
UNTERSUCHUNGEN DES ELEKTROSPRAY-
IONISIERUNGSPROZESSES ZUM MASSENSPEKTROMETRISCHEN
NACHWEIS NICHT-KOVALENTER KOMPLEXE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt
beim Fachbereich Chemie
der Johann Wolfgang Goethe – Universität
Frankfurt am Main

von Andrea Schmidt
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main (2000)
(DF1)

vom Fachbereich Chemie (14) der
Johann Wolfgang Goethe Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. T. Prisner
Gutachter: Prof. Dr. M. Karas
Prof. Dr. W. D. Lehmann

Datum der Disputation: 18.10.2000

1. EINLEITUNG	1
1.1. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	2
	Teil A: Theoretische Grundlagen
2. NICHT-KOVALENTE BIOMOLEKÜLKOMPLEXE	5
2.1. Die Stabilisierung von nicht-kovalenten Proteinkomplexen	5
2.2. Der massenspektrometrische Nachweis von nicht-kovalenten Komplexen	7
2.2.1. Nicht-kovalente Komplexe in der ESI-MS	8
2.2.2. Die Anwendung anderer Methoden zur Ionisierung nicht-kovalenter Komplexe	11
3. VOM GELÖSTEN ANALYTEN ZUM GASPHESENION	14
3.1. Das Prinzip der Elektrospray-Ionisierung	16
3.1.1. Die Zerstäubung von Flüssigkeiten im elektrischen Feld	16
3.1.2. Der Mechanismus der Desolvatisierung und Ionenfreisetzung	20
3.1.2.1. Der Zerfall der initialen Tropfen	20
3.1.2.2. Die Freisetzung präformierter Analytionen	22
3.1.3. Die Ionisierung in der ESI-MS	27
3.1.3.1. Der Mechanismus der Ionisierung	27
3.1.3.2. Der Einfluß von Reaktionen in Lösung auf die resultierende Verteilung der Ladungszustände	30
3.1.3.3. Der Einfluß von Reaktionen in der Gasphase auf die resultierende Verteilung der Ladungszustände	33
3.2. Praktische Aspekte der Elektrospray-Ionisierung	35
3.2.1. Probenpräparation	35
3.2.1.1. Das eingesetzte Lösungsmittel	36
3.2.2. Sprayquellen	37
3.2.2.1. Modifikationen der Standard-Sprayquelle	39
3.2.2.2. Die Nano-ESI-Quelle	40
3.2.3. Zwischen Sprayquelle und Massenanalysator	44
4. MASSENANALYSATOREN	49
4.1. Flugzeit-Massenspektrometrie	51
4.1.1. Grundlagen der Flugzeit-Massenspektrometrie	52
4.1.2. Der Einfluß der Startbedingungen	54
4.1.3. Flugzeit-Massenspektrometrie mit orthogonaler Extraktion	57
4.2. Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometrie	59
4.2.1. Das Prinzip der Quadrupol-Ionenfalle	59
4.2.2. Die Quadrupol-Ionenfalle als Massenanalysator	62
4.2.3. Mehrstufige MS-Experimente: MS ⁿ	64

5. MATERIALIEN UND METHODEN _____	66
5.1. Sprayquellen	66
5.2. Massenspektrometer	66
5.2.1. PerSeptive Biosystems MICKEY	66
5.2.2. PE Biosystems MARINER	69
5.2.3. Finnigan LCQ	70
Teil B: Ergebnisse und Diskussion	
6. PHYSIKALISCHE RANDBEDINGUNGEN DER ESI-MS _____	73
6.1. Die Transferkapillare und der geheizte Stickstoffgegenstrom im Vergleich	73
6.1.1. Die Strömung von Luft ins Massenspektrometer	73
6.1.2. Die desolvatisierende Wirkung verschiedener Aufbautypen im Vergleich	76
6.1.2.1. Bariumbromid als Indikator für die Desolvatisierungsbedingungen	76
6.1.2.2. Der geheizte Stickstoffgegenstrom und die geheizte Transferkapillare im praktischen Vergleich	78
6.2. Die Desolvatisierung von Makromolekülonen	80
6.2.1. Die Aktivierung nicht-kovalenter Komplexe während der Desolvatisierung	80
6.2.2. Die Stoßaktivierung verschiedener Ladungszustände	86
6.3. Die Axialgeschwindigkeit der Ionen im oTOF-MS	89
7. DER EINFLUß DER ZERSTÄUBUNGSBEDINGUNGEN AUF DAS IONENSIGNAL _____	93
7.1. Die diskontinuierliche Zerstäubung von Flüssigkeiten unter den Bedingungen der ESI-MS	93
7.2. Die Synchronisation des oTOF-Experiments mit dem Emissionsimpulsen	95
7.3. Ergebnisse: Synchronisierte ESI-oTOF-MS	98
7.3.1. Bariumbromid als Modellsystem	98
7.3.2. Angiotensin II und Maltoheptaose	100
7.4. Diskussion	102
8. DER EINFLUß DES LÖSUNGSMITTELS AUF DAS RESULTIERENDE IONENSIGNAL IN DER ESI-MS _____	106
8.1. Ergebnisse	107
8.1.1. Variation der Lösungsmittelzusammensetzung	110
8.1.2. Variation der Desolvatisierungsbedingungen	113
8.1.3. Der Einfluß des Analyten	114
8.2. Diskussion	115
8.2.1. Das Lösungsmittel als chemische Umgebung des Analyten	115
8.2.2. Das Lösungsmittel als Trägerkomponente	117
8.2.3. Das Lösungsmittel als Reaktionspartner in der Gasphase	120

9. ESI-MS-UNTERSUCHUNGEN ZUR DIMERISIERUNG VON GRAMICIDIN D _____	123
9.1. Die Peptidmischung Gramicidin D	123
9.2. Ergebnisse	125
9.2.1. ESI-MS-Analyse von Gramicidin D in verschiedenen Alkoholen	128
9.2.2. Gramicidin D in Lösungsmittelgemischen	131
9.3. Diskussion	134
9.3.1. Der Einfluß der Lösungsbedingungen auf den Nachweis von Gramicidin-Dimeren	135
9.3.2. Die Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung während der Desolvatisierung	138
10. DIE CHARAKTERISIERUNG VON PEPTID-ANIONEN-ADDUKTEN _____	141
10.1. Protonentransferreaktionen in der Gasphase an Peptiden und Proteinen	141
10.2. Ergebnisse	145
10.2.1. Neurotensin-Addukte mit verschiedenen Anionen	145
10.2.2. Trifluoracetat-Addukte verschiedener Peptide	149
10.3. Diskussion	154
10.3.1. Einfache Neurotensin-Anionen-Addukte	156
10.3.2. Der Einfluß des Anions auf die Adduktbildung	157
10.3.3. Der Einfluß des Peptids auf die Adduktbildung	158
11. DIE STABILITÄT NICHT-KOVALENTER KOMPLEXE IN DER ESI-MS _____	164
11.1. Strukturmerkmale von Hämoglobin und Myoglobin	165
11.2. Häm-Protein-Komplexe in der ESI-MS	166
11.3. Ergebnisse	167
11.3.1. ESI-MS-Untersuchungen von Hämoglobin und Myoglobin im positiven Ionenmodus	167
11.3.2. ESI-MS-Untersuchungen von Hämoglobin und Myoglobin im negativen Ionenmodus	173
11.3.3. ESI-MS-Untersuchungen von Hämoglobin und Myoglobin nach Reaktion mit DTT	175
11.4. Diskussion	178
11.4.1. Die Unterschiede zwischen den α - und β -Untereinheiten des Hämoglobins	178
11.4.2. Die Stabilität der Häm-Protein-Komplexe gegenüber Häm-Verlust in der Gasphase	179
12. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK _____	184
ANHANG A: Literaturverzeichnis	I
ANHANG B: Liste der verwendeten Analyte	X
ANHANG C: Aminosäuresequenzen verschiedener Hämoglobin-Varianten	XI
ANHANG D: Liste der verwendeten Abkürzungen	XIII

1. EINLEITUNG

Biopolymere, wie Nukleotide, Kohlenhydrate, Proteine und Peptide, stehen seit geraumer Zeit im Mittelpunkt intensiven Forschungsinteresses. Ziel der Untersuchungen ist es dabei, ein umfassenderes Verständnis biochemisch relevanter Vorgänge zu erlangen; auf der Basis der gewonnenen Erkenntnisse können in der Folge neue und effiziente Methoden zur gezielten Steuerung biochemischer Prozesse entwickelt werden.

Die Bioanalytik hat sowohl die umfassende Charakterisierung unbekannter Biopolymere zur Aufgabe, wie auch die Identifizierung bereits bekannter Substanzen. Zu diesem Zweck steht eine Reihe von analytischen Methoden zur Verfügung, wie z.B. chromatographische und elektrophoretische Trennverfahren, spektroskopische Untersuchungsmethoden und chemische bzw. biochemische Sequenzanalytik. Ferner finden die Röntgenstrukturanalyse und die NMR-Spektroskopie Einsatz zur detaillierten Aufklärung der dreidimensionalen Struktur. Neben diesen Verfahren kommt auch der Massenspektrometrie (MS) in der Bioanalytik eine immer größer werdende Bedeutung zu. Nach der Einführung „sanfter“ Ionisierungsmethoden, wie MALDI (*matrix-assisted laser desorption and ionization*, [Kar85], [Kar87]) und ESI (*electrospray ionization*, [Dol68], [Ale84], [Yam84]), welche den intakten Transfer auch großer, schwerflüchtiger Verbindungen in die Gasphase ermöglichen, ist die Massenspektrometrie zu einem leistungsfähigen und vielversprechenden Hilfsmittel zur Identifizierung und Strukturaufklärung von Biopolymeren geworden. Eine Übersicht über die Bandbreite der Einsatzmöglichkeiten findet sich beispielsweise bei Larsen und McEwan [Lar98]. Insbesondere ist die Massenspektrometrie in der Proteomanalyse zu Bedeutung gelangt (vgl. [Roe97], [Lot99]). Sie ermöglicht in diesem Bereich die schnelle und einfache Identifizierung der Proteine eines Organismus mit vollständig sequenziertem Genom, beispielsweise anhand des charakteristischen Peptidmassenmusters nach enzymatischer Spaltung.

Die Attraktivität massenspektrometrischer Verfahren zur Charakterisierung von Biopolymeren beruht auf mehreren Eigenschaften (vgl. [Loo97]):

- hohe Empfindlichkeit

Zur Analyse mittels MALDI-MS oder Nano-ESI-MS (vgl. Kap. 3.2.2.2) werden typischerweise Stoffmengen im Picomol- bis Femtomol-Bereich eingesetzt, welche in der Praxis noch gut zu handhaben sind. Der tatsächliche Probenbedarf zur Registrierung eines Massenspektrums ist nochmals geringer.

- geringer Zeitbedarf

Je nach Art des Massenanalysators (vgl. Kap. 4) erfolgt die Registrierung von Massenspektren im Zeitrahmen von Sekunden bis einigen Minuten; dem tatsächlichen Zeitbedarf einer Analyse sind allerdings – wie den anderen Methoden auch – noch die Phasen der Probenpräparation und der Interpretation der Resultate hinzuzurechnen.

- Genauigkeit

Die Molekülmassen eines Biopolymers oder seiner biochemisch bzw. physikalisch generierten Fragmente können sehr exakt ermittelt werden (vgl. Kap. 4), was zur Identifikation bekannter Verbindungen und Charakterisierung unbekannter Verbindungen von großem Wert ist.

Die MALDI-MS sowie die Standard-ESI-MS sind prinzipiell automatisierbar, was insbesondere für die schnelle Analyse großer Probenzahlen (in sogenannten *high-throughput*-Verfahren) vorteilhaft ist. Die Elektrospray-Ionisierung kann zudem direkt an chromatographische Trennverfahren wie HPLC gekoppelt werden (vgl. Kap. 3.2.2).

Der Nachweis nicht-kovalenter Komplexe mittels Massenspektrometrie gelang zwar bis heute in vielen hoffnungserweckenden Fällen, der Einsatz massenspektrometrischer Verfahren ist aber bei weitem noch nicht routinemäßig möglich (vgl. Kap. 2). Gerade nicht-kovalenten Komplexen kommt aber in biochemischen Prozessen eine besondere Bedeutung zu. So beruht häufig die Funktion von Biomolekülen auf der Bildung von spezifischen Komplexen auf der Basis von nicht-kovalenten Wechselwirkungen. Die Gruppe der relevanten Systeme umfaßt dabei z.B. Rezeptor-Ligand-, Enzym-Substrat- und Protein-Cofaktor-Komplexe oder die Quartärstruktur von Proteinen. Die Optimierung massenspektrometrischer Verfahren auf den Nachweis nicht-kovalenter Komplexe ist wünschenswert, um auch bei der Untersuchung dieser biologisch bedeutenden Systeme von den vorteilhaften Eigenschaften der Massenspektrometrie zu profitieren.

