abbildung 2.5). Hierbei kommt es zu einem Ringschluss der Carboxylsäure des Glutaminsäurerestes und der Aminogruppe. Unter Abscheidung von Wasser (H_2O) bildet sich so ein cyclisches Amid, das man als 5-Oxoprolin auch als Derivat des Prolins beschreiben kann. Durch die Cyclisierung steht das terminale Amid nicht mehr für eine weitere Kondensationsreaktion zur Verfügung, somit ist pGlu eine N-terminierende Aminosäure; durch Enzyme kann diese aber auch wieder freigelegt werden [95].

Da sich Aminosäuren beliebig aneinander synthetisieren lassen, eignen sich diese gut für systematische Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Strukturen beispielsweise auf das Fragmentationsverhalten. In dieser Arbeit wurde das Oligopeptid Angiotensin II (*DRVYIHPF*) als Ausgangsmolekül gewählt. Aufgrund des basischen Arginins (*R*) kann Angiotensin II leicht protoniert werden. In dieser Sequenz aus acht Aminosäuren lassen sich dann leicht einzelne Aminosäuren in der Synthese austauschen, um einzelne Abhängigkeiten, beispielsweise auf die Fragmentation, zu untersuchen, welche in Kapitel 5 dargelegt werden. Abbildung 2.6 zeigt Angiotensin II in (a) und als ein weiteres Beispielmolekül Bradykinin in (b), das in dieser Arbeit verwendet wurde. Die Peptide sind mit ihrer Aminosäuresequenz im Ein- und Dreibuchstabencode benannt.

In den Abbildungen A.1, A.2 und A.3 im Anhang 5.3 werden alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide schematisch dargestellt. Dort sind die Peptide sowohl nach der Nomenklatur der IUPAC-IUB, als auch mit Trivialnamen benannt [96]. Die herangezogenen Kriterien für die Auswahl einzelner Peptide, insbesondere bei Angiotensin-II-Derivaten, werden in Kapitel 5 genauer dargelegt und erklärt.

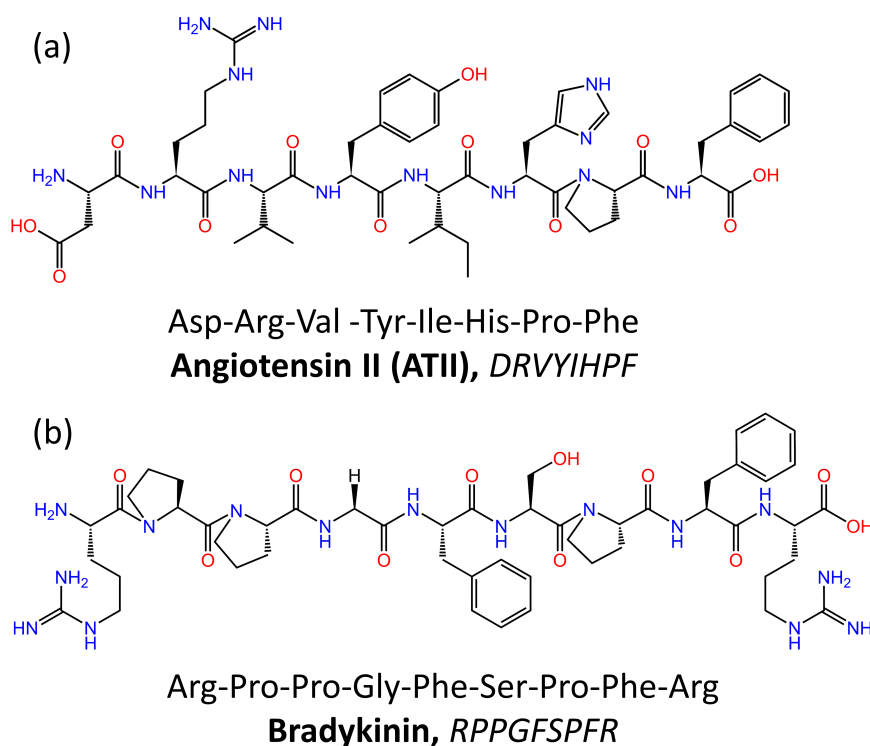


Abbildung 2.6: Strukturformel zweier untersuchter Peptide: In (a) Angiotensin II (*DRVYIHPF*) und in (b) Bradykinin (*RPPGFSPFR*). Die Aminosäuresequenzen sind nach dem Ein- und Dreibuchstabencode benannt. Sauerstoffatome werden rot und NH_x -Einheiten in blau dargestellt.

2.3.2 Porphyrine und $\text{Ir}(\text{ppy})_3$

Komplexe, oder auch Organometallkomplexe genannt, sind Moleküle, bei denen Liganden über verfügbare Elektronenpaare um ein oder mehrere Zentralatome koordinieren [55, 90]. Koordiniert ein Ligandmolekül mehr als eine Koordinationsstelle, so spricht man von einem Chelatkomplex. Im Extrem kann auch ein einziges Moleküle alle Koordinationsstellen des Koordinationszentrum besetzen und so einen besonders stabilen Komplex bilden [90]. Beispiele hierfür sind die Komplexe der Porphyrine: Porphyrin im Allgemeinen ist ein cyclisches Tetrapyrrol, das sowohl an seinen Methanyldingruppen (meso-Stellung) oder aber an den Pyrrolgruppen (β -Stellung) zusätzliche Reste haben kann (vergleiche Abbildung 2.7). Der bekannteste Porphyrin Komplex ist das Häm B des Hämoglobins, das im Menschen den Sauerstofftransport ermöglicht. Es besteht aus einem Fe^{2+} -Ion und einem Porphyrin mit verschiedenen funktionellen Gruppen, in Abbildung 2.7(b) dargestellt [97, 98].

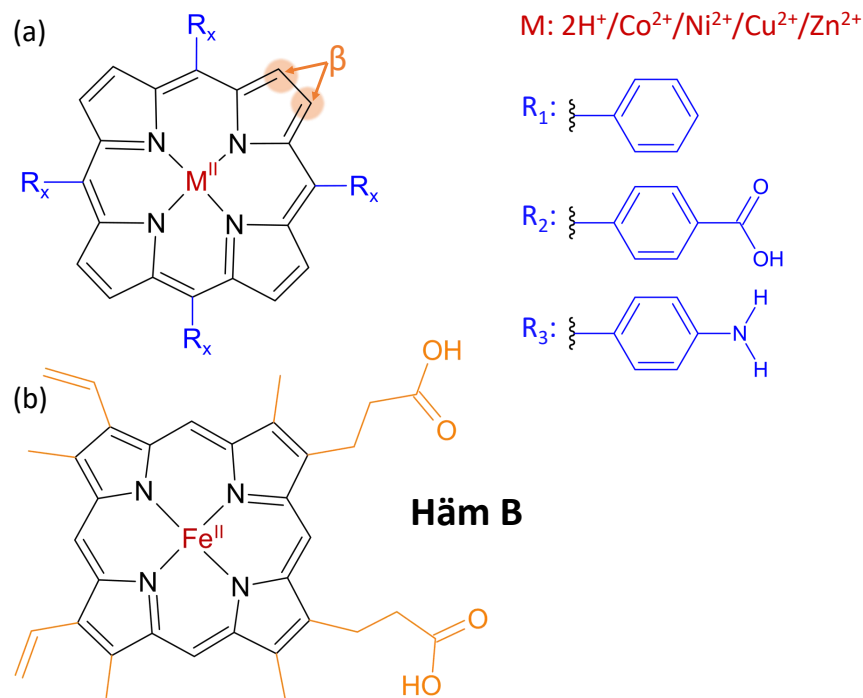


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung eines Porphyrins (a) und von Häm B (b). In (a) sind die β -Stellungen (orange), sowie die Reste in meso-Stellung (blau) markiert. Neben den in rot gelisteten Metall-Ionen befindet sich auch Wasserstoff, der sich in der allgemeinen Form des Porphyrins in dessen Zentrum befindet. Ebenso sind in blau die verwendeten Reste in meso-Stellung R_1 : Phenyl-, R_2 : Carboxyphenyl- und R_3 : Aminophenylreste gelistet.

Die sogenannten A4-Porphyrine zeichnen sich dadurch aus, dass sie an allen vier Methanyldingruppen den gleichen Rest (**R**) tragen. Darüber hinaus kann auch die zentrale Position, mit **M** markiert, verändert werden. Liegt das Porphyrin nicht als Komplex vor, so ist das Zentrum mit zwei Wasserstoffen ($M = 2H$) abgesättigt. Durch die Änderung der Restgruppen sowie des Zentralatoms kann die elektronische Struktur und damit das Ionisationsverhalten des Komplexes beeinflusst werden [99]. A4-Porphyrine werden in dieser Arbeit in Kapitel 4.1 untersucht.

Ein weiterer Komplex, das *fac*-tris(2-phenylpyridin) Iridium (kurz: Ir(ppy)₃), wird ebenfalls in dieser Arbeit untersucht. Beim Ir(ppy)₃ koordinieren drei Phenylpyridine ein Ir(III) Metall-Ion über den Stickstoff der Pyridin- und über den entsprechenden Kohlenstoff in der Phenylgruppe (vergleiche Abbildung 2.8) Dabei können die Phenylpyridine in zwei Konfigurationsisomeren an das Iridium koordinieren [100,101]. Liegen die gleichen koordinierenden Atome mit dem Zentralion auf einer räumlichen Ebene, so erhält das Isomer die Vorsilbe *mer* (lat. *meri-*

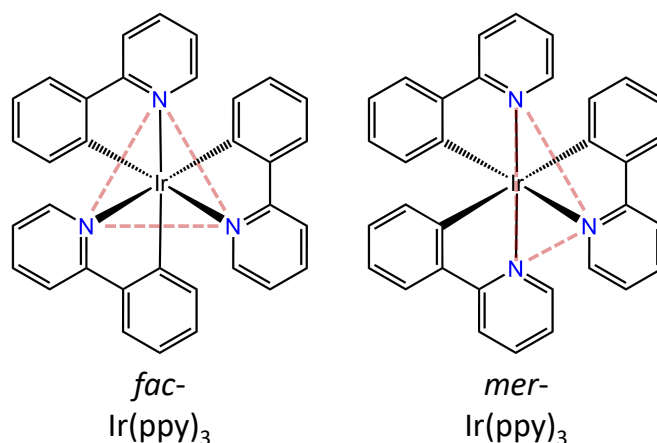


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der facialen und meridonalen Isomere von tris(2-phenylpyridin) Iridium, kurz *fac-* und *mer-*Ir(ppy)₃. Beim facialen Isomer liegen die gleichen Bindungszentren eines Liganden in einer Ebene, die nicht das Zentralatom einschließt, hier für den bindenden Stickstoff eingezeichnet. Liegen die Bindungszentren auf einer Ebene mit dem Koordinationszentrum, spricht man von einem meridonalen Isomer.

dianus: Äquator), während man das andere Isomer, bei dem sich zusammen mit dem Zentralatom insgesamt drei Ebenen ergeben, als *fac* (lat. *facies*: Gesicht) benennt.

Ir(ppy)₃ ist aufgrund seiner hohen Quanteneffizienz von fast 100% als phosphorisierende Komponente ein stark untersuchtes Material für organische Leuchtdioden (OLEDs) [102–107]. Dabei bildet das grün-gelb leuchtende Ir(ppy)₃ das grundlegende Molekül, auf dessen Basis über weitere funktionelle Gruppen an den Liganden die elektronische Eigenschaften abgestimmt werden können. Neben der Änderung des Moleküls selbst können auch weitere Materialien beigemischt werden, die über Matrixeffekte die Elektrolumineszenz beeinflussen [108–112]. Hierzu werden Mischungen mit anderen organischen Molekülen beziehungsweise Komplexen wie zum Beispiel Aluminium-tris(8-hydroxychinolin) (kurz: Alq₃) oder 3-(2-Benzothiazolyl)-*N,N*-diethylumbelliferylammin (trivial: Cumarin 6 oder kurz: Cou6) genutzt [113–115].

2.4 Fragmentierung von Biomolekülen

Die massenspektrometrische Analyse von Biomolekülen stellt in vielerlei Hinsicht eine Herausforderung dar: Neben der Sauberkeit der natürlich gewonnenen und

isolierten Analyten ist auch die Zuordnung beobachtbarer Massen beziehungsweise deren m/z -Verhältnisse zu möglichen Summen- oder Strukturformeln nicht trivial [8]. Gerade bei Proteinen oder Peptiden, die aus sich wiederholenden Aminosäuresequenzen aufgebaut sind (Kapitel 2.3.1), ist die eindeutige Zuordnung einzelner m/z -Werte zu deren Summenformel oder Aminosäuresequenz eine enorme Herausforderung und kann nicht immer eindeutig geschehen. Die bewusste Fragmentierung einer Spezies aus einem gemessenen Massenspektrum kann hier Aufschluss über die Zusammensetzung des Moleküls geben, das sich hinter einem Peak im Massenspektrum verbirgt [116]. Eine Fragmentanalyse kann beispielsweise mit Hilfe einer Ionenfalle durchgeführt werden. Hierbei wird zunächst der Analyt in die Gasphase überführt und ionisiert. Anschließend erfolgt die Isolation der zu fragmentierenden Spezies in einem engen Massenbereich. Die Fragmentierung selbst erfolgt dann mittels Kollisionen der Moleküle mit einem Hintergrundgas direkt in der Ionenfalle, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben. Alternativ kann die Fragmentierung auch in der ursprünglichen Probe stattfinden, so zum Beispiel bei der SHI-induzierten Fragmentierung, wie in Abschnitt 2.4.2 dargelegt.

Die so erhaltenen Spektren werden in Kapitel 5.2 im Detail diskutiert, allgemein gilt aber, dass entstehende Massedifferenzen zwischen dem Vorläufer- und dem Fragment-Ion eine chemische Bedeutung haben und entsprechend zu interpretieren sind [117]. Im Folgenden werden die Methoden zur Fragmentierung von Molekülen, die in dieser Arbeit genutzt und insbesondere zur Diskussion der Ergebnisse ioneninduzierter Fragmentierung herangezogen werden, vorgestellt.

2.4.1 Kollisionsinduzierte Fragmentierung

Bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung werden Vorläuferionen über Stöße mit einem Edelgas zur Fragmentierung gebracht [118]. Dies wird in der Tandem-Massenspektrometrie (MS^2) zur Strukturanalyse genutzt [61, 116, 118]. Abbildung 2.9 zeigt schematisch den Ablauf einer CID-Messung, wie sie in einer Quadrupol-Ionenfalle durchgeführt wird: Molekülionen werden zuerst in der Ionenfalle akkumuliert, Abbildung 2.9(1.). Das zu untersuchende Vorläuferion wird in einem begrenzten m/z -Bereich isoliert, wobei der zu isolierende m/z -Bereich frei gewählt werden kann, Abbildung 2.9(2.). Praktisch bedeutet das, dass auch ganze Abschnitte des Massenspektrums isoliert werden können, beispielsweise ganze Isotopenverteilungen. Nach der Isolierung folgt die Anregung durch eine größere Amplitude des Wechselfeldes, sodass die Ionen stärker beschleunigt werden und somit bei Stößen mit einem inerten Hintergrundgas angeregt werden können, Ab-

bildung 2.9(3.). Zu den häufig verwendeten Gasen gehören Helium, Argon oder Stickstoff [119]. Die Anregung ist resonant auf den isolierten m/z -Bereich abgestimmt. Durch die Stöße erzeugte Fragmente liegen außerhalb der resonanten Anregung, sodass diese keine weitere Fragmentierung erfahren. Hierbei stellt die Amplitude der Anregung den Parameter dar, über den der Grad der Fragmentierung kontrolliert wird, Abbildung 2.9(4.). Alle entstehenden Fragment-Ionen werden während der Anregung in der Ionenfalle gehalten. Es folgt die Relaxation der Fragmente durch das Hintergrundgas; Abbildung 2.9(5.). Die relaxierten Fragment-Ionen können anschließend erneut m/z -abhängig isoliert werden, um

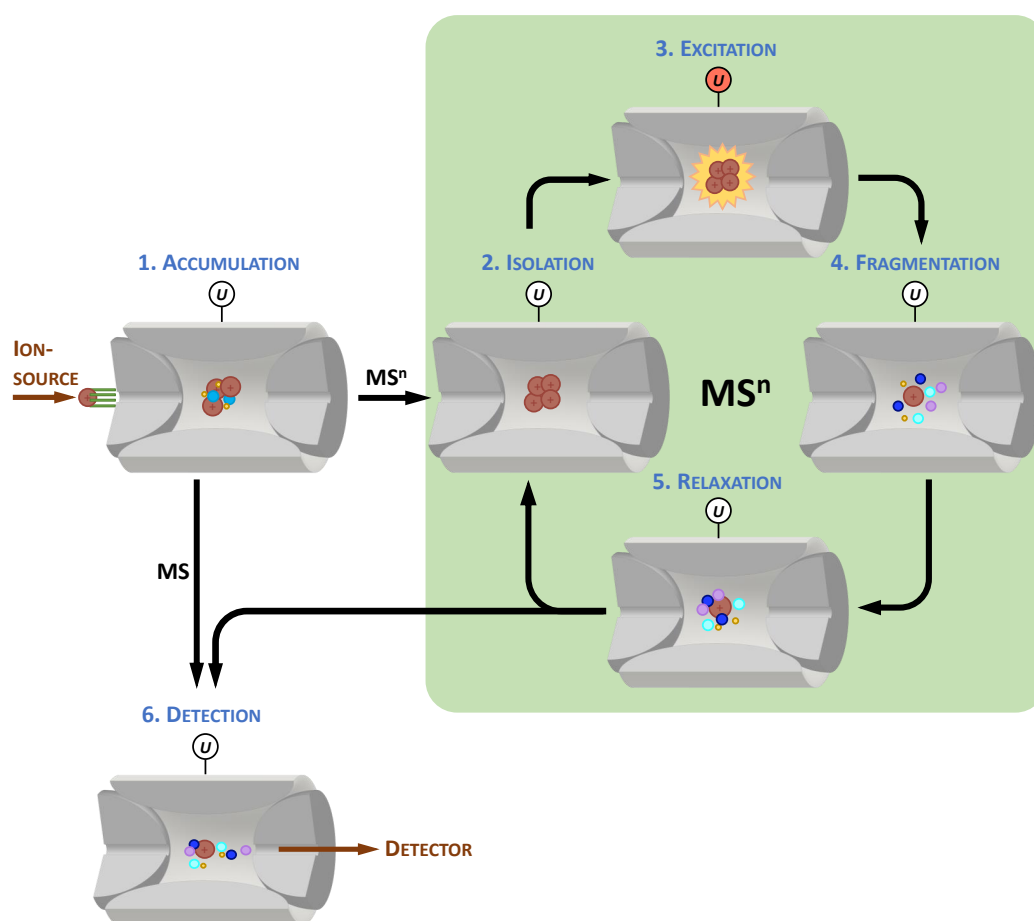


Abbildung 2.9: Skizze einer Quadrupol-Ionenfalle im MS und MSⁿ-Betrieb: Im MS-Betrieb werden Ionen akkumuliert (1.), abhängig vom m/z -Verhältnis ausgeworfen und detektiert (6.). Im MSⁿ-Betrieb werden Ionen akkumuliert (1.), ein m/z -Bereich isoliert (2.) und im inerten Hintergrundgas resonant angeregt (3.). Die erzeugten Fragmente (4.) relaxieren anschließend im Hintergrundgas (5.) und können dann nochmals isoliert werden, oder aber über den m/z -spezifischen Scan ausgeworfen und detektiert werden [55, 67, 116].

diese einen weiteren CID-Zyklus durchlaufen zu lassen. Dies nennt man MS^n , bei dem „n“ die Anzahl der Akkumulierungsschritte zählt; somit wird ein einfacher CID-Zyklus MS^2 genannt. Statt einer erneuten Anregung können die Fragment-Ionen nach jedem CID-Zyklus, wie bei einer nicht angeregten Messung, massenselektiv ausgeworfen und detektiert werden, Abbildung 2.9(6.) [55, 61, 67, 116].

Der Energieübertrag durch inelastische Stöße zwischen Anregungsgas und Vorläuferion ist abhängig von der Masse des Kollisionsgases. Es können bei einer Anregung via CID nur diskrete Energiebeträge pro Stoß übertragen werden. Somit findet die Anregung der Vibrationsmoden in mehreren spezifischen Beträgen statt, bis das Analyt-Ion schlussendlich fragmentiert. Es werden so bevorzugt energetisch niedrige Fragmentationswege erreicht [61, 120].

Mittels CID erzeugte Spektren können als Fingerabdruck zur Identifikation von Molekülen verwendet werden, da diese nur vom Ausgangsmolekül und der Anregungsamplitude abhängig sind [116, 121, 122]. Die Anregung mittels Stöße in der Gasphase findet aufgrund ihrer einfachen Umsetzung in einer Ionenfalle in der Analytik eine große Anwendung. Wegen des mittlerweile gutverstandenen Fragmentationsmechanismus ist CID damit eine der meist genutzten Fragmentierungsmethoden in der Peptid- und Proteinanalyse [120–126].

In Kombination mit der oberflächeninduzierten Fragmentierung (engl.: **surface-induced dissociation**, kurz: SID) konnte für Peptide das Fragmentationsverhalten in CID unter anderem mittels des „Modells mobiler Protonen“ (engl.: **mobile proton model**, kurz: MPM) erklärt werden [124, 127]. Bei der SID wird statt eines Gasatoms oder -moleküls eine feste Oberfläche als Stoßpartner verwendet [128, 129]. Als solche Oberflächen dienen zumeist Gold-Substrate, die mit einer monomolekularen, selbstanordnenden Schicht (engl.: **self-assembled monolayer**, kurz: SAM) aus langen perfluorierten Kohlenwasserstoffen versehen wurde [130–132]. Diese Oberfläche hat im Vergleich zum Analyt-Ion eine näherungsweise unendlich große Masse und die eingebrachte Stoßenergie wird über die kinetische Energie E_{kin} des Analytions bestimmt [130, 133–135]. Ein solcher Stoß mit der Oberfläche stellt eine einzelne, definierte Anregung dar und ermöglicht es so, das gleiche Molekül und dessen Fragmentationsverhalten bei unterschiedlichen Energien zu beobachten [133, 136]. Die hierbei übertragenen Energien liegen im Bereich von ungefähr 1-100 eV [137, 138]. Während die Auflösung der Fragmentierungsstärke nach der Anregungsenergie für eine normale massenspektrometrische Untersuchung einer Probe nicht notwendig ist, kann sie in den SID-Experimenten Aufschluss über den zu Grunde liegenden Prozess bei der Fragmenterzeugung geben [133].

Es wurde sowohl in der CID als auch in der SID beobachtet, dass manche protonierte Peptide statistisch verteilt Fragmente hervorbringen, während andere sehr selektiv fragmentieren. Eine mögliche Erklärung bringt das MPM, welches grundsätzlich davon ausgeht, dass Protonen Fragmentationen induzieren [124]: Im Rahmen des MPM wird hierfür nicht unterschieden, welchen Ursprungs das Proton ist. Sowohl ionisierende Protonen, als auch intramolekulare Protonen, die beispielsweise von einer Carboxylgruppe aus dem Peptid selbst stammen, können eine Fragmentation induzieren.

Für die weitere Diskussion ist aber zunächst die Einführung der verwendeten Nomenklatur für die entstehenden Fragmente notwendig: Die Benennung der Peptidfragmente folgt hierbei einer Nomenklatur, die sich an den möglichen Positionen der Fragmentierung im Peptidrückgrat orientiert. Diese Nomenklatur ist in Abbildung 2.10 schematisch dargestellt. Im Peptidrückgrat gibt es pro Peptidbindung drei unterscheidbare Schnitte, aus denen jeweils zwei komplementäre

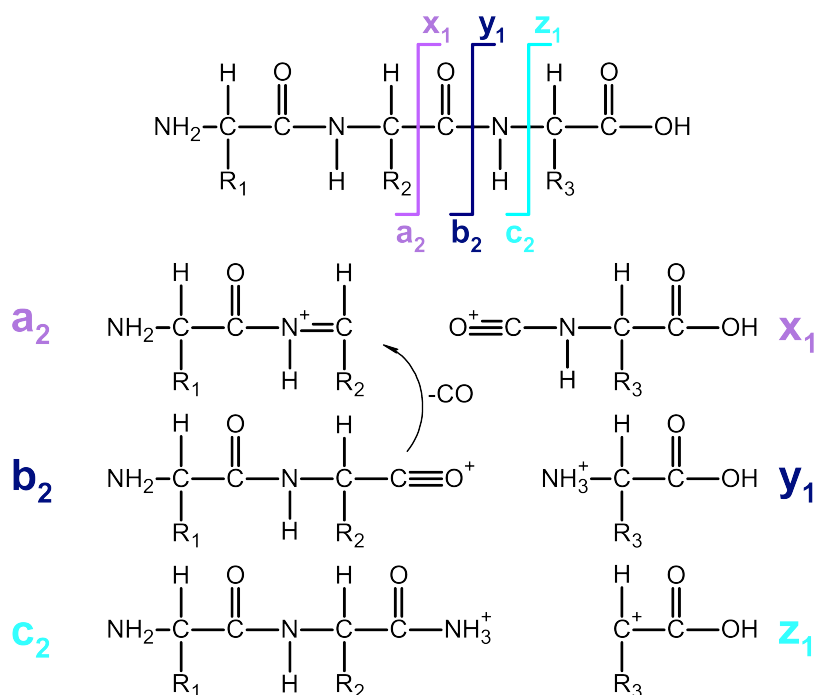


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung eines Tri-Peptids mit benannten Peptidrückgratfragmenten. Je nach Schnittposition in der Peptidbindung werden die komplementären Fragmente mit a/x , b/y oder c/z bezeichnet. Der Index gibt die Anzahl der Aminosäurereste in dem entsprechenden Fragment an [139–148]. a -, b -, x - und z -Fragmente werden in DiNEC-MS-Spektren teilweise mit zwei Wasserstoffatomen abgesättigt beobachtet.

Fragmente entstehen. N-terminale Fragmente erhalten die Bezeichnung a, b und c, während Fragmente mit C-Terminus mit x, y und z benannt werden. Ein Index gibt die Anzahl der verbliebenen Aminosäurereste in dem Fragment wieder. Für Peptide mit i Aminosäuren gilt für die Indizes n und m der komplementären Fragmente $i = n + m$. Bei a_n/x_m -Fragmenten liegt der Schnitt zwischen dem α -C-Atom und dem C-Atom der Carboxylgruppe. Für b_n/y_m liegt der Schnitt zwischen dem C-Atom der Carboxylgruppe und dem Amid der eigentlichen Peptidbindung. c_n/z_m -Fragmente bezeichnen die Fragmentierung zwischen dem Amid und dem α -C-Atom der C-terminalen Aminosäure [139–148]. Diese Schnitte im Peptidrückgrat werden als „spezifisch“ bezeichnet; als „unspezifische“ Schnitte hingegen werden Schnitte bezeichnet, die an der Seitenketten der Aminosäuren beobachtet werden.

Für die Anlagerung eines ionisierenden Protons an das Peptid stehen die Amide und die Carbonylgruppen im Peptidrückgrat sowie, falls vorhanden, die basischen Aminosäurereste von Lysin (K), Arginin (R) und Histidin (H) zur Verfügung. Durch eine externe Anregung kann ein Proton mobilisiert werden und sich entlang des Peptidrückgrats verlagern [116, 122, 149]. Obwohl die Protonenaffinität der Carbonylgruppe größer ist als die des Amids, legen Simulationen nahe, dass die protonierte Form des Stickstoffs hauptsächlich zur Fragmentierung beiträgt [150]. Die tatsächliche Position des Protons am Peptidrückgrat konnte allerdings noch nicht vollständig bestimmt werden. Beide Positionen führen aber zu einem partiell positiv geladenen Kohlenstoff der Carbonylgruppe, welches nukleophil angegriffen werden kann [150–153]. Diese Anlagerung des Protons führt zur bevorzugten Spaltung des Rückgrats N-terminal der Amid-Bindung in b/y-Fragmente [124]. Die dabei entstehenden, spezifischen Fragmente können sowohl mittels CID, als auch mittels SID beobachtet werden [124].

Das MPM wurde durch eine Vielzahl an CID- und SID-Experimenten bisher unterstützt. So wurde zum Beispiel in Vergleichsexperimenten, in denen Natriumkationen statt Protonen zur Ionisation von Peptiden genutzt wurden, eine Unterdrückung der Fragmentierung beobachtet [154]. Dadurch konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Ladung, sondern explizit ein mobiles Proton für die Dissoziation benötigt wird.

Abbildung 2.11 zeigt ein weiteres Experiment, auf dem das MPM aufbaut. In Abbildung 2.11(a) ist der Anteil der mittels SID fragmentierten Mutterionen gegen die Kollisionsenergie für vier verschiedenen Peptide aufgetragen. Bei den gezeigten Peptiden aus jeweils fünf Aminosäuren wurde jeweils eine Aminosäure in der Sequenz ausgetauscht. Durch das Ersetzen des N-terminalen Alanins (A) durch

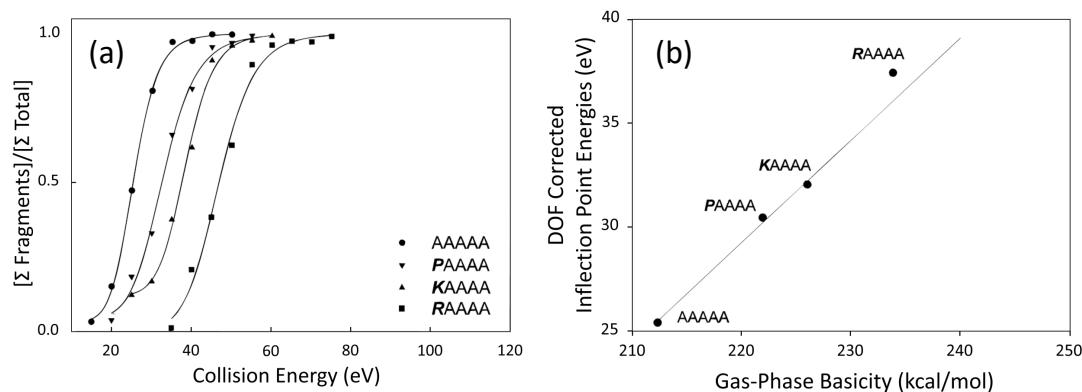


Abbildung 2.11: (a) Kollisionsenergieabhängige Effizienzkurven der Fragmentation von $[M+H]^+$ für die Peptide AAAAA (Kreis), PAAAA (gedrehtes Dreieck), KAAAA (Dreieck) und RAAAA (Quadrat) aus ESI/SID-Experimenten. (b) Die Kollisionsenergie des Wendepunktes der Kurven aus (a) ist gegen die Gasphasenbasizität des Restes der N-terminalen Aminosäure des entsprechenden Peptids aufgetragen. Die Gasphasenbasizitätswerte stammen aus [155]. Die Werte sind auf die Anzahl der Freiheitsgrade des Peptids angepasst. Adaptierter Nachdruck mit Genehmigung aus [150]. Copyright 1996 American Chemical Society.

Prolin (*P*) ist in Abbildung 2.11(a) zu erkennen, dass die Fragmentation eine höhere Kollisionsenergie benötigt. Wird statt mit Prolin durch Lysin (*K*) oder Arginin (*R*) substituiert, erhöht sich die benötigte Kollisionsenergie nochmals. Die Abhängigkeit der zur Fragmentierung benötigten Energie folgt hierbei der Gasphasenbasizität der einzelnen Aminosäurereste: $pK_{s_{\text{Arg}}} = 12,10$, $pK_{s_{\text{Lys}}} = 10,68$ und $pK_{s_{\text{His}}} = 6,02$, wie in Abbildung 2.11(b) gezeigt [39, 150, 156–158]. Hier wurde der Wendepunkt der Kurven aus Abbildung 2.11(a) gegen die Gasphasenbasizität aufgetragen. Dabei wurde die entsprechende Energie mit der Zahl der Freiheitsgrade, die sich aus der Molekülstruktur ergibt, skaliert. Der gerade Verlauf der so bestimmten Punkte zeigt die direkte Abhängigkeit der benötigten Kollisionsenergie von der Basizität der Restgruppen der Aminosäuren [150]. Im Rahmen des MPM wird dies so interpretiert: Je stärker das Proton an die basische Gruppe gebunden ist, desto mehr Energie wird benötigt es zu mobilisieren und damit für die Fragmentierung verfügbar zu machen [150, 159, 160]. Umgekehrt wird durch die zusätzliche Einführung einer sauren Gruppe, wie der Glutamin- (*E*) oder Asparaginsäure (*D*), die zur Fragmentation benötigte Energie reduziert [159, 161]. Bei Vergleichsexperimenten zwischen ähnlichen Peptiden mit und ohne sauren Gruppen konnte eine weitere Beobachtung gemacht werden: Zum einen ändert sich die Effizienzkurven für die Fragmentierung des Mutterions wie oben besprochen, zum anderen können Unterschiede in den Schnittpositionen der Fragmente

beobachteten werden. Abbildung 2.12 zeigt die relative Intensität des Mutterions in Abhängigkeit von der Kollisionsenergie mittels SID für Peptide mit und ohne saure Restgruppen. Ein Peptid mit sauren aber ohne basische Reste wie *LDIFSDF* (ausgefüllte Quadrate) fragmentiert bei einer kleineren Kollisionsenergie als das gleiche Peptid mit einem zusätzlichen Arginin, wie (*RLDIFSDF* und *LDIFSDFR*). Im Rahmen des MPM wird dies dadurch erklärt, dass die sauren Gruppen ein zusätzliches Proton zur Verfügung stellen und so eine Fragmentation bei geringeren Energien ermöglichen [159,161]. Ein zusätzliches Arginin hingegen kann ein Proton aufnehmen und somit erhöht sich die Kollisionsenergie für eine Fragmentierung. Die Position des Arginin in der Sequenzreihenfolge scheint hierbei keinen großen Einfluss zu haben. Ein Vergleich der zwei Aminosäuren mit sauren Resten Glutaminsäure (E) und Asparaginsäure (D) wird auch mit den Kurven der offenen Symbole dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass die Spaltung mit einer Glutaminsäure bei einer höheren Kollisionsenergie abläuft als bei der Asparaginsäure [162]. Dies passt zu den pKs-Werten der entsprechenden

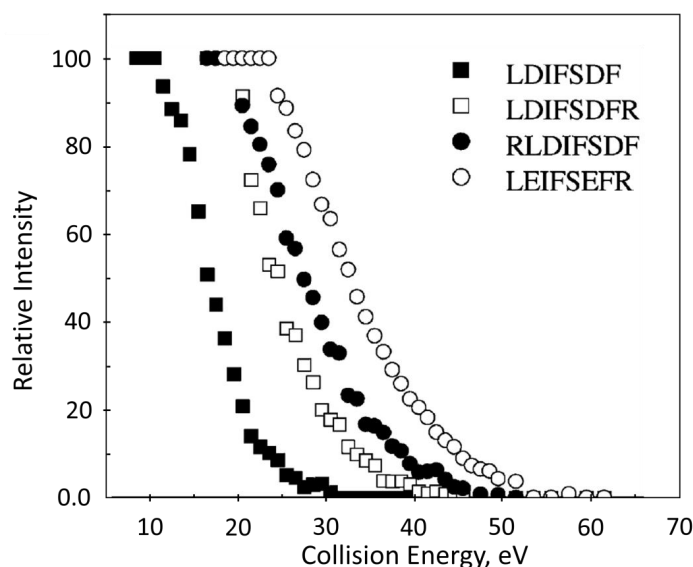


Abbildung 2.12: Kollisionsenergieabhängige Effizienzkurven der Fragmentation für die Peptide *LDIFSDF* (ausgefülltes Quadrat), *LDIFSDFR* (leeres Quadrat), *RLDIFSDF* (ausgefüllter Kreis) und *LEIFSEFR* (leerer Kreis) aus ESI/SID-Experimenten. Nachdruck aus International Journal of Mass Spectrometry, **222**, T. H. Bailey, *Energetics of selective cleavage at acidic residues studied by time- and energy-resolved surface-induced dissociation in FT-ICR MS*, 313–327, Copyright 2003, mit Erlaubnis von Elsevier [162].

Aminosäureresten, der für Glutaminsäure geringer ist als der der Asparaginsäure ($pK_{s\text{Glu}} = 4,15$ und $pK_{s\text{Asp}} = 3,71$) [39].

Für Peptide mit sauren Aminosäureresten wurde darüber hinaus in Kombination mit basischen Aminosäureeinheiten eine *hochselektive* Fragmentierung beobachtet: Abbildung 2.13(a)-(d) zeigt Spektren der Peptide, deren Effizienzkurven in Abbildung 2.12 dargestellt sind. Hier ist zu erkennen, dass die Spektren in den Abbildungen 2.13(a)-(c) nur wenige einzelne Fragmente zeigen; *LDIFSDF* in Abbildung 2.13(d) hingegen zeigt eine Vielzahl an Fragmenten. Die einzelnen Schnitte in den Abbildungen 2.13(a)-(c) treten als b/y-Fragmente C-terminal vom sauren Aminosäurerest auf [153, 159, 160]. Für diese selektiven Schnitte von ionisierten Peptiden scheint es nötig zu sein, dass kein mobiles Proton zur Verfügung steht. Liegt in einem protonierten Peptid keine Aminosäure mit basischem Rest (*K*, *R* oder *H*) vor, kann das Proton am Peptidrückgrat delokalisiert sein. Wird eine Fragmentation induziert, kann die Fragmentierung an jeder möglichen Stelle im Peptidrückgrat entstehen, wie es bei *LDIFSDF* in Abbildung 2.13(d) beobachtet

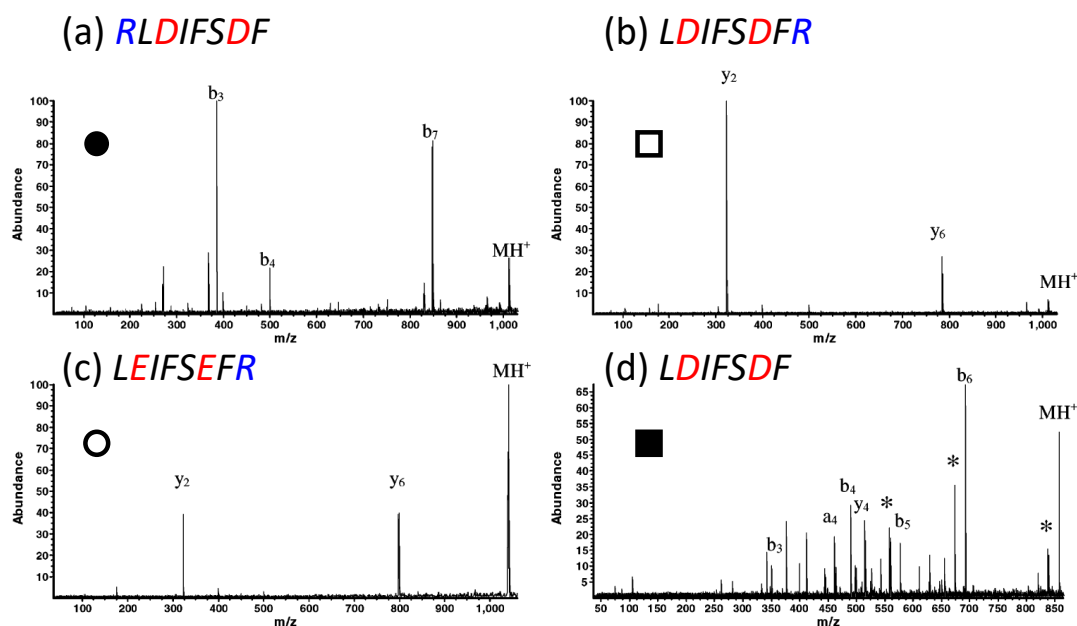


Abbildung 2.13: Massenspektren mittels SID fragmentierter Peptide (a) *RLDIFSDF*, (b) *LDIFSDFR*, (c) *LEIFSEFR* und (d) *LDIFSDF* aus ESI/SID-Experimenten; in den Peptidnamen wurden basische Aminosäuren blau und saure Aminosäuren rot markiert. Die Symbole der Peptide entsprechen der in Abbildung 2.12 eingeführten Zuordnung. Nachdruck aus International Journal of Mass Spectrometry, **222**, T. H. Bailey, *Energetics of selective cleavage at acidic residues studied by time- and energy-resolved surface-induced dissociation in FT-ICR MS*, 313–327, Copyright 2003, mit Erlaubnis von Elsevier [162].

wurde. Diese Schnitte und deren Fragmente sind folglich unselektiv in Bezug auf die Aminosäuren im betrachteten Peptid.

Darüber hinaus kann dieses Modell verwendet werden, um das Fragmentierungsverhalten von protonierten Peptiden mit sauren und basischen Resten zu erklären [160, 162]: Basische Reste im Peptid können das ionisierende Proton lokal binden, sodass auch hier der saure Rest bei einer Anregung effizient deprotoniert werden kann [159, 163]. Die deprotonierte und damit geladene Carboxylgruppe kann die selektiven b/y-Fragmente erzeugen, vergleiche Abbildung 2.13(a)-(c) [124]. An dieser Stelle wird der selektive Schnitt also nicht durch ein mobiles Proton selbst initiiert, sondern die Abwesenheit eines Protons führt dazu, dass der deprotonierte Rest des sauren Aminosäurerestes eine Fragmentierung herbeiführt. Es konnte beobachtet werden, dass eine Deaktivierung der Guanidgruppe des Arginin zur Unterdrückung der Selektivität führt, da diese dann nicht mehr zur Protonenaufnahme zur Verfügung steht [163, 164]. Damit wird ein Einfluss der basischen Gruppen auf das Fragmentationsverhalten bestätigt. Schlussendlich lässt sich dieses Modell für die selektive Fragmentierung an sauren Gruppen auch für mehrfach protonierte Moleküle verallgemeinern: Für eine selektive Fragmentation muss die Anzahl der basischen Gruppen größer oder gleich der Anzahl der ionisierenden Protonen sein, um alle potentiellen delokalisierten Protonen binden zu können [159, 160, 165]. Auch hier gilt, dass Aminosäurereste mit höherem pK_s -Wert einen ausgeprägteren Effekt mit sich bringen [149, 159, 166]. Die Reihenfolge der Aminosäuren innerhalb der Peptidsequenz hat auf dieses Fragmentationsverhalten nur einen geringen Einfluss [150, 159, 162].

Peptide, die die Aminosäure Prolin (Pro, *P*) enthalten, zeigen bei CID und SID ebenfalls auffällige Spektren: Prolin bildet im Vergleich zu anderen natürlichen Aminosäuren eine Ausnahme, da der Aminosäurerest des α -C-Atoms zur Aminogruppe einen Ring schließt, vergleiche Abbildung 2.5. Ein prolinhaltiges Peptid ist somit an dieser Stelle im Peptidrückgrat sterisch eingeschränkt [167, 168]. Zusätzlich hat das Amid des Prolins unter den Aminosäuren eine vergleichbar hohe Protonenaffinität und wird somit bevorzugt protoniert [155, 169]. Diese Protonenaffinität in Verbindung mit der sterischen Einschränkung scheint sich auch auf das Fragmentationsverhalten zu übertragen, da unter Anwesenheit eines mobilen Protons eine N-terminale Fragmentation am Prolin ausgeprägt beobachtbar ist. Diese starke Bevorzugung von b/y-Fragmenten am Prolin ist auch als Prolin-Effekt (engl.: proline effect) bekannt [124, 168–172]. Gleichzeitig verhindert die cyclische Form des Prolins einen c/z-Schnitt, da die vermeintlich entstehenden Fragmente weiter durch den Prolinrest verbunden sind [127].

Über die im Rahmen des MPM diskutierten Reaktionen hinaus existieren unter anderem noch Nebenreaktionen, bei denen entweder vom Mutterion oder aber von einem Fragment ein kleines Molekül abgespalten wird. Verluste von H_2O und NH_3 , aber auch CO gehören zu den typischen Reaktionen [61]. H_2O -Verluste können über den C-Terminus und dessen Carboxylgruppe, aber auch über Aminosäurereste mit Carboxylresten entstehen [173, 174]. Oftmals werden Serien aus y-Fragmenten auch von NH_3 -Verlusten begleitet, da dieses dort terminale Gruppe bilden würden [61, 124]. Die für die Analyse in dieser Arbeit wichtigste Nebenreaktion ist die des CO -Verlustes: Hier wird eine terminale Gruppe von einem b-Fragment entfernt, was einer Umwandlung in ein a-Fragment entspricht (vergleiche Abbildung 2.10) [135, 175]. Diese Einordnung wird später eine wichtige Rolle für die Interpretation von fragmentreichen Massenspektren spielen.