1.1. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die schonende Ionisierung von Makromolekülen mittels ESI ermöglicht es prinzipiell, auch nicht-kovalente Komplexe intakt in Gasphasenionen zu überführen und massenspektrometrisch zu analysieren (vgl. z.B. [Loo97]). Allerdings stellen die besonderen Eigenschaften nicht-kovalenter Komplexe Anforderungen an die Methode, die sich erheblich von den im Routineeinsatz bewährten Bedingungen der ESI-MS unterscheiden (vgl. Kap. 3). Die exakten Bedingungen, die für eine erfolgreichen Analyse dieser Substanzen von Bedeutung sind, sind noch nicht vollständig verstanden (vgl. [Loo98]). Einige Aspekte der Problematik, die mit

dem Nachweis nicht-kovalenter Komplexe in der ESI-MS verbunden ist, sind in Abb. 1.1 schematisch zusammengefaßt.

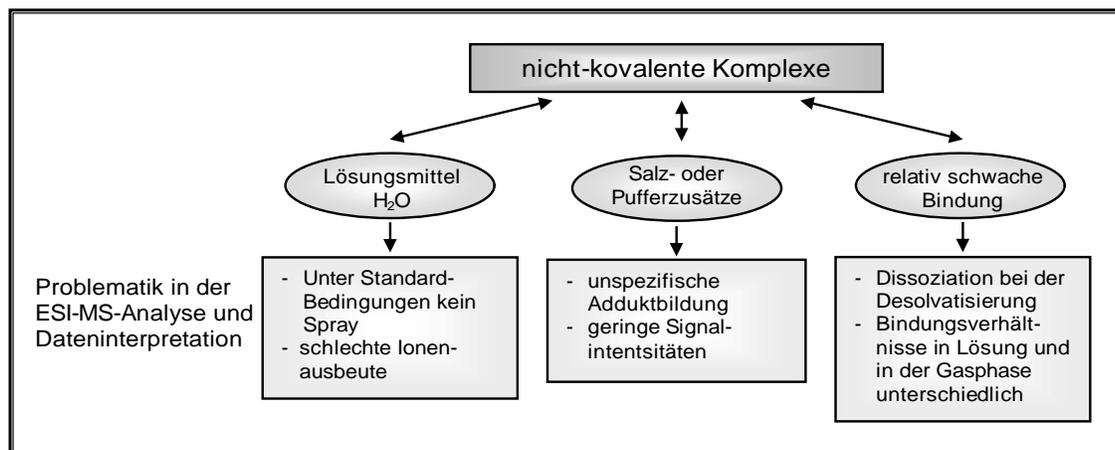


Abb. 1.1: Problematik beim Nachweis nicht-kovalenter Komplexe mittels ESI-MS.

Die Ursachen der dargestellten Problematik stehen in engem Zusammenhang mit den grundlegenden Charakteristika des ESI-Prozesses, welche in Kap. 3 der vorliegenden Arbeit vorgestellt werden. Um die Bedingungen der ESI-MS im Hinblick auf den Nachweis von nicht-kovalenten Komplexen optimieren zu können, ist ein umfassenderes Verständnis der dem Prozeß zugrundeliegenden Phänomene und der Eigenschaften der gebildeten Ionen unabdingbar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einzelne Phasen der ESI-MS während der Überführung eines Analyten aus der Lösung in die Gasphase näher zu untersuchen.

Die empfindliche Abhängigkeit der Konformation von Biomolekülen (insbesondere Proteinen und Peptiden) von Wechselwirkungen mit dem umgebenden Lösungsmittel macht die Verwendung wäßriger Lösungen, in der Regel mit Zusatz von Salzen oder Puffern, erforderlich, um nahezu physiologische Bedingungen zu gewährleisten. Unter dieser Voraussetzung ist in der Standard-ESI die Zerstäubung der Analytlösung nur schwer möglich und mit einer schlechten Ionenausbeute verbunden. Die Ursachen dieser Schwierigkeiten liegen in den Prinzipien der Zerstäubung und Freisetzung der Analytionen im ESI-Prozeß begründet, welche bislang noch nicht in allen Details verstanden sind. Die zugrundeliegenden Mechanismen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Experimente zum Einfluß der Zerstäubungsbedingungen und zum grundsätzlichen Einfluß von Lösungsmiteleigenschaften auf das resultierende Ionensignal an Modellsystemen untersucht.

Die gelösten Salze und Puffer bilden unspezifische Addukte mit dem Analyten, welche aufgrund der relativ schwachen Bindung innerhalb der nicht-kovalenten Komplexe nicht selektiv vor der massenspektrometrischen Analyse entfernt werden können. Die Bildung

unspezifischer Addukte erschwert die Bestimmung des exakten Molekulargewichts des Analyten und hat eine geringe Signalintensität in den Massenspektren zur Folge, da sich das Gesamtionensignal auf eine größere Anzahl Einzelsignale verteilt. Die Stabilität unspezifischer Addukte an den Analyten stellt somit einen kritischen Parameter für die erfolgreiche Analyse nicht-kovalenter Komplexe dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Faktoren für die Stabilität dieser Addukte von Relevanz sind.

Die häufig relativ schwache Bindung zwischen den einzelnen Komponenten eines nicht-kovalenten Komplexes ist für eine erfolgreiche Desolvatisierung im ESI-Prozeß kritisch, denn es gilt, unspezifisch an den Analyten gebundene Lösungsmittelmoleküle bzw. weitere unspezifisch gebundene Analyte zu entfernen, während die spezifischen Wechselwirkungen innerhalb des Analyten erhalten bleiben sollen. Neben der Wahl der Desolvatisierungsbedingungen hat daher auch die Stabilität des Komplexes in der Gasphase entscheidenden Anteil am Erfolg einer Analyse. Experimente zum Einfluß von Coulomb-Wechselwirkungen auf die Stabilität nicht-kovalenter Komplexe zeigen die Relevanz dieses Aspekts auf.

Die theoretischen Grundlagen der angewandten Methoden sind in den Kapiteln des Teils A der vorliegenden Arbeit zusammengestellt; die Resultate der durchgeführten Untersuchungen und ihre Diskussion finden sich im Teil B.

2. NICHT-KOVALENTE BIOMOLEKÜLKOMPLEXE

Unter der Bezeichnung „Komplexe“ (von lat. complexus = Umarmung) werden definitionsgemäß alle chemischen Verbindungen höherer Ordnung zusammengefaßt, die sich aus einfacheren, selbständig und unabhängig voneinander existierenden Verbindungen bilden (vgl. [Röm95], [Keu89]). Zur Verbindungsklasse der Komplexe gehören somit die anorganischen und organometallischen Koordinationsverbindungen; im weiteren Sinne werden auch supramolekulare Biomolekülverbindungen mit nicht-kovalenten Wechselwirkungen als Komplexe bezeichnet.

Als nicht-kovalente Proteinkomplexe sollen im folgenden alle Verbindungen bezeichnet werden, die mindestens ein Protein oder Peptid als Bestandteil aufweisen. Diese Gruppe der Komplexe schließt sowohl Aggregate aus Proteinen mit anderen Molekülen ein (z.B. Protein-Cofaktor-Komplexe oder Peptid-DNA-Komplexe), wie auch die Quartärstrukturen von Proteinen, die sich aus mehreren Polypeptiduntereinheiten zusammensetzen. Im folgenden Abschnitt werden zunächst die Prinzipien der Stabilisierung von nicht-kovalenten Proteinkomplexen zusammengefaßt. Grundsätzliche Bemerkungen zum Nachweis nicht-kovalenter Komplexe mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden werden im Anschluß gegeben.

2.1. Die Stabilisierung von nicht-kovalenten Proteinkomplexen

Die Existenz von spezifischen nicht-kovalenten Proteinkomplexen ist in der Regel eng an die Tertiär- bzw. Quartärstruktur der Proteine unter physiologischen Bedingungen gebunden. Die Ausbildung dieser Strukturen ist auf eine Reihe von zwischenmolekularen Wechselwirkungen zurückzuführen, die sowohl intramolekulare Wechselwirkungen innerhalb der Proteinsequenz als auch intermolekulare Wechselwirkungen mit dem umgebenden Lösungsmittel und darin enthaltener Elektrolyte umfassen. Die Grundzüge dieser Wechselwirkungen sollen an dieser Stelle dargelegt werden; eine detaillierte Übersicht liefern beispielsweise Burley und Petsko [Bur88].

Die Stabilisierung einer Proteinstruktur in Lösung erfolgt prinzipiell

- durch elektrostatische Wechselwirkungen und
- durch den hydrophoben Effekt
- durch Disulfidbrücken

Die Gruppe der elektrostatischen Wechselwirkungen beinhaltet dabei alle Interaktionen zwischen diskreten Ladungen und/oder elektrischen Multipolen. Einige Arten der Wechsel-

2. Nicht-kovalente Biomolekülkomplexe

wirkungen sind in Abb. 2.1 aufgeführt; daneben findet sich die Abhängigkeit der entsprechenden potentiellen Energie vom Abstand r zwischen den interagierenden Gruppen (nach [Bur88]). Elektrostatische Wechselwirkungen innerhalb eines Proteins umfassen somit sowohl ionische Wechselwirkungen zwischen geladenen Aminosäuren wie auch London-Kräfte zwischen unpolaren Aminosäuren. Sie können – wie in den erstgenannten Beispielen – in alle Raumrichtungen in gleichem Maße wirken (isotrope Wechselwirkungen); andere, wie beispielsweise die Wechselwirkungen zwischen Dipolen, sind räumlich anisotrop (vgl. Abb. 2.1).

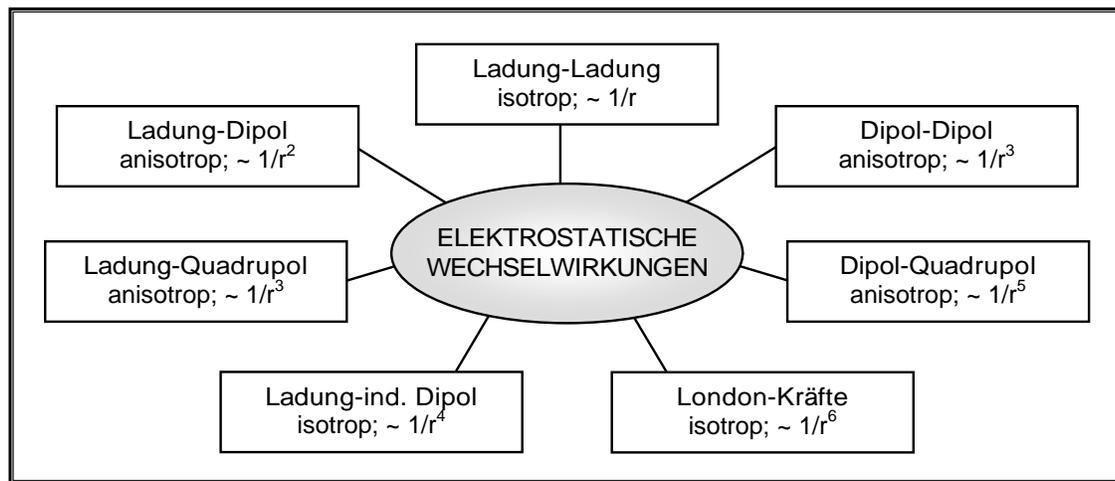


Abb. 2.1: Zusammenstellung von elektrostatischen Wechselwirkungen und Abhängigkeit der potentiellen Energie vom zwischenmolekularen Abstand r .

Die Stärke elektrostatischer Wechselwirkungen hängt neben der Distanz zwischen den interagierenden Gruppen auch davon ab, in welchem Maße das elektrische Feld zwischen diesen Gruppen abgeschirmt wird. Die Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums ist daher für das Ausmaß elektrostatischer Wechselwirkungen ebenfalls von Relevanz. Die Größenordnung des Beitrags verschiedener attraktiver elektrostatischer Wechselwirkungen zur Stabilisierung einer Proteinstruktur (ausgedrückt in der Änderung der freien Enthalpie ΔG) ist in Tab. 2.1 zusammengestellt (nach [Bur88], ^[1]).

ionische Wechselwirkungen	-12 bis -16 kJ/mol
Ion-Dipol-Wechselwirkungen	-12 kJ/mol
Wasserstoffbrückenbindungen (zwischen ungeladenen Gruppen)	-8 kJ/mol
Wechselwirkungen mit Quadrupolmomenten	-4 bis -10 kJ/mol

Tab. 2.1: Größenordnung des Beitrags einiger elektrostatischer Wechselwirkungen zur Stabilisierung einer Proteinstruktur.

¹ Die Wechselwirkungsenergie wird häufig in der Einheit kcal/mol angegeben; die hier angegebenen Werte wurden in die Einheit kJ/mol umgerechnet (1 cal = 4,184 J).

Im Vergleich zu den typischen Bindungsenthalpien kovalenter Bindungen (zwischen -150 und -1000 kJ/mol [Hol85]) ist demnach die Stabilisierung nicht-kovalenter Komplexe in Lösung durch elektrostatische Wechselwirkungen sehr gering. Die wesentliche Stabilisierung einer Proteinstruktur in wäßriger Lösung ist allerdings auf den sogenannten hydrophoben Effekt zurückzuführen [Bur88]. Sind auf der Außenseite eines Proteins polare Aminosäureseitenketten lokalisiert, so können diese gut durch das polare Lösungsmittel solvatisiert werden. Unpolare Gruppierungen werden dagegen in wäßriger Lösung durch einen „Käfig“ von Lösungsmittelmolekülen umgeben, welche untereinander durch eine große Zahl von Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind. Der Kontakt einer unpolaren Gruppe mit dem Lösungsmittel Wasser ist daher aus entropischer Sicht ungünstig. Im Hinblick auf eine maximale Entropie des Systems lagern sich unpolare Aminosäureseitenketten somit zusammen und ordnen sich bevorzugt im Inneren einer Proteinstruktur an (vgl. [Bur88]).