2.4.2 Schwerioneninduzierte Fragmentierung

Bei ionenbestrahlten organischen Proben können je nach Energiebereich der einfallenden Ionen unterschiedliche Fragmentierungsmechanismen von Bedeutung sein. Ionen mit kinetischen Energien von wenigen keV induzieren in Peptiden sowohl Bindungsbrüche im Peptidrückgrat selbst, als auch an den Seitenketten. Obwohl Ionen mit kinetischen Energien im MeV-Bereich einen größeren Energieübertrag beziehungsweise Energieverlust pro zurückgelegter Strecke im Probenfilm erfahren, induzieren diese in Peptiden sehr spezifische Brüche im Peptidrückgrat [31]. Dieser auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinende Zusammenhang soll im folgenden näher erläutert werden. Auf die quantitative statistische Verteilung dieser unterschiedlichen beobachteten Fragmentationsarten wird in Kapitel 5.1 und Abbildung 5.2 näher eingegangen.

Ionen mit Energien im keV-Bereich, wie sie bei SIMS verwendet werden, führen beim Auftreffen auf ein Molekül in der bestrahlten Probe zu einer lokalen Kollision. Wie in Kapitel 2.2.1 im Rahmen des nuklearen Energieverlustes beschrieben, führen solche primären elastischen Stöße der Atomrümpfe zu Kollisionskaskaden. Dadurch können unter anderem Atome aus der Oberfläche abgelöst werden, welche bei der SIMS detektiert und analysiert werden [57, 176–178]. Der Einschlag eines keV-Ions und die durch die Kollision eingebrachte Energie ist primär auf das gestoßene Atom begrenzt. Ein solcher lokalisierter Energieübertrag führt zu Bindungsbrüchen nahe des Auftreffortes des primären Ions ungeachtet der Bindungsart oder der beteiligten Bindungspartner. Die entstehenden Fragmente in Peptiden bestehen somit aus spezifischen Fragmenten aus dem Peptidrückgrat

und unspezifischen Fragmenten, die durch Bindungsbrüche in den Seitenketten entstanden sind. Für Gold keV-Ionen kann der Energieverlust in dem Peptid Angiotensin II aus der in Abbildung 2.4 gezeigten Simulation bei $E_{\text{kin}} \approx 10^{-2}$ MeV auf $dE/dx \approx 1$ keV/nm abgeschätzt werden. Abbildung 2.14(a) veranschaulicht diesen Mechanismus.

Für mit SHI bestrahlte Proben wurden hingegen fast ausschließlich spezifische Fragmente beobachtet. Im Gegensatz zu keV-Ionen wechselwirken SHI primär mit dem elektronischen System der Moleküle in der bestrahlten Probe; für MeV-Ionen ist der elektronische Energieverlust dominant (vergleiche Abbildung 2.4), bei dem der Energieeintrag in das Molekülsystem nicht durch elastische Stöße der Atomrümpfe erfolgt [179]. Das angeregte elektronische System des Moleküls kann nun durch zwei Mechanismen Bindungsbrüche erzeugen: Werden durch die angeregten Elektronen anti-bindende Orbitale besetzt, so kann es zu direkten Bindungsbrüchen kommen [61, 180, 181]. Hierzu ist eine Anregung und damit

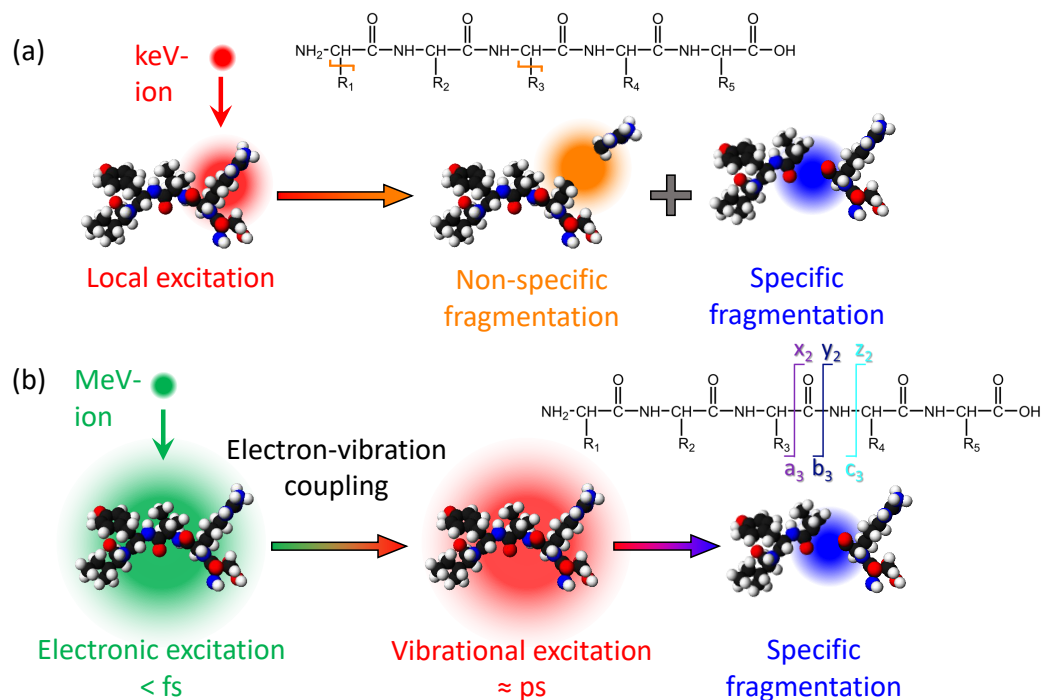


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung der ioneninduzierten Anregungsmechanismen in Peptiden: (a) keV-Ionen induzieren unselektive Bindungsbrüche. Es entstehen unspezifische und spezifische Fragmente. (b) MeV-Ionen regen auf kurzer Zeitskala das elektronische System an. Die Energie verteilt sich auf die vibronischen Freiheitsgrade des gesamten Moleküls, führt zum Bruch der schwächsten Bindung und somit zu spezifischen Fragmenten. Abbildung angelehnt an Abbildung 7 aus [31]; Copyright 2022 Springer Nature.

die Besetzung der anti-bindenden Orbitale über einen Zeitraum notwendig, der es den beteiligten Atome ermöglicht einen ausreichenden Impuls zur räumlichen Trennung zu erfahren. Diese direkte Anregung ist häufig bei der Dissoziation mittels UV-Licht zu beobachten [61, 154, 182]. Dabei konnte beobachtet werden, dass einzelne Aminosäurereste wie beispielsweise die Phenolgruppe des Tyrosins durch UV-Licht angeregt werden kann und es zur bevorzugten Abspaltung der Seitengruppe kommt, die ein unspezifisches Fragment erzeugt [180, 181]. In den Experimenten aus Referenz [31] wurden solche bevorzugten unspezifischen Fragmente nicht betrachtet; vergleiche hierzu Kapitel 5.1. Es scheint deshalb wahrscheinlicher, dass die Fragmentierung des Moleküls durch indirekte Anregung der Vibrationsfreiheitsgrade abläuft: Das angeregte Elektronensystem überträgt die aufgenommene Energie auf die Schwingungsfreiheitsgrade der Atomrümpfe [31]. Zum einen kann die bei der Relaxation des elektronischen Systems gewonnene Energie an die Atomrümpfe übertragen werden. Da sich die elektronische Anregung schnell über das gesamte Molekül verteilt, werden Vibrationszustände ebenfalls gleichmäßig im gesamten Molekül angeregt. Bindungsbrüche können in diesem gleichmäßig angeregten Molekül nun über die energetisch bevorzugten Reaktionswege ablaufen. In Peptidmolekülen wurden spezifische Schnitte im Peptidrückgrat beobachtet [31]. Hierbei ist auch zu beobachten, dass verschiedene Peptide unterschiedlich stark durch MeV-Ionen fragmentiert werden, vergleiche Abbildung 5.4. Die Präsenz unterschiedlicher Wirkungsquerschnitte für verschiedene Peptide zeigt, dass die Aminosäuresequenz und die damit einhergehenden Unterschiede des elektronischen Systems einen Einfluss auf die Fragmentation haben [31]; die Seitengruppen der Aminosäuren scheinen über ihre elektronische Struktur die Bruchreaktion zu beeinflussen. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass die Bindungsbrüche über sekundäre Wechselwirkungen wie mobile Protonen weiter beeinflusst werden [61, 183, 184]. Auch hier spielen die Aminosäurereste, insbesondere saure und basische Reste, eine signifikante Rolle, wie in Kapitel 2.4.1 im Rahmen des MPM vorgestellt.

3 | Experimentelles

In diesem Kapitel werden die Anlagen und Abläufe der Experimente, sowohl in den Laboren der AG Dürr am Institut für Angewandte Physik der Justus-Liebig-Universität Gießen, als auch an der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) GmbH in Darmstadt, beschrieben. Zunächst wird die Analyse mittels DINEC-MS, danach die Probenpräparation und schlussendlich der verwendete Linearbeschleuniger der GSI vorgestellt.

3.1 Massenspektrometrische Analyse mittels clusterinduzierter Desorption/Ionisation

Das in dieser Arbeit verwendete DINEC-MS-System besteht aus einer Cluster-Desorptionsstufe und einem Ionenfallen-Massenspektrometer. Eine solche Anlage ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. Die neutralen SO_2 -Cluster werden durch die adiabatische Expansion eines Gasgemisches aus 97% Helium und 3% SO_2 erzeugt. Hierzu wird das Gasgemisch über eine Düse bei einem Düsendruck von 15 bar gepulst in die Vakuumkammer eingelassen. Der Hintergrunddruck der Kammer beträgt typischerweise $p_{\text{Kammer}} = 2 \times 10^{-6}$ mbar. Die Solenoid-Düse mit einem PTFE-Stößel (Modell 009-0442-900 von Parker Hannifin Corp., Cleveland, USA) wurde in Kombination mit einer Düsensteuerung (Iota One, Modell 060-0010-900 von Parker Hannifin Corp., Cleveland, USA) bei einer Öffnungszeit von ungefähr 500 μs und einer Öffnungsfrequenz von 2 Hz betrieben. Bei der Expansion des Gaspulses in der Kammer kühlt sich das Gasgemisch ab und das SO_2 kondensiert in SO_2 -Cluster. Die so gebildeten Cluster bestehen aus 10^3 bis 10^4 SO_2 -Molekülen [46]. Über das verwendete Trägergas lässt sich die Geschwindigkeit der Cluster einstellen und beträgt bei der Verwendung von He $v_{\text{Cluster}} \approx 1600$ m/s [185]. Daraus ergibt sich eine kinetische Energiedichte von weniger als 0,8 eV pro SO_2 -Molekül.

Ein Skimmer (Model 2, Beam Dynamics Inc., Jacksonville, Florida, USA) im Verlauf des Clusterstrahls schneidet den äußeren Teil des Strahls ab, sodass ein homogener und lokal definierter Strahl entsteht. Der Clusterstrahl ist unter einem Winkel von 35° zur Normalen der Oberfläche auf die Probenoberfläche gerichtet. Beim Auftreffen auf die Probenoberfläche werden Moleküle, wie in Kapitel 2.1.1

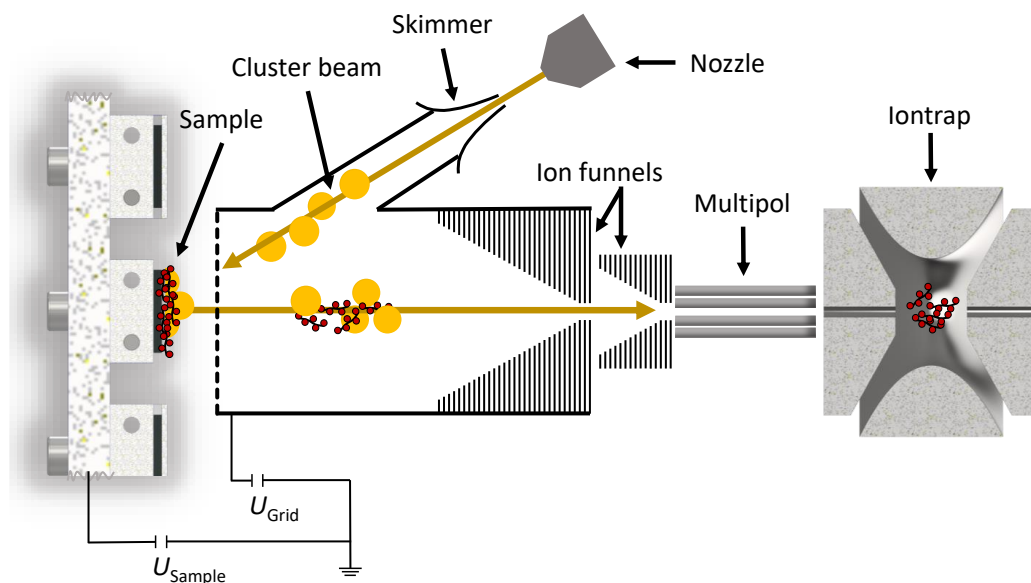


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau eines DINEC-Massenspektrometers: Der SO_2 -Clusterstrahl aus der Düse durchläuft einen Skimmer und trifft auf die Probenoberfläche. Die desorbierten Ionen werden durch die anliegenden Spannungen am Probenhalter und Gitter in Richtung Ionenfalle beschleunigt. Über zwei Ionentrichter und einen anschließenden Multipol, welcher die Ionen in die Ionenfalle transferiert. Durch einen massenselektiven Auswurf in einen nachgestellten Detektor können Massenspektren aufgenommen werden.

beschrieben, zum Teil desorbiert und ionisiert. Es konnte eine Ionisationseffizienz für Peptide in der Größenordnung von 0,5 – 3% bestimmt werden [54]; deutlich höher als beispielsweise bei der verwandten Methode SIMS mit einer Effizienz von $< 0,01\%$ [177]. Die Probenpräparation selbst wird in Kapitel 3.2 näher erläutert. Der Probenhalter liegt auf einem Potential von $U_{\text{Sample}} = 40 \text{ V}$ relativ zum Falleneingang und ein Gitter parallel zur Probenoberfläche (Abstand $d \approx 4 \text{ mm}$) auf einem Potential von $U_{\text{Grid}} = 7 \text{ V}$. Durch die Potentialdifferenz von $\Delta U = 33 \text{ V}$ werden die desorbierten Ionen von der Probe abgezogen. Bei der Untersuchung von Kationen liegen die Probe und das Gitter auf einem positiven Potential, welches für die Messung von Anionen invertiert wird. Nach dem Durchlaufen des Gitters befinden sich die Ionen in einem kommerziell erhältlichen Massenspektrometer *amaZon SL* der Firma Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland). Die ursprüngliche Konfiguration des Massenspektrometers sieht eine ESI-Stufe vor, die durch die DINEC-Desorptionsstufe ersetzt wurde. Ionen, die das Gitter passiert haben, werden über zwei hintereinander angeordnete Ionentrichter in einen Multipol überführt, der die Ionen in die Ionenfalle leitet.

Die mittels DINEC erreichte Nachweisgrenze liegt bei wenigen femtomol beziehungsweise bei etwa 0,1% einer Monolage [10]. Für die Anwendung bei der DINEC-MS spielt das kühlende Hintergrundgas der Ionenfalle noch eine besondere Rolle: Von SO₂-Cluster desorbierte Ionen können beim Eintritt in die Falle noch SO₂-Addukte mit sich tragen [15, 48, 54]. Bei Kollisionen mit dem Hintergrundgas lösen sich diese neutralen SO₂-Moleküle vom desorbierten Ion und verlassen die Falle. Es werden deshalb bei DINEC-MS typischerweise nur Moleküle ohne SO₂-Addukte detektiert. Die von der Falle ausgeworfenen Ionen werden in einem Daly-Detektor ausgezählt. In diesem treffen die Ionen auf einen Metallknopf, auf dem sie Sekundärelektronen auslösen, die über eine anliegende Hochspannung zu einem Szintillator abgezogen werden [67]. Einfallende Elektronen lösen im Szintillator Photonen aus, die mittels eines Photomultipliers detektiert werden [186]. Die aufgenommenen Massenspektren wurden mit *DataAnalysis* Version 4.0 SP4 von Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland und *OriginPro* Version 2019b von OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA verarbeitet.

Im Laufe dieser Arbeit wurde im Rahmen des BMBF-Verbundprojekts 05K19RG1 ein solches DINEC-Massenspektrometer durch die Kombination eines kommerziell erhältlichen Massenspektrometers mit einer DINEC-Stufe aufgebaut. Die Kammer und der Probenhalter wurden darauf ausgelegt, die Anlage zum einen über Transferschleusen bestücken zu können und zum anderen die Anlage leicht transportfähig machen zu können. Ersteres wurde durch eine eigenständig gepumpte und durch ein Schieberventil von der Hauptkammer getrennte Schleuse erreicht; in der technischen Zeichnung in Abbildung 3.2(a) und (b) ist die Schleusen-Einheit orange und die Hauptkammer weiß eingefärbt.

Über den Linearvershub ist es möglich, Proben in die Hauptkammer zu übergeben, ohne dass diese vollständig belüftet werden muss. Hierdurch wird der Messbetrieb nur für wenige Minuten während des Schleusenvorgangs unterbrochen, statt für bis zu 90 Minuten bei einer vollständigen Belüftung der Kammer. Alle Teile, die der Probenaufnahme zuzuordnen sind, sind in Abbildung 3.2 in gelb eingezeichnet. Der Probenmanipulator (hell blau in Abbildung 3.2) ermöglicht es, über einen xyz-Vershub mit einer zusätzlichen Drehdurchführungen die fünf Probenpositionen des Probenhalter zu bestücken und die gewünschte Proben im Clusterstrahl zu positionieren. In Abbildung 3.2 sind zusätzlich in lila die Solenoid-Düse und die Ionentransfereinheit zu erkennen, die für die Ionen-erzeugung und überführung in das Massenspektrometer (grau) benötigt werden. Weitere Vakuumbauteile wie Sichtfenster, Kabeldurchführungen, Druckmessröhre und Turbomolekularpumpe sind dunkelblau markiert. Für die erhöhte Transport-

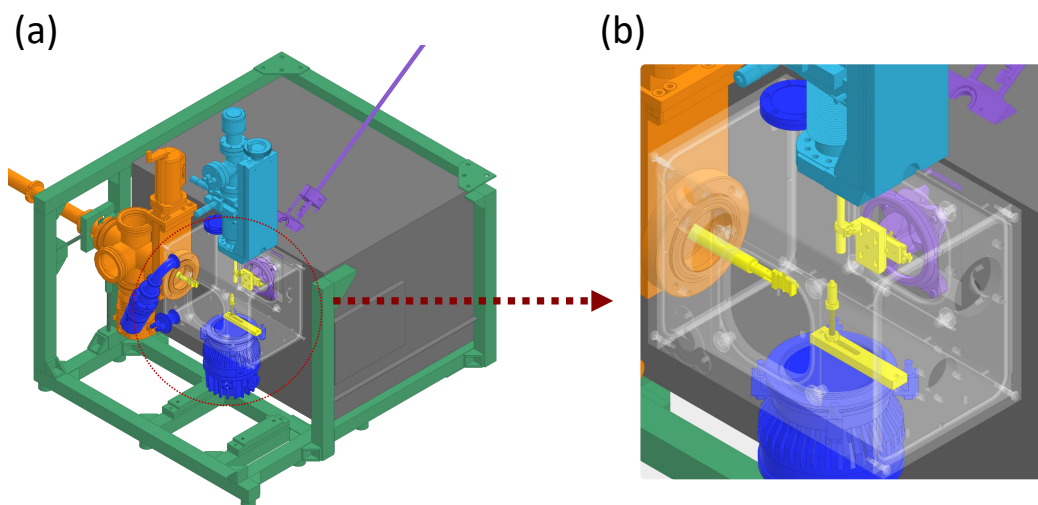


Abbildung 3.2: Technische Zeichnung des DINEC-MS in einer Gesamtübersicht (a) und Detailansicht der Hauptkammer (b): Zusammengehörige Baugruppen wurden in derselben Farbe markiert. Es werden die Proben-transfer- und Schleuseneinheit (orange), die Hauptkammer (weiß transparent), die Probenaufnahme (gelb), der xyz-Manipulator zur Probenpositionierung (hell blau), die Solenoid-Düse und Ionentransfereinheit (lila) und das Massenspektrometer selbst (grau) gezeigt. Zusätzlich sind die Pumpen, Messröhren, Stromdurchführungen und Schaugläser (dunkel blau) und der Aluprofil-Rahmen (grün) dargestellt.

fähigkeit ist die gesamte Anlage in Aluprofilen fixiert (grün in Abbildung 3.2), die den einzelnen Komponenten des Aufbaus Schutz, weitere Stabilität und eine Vereinfachung der Handhabung bieten.

In Abbildung 3.3(a) und (b) sind Fotografien des aufgebauten DINEC-MS abgebildet. In Abbildung 3.3(a) lassen sich das DINEC-MS erkennen. Neben der Schleuse sind auch die zur Erzeugung der SO_2 -Cluster benötigten Steuergeräte, sowie der Probenmanipulator zu erkennen. Abbildung 3.3(b) zeigt den Manipulator aus Richtung der Ionenfalle zusammen mit der Solenoid-Düse. Über elektrische Durchführungen am Manipulator können neben der Probenspannung auch weitere Spannungen in die Vakuumkammer eingebracht werden. Ebenso ist eine Durchführung für zwei Thermoelemente verbaut.

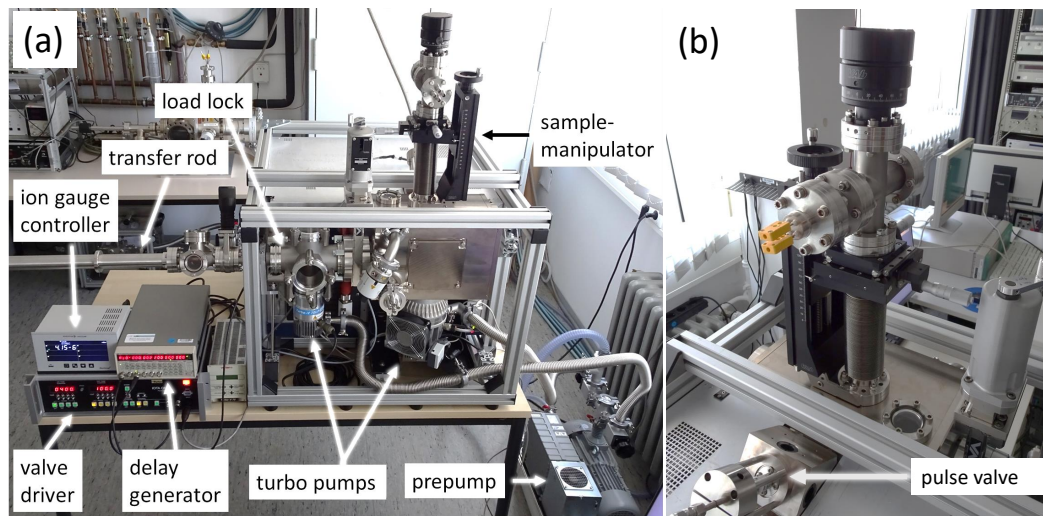


Abbildung 3.3: Fotografien der mobilen DINEC-Anlage: (a) Vorderseite mit Desorptionsstufe, Steuergeräten, Pumpen und Transferschleuse mit Linearverschiebung, sowie Probenmanipulator. (b) Rückseite des Probenmanipulators mit der Solenoid-Düse im unteren Teil des Fotos.

3.2 Probenpräparation

Die untersuchten Porphyrine wurden von PorphyChem SAS aus Longvic, Frankreich mit einer Reinheit von $> 98\%$ erworben und ohne weitere Aufarbeitung verwendet. Es wurden die Porphyrine 5,10,15,20-(tetraphenyl) porphyrin (kurz: TPP), 5,15-(diphenyl) porphyrin (kurz: DPP), 5,10,15,20-(tetra-4-carboxyphenyl) porphyrin (kurz: TCPP) und 5,10,15,20-(tetra-4-aminophenyl) porphyrin (kurz: TAPP) untersucht. In Abbildung 2.7 sind die Porphyrine schematisch dargestellt. Diese Porphyrine wurden ohne Zentralatom und teilweise mit Kobalt (Co) und Zink (Zn) als Zentralatom untersucht; die entsprechende Abkürzung des Porphyrins setzt sich aus dem Kürzel des zentralen Metallatoms und des Porphyrins zusammen. Als Substrate wurden Stücke eines Silizium-Wafers mit natürlicher Oxidschicht in den Abmessungen von ungefähr $8\text{ mm} \times 8\text{ mm}$ genutzt. Diese wurden nach dem Schneiden in einem Ultraschallbad zwei mal in Ethanol (ROTISOLV Pestilys plus von Carl-Roth GmbH, Karlsruhe) und einmal in Aceton (ROTISOLV HPLC von Carl-Roth GmbH, Karlsruhe) für je 10 min gereinigt. Anschließend wurden die Substrate einzeln aus dem Aceton-Bad genommen und mit Stickstoff getrocknet, um im Aceton gelöste Verunreinigungen noch gelöst von der Oberfläche zu sprühen. Die Porphyrinproben wurden stets aus $30\ \mu\text{l}$ einer Ethanol-Lösung ($c_{\text{Porph}} = 1 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$) auf einem Stück Silizium-Wafer präpariert.

Die Peptidproben wurden aus einer wässrigen Lösung (ROTISOLV Ultra LC-MS von Carl-Roth GmbH, Karlsruhe) bei einer Konzentration von $c_{\text{Pep}} = 1 \times 10^{-3}$ mol/L präpariert. Wie auch die Porphyrin-Proben, wurden die Peptid-Lösungen auf ein gereinigtes Stück Silizium-Wafer getropft. Hierbei wurden auf die Substrate jeweils mit einer Mikropipette 30 μl der gewünschten Peptidlösung aufgebracht. Die Proben wurden anschließend in einem Exsikkator getrocknet. In Tabelle 3.1 werden alle untersuchten Peptide gelistet.

Mit doppelseitigem Kupferklebeband (Typ 1182 von 3M, St. Paul, MN, USA) wurden die Proben auf einem Probenblock befestigt. Dieser Probenblock besteht aus einem 5 mm hohen und 10 mm \times 10 mm breitem Aluminiumquader (vergleiche Abbildung 3.4(a)). Über seitliche Gewindelöcher ist es möglich, eine Maske über die Probe zu legen und seitlich mit Schrauben zu arretieren. Die Maske hat eine angesenkte Bohrung mit einem Durchmesser von 6 mm, über die die bestrahlte und massenspektrometrisch untersuchte Probenfläche definiert wird. Zwei weitere Gewindelöcher in der Unterseite des Probenhalters ermöglichen die Befestigung auf dem Probenhalter im Massenspektrometer und auf der Halteplatte bei der Bestrahlung selbst, vergleiche Abbildung 3.4(b) und (c). Bei der DINEC-MS-Aufnahme nach der Bestrahlung ist die exakte Repositionierung des Probenhalters in die Position der Messung vor Ionenbestrahlung essentiell für die quantitative Auswertung der Spektren. Alle Proben wurden stets in einer Transportbox aufbewahrt, welche lichtundurchlässig in Aluminiumfolie eingeschlagen wurde. Die Box wurde stets von direkten Wärmequellen oder Stößen geschützt. Alle Proben sind somit der gleichen Atmosphäre und Temperatur ausgesetzt worden. Zusätzlich zu den eigentlichen Proben wurde auch eine Transportreferenz

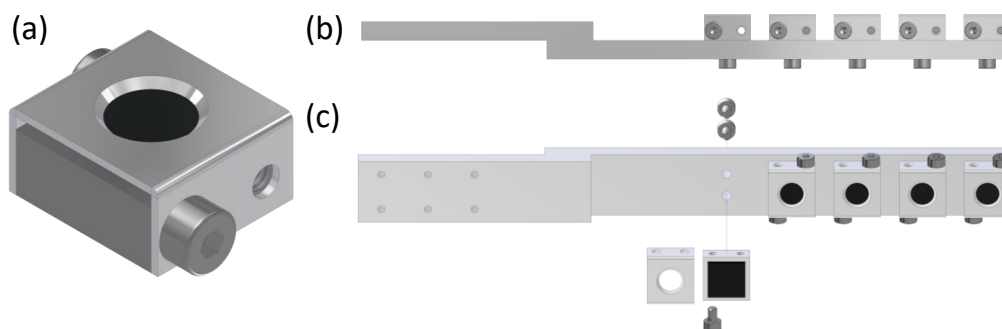


Abbildung 3.4: (a) Zeichnung des einzelnen Probenblocks; (b) Seiten- und (c) Draufsicht des gesamten Probenhalters. Die Probenblöcke sind mit Schrauben auf den Probenhalter geschraubt. Dies erlaubt die wiederholbare Positionierung zum Beispiel bei der Messung vor und nach der Bestrahlung mittels SHI.

mit geführt. Das Spektrum dieser Referenz wird nicht präsentiert, da diese keine Veränderung durch den Transport gezeigt hat.

Tabelle 3.1: Auflistung aller untersuchten Peptide

Hersteller:	Trivialname:	Aminosäuresequenz:	CAS-Nr.:	Artikel-Nr.:	Reinheit:
Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	Angiotensin I acetat	<i>DRVYIHPFHL</i>	70937-97-2	A9650	≥ 90 %
	Angiotensin II	<i>DRVYIHPF</i>	4474-91-3	A9525	≥ 93 %
	[Val ⁵]-Angiotensin II acetat	<i>DRVYVHPF</i>	—	A2900	≥ 95 %
	[Asn ¹ ,Val ⁵]-Angiotensin II	<i>NRVYVHPF</i>	20071-00-5	A6402	≥ 97 %
	Angiotensin A trifluoracetat	<i>ARVYIHPF</i>	51833-76-2	SML1373	≥ 98 %
	Alamandin trifluoracetat	<i>ARVYIHP</i>	1176306-10-7	SML1374	≥ 98 %
	[Sar ¹]-Angiotensin II	<i>SarRVYIHPF</i>	—	SCP0020	≥ 95 %
	Substanz P acetat	<i>RPKPQQFFGLM</i>	137348-11-9	S6883	≥ 95 %
	<i>Leu</i> -Enkephalin acetat	<i>YGGFL</i>	58822-25-6	L9133	≥ 95 %
Calbiochem, San Diego, CA, USA	Bradykinin acetat	<i>RPPGFSPFR</i>	23815-87-4	05-23-0500	≥ 97 %
	Neurotensin	<i>pELYENKPRRPYIL</i>	39379-15-2	05-23-1200	≥ 97 %
Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	Angiotensinogen (1-14) trifluoracetat	<i>DRVYIHPFHLVIHN</i>	104180-23-6	CAY24989	> 95 %
	Dynorphin B (1-9) trifluoracetat	<i>YGGFLRRQF</i>	126050-26-8	CAY24743	> 95 %

3.3 Erzeugung schneller Schwerionen

Die Bestrahlung präparierter Proben wurde an der Gesellschaft für Schwerionenforschung (kurz: GSI) Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung in Darmstadt-Wixhausen, Deutschland durchgeführt. Hierzu wurde am M-Zweig des UNILAC (engl.: **u**niversal **l**inear **a**ccelerator) die Bestrahlkammer an der Extraktionstation „M3“ genutzt. Der UNILAC ist eine universelle Ionenquelle und kann positive einatomare Ionen, die aus einer Primärquelle erzeugt werden, auf bis zu 11,4 MeV/u beschleunigen. Neben der direkten Extraktion wie am M-Zweig ist es möglich, mittels Speicherringe die Ionen auf bis zu 1000 MeV/u weiter zu beschleunigen. In Abbildung 3.5 ist der Aufbau des UNILAC grob skizziert:

Von den vorhandenen Quellen am UNILAC wurden für die Bestrahlungen in dieser Arbeit die PIG- und VARIS-Quelle (**P**enning-**I**onization **G**auge und **V**acuum **A**rc **I**on **S**ource) verwendet. In beiden Quellen wird ein Argonplasma dazu verwendet, Atome des gewünschten Elements in die Gasphase zu überführen und Ionen mit einer geringen Ladung zu erzeugen [188–191]. Über Extraktionsspannungen werden die erzeugten Ionen gebündelt und aus der Quelle heraus beschleunigt. Die niedergeladenen Primärionen werden über ein elektrisches Feld in einen Hochfrequenz-Quadrupol (engl.: **r**adio-**f**requency-**q**uadrupol, kurz: RFQ) beschleunigt. Mit Hilfe des RFQs werden die Ionen in Paketen gesammelt, diese werden anschließend in einer IH-Kammer (engl.: **i**nter-**d**igital **H**-type structure,

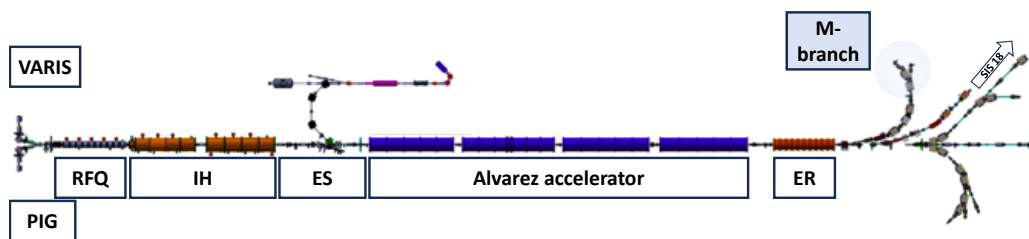


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des „UNILAC“ Linearbeschleunigers des GSI Helmholtzzentrums für Schwerionenforschung GmbH Darmstadt-Wixhausen. Aus den verwendeten Quellen (PIG/VARIS) werden die Ionen durch den Hochfrequenz-Quadrupol (RFQ) und die IH-Einheit auf etwa 1,4 MeV/u beschleunigt. Im Elektronenabstreifer (ES) wird der Ladungszustand erhöht und die Ionen im Folgenden durch den Alvarez-Beschleuniger mit nachgeschaltetem Einzelresonator (ER) auf bis zu 11,4 MeV/u beschleunigt. Der magnetisch geleitete Ionenstrahl wird schlussendlich an den entsprechenden Experimentierplatz überführt. Der M-Zweig ist hier bläulich hervorgehoben. Angelehnt an das Originalbild von M. Kaiser/L. Groening, GSI/FAIR [187].

kurz: IH) auf rund 1,4 MeV/u beschleunigt. Abhängig von der genutzten Quelle, wird der Ionenstrahl durch einen Elektronenabstreifer (engl.: gaseous electron-stripper, kurz: ES) geschickt. Der Abstreifer ist mit einem Gas gefüllt: Bei Stößen der Ionen mit den Gasmolekülen geben die Ionen Elektronen ab, sodass der Ladungszustand der Ionen weiter erhöht wird. Im letzten Schritt wird der Strahl mittels fünf sequenzieller Beschleuniger im Alvarez-Typ und eines Lückenresonators (**E**inzelresonator, kurz: ER) auf die endgültige Energie gebracht. Die Arbeitsfrequenz des UNILAC liegt bei 50 Hz. Bei Betrieb kann diese Frequenz auch anteilig mit unterschiedlichen Ionen betrieben werden, um mehrere Experimente parallel durchführen zu können. Unter Verwendung von ablenkenden Magnetfeldern werden die Ionenpakete zu den entsprechenden Experimenten geleitet [192–194]. In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 3.2 aufgeführten Ionen bei den angegebenen Energien verwendet.

Tabelle 3.2: Auflistung aller für die Bestrahlung verwendeten Ionen; Werte für dE/dx wurden mittels SRIM simuliert [78, 79].

Ion:	E_{kin}/u :	E_{kin} :	$dE/dx (E_{\text{kin}})$:
$^{197}\text{Au}^{26+}$	4,8 MeV/u	946 MeV	12,5 keV/nm
$^{48}\text{Ca}^{10+}$	4,8 MeV/u	192 MeV	2,4 keV/nm
$^{56}\text{Fe}^{3+}$	11,4 MeV/u	636 MeV	2,2 keV/nm

Über eine verfahrbare, quadratische Blende kann der Ionenstrahl auf die zu bestrahlende Fläche abgeschnitten werden. Die Fläche wurde auf einem phosphorisierendem Leuchtschirm aus einem Gemisch aus Al_2O_3 und Cr_2O_3 (Modell 444-444-444-444 von BCE Special Ceramics GmbH, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Über einen verfahrbaren Faraday-Becher wurde vor jeder Probenbestrahlung der Ionenfluss bestimmt um darüber die Bestrahlungszeit für eine bestimmte Fluenz festzulegen. Zusätzlich wird über eine Referenzierung des Ionenstroms auf der Blende zum Ionenstrom des Faraday-Bechers der Ionenfluss während der Probenbestrahlung überwacht. Der Kammerdruck lag während der Bestrahlung bei ungefähr $p \approx 1 \times 10^{-8}$ mbar.

4 | Ionisationsverhalten organischer Moleküle bei DINEC

In diesem Kapitel wird das Ionisationsverhalten organischer Moleküle am Beispiel unterschiedlicher Metallkomplexe näher untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Ionisationsmechanismen bei ähnlichen oder sogar dem gleichen Molekül stattfinden können. So ist neben der Protonierung auch die Elektronenabgabe ein möglicher Mechanismus für die positive Ionisation. Umgekehrt wurde die Deprotonierung beziehungsweise die Elektronenaufnahme für negative Analyt-Ionen beobachtet. Bei Porphyrinen wurde beobachtet, dass das Auftreten des dominierenden Mechanismus von den funktionellen Gruppen und dem zentralen Metall-Ion des Komplexes abhängt. Für $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ konnte darüber hinaus eine Änderung des dominanten Ionisationsmechanismus während der Aufnahme der Massenspektren beobachtet werden, die dem Einfluss des koadsorbierten Wassers zugeschrieben wurde. Im Folgenden wird zuerst der bei den Porphyrinen beobachtete Ionisationsmechanismus systematisch untersucht und anschließend die Ergebnisse für $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ mit dem Fokus auf die Einflüsse der experimentellen Parameter auf den Ionisationsprozess vorgestellt.

4.1 DINEC-MS von Porphyrinen

Abbildung 4.1 zeigt beispielhaft ein DINEC-MS-Spektrum einer TPP-Probe mit einem Hauptpeak bei $m/z = 615, 3$. Dieser kann dem einfach protonierten Molekül $[\text{M}+\text{H}]^+$ zugeordnet werden. Zusätzlich ist in der Abbildung 4.1 die Strukturformel des TPP in seiner neutralen Form gezeigt. Neben dem Hauptpeak sind keine weiteren Ionen zu beobachten, die dem TPP zuzuordnen sind.

In den Abbildungen 4.2(a) und (b) ist das Isotopenmuster der DINEC-Messung des TPP und in den Abbildungen 4.2(c) und (d) das des DPP dargestellt. Im direkten Vergleich zu den experimentellen Daten wird auch eine Simulation des Isotopenmusters in grau gepunktet gezeigt, die die Zuordnung der Ionisationsart bestätigen. Für beide Porphyrine sind die protonierten Kationen $[\text{M}+\text{H}]^+$ in den Abbildungen 4.2(a) und (c) deutlich erkennbar und decken sich mit der Simulation. In den dargestellten negativen Spektren in den Abbildungen 4.2(b) und (d) ist kein klarer Hinweis auf Anionen der entsprechenden Porphyrine zu be-

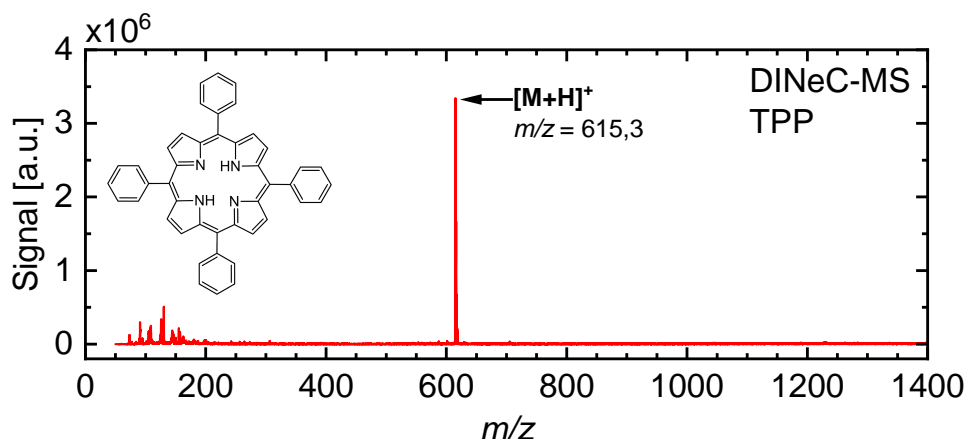


Abbildung 4.1: DINEC-MS Spektrum positiver Ionen einer TPP-Probe mit der Strukturformel des neutralen Ausgangsmoleküls. Der dominante Peak kann dem einfach protonierten TPP-Molekül in der Form $[M+H]^+$ bei $m/z = 615,3$ zu geordnet werden. Es lassen sich keine weiteren Ionen beobachten, die sich dem TPP zuordnen lassen.

obachten. Da sowohl TPP als auch DPP keine funktionelle Gruppen besitzen, muss die Ionisation über die Protonierung oder Deprotonierung der sekundären Aminogruppen im inneren des Porphyrins erfolgen. Im ungeladenen Zustand sind zwei der vier Aminogruppen mit Wasserstoff-Atomen abgesättigt: Die saure Umgebung während der DINEC-MS scheint die weitere Protonierung zu unterstützen [195]. Auf der anderen Seite kann weder bei TPP noch bei DPP eine Deprotonierung beobachtet werden [196]. Zum Vergleich werden Spektren aus massenspektrometrischen Untersuchungen mittels ESI (engl., *electrospray ionization*) herangezogen. Bei TPP und DPP konnte auch bei ESI das protonierte Kation $[M+H]^+$ beobachtet werden [195, 197]; für beide Porphyrine konnten keine Anionen detektiert werden. Mit der Einführung einer funktionellen Gruppen an den Phenylrest kann diese bei der DINEC-MS Messung zur Ionisation beitragen. Abbildungen 4.2(e) und (f) stellen die gemessenen Isotopenmuster mit zugehöriger Simulation von TCPP dar. Die Kationen in Abbildung 4.2(e) lassen sich der einfach protonierten Spezies $[M+H]^+$ zuordnen. Es konnte gezeigt werden, dass in saurer Umgebung die Protonierung bei TCPP trotz der Carboxylgruppe an den inneren sekundären Aminogruppen erfolgt [198, 199]. Zusätzlich sind bei diesem Molekül in Abbildung 4.2(f) deutlich Anionen $[M-H]^-$ zu beobachten. Auch in mittels ESI aufgenommenen Spektren werden die gleichen Kat- und Anionen wie bei DINEC-MS beobachtet [200, 201]. Der direkte Vergleich zwischen TPP/DPP in den Abbildungen 4.2(b)/(d) und TCPP Abbildung 4.2(f) zeigt, dass für die Bildung von Anionen die Einführung der Carboxylgruppe eine Deprotonierung

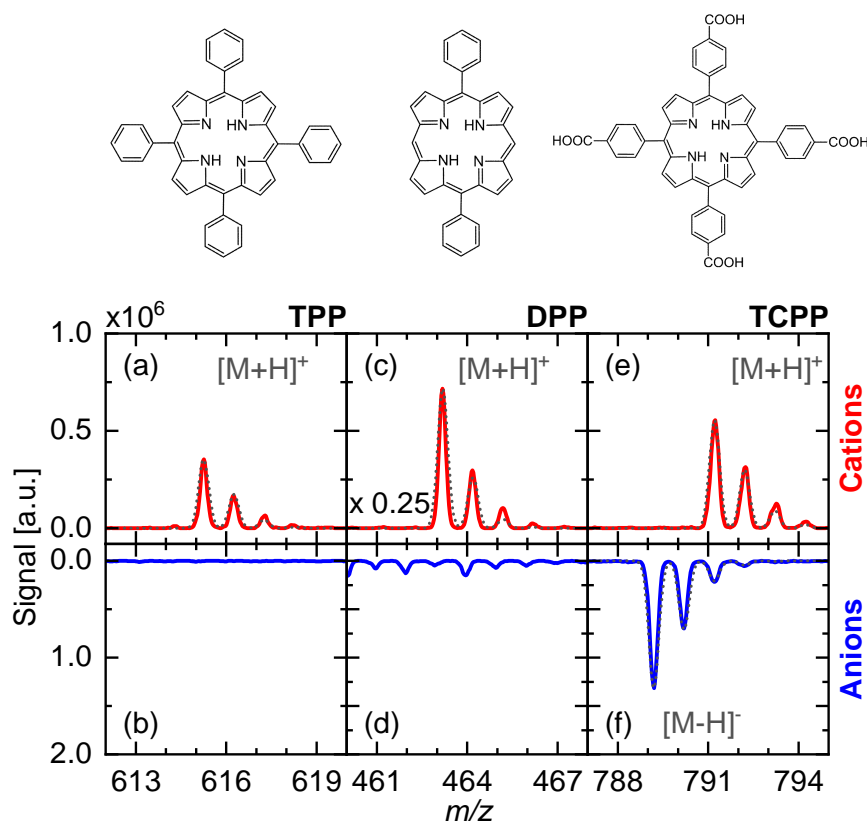


Abbildung 4.2: Ausschnitte aus den positiven (rot) und negativen (blau) DINEC-Massenspektren der Porphyrine TPP in (a) und (b), DPP in (c) und (d) und TCPP in (e) und (f). In grau die zugeordnete Simulation der Messung des jeweiligen Ions.

bei der DINEC-MS ermöglicht und sich auch auf diese zurückzuführen lässt. Entgegen der Bildung der Kationen, werden bei der Bildung der Anionen bei TCPP die Carboxylgruppen für die Deprotonierung bevorzugt [201]. Obwohl ein TCPP-Molekül vier Carboxylgruppen trägt, konnten sowohl im positiven als auch im negativen Messmodus nur einfach geladene Ionen beobachtet werden.