Aus diesen Fakten wird deutlich, daß das Lösungsmittel als umgebendes Medium einen entscheidenden Einfluß auf die Struktur von Proteinen in Lösung ausübt. Veränderungen des pH-Werts können entscheidend die Art der elektrostatischen Wechselwirkungen im Protein verändern, während der Zusatz von organischen Lösungsmitteln die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen dem Protein und seiner Umgebung beeinflusst. Die Denaturierung des Proteins unter Verlust seiner Tertiär- und Quartärstruktur ist somit die Folge.

2.2. Der massenspektrometrische Nachweis von nicht-kovalenten Komplexen

Zur Untersuchung von Struktur und Zusammensetzung nicht-kovalenter Proteinkomplexe sind heute eine Reihe von analytischen Techniken verfügbar. So liefern beispielsweise Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie detaillierte Informationen zur dreidimensionalen Struktur der Komplexe, erfordern aber große Probenmengen und einen hohen Zeitaufwand. Mit Hilfe von spektroskopischen Methoden (wie IR- und UV-Spektroskopie sowie Zirkulardichroismus) lassen sich insbesondere Konformationsänderungen von Proteinen verfolgen. Auch diese Verfahren erfordern relativ große Mengen Probenmaterials. Zur Analyse der Zusammensetzung von nicht-kovalenten Komplexen haben sich zudem Methoden wie die analytische Ultrazentrifugation, chromatographische und elektro-phoretische Trennungen bewährt. Allerdings erlauben diese Verfahren häufig nur eine recht ungenaue Bestimmung der interessierenden Molekülmassen (vgl. z.B. [Smi94], [Loo97]).

Neben dem Einsatz dieser Verfahren ist ebenfalls die Etablierung massenspektrometrischer Methoden Gegenstand intensiver Forschung. Eine kritische Diskussion zur Stellung der

Massenspektrometrie (MS) zwischen den etablierten Verfahren findet sich beispielsweise bei Smith et al. [Smi94] und insbesondere bei Loo [Loo97].

Die Attraktivität der Massenspektrometrie beruht dabei im wesentlichen auf folgenden Punkten (vgl. [Loo97]):

- geringer Zeitbedarf der Analysen
- geringer Probenbedarf aufgrund der hohen Empfindlichkeit
- hohe Genauigkeit der Massenbestimmung

Massenspektrometrische Verfahren sind insbesondere zur Ermittlung der stöchiometrischen Verhältnisse in nicht-kovalenten Komplexen geeignet, da diese Größe über die molekulare Masse des Komplexes direkt ermittelt werden kann. Voraussetzung hierfür ist allerdings, daß die Komplexe intakt in Gasphasenionen überführt werden, so daß prinzipiell der Einsatz schonender Ionisierungsmethoden erforderlich ist. Ferner ist bereits bei der Präparation der Proben zu berücksichtigen, daß die Komplexe unter nicht-physiologischen Lösungsbedingungen in der Regel bereits dissoziieren.

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins oder Proteinkomplexes unterscheidet sich in Lösung und in der Gasphase unter Umständen erheblich, was insbesondere auf das Fehlen von Solvatisierungseffekten in der Gasphase zurückzuführen ist. Dies ist zu beachten, wenn die Struktur dieser Verbindungen Gegenstand einer massenspektrometrischen Untersuchung ist. Wie bereits in Kap. 2.1 beschrieben, haben Wechselwirkungen zwischen Protein und Lösungsmittel beim hydrophoben Effekt entscheidenden Einfluß auf die dreidimensionale Struktur in Lösung. Zwar können einige Strukturmerkmale von Proteinen beim Transfer in die Gasphase aus kinetischen Gründen erhalten bleiben (vgl. [Smi93], [Smi97]); eine Untersuchung der biologisch relevanten Struktur sollte aber dennoch in Lösung vorgenommen werden. Mit massenspektrometrischen Methoden können Veränderungen der Proteinstruktur durch H/D-Austauschreaktionen in Lösung und anschließender Ermittlung von Unterschieden in der Molekülmasse untersucht werden. Ein Überblick zu dieser Technik findet sich beispielsweise bei Winston et al. [Win97].

2.2.1. *Nicht-kovalente Komplexe in der ESI-MS*

Die Methode der Elektrospray-Ionisierung (ESI; zur Beschreibung der Grundlagen vgl. Kap. 3) ist prinzipiell zum Nachweis von intakten nicht-kovalenten Komplexen geeignet, sofern die Analyse aus wäßriger, meist gepufferter Lösung und bei geringer Anregungsenergie der Ionen erfolgt. Diese Anforderungen unterscheiden sich allerdings erheblich von den Bedingungen

der ESI-MS in Routineanwendungen, welche in der Regel die Ermittlung der Molekülmasse kovalent gebundener Spezies zum Ziel haben. Die Konsequenzen, die diese Unterschiede für die ESI-MS-Analyse mit sich bringen, werden in Kap. 3.2 näher erläutert.

Erste erfolgreiche Anwendungen der ESI-MS zur Analyse nicht-kovalenter Komplexe wurden am Beispiel von intakten Rezeptor-Ligand-Komplexen [Gan91], Enzym-Substrat-Komplexen [Gan91a] bzw. Häm-gebundenem Myoglobin [Kat91] demonstriert. Seitdem konnte eine große Zahl nicht-kovalenter Proteinkomplexe mittels ESI-MS nachgewiesen werden. Eine umfassende Übersicht der analysierten Verbindungen findet sich bei Loo [Loo97], weitere Zusammenfassungen bisheriger Resultate liefern [Smi93], [Smi94], [Prz96], [Smi97], [Win97], [Vee99]. Zu den erfolgreich untersuchten Verbindungsklassen gehören beispielsweise:

- Proteine mit Quartärstruktur, wie z.B. Concanavalin A [Lig94], [Wan96a], Hämoglobin [Lig94], [Apl96] und Streptavidin [Sch95]
- Protein-Cofaktor-Komplexe, z.B. der Häm-Globin-Komplex in Myoglobin [Kat91], [Loo93], [Jaq93]
- Komplexe aus Proteinen und kleinen Molekülen, z.B. Streptavidin/Biotin [Eck95], [Sch95a], [Che98a]
- spezifische Metall-Protein-Komplexe, z.B. zwischen Zn^{2+}/Ca^{2+} und Matrilysin [Fen95a]

Die große Zahl erfolgreich detektierter Komplexe spiegelt allerdings nicht vollständig den Stand der Forschung auf diesem Gebiet wider, denn negative Resultate – wie das Scheitern des Nachweises eines bekanntermaßen in Lösung vorliegenden Komplexes – werden in der Regel nicht publiziert (vgl. [Loo97]).

Grundsätzlich ist zum Nachweis intakter nicht-kovalenter Komplexe eine sorgfältige Anpassung aller Analyseparameter (Lösungsmittelzusammensetzung, Betriebsbedingungen des MS-Systems) erforderlich. Dennoch sind bisher noch nicht alle Faktoren bekannt, die für eine erfolgreiche Analyse nicht-kovalenter Komplexe relevant sind, so daß beispielsweise zwei Experimentatoren bei Verwendung identischer Probenlösungen und identischen Betriebsbedingungen des MS-Systems dennoch unterschiedliche Resultate erhalten können [Loo98]. Auch stellt jedes Untersuchungssystem eigene Anforderungen an die Anpassung der ESI-MS-Parameter; Bedingungen, die auf den Nachweis eines Metalloprotein-Komplexes optimiert sind, können beispielsweise für den Nachweis der Quartärstruktur eines Proteins völlig ungeeignet sein [Loo97].

Bei der Analyse von Biomolekülen mittels ESI-MS sind häufig unspezifische Anlagerungen an den Analyten zu beobachten, die insbesondere mit weiteren ionischen Komponenten der Lösung (durch Puffer- oder Tensidzusatz) gebildet werden. Ferner können die Analyte selbst in Lösung aggregieren und somit unspezifische Multimere bilden. Um diese unspezifischen Komplexe von spezifisch in Lösung gebildeten nicht-kovalenten Komplexen zu unterscheiden, werden von Smith et al. [Smi93] folgende Richtlinien zur Identifizierung spezifischer Komplexe vorgeschlagen:

- Nach Optimierung der Desolvatisierungsbedingungen sollten die Signale der Komplexe mit dominanter Intensität in den Massenspektren auftreten.
- Komplexe sollten mit einer bevorzugten Stöchiometrie nachgewiesen werden; d.h. neben einem spezifischen Komplex A·B sollten keine wesentlichen Anteile von Komplexen A·A, B·B, A₂·B usw. auftreten.
- Nicht-kovalente Komplexe fragmentieren im Unterschied zu kovalenten Modifikationen bereits bei mäßiger Verschärfung der Desolvatisierungsbedingungen.
- Eine Denaturierung des Proteins in Lösung (durch Veränderung des pH-Werts oder Zusatz von organischen Lösungsmitteln) sollte zu einer deutlichen Veränderung in den Massenspektren führen.
- Die Modifikation von Komplexkomponenten sollte eine Änderung der relativen Intensität des Komplexes im Massenspektrum zur Folge haben.

Die Durchführung entsprechender Kontrollexperimente gewährleistet somit eine Unterscheidung spezifischer nicht-kovalenter Komplexe von unspezifischen Aggregaten. Die Bildung unspezifischer Komplexe stellt allerdings in anderer Hinsicht eine erhebliche Schwierigkeit in der ESI-MS-Analyse von nicht-kovalenten Komplexen dar. Gerade unspezifische Aggregate mit ionischen Komponenten der Lösung weisen häufig eine hohe Stabilität in der Gasphase auf (vgl. [Smi93]). Diese Anlagerungen können in der Regel nicht durch verstärkte Aktivierung der Analytionen entfernt werden, ohne auch den spezifischen nicht-kovalenten Komplex selbst zu zerstören. Die resultierenden Ionensignale intakter nicht-kovalenter Komplexe sind daher aufgrund von unspezifischen Anlagerungen an den Analyten häufig stark verbreitert, was die exakte Bestimmung der Molekülmasse des Komplexes erschwert (vgl. [Che98a]).

Über den grundsätzlichen Nachweis von nicht-kovalenten Komplexen mittels ESI-MS hinaus stellt die Ermittlung der Stabilität dieser Verbindung einen Gegenstand besonderen Interesses dar. Gerade die Entwicklung neuer Medikamente beruht häufig auf der Suche nach geeigneten

Komplexbildungspartnern für bestimmte Biopolymere, wobei die Komplexe eine möglichst hohe Stabilität *in vivo* aufweisen sollen. Die Entwicklung massenspektrometrischer Methoden zur Untersuchung dieser analytischen Probleme ist somit wünschenswert. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Stabilität nicht-kovalenter Komplexe in der Gasphase nicht zwangsläufig deren Stabilität in Lösung reflektiert (vgl. [Loo97]). Insbesondere ionische Wechselwirkungen gewinnen in der Gasphase an Bedeutung, während der hydrophobe Effekt in Abwesenheit eines Lösungsmittels nicht mehr existiert ([Smi93], [Smi97], [Loo97]). Bei der Beurteilung der Stabilität nicht-kovalenter Komplexe mit Hilfe der ESI-MS ist somit Vorsicht angebracht [Loo97].

Die Methode der ESI-MS stellt zusammenfassend ein vielversprechendes Hilfsmittel zur Analyse von nicht-kovalenten Komplexen dar. Es ist daher von besonderem Interesse, das Verfahren auch für den routinemäßigen Einsatz im Hinblick auf diese analytische Problemstellung zu optimieren.

2.2.2. *Die Anwendung anderer Methoden zur Ionisierung nicht-kovalenter Komplexe*

Die Methode der MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization* [Kar85], [Kar87]) bietet – wie auch die Elektrospray-Ionisierung – die Möglichkeit, Biopolymere auf schonende Weise in Gasphasenionen zu überführen und so intakt der massenspektrometrischen Analyse zugänglich zu machen. Einen Überblick über dieses Verfahren, das in der Analytik von Biopolymeren eine weite Verbreitung gefunden hat, liefern beispielsweise Karas et al. [Kar97a].

Prinzipiell wird zur MALDI-MS-Analyse ein gelöster Analyt mit einem hohen Überschuß einer gelösten Matrix ^[1] auf einer metallischen Unterlage zur Kokristallisation gebracht. Die so präparierte feste Probe wird im Vakuum kurzen, intensiven Laserimpulsen ausgesetzt, welche die Desorption und Ionisierung von Analytionen bewirken. Die MS-Analyse erfolgt im Anschluß meist mit Hilfe von Flugzeit-Massenanalysatoren (vgl. Kap. 4.1). Je nach emittierter Wellenlänge des verwendeten Lasers ist zwischen UV- und IR-MALDI zu unterscheiden; die heute kommerziell erhältlichen MALDI-MS-Systeme setzen meist N₂-Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm ein. Die Rolle der Matrix in der MALDI besteht zunächst in folgenden Punkten (vgl. [Kar87]):

- Gewährleistung einer räumlichen Isolation der Analytteilchen in der Präparation
- Absorption des Laserlichts und somit Eintrag von Energie in die Probe

¹ Als Matrix dienen in der Regel kleinere, organische Verbindungen, welche bei der vom verwendeten Laser emittierten Wellenlänge stark absorbieren (vgl. z.B. [Kar90a])

2. Nicht-kovalente Biomolekülkomplexe

Welche Reaktionen in der UV-MALDI letztendlich zur Ionisierung der Analyte führen, ist gegenwärtig noch nicht vollständig geklärt; eine Diskussion der Modellvorstellungen findet sich beispielsweise bei Zenobi et al. [Zen98] bzw. Karas et al. [Kar00].

Das Prinzip der MALDI und ein charakteristisches UV-MALDI-Massenspektrum, hier des Proteins Cytochrom C mit einer Molekulargewicht von 15359 Da, sind in Abb. 2.2 dargestellt. Aus der MALDI-Ionisierung gehen typischerweise niedrig geladene Analytionen hervor^[1], die im positiven Ionenmodus durch Protonierung oder Anlagerung von Kationen an den Analyten, im negative Ionenmodus dagegen meist durch Deprotonierungsreaktionen gebildet werden. Mehrfach geladene Analytionen werden in der MALDI-MS mit erheblich geringerer Signalintensität nachgewiesen. Charakteristisch ist für die MALDI ebenfalls, daß die Analytionen unspezifische Multimere zu bilden vermögen, wie beispielsweise das Cytochrom C-Dimer in Abb. 2.2. Zum Vergleich ist in Abb. 2.2 das ESI-Massenspektrum von Cytochrom C unter denaturierenden Lösungsbedingungen gegenübergestellt. Es zeigt den Analyten in der für diese Methode charakteristischen breiten Verteilung hoher Ladungszustände^[2].

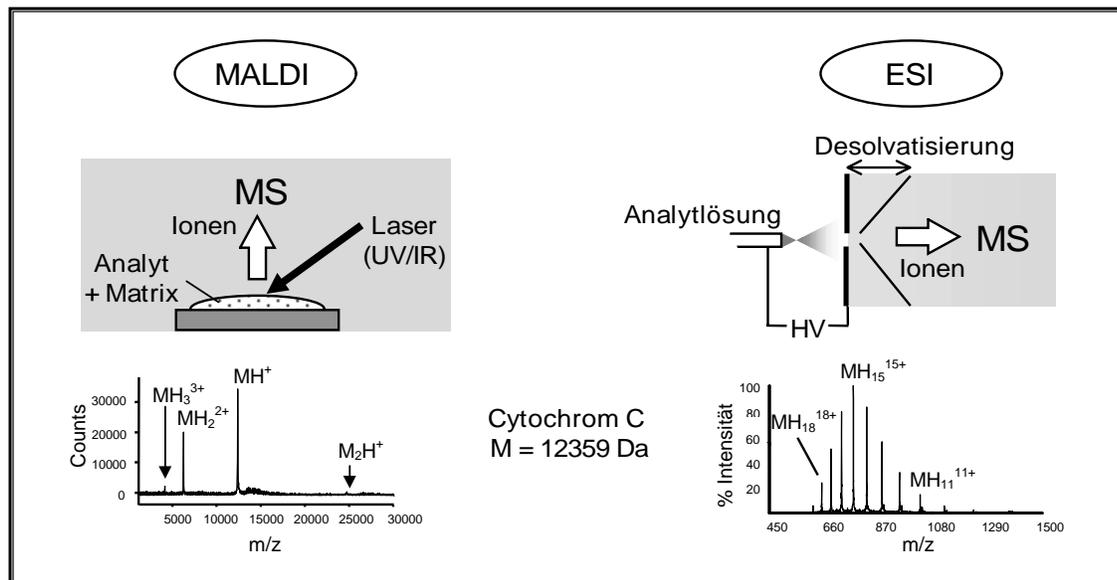


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des MALDI- und ESI-Prozesses sowie charakteristische Massenspektren des Proteins Cytochrom C in beiden Ionisierungsmethoden. Eine detaillierte Beschreibung des ESI-Prozesses findet sich in Kap. 3.

¹ In der Regel werden einfach geladene Analytionen mit dominanter Signalintensität nachgewiesen.

² Eine detaillierte Beschreibung der Prinzipien der ESI findet sich in Kap. 3.

Bereits zu Beginn der Etablierung der MALDI-Technik konnten einige Proteine mit intakter Quartärstruktur nachgewiesen werden ([Kar90], [Kar90a]), so daß Hoffnung auf eine grundsätzliche Anwendbarkeit des Verfahrens zur Analyse nicht-kovalenter Komplexe bestand. Es zeigte sich jedoch im Laufe der Zeit, daß der intakte Nachweis dieser Verbindungsklasse in der MALDI-MS eher eine Ausnahme als eine Regel darstellt. Zwar können in der MALDI-MS oft unspezifische Aggregate der Analyte beobachtet werden; spezifische nicht-kovalente Komplexe sind dagegen nur selten mit dominanter Signalintensität in den Massenspektren zu beobachten (vgl. [Hil98]). Ein grundsätzliches Problem stellen in der Regel bereits die Präparationsbedingungen der MALDI dar, die zu einer Denaturierung von Proteinen führen können. So werden die Matrices meist in organischen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen gelöst; überdies sind die gängigen Matrixsubstanzen Carbonsäuren. Aber auch bei Verwendung neutraler Matrices aus wäßriger Lösung können spezifische nicht-kovalente Komplexe häufig nur während der ersten Bestrahlung einer Stelle der Präparation erhalten werden („*first shot phenomenon*“, [Ros95]). Welche Faktoren die Dissoziation nicht-kovalenter Komplexe unter den Bedingungen der MALDI-MS verursachen, ist bisher noch nicht geklärt. Eine Diskussion möglicher Ursachen findet sich beispielsweise bei Thierolf [Thi00]. Die Methode der MALDI-MS ist somit bisher nur eingeschränkt zum Nachweis nicht-kovalenter Proteinkomplexe geeignet. Die Anwendbarkeit des Verfahrens insbesondere auf unbekannte nicht-kovalente Komplexe ist daher beim bisherigen Entwicklungsstand fraglich [Hil98].

Eine andere Laserdesorptions-/ionisationsmethode, welche prinzipiell den massenspektrometrischen Nachweis nicht-kovalenter Komplexe erlaubt, stellt das sogenannte LILBID-Verfahren dar (*laser induced liquid beam ionization/desorption*, vgl. z.B. [Pfe95], [Kle96a]). Diese Ionisierungsmethode beruht in ihren Grundzügen auf der Injektion einer Analytlösung in Form eines Flüssigkeitsstrahls in eine Vakuumkammer. Der Flüssigkeitsstrahl wird dort den Lichtimpulsen eines IR-Lasers ausgesetzt, welcher auf eine Absorptionswellenlänge des Lösungsmittels eingestellt ist. Dies führt zur Desorption und Ionisierung des gelösten Analyten, welcher in der Folge mit Hilfe eines Flugzeit-Massenspektrometers nachgewiesen werden kann. Mit Hilfe des LILBID-Verfahrens konnten spezifische nicht-kovalente Dimere von Gramacidin D bzw. einem Leucin-Zipper-Peptid aus alkoholischer Lösung detektiert werden ([Pfe95], [Kle96], [Kle96a], [Kle96b]). Bei Verwendung wäßriger Lösungen wurden ebenfalls intakte Peptid- und Proteinkomplexe, wie beispielsweise Hämoglobin, nachgewiesen [Wat99].

3. VOM GELÖSTEN ANALYTEN ZUM GASPHASENION

Das Phänomen der Zerstäubung von Flüssigkeiten im elektrischen Feld in kleine, hochgeladene Tröpfchen wurde bereits vor zwei Jahrhunderten beschrieben und schon Anfang dieses Jahrhunderts erstmals experimentell untersucht. Im Jahr 1968 zeigten die Arbeiten von Dole et al. [Dol68], daß auf diese Weise Makromoleküle aus einer Lösung intakt in Gasphasenionen überführt werden können; der analytische Nutzen dieses Phänomens als Ionisierungsmethode für massenspektrometrische Untersuchungen wurde erst später von Yamashita und Fenn [Yam84] bzw. Aleksandrov et al. [Ale84] demonstriert. Unter dem Namen „Elektrospray-Ionisierung (ESI)“ hat sich dieses Verfahren seither in der massenspektrometrischen Analytik von Makromolekülen etabliert und ist als besonders schonende Ionisierungsmethode gerade für die Untersuchung von Biopolymeren (wie Proteinen und Peptiden, Nukleotiden und Kohlenhydraten) von großer Bedeutung. Einen Überblick zum Einsatz der ESI-MS in der Bioanalytik findet sich z. B. bei [Lar98]; eine Zusammenstellung der Anwendungen auf anorganische und organometallische Proben ist bei [Col95] und [Ste99a] beschrieben.

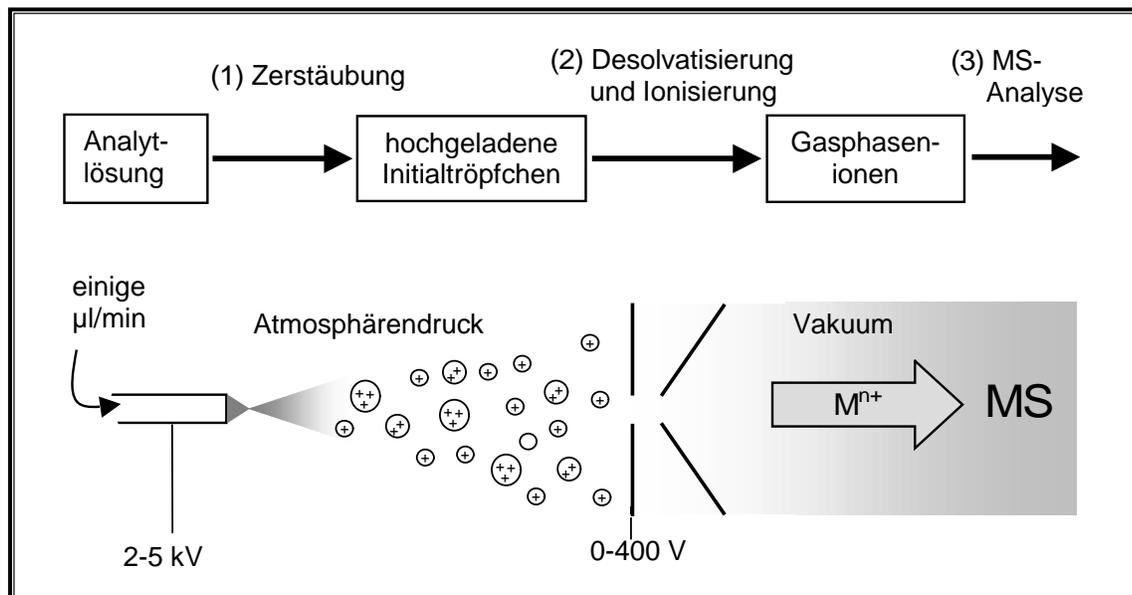


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des ESI-Prozesses im positiven Ionenmodus.

Grundsätzlich lassen sich im Prozeß der ESI-MS drei Teilschritte unterscheiden (s. Abb. 3.1):

- (1) die Zerstäubung der Analytlösung im elektrischen Feld,
- (2) die Desolvatisierung und Ionisierung des Analyten,
- (3) die massenspektrometrische Analyse der Analytionen.

Bei der ESI in ihrer ursprünglichen Form wird die Analytlösung mit einer Flußrate von einigen μl pro Minute durch eine Metallkapillare gepumpt. Besteht zwischen der Metallkapillare und einer Gegenelektrode in wenigen Zentimetern Abstand eine gewisse Potentialdifferenz von typischerweise 2 bis 5 kV, so wird die austretende Lösung im elektrischen Feld unter Atmosphärendruck in einen Nebel aus kleinen, hochgeladenen Tröpfchen zerstäubt (1). Durch einen geeigneten Aufbau im Einlaßbereich des Massenspektrometers (s. hierzu Kap. 3.2.3) kann dann der darin enthaltene Analyt desolvatisiert und ionisiert (2) für die MS-Analyse (3) erhalten werden. Der Strom, der bei diesem Vorgang über die Kapillare abfließt, liegt in der Größenordnung von 0,1 – 0,5 μA . Die Polarität der an der Kapillare angelegten Spannung legt die Polarität der generierten Tröpfchen und damit auch die Polarität der detektierbaren Ionen fest. Im „positiven Ionenmodus“ zur Detektion positiver Ionen besteht eine Potentialdifferenz positiven Vorzeichens zwischen Spraykapillare und Gegenelektrode, im „negativen Ionenmodus“ zur Detektion negativer Ionen eine Potentialdifferenz negativen Vorzeichens.