Um den Einfluss der Besetzung der zentralen Position des Komplexes mit einem Metall-Ion auf den Ionsationsmechanismus zu untersuchen, wurden auch metallierte Porphyrine analysiert. Abbildung 4.3 zeigt Ausschnitte des Isotopenmusters in DINEC-MS Spektren von CoTPP in (a) und (b), CoTCPP in (c) und (d) und CoTAPP in (e) und (f). Neben den experimentellen Daten sind auch entsprechende Simulationen in grau gezeigt. In den drei untersuchten kobalthaltigen Porphyrinen sind in allen Fällen die Kationen als $[M]^+$ in rot deutlich messbar; vergleiche Abbildung 4.3(a)/(c)/(e). Die Ionisation erfolgt also bei allen drei Porphyrinen

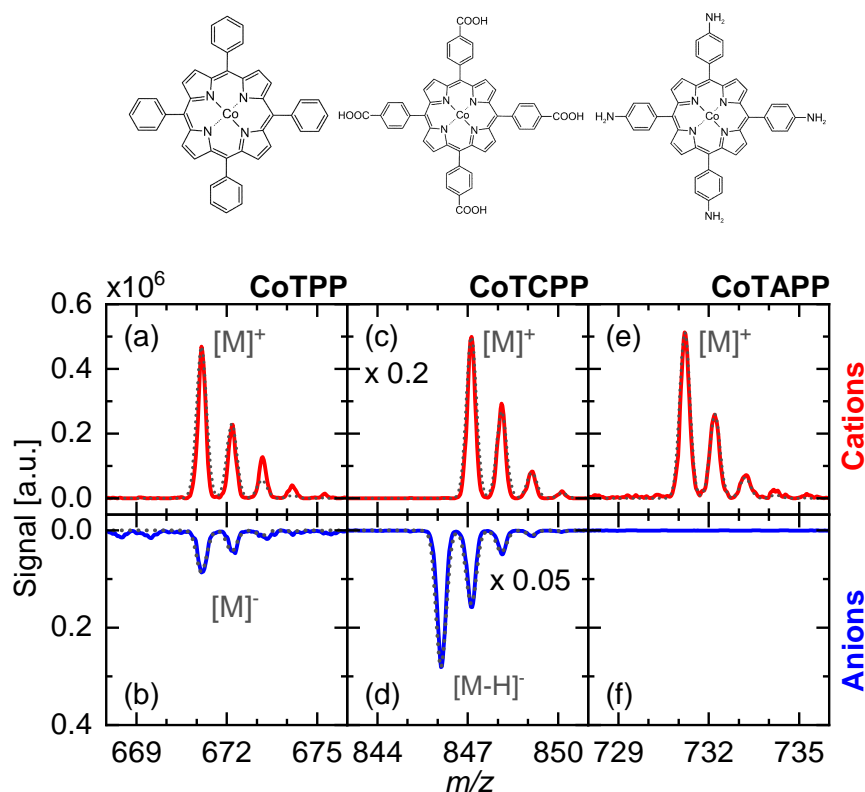


Abbildung 4.3: Ausschnitte aus den positiven (rot) und negativen (blau) DINEC-Massenspektren der Porphyrine CoTPP in (a) und (b), CoTCPP in (c) und (d) und CoTAPP in (e) und (f). In grau die zugeordnete Simulation der Messung des jeweiligen Ions.

über eine Elektronenabstraktion. Durch das Metallatom im Zentrum des Porphyrins sind die zentralen Aminogruppen abgesättigt und stehen nicht mehr für die Protonierung zur Verfügung. Überraschenderweise scheint die Elektronenabstraktion selbst für CoTAPP, das explizit basische Gruppen zur Protonenaufnahme zur Verfügung stellt, gegenüber der Protonierung dieser Restgruppen bevorzugt zu werden. Eine Recherche nach Abhängigkeiten des mittels DINEC beobachteten Ionisations-Verhaltens von der Ionisationsenergien oder Elektronenaffinitäten erbrachte aufgrund unvollständiger Datenlage keine Ergebnisse. Veröffentlichte ESI-Spektren dieser mit Kobalt metallierten Porphyrine zeigen allerdings auch durchweg die kationische Form $[M]^+$ [202–205].

Die Anionen der drei metallierten Porphyrine verhalten sich unterschiedlich: Das CoTPP, in Abbildung 4.3(b) gezeigt, wird über die Aufnahme eines Elektrons ionisiert, da keine funktionelle Gruppen für eine Protonenabgabe zur Verfügung

steht. Die Effizienz für die Elektronenaufnahme scheint aber gering, da die Intensität des Isotopenmusters vergleichsweise schwach ist. Mit einer Carboxylgruppe und damit der Verfügbarkeit von Protonen, ist CoTCPP im negativen Spektrum Abbildung 4.3(d) deutlich als $[M-H]^-$ zu beobachten. Die Anwesenheit des zentralen Kobalts scheint hier keine weitere Auswirkung auf die anionische Form des CoTCPP zu haben, da dieses sich wie das TCPP (Abbildung 4.2(f)) deprotoniert vorliegt. CoTAPP in Abbildung 4.3(f) zeigt kein Anion. Hier findet also weder die Elektronenaufnahme noch die Deprotonierung statt.

Neben Kobalt wurde auch Zink als Zentralion untersucht. Abbildung 4.4 zeigt die Isotopenmuster von ZnTPP in (a) und (b), sowie ZnTCPP in (c) und (d). Das Isotopenmuster des Zink ist mit insgesamt fünf natürlich vorkommenden, stabilen Isotopen komplex. Von diesen stabilen Isotopen dominieren insbesondere ^{64}Zn (48,6%), ^{66}Zn (27,9%) und ^{68}Zn (18,8%) das Massenspektrum [39]. In

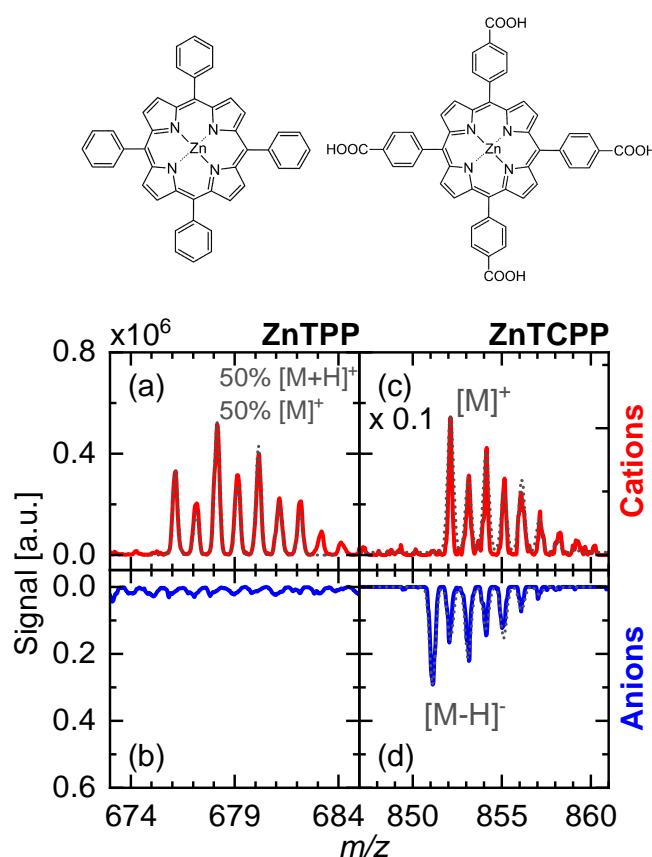


Abbildung 4.4: Ausschnitte aus den kationischen (rot) und anionischen (blau) DINEC-Massenspektren der Porphyrine ZnTPP in (a) und (b) und ZnTCPP in (c) und (d). In grau die zugeordnete Simulation der Messung des jeweiligen Ions.

Abbildung 4.4(a) ist durch die Simulation in grau erkennbar, dass sich hier die protonierte und elektronisch ionisierten Spezies, $[M+H]^+$ und $[M]^+$, überlagern. Die angepasste Simulation zeigt, dass der Anteil beider Ionenarten bei circa 50% liegt. Diese Beobachtung ist zunächst überraschend, da die Aminogruppen im Zentrum durch das Zink-Ion abgesättigt sind. In der Literatur gibt es für diese Konfiguration einen Vorschlag, der ein Proton an den sekundären Aminen vorsieht, während das Zink-Ion mit diesen noch leicht koordiniert ist [206]. Diese beobachtete Konfiguration könnte das in DINEC-Spektren beobachtete protonierte Ion erklären, da das Proton wie bei CoTPP eigentlich keine Anlagerungsmöglichkeit hat. Eine Mischung aus protonierten und elektronisch ionisierten Molekülen erklärt dann das beobachtete Gesamtverhalten. Mittels ESI aufgenommene Massenspektren von ZnTPP hingegen zeigen ausschließlich die elektronisch ionisierte Spezies $[M]^+$ [207]. Die Ionisation erfolgt hier also wie für die mit Kobalt metallierten Porphyrinmolekülen bei DINEC und ESI. ZnTCPP hingegen zeigt sowohl die protonierte Spezies $[M+H]^+$ im positiven sowie die deprotonierte Form $[M-H]^-$ in den negativen Massenspektren, die mit ESI-Messungen aufgenommen wurden. Dies steht im Gegensatz zu den DINEC-Messungen, bei denen im Positiven nur die elektronisch ionisierte Form $[M]^+$ beobachtet wird.

Abbildung 4.4(b) zeigt für ZnTPP keine Anionen. Da auch hier wie bei CoTPP keine Deprotonierung möglich ist, wäre nur die Ionisation durch eine Elektronenaufnahme möglich. Obwohl diese bei CoTPP in geringem Maße zu beobachten ist, ist diese bei ZnTPP offensichtlich unterdrückt. Das Ionisationsverhalten bei DINEC-MS des ZnTCPP ist vollständig identisch zu dem des CoTCPP. Sowohl bei CoTCPP, als auch bei ZnTCPP werden Kationen durch Elektronenabstraktion und Anionen durch Protonenabgabe erzeugt.

Tabelle 4.1 fasst die beobachteten Ionisationsarten für die jeweiligen Porphyrine zusammen. Da bei keinen Spektren mehrfach geladene Analyt-Ionen beobachtet werden konnten, beschränkt sich die Tabelle 4.1 auf einfach geladene Porphyrin-Ionen. Ein Querstrich indiziert erfolgte Messungen ohne zuzuordnendes Ergebnis, während grau hinterlegter Felder für nicht erfolgte Messungen stehen.

Wie in Tabelle 4.1 abzulesen, weisen die mittel DINEC- und ESI-MS beobachteten Ionen eine starke Ähnlichkeit auf: In vergleichbaren Experimenten, in denen kationische ESI-Spektren von Porphyrinen mit und ohne zentralem Metall-Ion aufgenommen wurden, werden ebenfalls für die metallierten Moleküle, mit Ausnahme des ZnTCPP, die elektronisch ionisierten Moleküle beobachtet, vergleiche Tabelle 4.1 [202,208–210]. Zusammenfassend kann in DINEC-Spektren beobachtet werden, dass unmetallierte Porphyrine über Aufnahme oder Abgabe von Protonen

Tabelle 4.1: Übersicht der mittels DINEC- und ESI-MS beobachteten Ionisationsarten für Porphyrine. # aus Referenz [204]

	Porph.:	2H		Co		Zn	
DINEC-MS	TPP	[M+H] ⁺	-	[M] ⁺	[M] ⁻	[M] ⁺ /[M+H] ⁺	-
	DPP	[M+H] ⁺	-				
	TCPP	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	[M] ⁺	[M-H] ⁻	[M] ⁺	[M-H] ⁻
	TAPP			[M] ⁺	-		
ESI-MS	TPP	[M+H] ⁺	-	[M] ⁺	-	[M] ⁺	-
	DPP						
	TCPP	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	[M] ⁺	-	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
	TAPP			[M] ⁺ #			

ionisiert werden. Dies wird auch in vergleichbaren, mittels ESI aufgenommenen Spektren beobachtet und lässt sich auf die freien Amine im Zentrum der Porphyrine zurückführen [208]. Für Porphyrine mit zentralem Metall-Ion hingegen werden Kationen, die durch eine elektrische Ionisation des Zentralions entstehen, beobachtet. Dies ist selbst dann der Fall, wenn basische Restgruppen für eine Protonierung zur Verfügung stehen. Lediglich ZnTPP zeigt bei DINEC-MS als Kation zusätzlich auch die protonierten Form. Anionen werden fast ausschließlich dann beobachtet, wenn explizit saure Gruppen vorhanden sind, unabhängig ob die Porphyrine mit oder ohne Zentralion vorliegen. Das CoTPP bei DINEC-MS stellt hier eine Ausnahme dar, das sehr schwach über Elektronenaufnahme Anionen bildet.

4.2 DINEC-MS von Ir(ppy)₃

4.2.1 Ionisationsverhalten von reinem Ir(ppy)₃

Ähnlich zu den Porphyrinen lassen sich auch bei Ir(ppy)₃ zwei verschiedene Ionisationsmechanismen für einfach positiv geladene Ionen beobachten. Die Besonderheit hierbei ist aber, dass beide Mechanismen am gleichen Komplex während einer Messung auftreten und insbesondere, dass sich die relative Intensitäten der Ionen, die den unterschiedlichen Mechanismen zuzuordnen sind, im Laufe einer Messung verschieben. Die Daten und Ergebnisse zu diesem Abschnitt wurden zum Großteil in Quelle [18] veröffentlicht.

Das DINEC-MS-Spektrum einer aufgedampften¹ Ir(ppy)₃-Schicht ist in Abbildung 4.5 dargestellt: Abbildung 4.5(a) zeigt ein über 30 Minuten gemittelttes Spektrum im Bereich von $m/z = 300 - 1000$. Das Isotopenmuster des Ir(ppy)₃ liegt bei ungefähr $m/z = 655$ und wird in Abbildung 4.5(b) vergrößert dargestellt. Die Form des Isotopenmusters ist durch die Isotope ¹⁹¹Ir und ¹⁹³Ir mit einer Überlagerung von ¹³C zu erklären und lässt sich dem elektronisch ionisierten [Ir(ppy)₃]⁺ zuordnen.

Darüber hinaus sind weitere Peaks im Bereich um etwa $m/z = 670$, $m/z = 685$ und $m/z = 705$ zu erkennen, welche in Abbildung 4.5(c) dargestellt sind. Diese Peaks können oxidiertem Ir(ppy)₃ zugeordnet werden, da diese einen Abstand von $\Delta(m/z) = 16$ aufweisen. Hierbei können ein oder bis zu drei der Liganden zu 2-phenylpyridin-1-oxid oxidiert werden [211, 212]. Ein kleiner Peak (kleiner <2% des höchsten Signals) bei ungefähr $m/z = 500$ kann der Spezies [Ir(ppy)₂]⁺ zugeordnet werden, in Abbildung 4.5 ist diese mit einem Pfeil markiert. Moleküle mit nur einem Phenylpyridin [Ir(ppy)]⁺ oder gar nur das Ir⁺-Ion konnten nicht beobachtet werden.

Abbildung 4.6 zeigt DINEC-MS-Spektren einer aufgedampften Ir(ppy)₃-Probe, die über unterschiedliche Zeitintervalle gemittelt wurden: Abbildung 4.6(a) zeigt in blau das Isotopenmuster für eine auf der Summenformel basierenden Simulation des natürlich vorkommenden Isotopenmusters des einfach protonierten [Ir(ppy)₃+H]⁺. In Abbildung 4.6(e) ist das simulierte Isotopenmuster für die einfach positiv geladene Spezies [Ir(ppy)₃]⁺ in grün dargestellt, die mittels Elektronenabstraktion ionisiert wurde. In beiden Fällen ist das typische Muster, das durch die Kohlenstoffisotope hervorgerufen wird, mit einer Überlagerung der Iridiumisotope zu erkennen.

¹20 nm Ir(ppy)₃-Schicht mittels PVD (engl.: **p**hysical **v**apour **d**eposition) aufgedampft [114].

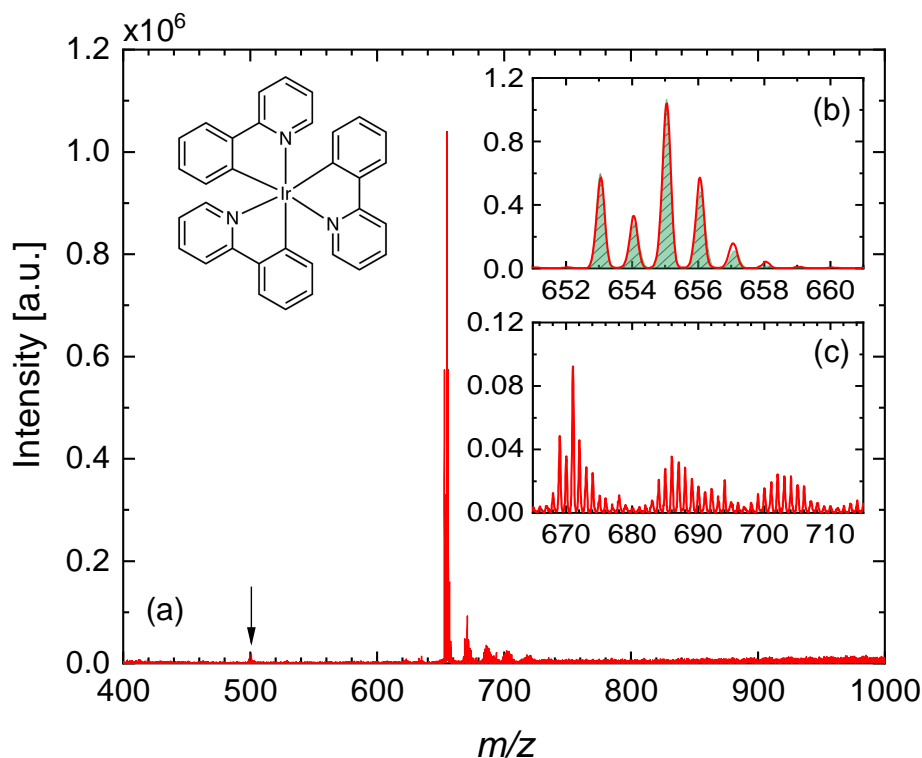


Abbildung 4.5: (a) DINEC-MS-Spektrum einer mittels PVD hergestellten $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ -Probe. Die Strukturformel ist oben links gezeigt. Das Isotopenmuster (b) mit dem größten Peak bei $m/z = 655$ wird dem intakten Molekül $[\text{Ir}(\text{ppy})_3]^+$ zugeordnet. Der Pfeil in (a) zeigt einen Peak bei $m/z = 501$ an, der $[\text{Ir}(\text{ppy})_2]^+$ zugeordnet wird. (b) Die Anpassung der experimentellen Daten in rot durch eine Simulation eines Spektrums, das bei elektronischer Ionisation zu erwarten ist (grüne Fläche unter der Kurve), bestätigt die überwiegend elektronische Ionisation. (c) Die in (a) erkennbaren Peak-Gruppen bei höheren Massen ($m/z \approx 670$ und $m/z \approx 685$) können oxidierten Molekülen zugeordnet werden [211, 212]. Nachdruck aus Referenz [18], mit der Genehmigung von AIP Publishing.

In den Abbildungen 4.6(b), (c) und (d) wurden die aufgenommenen Spektren über die Zeitintervalle 0 – 1 min, 2 – 5 min und 15 – 20 min gemittelt (rote Linien). Diese Daten wurden mit einer Linearkombination aus den Isotopenmustern von $[\text{Ir}(\text{ppy})_3 + \text{H}]^+$ und $[\text{Ir}(\text{ppy})_3]^+$ angepasst. Die farbige Fläche unter den Messdaten gibt den jeweiligen Anteil des entsprechenden Ionisationsmechanismus an. Hieraus lässt sich erkennen, dass die Probe zu Beginn der Messung (0 – 1 min) bevorzugt chemisch über eine Protonierung ionisiert wird. Mit zunehmender Messzeit (2 – 5 min) nimmt der Anteil der elektronischen Ionisation zu, bis diese nach circa 15 – 20 min schlussendlich dominiert. $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ weist keine basischen

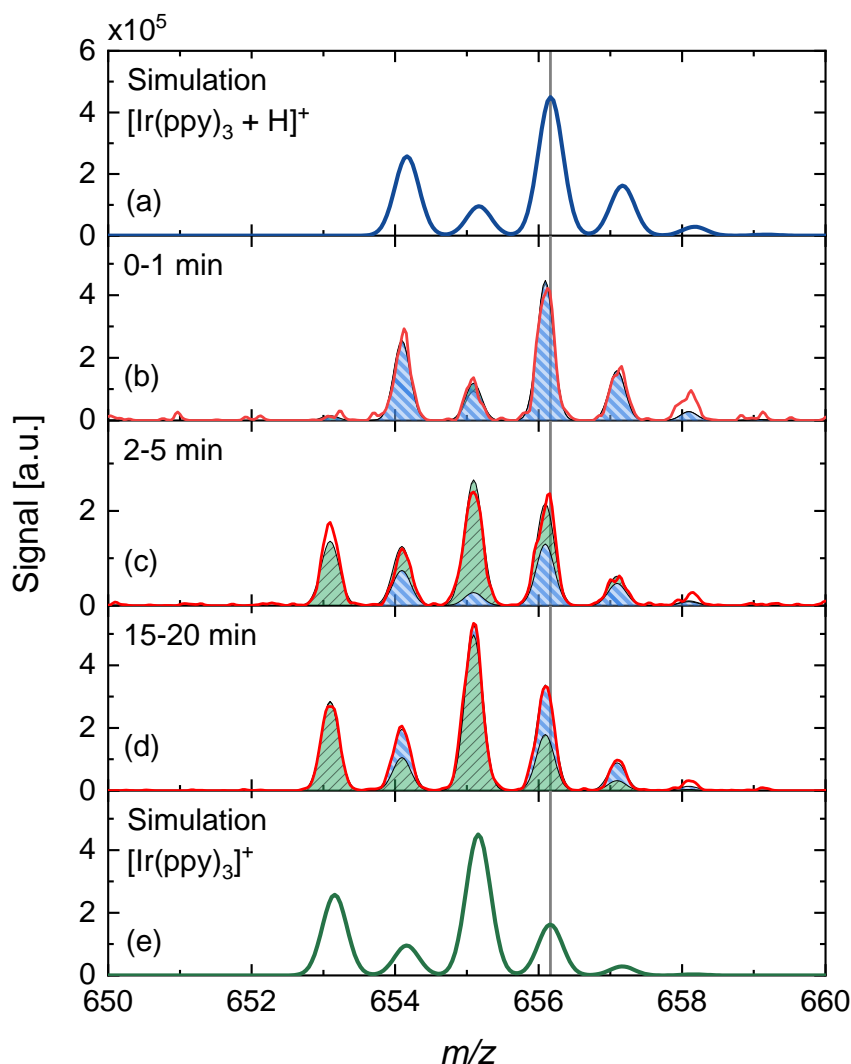


Abbildung 4.6: (a) und (e) zeigen Simulationen des Isotopenmusters für chemisch (a) und elektronisch (e) ionisiertes $\text{Ir}(\text{ppy})_3$. In (b)-(d) sind DINEC-MS-Spektren einer mittels PVD präparierten Probe gezeigt; die Spektren sind über die angegebenen Messzeiträume gemittelt und wurden mit einer linearen Kombination der beiden in (a) und (e) gezeigten Simulationen angepasst. Die entsprechenden Beiträge wurden mit einer entsprechend eingefärbten Flächen kenntlich gemacht. Nachdruck aus Referenz [18], mit der Genehmigung von AIP Publishing.

Gruppe auf, sodass die Protonierung eines der koordinierenden Kohlenstoffatomen naheliegt. Diese Protonierung konnte bei $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ durch Protonierung in Lösung nachgewiesen werden [101]. Die elektronische Ionisation erfolgt über die bei DINEC-MS bereits beobachtete Elektronenabstraktion wie bei den Porphyr-

rinen in Kapitel 4.1 beschrieben. Die Ionisationsenergie für $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ liegt nahe der von anderen mittels DINEC-MS untersuchten Systemen: Für $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ wurde diese experimentell auf 5,2–5,3 eV [213, 214] bestimmt (theoretisch in Gasphase: 5,9 eV) [215, 216], während die Ionisationsenergie von CoTCPP in der Gasphase auf 4,9 eV bestimmt wurde [217]. Auch mittels DINEC-MS messbare Alkaliatome zeigen eine vergleichbare Ionisationsenergie von 3,9–5,4 eV für Caesium- bis Lithium-Atome in der Gasphase [39]. Mittels Dichtefunktional-Berechnungen wurde ermittelt, dass die Elektronenabstraktion bei $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ über 5d-ähnliche Orbitale abläuft [215, 216]; das resultierende Ion kann somit auch als Ir(III) 5d₆-Komplex angesehen werden [215].

In Abbildung 4.7 ist der zeitliche Verlauf der unterschiedlichen Beiträge explizit aufgetragen: Die absoluten Beiträge der Linearkombination der Fits sowie deren Summe werden für Spektren in Intervallen von 1 min dargestellt. Während die Summe einen annähernd konstanten Wert beibehält, ändern sich die Anteile der chemisch und elektronisch ionisierten Spezies stark. Nach ungefähr 2 min Messzeit wechselt die dominierende Spezies von $[\text{Ir}(\text{ppy})_3+\text{H}]^+$ zu $[\text{Ir}(\text{ppy})_3]^+$. Bei langen Messzeiten stellt sich ein Gleichgewichtszustand zwischen den beiden Mechanismen ein, der deutlich auf der Seite des elektronisch ionisierten $[\text{Ir}(\text{ppy})_3]^+$ liegt, während der Anteil der protonierten Spezies $[\text{Ir}(\text{ppy})_3+\text{H}]^+$ aber nicht den Wert 0 erreicht.

In Abbildung 4.8 ist der relative Verlauf der Ionisationsmechanismen zweier Messungen aufgetragen, zwischen denen die Probe in der Vakuumkammer für 60 min H_2O bei einem Druck von 2×10^{-4} mbar ausgesetzt wurde. Der relative Verlauf der Beiträge von $[\text{Ir}(\text{ppy})_3+\text{H}]^+$ und $[\text{Ir}(\text{ppy})_3]^+$ zeigt, dass sich die Anteile der Spezies vor und nach der Exposition an H_2O qualitativ sehr ähnlich verhalten. Sie unterscheiden sich jedoch in der quantitativen Verteilung zu Beginn der jeweiligen Messung und in der Geschwindigkeit, mit der sich die Verteilung mit der Zeit ändert.

Aus der Beobachtung in Abbildung 4.8 lässt sich auf einen Einfluss des Restwasserfilms auf den Ionisationsmechanismus schließen. Bei der primären Messung wurde die Probe in die belüftete Messkammer eingebaut. Bei dieser Präparation konnte sich ein Wasserfilm auf der Probe bilden, der bei der primären Messung abgetragen wird. Die Abtragung wird durch die Abnahme des Anteils des chemisch ionisierten $[\text{Ir}(\text{ppy})_3+\text{H}]^+$ sichtbar. Wie in Kapitel 2.1.2 erklärt, bilden die SO_2 -Moleküle aus dem Cluster mit dem Restwasser auf der Probe eine saure Umgebung. Da die Probe an der Umgebungsluft des Labors gelagert wurde, konnte sich der Restwasserfilm zum Teil auch in tiefere Schichten der Probe ein-

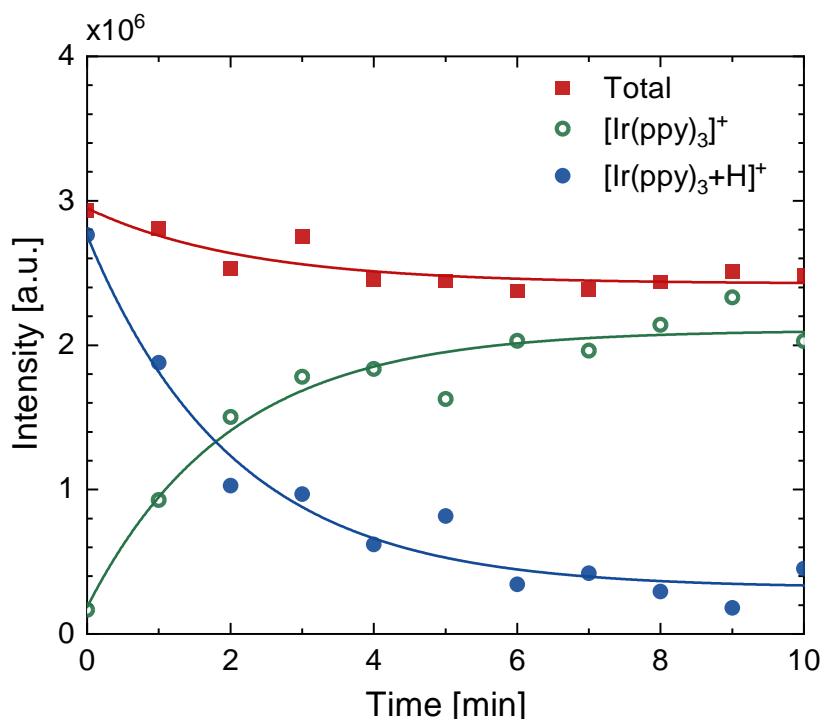


Abbildung 4.7: Integrierte Signalintensität der beiden Ionisationsbeiträge (elektronische Ionisation in grünen offenen Kreisen und chemische Ionisation in blauen Kreisen) bei $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ als Funktion der Dauer der Messung. Als rote Quadrate ist die Summe der beiden Beiträge dargestellt. Für jeden Datenpunkt wurden 1 min-Intervalle integriert. Die Linien dienen zur besseren Veranschaulichung des Verlaufs der Datenpunkte. Nachdruck aus Referenz [18], mit der Genehmigung von AIP Publishing.

lagern. Durch die Bereitstellung von H_2O in der Kammer bildet sich erneut ein Wasserfilm auf der Probe aus und die initiale Verteilung ist somit wieder durch $[\text{Ir}(\text{ppy})_3+\text{H}]^+$ dominiert. Die Einlagerung des Wasser erfolgt allerdings hierbei nur oberflächlich, weshalb die Rate mit der sich die Verteilung ändert, deutlich erhöht.

Diese Abhängigkeit des dominierenden Ionisationsmechanismus vom Restwasserfilm erklärt allerdings nur den absoluten Anteil der chemisch ionisierten Spezies $[\text{Ir}(\text{ppy})_3+\text{H}]^+$. Der absolute Wert der elektronisch ionisierten Spezies $[\text{Ir}(\text{ppy})_3]^+$ verläuft hingegen konträr. Damit scheint der Restwasserfilm auf der Probenoberfläche auch die Ionisationseffizienz der Elektronenabstraktion gleichermaßen zu beeinflussen. Es ist möglich, dass die Anwesenheit von Wasser die elektronische Umgebung der $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ -Moleküle so stark ändert, dass Elektronen mit deutlich geringerer Effizienz abstrahiert werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Clus-

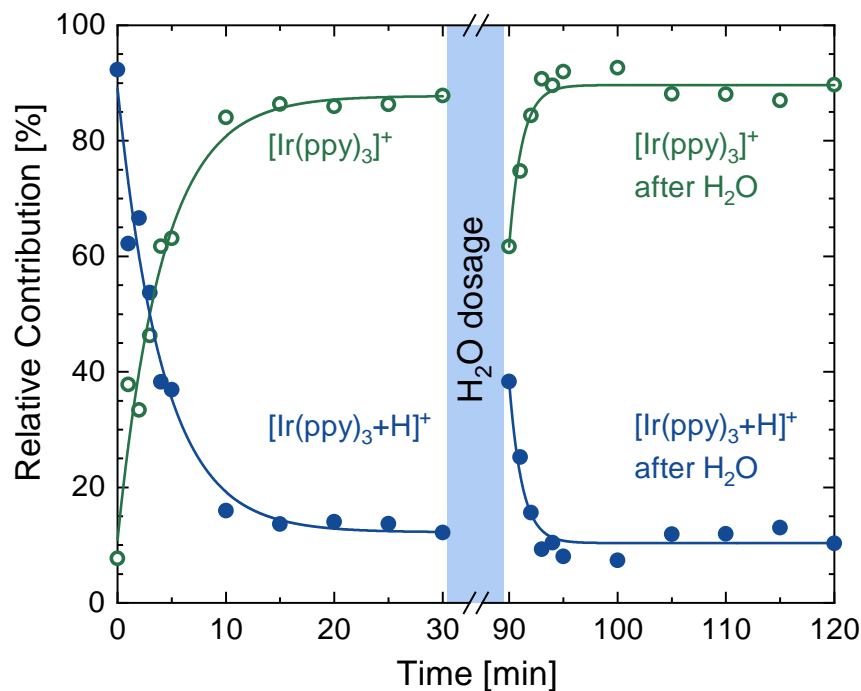


Abbildung 4.8: Die relativen Beiträge der chemischen und elektronischen Ionisation von $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ als Funktion der Zeit für zwei Messungen, die durch den Einlass von gasförmigen Wasser unterbrochen wurden. Die Invertierung von elektronischer zu chemischer Ionisation kann durch Einlassen von gasförmigen Wasser (bei einem Partialdruck von 2×10^{-4} mbar für 60 min) in die Messkammer teilweise zurückgesetzt werden. Die Probe wurde mittels PVD präpariert, die eingezeichneten Linien dienen zur besseren Veranschaulichung des Verlaufs der Datenpunkte. Nachdruck aus Referenz [18], mit der Genehmigung von AIP Publishing.

terdynamik beim Auftreffen auf der Probenoberfläche sich dahingehend ändert, dass die Wahrscheinlichkeit des stark aktivierten Prozess der Elektronenabstraktion bei Vorhandensein eines H_2O -Films zu gering wird. Die maximale Desorptions- und Ionisationseffizienz von chemischer und elektronischer Ionisation ist für die mittels PVD präparierte Probe offensichtlich ähnlich.

Zum Vergleich wurden auch Proben analysiert, deren $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ -Film nicht durch Aufdampfen sondern durch Auftropfen aus Lösung oder aus ungelöstem Pulver in einer Indium-Folie als Träger präpariert wurden. Das hierfür verwendete $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ -Pulver wurde mit einer Reinheit von $> 98\%$ von Carbosynth Ltd. aus Compton, UK bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die verwendeten Lösungen wurden aus $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ in Chloroform (CHCl_3 , $c_{\text{CHCl}_3} = 4,2 \times 10^{-4}$ mol/L) und Monochlorbenzol (MCB, $c_{\text{MCB}} = 2,3 \times 10^{-3}$ mol/L) präpariert. 30 μL der je-

weiligen Lösung wurden auf einem gereinigten SiO_2 -Wafer-Stück aufgetropft und in einem Exsikkator getrocknet. Zusätzlich wurde noch eine Probe durch mechanisches Einpressen von $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ -Pulver in ein Stück gereinigter Indium-Folie erstellt. Bei gleicher Analyse der erhaltenen DINEC-Massenspektren durch einen Fit an die in 1-Minuten-Intervallen gemittelte Spektren mit einer Linearkombination aus chemisch und elektronisch ionisierten $\text{Ir}(\text{ppy})_3$, ergeben sich für die drei Proben die in Abbildung 4.9 gezeigten Verläufe.

Die mittels PVD bedampfte Probe und die Probe aus ungelöstem Pulver zeigen dabei einen ähnlichen Verlauf. Lediglich die quantitative Verteilung der Beiträge nach 15 min ist für die beiden analysierten Proben unterschiedlich. Das $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ -Pulver zeigt auch nach 15 min noch etwa 30% $[\text{Ir}(\text{ppy})_3+\text{H}]^+$, während für die aufgedampfte Probe dieser Beitrag bei etwa 15% liegt. Einen deutlichen Unterschied zeigen dagegen die Proben aus Lösung, bei denen der gesamte Verlauf von Beginn an sehr stark durch elektronisch ionisiertes $[\text{Ir}(\text{ppy})_3]^+$ dominiert ist. Hier

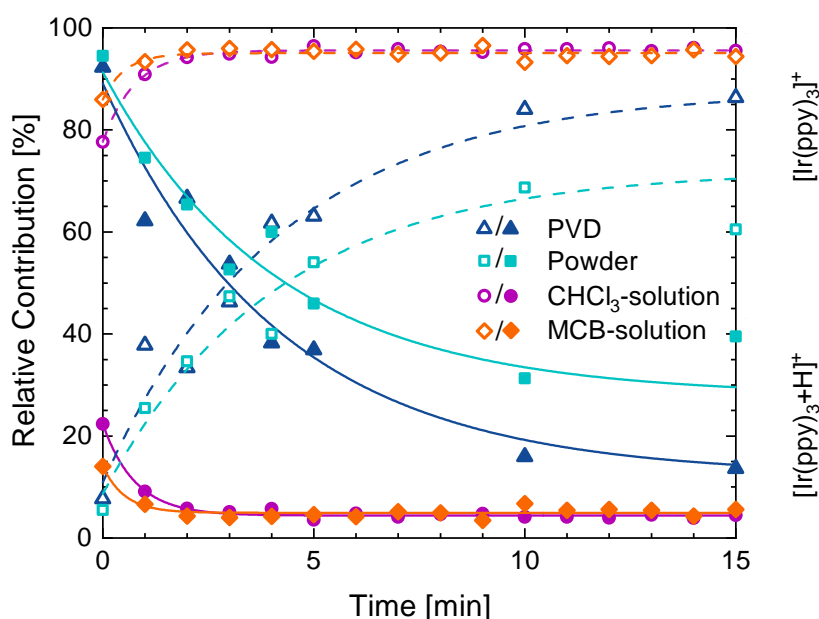


Abbildung 4.9: Vergleich der zur Ionisation beitragenden Mechanismen für Proben verschiedener Präparationsarten. Es werden Proben verglichen, die per Auftropfen aus Lösungen (MCB in orange und CHCl_3 in violett), mittels PVD (dunkelblau) und durch Einpressen eines $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ -Pulvers (hellblau) präpariert wurden. Die Linien dienen zur Veranschaulichung des Verlaufs der Datenpunkte. Nachdruck aus Referenz [18], mit der Genehmigung von AIP Publishing.

sind die Verläufe für die Lösung aus Chloroform und Monochlorbenzol bis auf die Ausgangsverteilung identisch.

In Abbildung 4.10 wird analog zu Abbildung 4.7 für aus CHCl_3 präpariertes $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ der absolute Beitrag der chemischen und elektronischen Ionisation sowie deren Summe als zeitlicher Verlauf dargestellt. Abbildung 4.10(a) zeigt den gesamten Verlauf, während in Abbildung 4.10(b) der Verlauf des Beitrags durch chemische Ionisation vergrößert dargestellt wird. Da sich die Abnahme der chemisch ionisierten Ionen mit der Messdauer vergleichbar zu der Abnahme der chemischen Ionisation der PVD-Probe in Abbildung 4.7 verhält, wird diese gleich

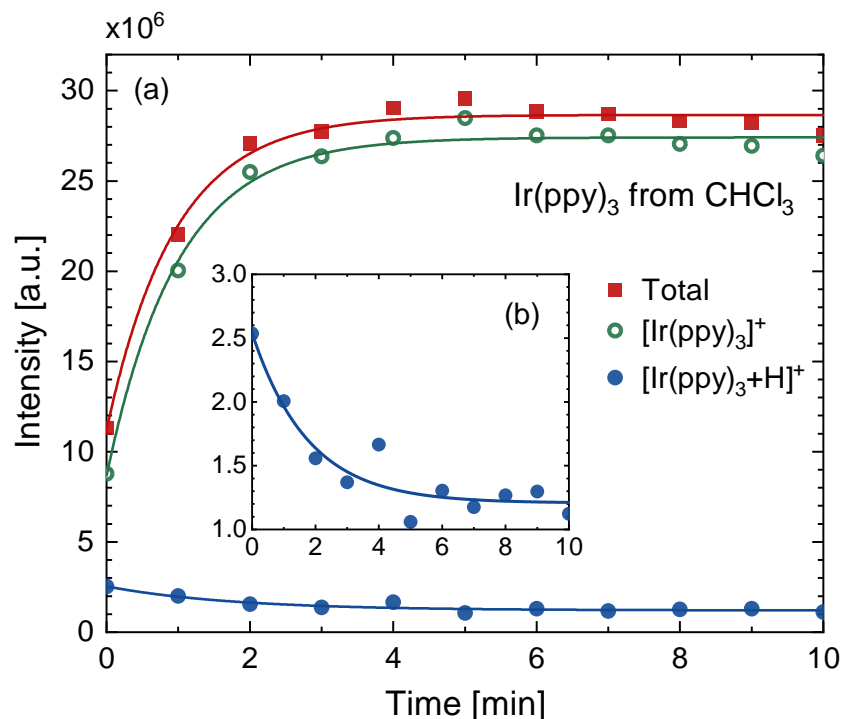


Abbildung 4.10: (a) Integrierte Signalintensität der beiden Ionisationsbeiträge (elektronische Ionisation in grünen offenen Kreisen und chemische Ionisation in blauen Kreisen) bei $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ als Funktion der Dauer der DINEC-MS-Messung für eine Probe, die aus einer CHCl_3 -Lösung präpariert wurde. Als rote Quadrate ist die Summe der beiden Beiträge dargestellt. Für jeden Datenpunkt wurden 1 min-Intervalle integriert. (b) Vergrößerung des Beitrages der chemischen Ionisation. Der zeitliche Verlauf der Abnahme der Intensität ist vergleichbar zu der Abnahme der in Abbildung 4.7 dargestellten DINEC-Messung der PVD-Probe. In beiden Abbildungsteilen dienen die Linien zur besseren Veranschaulichung des Verlaufs der Datenpunkte. Nachdruck aus Referenz [18], mit der Genehmigung von AIP Publishing.

interpretiert: Ein dünner Restwasser-Film auf der Probenoberfläche erzeugt mit SO_2 -Molekülen aus den Clustern eine saure Umgebung, die die chemische Ionisation begünstigt. Da dieser Film bei der Messung selbst abgetragen wird, nimmt damit auch der absolute Beitrag der chemischen Ionisation ab. Allerdings ist von Beginn an der Beitrag der elektronischen Ionisation deutlich größer und steigt im Verlauf der Messung weiter an.

Diese deutlichen Unterschiede zwischen den Präparationsarten können auf die Morphologie der Proben zurückgeführt werden. Abbildung 4.11 zeigt Aufnahmen mit einem Raster-Elektronen-Mikroskop der untersuchten Proben. Die erkennbaren Strukturen der aus Lösung präparierten Proben lassen sich im direkten Vergleich zu der aufgedampften und der Pulverprobe in ihrer Größe unterscheiden.

Die aus Lösung präparierten Proben zeigen größere Mikrokristalle im μm -Bereich, während die anderen zwei Proben Strukturen $< 100 \text{ nm}$ aufweisen. Die Unterschiede der Kristallgrößen passen somit zu den ähnlichen Verläufen der relativen Beiträge zur Ionisation. Über die tiefliegende physikalische Ursache kann an dieser Stelle allerdings nur spekuliert werden: So ist es möglich, dass bei den aus Lösungen präparierten Proben die Größe der Kristalle und eine erniedrigte Fehl-

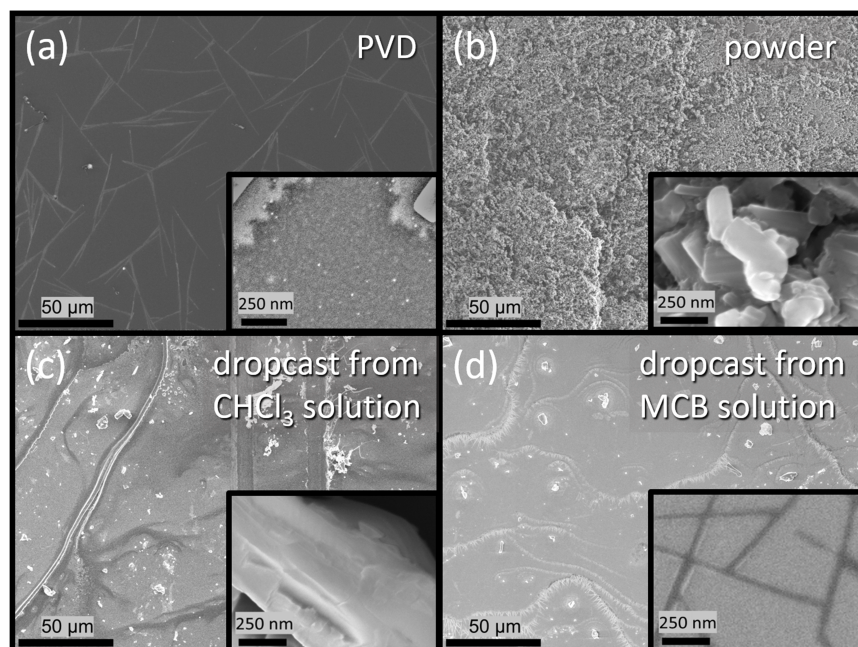


Abbildung 4.11: Aufnahmen von $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ -Proben mittels Rasterelektronenmikroskop: (a) mittels PVD präpariert, (b) aus eingepresstem $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ -pulver, (c) aus einer CHCl_3 -Lösung aufgetropft und (d) aus einer MCB-Lösung aufgetropft. Nachdruck aus Referenz [18], mit der Genehmigung von AIP Publishing.

stellendichte zu einer Änderung der Austrittsarbeit führt. Für die Elektronenabstraktion kann eine solche Änderung dann eine starke Änderung der Ionisations-effizienz bedeuten. Diese kann durch das Vorhandensein von Wasser zusätzlich beeinflusst werden.