Als typisches Lösungsmittel für die ESI-MS von Proteinen im positiven Ionenmodus dient eine Mischung aus Wasser und organischem Lösungsmittel mit dem Zusatz von einigen Prozent Säure. So hat sich z. B. der Einsatz eines Lösungsmittelgemischs aus Wasser und Methanol im Volumenverhältnis 1:1 unter Zusatz von 1-5% Essigsäure bewährt. Der Analyt liegt in der Lösung typischerweise in einer Konzentration von 10^{-5} – 10^{-6} mol/l vor. Das ESI-Massenspektrum, welches das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) der Analytionen registriert, zeigt in der Regel daraufhin Signale, die dem Protein in einer Reihe von verschiedenen Protonierungsstufen und damit verschiedenen Ladungszuständen entsprechen:

$$m/z = (M_{\text{Protein}} + z\text{H}^+)/z$$

In der Praxis hat sich erwiesen, daß Proteine unter denaturierenden Lösungsbedingungen durchschnittlich pro 1000 Da ihres Molekulargewichts eine Ladung tragen [Smi91]. Der Schwerpunkt der resultierenden Ladungsverteilung liegt demnach in einem m/z -Bereich von 1000 – 1500 Thomson, welcher auch mit Quadrupol-Massenspektrometern (s. Kap. 4) für gewöhnlich zugänglich ist. Unter nicht-denaturierenden Lösungsbedingungen treten Analytionen dagegen typischerweise in niedrigeren Ladungszuständen auf (s. Kap. 3.1.3.2) und sind somit bei höheren m/z -Verhältnissen massenspektrometrisch zu detektieren.

Sowohl der Zerstäubungsvorgang als auch der Desolvatisierungs- und Ionisierungsschritt sind bis heute intensiv untersucht worden, wobei sich aber keine einheitlichen Modellvorstellungen für die jeweiligen zugrundeliegenden Mechanismen durchsetzen konnten. Im Hinblick auf eine vollständige Aufklärung des Ionisierungsmechanismus ist gegenwärtig Gegenstand der Forschung, in welcher Weise die beobachteten Ladungszustände des Analyten von Vorgängen in Lösung und in der Gasphase sowie von bestimmten Geräteparametern abhängig sind.

Im folgenden sollen zunächst die bisherigen Erkenntnisse über die einzelnen Schritte zusammengefaßt (Kap. 3.1) und im Anschluß die praktischen Aspekte für den Betrieb einer ESI-Quelle kurz beschrieben werden (Kap. 3.2). Für eine weitergehende Behandlung sei an dieser Stelle auf die entsprechende Literatur verwiesen, z. B. [Keb93], [Keb97], [Van97], [Wan97], [Dül99].

3.1. Das Prinzip der Elektrospray-Ionisierung

3.1.1. *Die Zerstäubung von Flüssigkeiten im elektrischen Feld*

Die Zerstäubung von Flüssigkeiten im elektrischen Feld findet ihr Einsatzgebiet nicht nur in der ESI-MS, sondern vielmehr auch in technischen Prozessen, in denen ein gezieltes Aufbringen von Material auf eine Trägersubstanz oder generell die Bildung eines feinen Aerosols von Relevanz sind. Zu diesen Anwendungen gehören unter anderem [Wig97]:

- elektrostatisches Lackieren
- Versprühen von Pflanzenschutzmitteln
- Oberflächenbeschichtung im Bereich der Nuklearforschung
- Gezieltes Auftragen von Halbleiterfilmen
- Brennstoff-Zerstäubung

Untersuchungen zum Mechanismus des Zerstäubungsvorgangs finden sich daher überwiegend aus dem Bereich der Aerosolforschung, wobei die Untersuchungsbedingungen (wie Lösungsmittel, Sprayquellengeometrie, Flußraten) stark von den Standardbedingungen der ESI-MS abweichen können. Die Übertragbarkeit der Daten auf diese spezielle Anwendung ist daher nur teilweise möglich.

Bringt man eine Elektrolytlösung in ein elektrisches Feld, so ordnen sich die in der Lösung enthaltenen Ladungsträger unter dem Einfluß des Feldes neu an. Ionen gleicher Polarität wie die angelegte Spannung wandern bevorzugt zur der Gegenelektrode zugewandten Flüssigkeitsoberfläche, während die Ladungsträger entgegengesetzter Polarität von der

Oberfläche wegdriften. Diese Ladungstrennung nach dem sogenannten „elektrophoretischen Mechanismus“ führt dazu, daß im Inneren der Flüssigkeit feldfreie Verhältnisse herrschen. Die repulsiven Kräfte zwischen Ionen gleicher Polarität wirken dabei der Oberflächenspannung des Lösungsmittels entgegen. Für das Verhalten einer Flüssigkeitsoberfläche im elektrischen Feld wurde von Taylor [Tay64] ein theoretisches Konzept entwickelt. Unter der Voraussetzung, daß die Lösung eine ausreichende (idealerweise metallische) Leitfähigkeit aufweist, nimmt die Flüssigkeitsoberfläche eine Konusform mit charakteristischem Öffnungswinkel an; es entsteht ein sogenannter *Taylor cone*. Die Konusoberfläche ist unter diesen Bedingungen als Äquipotentialfläche anzusehen, und das darauf senkrecht stehende elektrische Feld nimmt zur Konusspitze hin zu. Das Taylor'sche Modell impliziert allerdings, daß an der Konusspitze selbst (also bei unendlich kleinem Krümmungsradius) die Feldstärke unendlich groß wird, so daß dieser Bereich eine extreme Instabilität aufweist. In der Praxis wird daher die Emission von Flüssigkeit aus der Spitze des Konus beobachtet, sofern die angelegte Potentialdifferenz ausreichend groß ist.

Unter den Bedingungen der Standard-ESI wird die zu zerstäubende Analytlösung an der Spitze einer Metallkapillare einem elektrischen Feld ausgesetzt und abgebaut, wobei mittels einer Pumpe kontinuierlich Flüssigkeit nachgeliefert wird. Das von Taylor beschriebene statische Kräftegleichgewicht kann daher nicht mehr zur Beschreibung herangezogen werden. Es resultiert vielmehr ein Fließgleichgewicht, das von Flüssigkeitsnachschiebung durch die Kapillare und Emission aus dem (meist dennoch als *Taylor cone* bezeichneten) Konus aufrechterhalten wird. Eine Übersicht zur entsprechend modifizierten Gleichgewichtsbedingung wird z.B. bei Dülcks [Dül94] gegeben.

Die elektrische Feldstärke E_C am Kapillarenende kann unter der Voraussetzung, daß die Gegenelektrode groß und planar ist, abgeschätzt werden [Keb97]:

$$(Gl. 3.1) \quad E_c \approx \frac{2V_c}{r_c \ln(4d/r_c)}$$

mit V_c : angelegte Potentialdifferenz
 d : Abstand Kapillarenende – Gegenelektrode
 r_c : Außenradius der Kapillare

Eine Abschätzung der Größenordnung von E_c ergibt mit den für ESI typischen Werten $V_c = 3 \cdot 10^3$ V, $r_c = 10^{-4}$ m und $d = 10^{-2}$ m an der Kapillarenspitze eine Feldstärke im Bereich von $1 \cdot 10^7$ V/m. Bei Feldstärken dieser Größenordnung können insbesondere im negativen Ionenmodus elektrische Entladungsreaktionen an der Kapillarenspitze ablaufen, welche den ESI-Prozeß erheblich stören.

3. Vom gelösten Analyten zum Gasphasenion

Der für die ESI relevante Schwellenwert der angelegten Potentialdifferenz V_C , bei dem die Emission von Flüssigkeit beginnt (*onset voltage* V_{on}), ergibt sich näherungsweise gemäß [Smi86], [Keb97]:

$$(Gl. 3.2) \quad V_{on} \approx 2 \cdot 10^5 (r_C \gamma)^{1/2} \ln(4d/r_C)$$

mit d: Abstand Kapillarenende – Gegenelektrode
 r_C : Außenradius der Kapillare
 γ : Oberflächenspannung der Flüssigkeit

Die erforderliche Potentialdifferenz ist demnach bei gegebener Geometrie des Aufbaus um so größer, je höher die Oberflächenspannung der zu zerstäubenden Flüssigkeit ist. Zur Gewährleistung eines stabilen Sprays muß in der Praxis eine um einige hundert Volt größere Potentialdifferenz zwischen Spraykapillare und Gegenelektrode angelegt werden als die durch (Gl. 3.2) ermittelte.

Der Abbau von Flüssigkeit im elektrischen Feld erfolgt nach dem Überschreiten der Einsatzspannung nicht unbedingt kontinuierlich. Vielmehr lassen sich in der elektrohydrodynamischen Zerstäubung eine Reihe unterschiedlicher Zerfallsbereiche (sogenannte Spraymoden) unterscheiden, in denen die Lösung auch diskontinuierlich in kurzen Impulsen emittiert wird. Eine Übersicht zu diesem Phänomen liefern Grace und Marijnissen [Gra94] bzw. Cloupeau und Prunet-Foch [Clo94]. Unter ESI-MS-Bedingungen kann ebenfalls das Auftreten verschiedener diskontinuierlicher und kontinuierlicher Spraymoden sowohl optisch als auch anhand des über die Spraykapillare abfließenden Stroms beobachtet werden [Jur97], [Jur98].

Unter Bedingungen, wie sie auch in der ESI-MS angestrebt sind, erfolgt die Emission von Flüssigkeit aus dem Flüssigkeitskonus unter Ausbildung eines feinen Strahls (*jet*), dessen weiterer Zerfall schließlich zu einem Nebel aus geladenen Tröpfchen führt. Für den Mechanismus des Zerfalls findet sich in der Literatur keine einheitliche Modellvorstellung; ein Überblick über die verschiedenen Erklärungsansätze findet sich z. B. bei Dülcks [Dül94], [Dül99]. Mit steigender Leitfähigkeit der Lösung und Verringerung der Flußrate ist eine Verkleinerung des *jet*-Durchmessers verbunden, wie von Smith [Smi86] gezeigt werden konnte. Der Radius R der während der Zerstäubung entstehenden Tröpfchen und damit auch der Durchmesser ^[1] des *jets* d_j können nach Fernandez de la Mora abgeschätzt werden [Fer94]:

¹ Der in (Gl. 3.4) angegebene Faktor von 0,4 zwischen Tropfenradius und Durchmesser des *jet* erscheint allerdings relativ klein; meist wird von einem Faktor 0,5 zwischen Tropfenradius und jet-Radius ausgegangen (vgl. [Dül99])

$$(Gl. 3.3) \quad R \approx (V_n \epsilon \epsilon_0 / \kappa)^{1/3}$$

$$(Gl. 3.4) \quad d_j \approx 0,4 \cdot (V_n \epsilon \epsilon_0 / \kappa)^{1/3}$$

mit V_n : Flußrate
 ϵ : Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels
 ϵ_0 : Dielektrizitätskonstante des Vakuums
 γ : Oberflächenspannung des Lösungsmittels
 κ : Leitfähigkeit der Lösung

Unter den üblichen ESI-Bedingungen (Flußraten von wenigen $\mu\text{l}/\text{min}$, Leitfähigkeiten im Bereich von 10^{-1} Sm^{-1}) weisen die Tropfen einen Radius in der Größenordnung von 500 nm auf.

Die Ladung der Tropfen, die aus dem Zerstäubungsprozeß resultieren, spiegelt sich in dem über die Spraykapillare abfließenden Strom wider. Grundlegende Untersuchungen zur elektrohydrodynamischen Zerstäubung von Flüssigkeiten ergaben, daß mit Erhöhung der Leitfähigkeit einer Lösung eine Zunahme des Stromflusses verbunden ist [Pfe68], [Smi86]. Der Zusammenhang zwischen dem Strom I und der Leitfähigkeit κ läßt sich dabei durch folgende Beziehung wiedergeben [Tan91]:

$$(Gl. 3.5) \quad I \propto \kappa^n \quad \text{mit } 0,2 < n < 0,4$$

Der Transport positiv geladener Tröpfchen zur Gegenelektrode führt im positiven Ionenmodus an der Spraykapillare zu einem Defizit an positiven Ladungen. Dieses kann durch eine Oxidationsreaktion, also entweder durch die Entladung von Anionen aus der Lösung (z.B. $2\text{Cl}^- \rightarrow \text{Cl}_2 + 2\text{e}^-$) oder durch Produktion von neuen Ladungsträgern aus dem Kapillarenmaterial (z.B. $\text{Fe} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2\text{e}^-$) ausgeglichen werden. Im Gegenzug werden die positiv geladenen Tropfen beim Erreichen der Gegenelektrode durch e^- -Aufnahme neutralisiert; der Stromkreis ist damit geschlossen. Im negativen Ionenmodus erfolgt analog dazu der Ausgleich des Ladungsdefizits an der Kapillare durch Reduktionsreaktionen. Die ESI-Quelle kann daher als eine „besondere Art der Elektrolysezelle“ aufgefaßt werden – „besonders“, da der Transport der Ionen nicht wie üblich durch die Lösung, sondern in diesem Fall durch die Gasphase erfolgt [Bla91]. Redoxreaktionen an der Spraykapillare können auch eine Veränderung des pH-Werts der Lösung zur Folge haben, wie von Van Berkel et al. [Van96] gezeigt werden konnte. Im positiven Ionenmodus ist dabei z.B. eine Verringerung des pH-Werts durch die Reaktionen ($2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + \text{O}_2 + 4\text{e}^-$) bzw. ($4\text{OH}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 4\text{e}^-$) möglich. Der Effekt ist bei gegebenem Stromfluß um so größer, je geringer die Flußrate der Lösung ist. Taucht unter den Bedingungen der Nano-ESI (vgl. Kap. 3.2.2.8) ein Platindraht in

die Analytlösung, so kann aufgrund der beschriebenen Redoxreaktionen mit fortschreitender Zeit eine erhebliche Verringerung des pH-Werts beobachtet werden (innerhalb von zwei Stunden von pH 5,5 auf pH 1) [Sch99]. In einzelnen Fällen ist auch der Analyt selbst an den ablaufenden Redoxreaktionen beteiligt, wie Karancsi et al. am Beispiel von Benzofuran-derivaten demonstrierten [Kar97].