4.2.2 Ionisationsverhalten von $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ in Mischungen

Eine weitere Änderung der chemischen und damit auch elektronischen Umgebung von $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ wurde durch die Mischung von $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ mit Materialien, die auch in OLEDs aufgrund ihrer Elektrolumineszenz verwendet werden, realisiert. Mischungen von $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ mit Alq_3 und Coumarin 6 (Cou6) wurden hierzu per PVD aufgedampft; weitere Informationen zur Probenpräparation sind in Quelle [114] zu finden. Für beide Mischsysteme wurden Proben analysiert, die zu 0%, 25%, 50%, 75% und 100% aus $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ und komplementär dazu aus Alq_3 oder Cou6 bestehen. In Abbildung 4.12 sind die summierten Intensitäten des jeweiligen gesamten Isotopenmusters im Intervall von 10-25 min der DINEC-Messung aufgetragen. In diesem Intervall wird reines, durch PVD aufgedampftes $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ zum Großteil elektronisch ionisiert beobachtet, wie in Abbildung 4.6 gezeigt. Darüber hinaus konnte bei Mischungen von $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ mit Cou6 und Alq_3 in keinem Messintervall eine chemische Ionisation des $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ beobachtet werden und auch Cou6 wird ausschließlich elektronisch ionisiert nachgewiesen.

In Abbildung 4.12(a) werden die Ergebnisse für die Mischungen aus $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ und Cou6, in Abbildung 4.12(b) werden die Ergebnisse für die Mischungen aus $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ und Alq_3 gezeigt. Die Auftragung in Abbildung 4.12(a) zeigt einen starken Abfall für die Intensität des Cou6 für die Proben ohne und mit 25% $\text{Ir}(\text{ppy})_3$. Gleiches gilt auch für die $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ -Intensität im Vergleich der Proben mit 100% und 75% $\text{Ir}(\text{ppy})_3$. Würden sich $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ und Cou6/ Alq_3 in ihrem Desorptions-/Ionisationsverhalten nicht beeinflussen, wäre zu erwarten, dass die Verläufe eine Gerade bilden; ein geringerer Anteil eines Stoffes in der Mischung resultiert auch in einem niedrigeren Anteil im oberflächennahen Bereich und somit in einer geringeren Intensität an desorbierten Molekülen. Insbesondere durch die relativ lange Messzeit können Segregationseffekte weitgehend ausgeschlossen werden [42]. Das nicht-lineare Verhalten der Intensitäten mit dem Stoffmengenanteil in der Probe lässt deshalb darauf schließen, dass die Desorptions- und Ionisationseffizienz der beiden Mischungspartner vom Mischungsverhältnis abhängig ist. Sowohl die Mischung mit Cou6, als auch von Alq_3 mit $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ unterdrücken die $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ -Intensität in Massenspektren mittels DINEC. Da Alq_3 allerdings mittels DINEC-

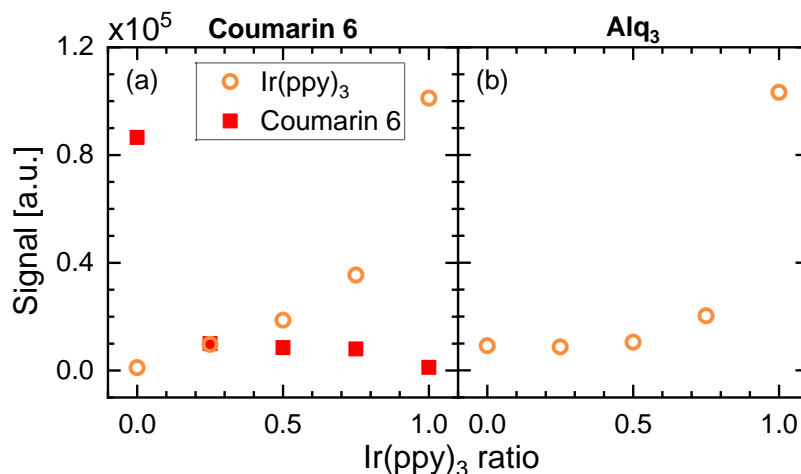


Abbildung 4.12: Intensitätsverläufe aus DINEC-MS-Messungen von mittels PVD präparierten Mischproben bestehend aus Ir(ppy)₃ und Cou6 in (a), und Alq₃ in (b), jeweils für das Messintervall von 10 bis 25 Minuten. Jeweils als orangefarbene Kreise ist die Intensität des gesamten Isotopenmusters für Ir(ppy)₃ eingezeichnet. Die Intensität für Coumarin 6 ist als rote Quadrate eingetragen; Alq₃ konnte mittels DINEC-MS nicht beobachtet werden.

MS nicht beobachtbar ist, wird hier nur die Signalintensität von Ir(ppy)₃ diskutiert. Auch in dieser Reihe ist ein nicht-linearer Verlauf der Ir(ppy)₃-Intensität mit dem Stoffmengenanteil zu beobachten.

Bei Betrachtung der Elektronenaffinitäten dieser Mischungspartner zeigt sich, dass sowohl Cou6 mit 2,93 eV als auch Alq₃ mit 2,99-3,1 eV eine größere Elektronenaffinität hat als Ir(ppy)₃ mit 2,6-2,7 eV [213,218–221]. In beiden Fällen scheint die erhöhte Elektronenaffinität bereits bei kleineren Mischungsverhältnissen der Elektronenabstraktion durch das SO₂ und damit der elektrischen Ionisationseffizienz des Ir(ppy)₃ entgegen zu wirken. Dennoch sind auch bei kleinen Messzeiten keine chemisch ionisierten Moleküle detektierbar, was auf einen weiteren Einfluss der beigemischten Moleküle, zum Beispiel hinsichtlich der Wechselwirkung mit Wasser, hindeutet.

5 | Ioneninduzierte Fragmentierung von Peptiden

Die durch Ionenbeschuss induzierte Fragmentierung von Peptiden, insbesondere unter Verwendung schneller Schwerionen, soll im Folgenden analysiert werden. Im Vordergrund steht hierbei die Analyse der Schnitte entlang des Peptidrückgrats, den sogenannten spezifischen Schnitten, sowie deren Position im Rückgrat des untersuchten Peptids. Dazu werden die Intensitäten der entsprechenden Fragmente im Peptid einzeln analysiert und miteinander verglichen. Zur weiteren Interpretation der durch SHI fragmentierten Peptide werden auch CID-Spektren der gleichen Peptide herangezogen und verglichen. Die hohe Selektivität der SHI-induzierten Fragmentation, die deutliche Abweichungen von den in CID-Experimenten gemessenen Verteilungen und insbesondere auch das auftreten von a/x- und c/z-Schnitten weist dabei auf einen neuen Fragmentierungsmechanismus hin.

5.1 Spezifische Fragmentierung durch MeV-Ionen

5.1.1 Fragmentanalyse

Die in diesem Unterkapitel vorgestellten Messungen wurden zum Teil zusammen mit Dr. Pascal Schneider durchgeführt und in Referenz [31] veröffentlicht. Hier sollen die grundlegenden Ergebnisse nochmals vorgestellt und insbesondere bezüglich der quantitativen Auswertung erweitert werden. In Abbildung 5.1 sind beispielhaft zwei Spektren derselben Angiotensin-II-Probe gezeigt, die mittels DINEC-MS aufgenommen wurden. Abbildung 5.1(a) zeigt das Massenspektrum einer unbestrahlten Probe, die im Anschluss an eine Bestrahlung mit Gold-Ionen bei 946 MeV erneut vermessen wurde; das Spektrum dieser Messung ist in Abbildung 5.1(c) dargestellt. In Abbildung 5.1(a) ist das Signal des einfach protonierten Monomers $[M+H]^+$ bei $m/z = 1046,47$ dominant. Bei höheren m/z -Werten lassen sich zudem Signale des Monomers mit Addukten erkennen, darunter die mit Alkalimetallen ionisierten Formen $[M+Na]^+$ bei $m/z = 1068,47$

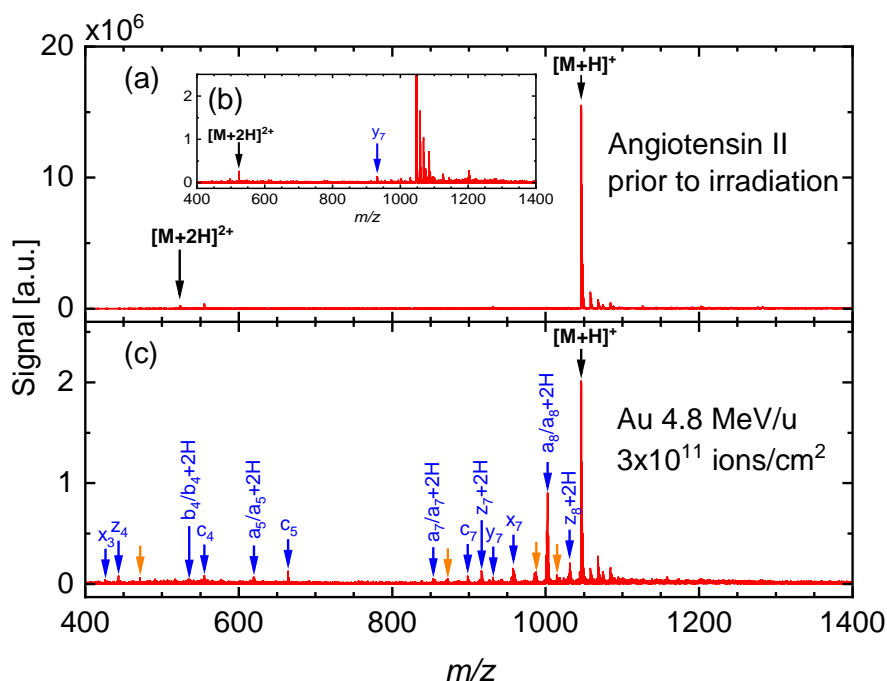


Abbildung 5.1: DINEC-MS Spektren von Angiotensin II: (a) und (b) vor der Bestrahlung, sowie in (c) nach der Bestrahlung mit Gold-Ionen ($^{197}\text{Au}^{26+}$, $4,8 \text{ MeV/u}$, $3 \times 10^{11} \text{ Ionen/cm}^2$). Die Peaks, die einfach und doppelt protonierten, intakten Ionen zuzuordnen sind, sind mit schwarzen Pfeilen und die spezifischen Fragmente mit blauen Pfeilen gekennzeichnet und nach ihrer Zuordnung benannt. Orangene Pfeile markieren unspezifische Fragmente im Spektrum.

und $[M+K]^+$ bei $m/z = 1084,47$ [222]. Zusätzlich ist auch das doppelt protonierte Monomer $[M+2H]^{2+}$ bei $m/z = 523,28$ schwach zu beobachten. Das Spektrum in Abbildung 5.1(a) zeigt keine signifikante Menge an Fragmenten. Auch in der vergrößerten Ansicht in Abbildung 5.1(b), ist nur das markierte y_7 -Fragment, sowie das zweifach protonierte Monomer zu erkennen. Dies hebt nochmals die sanfte Desorption und Ionisation durch SO_2 -Cluster hervor und legitimiert somit diese Methode zur Untersuchung der ioneninduzierten Fragmentierung durch Messungen der Proben vor und nach der Bestrahlung mit SHI. Das DINEC-Spektrum der gleichen Probe nach Bestrahlung mit MeV-Ionen ($^{197}\text{Au}^{26+}$, $4,8 \text{ MeV/u}$, $3 \times 10^{11} \text{ Ionen/cm}^2$) in Abbildung 5.1(c) zeigt eine Reduktion des Mutterpeaks auf ungefähr ein Zehntel der ursprünglichen Intensität. Darüber hinaus können deutlich Fragmente identifiziert werden. Signale, die einem spezifischen Fragment des Angiotensin II zugeordnet werden können, sind entsprechend der in Kapitel 2.4 eingeführten Nomenklatur in blau beschriftet. Die Fragmente treten zum Teil in Verbindung mit einer Weiterreaktion auf, die sich durch die Addition von zwei Wasserstoff-Atomen äußert [223]. Da diese abreagierte Form aus dem

gleichen Fragment herrührt, werden solche abreagierten Formen dem ursprünglichen Fragment zugeordnet. Orangene Pfeile markieren Signale von Fragmenten, die vor der Bestrahlung nicht zu beobachten waren, nach der Bestrahlung aber aufgetreten sind und sich keinem spezifischen Fragment zuordnen lassen.

Es lässt sich erkennen, dass die SHI-induzierte Fragmentierung überwiegend spezifische Fragmente hervorbringt. Im direkten Kontrast dazu steht die Fragmentation durch keV-Ionen, bei denen größtenteils unspezifische Brüche beobachtet wurden [31].

Um die Verteilung von spezifischen zu unspezifischen Fragmenten weiter zu quantifizieren, wird die Anzahl der Peaks sowie die aufsummierte Gesamtintensität, die den spezifischen beziehungsweise unspezifischen Fragmenten von Angiotensin II zugeordnet werden können, in Abbildung 5.2 aufgetragen. Eingetragen wurden die Ergebnisse von jeweils fünf Proben, die mittels MeV- oder keV-Ionen bestrahlt wurden (MeV: $^{197}\text{Au}^{26+}$ bei 946 MeV; keV: Bi^{3+} bei 25 keV). Als unspezifische Brüche werden die Brüche bezeichnet, die nicht entlang des Peptidrückgrats sondern in den Aminosäureresten liegen [31, 224]. Die Daten in Abbildung 5.2(a)

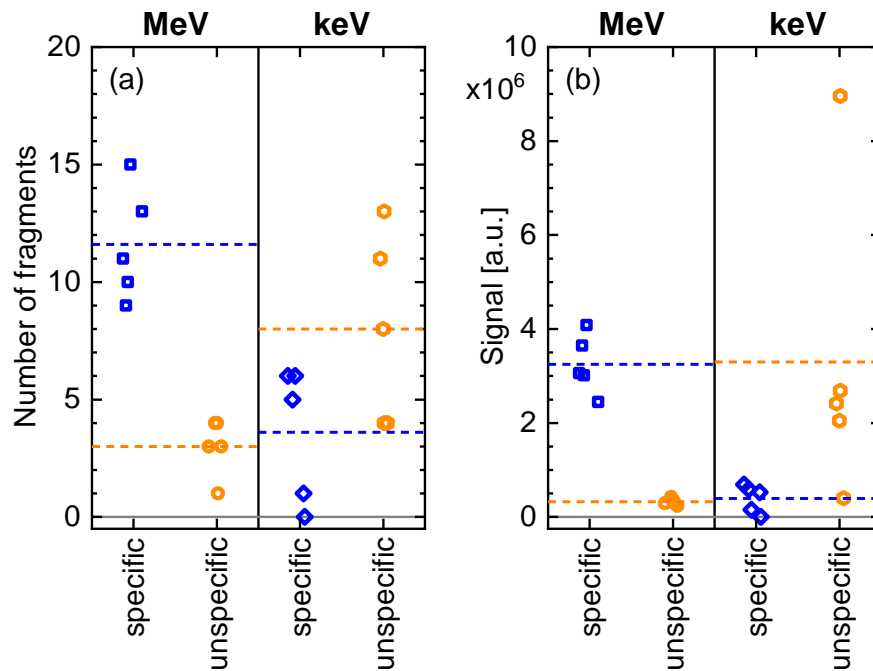


Abbildung 5.2: Für jeweils fünf mit MeV- und keV-Ionen bestrahlte Angiotensin-II-Proben sind (a) die Fragmenthäufigkeiten und (b) die Gesamtintensitäten der beobachteten Fragmente aufgetragen. Spezifische Fragmente sind blau und unspezifische Fragmente orange gekennzeichnet. Die gestrichelte Linie gibt den jeweiligen Mittelwert an.

und (b) gehören dabei zu demselben Satz Proben. Wie in Abbildung 5.1 sind Datenpunkte für spezifische Fragmente in blau und für unspezifische Fragmente in orange dargestellt. Die gestrichelten Linien stellen den Mittelwert der gemessenen Werte jeder Kategorie dar. Abbildung 5.2(a) zeigt die Anzahl der beobachteten Fragmente unabhängig von ihrer Intensität. Für die Fragmentation durch MeV-Ionen wird ersichtlich, dass spezifische Fragmente viermal häufiger auftreten als unspezifische Fragmente. Mit keV-Ionen bestrahlte Proben hingegen weisen eine größere Anzahl unspezifischer Fragmente auf. Der Unterschied zwischen der Anzahl spezifischer und unspezifischer Fragmente ist bei diesen Proben aber weniger ausgeprägt. Dennoch sind die unspezifischen Fragmente doppelt so oft vertreten wie die spezifischen Fragmente.

Abbildung 5.2(b) stellt die aufsummierten, absoluten Intensitäten der entsprechenden Fragmente für die zwei Energiebereiche gegenüber. In dieser Darstellung ist zu erkennen, dass bei der SHI-induzierten Fragmentierung nicht nur eine größere Anzahl spezifischer Fragmente erzeugt wird, sondern auch deren gesamte Intensität deutlich über der der unspezifischen Fragmente liegt. Die Bestrahlung mit keV-Ionen hingegen führt überwiegend zu unspezifischen Fragmenten, die auch in der Gesamtintensität überwiegen. Diese Auftragungen wurde ohne Rücksicht auf die verwendeten Flüsse oder Fluenzen erstellt. Es wurde lediglich sichergestellt, dass eine breite Verteilung dieser Parameter vorliegt und keine zwei Proben den gleichen Parametersatz aufweisen. Dies erklärt auch Ausreißer, die sich vermeintlich weit von anderen Datenpunkten entfernt befinden. Wie in Kapitel 2.4.2 dargestellt, erfolgt der Energieübertrag bei einem Einschlag eines keV-Ions lokal und induziert lokale Bindungsbrüche. Damit können neben spezifischen Fragmenten auch unspezifische Fragmente entstehen, wie es in den Abbildungen 5.2(a) und (b) in orange beobachtet wird. MeV-Ionen hingegen regen das elektronische System des Moleküls an, das die eingebrachte Energie delokalisiert und damit die energetisch bevorzugten Bindungsbrüche bevorzugt. In Abbildung 5.2(a) und (b) ist das an der Dominanz der spezifischen Fragmente in blau zu erkennen.

Die weitere Analyse des Signals des Mutterions zeigt, wie in Abbildung 5.3 dargestellt, keine Abhängigkeit der Intensität des Mutterions bei unterschiedlichen Ionenflüssen bei konstanter Ionenfluenz. Die dargestellten Daten stammen aus DINEC-MS-Spektren von Angiotensin-II- und Bradykinin-Proben, die mit 3×10^{11} Ionen/cm² (¹⁹⁷Au²⁶⁺, 4,8 MeV/u) bestrahlt wurden. Die Intensität des Signals nach der Bestrahlung wurde auf die Signalintensität vor der Bestrahlung normiert. Die gestrichelten Linien zeigen den Mittelwert für das jeweilige Peptid. Es fällt auf, dass dieser Mittelwert für Bradykinin gegenüber Angiotensin II

nur die Hälfte beträgt. Weiterhin lässt sich erkennen, dass die Signalreduktion und damit die Fragmentierungswahrscheinlichkeit des ursprünglichen Moleküls offenbar nicht maßgeblich vom Fluss der einfallenden Ionen abhängt, da das normierte Signal sich bei gleicher Fluenz für beide Probensorten konstant zeigt. Daraus kann geschlossen werden, dass die beobachtete selektive Fragmentierung eine direkte Konsequenz aus der Wechselwirkung des Peptids mit den einfallenden Ionen ist und nicht aus einem sekundären Effekt wie beispielsweise ein makroskopisches Aufheizen der Probe aufgrund unzureichenden Wärmeabtrags herrührt. Für Angiotensin II können die Ausreißer bei kleinen Flüssen auf einen inhomogenen Ionenstrahl zurückgeführt werden, da insbesondere bei Flüßen $< 1 \times 10^8$ Ionen/(cm²s) am Messplatz M3 Inhomogenitäten des Ionenstrahls und damit schwankende Gesamtfluenzen beobachtet werden können.

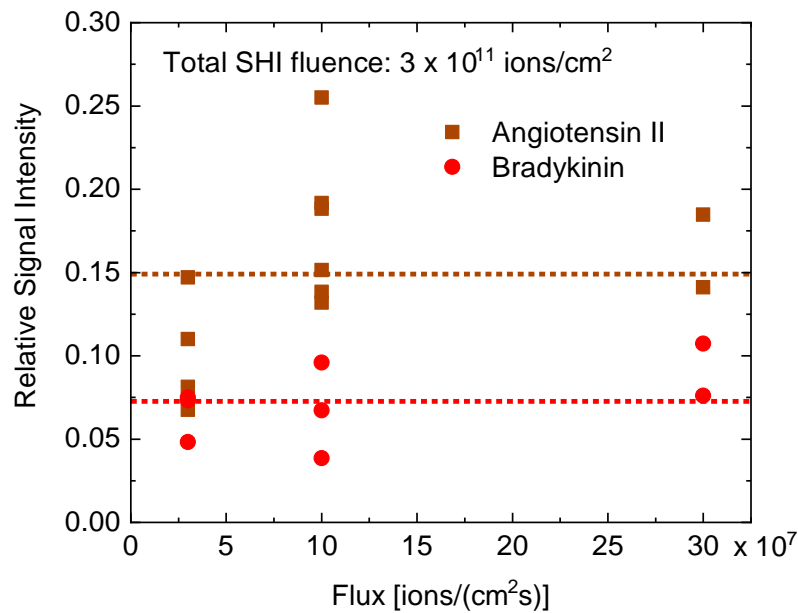


Abbildung 5.3: Normierte Intensität des Peaks, der dem intakten Angiotensin II (Quadrate) und Bradykinin (Punkte) zugeordnet wird, nach der Bestrahlung mit SHI. Die Signalintensität nach der Bestrahlung ist auf die Intensität dieser Peaks vor der Bestrahlung normiert. Die dargestellten Daten sind gegen den Fluss des Ionenstrahls aufgetragen. Alle Proben wurden mit einer Fluenz von 3×10^{11} Ionen/cm² (¹⁹⁷Au²⁶⁺, 4,8 MeV/u) bestrahlt. Der Mittelwert des jeweiligen normierten Signals ist für die beiden Peptide jeweils als gestrichelte Linie eingezeichnet. Angelehnt an Abbildung S3 aus Quelle [31], ergänzt durch nach der Veröffentlichung aufgenommene Datenpunkte; Copyright 2022 Springer Nature.

5.1.2 Wirkungsquerschnitte und Fragmenthäufigkeit

In Abbildungen 5.4(a)-(c) ist der Einfluss der Fluenz auf die Signalintensität des Peaks der den intakten Molekül zugeordnet werden kann, für Angiotensin II (5.4(a)), Neurotensin (5.4(b)) und Bradykinin (5.4(c)) zu sehen. Auch hier wurde die Intensität des Peaks der intakten Moleküle vor und nach der Bestrahlung mit MeV-Ionen ($^{197}\text{Au}^{26+}$, 4,8 MeV/u) verglichen und auf die Intensität in der Vormessung normiert. Je Peptid wurde zusätzlich ein exponentieller Verlauf angepasst, der die Verläufe der Peptide miteinander vergleichbar macht. Es ist erkennbar, dass die Peptide Bradykinin und Neurotensin im Mittel bei kleineren Fluenzen fragmentiert werden. Angiotensin II scheint vergleichsweise stabil, da es bei einer Fluenz von ungefähr 2×10^{11} Ionen/cm² circa die Hälfte der ursprünglichen

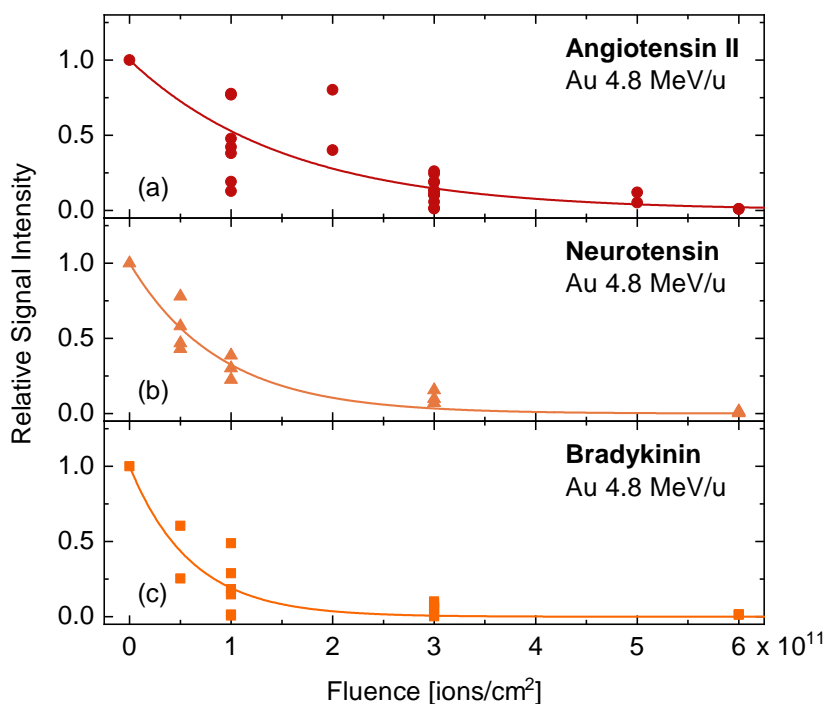


Abbildung 5.4: Relative Intensität des Peaks des intakten Angiotensin II (a), Neurotensin (b) und Bradykinin (c) nach der Bestrahlung mit SHI ($^{197}\text{Au}^{26+}$, 4,8 MeV/u). Die Signalintensitäten nach der Bestrahlung sind auf die Intensität vor der Bestrahlung normiert. Die dargestellten Daten sind gegen die Fluenz des Ionenstrahls aufgetragen und alle Werte eines Peptids wurden mit einer exponentiellen Funktion angepasst. Angelehnt an Abbildung 6 aus Quelle [31], ergänzt durch nach der Veröffentlichung aufgenommene Datenpunkte; Copyright 2022 Springer Nature.

Intensität verliert. Für Neurotensin und Bradykinin liegt dieser Wert bei einer Fluenz von ungefähr $0,6 \times 10^{11}$ Ionen/cm² beziehungsweise $0,4 \times 10^{11}$ Ionen/cm². Diese Unterschiede lassen sich aus der Anpassung nach $I(F) = I_0 \cdot \exp^{-\sigma \cdot F}$ durch die Wirkungsquerschnitte $\sigma_{\text{AngiotensinII}} \approx 600 \text{ nm}^2$, $\sigma_{\text{Neurotensin}} \approx 1100 \text{ nm}^2$ und $\sigma_{\text{Bradykinin}} \approx 1700 \text{ nm}^2$ ausdrücken; mit I_0 für die Intensität des Peaks des intakten Moleküls in der unbestrahlten Probe und der Fluenz F .

Die verschiedenen Wirkungsquerschnitte der Peptide weisen daraufhin, dass die SHI-Bestrahlung die Peptide unterschiedlich stark beeinflusst. Damit muss die Struktur der Peptide einen Einfluss auf die Fragmentierung haben, weshalb dieser Einfluss im anschließenden Unterkapitel 5.2 weiter diskutiert wird.

5.2 Selektive Fragmentierung zwischen Aminosäureeinheiten

Die bisherige Betrachtung der Fragmentation und der damit einhergehenden Abnahme der Intensität des Mutterions zeigt einen Einfluss der molekularen Struktur auf die Fragmentierung, bezieht sich aber nur auf das Gesamtmolekül und beschäftigt sich nicht mit den entstandenen Fragmenten. Wie die Fluenzabhängigkeit in Abbildung 5.4 gezeigt hat, gibt es aber Unterschiede, wie stark unterschiedliche Moleküle bei gegebener Fluenz fragmentieren. Der naheliegendste Parameter der dieses Verhalten beeinflussen könnte, sind die unterschiedlichen Aminosäureeinheiten der Peptide. Da diese das Gesamtsystem durch saure, neutrale oder basische Aminosäurereste verändern, werden in den folgenden Abschnitten Peptide mit entsprechend unterschiedlichen Einheiten diskutiert. Des Weiteren wird auch der Einfluss ganzer Sequenzen von Aminosäuren analysiert, um auch Interaktionen und gegenseitige Beeinflussungen zu überprüfen. Als Vergleich zu der SHI-induzierten Fragmentierung wird hierzu die kollisionsinduzierte Fragmentierung (CID) herangezogen, da diese wie die SHI-induzierte Fragmentierung spezifische und selektive Fragmente zeigt und hierzu bereits Modelle aufgestellt und Mechanismen in der Literatur diskutiert worden sind. Im Anschluss werden auch der Einfluss der Fluenz und des Energieverlustes auf die Fragmentationsstärke und insbesondere auf die Fragmentmuster diskutiert.

5.2.1 Fragmentierung induziert durch SHI

Im Folgenden werden nun die spezifischen Fragmente betrachtet, die durch SHI induziert wurden. Da die spezifischen Fragmente per Definition durch eine Frag-

mentation im Peptidrückgrat entstehen, können die beobachteten Fragmente entsprechend der Position der Schnitte im Peptid eingeteilt werden. Abbildung 5.5 zeigt die Intensitäten aller spezifischen Fragmente von 14 Angiotensin-II-Proben, die mit SHI bestrahlt wurden.

Jeder Balken zeigt dabei die Intensitätsdifferenz der Fragmentintensitäten nach und vor der Bestrahlung mit SHI für eine der Proben. Die Intensitäten sind hier nach der Schnittposition und der Schnittart (a/x, b/y und c/z) sortiert. Pro Schnittart unterteilt sich die Darstellung nochmals in die einzelnen Fragmente; beispielsweise sind c_5 -Fragmente zu beobachten, während das entsprechende komplementäre Fragment (z_3) dieses Schnitts an dieser Position nicht zu beobachten ist. Bei a_7 hingegen wurden sowohl a-, als auch x-Fragmente beobachtet. Es sind N-terminal von Arginin (R) ausschließlich x/y/z-Fragmente zu beobachten, während C-terminal von Arginin größtenteils a/b/c-Fragmente aufgenommen wurden. Dies lässt sich auf die Ionisation des Peptids beziehungsweise der Fragmente zurückführen: Das basische Arginin kann leicht protoniert werden und so den Analyten ionsieren; ein Fragment ohne Arginin wird nicht so leicht ionisiert und kann entsprechend nicht mit gleicher Wahrscheinlichkeit im Massenspektrometer detektiert werden. Abbildung 5.5 zeigt auch randständige Schnitte an Position

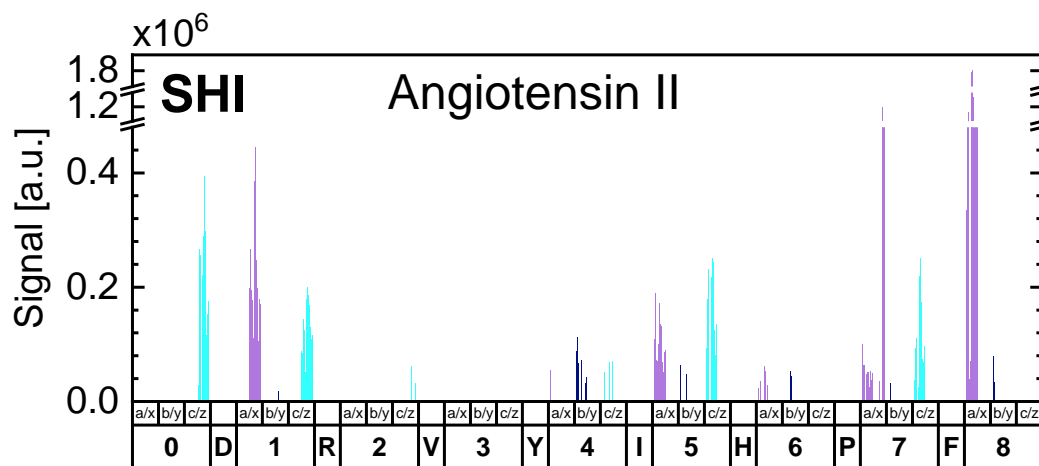


Abbildung 5.5: Darstellung aller spezifischen Fragmentintensitäten für 14 Angiotensin-II-Proben nach der SHI-induzierten Fragmentation. Die unterste Beschriftung gibt die gesamte Aminosäuresequenz und die möglichen Schnittpositionen im Peptid an. Die Daten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren sortiert, wobei pro Feld der linke Teil den a/b/c- und der rechte Teil den x/y/z-Fragmenten zugeordnet wird. Darüber hinaus sind die a/x-, b/y- und c/z-Fragmente entsprechend Abbildung 2.10 farblich unterschieden.

0 und 8, die keine Fragmentierung einer Peptidbindung darstellen. Solche Fragmente entstehen durch Nebenreaktionen, vergleiche Kapitel 2.4.1. So entstehen durch eine Entfernung einer NH_3 -Einheit die dargestellten Fragmente bei z_0 und durch die Entfernung von CO_2 die a_8 -Fragmente. Da diese endständigen Schnitte keine Schnitte zwischen zwei Aminosäuren darstellen, werden diese in folgenden Abbildungen nicht mit dargestellt und auch nicht diskutiert. Alle Abbildungen sind unter Berücksichtigung endständigen Schnitten im Anhang B verfügbar.

Werden die Intensitäten der Fragmente entsprechend der Schnittart je Peptidbindung aufsummiert, ergibt sich Abbildung 5.6(b). Die Gesamtintensität eines Schnittes wurde auf die Anzahl der beitragenden Proben normiert, um später unterschiedliche Peptide mit unterschiedlicher Probenanzahl miteinander vergleichen zu können. Um in den Daten Fragmente (und damit Schnitte), die vor der Bestrahlung bereits in der Probe vorhanden waren, zu berücksichtigen, werden die Intensitäten der beobachteten Fragmente in der Messung vor der SHI-Bestrahlung von der Messung nach der SHI-Bestrahlung abgezogen (Abbildung 5.6(c)). Darüber hinaus wurden pro Probe nur die Fragmente berücksichtigt, deren Intensität nach Bestrahlung größer war als vor der Bestrahlung. So kann ausgeschlossen werden, dass ein negativer Beitrag dieser Verrechnung sich mit einem positiven Beitrag einer anderen Probe ausgleicht und so auftretende Fragmente unterdrückt. Da auch Fragmente, die vor der Bestrahlung vorhanden sind, fragmentieren könnten, könnte durch diesen Abzug eine zu große Zahl an Fragmenten von den Daten abgezogen werden. Dieses Vorgehen stellt also eine untere Grenze an Fragmenten dar. Allerdings zeigt der Vergleich von Abbildung 5.6(b) und 5.6(c) deutlich, dass ein möglicher Fehler durch den Abzug der Fragmente, die vor der Bestrahlung vorhanden sind, klein ist: In Abbildung 5.6(a) sind die Intensitäten der Fragmente in der unbestrahlten Probe zu erkennen. Es ist zu beobachten, dass alle Schnittpositionen in geringem Maße Schnitte aufweisen. Diese sind überwiegend b/y-Fragmente mit einigen a/x-Fragmenten. Solche Fragmente könnten durch unerwünschte Nebenreaktionen bei der Synthese des Peptids entstehen. Wie in 2.3.1 beschrieben, werden bei der Synthese von Peptiden die Säure- und Aminogruppen zweier Aminosäuren verknüpft. Bei der Synthese werden blockierende Moleküle an den Enden verwendet, um die Reihenfolge der Aminosäuresequenz kontrollieren zu können. Diese Blocker werden vor jedem Syntheseschritt entfernt, bevor eine neue Aminosäure der Sequenz hinzugefügt wird. Löst sich allerdings eine solche Endgruppe, bevor die Synthese vollständig abgeschlossen ist oder löst sie sich nicht zwischen zwei Syntheseschritten, so ist es möglich, dass es unvollständige Aminosäuresequenzen gibt. Diese Fragmente könnten dann Oxazolion bilden;

dazu später mehr in Kapitel 5.2.4. Scheinbar bilden diese unvollständig synthetisierten Peptidstücke b/y-Fragmente und werden somit, wie in Abbildung 5.6(a) dargestellt, beobachtet. Ebenso ist es nicht auszuschließen, dass die Peptide auch bei der Lagerung und Handhabung Fragmente bilden. Die Intensitäten der Messungen nach der Bestrahlung (5.6(b)) sind etwa eine Größenordnung gegenüber der unbestrahlten Probe (5.6(a)) erhöht; die dargestellten Intensitäten in

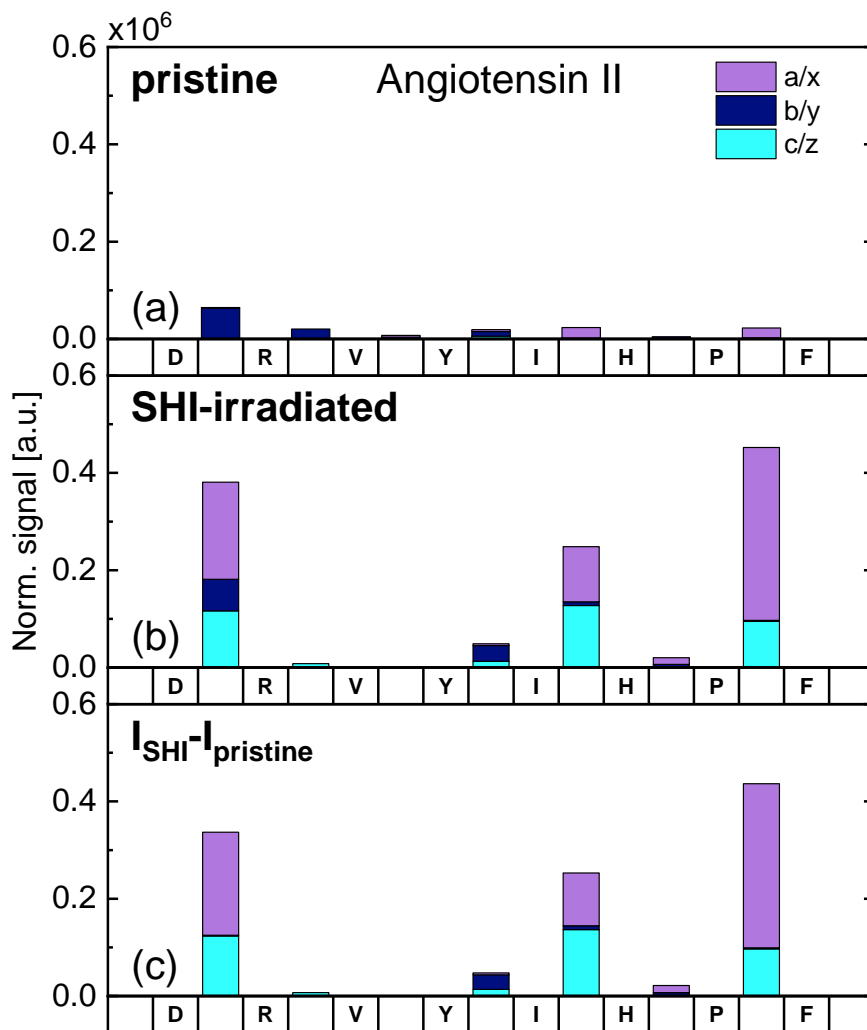


Abbildung 5.6: Darstellung aller Fragmentintensitäten von Angiotensin II, die entsprechenden Schnitten zugeordnet werden können. (a) Die Signalintensitäten der Fragmente vor der Bestrahlung, (b) nach der Bestrahlung mit SHI und (c) die Intensitäten aus (b) nach Abzug der Intensitäten aus (a). Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet.

5.6(b) und 5.6(c) ähneln sich entsprechend stark. Diese Vorgehensweise zur Berücksichtigung der vor der Bestrahlung vorhandenen Fragmente ist für alle im folgenden ausgewerteten Peptide dieselbe.

Die in Abbildung 5.6(c) gezeigten Intensitätsbeiträge lassen erkennen, dass die auftretenden Schnitte nicht gleichmäßig über die verfügbaren Peptidbindungen verteilt sind. Drei Schnittstellen treten besonders stark auf: Zwischen der Asparaginsäure (*D*) und Arginin (*R*), zwischen Isoleucin (*I*) und Histidin (*H*), sowie zwischen Prolin (*P*) und Phenylalanin (*F*). Neben der starken Selektivität lässt sich auch beobachten, dass a/x- und c/z-Fragmente gegenüber b/y-Fragmenten dominieren.

Im Folgenden sollen nun die selektiven Schnitte in Angiotensin II durch Austausch einzelner Aminosäuren auf ihre Ursache hin untersucht werden. Zuerst soll der Schnitt zwischen *D* und *R* näher betrachtet werden: In Abbildung 5.7 sind neben den Daten von Angiotensin II in (a) auch die Daten für die modifizierte Angiotensin-II-Moleküle Angiotensin A in (b) und [Sar¹]-Angiotensin II in (c) dargestellt. Auch hier zeigen sich drei auffällige Schnittpositionen und die Schnitte sind von a/x- und c/z-Schnitten dominiert. Im direkten Vergleich zwischen Angiotensin II und Angiotensin A in Abbildung 5.7(a) und (b) gibt es keine gravierenden Unterschiede. Die dominierenden Schnittpositionen sind die Gleichen, während die Verteilung der Schnittarten nur minimal verändert ist; die b/y-Fragmente sind stark unterdrückt. [Sar¹]-Angiotensin II in Abbildung 5.7(c) schließt sich mit den gleichen beobachtbaren Schnittpositionen der Reihe an. Die Schnitte sind von a/x- und c/z-Fragmenten dominiert, mit ein paar wenigen b/y-Schnitten. Alle drei in Abbildung 5.7 gezeigten Verteilungen, sind sich sehr ähnlich. Der Unterschied liegt bei diesen Peptiden ausschließlich in der ersten Aminosäure. Bei Angiotensin A wurde die N-terminale Asparaginsäure (*D*) durch ein Alanin (*A*) ersetzt. Somit besitzt Angiotensin A keinen sauren Rest, sondern eine zusätzliche, unreaktive Methylgruppe als Rest. Das [Sar¹]-Angiotensin II besitzt ebenso eine zusätzliche Methylgruppe statt der sauren Glutaminsäure. Während das Alanin eine Methylgruppe am α -C-Atom aufweist, hängt die Methylgruppe des Sarkosins direkt an der endständigen Aminogruppe; vergleiche Abbildung 2.5 und Abbildungen A.1/A.2. Es zeigt sich in beiden Fällen, dass hier das Entfernen des sauren Restes keine signifikante Auswirkung auf die Fragmentierung durch SHI hat. Zusätzlich scheint die Position der Methylgruppe, ob am α -C-Atom oder an der Aminogruppe, ebenso keinen Einfluss bei SHI-Bestrahlung mit sich zu bringen. Ein solcher Schnitt zwischen einer Asparaginsäure und einem Arginin ist aus CID-Messungen bekannt und kann im Rahmen des MPM erklärt werden,

vergleiche Kapitel 2.4.1. Der Vergleich mit den Daten aus aufgenommenen CID-Spektren folgt später in Kapitel 5.2.2.

Als nächstes wird der Schnitt zwischen *I* und *H* näher untersucht. Abbildung 5.8 stellt dazu die Daten für die Peptide Angiotensin II in 5.8(a), [Val⁵]-Angiotensin II in 5.8(b) und [Asn¹,Val⁵]-Angiotensin II in 5.8(c) gegenüber. Im Vergleich zum

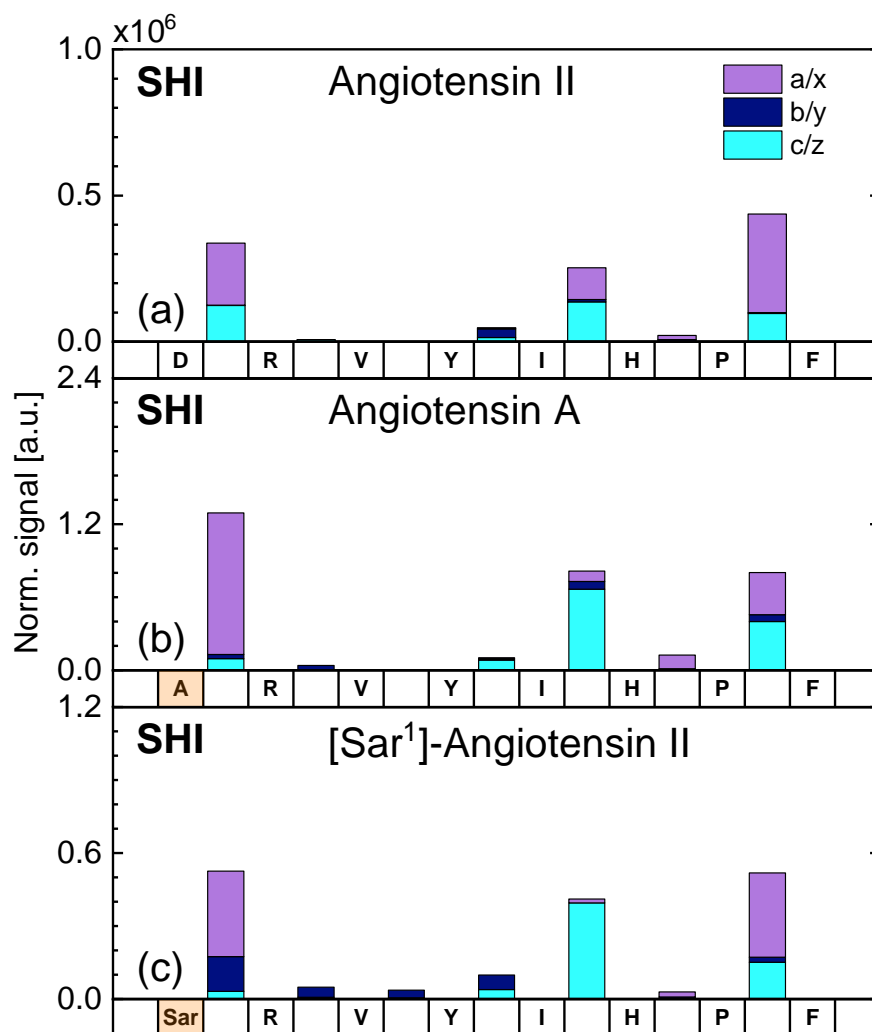


Abbildung 5.7: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten mittels SHI induzierter und DINEC-MS beobachteter Fragmente unterschiedlicher Peptide. Es werden die Daten für Angiotensin II in (a), Angiotensin A in (b) und [Sar¹]-Angiotensin II in (c) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet. In orange markiert sind die Aminosäuren, die sich von der Sequenz des Angiotensin II unterscheiden.

Angiotensin II ist bei [Val⁵]-Angiotensin II das Isoleucin (*I*) durch Valin (*V*) ersetzt. Beide Aminosäurereste sind unreaktive Alkane, deren Austausch auf die Fragmentierung per SHI keine Auswirkungen mit sich bringt: Der Vergleich der experimentellen Daten in Abbildung 5.8(a) und (b) zeigt kaum Unterschiede. Es werden die drei gleichen selektiven Schnitte beobachtet und die Zuordnung der

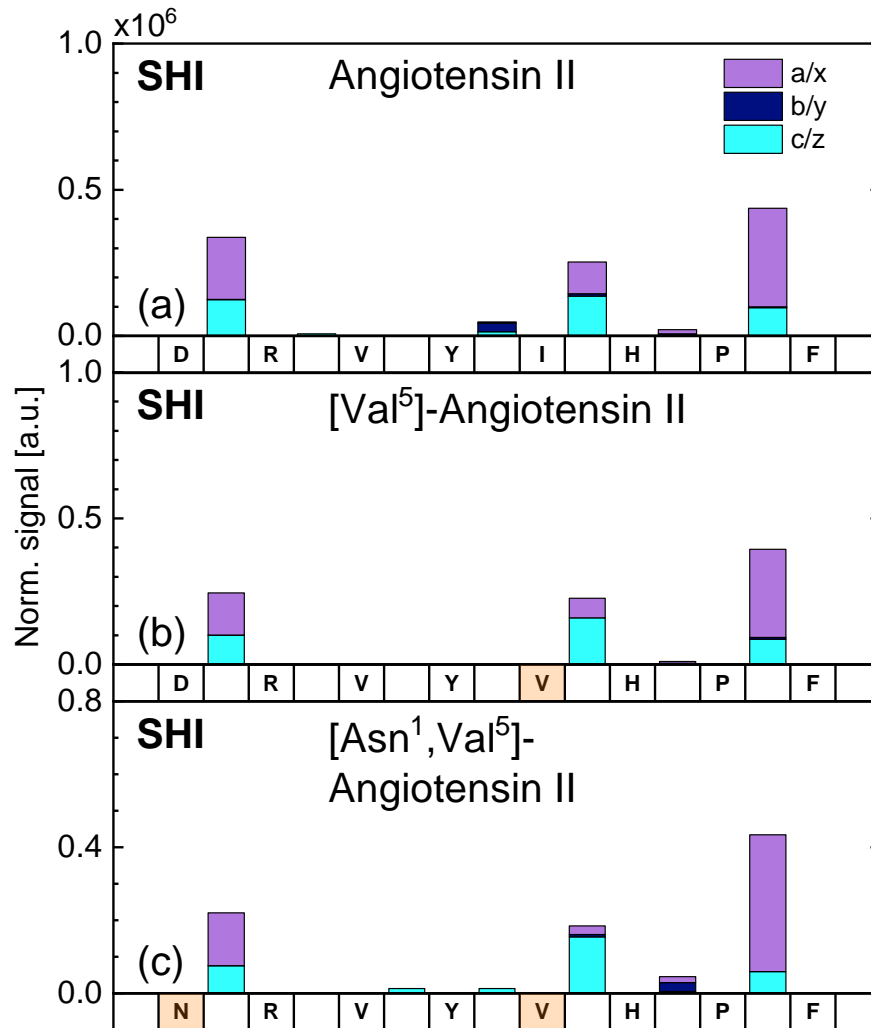


Abbildung 5.8: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten mittels SHI induzierter und DINEC-MS beobachteter Fragmente unterschiedlicher Peptide. Es werden die Daten für Angiotensin II in (a), [Val⁵]-Angiotensin II in (b) und [Asn¹Val⁵]-Angiotensin II in (c) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet. In orange markiert sind die Aminosäuren, die sich von der Sequenz des Angiotensin II unterscheiden.

Intensität der Schnittarten (a/x und c/z) bleibt ebenfalls konstant. In Abbildung 5.8(c) ist zusätzlich die Auswertung für [Asn¹,Val⁵]-Angiotensin II gezeigt. Neben dem Valin ist hier zusätzlich an N-terminaler Stelle statt der Asparaginsäure (D) ein Asparagin (N) vorzufinden. Asparagin weist als Rest eine Alkankette auf, die statt in einer Carboxylgruppe in einer Carbamoylgruppe endet; vergleiche hierzu Abbildung 2.5. Die damit einhergehende Änderung des Gesamtsystems hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Fragmentierung durch SHI.

Neben der Änderung durch das Austauschen einzelner Aminosäuren wurde auch die Auswirkung zusätzlicher Aminosäuren an Angiotensin II untersucht. Abbildung 5.9 zeigt neben Angiotensin II in 5.9(a) auch Angiotensin I in 5.9(b) und Angiotensinogen (1-14) in 5.9(c). Angiotensin I weist im direkten Vergleich zu Angiotensin II zwei zusätzliche Aminosäuren, Histidin (H) und Leucin (L), am

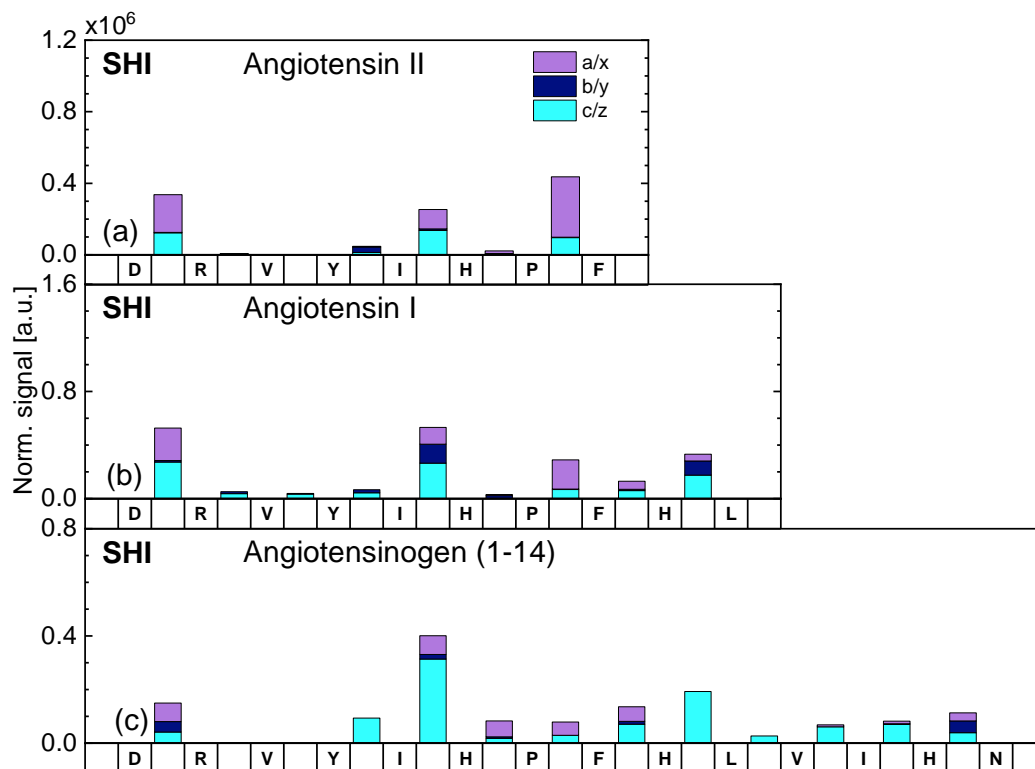


Abbildung 5.9: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten mittels SHI induzierter und DINEC-MS beobachteter Fragmente unterschiedlicher Peptide. Es werden die Daten für Angiotensin II in (a), Angiotensin I in (b) und Angiotensinogen (1-14) in (c) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet.

C-Terminus auf. Ein Vergleich von Angiotensin II in Abbildung 5.9(a) und Angiotensin I in Abbildung 5.9(b), zeigt, dass in beiden Fällen die Fragmente überwiegend aus a/x- und c/z-Fragmenten bestehen. Die in Angiotensin II zu beobachtenden selektiven Schnitte sind auch bei Angiotensin I dominant (*D-R*, *I-H* und *P-F*), während durch die zusätzlichen Aminosäuren auch *F-H*- und *H-L*-Schnitte beobachtet werden. Im Vergleich von Angiotensin II in Abbildung 5.9(a) und Angiotensinogen (1-14) in Abbildung 5.9(c) ist zu erkennen, dass insbesondere die Schnitte in der C-terminalen Hälfte ausgeprägter auftreten. Angiotensinogen (1-14) kann als Angiotensin I gesehen werden, das C-terminal durch ein Valin (*V*), Isoleucin (*I*), Histidin (*H*) und ein Asparagin (*N*) ergänzt ist. Die Schnitte des Angiotensinogen (1-14) ähneln denen des Angiotensin I. Auffällig ist der intensive Schnitt zwischen dem ersten *I-H*-Paar, der bei den weiteren Derivaten des Angiotensin II nicht der intensivitätsstärkste Bruch ist. Die zusätzliche Länge scheint stärker zu einer statistischen Verteilung der Fragmente zu führen.

Neben *längeren* Angiotensin-II-Derivaten wurde auch Alamandin untersucht, das kein terminales Phenylalanin (*F*) wie das Angiotensin II besitzt; die Peptidsequenz ist somit insgesamt um eine Aminosäure verkürzt und endet mit einem Prolin (*P*). Im Vergleich zu Angiotensin II weist das Alamandin wie das Angiotensin A statt der Asparaginsäure (*D*) ein Alanin (*A*) auf. Abbildung 5.10 zeigt in 5.10(a) die Fragmentverteilung für Angiotensin II und in 5.10(b) für Alamandin. Die Signalintensität der Fragmente des Alamandin sind in ihrer Verteilung stark an die des Angiotensin II angelehnt. Alle dominanten Schnitte des Angiotensin II sind, sofern möglich, auch bei Alamandin vertreten. Wie in Abbildung 5.7(b) gezeigt, hat eine Änderung der ersten Aminosäure zu einem Alanin keinen Einfluss auf die Selektivität der Schnitte. Das Verkürzen der Peptidsequenz auf sieben Aminosäuren des Alamandin bringt ebenfalls keine Änderung der auffälligen Schnitte mit sich. Die bei Angiotensin II dominanten Schnitte zwischen Prolin (*P*) und Phenylalanin (*F*) bilden bei Alamandin nun die terminalen Fragmente und lassen sich so nicht mehr dem Prolin zuordnen.

Neben den gezeigten Angiotensin-II-Derivaten wurden auch weitere, von Angiotensin II unabhängige Peptide untersucht. Abbildung 5.11 zeigt die normierten und summierten Signalintensitäten der Fragmente von Bradykinin in Abbildung 5.11(a), Substanz P in Abbildung 5.11(b) und Neurotensin in Abbildung 5.11(c). Diese Peptide weisen unterschiedliche Peptidsequenzen auf, die nur indirekt miteinander und mit anderen Peptiden vergleichbar sind. Die mit Arginin (*R*) versehenen Termini des Bradykinin in Abbildung 5.11(a) ermöglichen es theoretisch immer, alle Fragmente beobachten zu können, die durch einzel-

ne Schnitte entstanden sind. Bradykinin weist ähnlich zu Angiotensin II wenige, aber sehr selektive Schnitte auf: Für Fragmente, die durch Schnitte zwischen dem N-terminalen Arginin und dem nächstgelegenen Prolin (*P*), zwischen Phenylalanin (*F*) und Serin (*S*), sowie zwischen Phenylalanin (*F*) und dem C-terminalen Arginin (*R*) entstehen, sind intensive Signale zu beobachten. Bradykinin zeigt im Vergleich zu den Angiotensin-II-Derivaten deutlich mehr b/y-Fragment zwischen *F* und *S*; die c/z-Fragmente machen aber dennoch den Großteil der Gesamtintensität aus.

Substanz P in Abbildung 5.11(b) zeigt gegenüber Bradykinin eine deutlich niedrigere Selektivität in den beobachteten Schnitten. Es lassen sich kaum noch einzelne Schnitte besonders hervorheben, die sich von den unmittelbar angrenzenden unterscheiden. Nur der Schnitt zwischen den zentralen Glutaminen-Einheiten (*Q*) ist unterdrückt.

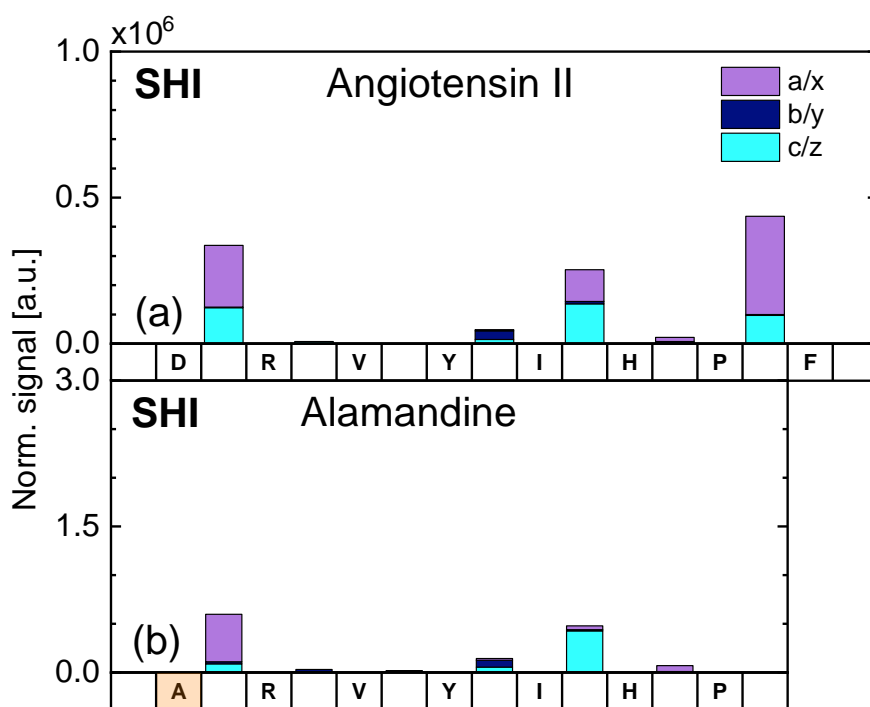


Abbildung 5.10: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten mittels SHI induzierter und DINEC-MS beobachteter Fragmente unterschiedlicher Peptide. Es werden die Daten für Angiotensin II in (a) und Alamandine in (b) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet. In orange markiert sind die Aminosäuren, die sich von der Sequenz des Angiotensin II unterscheiden.

Eine ebenfalls weitgehend statistische Verteilung zeigt Neurotensin in Abbildung 5.11(c): Es sind Fragmente an allen Schnittpositionen zu beobachten; leicht erhöhte Intensitäten im Gegensatz zum direkten Umfeld lassen sich jeweils N-terminal zu Leucin (*L*) erkennen. Auch die Schnitte zwischen Glutaminsäure (*E*) und Asparagin (*N*), sowie zwischen den zentralen Argininen (*R*) sind erhöht.

Um den Einfluss der Peptidlänge noch weiter zu untersuchen wurde das *Leu*-Enkephalin mit nur fünf Aminosäure-Einheiten, sowie Dynorphin B, das mit der gleichen Aminosäuresequenz beginnt, gewählt. Die beobachteten Intensitäten der Schnitte in *Leu*-Enkephalin und Dynorphin B werden in den Abbildungen 5.12(a) und (b) dargestellt.

Dynorphin B (1-9) zeigt kaum b/y-Fragmente und weist zwei Arginin-Einheiten (*R*) auf. Sowohl das Mutterion, als auch die Fragmente können einen basischen

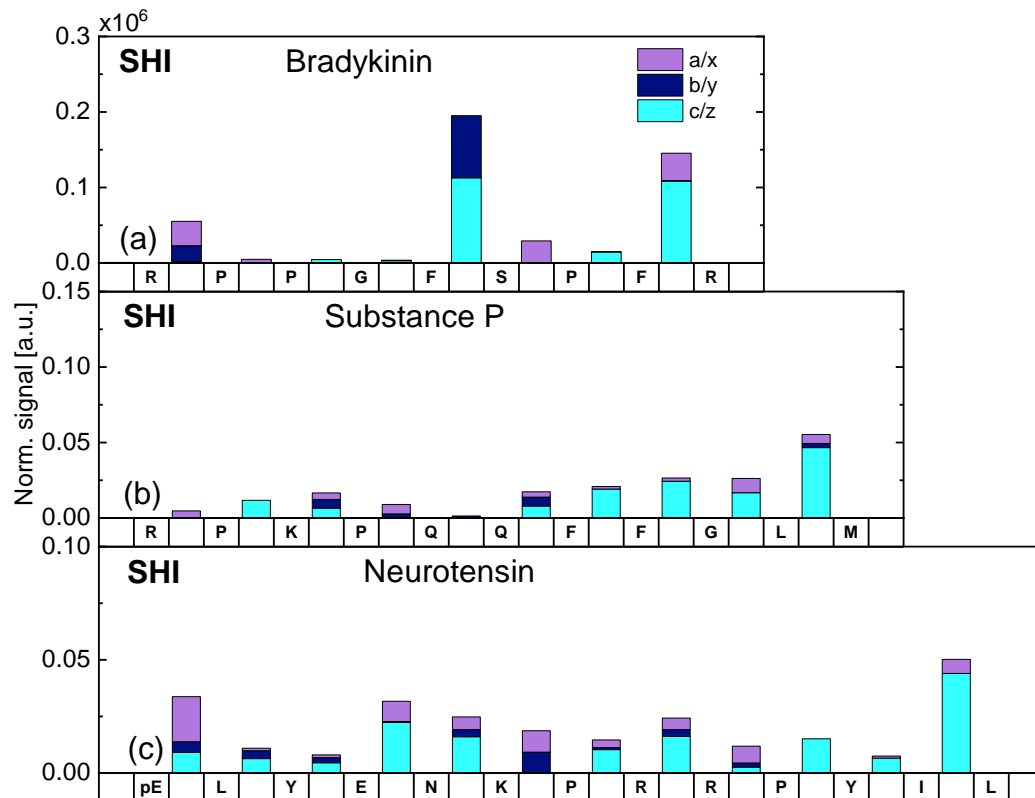


Abbildung 5.11: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten mittels SHI induzierter und DINEC-MS beobachteter Fragmente unterschiedlicher Peptide. Es werden die Daten für Bradykinin in (a), Substanz P in (b) und Neurotensin in (c) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet.

Rest besitzen, der gut ionisiert werden kann und so die Detektion der Fragmente unterstützt. Die Schnitte zwischen Tyrosin (Y) und Glycin (G), sowie Phenylalanin (F) sind dominant. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Substanz P in Abbildung 5.11. Hier konnten ebenfalls Fragmente zwischen F, G und L beobachtet werden. Trotz gleichem Sequenzbeginn mit den ersten fünf Aminosäuren, lassen sich Unterschiede zwischen *Leu*-Enkephalin und Dynorphin B (1-9) erkennen, vergleiche Abbildung 5.12(a): *Leu*-Enkephalin besitzt keinen basischen Rest und ist somit schlechter ionisierbar als das vergleichbare Dynorphin B. Dadurch ist auch die Intensität des Mutterions, wie auch der Fragmente stark limitiert. Die entstandenen Fragmente sind deshalb eventuell nicht mittels DINEC-MS zu beobachten. Ein paar wenige beobachtete Fragmente sind allerdings nach der SHI-Bestrahlung auf alle verfügbaren Schnittpositionen gleich verteilt. Der beobachtete Anteil an b/y-Fragmenten ist hier für eine mit SHI bestrahlte Probe vergleichsweise hoch. Diese Änderung der dominierenden Fragmentarten könnte auf eine geringe Desorptions- und Ionisationswahrscheinlichkeit zurückgeführt werden. Ein geringer Anteil an b/y-Fragmenten ist immer zu beobachten; sollte

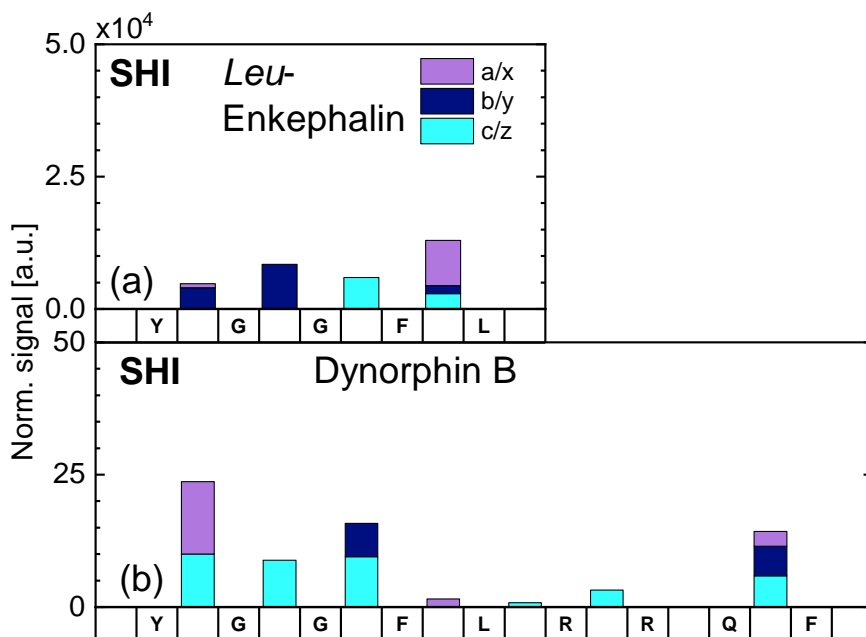


Abbildung 5.12: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten mittels SHI induzierter und DINEC-MS beobachteter Fragmente unterschiedlicher Peptide. Es werden die Daten für *Leu*-Enkephalin in (a) und Dynorphin B in (b) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet.

diese eine andere Ionisationseffizienz haben als andere Fragmentensorten, könnte dies in diesem Fall zur Verschiebung der Verteilung führen.

Werden zusammenfassend SHI-induzierte Schnitte nach a/x, b/y und c/z getrennt, aber über alle Positionen gemittelt aufgetragen, wird Abbildung 5.13(a) erhalten. Jedes betrachtete Peptid trägt hier den gleichen Beitrag entsprechend der Schnittart bei. Endständige Schnitte, die keiner echten Peptidbindung entsprechen, wurden nicht mit einbezogen. Im Vergleich dazu ist die Verteilung der Schnittintensitäten aus einem CID-Experiment in Abbildung 5.13(b) dargestellt. Im direkten Vergleich aller entstandenen Fragmente von SHI und CID-induzierter Fragmente sind deutliche Unterschiede zu erkennen: Bei SHI-induzierter Fragmentierung werden nur wenige b/y-Fragmente beobachtet (8%), während große Signalintensitäten der a/x- und c/z-Fragmente stark beobachtet werden. Dagegen werden bei CID (Abbildung 5.13(b)) hauptsächlich b/y-Fragmente induziert (61%). Ebenso ist bei CID die Fragmentierung mittels a/x-Schnitt mit 10% sehr niedrig. c/z-Schnitte sind hingegen bei beiden Fragmentierungsarten unter allen Schnitten mit 30% (CID) und 31% (SHI) annähernd gleich stark vertreten. SHI-induzierte Fragmente in Abbildung 5.13(a) resultieren in 8% b/y-Fragmente, während die a/x-Schnitte mit 61% dominieren. Dieser deutliche Unterschied der beobachteten Fragmentart kann auf unterschiedliche Fragmentationsmechanis-

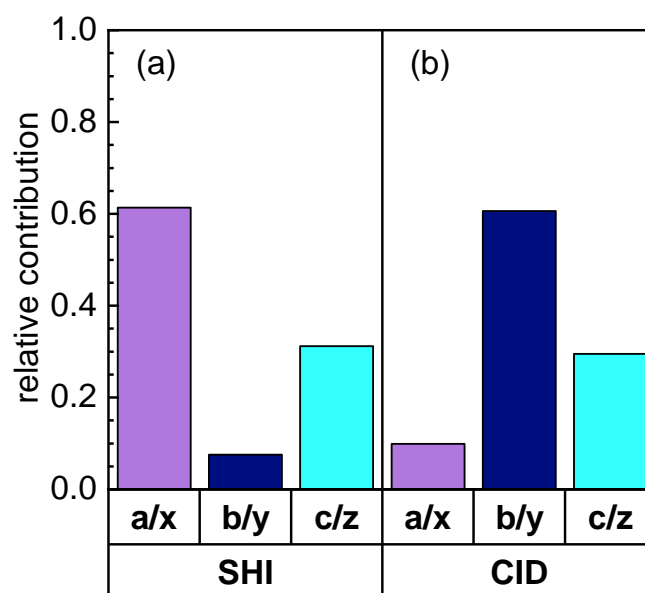


Abbildung 5.13: Nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren getrennte Darstellung der Summe aller auf die Probenanzahl normierter Intensitäten der mittels (a) SHI- und (b) CID-induzierten Schnitte für alle betrachteten Peptide.

men zurückgeführt werden. In der Tat erfolgt die Fragmentierung bei Bestrahlung mittels SHI und bei CID bei sehr unterschiedlichen Energien, sodass ein Vergleich der Prozesse vielleicht zuerst verwundert. Allerdings legen die spezifischen Schnitte und die hohe Selektivität diesen Vergleich doch nahe, der in Abschnitt 5.2.2 auch für CID hinsichtlich der Schnittpositionen durch geführt werden soll.

Auch der Vergleich mit weiteren Fragmentationsmethoden zeigt keine vergleichbare Übereinstimmung der Schnittarten mit den bei SHI-induzierten Fragmenten. Wird die Fragmentation durch die Aufnahme von Elektronen induziert (engl.: **e**lectron-**c**apture **d**issociation, kurz: ECD oder engl.: **e**lectron-**t**ransfer **d**issociation, kurz: ETD), so werden, neben vereinzelt b-/y-Fragmenten, deutlich bevorzugt c/z-Fragmente beobachtet [225–229]: Ein zusätzlich aufgenommenes Elektron befindet sich bevorzugt an Kohlenstoffen der Ketongruppen im Peptidrückgrat [227, 228]. Daraus resultiert ein Bindungsbruch zwischen dem angrenzenden Amin und dem darauffolgenden α -Kohlenstoff und damit in einer hohen Anzahl an c-/z-Fragmenten [228, 229]. Eine Selektivität hinsichtlich der Position im Peptid wurde nicht in gleichem Maße wie für SHI oder CID beobachtet [229].

Des Weiteren wurde bei rein thermischer Anregung fast ausschließlich b/y-Fragmente für die Peptide Angiotensin I, Angiotensin II, Bradykinin, Substanz P und *MRFA* beobachtet [230, 231]. In den Spektren dieser thermisch fragmentierten Peptide wurden b/y-Fragmente mit hoher Selektivität hinsichtlich der Position in der Aminosäuresequenz detektiert [230, 231]; beispielsweise zeigt Angiotensin II fast ausschließlich den *D-R*-Schnitt als y_7 -Fragment und weist damit eine starke Ähnlichkeit mit der Fragmentierung einer mittels CID fragmentierten Probe auf, wie sie im folgenden Kapitel ausführlich diskutiert wird [231]. Damit kann auch ein möglicher Nebeneffekt einer thermischen Anregung der Peptidfilme bei der SHI-Bestrahlung ausgeschlossen werden, da hierbei kaum b/y-Fragmente beobachtet werden.

5.2.2 Vergleich mit den Schnittpositionen bei CID-induzierter Fragmentierung

Da sowohl CID als auch SHI-induzierte Fragmentierung eine hohe Selektivität der spezifischen Schnitte zeigt, wurden zusätzlich zum Vergleich der Schnittarten in Abbildung 5.13 auch bei CID die einzelnen Schnittpositionen verglichen. An ausgewählten Beispielen werden Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen der SHI-induzierten Fragmentierung und der kollisionsinduzierten Fragmentierung in Bezug auf die Schnittposition und den Einfluss benachbarter Aminosäuren aufgezeigt. In Anhang C werden alle, mittels CID erzeugten, Daten vollständig, einschließlich der nicht diskutierten terminalen Schnitten, gezeigt.

Ein typisches Massenspektrum einer mittels CID fragmentierten Angiotensin-II-Probe ist in Anhang C in Abbildung C.1 dargestellt. Abbildung 5.14(b) zeigt die daraus identifizierten Fragmente und Abbildung 5.14(a) zeigt im Vergleich die Schnittintensitäten einer Angiotensin-II-Probe, die mittels SHI bestrahlt wurde. Deutlich erkennbar ist bei CID die Dominanz der dunkelblau dargestellten b/y-Fragmente gegenüber den anderen Schnittarten. Der Schnitt zwischen der Asparaginsäure (*D*) und Arginin (*R*) dominiert stark, ebenso der im MPM erwartete Schnitt zwischen Histidin (*H*) und Prolin (*P*). Durch das Verändern der Aminosäuresequenz des Angiotensin II lassen sich die Schnitte manipulieren. Angiotensin A in Abbildung 5.14(c) und (d) weist statt einer Asparaginsäure (*D*) eine Aminosäure ohne funktionellen Rest am N-Terminus auf; der saure Rest der Aminosäure wurde durch eine Methylgruppe am α -C-Atom ersetzt. Da der N-terminale Schnitt von Arginin durch das Entfernen der Asparaginsäure im CID-Spektrum nicht mehr beobachtet werden kann, kann der selektive Schnitt an dieser Position einer Interaktion der sauren Asparaginsäure mit Arginin zugeordnet werden. Alle weiteren Schnitte unterscheiden sich zwischen Angiotensin II in Abbildung 5.14(a) und (b) und Angiotensin A in Abbildung 5.14(c) und (d) kaum. Das gleiche Verhalten kann für [Sar¹]-Angiotensin II, [Val⁵]-Angiotensin II und [Asn¹,Val⁵]-Angiotensin II beobachtet werden (vergleiche Abbildung C.2 und C.3); der Austausch der sauren Aminosäure zu einer Aminosäure neutralem Charakters führt dazu, dass der Schnitt bei Arginin im CID nicht mehr zu beobachten ist. Darüber hinaus hat auch die Länge des Angiotensin-II-Derivats keinen merklichen Einfluss auf die Fragmentierung an dieser Position (Abbildung C.4 und C.5).

Die Analyse der mittels SHI-Bestrahlung induzierten Fragmente in Kapitel 5.2.1 hat gezeigt, dass bei Angiotensin-II-Derivaten die saure Asparaginsäure nicht für

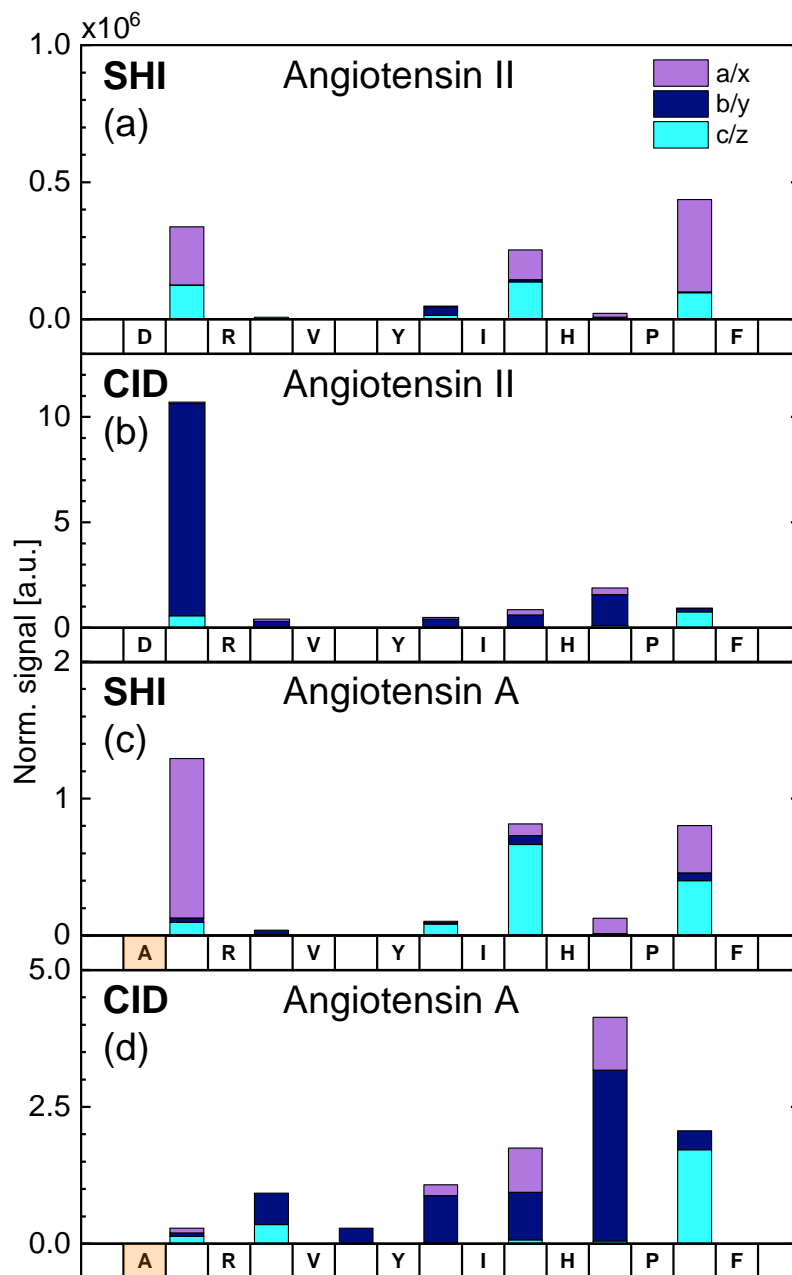


Abbildung 5.14: Darstellung der Schnittintensitäten nach Fragmentierung mittels SHI ((a)/(c)) und CID ((b)/(d)), die entsprechenden Schnitten zugeordnet werden können. Es werden die Daten aus DINEC-Spektren für Angiotensin II in (a) und (b), sowie für Angiotensin A in (c) und (d) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet. In orange markiert sind die Aminosäuren, die sich von der Sequenz des Angiotensin II unterscheiden.

den intensiv beobachteten Schnitt zwischen Asparaginsäure und Arginin verantwortlich ist, da auch bei Austausch der Asparaginsäure dieser Schnitt dominant ist (vergleiche Abbildung 5.14(a) und (c)). Bei CID hingegen lässt sich eine klare Abhängigkeit des Schnittes zwischen Asparaginsäure und Arginin beobachten. Dies kann im Rahmen des MPM darauf zurückgeführt werden, dass das Proton der Asparaginsäure im Peptid delokalisiert werden kann. Der verbliebene Asparaginsäure-Rest kann dann durch einen nucleophilen Angriff am Peptidrückgrat zu den beobachteten b/y-Fragmente führen [124]. Trotz der beobachteten Ähnlichkeiten hinsichtlich spezifischer und selektiver Schnitte bei SHI und CID scheinen die zugrundeliegenden Anregungsmechanismen demnach doch deutlich unterschiedlich zu sein.

Dies wird auch beim Vergleich der Peptide, die nicht den Angiotensin-II-Derivaten zugeordnet werden, deutlich: Bradykinin nach CID (5.15(b)) weist zwischen dem N-terminalen Arginin (R) und Prolin (P) einen spezifischen Schnitt mit hoher Intensität auf. Dieser passt zum Prolin-Effekt, der sich aus der hohen Protonenaffinität des Prolin-Amids ergibt [155, 169]. Umgekehrt wurde beobachtet, dass

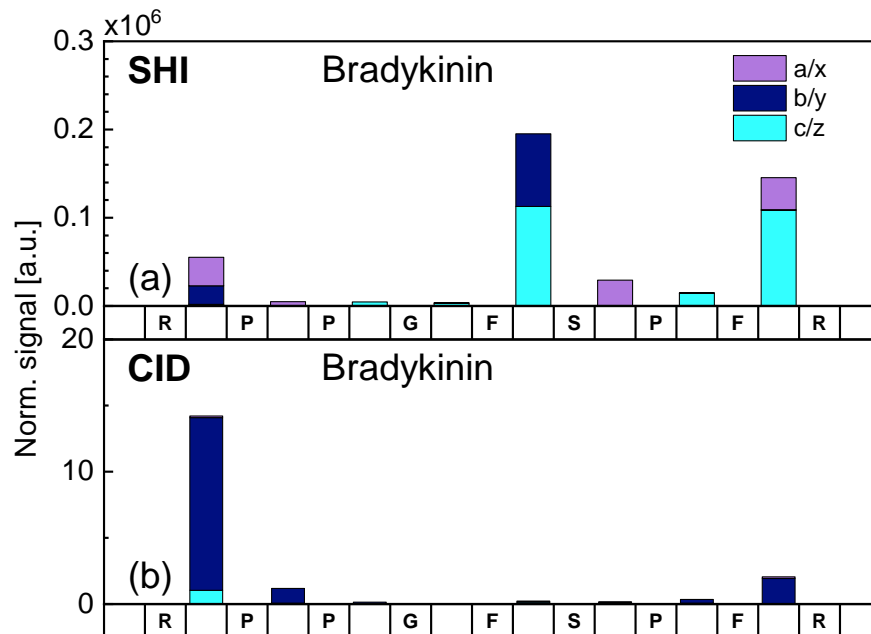


Abbildung 5.15: Darstellung der Schnittintensitäten von Bradykinin nach Fragmentierung mittels SHI (a) und CID (b), die entsprechenden Schnitten zugeordnet werden können. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet.

Sequenzen mit zwei aufeinanderfolgenden Prolin-Einheiten den Schnitt zwischen den Prolin-Einheiten unterdrücken können [168]. Diese veröffentlichte Beobachtung kann auch hier an den Daten des Bradykinin bestätigt werden. Ein direkter Vergleich mit den Daten aus mit SHI bestrahlter Proben zeigt deutliche Unterschiede. Die Schnitte zwischen Phenylalanin (*F*) und Serin (*S*) sowie Phenylalanin (*F*) und Arginin (*R*) sind bei CID nicht zu beobachten, vergleiche Abbildung 5.15. Bei CID beobachtete Schnitte von Substanz P und Neurotensin weisen gegenüber der SHI-induzierten Fragmentierung ebenfalls deutliche Unterschiede in der Verteilung der Schnittart auf, auch wenn die Selektivität in beiden Fällen reduziert ist, vergleiche Abbildung 5.16, C.6 und C.7.

Abschließend lässt sich also zusammenfassen, dass trotz einiger auf den ersten Blick überraschenden Ähnlichkeiten in der Selektivität der Schnitte in SHI und CID den beiden Fragmentierungsarten höchstwahrscheinlich sehr unterschiedliche Prozesse zugrunde liegen. Dies wird durch die Art der beobachteten Schnitte (*a/x*, *b/y*, *c/z*) weiter unterstützt, die für CID und SHI sehr unterschiedlich ist (Abbildung 5.13). Eine mögliche Erklärung für die bisherigen Beobachtung ist, dass mittels SHI höher aktivierte Prozesse mit *a/x*- und *c/z*-Schnitten adressiert werden können, die dennoch, zum Beispiel aufgrund der Struktur des Peptids, eine hohe Selektivität aufweisen.

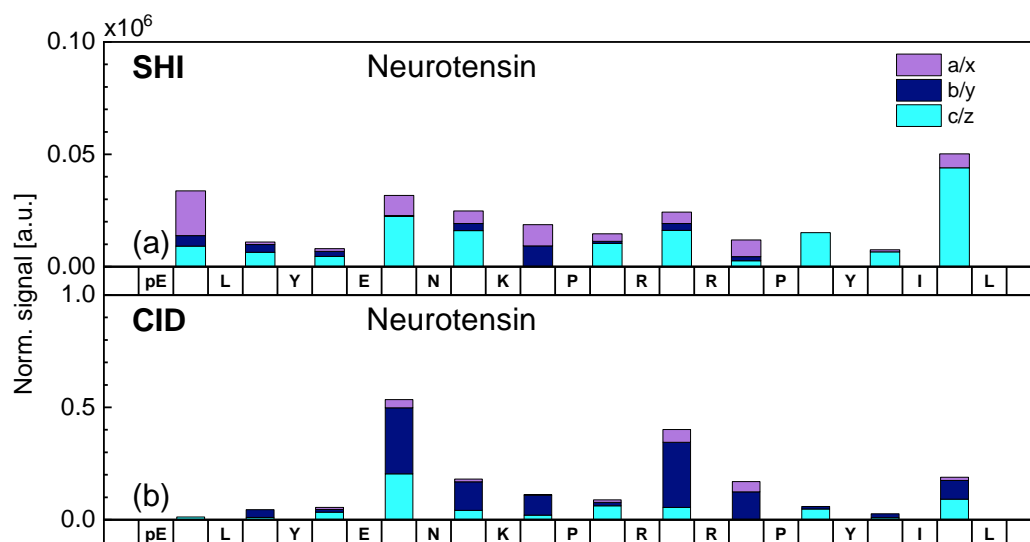


Abbildung 5.16: Darstellung der Schnittintensitäten von Neurotensin nach Fragmentierung mittels SHI (a) und CID (b), die entsprechenden Schnitten zugeordnet werden können. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (*a/x*, *b/y*, *c/z*) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet.