3.1.2. *Der Mechanismus der Desolvatisierung und Ionenfreisetzung*

Die geladenen Initialtropfen tragen – entsprechend dem elektrophoretischen Mechanismus – auf ihrer Oberfläche überschüssige Ladungsträger gleicher Polarität. Im Innern des Tropfens befinden sich diejenigen Ladungsträger, die nicht an der Aufladung des Tropfens teilnehmen, zusammen mit einer entsprechenden Anzahl von Gegenionen sowie ungeladene Moleküle [Enk97]. Der Aufenthaltsort von Analytteilchen in den Tropfen ist daher entscheidend von ihrer Ladung abhängig, welche im Falle nicht-präformierter Analytionen durch die Zusammensetzung des Lösungsmittels bestimmt wird. Tragen geladene Analytionen selbst zur Aufladung des Tropfens bei, so werden sie sich bevorzugt an der Tropfenoberfläche aufhalten, anderenfalls befinden sie sich hauptsächlich im Tropfeninneren.

Der Weg des Analyten aus den geladenen Initialtropfen zu einem massenspektrometrisch analysierbaren Gasphasenion findet in mehreren Schritten statt: Zerfall der initialen Tropfen, gegebenenfalls Ladung des gelösten Analyten und schließlich die Freisetzung des Analytions aus der Lösung in die Gasphase. Diese Desolvatisierung und Ionisierung gelingen unter den üblichen ESI-Bedingungen nur für einen geringen Teil der Analytlösung; der Großteil des Sprühnebels und des darin enthaltenen Analyten ist für die massenspektrometrische Untersuchung verloren. Die einzelnen Schritte werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.1.2.1. *Der Zerfall der initialen Tropfen*

Die durch den Spray-Prozeß gebildeten initialen Tropfen schrumpfen durch Lösungsmittelverdampfung auf ihrem Weg ins Massenspektrometer. Der Tropfenradius nimmt dabei um so schneller ab, je höher der Dampfdruck des Lösungsmittels bei der Temperatur des Tropfens ist [Keb93]. Durch Zufuhr von thermischer Energie wird die Verdampfung des Lösungsmittels und damit die Verkleinerung der Tropfen beschleunigt.

Die Anzahl der überschüssigen Ladungsträger auf dem Tropfen bleibt während dieses Prozesses unverändert, so daß das Oberfläche-zu-Ladungs-Verhältnis der Tropfen beim Schrumpfen abnimmt. Somit nehmen die repulsiven elektrostatischen Kräfte an der Tropfenoberfläche zu, die den Kräften der Oberflächenspannung entgegenwirken und

schließlich zum Zerfall des Tropfens führen. Die Ladung q , bei welcher ein sphärischer Tropfen mit dem Radius R gerade noch stabil ist, wird durch das Rayleigh-Stabilitätslimit [Ray82] gegeben:

$$(Gl. 3.6) \quad q_{Ry} = 8\pi(\epsilon_0\gamma R^3)^{1/2}$$

mit q_{Ry} : Ladung des Tropfens
 ϵ_0 : Dielektrizitätskonstante des Vakuums
 γ : Oberflächenspannung
 R : Tropfenradius

Experimentell konnte ermittelt werden, daß die initialen Tropfen mit einer Ladung in der Größenordnung von 50% ihres Rayleigh-Limits entstehen und daß aufgrund elliptischer Deformationen des Tropfens ein weiterer Zerfall bereits bei Erreichen von etwa 80% des Grenzwerts eintritt [Gom94]. Wie Hager et al. [Hag94] bzw. Gomez und Tang [Gom94] in ihren Untersuchungen photographisch nachweisen konnten, erfolgt dieser Zerfall ebenfalls unter Ausbildung eines *jets*. Ferner ist dieser Zerfall unsymmetrisch: der Ausgangstropfen verliert bei diesem Prozeß nur ca. 2% seiner Masse, aber 15% seiner Ladung. Dieser Anteil verteilt sich auf ca. 20 Tropfen der „nächsten Generation“, sog. *offspring droplets*, deren Radius nur noch etwa 1/10 des ursprünglichen Tropfens beträgt [Gom94]. Sowohl der verbleibende „Resttropfen“ als auch die *offspring droplets* können durch Verdampfung von Lösungsmittel weiter schrumpfen und infolgedessen erneut zerfallen. Die Länge des Zeitraums zwischen den Zerfallsschritten hängt bei einem gegebenem Lösungsmittel von Größe und Ladung der Tropfen ab. So benötigt ein initial gebildeter Tropfen (Lösungsmittel Methanol) etwa 500 μ s bis zum Zerfall, ein verbleibender Resttropfen etwa 70 μ s und ein *offspring droplet* etwa 40 μ s [Keb93].

Anhand der zuvor beschriebenen Fakten können die Veränderungen, die mit dem Tropfenzerfall einhergehen, abgeschätzt werden. Die Resultate einer exemplarischen Rechnung^[1] für das Modellsystem Wasser/Methanol im Volumenverhältnis 1:1, in dem ein Analyt in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l gelöst vorliegt, sind in Abb. 3.2 zusammengestellt. Die Rechnung geht allerdings von der vereinfachenden Annahme aus, daß der Analyt rein statistisch im Lösungsmittel vorliegt und daß sich die Zusammensetzung des Lösungsmittelgemischs während des Schrumpfens nicht ändert. Daher sind die dargestellten Größen nur als Richtwerte anzusehen. Es wird deutlich, daß die Verringerung des Tropfenradius durch Lösungsmittelverdampfung formal eine unter Umständen erhebliche Erhöhung der Analytkonzentration in den Tropfen zur Folge hat. Da die beim unsymmetrischen Zerfall

¹ T. Dülcks, Universität Bremen, persönliche Mitteilung

3. Vom gelösten Analyten zum Gasphasenion

gebildeten *offspring droplets* jedoch sehr klein sind, ist die absolute Anzahl darin enthaltener Analytteilchen nur gering.

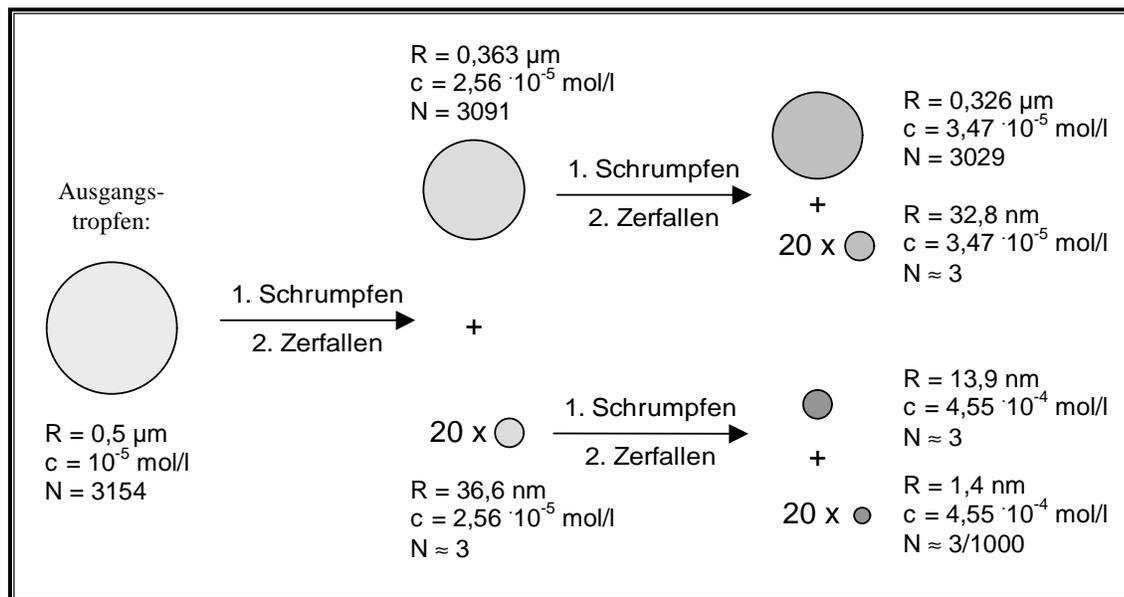


Abb. 3.2: Resultate einer vereinfachten Berechnung des Verlaufs des Tropfenzersfalls. Modellsystem: Methanol/Wasser (Volumenverhältnis 1:1), Analytkonzentration 10^{-5} mol/l R: Tropfenradius, c: Analytkonzentration, N: Anzahl der Analytmoleküle pro Tropfen

Bedingt durch den unsymmetrischen Zerfall weisen die *offspring droplets* ein deutlich höheres Ladung-zu-Masse-Verhältnis auf als die Ausgangstropfen. Die Ladungsträger auf der Tropfenoberfläche werden demnach durch den Zerfall in den *offspring droplets* angereichert. Trägt nun ein Analyt selbst zur Oberflächenladung bei, so sollte es ebenfalls mit erhöhter Wahrscheinlichkeit in die nächste Tropfengeneration gelangen ([Keb97], [Bah97]).

3.1.2.2. Die Freisetzung präformierter Analytionen

Das Gelangen des Analyten in die *offspring droplets* wird als essentieller Schritt auf den Weg vom gelösten Analyten zum Gasphasenion angesehen [Keb93], denn nur aus hinreichend kleinen und hochgeladenen Tropfen kann die Freisetzung von Analytionen erfolgen. Der aus dem ersten unsymmetrischen Zerfall verbleibende Resttropfen endet dagegen nach Entfernung allen Lösungsmittels als relativ niedrig geladener großer Rest, der analytisch nicht nutzbar ist. Niedrig geladene Reste der kleineren *offspring droplets* konnten dagegen von Winger et al. [Win93] als breite, unaufgelöste Ionensignalverteilungen mit hohen m/z-Verhältnissen massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

Für die Ionisierung eines Analyten sind grundsätzlich zwei Fälle zu unterscheiden. Liegt der Analyt schon als präformiertes Ion im Tropfen vor, so kann seine Freisetzung ohne weiteren Zwischenschritt erfolgen. Eine große Zahl von Analyten trägt jedoch keine feste Ladung, so

daß in diesen Fällen das Molekül zusätzlich noch ionisiert werden muß. Der Übersicht halber soll an dieser Stelle der Übergang präformierter Ionen behandelt werden; für die genauere Beschreibung des Ionisierungsvorgangs elektrisch neutraler Analyte sei auf Kap. 3.1.3 verwiesen.

Zur Freisetzung von Analytionen wird ein Tropfenradius von etwa 10 nm als „hinreichend klein“ angenommen. Zum Mechanismus der Entstehung von Gasphasenionen existieren prinzipiell zwei verschiedene Ansätze, von denen aber keiner bisher mit ausreichender Sicherheit nachgewiesen ist^[1].

Das ion evaporation-Modell (IEM) geht auf die Arbeiten von Iribarne und Thomson [Iri76], [Tho79] zurück und gilt in seiner ursprünglichen Form nur für kleine Analyte (z. B. Alkaliionen, quartäre Ammoniumionen, kleinere organische Verbindungen). Es postuliert die direkte Freisetzung eines Ions (evtl. mit einigen verbleibenden Solvensmolekülen) aus einem kleinen Tropfen ($R \approx 10$ nm) mit genügend hoher Ladung. Die Ionenfreisetzung wird im Rahmen dieses Modells als kinetisches Problem betrachtet und folgt einem Zeitgesetz 1. Ordnung, gemäß:

$$(Gl. 3.7) \quad -d \ln c/dt = k$$

Hierin gibt c die Konzentration des Analytions an der Tropfenoberfläche an; k ist die Geschwindigkeitskonstante des Prozesses. Der Betrag dieser Geschwindigkeitskonstanten hängt entscheidend von der Höhe der Energiebarriere ab, die ein Analytion beim Übergang in die Gasphase überwinden muß. Die Existenz dieser Barriere ist auf das gleichzeitige Einwirken von attraktiven und repulsiven Kräften auf ein Ion zurückzuführen, das einen solchen Prozeß durchläuft. Attraktive Kräfte resultieren dabei aus Wechselwirkungen zwischen Ion und Lösungsmittel, während repulsive Kräfte die Folge von Wechselwirkungen mit der geladenen Tropfenoberfläche sind. Für kleine Analytionen, z.B. Alkaliionen, kann die Höhe der Barriere minimiert werden, wenn die Freisetzung eines Analyt-Lösungsmittel-Clusters angenommen wird. Der Prozeß der „Ionenverdampfung“ wird im Rahmen des Modells als ausreichend schnell angesehen, wenn die Geschwindigkeitskonstante etwa 10^6 s^{-1} beträgt. Iribarne und Thomson zeigten in ihren Betrachtungen [Iri76], daß die genügend schnelle Freisetzung eines Analytions aus sehr kleinen Tröpfchen ($R \approx 10$ nm) durch Feldverdampfung erfolgen kann, bevor der Tropfen das Rayleigh-Stabilitätslimit erreicht und erneut zerfällt.

¹ Ein dritter Erklärungsansatz, der die Freisetzung von Ionen unmittelbar am Taylor cone postuliert, wurde von Guevremont et al.[Gue93], [Ke95] vorgeschlagen.

3. Vom gelösten Analyten zum Gasphasenion

Dem *ion evaporation*-Modell zufolge erfolgt der Übergang eines Ions aus dem Tropfen in die Gasphase mit einer großen Geschwindigkeitskonstante (und damit besonders effizient), wenn die Ladung auf dem Tropfen hoch und die freie Solvatisierungsenthalpie des Teilchens gering ist [Iri76]. Ferner gilt, daß die Oberflächenaktivität des Analyten und damit seine Aufenthaltswahrscheinlichkeit an der Tropfenoberfläche einen deutlichen Einfluß auf die Geschwindigkeit des Ionentransfers in die Gasphase hat [Fen93a].

Die Entstehung von Makromolekül-Gasphasenionen in verschiedenen Ladungszuständen konnte mit dem *ion evaporation*-Modell in seiner ursprünglichen Form zunächst nicht erklärt werden. Fenn et al. [Fen93a], [Fen97] stellten daher eine Modifikation des Modells vor, das auch diesem Phänomen gerecht werden soll. Dem vorgestellten Erklärungsansatz zufolge resultieren die unterschiedlichen Ladungszustände eines Analyten in gegebener Konformation aus unterschiedlichen Zeitpunkten der Freisetzung aus dem Tropfen. Die Anzahl der Ladungsträger auf dem Analyt ion spiegelt dabei die Ladungsdichte auf dem Tropfen wider. Analytmoleküle, die den Tropfen zu früheren Zeitpunkten verlassen, werden demnach in niedrigeren Ladungszuständen nachgewiesen als solche, die erst später in die Gasphase übergehen.

Die Anwendbarkeit des *ion evaporation*-Modells auf sehr große Analyte, die einen Radius in der Größenordnung von 1 nm oder mehr aufweisen (z.B. große Proteine), wird dennoch auch von entschiedenen Verfechtern dieser Theorie in Frage gestellt. Die Freisetzung eines solchen Makromoleküls erscheint in dem Zeitraum, in dem ein Tröpfchen mit $R \approx 10$ nm auf den Radius des Analyten selbst schrumpft, eher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist in einem solchen Fall, daß der Analyt als geladener, unverdampfbarer Rest des Tröpfchens verbleibt – was einer Ionenfreisetzung nach dem *charged residue*-Modell gleichkommt [Keb97], [Fer00].

Das *charged residue*-Modell (CRM)^[1] wurde zunächst von Dole [Dol68] vorgeschlagen und später von Röllgen [Röl87] gegen das *ion evaporation*-Modell verteidigt. Sein Gültigkeitsbereich umfaßt die Freisetzung sowohl kleiner als auch großer, makromolekularer Analyte.

Die Entfernung eines Ions mit Teilen seiner Solvathülle aus einem geladenen Tropfen wird von Röllgen [Röl87] als Einsatz eines elektrohydrodynamischen Desintegrationsprozesses auf molekularer Ebene angesehen. Da die Tropfen sehr klein sind, kann deren Oberflächenladung nicht mehr als kontinuierlich angesehen werden, sondern die Anwesenheit diskreter

¹ Das Modell wird ebenfalls als *single ion in a droplet theory* bezeichnet (SIDT; vgl. [Keb93]).

Ladungsträger muß berücksichtigt werden. Demnach ist ein Zerfall unter Freisetzung teilweise solvatisierter Ionen erst oberhalb des Rayleigh-Limits wahrscheinlich.

Dem *charged residue*-Modell zufolge reagiert auch ein sehr kleiner geladener Tropfen ($R \approx 10$ nm) auf die repulsiven elektrostatischen Kräfte an seiner Oberfläche, indem er erneut unsymmetrisch zerfällt. Die aus diesem Zerfall resultierenden *offspring droplets* sind aufgrund ihrer geringen Größe als Analyt-Lösungsmittel-Cluster anzusehen. Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß sie bei der üblicherweise eingesetzten Analytkonzentration nicht mehr als ein einziges Analytteilchen enthalten (vgl. Abb. 3.2). Neben überschüssigen Ladungsträgern und Analyt können die *offspring droplets* noch weitere Komponenten der Ausgangslösung enthalten, wie z.B. Gegenionen. Das Verdampfen des verbleibenden Lösungsmittels führt zur Entstehung eines geladenen Clusters, dessen flüchtige Bestandteile durch weitere Energiezufuhr ebenfalls verdampft werden können. Das Analytion verbleibt somit formal im geladenen Rest des Tropfens, dem sogenannten *charged residue*. Experimentelle Resultate weisen darauf hin, daß ein nur schwach solvatisiertes Analytion, welches sich bevorzugt an der Tropfenoberfläche aufhält, bevorzugt in die *offspring droplets* gelangt und so mit erhöhter Wahrscheinlichkeit als Gasphasenion nachweisbar ist [Wan98], [Wan00].

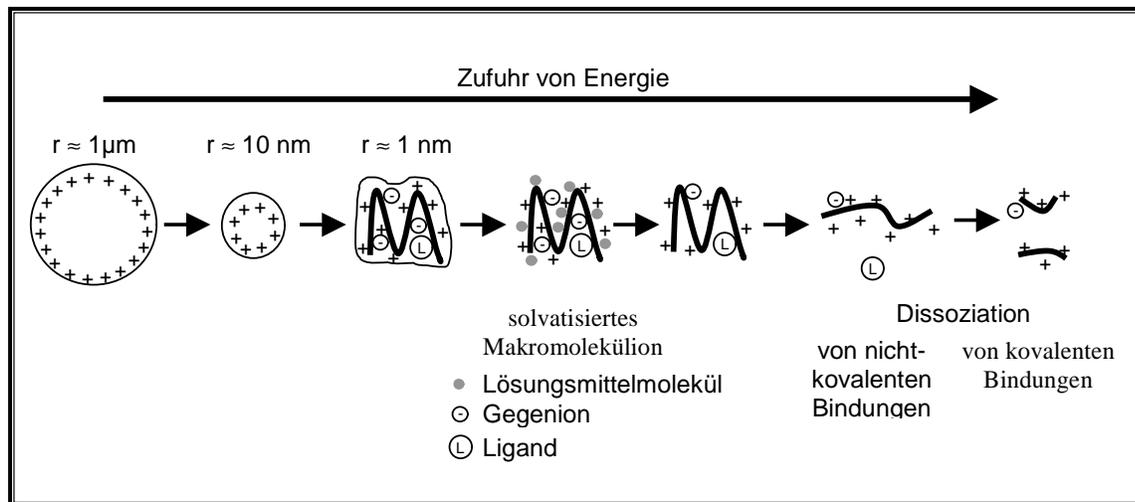


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Bildung von Makromolekülonen nach dem *charged residue*-Mechanismus (nach [Smi97]).

Die Überführung eines nicht-kovalenten Makromolekül-Komplexes in ein Gasphasenion nach dem *charged residue*-Mechanismus ist in Abb. 3.3 [Smi97] schematisch dargestellt. Durch weitgehende Entfernung des Lösungsmittels werden die Ladungsträger und Gegenionen zwangsläufig auf den Analyten aufgebracht („*charge condensation*“), und die leichter flüchtigen Komponenten dieses molekularen Clusters werden durch weitere Energiezufuhr

entfernt. Die Entstehung des Analyten in verschiedenen Ladungszuständen kann im Rahmen dieses Modells relativ einfach erklärt werden (eine detaillierte Beschreibung der zugrundeliegenden Prozesse findet sich in Kap. 3.1.3). Wird dem verbleibenden Rest weiterhin Energie zugeführt, hat dies die Dissoziation von nicht-kovalenten Wechselwirkungen im Analyten (sofern vorhanden) und anschließend auch den Bruch kovalenter Bindungen zur Folge.

Die beiden Erklärungsansätze zur Ionenfreisetzung in der ESI, das *ion evaporation*-Modell und *charged residue*-Modell, unterscheiden sich im wesentlichen in der Vorstellung, auf welche Weise ein kleiner, geladener Tropfen auf die repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen an seiner Oberfläche reagiert. Auch wenn beide Mechanismen zur Freisetzung der Analytionen recht kontrovers diskutiert werden, sind deren Folgerungen für die praktische Anwendung der ESI relativ einheitlich. Auf experimenteller Basis konnte daher bis heute kein unzweifelhafter Beleg für die Freisetzung kleiner Analytionen nach dem einen oder dem anderen Mechanismus gefunden werden. Viele der Resultate grundlegender Untersuchungen lassen sich sowohl im Sinne des *ion evaporation*-Mechanismus als auch im Sinne des *charged residue*-Modells interpretieren. Beide vorgeschlagenen Mechanismen stimmen überein, daß die Möglichkeit der Freisetzung eines Analyten in die Gasphase deutlich von dessen Aufenthaltswahrscheinlichkeit an der Tropfenoberfläche und damit seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften abhängt [Buc93], [Fen93a], [Wan98], [Wan00], [Enk97]. Enke et al. entwickelten auf der Basis unterschiedlicher Aufenthaltswahrscheinlichkeiten von Analyt- und Elektrolytionen an der Tropfenoberfläche ein Gleichgewichtsmodell, welches die unterschiedlichen Ionensignalintensitäten in der ESI-MS von Mischungen zu beschreiben vermag [Enk97], [Con99] [Con00]. Für einen gegebenen Analyten sind weiterhin Größe und Ladung der initial gebildeten Tropfen von Bedeutung: je kleiner die Tropfen und je höher deren Ladung, desto leichter ist die Bildung eines massenspektrometrisch nachweisbaren Gasphasenions möglich.

Dennoch steht die Frage nach dem letztendlich gültigen Mechanismus nur für die Freisetzung von kleinen Analytionen zur Diskussion. In der Literatur finden sich in diesem Zusammenhang Modellvorstellungen, die auf einer Kombination beider Theorien basieren [Keb00], [Gam00]. Für die Überführung von Makromolekülen in Gasphasenionen hat sich allerdings weitgehend das *charged residue*-Modell durchsetzen können.

3.1.3. Die Ionisierung in der ESI-MS

In der Diskussion zum Mechanismus der Ionenfreisetzung wurde in den vorhergehenden Abschnitten vereinfachend vom Vorliegen präformierter Analytionen in der Lösung ausgegangen. In der Praxis ist diese Voraussetzung jedoch nur für eine gewisse Art von Analyten gegeben, wie z.B. Alkalikationen und quartäre Ammoniumverbindungen in der ESI im positiven Ionenmodus. Bei einer großen Gruppe von Substanzen, wie z.B. Proteinen, kann nicht von einer „festen“ Ladung auf dem Analytmolekül in Lösung ausgegangen werden, so daß zusätzlich zum Ionenfreisetzungsschritt auch ein Ionisierungsschritt erfolgen muß.

Die Ladung vieler Substanzen, wie auch Proteine und Peptide, unterliegt in Lösung Säure-Base-Gleichgewichtsreaktionen (nach Brønsted), so daß ihr Ladungszustand empfindlich vom pH-Wert der Lösung abhängt. Trotzdem spiegeln die resultierenden ESI-Massenspektren nicht unbedingt die Säure-Base-Reaktionen in Lösung wider [Man97], [San97], [Smi95], [LeB94], [Wan94], [Kel92]. Auch aus basischen Lösungen lassen sich im positiven Ionenmodus protonierte Analyte nachweisen; im Gegenzug sind auch aus saurer Lösung im negativen Ionenmodus deprotonierte Analytionen zu beobachten.

Grundsätzlich ist in der ESI ein detektierbares Gasphasenion das Produkt einer ganzen Reihe von Reaktionen, die der Analyt sowohl in Lösung als auch in der Gasphase durchläuft. Analytionen, die mehr als eine einzelne Ladung zu tragen vermögen, werden dabei typischerweise in einer Verteilung mehrerer diskreter Ladungszustände nachgewiesen, welche die Prozesse in beiden Phasen widerspiegelt. Dabei sind die Zusammenhänge zwischen den relevanten Faktoren komplex, was sich auch in z.T. widersprüchlichen Resultaten der verschiedenen Untersuchungen dieser Phänomene äußert. Einen Überblick über diesen Sachverhalt liefern z.B. Wang und Cole [Wan97].

In Kap. 3.1.3.3 soll zunächst der Mechanismus der Ionisierung an sich beschrieben werden, bevor die heutigen Kenntnisse über das Zustandekommen verschiedener Ladungszustände in Kap. 3.1.3.4 und Kap. 3.1.3.5 zusammengefaßt werden.

3.1.3.3. Der Mechanismus der Ionisierung

Im routinemäßigen Einsatz der ESI-MS von Proteinen finden im positiven Ionenmodus saure Lösungen mit Zusatz erheblicher Mengen organischen Lösungsmittels Verwendung; der Analyt liegt daher in protonierter Form in Lösung vor. Gemäß dem *charged residue*-Modell verbleibt der Analyt nach mehreren Tropfenzerfallereignissen in einem Cluster mit weiteren Ladungsträgern, Lösungsmittelmolekülen und Gegenionen (vgl. Abb. 3.3). Beim weiteren Zerfall wird dann – gegebenenfalls unter Protonentransferreaktionen – das Analytion

freigesetzt. Exemplarisch sind die Protonierung von Anionen und Lösungsmittelmolekülen im positiven Ionenmodus in Abb. 3.4 A und B dargestellt.