5.2.3 Fragmentierung in Abhängigkeit der Ionenart

Auch die Primärionen selbst, insbesondere durch den unterschiedlichen Energieverlust im Bragg-Peak, könnten einen Einfluss auf das Fragmentationsverhalten der Peptide haben. Um dies zu untersuchen, wurde Angiotensin II mit drei verschiedenen Ionenarten bestrahlt: In Abbildung 5.17 werden die Fragmentintensitäten für Proben, die mit $^{197}\text{Au}^{26+}$ in (a), $^{48}\text{Ca}^{10+}$ in (b) und $^{56}\text{Fe}^{3+}$ in (c) bestrahlt wurden, gezeigt. Die wichtigen Parameter, insbesondere auch der Energieverlust im Gleichgewichtsladungszustand, sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die Werte für dE/dx in Tabelle 3.2 wurden mit dem SRIM-2013 Softwarepaket simuliert und beziehen sich auf ein Material mit einer Zusammensetzung, die dem Peptid Angiotensin II entspricht [78, 79], vergleiche Kapitel 2.2. Die durch $^{197}\text{Au}^{26+}$ - und $^{48}\text{Ca}^{10+}$ -Ionen induzierten Fragmente ähneln sich stark; die häufigsten Fragment-schnitte sind in ihrer Position in der Peptidsequenz identisch. Bei der Bestrahlung mit $^{48}\text{Ca}^{10+}$ -Ionen sind etwas mehr b/y-Fragmente zu beobachten; dennoch sind wie auch bei der Bestrahlung mit $^{197}\text{Au}^{26+}$ -Ionen die c/z- und a/x-Fragmente dominierend. Durch die Bestrahlung mit $^{48}\text{Ca}^{10+}$ -Ionen sind die Schnitte, welche bei den mit $^{197}\text{Au}^{26+}$ -Ionen bestrahlten Proben stark unterdrückt sind, etwas stärker zu beobachten; die Schnitte bei *R-V* und *H-P* werden im Vergleich zu den anderen Schnitten intensiver. Die Unterschiede sind insgesamt aber gering. Dies weist auf einen gleichen Anregungsmechanismus bei der Bestrahlung mit diesen zwei Ionensorten hin. Diesen Ergebnissen steht die Bestrahlung mit $^{56}\text{Fe}^{3+}$ -Ionen gegenüber. Hier ist ein intensiver Schnitt zwischen Valin (V) und Tyrosin (Y) zu erkennen. Dieser Schnitt ist bei keiner anderen Betrachtung intensiv aufgetreten, wenn er überhaupt zu beobachten war. Der sonst typische *I-H*-Schnitt wiederum ist in dieser Betrachtung relativ klein und scheint unterdrückt. Die Bestrahlung mit $^{56}\text{Fe}^{3+}$ -Ionen fällt aus dem sonst bekannten Muster bei Angiotensin-II-Proben heraus. Für alle drei untersuchten Ionenarten gilt, dass ihr Ladungszustand beim Auftreffen auf die Probenoberfläche vergleichsweise weit vom ihrem Gleichgewichtsladungszustand in Materie entfernt ist und sich ihr Ladungszustand im weiteren Verlauf noch erhöht. Allerdings beträgt die Peptidfilmdicken, die bei der Messung mittels DINEC-MS nach der Ionenbestrahlung abgetragen werden, nur ungefähr 2 nm [42]. Simulationen mit dem Programm ETACHA4 für einen 2 nm dicken Kohlenstofffilm haben ergeben, dass für $^{197}\text{Au}^{26+}$ - und $^{48}\text{Ca}^{10+}$ -Ionen die Ladungszustände um maximal $\Delta q = +2$ erhöht auftreten, der Großteil der Gold- und Calcium-Ionen behält auf dieser Strecke den ursprünglichen Ladungszustand bei [232, 233]. $^{56}\text{Fe}^{3+}$ -Ionen hingegen zeigen eine breitere Ladungsverteilung nach

dem Durchlaufen der Testschicht von 2 nm Dicke, die sich bei einer Durchschnittsladung von 4+ bis zum Ladungszustand 8+ erstreckt. Es kommt also zu einer verstärkten Umladung der $^{56}\text{Fe}^{3+}$ -Ionen, die eventuell die Fragmentierung beeinflussen könnte.

Die Bestrahlung mit $^{56}\text{Fe}^{3+}$ -Ionen hat sich gegenüber anderer Primärionen aber auch insbesondere in der Handhabung als schwieriger erwiesen: Nach der Ionenbestrahlung, wurde eine erhöhte Restaktivität der Probenhalter beobachtet. Zu-

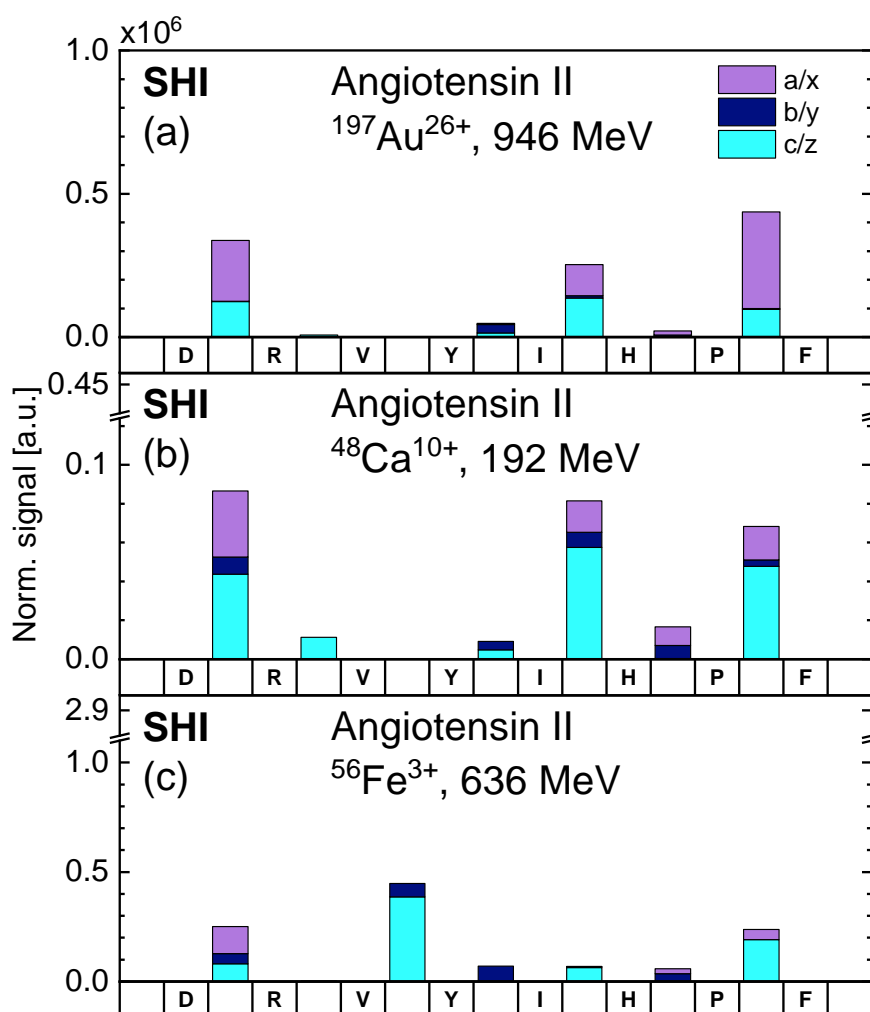


Abbildung 5.17: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten von Angiotensin II, die mittels SHI induzierter und DINEC-MS nach SHI Bestrahlung beobachtet wurden. Die untersuchten Primärionen sind: (a) $^{197}\text{Au}^{26+}$ (4,8 MeV/u, 946 MeV), (b) $^{48}\text{Ca}^{10+}$ (4,8 MeV/u, 192 MeV), (c) $^{56}\text{Fe}^{3+}$ (11,4 MeV/u, 636 MeV). Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet.

sätzlich zur kontrollierten Bestrahlung mit SHI-Ionen waren diese Proben somit noch einer zusätzlichen, unkontrollierten Dosis an γ - und β -Strahlung ausgesetzt. Trotz der unkontrollierten Bestrahlung wurden diese Daten an dieser Stelle in die Auswertung mit aufgenommen.

Abbildung 5.18 zeigt die Wirkungsquerschnitte der Peptide Bradykinin, Neurotensin und Angiotensin II für Bestrahlungen mit $^{48}\text{Ca}^{10+}$ - und $^{197}\text{Au}^{26+}$ -Ionen (vergleiche Abbildung 5.4).

Die Wirkungsquerschnitte wurden der kinetischen Energie der verwendeten Ionenart zugeordnet und doppelt logarithmisch aufgetragen. Für jedes Peptid ergeben sich somit zwei Datenpunkte, deren Verhältnis durch die Steigung der Geraden, die sie verbindet, repräsentieren lässt. Es fällt auf, dass die Geraden für alle drei Peptide eine ähnliche Steigung aufweisen. Dies zeigt, dass die Wirkungsquerschnitte unterschiedlicher Peptide mit dem Energieverlust des Primärions vergleichbar skalieren. Dies legt einen vergleichbaren Anregungsmechanismus für alle drei Peptide bei SHI-Bestrahlung nahe.

Formuliert man die Parameter der Geraden aus der doppelt-logarithmisch Auftragung in eine Potenzfunktion der Form $\sigma = a \cdot (dE/dx)^n$ um, so ergibt sich für die betrachteten Peptide $n = 0,55 - 0,58$. Ein Vergleich der für Glycin experimentell bestimmten Steigung der Wirkungsquerschnitte zu Energieverlust

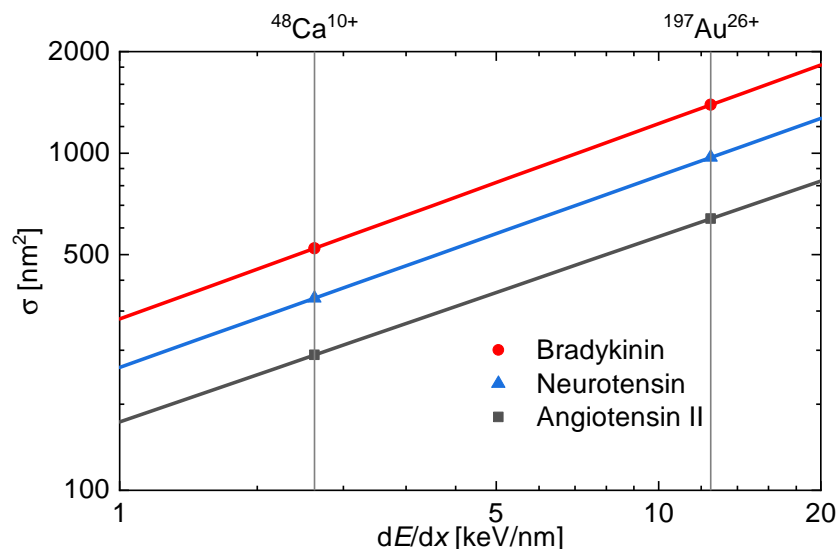


Abbildung 5.18: Wirkungsquerschnitte der SHI-induzierten Fragmentierung dreier Peptide in Abhängigkeit des Energieverlustes der entsprechenden Primärionen. Die Datenpunkte wurden zusätzlich mit einer Geraden verbunden. Die gleiche Steigung der Geraden deutet auf den gleichen Anregungsmechanismus durch SHI-Bestrahlung in den unterschiedlichen Peptiden hin.

($n_{\text{Gly}} \approx 0,5$) zeigt, dass sowohl einzelne Aminosäuren, als auch Aminosäuresequenzen vergleichbar auf eine Änderung des Energieverlustes des einfallenden Ions reagieren [234]. Für $^{56}\text{Fe}^{3+}$ liegt nur für Bradykinin ein auswertbarer Datensatz vor. Der dabei ermittelte Wirkungsquerschnitt ist bei vergleichbarem Energieverlust deutlich höher als für $^{48}\text{Ca}^{10+}$, was ebenfalls für einen abweichenden Prozess im Falle der $^{56}\text{Fe}^{3+}$ -Ionen spricht.

5.2.4 Folge- und Nebenreaktionen nach MeV-Ionen-Beschuss

Bei der Analyse der Fragmente in Spektren von Proben, die mit MeV-Ionen bestrahlt wurden, sind in einzelnen Fällen spezifische Fragmente mit einer Massendifferenz von $\Delta(m/z) = +2$ bezüglich der erwarteten Fragmente beobachtet worden. Abbildung 5.19 zeigt Massenspektren von Angiotensin II und Bradykinin, in denen solche zusätzliche Fragmente zu erkennen sind. Bei beiden Peptiden sind Peaks spezifischen Fragmenten zuzuordnen, die genau der nominellen Masse dieser Fragmente entsprechen. Ebenso treten vereinzelt Peaks auf, die der nominellen Masse von spezifischen Fragmenten $\Delta(m/z) = +2$ entsprechen. Diese zusätzliche Masse wird einer zweifachen Aufnahme von Wasserstoffatomen zugeordnet. Als Beispiel sind die Isotopenmuster für das b_6 -Fragment von Angiotensin II in Abbildung 5.19(b) und das b_8 -Fragment von Bradykinin in Abbildung 5.19(d) zusammen mit der entsprechenden Simulation des Fragmentmusters dargestellt. Bei Angiotensin II in Abbildung 5.19(b) ist keine Weiterreaktion des b_6 -Fragments zu erkennen. Die b_8 -Fragmente des Bradykinin in Abbildung 5.19(d) hingegen können sowohl weiterreagiert, als auch ohne Weiterreaktion beobachtet werden. Diese b-Fragmente werden zwar in SHI-bestrahlten Proben nur in geringem Maße beobachtet, sind aber aktuell in der Literatur am besten beschrieben. Eine mögliche Abreaktion eines b-Fragments ist ein intramolekularer Ringschluss, bei dem aus einem Acyliumion ein Oxazoloniumion gebildet wird [235]; hierbei würde sich die Masse des Moleküls nicht ändern. Erfolgt die Weiterreaktion allerdings durch die Aufnahme von zwei Wasserstoffen, so erhöht sich die Masse des abgesättigten Acyliumions um $\Delta(m/z) = +2$. Es kann also offensichtlich zu unterschiedlichen Weiterreaktionen, selbst in ein und demselben Peptid kommen. Aus den bisherigen Experimenten ist nicht klar, welche Parameter die eine oder andere Reaktion bevorzugt. Da die Proben nach der Bestrahlung mit MeV-Ionen an Atmosphäre transportiert wurden, kann es sein, dass auch im Kontakt mit Atmosphäre eine Weiterreaktion initiiert wurde.

Da die Fragmente und ihre mit Wasserstoffen weiterreagierten Spezies dem gleichen Schnitt zugeordnet werden können, wurden die Fragmentintensitäten dieser für die Analyse in dieser Arbeit aufsummiert.

5.2.5 Weiterführende Experimente mit ausgewählten Aminosäuresequenzen

Für eine Weiterführung der Untersuchung der durch MeV-Ionen induzierten Fragmentation sollen an dieser Stelle vielversprechende Aminosäuresequenzen vorgestellt werden. Die Analyse der Derivate von Angiotensin II hat gezeigt, dass

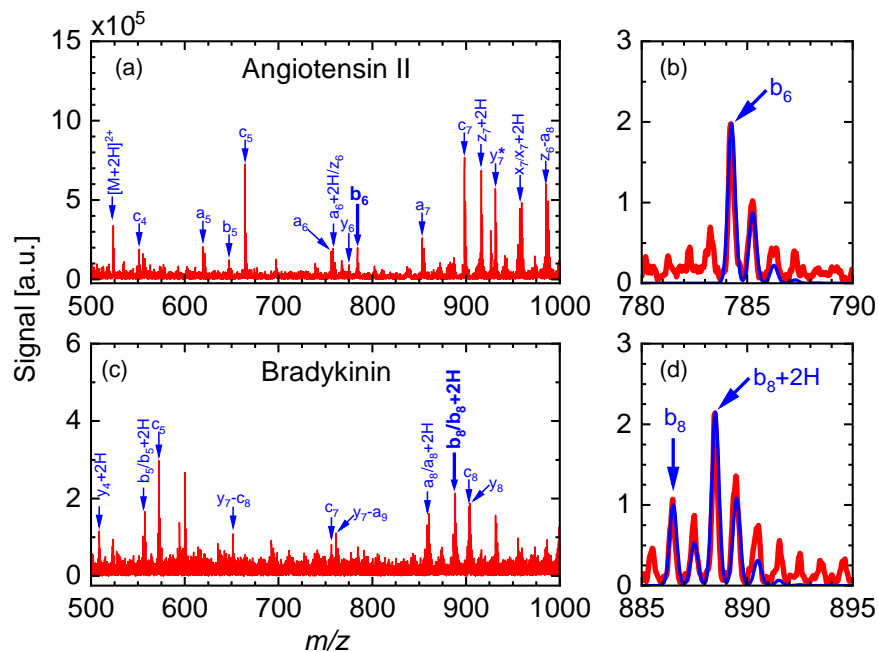


Abbildung 5.19: (a) Spektrum einer mit Goldionen (946 MeV) bestrahlten Angiotensin-II-Probe. Die spezifischen Fragmente wurden entsprechend ihrer Zuordnung benannt. Fragmente, die durch zwei Schnitte entstanden sind, wurden entsprechend der zwei Schnittpositionen im Ausgangsmolekül bezeichnet. Das doppelt protonierte Monomer $[M+2H]^+$ ist ebenfalls zu beobachten. Das Isotopenmuster des Fragments b_6 (fett) ist in (b) vergrößert dargestellt. (b) Isotopenmuster des b_6 -Fragments aus (a). (c) Spektrum einer mit Goldionen (946 MeV) bestrahlten Bradykinin-Probe. Die spezifischen Fragmente wurden entsprechend ihrer Zuordnung benannt. Das Fragment b_8/b_8+2H (fett) ist in (d) vergrößert dargestellt. (d) Isotopenmuster des b_8 -Fragments mit und ohne zusätzlicher Wasserstoffe. Der Vergleich zwischen Angiotensin II und Bradykinin zeigt unterschiedliche Möglichkeiten der Folgereaktionen von b-Fragmenten.

Tabelle 5.1: Auflistung möglicher Angiotensin-II-ähnlicher Peptide, die zur weiteren systematischen Untersuchung des Einflusses einer Aminosäure auf die benachbarten Schnitte vorteilhaft wären. Erweiterungen, die nicht im ursprünglichen Angiotensin II vorhanden sind, sind grün gekennzeichnet, vertauschte Aminosäuren sind rot eingefärbt und in blau werden einzelne ausgetauschte Aminosäuren markiert. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code notiert.

Trivialname:	Aminosäuresequenz:	Analyse-Ziel:
Angiotensin II	<i>DRVYIHPF</i>	<i>Ausgangspeptid</i>
[Ile ²]-Angiotensin II	<i>D</i> <u><i>I</i></u> <i>VYIHPF</i>	Abhängigkeit von <i>R</i>
[Val ² , Arg ³]-Angiotensin II	<i>D</i> <u><i>V</i></u> <u><i>R</i></u> <i>YVHPF</i>	Abhängigkeit von <i>R-V</i>
<i>Ile</i> -Angiotensin-II- <i>Ile</i>	<u><i>I</i></u> <i>DRVYIHPF</i> <u><i>I</i></u>	Terminale Schnitte
[Ile ⁶]-Angiotensin II	<i>DRVYI</i> <u><i>I</i></u> <i>PF</i>	Abhängigkeit von <i>H</i>
[Ile ⁷]-Angiotensin II	<i>DRVYI</i> <u><i>H</i></u> <i>IF</i>	Abhängigkeit von <i>P</i>
[Ile ⁸]-Angiotensin II	<i>DRVYI</i> <u><i>H</i></u> <u><i>P</i></u> <i>I</i>	Abhängigkeit von <i>F</i>

eine MeV-ioneninduzierte Fragmentierung N-terminal des Arginins hoch selektiv ist; vergleiche hierzu insbesondere Abbildung 5.7, 5.8 und 5.10. Mit weiteren Angiotensin-II-Derivaten könnte der Einfluss der Protonenaffinität des basischen Arginins auf die beobachteten Schnitte untersucht werden. Eine leichte Änderung der Peptidsequenz, beispielsweise durch Vertauschen des Valins und des Arginins, könnte Informationen darüber geben, ob der Schnitt durch das Arginin geleitet wird, vergleiche Tabelle 5.1. Aber auch andere markante Schnittpositionen könnten durch systematisches Ersetzen einzelner benachbarter Aminosäuren mit einer bezüglich der Fragmentierung vermeintlich inerten Aminosäure untersucht werden, beispielsweise durch Isoleucin- (*I*) oder aber auch Valin-Einheiten (*V*). Ebenso könnten die terminalen Schnitte durch vor- und nachgestellte Aminosäuren um das Angiotensin II herum, wie zum Beispiel *Ile*-Angiotensin-II-*Ile* untersucht werden (vergleiche Tabelle 5.1).

Durch eine Cyclisierung des Angiotensin II könnte weiterhin getestet werden, ob es Einflüsse durch die Termini selbst und den Abstand von Aminosäuren zu den jeweiligen Termini gibt. Zusätzlich zu den Angiotensin-II-ähnlichen Peptiden wären auch Peptide interessant, deren Komplexität sich auf ein bis zwei Aminosäurearten beschränkt. Darüber hinaus könnten auch Peptide mit in die Analyse einbezogen werden, die eine feste lokalisierte Ladung mit sich bringen und bereits in der Erstellung des MPM eine wichtige Rolle gespielt haben und entsprechend

gut in der Literatur vertreten sind, wie das $\phi_3\text{P}^+\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{-LDIFSDF}$ [160]; das ϕ_3 steht an dieser Stelle für tris(2,4,6-trimethoxyphenyl), welches in Kombination mit dem Phosphor eine einzelne Ladung darstellt, sodass keine Protonierung notwendig ist. Der direkte Vergleich der Fragmente zwischen CID-Spektren und Spektren von mit SHI bestrahlten Proben dieser Moleküle würde weitere Einblicke in die unterschiedlichen Anregungsmechanismen geben.

5.3 Spezifische Fragmentierung nach keV-Ionen-Beschuss

Die Bestrahlung von Peptiden mit Ionen im MeV-Bereich zeigen im Gegensatz zu keV-Ionen spezifische und selektive Fragmentierung. Für ein besseres Verständnis der Unterschiede und Gemeinsamkeiten wurden die beobachteten, spezifischen Fragmente nach keV-Ionen-Beschuss detaillierter untersucht. In Abbildung 5.20 sind die Intensitäten der spezifischen Fragmente für Angiotensin II gezeigt, die aus Proben stammen, die mit keV-Primärionen bestrahlt wurden. Für die Bestrahlung der in Abbildung 5.20(a) gezeigten Proben wurden Bi^+ -Ionen mit einer kinetischen Energie von 25 keV verwendet. Es lässt sich erkennen, dass fast alle möglichen Schnitte mit ähnlicher Intensität beobachtet werden. Nur die Schnitte zwischen Arginin (*R*) und Valin (*V*) sowie Histidin (*H*) und Prolin (*P*) scheinen unterdrückt zu sein. Ähnlich verhalten sich die beobachteten Schnitte in den mit Bi_3^+ -Ionen (25 keV) bestrahlten Proben in Abbildung 5.20(b). Im Vergleich zu den Schnitten in Abbildung 5.20(a) ist die Intensität des *H-P*-Schnittes zum stärksten Schnitt in der Darstellung geworden und der *P-F*-Schnitt scheint unterdrückt zu sein. Sowohl bei den mit Bi^+ - wie auch mit Bi_3^+ -Ionen bestrahlten Proben ist eine relativ breite Verteilung der Fragmente zu beobachten: Fast alle Positionen weisen Fragmente auf und die Fragmentart scheint homogen verteilt. In Abbildung 5.20(c) sind die Intensitäten der Fragmente des mit Ar_{1000}^+ -Ionen bestrahlten Proben dargestellt. Diese erinnern stark an die Intensitätsverteilung der Fragmente von Angiotensin II, die durch CID erzeugt wurden; vergleiche hierzu Abbildung 5.14. Der *D-R*-Schnitt ist dominant und es ist eine Häufung um den *H-P*-Schnitt erkennbar. Zusätzlich sind die erzeugten Fragmente zum Großteil b/y-Fragmente. Diese Ähnlichkeit zu CID-induzierten Fragmenten könnte sich auf die Größe des Primärions und die damit für diese Schnitte verantwortliche Anregung zurückführen lassen: Bei 1000 Gasatomen im Cluster mit einer kinetischen Gesamtenergie von 20 keV entspricht dies einer Energiedichte von 20 eV pro

Argon-Atom. Im Stoß kommt es zu einer starken Umverteilung der Energie im Cluster und es entstehen Zonen höherer Temperatur, in denen die Wechselwirkung des Clusters mit den Probenmolekülen im Wesentlichen durch ein Aufheizen der Probe beschrieben werden können [236,237]. Aus diesen Zonen stammen eventuell die beobachteten CID-ähnlichen Fragmente. Grundsätzlich ist eine solche starke Abhängigkeit von der Primärionenart für ToF-SIMS-Messungen bekannt [58]. Die beobachtete Ähnlichkeit der Verteilung nach Beschuss mit Ar_{1000}^+ -Clustern und

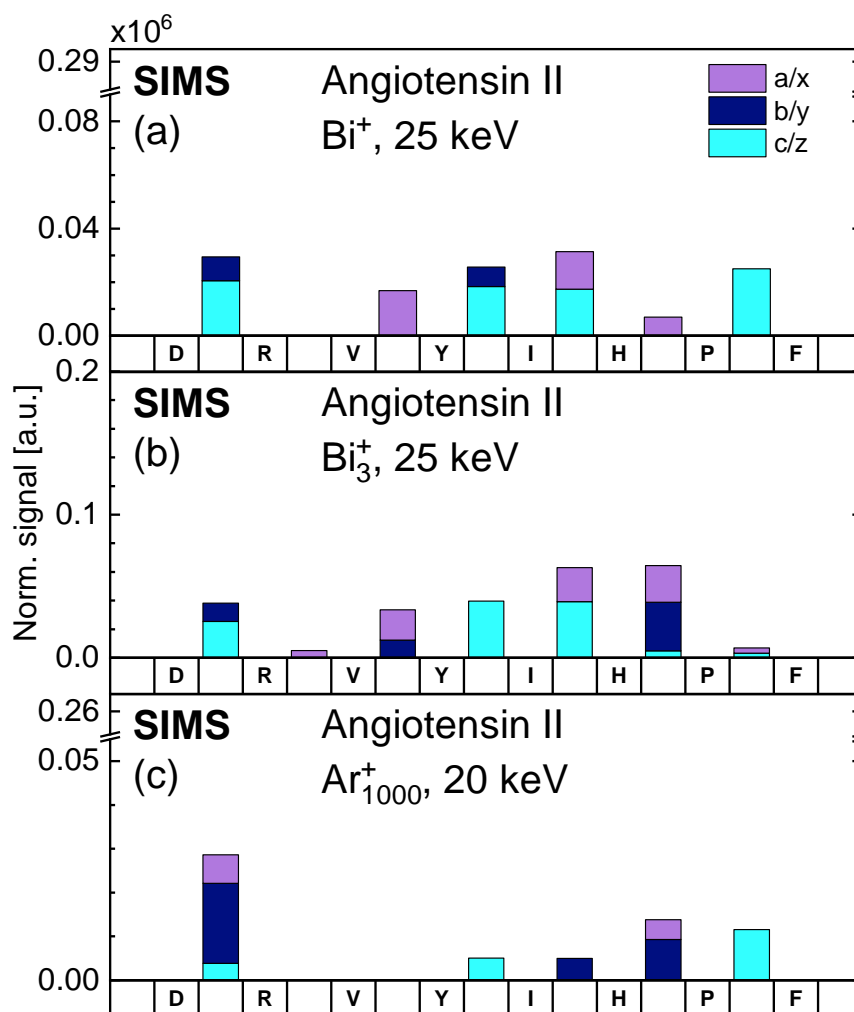


Abbildung 5.20: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten von Angiotensin II, die mittels SHI induzierter und DINEC-MS nach SHI Bestrahlung beobachtet wurden. Die Primärionen waren: (a) Bi^+ (25 keV), (b) Bi_3^+ (25 keV) und (c) Ar_{1000}^+ (20 keV). Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet.

CID könnte durch Experimente unter Austausch einzelner Aminosäure-Einheiten, vergleichbar zu den in Kapitel 5.2.1 und 5.2.2 beschriebenen Experimenten, ebenfalls weiter untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- [1] J. J. Thomson. *Bakerian Lecture: Rays of Positive Electricity*. Proc. R. Soc. London A. **89**, 1–20 (1913).
- [2] F. E. Ahmed. *Utility of mass spectrometry for proteome analysis: part I. Conceptual and experimental approaches*. Expert Rev. Proteomics **5**, 841–864 (2008).
- [3] Nobel Foundation. *Francis W. Aston - Biographical*. www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1922/aston/biographical/ (1966). [Abgerufen am 16.02.2024].
- [4] Nobel Foundation. *Wolfgang Paul - Biographical*. www.nobelprize.org/prizes/physics/1989/paul/biographical/ (1990). [Abgerufen am 16.02.2024].
- [5] Nobel Foundation. *John B. Fenn - Biographical*. www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002/fenn/facts/ (2003). [Abgerufen am 16.02.2024].
- [6] Nobel Foundation. *Koichi Tanaka - Biographical*. www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002/tanaka/biographical/ (2003). [Abgerufen am 16.02.2024].
- [7] G. L. Glish und R. W. Vachet. *The basics of mass spectrometry in the twenty-first century*. Nat. Rev. Drug Discov. **2**, 140–150 (2003).
- [8] A. N. Krutchinsky und B. T. Chait. *On the nature of the chemical noise in MALDI mass spectra*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **13**, 129–134 (2002).
- [9] C. Gebhardt, A. Tomsic, H. Schröder, M. Dürr und K. Kompa. *Matrix-free formation of gas-phase biomolecular ions by soft cluster-induced desorption*. Angew. Chem. Int. Ed. **48**, 4162–4165 (2009).
- [10] M. Baur, B.-J. Lee, C. R. Gebhardt und M. Dürr. *Soft cluster-induced desorption and ionization of biomolecules - Influence of surface load and morphology on desorption efficiency*. Appl. Phys. Lett. **99**, 234103 (2011).
- [11] M. Baur, C. R. Gebhardt und M. Dürr. *Desorption/ionization induced by neutral cluster impact as a soft and efficient ionization source for ion trap*

- mass spectrometry of biomolecules*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **28**, 290–296 (2014).
- [12] K. Bomhardt, P. Schneider, A. Portz, C. R. Gebhardt und M. Dürr. *Analysis of Complex Molecules and Their Reactions on Surfaces by Means of Cluster-Induced Desorption/Ionization Mass Spectrometry*. J. Visualized Exp. **11**, e60487 (2020).
- [13] A. Portz, K. Bomhardt, M. Rohnke, P. Schneider, A. Asperger, C. R. Gebhardt und M. Dürr. *Soft cluster-induced desorption/ionization mass spectrometry: How soft is soft?* Biointerphases **15**, 021001 (2020).
- [14] K. Bomhardt, P. Schneider, M. Rohnke, C. R. Gebhardt und M. Dürr. *Cluster-induced desorption/ionization mass spectrometry of highlighter ink: unambiguous identification of dyes and degradation processes based on fragmentation-free desorption*. Analyst **147**, 333–340 (2022).
- [15] A. Portz, M. Baur, C. R. Gebhardt, A. J. Frank, P. Neuderth, M. Eickhoff und M. Dürr. *Influence of the cluster constituents' reactivity on the desorption/ionization process induced by neutral SO₂ clusters*. J. Chem. Phys. **146**, 134705 (2017).
- [16] P. Schneider und M. Dürr. *Cluster-induced desorption investigated by means of molecular dynamics simulations - Microsolvation in clusters of polar and non-polar constituents*. J. Chem. Phys. **150**, 214301 (2019).
- [17] C. R. Gebhardt, H. Schröder und K. L. Kompa. *Surface impact ionization of polar-molecule clusters through pickup of alkali atoms*. Nature **400**, 544–547 (1999).
- [18] P. Keller, S. Aoyagi und M. Dürr. *Cluster-induced desorption/ionization mass spectrometry of Ir(ppy)₃*. J. Vac. Sci. Technol. B **41**, 054002–1 – 054002–6 (2023).
- [19] J. P. Nozieres, M. Ghidini, N. M. Dempsey, B. Gervais, D. Givord, G. Suran und J. M. D. Coey. *Swift heavy ions for magnetic nanostructures*. Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. B **146**, 250–259 (1998).
- [20] F. Aumayr, S. Facsko, A. S. El-Said, C. Trautmann und M. Schleberger. *Single ion induced surface nanostructures: a comparison between slow highly charged and swift heavy ions*. J. Phys. Condens. Matter **23**, 393001 (2011).

- [21] D. K. Avasthi und G. K. Mehta. *Swift heavy ions for materials engineering and nanostructuring*, volume 145. Springer Science & Business Media (2011).
- [22] M. Lang, R. Devanathan, M. Toulemonde und C. Trautmann. *Advances in understanding of swift heavy-ion tracks in complex ceramics*. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **19**, 39–48 (2015).
- [23] F. F. Komarov. *Nano- and microstructuring of solids by swift heavy ions*. *Uspekhi Fizicheskikh Nauk* **187**, 465–504 (2016).
- [24] P. Y. Apel. *Fabrication of functional micro- and nanoporous materials from polymers modified by swift heavy ions*. *Radiat. Phys. Chem.* **159**, 25–34 (2019).
- [25] G. Perez-Mitta, M. E. Toimil-Molares, C. Trautmann, W. A. Marmisolle und O. Azzaroni. *Molecular Design of Solid-State Nanopores: Fundamental Concepts and Applications*. *Adv. Mater.* **31** (2019).
- [26] G. Kraft, M. Scholz und U. Bechthold. *Tumor therapy and track structure*. *Radiat. Environ. Bioph.* **38**, 229–237 (1999).
- [27] S. Ritter und M. Durante. *Heavy-ion induced chromosomal aberrations: A review*. *Mutat. Res.* **701**, 38–46 (2010).
- [28] D. Schardt, T. Elsässer und D. Schultz-Ertner. *Heavy-ion tumor therapy: Physical and radiobiological benefits*. *Rev. Mod. Phys.* **82**, 383–425 (2010).
- [29] U. Linz und J. Alonso. *Laser-driven ion accelerators for tumor therapy revisited*. *Phys. Rev. Accel. Beams* **19**, 124802 (2016).
- [30] M. Scholz. *State-of-the-Art and Future Prospects of Ion Beam Therapy: Physical and Radiobiological Aspects*. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **4**, 147–160 (2020).
- [31] P. Schneider, P. Keller, I. Schubert, M. Bender, C. Trautmann und M. Dürr. *Bond-specific fragmentation of oligopeptides via electronic stopping of swift heavy ions in molecular films*. *Sci. Rep.* **12**, 17975–17983 (2022).
- [32] S. A. McLuckey. *Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **3**, 599–614 (1992).

- [33] K. Vékey. *Internal Energy Effects in Mass Spectrometry*. J. Mass Spectrom. **31**, 445–463 (1996).
- [34] J. Mitchell Wells und S. A. McLuckey. *Collision-Induced Dissociation (CID) of Peptides and Proteins*. In *Biological Mass Spectrometry, Methods in Enzymology*, volume 402, chapter 5, pp. 148–185. Academic Press (2005).
- [35] K. Pluschke, A. Herrmann und M. Dürr. *Soft Deposition of Organic Molecules Based on Cluster-Induced Desorption for the Investigation of On-Surface and Surface-Mediated Reactions*. ACS Omega **8**, 40639–40646 (2023).
- [36] D. Rading, R. Moellers, H.-G. Cramer und E. Niehuis. *Dual beam depth profiling of polymer materials: comparison of C₆₀ and Ar cluster ion beams for sputtering*. Surf. Interface Anal. **45**, 171–174 (2013).
- [37] D. Patel, D. Margolese und T. R. Dykea. *Electric dipole moment of SO₂ in ground and excited vibrational states*. J. Chem. Phys. **70**, 2740–2747 (1979).
- [38] C. M. Mahoney. *Cluster secondary ion mass spectrometry: principles and applications*. John Wiley & Sons (2013).
- [39] J. R. Rumble, D. R. Lide und T. J. Bruno (editors). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Boca Raton, 99 edition (2018).
- [40] N. Winograd. *Gas Cluster Ion Beams for Secondary Ion Mass Spectrometry*. Annu. Rev. Anal. Chem. **11**, 29–48 (2018).
- [41] V. Delmez, B. Tomasetti, T. Daphnis, C. Poleunis, C. Lauzin, C. Dupont-Gillain und A. Delcorte. *Gas Cluster Ion Beams as a Versatile Soft-Landing Tool for the Controlled Construction of Thin (Bio)Films*. ACS Appl. Bio Mat. **5**, 3180–3192 (2022).
- [42] A. Portz, S. Aoyagi und M. Dürr. *Soft depth-profiling of mixed peptide/lipid samples by means of cluster induced desorption/ionization mass spectrometry – High depth resolution and low matrix effect*. Biointerphases **13**, 03B405 (2018).
- [43] P. Schneider, F. Verloh und M. Dürr. *Cluster-Induced Desorption/Ionization of Polystyrene: Desorption Mechanism and Effect of Polymer Chain Length on Desorption Probability*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **33**, 832–839 (2022).

- [44] H. Gnaser, M. R. Savina, W. F. Calaway, C. E. Tripa, I. V. Veryovkin und M. J. Pellin. *Photocatalytic degradation of methylene blue on nanocrystalline TiO₂: Surface mass spectrometry of reaction intermediates*. Int. J. Mass Spectrom. **245**, 61–67 (2005).
- [45] K. Bomhardt, P. Schneider, T. Glaser und M. Dürr. *Surface Properties of Ionic Liquids: A Mass Spectrometric View Based on Soft Cluster-Induced Desorption*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **33**, 974–980 (2022).
- [46] F. Eusepi, A. Tomsic und C. R. Gebhardt. *Analysis of Solution-Deposited Alkali Ions by Cluster Surface Collisions*. Anal. Chem. **75**, 5124–5128 (2003).
- [47] V. V. Gridin, C. R. Gebhardt, A. Tomsic, I. Schechter, H. Schröder und K. L. Kompa. *Surface impact induced fragmentation and charging of neat and mixed clusters of SO₂ and H₂O*. Int. J. Mass Spectrom. **232**, 1–7 (2004).
- [48] B.-J. Lee, C. R. Gebhardt, H. Schröder, K.-L. Kompa und M. Dürr. *Observation of ionic desorption channels in cluster-induced desorption of alkali halides – influence of surface electronic properties and surface configuration*. Chem. Phys. Lett. **556**, 77–81 (2013).
- [49] A. Portz, C. R. Gebhardt und M. Dürr. *Real-time investigation of the H/D exchange kinetics of porphyrins and oligopeptides by means of neutral cluster induced desorption/ionization mass spectrometry*. J. Phys. Chem. B **121**, 11031–11036 (2017).
- [50] J. J. Grabowski, J. M. Van Doren, C. H. DePuy und V. M. Bierbaum. *Flowing afterglow studies of the electron affinity of SO₂*. J. Chem. Phys. **80**, 575–577 (1984).
- [51] M. R. Nimlos und G. B. Ellison. *Photoelectron spectroscopy of sulfur-containing anions (SO₂⁻, S₃⁻, and S₂O⁻)*. J. Phys. Chem. **90**, 2574–2580 (1986).
- [52] T. Raz, I. Schek, M. Bennun, U. Even, J. Jortner und R. D. Levine. *Dissociation dynamics of diatomic molecules embedded in impact heated rare gas clusters*. J. Chem. Phys. **101**, 8606–8619 (1994).
- [53] J. L. S. Lee, S. Ninomiya, J. Matsuo, I. S. Gilmore, M. P. Seah und A. G. Shard. *Organic depth profiling of a nanostructured delta layer reference material using large argon cluster ions*. Anal. Chem. **82**, 98–105 (2010).

- [54] B.-J. Lee, M. Baur, C. R. Gebhardt und M. Dürr. *Quantification of the ionization probability during desorption/ionization of oligopeptides induced by neutral cluster impact*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **27**, 1090–1094 (2013).
- [55] M. Hesse, H. Meier und B. Zeeh. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag, Rüdiger Strasse 14, 70469 Stuttgart, 9th edition (2005).
- [56] J. C. Vickerman. *Molecular imaging and depth profiling by mass spectrometry SIMS, MALDI or DESI?* Analyst **136**, 2199–2217 (2011).
- [57] P. van der Heide. *Secondary ion Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (2014).
- [58] S. Muramoto, D. J. Graham, M. S. Wagner, T. G. Lee, D. W. Moon und D. G. Castner. *ToF-SIMS Analysis of Adsorbed Proteins: Principal Component Analysis of the Primary Ion Species Effect on the Protein Fragmentation Patterns*. J. Phys. Chem. C **115**, 24247–24255 (2011).
- [59] R. Michel und D. G. Castner. *Advances in time-of-flight secondary ion mass spectrometry analysis of protein films*. Surf. Interface Anal. **38**, 1386–1392 (2006).
- [60] M. W. Duncan, H. Roder und S. W. Hunsucker. *Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Brief. Funct. Genomic. Proteomic. **7**, 355–370 (2008).
- [61] A. M. Rijs. *Gas-Phase Ir Spectroscopy And Structure Of Biological Molecules*. Topics in Current Chemistry. Springer International Publishing AG, Cham (2015).
- [62] K. Demeure, V. Gabelica und E. A. D. Pauw. *New advances in the understanding of the in-source decay fragmentation of peptides in MALDI-TOF-MS*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **21**, 1906–1917 (2010).
- [63] E. Schulz, M. Karas, F. Rosu und V. Gabelica. *Influence of the matrix on analyte fragmentation in atmospheric pressure MALDI*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **17**, 1005–1013 (2006).

- [64] A. Croxatto, G. Prodhom und G. Greub. *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS Microbiology Reviews **36**, 380–407 (2012).
- [65] M. Morelato, A. Beavis, P. Kirkbride und C. Roux. *Forensic applications of desorption electrospray ionisation mass spectrometry (DESI-MS)*. Forensic Sci. Int. **226**, 10–21 (2013).
- [66] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong und C. M. Whitehouse. *Electrospray ionization—principles and practice*. Mass Spectrom. Rev. **9**, 37–70 (1990).
- [67] Bruker Daltonics, Bremen, Germany. *amaZon Series User Manual* (2016). Revision A, Part No.: 1846779.
- [68] A. Portz, M. Baur, G. Rinke, S. Abb, S. Rauschenbach, K. Kern und M. Dürr. *Chemical analysis of complex surface-adsorbed molecules and their reactions by means of cluster-induced desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **90**, 3328–3334 (2018).
- [69] J. Heep, P. H. K. Tuchecker, C. R. Gebhardt und M. Dürr. *Combination of Thin-Layer Chromatography and Mass Spectrometry Using Cluster-Induced Desorption/Ionization*. ACS Omega **4**, 22426–22430 (2019).
- [70] W. Paul und H. Steinwedel. *Notizen: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld*. Zeitschrift für Naturforschung A **8**, 448–450 (1953).
- [71] W. Paul. *Electromagnetic traps for charged and neutral particles*. Rev. Mod. Phys. **62**, 531–540 (1990).
- [72] R. E. March und J. F. J. Todd (editors). *Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2nd edition (2005).
- [73] L. Ding, M. Sudakov, F. L. Brancia, R. Giles und S. Kumashiro. *A digital ion trap mass spectrometer coupled with atmospheric pressure ion sources*. J. Mass Spectrom. **39**, 471 – 484 (2004).
- [74] P. Schneider. *Clusterinduzierte Desorption/Ionisation: sanfter Desorptionsmechanismus zur massenspektrometrischen Analyse ioneninduzierter Fragmentierung in Oligopeptiden* (2022).

- [75] D. T. Snyder, W. Peng und R. G. Cooks. *Resonance methods in quadrupole ion traps*. Chem. Phys. Lett. **668**, 69 – 89 (2017).
- [76] G. Zhang, R. S. Annan, S. A. Carr und T. A. Neubert. *Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry*. Current Protocols in Protein Science **62**, 16.1.1–16.1.30 (2010).
- [77] M. Schleberger und J. Kotakoski. *2D Material Science: Defect Engineering by Particle Irradiation*. Materials **11**, 1885 (2018).
- [78] J. F. Ziegler, M. D. Ziegler und J. P. Biersack. *SRIM - The stopping and range of ions in matter*. Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. B **268**, 1818–1823 (2010).
- [79] J. F. Ziegler, J. P. Biersack und M. D. Ziegler. *The Stopping and Range of Ions in Matter*. SRIM Co., Chester, 15 edition (2015).
- [80] K. Gärtner. *Ion-Solid-Interaction*. In W. Wesch und E. Wendler (editors), *Ion Beam Modification of Solids*, chapter 1, pp. 3–62. Springer Nature, Switzerland (2016).
- [81] W. Nolting. *Grundkurs Theoretische Physik 1*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 11th edition (2018).
- [82] P. A. Tipler und G. Mosca. *Physik für Wissenschaftler und Ingenieure*, volume 7. Springer Berlin Heidelberg (2015).
- [83] N. Medvedev, A. E. Volkov, R. Rymzhanov, F. Akhmetov, S. Gorbunov, R. Voronkov und P. Babaev. *Frontiers, challenges, and solutions in modeling of swift heavy ion effects in materials*. J. Appl. Phys. **133**, 100701–1 – 100701–58 (2023).
- [84] D. J. O’connor und J. P. Biersack. *Comparison of theoretical and empirical interatomic potentials*. Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. B **15**, 14–19 (1986).
- [85] J. F. Ziegler, J. P. Biersack und M. D. Ziegler. *The Stopping and Range of Ions in Solids, Stopping and Ranges of Ions in Matter*, volume 1. Pergamon Press, New York (1984).
- [86] F. Bloch. *Zur Bremsung rasch bewegter Teilchen beim Durchgang durch Materie*. Ann. Phys. **408**, 285–320 (1933).

- [87] D. Meschede. *Gerthsen Physik*. 25. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg (2015).
- [88] J. Lindhard und M. Scharff. *Energy Dissipation by Ions in the keV Region*. Phys. Rev. **124**, 128–130 (1961).
- [89] W. Wesch und E. Wendler (editors). *Ion Beam Modification of Solids*. Number 61 in Springer Series in Surface Sciences. Springer International Publishing, Cham (2016).
- [90] H. P. Latscha und U. Kazmaier. *Chemie für Biologen*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 4 edition (2016).
- [91] W. H. Brown und T. Poon. *Einführung in die organische Chemie*. John Wiley & Sons, Weinheim, Germany (2020).
- [92] J. Buddrus. *Grundlagen der Organischen Chemie*. De Gruyter, Berlin, New York (2011).
- [93] C. Schmidt und L. Dietrich. *Chemie für Biologen*. Springer Berlin Heidelberg (2014).
- [94] W. C. W. P. D. Chan und P. White. *Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach*, volume 222. OUP Oxford (1999).
- [95] D. N. Podell und G. N. Abraham. *A technique for the removal of pyroglutamic acid from the amino terminus of proteins using calf liver pyroglutamate amino peptidase*. Biochem. Bioph. Res. Co. **81**, 176–185 (1978).
- [96] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). *Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides*. Eur. J. Biochem. **138**, 9–37 (1984).
- [97] J. M. Gottfried. *Surface chemistry of porphyrins and phthalocyanines*. Surf. Sci. Rep. **70**, 259–379 (2015).
- [98] A. Kuznetsov. *Metalloporphyrins: Tuning Properties and Applications*. De Gruyter (2021).
- [99] S. De, T. Devic und A. Fateeva. *Porphyrin and phthalocyanine-based metal organic frameworks beyond metal-carboxylates*. Dalton T. **50**, 1166–1188 (2021).

- [100] N. Ide, N. Matsusue, T. Kobayashi und H. Naito. *Photoluminescence properties of facial- and meridional-Ir(ppy)₃ thin films*. Thin Solid Films **509**, 164–167 (2006).
- [101] A. Y. Gitlina, F. Fadaei-Tirani, A. Ruggi, C. Plaice und K. Severin. *Acid-base-induced fac -> mer isomerization of luminescent iridium(III) complexes*. Chem. Sci. **13**, 10370–10374 (2022).
- [102] M. A. Baldo, D. F. O’Brien, Y. You, A. Shoustikov, S. Sibley, M. E. Thompson und S. R. Forrest. *Highly efficient phosphorescent emission from organic electroluminescent devices*. Nature **395**, 151–154 (1998).
- [103] M. A. Baldo, S. Lamansky, P. E. Burrows, M. E. Thompson und S. R. Forrest. *Very high-efficiency green organic light-emitting devices based on electrophosphorescence*. Appl. Phys. Lett. **75**, 4–6 (1999).
- [104] M. Ikai, S. Tokito, Y. Sakamoto, T. Suzuki und Y. Taga. *Highly efficient phosphorescence from organic light-emitting devices with an exciton-block layer*. Appl. Phys. Lett. **79**, 156–158 (2001).
- [105] Y. Kawamura, K. Goushi, J. Brooks, J. J. Brown, H. Sasabe und C. Adachi. *100% phosphorescence quantum efficiency of Ir(III) complexes in organic semiconductor films*. Appl. Phys. Lett. **86**, 071104 (2005).
- [106] L. Flamigni, A. Barbieri, C. Sabatini, B. Ventura und F. Barigelletti. *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds II*, chapter Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds: Iridium, pp. 143–203. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg (2007).
- [107] G. Hong, X. Gan, C. Leonhardt, Z. Zhang, J. Seibert, J. M. Busch und S. Bräse. *A brief history of OLEDs - Emitter development and industry milestones*. Adv. Mater. **33**, 2005630 (2021).
- [108] V. V. Grushin, N. Herron, D. D. LeCloux, W. J. Marshall, V. A. Petrov und Y. Wang. *New, efficient electroluminescent materials based on organometallic Ir complexes*. Chem. Commun. **2001**, 1494–1495 (2001).
- [109] A. Beeby, S. Bettington, I. D. W. Samuel und Z. Wang. *Tuning the emission of cyclometalated iridium complexes by simple ligand modification*. J. Mater. Chem. **13**, 80–83 (2003).

- [110] A. B. Tamayo, B. D. Alleyne, P. I. Djurovich, S. Lamansky, I. Tsyba, N. N. Ho, R. Bau und M. E. Thompson. *Synthesis and Characterization of Facial and Meridional tris-cyclometalated Iridium(III) Complexes*. J. Am. Chem. Soc. **125**, 7377–7387 (2003).
- [111] Y. Natori, Y. Kitagawa, S. Aoki, R. Teramoto, H. Tada, I. Era und M. Nakano. *Quantum chemical design guidelines for absorption and emission color tuning of fac-Ir(ppy)₃ complexes*. Molecules **23**, 577 (2018).
- [112] Y.-X. Hu, X. Xia, W.-Z. He, Z.-J. Tang, Y.-L. Lv, X. Li und D.-Y. Zhang. *Recent developments in benzothiazole-based iridium(III) complexes for application in OLEDs as electrophosphorescent emitters*. Org. Electron. **66**, 126–135 (2019).
- [113] X. Ren, M. E. Kondakova, D. J. Giesen, M. Rajeswaran, M. Madaras und W. C. Lenhart. *Coumarin-Based, Electron-Trapping Iridium Complexes as Highly Efficient and Stable Phosphorescent Emitters for Organic Light-Emitting Diodes*. Inorg. Chem. **49**, 1301–1303 (2010).
- [114] A. G. Shard, A. Miisho, J.-L. Vorng, R. Havelund, I. S. Gilmore und S. Aoyagi. *A two-point calibration method for quantifying organic binary mixtures using secondary ion mass spectrometry in the presence of matrix effects*. Surf. Interface Anal. **54**, 363–373 (2022).
- [115] S. Aoyagi, D. J. H. Cant, M. Dürr, A. Eyres, S. Fearn, I. S. Gilmore, S.-i. Iida, R. Ikeda, K. Ishikawa, M. Lagator, N. Lockyer, P. Keller, K. Matsuda, Y. Murayama, M. Okamoto, B. P. Reed, A. G. Shard, A. Takano, G. F. Trindade und J.-L. Vorng. *Quantitative and Qualitative Analyses of Mass Spectra of OEL Materials by Artificial Neural Network and Interface Evaluation: Results from a VAMAS Interlaboratory Study*. Anal. Chem. **95**, 15078–15085 (2023).
- [116] J. S. Brodbelt. *Ion Activation Methods for Peptides and Proteins*. Anal. Chem. **88**, 30–51 (2015).
- [117] C. Dass. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA (2006).
- [118] D. F. Hunt, J. R. Yates, J. Shabanowitz, S. Winston und C. R. Hauer. *Protein sequencing by tandem mass spectrometry*. Proc. Natl. Acad. Sci. **83**, 6233–6237 (1986).

- [119] J. Yinon. *Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) and Collision Induced Dissociation (CID) - an Introduction*, NATO ASI Series, volume 309, pp. 685–693. Springer, Dordrecht, Netherlands (1990).
- [120] V. H. Wysocki, K. E. Joyce, C. M. Jones und R. L. Beardsley. *Surface-induced dissociation of small molecules, peptides, and non-covalent protein complexes*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 190–208 (2008).
- [121] F. E. Ahmed. *Utility of mass spectrometry for proteome analysis: part II. Ion-activation methods, statistics, bioinformatics and annotation*. *Expert Rev. Proteomics* **6**, 171–197 (2009).
- [122] L. A. Macias, I. C. Santos und J. S. Brodbelt. *Ion Activation Methods for Peptides and Proteins*. *Anal. Chem.* **92**, 227–251 (2020).
- [123] I. A. Papayannopoulos. *The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides*. *Mass Spectrom. Rev.* **14**, 49–73 (1995).
- [124] B. Paizs und S. Suhai. *Fragmentation pathways of protonated peptides*. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 508–548 (2005).
- [125] J. M. Wells und S. A. McLuckey. *Collision-induced Dissociation (CID) of Peptides and Proteins*. *Meth. Enzymol.* **402**, 148–185 (2005).
- [126] C. K. Frese, A. F. M. Altelaar, M. L. Hennrich, D. Nolting, M. Zeller, J. Griep-Raming, A. J. R. Heck und S. Mohammed. *Improved Peptide Identification by Targeted Fragmentation Using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos*. *J. Proteome Res.* **10**, 2377–2388 (2011).
- [127] E. D. Hoffmann. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, Incorporated, New York, 1 edition (2013).
- [128] R. G. Cooks, D. T. Terwilliger, T. Ast, J. H. Beynon und T. Keough. *Surface modified mass spectrometry*. *JACS* **97**, 1583–1585 (1975).
- [129] M. A. Mabud, M. J. Dekrey und R. Graham Cooks. *Surface-induced dissociation of molecular ions*. *Int. J. Mass Spectrom.* **67**, 285–294 (1985).
- [130] D. L. Smith, V. H. Wysocki, R. Colorado, O. E. Shmakova, M. Graupe und T. R. Lee. *Low-Energy Ion-Surface Collisions Characterize Alkyl- and Fluoroalkyl-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold*. *Langmuir* **18**, 2895–3902 (2003).

- [131] A. Q. Stiving, Z. L. VanAernum, F. Busch, S. R. Harvey, S. H. Sarni und V. H. Wysocki. *Surface-Induced Dissociation: An Effective Method for Characterization of Protein Quaternary Structure*. *Anal. Chem.* **91**, 190–209 (2018).
- [132] D. T. Snyder, S. R. Harvey und V. H. Wysocki. *Surface-induced Dissociation Mass Spectrometry as a Structural Biology Tool*. *Chem. Rev.* **122**, 7442–7487 (2021).
- [133] J. Laskin, E. Denisov und J. Futrell. *Comparative Study of Collision-Induced and Surface-Induced Dissociation. 2. Fragmentation of Small Alanine-Containing Peptides in FT-ICR MS*. *J. Phys. Chem. B* **105**, 1895–1900 (2001).
- [134] J. Laskin und J. H. Futrell. *Energy transfer in collisions of peptide ions with surfaces*. *J. Chem. Phys.* **119**, 3413–3420 (2003).
- [135] V. H. Wysocki, K. A. Resing, Q. Zhang und G. Cheng. *Mass spectrometry of peptides and proteins*. *Methods* **35**, 211–222 (2005).
- [136] M. J. DeKrey, H. I. Kenttämaa, V. H. Wysocki und R. G. Cooks. *Energy deposition in $[Fe(CO)_5]^+$ upon collision with a metal surface*. *Org. Mass Spectrom.* **21**, 193–195 (1986).
- [137] A. R. Dongré, Á. Somogyi und V. H. Wysocki. *Surface-induced Dissociation: An Effective Tool to Probe Structure, Energetics and Fragmentation Mechanisms of Protonated Peptides*. *J. Mass Spectrom.* **31**, 339–350 (1996).
- [138] H. Lim, D. G. Schultz, C. Yu und L. Hanley. *Relative Dissociation Energies of Protonated Peptides by Electrospray Ionization/Surface-Induced Dissociation*. *Anal. Chem.* **71**, 2307–2317 (1999).
- [139] P. Roepstorff und J. Fohlman. *Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides*. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601 (1984).
- [140] R. S. Johnson, S. A. Martin, K. Biemann, J. T. Stults und J. T. Watson. *Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine*. *Anal. Chem.* **59**, 2621–2625 (1987).

- [141] K. Biemann. *Contributions of Mass Spectrometry to Peptide and Protein Structure*. Biomed. Environ. Mass Spectrom. **16**, 99–111 (1988).
- [142] R. S. Johnson, S. A. Martin und K. Biemann. *Collision-induced fragmentation of $(M + H)^+$ ions of peptides. Side chain specific sequence ions*. Int. J. Mass Spectrom. **86**, 137–154 (1988).
- [143] P. T. M. Kenny, K. Nomoto und R. Orlando. *Fragmentation Studies Of Peptides: The Formation Of Y Ions*. Rapid Commun. Mass Sp. **6**, 95–97 (1992).
- [144] T. Yalcin, C. Khouw, I. G. Csizmadia, M. R. Peterson und A. G. Harrison. *Why Are B Ions Stable Species in Peptide Spectra*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **6**, 1164–1174 (1995).
- [145] T. Yalcin, I. G. Csizmadia, M. R. Peterson und A. G. Harrison. *The Structure and Fragmentation of B_n ($n \geq 3$) Ions in Peptide Spectra*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **7**, 233–242 (1996).
- [146] R. A. Zubarev, N. L. Kelleher und F. W. McLafferty. *Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process*. JACS **120**, 3265–3266 (1998).
- [147] N. A. Kruger, R. A. Zubarev, D. M. Horn und F. W. McLafferty. *Electron capture dissociation of multiply charged peptide cations*. Int. J. Mass Spectrom. **185-187**, 787–793 (1999).
- [148] N. Sadagopan und J. T. Watson. *Mass spectrometric evidence for mechanisms of fragmentation of charge-derivatized peptides*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **12**, 399–409 (2001).
- [149] E. A. Kapp, F. Schütz, G. E. Reid, J. S. Eddes, R. L. Moritz, R. A. J. O’Hair, T. P. Speed und R. J. Simpson. *Mining a Tandem Mass Spectrometry Database To Determine the Trends and Global Factors Influencing Peptide Fragmentation*. Anal. Chem. **75**, 6251–6264 (2003).
- [150] A. R. Dongré, J. L. Jones, Á. Somogyi und V. H. Wysocki. *Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model*. J. Am. Chem. Soc. **118**, 8365–8374 (1996).

- [151] A. Somogyi, V. H. Wysocki und I. Mayer. *The effect of protonation site on bond strengths in simple peptides: Application of Ab initio and modified neglect of differential overlap bond orders and modified neglect of differential overlap energy partitioning*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **5**, 704–717 (1994).
- [152] A. Schlosser und W. D. Lehmann. *Five-membered ring formation in unimolecular reactions of peptides: a key structural element controlling low-energy collision-induced dissociation of peptides*. J. Mass Spectrom. **35**, 1382–1390 (2000).
- [153] V. H. Wysocki, G. Tsaprailis, L. L. Smith und L. A. Breci. *Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation*. J. Mass Spectrom. **35**, 1399–1406 (2000).
- [154] E. M. Solovyeva, A. Y. Pereverzev, M. V. Gorshkov und O. V. Boyarkin. *Ultraviolet Photodissociation of Peptides: New Insight on the Mobile Proton Model*. J. Exp. Theor. Phys. **130**, 626–632 (2020).
- [155] G. S. Gorman, J. P. Speir, C. A. Turner und I. J. Amster. *Proton Affinities of the 20 Common α -Amino Acids*. JACS **114**, 3986–3988 (1992).
- [156] S. Campbell, J. L. Beauchamp, M. Rempe und D. L. Lichtenberger. *Correlations of lone pair ionization energies with proton affinities of amino acids and related compounds. Site specificity of protonation*. Int. J. Mass Spectrom. **117**, 83–99 (1992).
- [157] A. G. Harrison. *The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides*. Mass Spectrom. Rev. **16**, 201–217 (1997).
- [158] A. Sigel, H. Sigel und R. K. O. Sigel (editors). *Metal Ions In Life Sciences*, volume 2. Hohn Wiley & Sons, Ltd., The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England (2007).
- [159] G. Tsaprailis, H. Nair, Á. Somogyi, V. H. Wysocki, W. Zhong, J. H. Futrell, S. G. Summerfield und S. J. Gaskell. *Influence of Secondary Structure on the Fragmentation of Protonated Peptides*. J. Am. Chem. Soc. **121**, 5142–5154 (1999).
- [160] C. Gu, G. Tsaprailis, L. Breci und V. H. Wysocki. *Selective Gas-Phase Cleavage at the Peptide Bond C-Terminal to Aspartic Acid in Fixed-Charge Derivatives of Asp-Containing Peptides*. Anal. Chem. **72**, 5804–5813 (2000).

- [161] J. Laskin, T. H. Bailey und J. H. Futrell. *Fragmentation energetics for angiotensin II and its analogs from time- and energy-resolved surface-induced dissociation studies*. Int. J. Mass Spectrom. **234**, 89–99 (2004).
- [162] T. H. Bailey, J. Laskin und J. H. Futrell. *Energetics of selective cleavage at acidic residues studied by time- and energy-resolved surface-induced dissociation in FT-ICR MS*. Int. J. Mass Spectrom. **222**, 313–327 (2003).
- [163] W. M. McGee und S. A. McLuckey. *The ornithine effect in peptide cation dissociation*. J. Mass Spectrom. **48**, 856–861 (2013).
- [164] A. Leitner und W. Lindner. *Effects of an arginine-selective tagging procedure on the fragmentation behavior of peptides studied by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)*. Anal. Chim. Acta **528**, 165–173 (2005).
- [165] J. L. Stephenson, B. J. Cargile und S. A. McLuckey. *Ion trap collisional activation of disulfide linkage intact and reduced multiply protonated polypeptides*. Rapid Commun. Mass Sp. **13**, 2040–2048 (1999).
- [166] C. Gu, Á. Somogyi, V. H. Wysocki und K. F. Medzihradszky. *Fragmentation of protonated oligopeptides XLDVLQ (X=L, H, K or R) by surface induced dissociation: additional evidence for the mobile proton model*. Anal. Chim. Acta **397**, 247–256 (1999).
- [167] D. L. Tabb, L. L. Smith, L. A. Brexi, V. H. Wysocki, D. Lin und J. R. Yates. *Statistical Characterization of Ion Trap Tandem Mass Spectra from Doubly Charged Tryptic Peptides*. Anal. Chem. **75**, 1155–1163 (2003).
- [168] Y. Huang, J. M. Triscari, L. Pasa-Tolic, G. A. Anderson, M. S. Lipton, R. D. Smith und V. H. Wysocki. *Dissociation Behavior of Doubly-Charged Tryptic Peptides: Correlation of Gas-Phase Cleavage Abundance with Ramachandran Plots*. JACS **126**, 3034–3035 (2004).
- [169] B. L. Schwartz und M. M. Bursey. *Some proline substituent effects in the tandem mass spectrum of protonated pentaalanine*. Meth. Enzymol. **21**, 92–96 (1992).
- [170] T. Vaisar und J. Urban. *Probing Proline Effect in CID of Protonated Peptides*. J. Mass Spectrom. **31**, 1185–1187 (1996).

- [171] L. A. Brechi, D. L. Tabb, J. R. Yates und V. H. Wysocki. *Cleavage N-Terminal to Proline: Analysis of a Database of Peptide Tandem Mass Spectra*. Anal. Chem. **75**, 1963–1971 (2003).
- [172] Y. Qi und D. A. Volmer. *Electron-based fragmentation methods in mass spectrometry: An overview*. Mass Spectrom. Rev. **36**, 4–15 (2015).
- [173] X. Liu, J.-C. Tabet und R. B. Cole. *Evidence for ion-ion interactions between peptides and anions (HSO_4^- or ClO_4^-) derived from high-acidity acids*. J. Mass Spectrom. **49**, 490–497 (2014).
- [174] C. Liu, E. Topchiy, T. Lehmann und F. Basile. *Characterization of the dehydration products due to thermal decomposition of peptides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Mass Spectrom. **50**, 625–632 (2015).
- [175] B. Paizs, Z. Szilávik, G. Lendvay, K. Vékey und S. Suhai. *Formation of a_2^+ ions of protonated peptides. An ab initio study*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **14**, 746–755 (2000).
- [176] P. Sigmund. *Mechanisms and Theory of Physical Sputtering by Particle Impact*. Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. B **27**, 1–20 (1987).
- [177] A. Benninghoven. *Surface Analysis by Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS)*. Surf. Sci. **299-300**, 246–260 (1994).
- [178] H. Gnaser. *Low-Energy Ion Irradiation of Solid Surfaces. Springer Tracts in Modern Physics*, volume 146. Springer, Berlin, Heidelberg (1999).
- [179] P. Sigmund und A. Schinner. *Progress in understanding heavy-ion stopping*. Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. B **382**, 15–25 (2016).
- [180] Y. He, N. Webber und J. P. Reilly. *157 nm Photodissociation of a Complete Set of Dipeptide Ions Containing C-Terminal Arginine*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **24**, 675–683 (2013).
- [181] N. Webber, Y. He und J. P. Reilly. *157 nm Photodissociation of Dipeptide Ions Containing N-Terminal Arginine*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **25**, 196–203 (2014).
- [182] R. R. Julian. *The Mechanism Behind Top-Down UVPD Experiments: Making Sense of Apparent Contradictions*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **28**, 1823–1826 (2017).

- [183] I. Anusiewicz, J. Berdys-Kochanska und J. Simons. *Electron Attachment Step in Electron Capture Dissociation (ECD) and Electron Transfer Dissociation (ETD)*. J. Phys. Chem. A **109**, 5801–5813 (2005).
- [184] E. A. Syrstad und F. Tureček. *Toward a general mechanism of electron capture dissociation*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **16**, 208–224 (2005).
- [185] G. Scoles, D. Bassi, U. Buck und D. Lainé (editors). *Atomic and Molecular Beam Methods Volume 1*. Oxford University Press, New York (1988).
- [186] N. R. Daly. *Scintillation type mass spectrometer ion detector*. Rev. Sci. Instrum. **31**, 264–267 (1960).
- [187] GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH. *UNI-LAC Overview*. <https://www.gsi.de/work/beschleunigerbetrieb/beschleuniger/unilac/unilac>. [Abgerufen am 11.03.2024].
- [188] I. G. Brown. *Vacuum arc ion sources*. Rev. Sci. Instrum. **65**, 3061–3081 (1994).
- [189] B. Wolf. *Handbook of ion sources*. CRC Press (1995).
- [190] I. G. Brown, A. Anders, S. Anders, M. R. Dickinson, R. A. MacGill und E. M. Oks. *Recent advances in vacuum arc ion sources*. Surf. Coat. Technol. **84**, 550–556 (1996).
- [191] GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH. *High Current Ion Sources*. www.gsi.de/en/work/beschleunigerbetrieb/beschleuniger/ionenquellen/sources/ion_sources (2024). [Abgerufen am 24.01.2024].
- [192] K. Blasche und H. Prange. *Die GSI in Darmstadt (I): Ein Laboratorium für die Schwerionenforschung*. Phys. Bl. **33**, 249–261 (1977).
- [193] W. Barth, W. Bayer, L. Dahl, L. Groening, S. Richter und S. Yaramyshev. *Upgrade program of the high current heavy ion UNILAC as an injector for FAIR*. Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. A **577**, 211–214 (2007).
- [194] candre. *Linear Accelerator UNILAC at GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung*. www-bd.gsi.de/dokuwiki/lib/exe/detail.php?id=projects%3Abif-monitor%3Aapplication&media=projects:bif-monitor:unilac_bif_new_3.png (2011). [Abgerufen am 21.12.2023].

- [195] K. S. F. Lau, M. Sadilek, M. Gouterman, G. E. Khalil und C. Brückner. *Observation of phenyl-fused porphyrinoids during the ESI mass spectrometric analysis of meso-pentafluorophenyl-substituted porphyrin and corrole*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **17**, 1306–1314 (2006).
- [196] M. Presselt, W. Dehaen, W. Maes, A. Klamt, T. Martínez, W. J. D. Beenken und M. Kruk. *Quantum chemical insights into the dependence of porphyrin basicity on the meso-aryl substituents: thermodynamics, buckling, reaction sites and molecular flexibility*. Phys. Chem. Chem. Phys. **17**, 14096–14106 (2015).
- [197] M. Abdinejad, A. Seifitokaldani, C. Dao, E. H. Sargent, X.-a. Zhang und H. B. Kraatz. *Enhanced electrochemical reduction of CO₂ catalyzed by cobalt and iron amino porphyrin complexes*. ACS Appl. Energy Mater. **2**, 1330–1335 (2019).
- [198] J. Sobczynski, H. H. Tonnesen und S. Kristensen. *Influence of aqueous media properties on aggregation and solubility of four structurally related meso-porphyrin photosensitizers evaluated by spectrophotometric measurements*. Pharmazie pp. 100–109 (2013).
- [199] Y. Zhao, X. Cai, Y. Zhang, C. Chen, J. Wang und R. Pei. *Porphyrin-based metal-organic frameworks: protonation induced Q band absorption*. Nanoscale **11**, 12250–12258 (2019).
- [200] S. Takeda und S.-i. Yamazaki. *Electrospray ionization mass spectrometric analyses of rhodium tetraphenylporphyrin complexes as electrocatalysts for CO oxidation by tandem mass spectrometry and hyphenated method with capillary electrophoresis*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **24**, 2341–2351 (2010).
- [201] P. M. Lalli, B. A. Iglesias, H. E. Toma, G. F. de Sa, R. J. Daroda, J. C. Silva Filho, J. E. Szulejko, K. Araki und M. N. Eberlin. *Protomers: formation, separation and characterization via travelling wave ion mobility mass spectrometry*. J. Mass Spectrom. **47**, 712–719 (2012).
- [202] E. Mishra, J. L. Worlinsky, C. Brückner und V. Ryzhov. *MS/MS Fragmentation Behavior Study of meso-Phenylporphyrinoids Containing Nonpyrrolic Heterocycles and meso-Thienyl-Substituted Porphyrins*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **25**, 18–29 (2013).

- [203] T. Nakazono, A. R. Parent und K. Sakai. *Cobalt porphyrins as homogeneous catalysts for water oxidation*. Chem. Commun. **49**, 6325–6327 (2013).
- [204] K. Endo, A. Raza, L. Yao, S. Van Gele, A. Rodríguez-Camargo, H. A. Vignolo-González, L. Grunenberg und B. V. Lotsch. *Downsizing Porphyrin Covalent Organic Framework Particles Using Protected Precursors for Electrocatalytic CO₂ Reduction*. Adv. Mater. **36** (2024).
- [205] Y. Shu, X. Liu, M. Zhang, B. Liu und Z. Wang. *Deactivation of porphyrin metal-organic framework in advanced oxidation process: Photobleaching and underlying mechanism*. App. Cat. B **346**, 123746 (2024).
- [206] M. Franke, F. Marchini, N. Jux, H. Steinrück, O. Lytken und F. J. Williams. *Zinc Porphyrin Metal-Center Exchange at the Solid-Liquid Interface*. Chemistry - A European Journal **22**, 8520–8524 (2016).
- [207] Z. Yin, B. Sun, X. Wang, X. Cheng, W. Hang und B. Huang. *Comprehensive analysis of metalloporphyrins via high irradiance laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. J. Anal. At. Spectrom. **29**, 1714–1719 (2014).
- [208] G. J. Van Berkel, S. A. McLuckey und G. L. Glish. *Electrochemical origin of radical cations observed in electrospray ionization mass spectra*. Anal. Chem. **64**, 1586–1593 (1992).
- [209] R. L. C. Lau, J. Jiang, D. K. P. Ng und T. W. D. Chan. *Fourier transform ion cyclotron resonance studies of lanthanide(III) porphyrin-phthalocyanine heteroleptic sandwich complexes by using electrospray ionization*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **8**, 161–169 (1997).
- [210] T. Gozet, L. Huynh und D. K. Bohme. *Collision-induced dissociation of tetraphenyl iron and manganese porphyrin ions by electrospray ionization mass spectrometry*. Int. J. Mass Spectrom. **279**, 113–118 (2009).
- [211] A. R. Hands und A. R. Katritzky. *N-oxides and related compounds: Part XI. Mononitration of 2-, 3-, and 4-phenyl- and 2- and 4-benzyl-pyridine 1-oxide*. J. Chem. Soc. pp. 1754–1762 (1958).
- [212] A. R. Gallopo und J. O. Edwards. *Kinetics and mechanism of the oxidation of pyridine by Caro's acid catalyzed by ketones*. J. Org. Chem. **46**, 1684–1688 (1981).

- [213] M. Mesta, M. Carvelli, R. J. de Vries, H. van Eersel, J. J. M. van der Holst, M. Schober, M. Furno, B. Lüssem, K. Leo, P. Loebel et al. *Molecular-scale simulation of electroluminescence in a multilayer white organic light-emitting diode*. *Nature Materials* **12**, 652–658 (2013).
- [214] H. Yoshida und K. Yoshizaki. *Electron affinities of organic materials used for organic light-emitting diodes: A low-energy inverse photoemission study*. *Org. Electron.* **20**, 24–30 (2015).
- [215] P. J. Hay. *Theoretical studies of the ground and excited electronic states in cyclometalated phenylpyridine Ir(III) complexes using density functional theory*. *J. Phys. Chem. A* **106**, 1634–1641 (2002).
- [216] J. Fine, K. Diri, A. I. Krylov, C. Nemirow, Z. Lu und C. Wittig. *Electronic structure of tris(2-phenylpyridine)iridium: electronically excited and ionized states*. *Mol. Phys.* **110**, 1849–1862 (2012).
- [217] Y. Nakato, K. Abe und H. Tsubomura. *Experimental determination of ionization potentials of tetraphenylporphine and metallotetraphenylporphines*. *Chem. Phys. Lett.* **39**, 358–360 (1976).
- [218] C.-C. Wu, J. C. Sturm, R. A. Register, J. Tian, E. P. Dana und M. E. Thompson. *Efficient organic electroluminescent devices using single-layer doped polymer thin films with bipolar carrier transport abilities*. *IEEE Transactions on Electron Devices* **44**, 1269–1281 (1997).
- [219] S. Barth, P. Müller, H. Riel, P. F. Seidler, W. Rieß, H. Vestweber und H. Bässler. *Electron mobility in tris(8-hydroxy-quinoline)aluminum thin films determined via transient electroluminescence from single- and multi-layer organic light-emitting diodes*. *J. Appl. Phys.* **89**, 3711–3719 (2001).
- [220] R. M. Meixner, H. Göbel, F. A. Yildirim, W. Bauhofer und W. Krautschneider. *Wavelength-selective organic field-effect phototransistors based on dye-doped poly-3-hexylthiophene*. *Appl. Phys. Lett.* **89** (2006).
- [221] T. Earmme, E. Ahmed und S. A. Jenekhe. *Highly Efficient Phosphorescent Light-Emitting Diodes by Using an Electron-Transport Material with High Electron Affinity*. *J. Phys. Chem. C* **113**, 18448–18450 (2009).
- [222] A. Portz, M. Baur, C. R. Gebhardt und M. Dürr. *Mass spectrometry of oligopeptides in the presence of large amounts of alkali halides using desorpti-*

- on/ionization induced by neutral cluster impact*. *Biointerphases* **11**, 02A316 (2016).
- [223] B. J. Bythell und A. G. Harrison. *Formation of a_1 Ions Directly from Oxazolone b_2 Ions: an Energy-Resolved and Computational Study*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **26**, 774–781 (2015).
- [224] P. Schneider, F. Verloh, A. Portz, S. Aoyagi, M. Rohnke und M. Dürr. *Direct Analysis of Ion-Induced Peptide Fragmentation in Secondary-Ion Mass Spectrometry*. *Anal. Chem.* **92**, 15604–15610 (2020).
- [225] S. A. McLuckey und J. L. Stephenson. *Ion/ion chemistry of high-mass multiply charged ions*. *Mass Spectrom. Rev.* **17**, 369–407 (1998).
- [226] R. A. Zubarev, D. M. Horn, E. K. Fridriksson, N. L. Kelleher, N. A. Kruger, M. A. Lewis, B. K. Carpenter und F. W. McLafferty. *Electron Capture Dissociation for Structural Characterization of Multiply Charged Protein Cations*. *Anal. Chem.* **72**, 563–573 (2000).
- [227] J. E. P. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz und D. F. Hunt. *Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 9528–9533 (2004).
- [228] J. Szczerbinski, J. B. Metternich, G. Goubert und R. Zenobi. *How Peptides Dissociate in Plasmonic Hot Spots*. *Small* **16** (2020).
- [229] S. C. de Graaf, M. Hoek, S. Tamara und A. J. R. Heck. *A perspective toward mass spectrometry-based de novo sequencing of endogenous antibodies*. *mAbs* **14** (2022).
- [230] D. J. Butcher, K. G. Asano, D. E. Goeringer und S. A. McLuckey. *Thermal Dissociation of Gaseous Bradykinin Ions*. *J. Phys. Chem. A* **103**, 8664–8671 (1999).
- [231] H. Chen, L. S. Eberlin und R. G. Cooks. *Neutral fragment mass spectra via ambient thermal dissociation of peptide and protein ions*. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5880–5886 (2007).
- [232] J. P. Rozet, C. Stéphan und D. Vernhet. *ETACHA: a program for calculating charge states at GANIL energies*. *Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. B* **107**, 67–70 (1996).

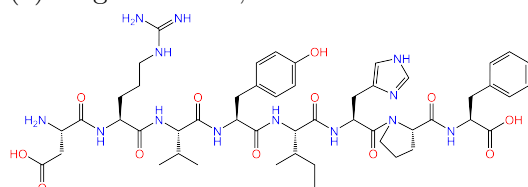
- [233] E. Lamour, P. D. Fainstein, M. Galassi, C. Prigent, C. A. Ramirez, R. D. Rivarola, J.-P. Rozet, M. Trassinelli und D. Vernhet. *Extension of charge-state-distribution calculations for ion-solid collisions towards low velocities and many-electron ions*. Phys. Rev. A **92**, 042703 (2015).
- [234] W. Portugal, S. Pilling, P. Boduch, H. Rothard und D. P. P. Andrade. *Radiolysis of amino acids by heavy and energetic cosmic ray analogues in simulated space environments: α -glycine zwitterion form*. Mon. Not. R. Astron. Soc. **441**, 3209–3225 (2014).
- [235] X. Chen und F. Tureček. *Simple b ions have cyclic oxazolone structures. A neutralization-reionization mass spectrometric and computational study of oxazolone radicals*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **16**, 1941–1956 (2005).
- [236] Z. Insepov und I. Yamada. *Molecular dynamics study of shock wave generation by cluster impact on solid targets*. Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. B **112**, 16–22 (1996).
- [237] K. F. Medzihradzsky und R. J. Chalkley. *Lessons in de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry*. Mass Spectrom. Rev. **34**, 43–63 (2013).

LITERATURVERZEICHNIS

Anhang A:

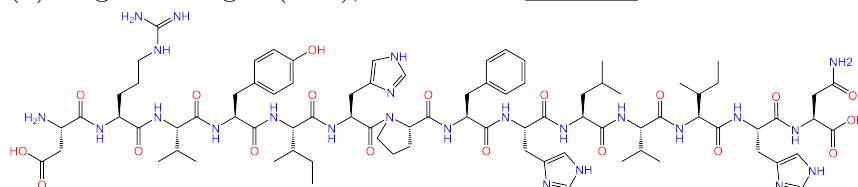
Strukturformeln der untersuchten Peptide

(a) Angiotensin II, *DRVYIHPF*



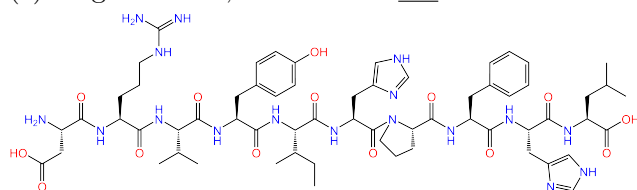
Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe

(b) Angiotensinogen (1-14), *DRVYIHPFHLVIHN*



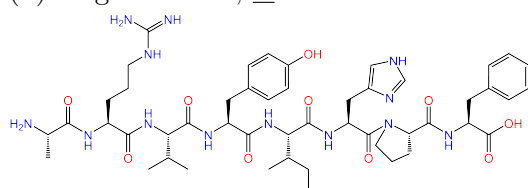
Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe - His - Leu - Val - Ile - His - Asn

(c) Angiotensin I, *DRVYIHPFHL*



Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe - His - Leu

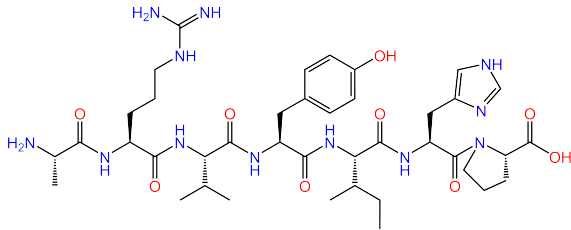
(d) Angiotensin A, *ARVYIHPF*



Ala - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe

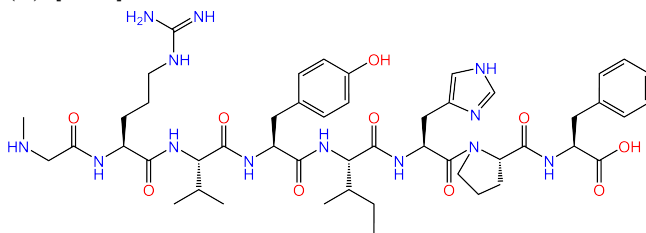
Abbildung A.1: Strukturformel und Benennung der verwendeten Peptide (in Ein- und Dreibuchstabencode). (a) Angiotensin II, (b) Angiotensinogen (1-14), (c) Angiotensin I und (d) Angiotensin A. Der Einbuchstabencode der Aminosäureeinheiten in der Aminosäuresequenz, die sich von der Sequenz des Ausgangsmoleküls Angiotensin II unterscheiden, sind unterstrichen.

(a) Alamandin, ARVYIHP



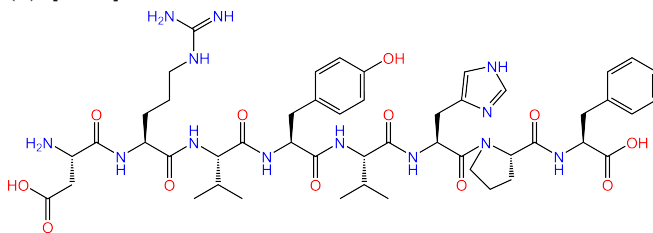
Ala - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro

(b) [Sar¹]-Angiotensin II, SarRVYIHPF



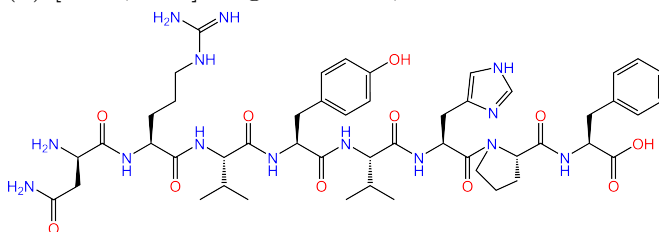
Sar - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe

(c) [Val⁵]-Angiotensin II, DRVYVHPF



Asp - Arg - Val - Tyr - Val - His - Pro - Phe

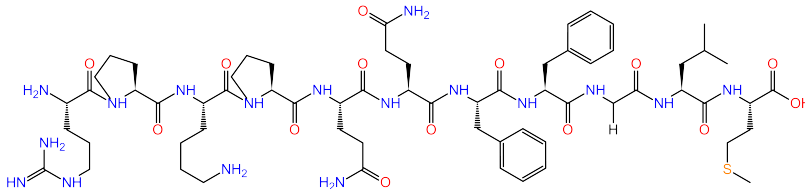
(d) [Asn¹, Val⁵]-Angiotensin II, NRVYVHPF



Asn - Arg - Val - Tyr - Val - His - Pro - Phe

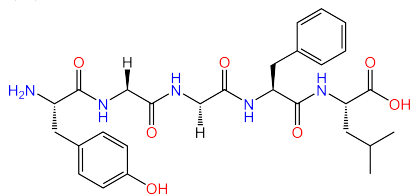
Abbildung A.2: Strukturformel und Benennung der verwendeten Peptide (in Ein- und Dreibuchstabencode). (a) Alamandin, (b) [Sar¹]-Angiotensin II, (c) [Val⁵]-Angiotensin II und (d) [Asn¹, Val⁵]-Angiotensin II. Der Einbuchstabencode der Aminosäureeinheiten in der Aminosäuresequenz, die sich von der Sequenz des Ausgangsmoleküls Angiotensin II unterscheiden, sind unterstrichen.

(a) Substanz P, *RPKPQQFFGLM*



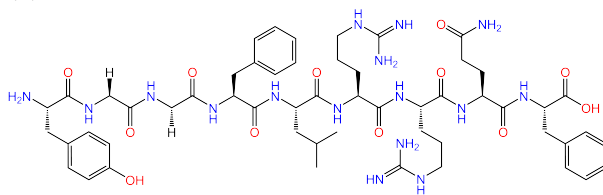
Arg - Pro - Lysl - Pro - Gln - Gln - Phe - Phe - Gly - Leu - Met

(b) *Leu*-Enkephalin, *YGGFL*



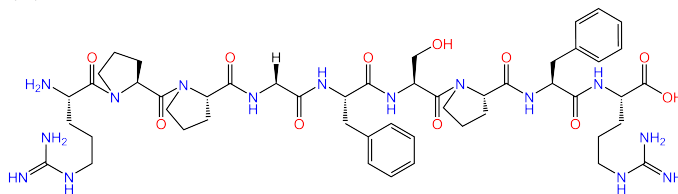
Tyr - Gly - Gly - Phe - Leu

(c) Dynorphin B, *YGGFLRRQF*



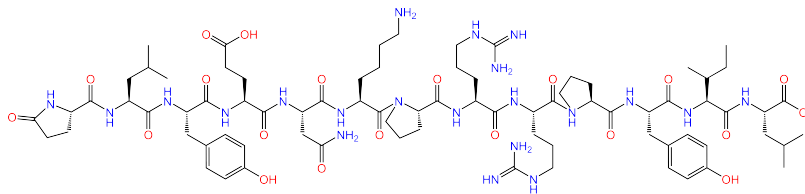
Tyr - Gly - Gly - Phe - Leu - Arg - Arg - Gln - Phe

(d) Bradykinin, *RPPGFSPFR*



Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg

(e) Neurotensin, *pELYENKPRRPYL*

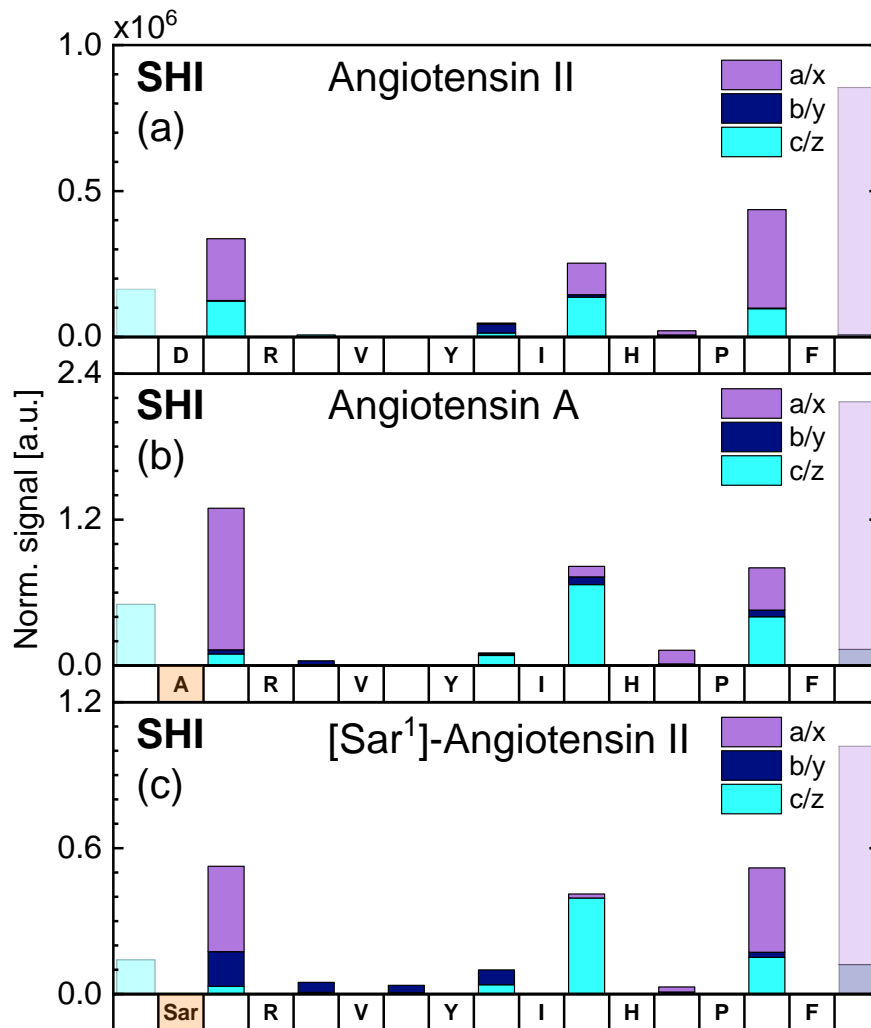


*p*Glu - Leu - Tyr - Glu - Asn - Lys - Pro - Arg - Arg - Pro - Tyr - Ile - Leu

Abbildung A.3: Strukturformel und Benennung der verwendeten Peptide (in Ein- und Dreibuchstabencode). (a) Substanz P, (b) *Leu*-Enkephalin, (c) Dynorphin B, (d) Bradykinin und (e) Neurotensin.

Anhang B:

Fragmentverteilungen mittels SHI bestrahlter Peptide



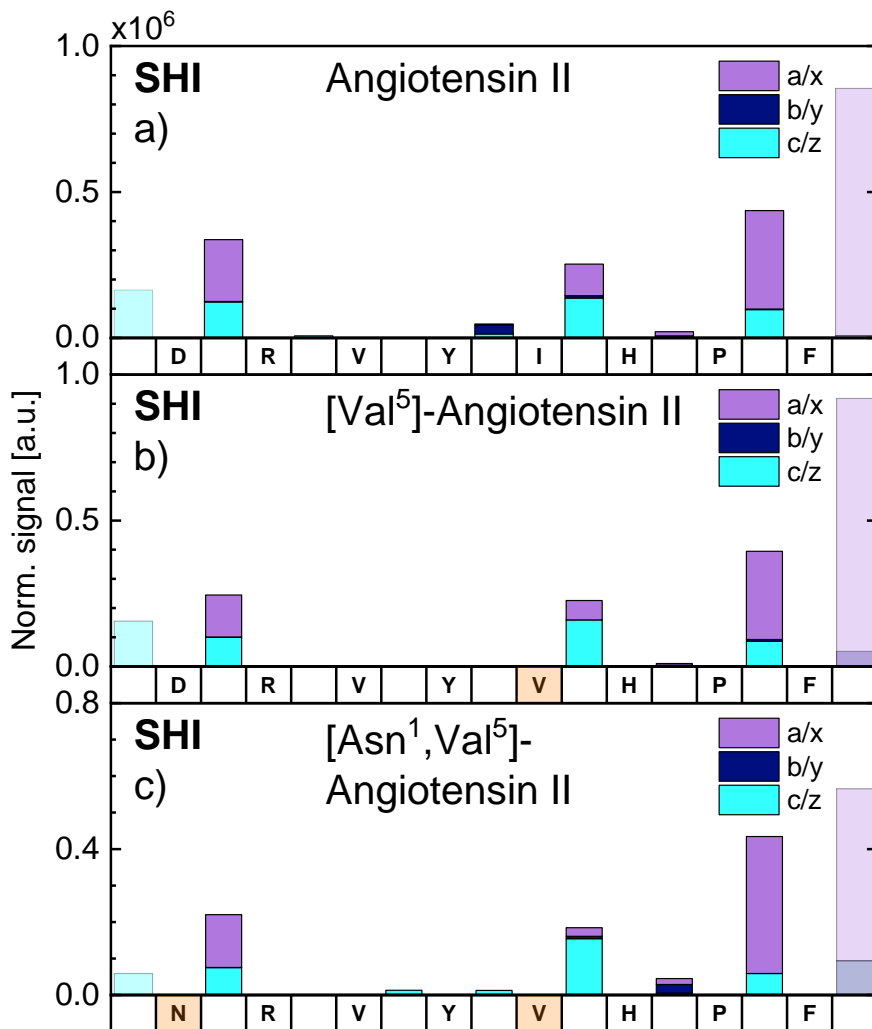


Abbildung B.2: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten mittels SHI induzierter und DINEC-MS beobachteter Fragmente unterschiedlicher Peptide. Es werden die Daten für Angiotensin II in (a), [Val⁵]-Angiotensin II in (b) und [Asn¹,Val⁵]-Angiotensin II in (c) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet. In orange markiert sind die Aminosäuren, die sich von der Sequenz des Angiotensin II unterscheiden.

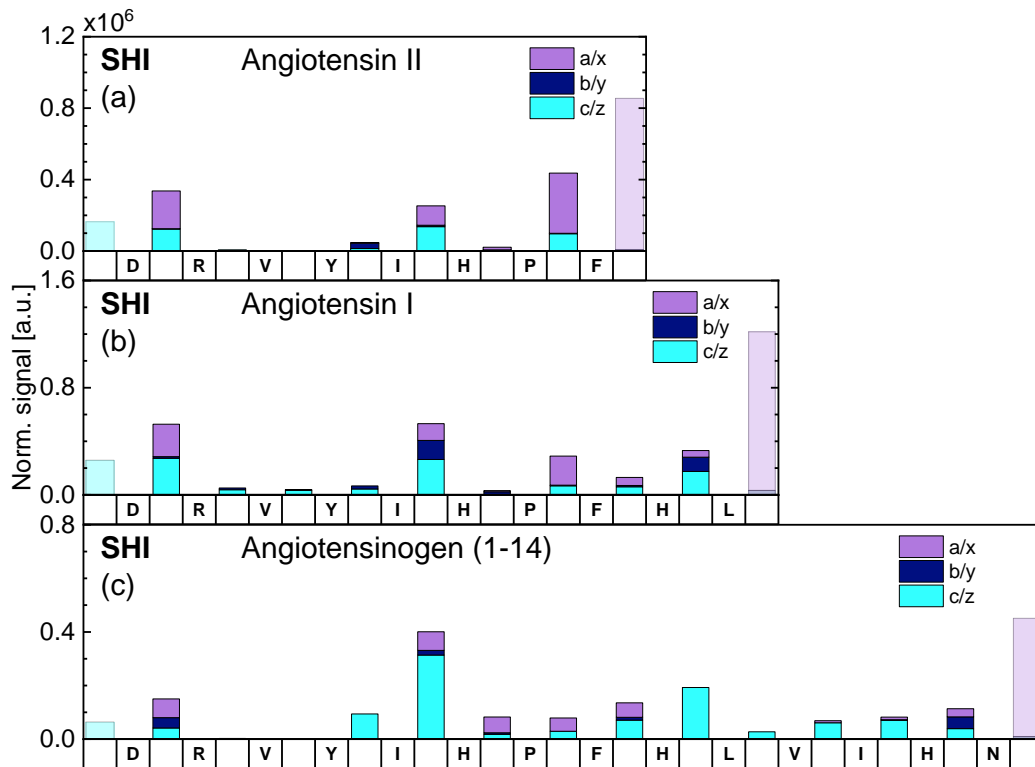


Abbildung B.3: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten mittels SHI induzierter und DiNeC-MS beobachteter Fragmente unterschiedlicher Peptide. Es werden die Daten für Angiotensin II in (a), Angiotensin I in (b) und Angiotensinogen (1-14) in (c) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet. In orange markiert sind die Aminosäuren, die sich von der Sequenz des Angiotensin II unterscheiden.

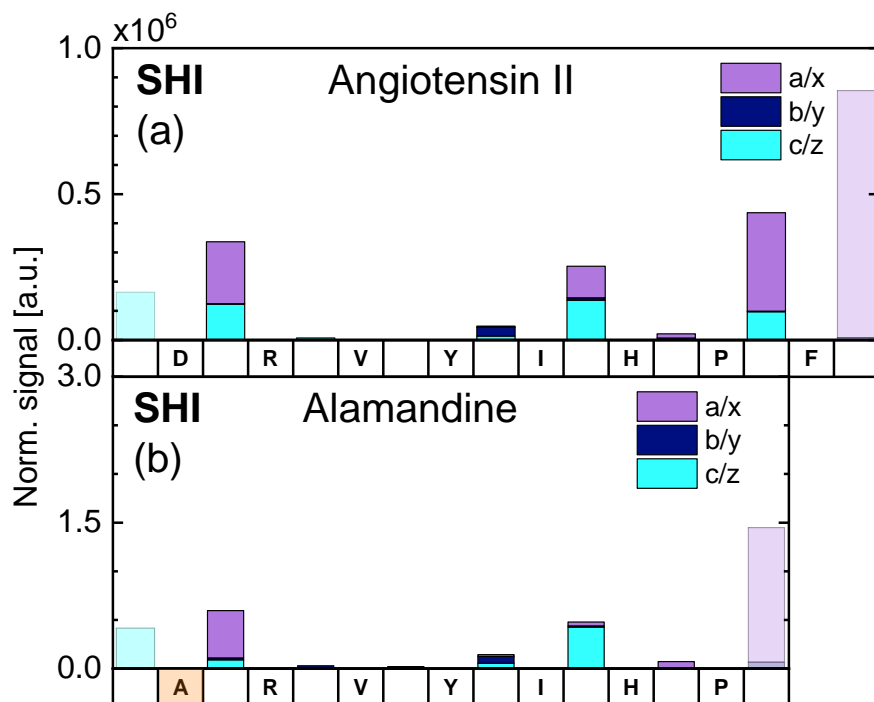


Abbildung B.4: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten mittels SHI induzierter und DINEC-MS beobachteter Fragmente unterschiedlicher Peptide. Es werden die Daten für Angiotensin II in (a) und Alamandine in (b) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet. In orange markiert sind die Aminosäuren, die sich von der Sequenz des Angiotensin II unterscheiden.

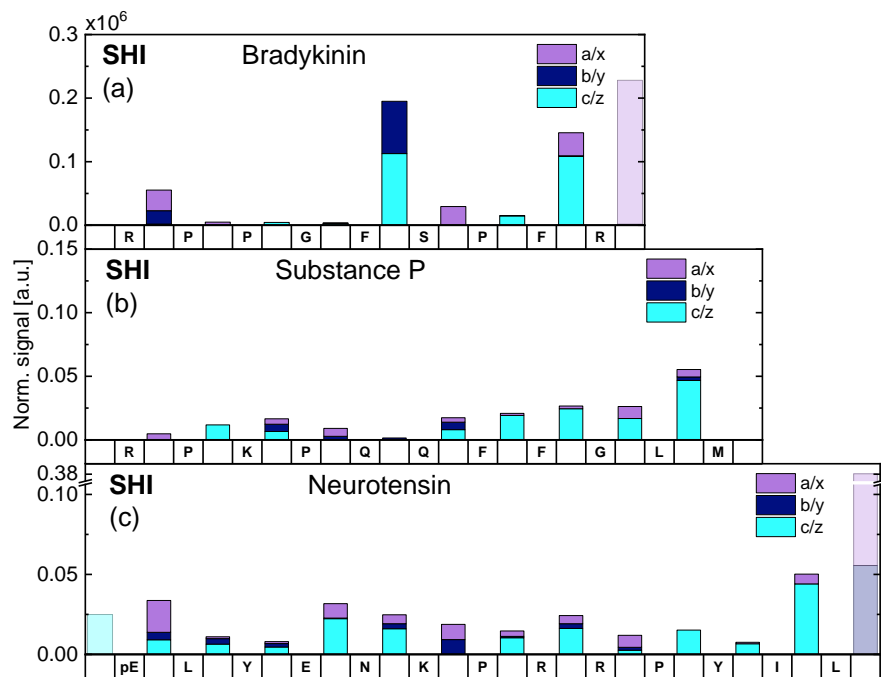


Abbildung B.5: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten mittels SHI induzierter und DINEC-MS beobachteter Fragmente unterschiedlicher Peptide. Es werden die Daten für Bradykinin in (a), Substanz P in (b) und Neurotensin in (c) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet.

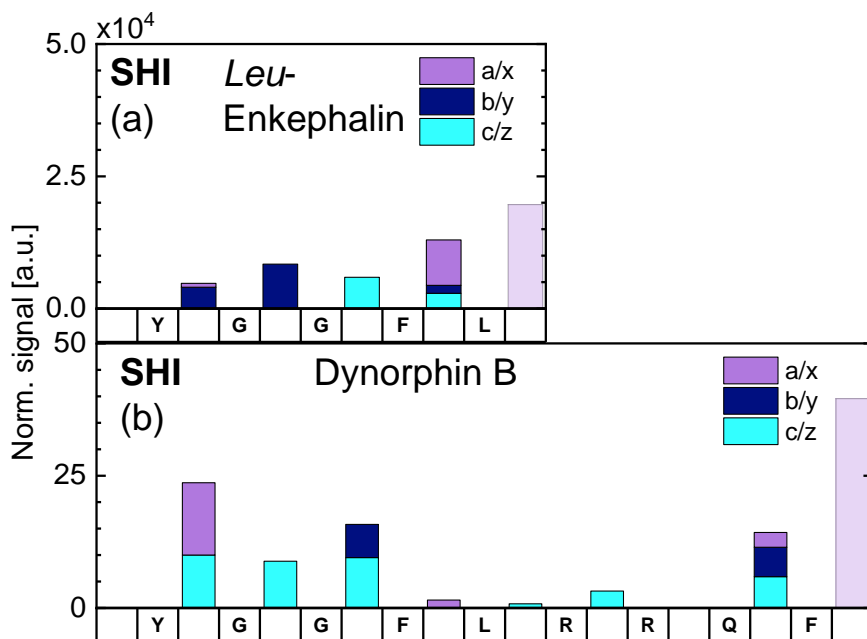


Abbildung B.6: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten mittels SHI induzierter und DINEC-MS beobachteter Fragmente unterschiedlicher Peptide. Es werden die Daten für *Leu*-Enkephalin in (a) und Dynorphin B in (b) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet.

Anhang C:

Spektrum und Fragmentverteilungen mittels CID fragmentierter Proben

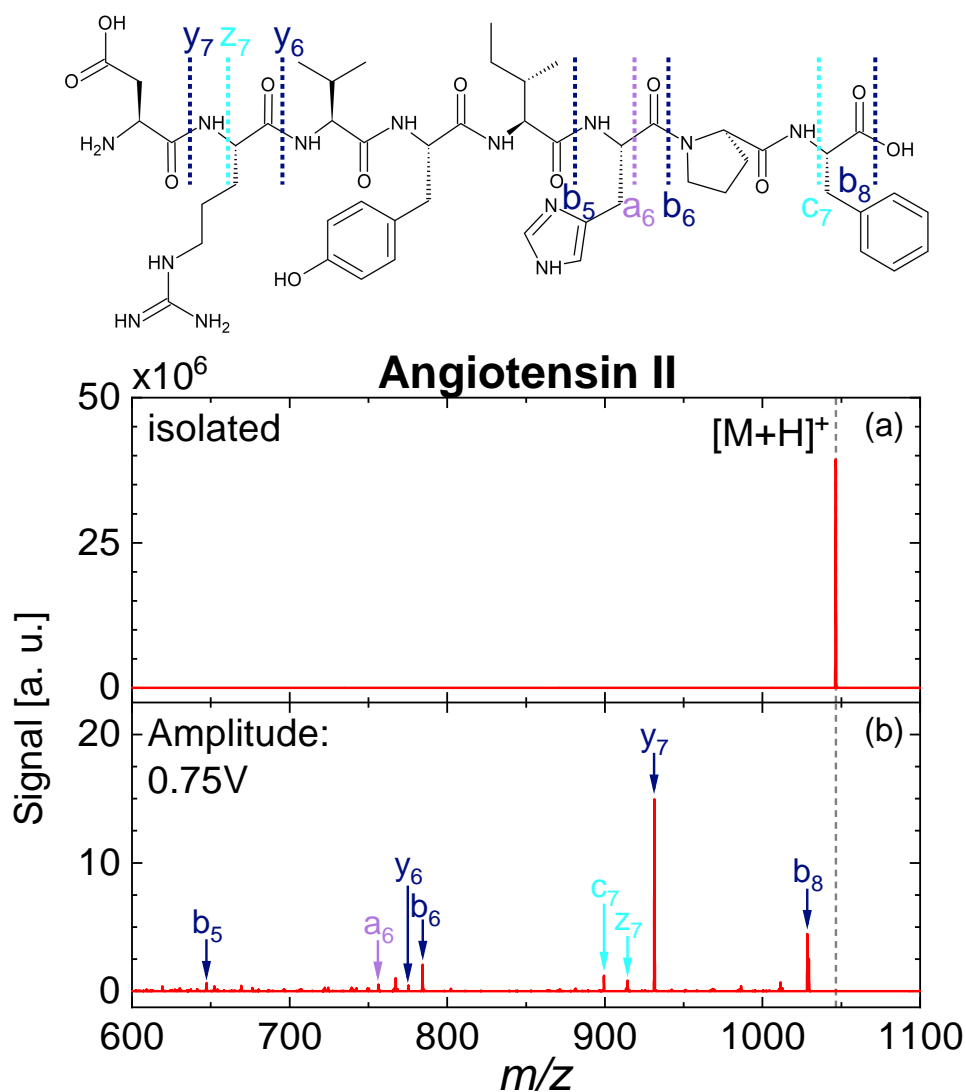


Abbildung C.1: (a) Spektrum des protonierten und isolierten ($\Delta(m/z) = 1,0$) Angiotensin II bei $m/z = 1046,5$. (b) kollisionsinduzierte Fragmentierung bei einer Anregungsamplitude von 0,75 V. Die entstandenen Fragmente sind entsprechend ihrer Schnitte benannt und wurden in die Strukturformel entsprechend ihrer Zuordnung eingezeichnet. Die größte Signalintensität ist bei dem spezifischen Fragment y_7 ($m/z = 931,5$) zu beobachten.

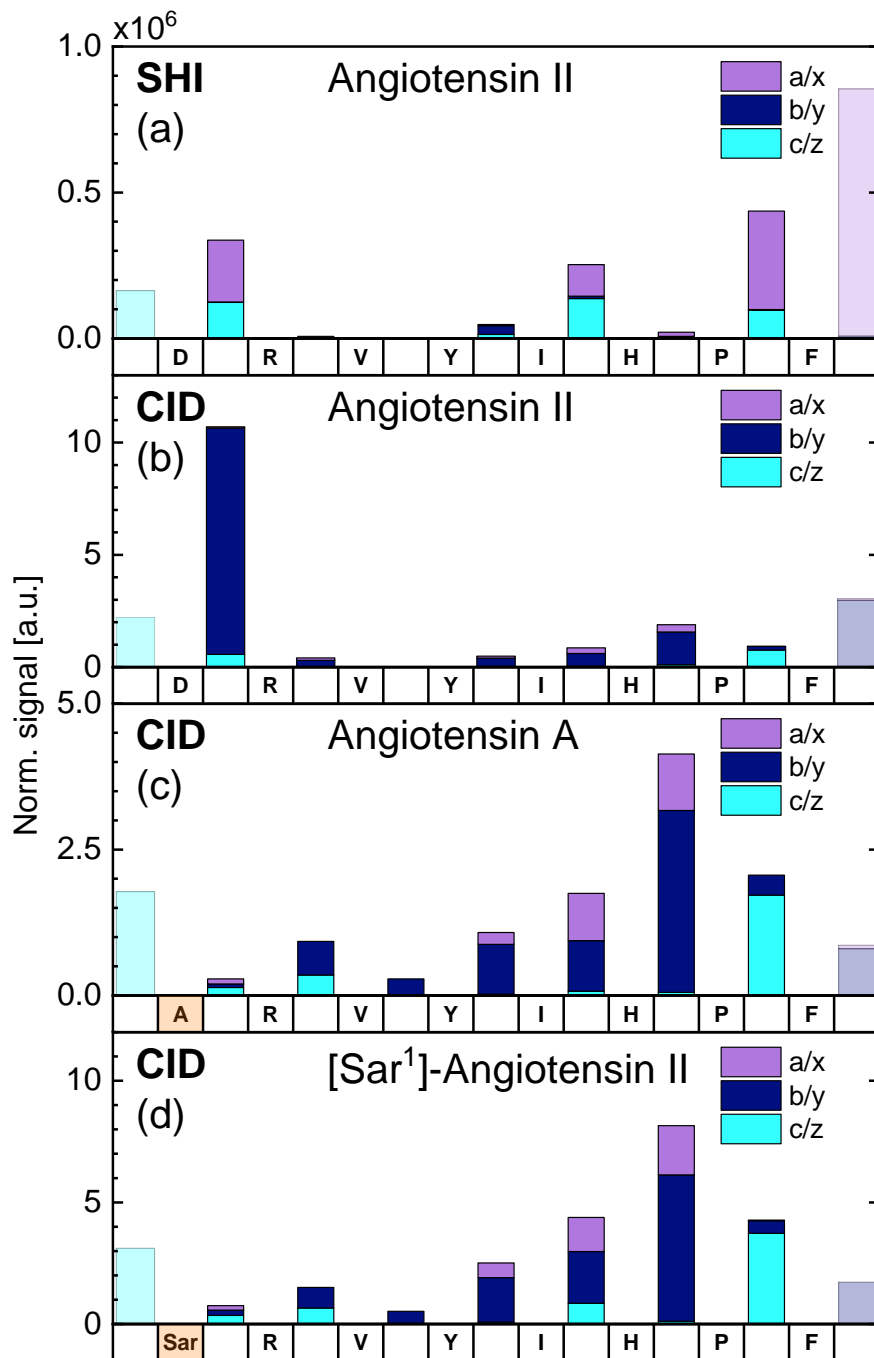


Abbildung C.2: Darstellung der Schnittintensitäten nach Fragmentierung mittels SHI (a) und CID (b)-(d), die entsprechenden Schnitten zugeordnet werden können. Es werden die Daten für Angiotensin II in (a) und (b), Angiotensin A in (c) und [Sar¹]-Angiotensin II in (d) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet. In orange markiert sind die Aminosäuren, die sich von der Sequenz des Angiotensin II unterscheiden.

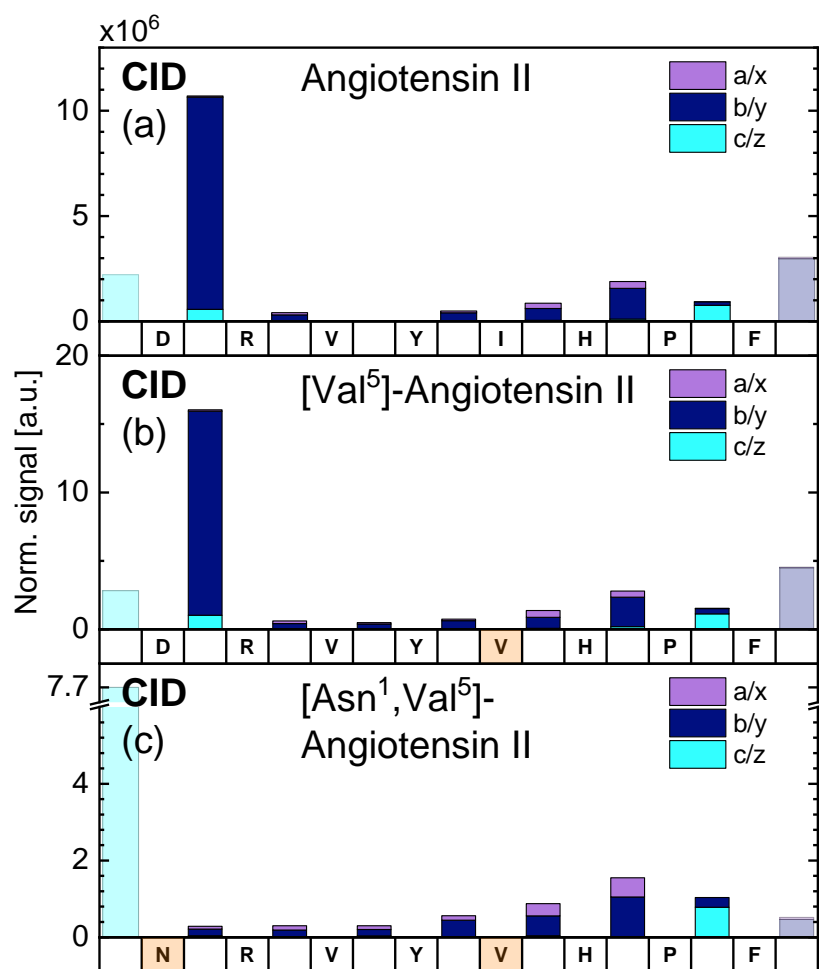


Abbildung C.3: Darstellung der Schnittintensitäten nach Fragmentierung mittels CID, die entsprechenden Schnitten zugeordnet werden können. Es werden die Daten für Angiotensin II in (a), [Val⁵]-Angiotensin II in (b) und [Asn¹Val⁵]-Angiotensin II in (c) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet. In orange markiert sind die Aminosäuren, die sich von der Sequenz des Angiotensin II unterscheiden.

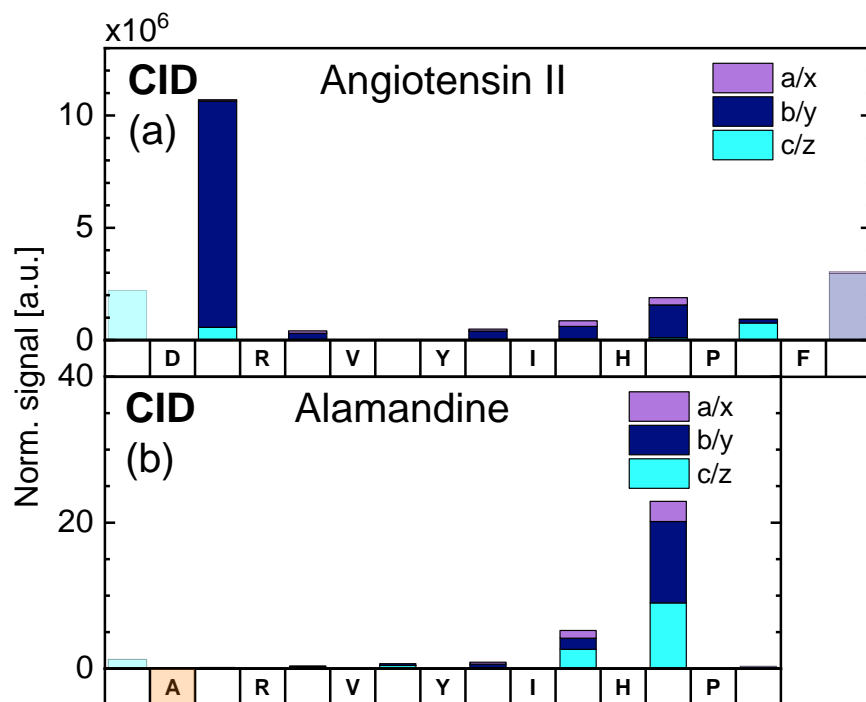


Abbildung C.4: Darstellung der Schnittintensitäten nach Fragmentierung mittels CID, die entsprechenden Schnitten zugeordnet werden können. Es werden die Daten für Angiotensin II in (a) und Alamandine in (b) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet. In orange markiert sind die Aminosäuren, die sich von der Sequenz des Angiotensin II unterscheiden.

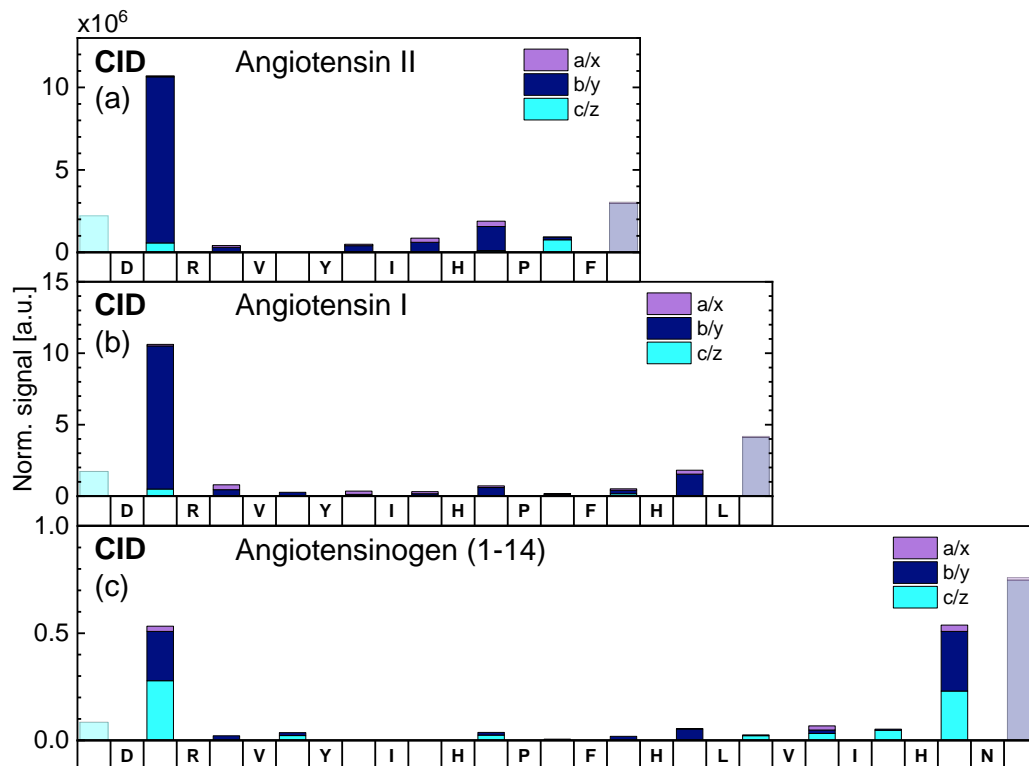


Abbildung C.5: Darstellung der Schnittintensitäten nach Fragmentierung mittels CID, die entsprechenden Schnitten zugeordnet werden können. Es werden die Daten für Angiotensin II in (a), Angiotensin I in (b) und Angiotensinogen (1-14) in (c) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet. In orange markiert sind die Aminosäuren, die sich von der Sequenz des Angiotensin II unterscheiden.

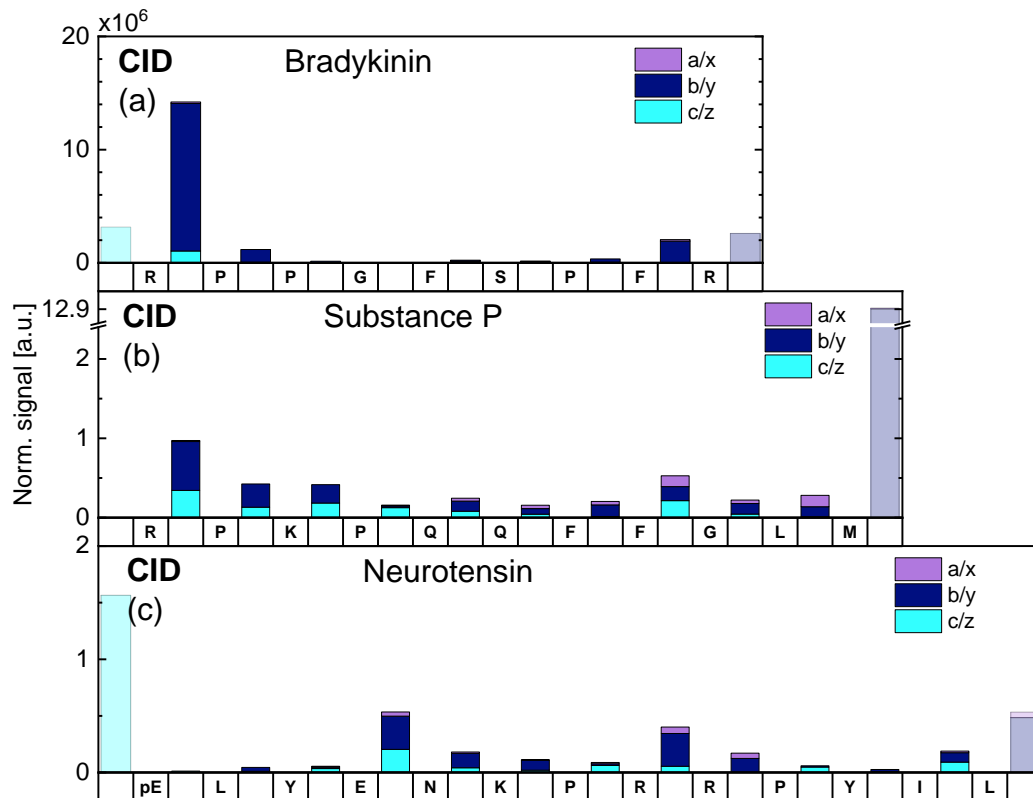


Abbildung C.6: Darstellung der Schnittintensitäten nach Fragmentierung mittels CID, die entsprechenden Schnitten zugeordnet werden können. Es werden die Daten für Bradykinin in (a), Substanz P in (b) und Neurotensin in (c) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet. In orange markiert sind die Aminosäuren, die sich von der Sequenz des Angiotensin II unterscheiden.

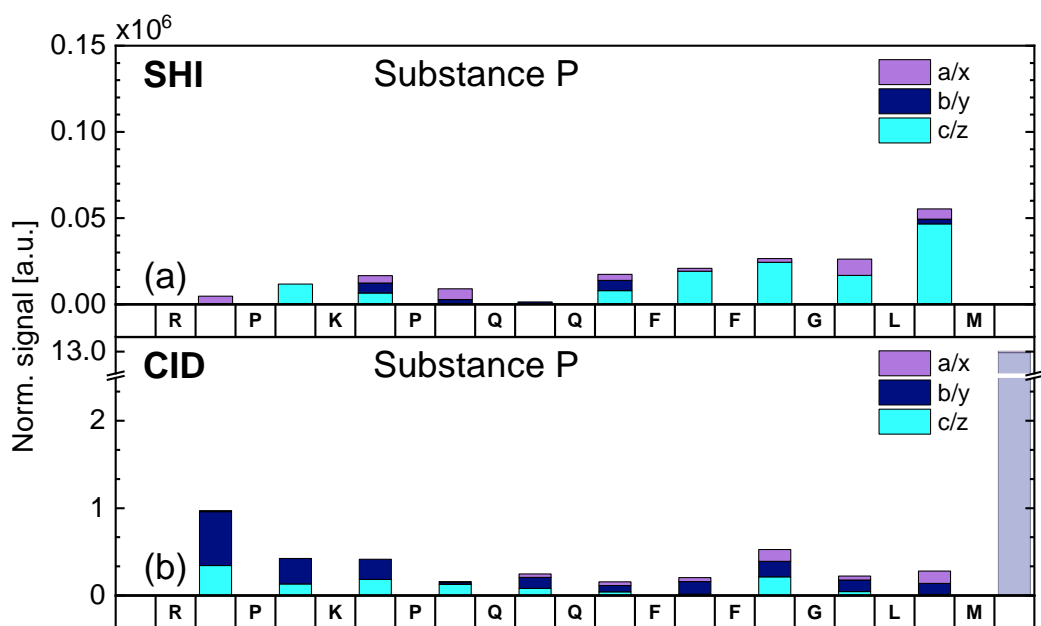


Abbildung C.7: Darstellung der Schnittintensitäten von Substanz P nach Fragmentierung mittels SHI (a) und CID (b), die entsprechenden Schnitten zugeordnet werden können. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet.

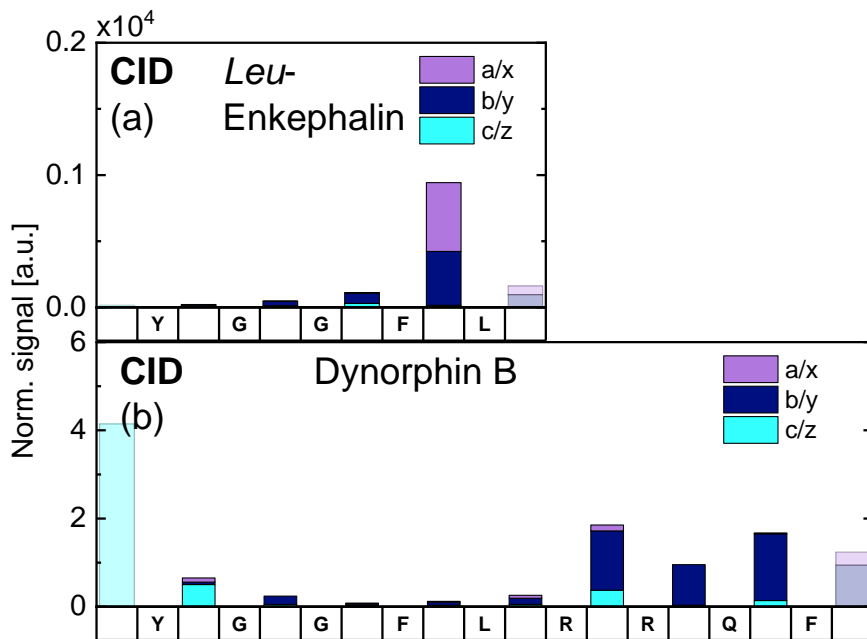


Abbildung C.8: Darstellung der Schnittintensitäten nach Fragmentierung mittels CID, die entsprechenden Schnitten zugeordnet werden können. Es werden die Daten für *Leu*-Enkephalin in (a) und Dynorphin B in (b) gezeigt. Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet. In orange markiert sind die Aminosäuren, die sich von der Sequenz des Angiotensin II unterscheiden.

Anhang D:

Fragmentierung in Abhängigkeit der SHI-Fluenz

Neben dem Einfluss der einzelnen Aminosäuren auf die Fragmentierung können auch die Eigenschaften der Anregung, beispielsweise durch die Ionenspezies und der damit verbundene Energieverlust selbst, untersucht werden. Ein weiterer Parameter ist die Fluenz, mit der die Peptidproben bestrahlt wurden. Je nach Fluenz werden Fragmente, die mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit entstehen, unterschiedlich stark gewichtet. In Kapitel 5.1 konnte gezeigt werden, dass der Fluss auf die Fragmentierung des Mutterpeaks keinen Einfluss zu haben scheint. Daher wird dieser nicht als verfügbarer Parameter behandelt. Die Fluenz hingegen zeigt einen starken Einfluss auf die Fragmentation, wie in zuvor in Abbildung 5.4 gezeigt.

In Abbildung D.1 sind die Fragmentintensitäten für Angiotensin II bei drei unterschiedlichen Fluenzen einer Bestrahlung mit Gold-Ionen ($^{197}\text{Au}^{26+}$, 4,8 MeV/u) dargestellt. Erkennbare Schnitte sind, wie bei Angiotensin II bekannt, an drei Positionen sehr ausgeprägt: Zwischen der Asparaginsäure (*D*) und Arginin (*R*), zwischen Isoleucin (*I*) und Histidin (*H*), sowie zwischen Prolin (*P*) und Phenylalanin (*F*). Diese Schnitte sind bei 1×10^{11} Ionen/cm² in Abbildung D.1(a) und 3×10^{11} Ionen/cm² in Abbildung D.1(b) ähnlich. Für 1×10^{12} Ionen/cm² in Abbildung D.1(c) hingegen kann beobachtet werden, dass der Prolin-Phenylalanin-Schnitt deutlich unterdrückt wird. Dies könnte an der hohen Fluenz liegen, da hier hauptsächlich a₇/c₇-Fragmente detektiert werden, die bei der Fluenz selbst weiter fragmentiert werden könnten. Gleiches auch für die anderen Fragmente der in Abbildung D.1(c) dargestellten Proben. Die allgemein niedrige Intensität lässt sich auf die hohe Fluenz zurückführen, die in den entstandenen Fragmenten weitere Dissoziationen herbeiführen könnte. Dennoch lässt sich bei allen Proben mit unterschiedlichen Fluenzen beobachten, dass die Schnitte an den gleichen Positionen auftreten. Auf die Selektivität der Fragmentation scheint die Fluenz keinen Einfluss zu haben.

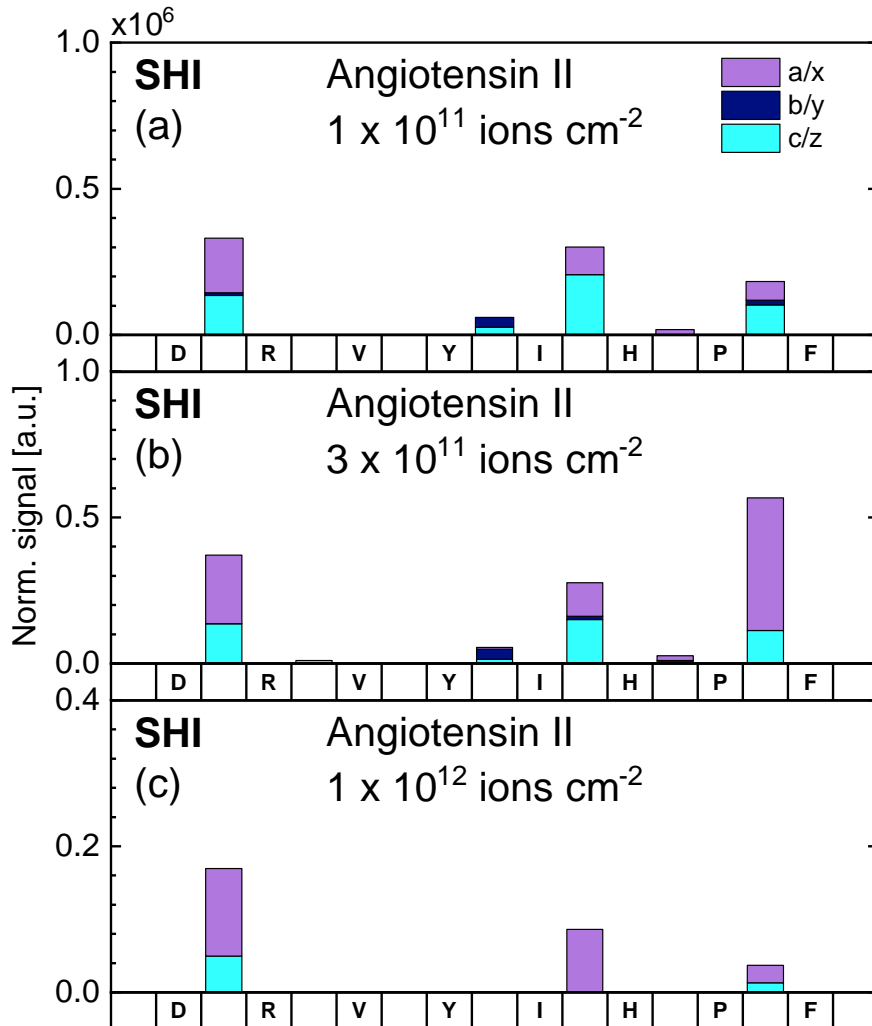


Abbildung D.1: Darstellung aller auf die Probenanzahl normierten Schnittintensitäten von Angiotensin II, die mittels SHI induzierter und DINEC-MS nach SHI Bestrahlung beobachtet wurden. Die untersuchten Fluenzen von $^{197}\text{Au}^{26+}$ (4,8 MeV/u) sind: (a) 1×10^{11} Ionen/ cm^2 , (b) 3×10^{11} Ionen/ cm^2 und (c) 1×10^{12} Ionen/ cm^2 . Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Peptid angegeben. Die Intensitäten sind nach den Schnitten (a/x, b/y, c/z) zwischen zwei Aminosäuren farblich gekennzeichnet.

Danksagung

All denen, die mich bei der dieser Arbeit unterstützt haben möchte ich an dieser Stelle danken:

Danke an meinen Doktorvater Prof. Dr. Michael Dürr für die gute Zusammenarbeit, das Vertrauen und die Betreuung während den letzten Jahren. Danke für die vielen Anregungen und Diskussionen, die mich und damit uns in dieser Thematik immer wieder weiter gebracht haben.

Ich möchte mich bei meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Stefan Schippers für die Zeit und Mühen des Gutachtens bedanken. Weiterer Dank geht auch an Prof. Dr. André Schirmeisen und Prof. Dr. Simone Sanna für ihr Mitwirken in der Prüfungskommission.

Ich bedanke mich für die finanzielle Unterstützung durch das BMBF-Verbundprojekt „Soft mass-spectrometric analysis of ion-induced fragmentation in organic and biomolecular samples by means of cluster-induced desorption/ionization“ (Projektnummer: *05K19RG1*) und durch die Stelle im Rahmen des Kooperationsvertrages der JLU und GSI.

Auch bei meinen (ehemaligen) Kollegen und Freunden im Institut für Angewandte Physik möchte ich mich bedanken: Timo, Pascal, Karolin, Jack, Sophie, Aaron, Mohit, Xaver, Alexandra Gabriel, Sylvia Schmandt und auch bei den Mitarbeitern der mechanischen Feinwerkstatt, sowie der Elektronikwerkstatt.

Ich möchte mich auch bei meinen Ansprechpartnern an der GSI Dr. Ina Schubert, Dr. Frieder Koch, Prof. Dr. Eugenia Toimil-Molares und Prof. Dr. Christina Trautmann bedanken, die mich bei den Bestrahlungen zu jeder Uhrzeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an die „MaWi’s“ bestehend aus Maio, Timo, Till, Kevin und unserem adoptiv-MaWi Fynn für ihre Unterstützung seit dem Wintersemester 2014/15: ob bei inhaltlichen Diskussionen oder beim Dummschwätzen, euch kann man ansprechen.

Ich möchte auch meinen Eltern und meiner Schwester für die mentale Unterstützung danken; ebenso auch meinen Freunden Finn & Laura, Markus & Leonie sowie Jens.

Danke Eva, dass du für mich während jeder Phase der Arbeit unermüdlich motiviert und beruhigt hast. Du bist immer da gewesen wenn ich dich brauchte. Ich hab dich lieb!

Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer eventuellen Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiats-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Unterschrift