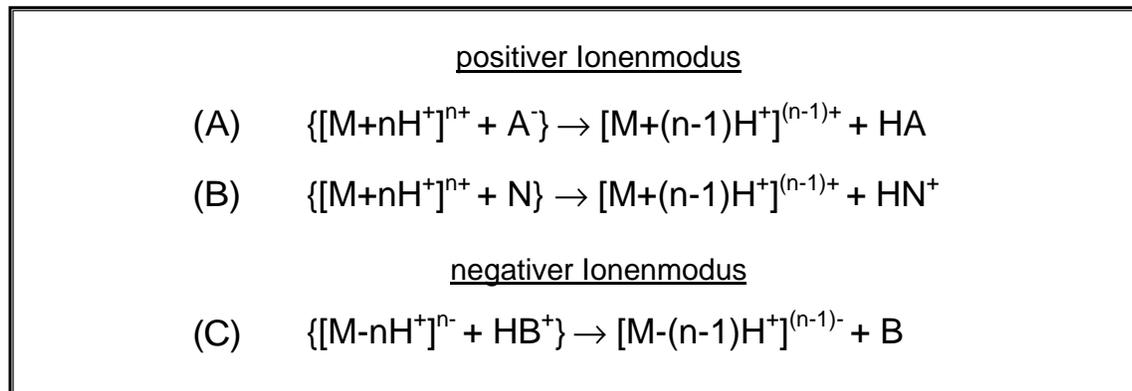


Abb. 3.4 Reaktionen im nach dem charged residue-Modell verbleibenden Cluster im positiven und negativen Ionenmodus; M: Analytion, A⁻: Gegenion, N: neutrales Molekül, z.B. Lösungsmittel, HB⁺: protonierte Base

Entscheidend für diese Protonenübertragung ist die Protonenaffinität des Analytions im Vergleich zu derjenigen anderer Bestandteile des Clusters [Wil96]. Protonenübertragungsreaktionen üben einen erheblichen Einfluß auf die beobachtbare Verteilung der Ladungszustände des Analyten aus und werden daher in Kap. 3.1.3.5 näher erläutert. Die Ladungen in Form von H⁺ finden sich im Analytion auf den Stellen höchster Protonenaffinität. In der Praxis hat sich gezeigt, daß der maximale Grad der Protonierung oft der Zahl der basischen Aminosäuren in der Sequenz plus eins (dem N-Terminus) entspricht. Es finden sich aber auch Beispiele, in denen diese Zahl deutlich unterschritten oder sogar überschritten wird ([Smi90], [Smi91]).

Enthält der Cluster neben H⁺ auch andere positive Ladungsträger, z.B. Na⁺, die nicht durch vergleichbare Reaktionen abgespalten werden können, so verbleiben diese auf dem Analyten und sind im Massenspektrum als Anlagerungen („Addukte“) nachweisbar. Ebenfalls können in der Praxis die korrespondierenden Säuren einiger Anionen, z.B. H₃PO₄ oder H₂SO₄, häufig nur schwer abgespalten werden und bilden Addukte mit dem Analytion [Cho90b].

Bei der Ionisierung aus alkalischer Lösung im negativen Ionenmodus finden im verbleibenden Cluster vergleichbare Reaktionen statt. Tritt eine protonierte Base, z.B. NH₄⁺, als Gegenion im Cluster auf, so kann auch hier bei geeigneten Verhältnissen der Protonenaffinitäten eine Protonentransferreaktion auf den Analyten stattfinden (Abb. 3.4 C).

Das Phänomen, in Lösung deprotonierte Analyte in der ESI als protonierte Gasphasenionen nachweisen zu können (und umgekehrt), wird in der Literatur auch als „*wrong way round-ESI*“ bezeichnet [Man97]. Es liefert ein bedeutendes Indiz, daß die in der ESI beobachteten

Ladungszustände nicht nur auf präformierten Ionen in der Analytlösung zurückzuführen sind, sondern daß vielmehr auch Gasphasenreaktionen den Ionisierungs- und Freisetzungsprozeß entscheidend beeinflussen. Kelly et al. [Kel92] beobachteten, daß sich Proteine unabhängig vom pH-Wert der Lösung im positiven und negativen Ionenmodus nachweisen lassen. Wang und Cole beschrieben in der Folge, daß der Ladungszustand eines Peptids in Lösung nicht mit dessen Ladungszustand in der ESI-MS korreliert ist [Wan94], während Le Blanc et al. [LeB94] sowie Sannes-Lowery et al. [San97] zeigen konnten, daß vielmehr eine Korrelation mit der Protonenaffinität zugesetzter Basen besteht. Mansoori et al. [Man97] zeigten, daß Änderungen des pH-Werts durch Redoxreaktionen an der Spraykapillare nicht für die beobachteten Abweichungen vom Ladungszustand in Lösung verantwortlich sein können.

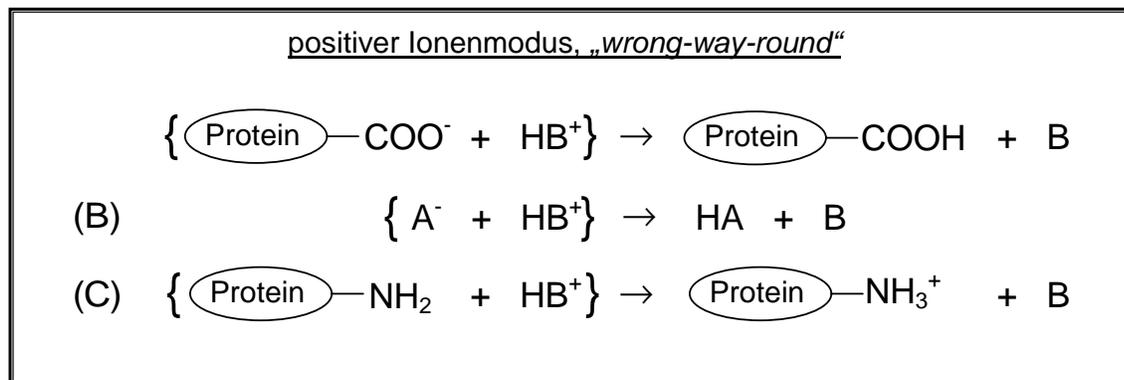


Abb. 3.5 Schematische Darstellung der Reaktionen (nach [Keb97]) im nach dem *charged residue-Modell* verbleibenden Cluster in der „wrong way round“-ESI im positiven Ionenmodus; HB^+ : protonierte Base, B: freie Base, A^- : Elektrolytion.

Auf der Basis des *charged residue-Modells* kann die Protonierung eines Proteins aus alkalischer Lösung (z.B. durch Zusatz von NH_4OH) ebenfalls durch Reaktionen im verbleibenden Cluster erklärt werden [Keb97]. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels und der damit einhergehenden Abnahme des Tropfenradius kommen die Oberflächenladungsträger (in diesem Beispiel NH_4^+) zwangsläufig in unmittelbare Nähe zum negativ geladenen Analyt sowie weiteren, noch im Tropfen enthaltenen Anionen. Da die abschirmende Wirkung der Ladungen voneinander in einem molekularen Cluster nicht mehr gewährleistet ist, bilden sich zunächst Ionenpaare; Protonenübertragung und Verdampfen der korrespondierenden freien Base schließen sich an. Weiterhin wird unter diesen Bedingungen auch die Protonierung anderer Gruppen im Protein möglich, die eine größere Protonenaffinität als die Base besitzen. Die entsprechenden Reaktionen für die „wrong way round“-ESI aus alkalischer Lösung im positiven Ionenmodus (nach [Keb97]) sind in Abb. 3.5 schematisch dargestellt.

Protonierte Analyte aus alkalischer Lösung bzw. deprotonierte aus saurer Lösung lassen sich nur mit deutlich geringerer Signalintensität nachweisen als aus Lösungen mit dem „richtigen“ pH-Wert [Kel92]. Allerdings ist das Schicksal von Analyten, deren Ladung durch Säure-Base-Gleichgewichtsreaktionen bestimmt wird, beim Zerfall der Tropfen empfindlich von deren Zusammensetzung abhängig. Ein in alkalischer Lösung negativ geladenes Protein wird sich im positiven Ionenmodus bevorzugt im Tropfeninneren aufhalten und so nur mit geringerer Wahrscheinlichkeit in die *offspring droplets* gelangen (s. Kap. 3.1.2).

3.1.3.4. *Der Einfluß von Reaktionen in Lösung auf die resultierende Verteilung der Ladungszustände*

Wie im Abschnitt zuvor beschrieben, sind Reaktionen in Lösung zwar nicht die letztendliche Ursache der Ionisierung in der ESI, sie üben aber dennoch einen merklichen Einfluß auf die zu beobachtende Verteilung der Ladungszustände des Analyten aus. Guevremont et al. [Gue92] beobachteten, daß der Ladungszustand in der ESI mit Variation des pH-Werts der Lösung ebenfalls Veränderungen erfährt. So konnten mit sinkendem pH-Wert zunehmend protonierte Analytionen in höheren Ladungszuständen nachgewiesen werden. Das auf der Basis dieser Ergebnisse entwickelte Modell, die Verteilung der Ladungszustände in Lösung mit denen der ESI zu korrelieren, wurde allerdings durch die Resultate der „*wrong-way-round-ESI*“ widerlegt. Den Resultaten von Guevremont et al. [Gue92] zufolge spiegeln sich also in der ESI-Ladungsverteilung Säure-Base-Reaktionen in Lösung wider, auch wenn sie nicht den zur Ionisierung entscheidenden Prozeß darstellen.

Als in Lösung relevante Faktoren für den resultierenden Ladungszustand eines Analyten in der ESI-MS sind folgende Aspekte zu nennen, die in den nachfolgenden Abschnitten detailliert beschrieben werden:

- die Art der weiteren, in der Lösung enthaltenen Kationen und Anionen
- der Einfluß des Lösungsmittels auf die Konformation eines Analyten
- die Polarität des Lösungsmittels
- die Konzentration des Analyten

Werden Proteinlösungen mit Zusatz verschiedener Säuren mittels ESI-MS im positiven Ionenmodus untersucht, so zeigt sich, daß nicht der pH-Wert, sondern die Art des zugesetzten Säure-Anions die resultierende Ladungsverteilung beeinflusst [Mir94]. Im Vergleich zwischen verschiedenen Säuren konnte in diesem Zusammenhang sogar beobachtet werden, daß mit sinkendem pH-Wert eine Abnahme des mittleren Ladungszustands einhergehen kann. In welchem Ausmaß eine Anionenart den Ladungszustand eines Analyten zu beeinflussen

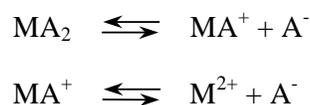
vermag, wird im wesentlichen durch seine Kationenaffinität erklärt [Mir94], [Wan96]. Weist ein Anion eine hohe Kationenaffinität auf, so ist es mit hoher Wahrscheinlichkeit in dem zur Ladung relevanten Cluster enthalten und wirkt dort durch Protonenübertragungsreaktionen auf den Ladungszustand des Analyten ein (s. Kap. 3.1.3.31). Das Ausmaß der Erniedrigung des mittleren Ladungszustands nimmt dabei in der Reihe $\text{CH}_3\text{COO}^- \approx \text{Cl}^- < \text{CF}_3\text{COO}^- < \text{CCl}_3\text{COO}^-$ zu [Mir94].

Bei Variation der Leitfähigkeit einer Analytlösung durch den Zusatz von Fremdelektrolyten, z.B. CsCl, ist es vom gewählten Analyten abhängig, ob ein Einfluß auf die resultierende Verteilung der Ladungszustände beobachtet werden kann [Wan95]. Als Erklärung dieses Phänomens führen Wang und Cole Unterschiede zwischen Analyt- und Elektrolytkationen in der Effizienz ihrer Freisetzung in die Gasphase an. Ähneln sich Analyt- und Elektrolytkation in dieser Eigenschaft, so ist die Bildung von Ionenpaaren mit Gegenionen für beide Kationenarten wahrscheinlich und damit ein Einfluß auf die beobachtbare Ladungsverteilung des Analyten zu erwarten. Weist dagegen der Analyt eine deutlich größere Freisetzungseffizienz als das Elektrolytkation auf, so erfolgt die Bildung von Ionenpaaren bevorzugt mit den Elektrolytkationen, und damit ist kein Einfluß auf die Ladungsverteilung des Analyten beobachtbar [Wan95].

Der pH-Wert kann in einem anderen Zusammenhang einen deutlichen Einfluß auf die zu beobachtenden Massenspektren ausüben, denn bei der Untersuchung von Proteinen ist deren Konformation für die resultierende Ladungsverteilung in der ESI von Bedeutung. In einem Protein in nativer Konformation können einige basische Aminosäuren der Sequenz im Innern der Struktur angeordnet sein, so daß diese nicht für Protonentransferreaktionen zugänglich sind. Wird dagegen das Protein in eine denaturierte Konformation überführt, so sind auch diese Stellen der Reaktion zugänglich, und das Protein kann in höheren Ladungszuständen nachgewiesen werden. Experimentell konnte die Bedeutung der Konformation zunächst durch Chowdhury et al. [Cho90a] gezeigt werden. Während ein durch Säurezusatz zur Analytlösung denaturiertes Protein in einer Verteilung hoher Ladungszustände detektiert wird, erscheint bei Erhöhung des pH-Werts eine zweite, engere Verteilung niedrigerer Ladungszustände, welche schließlich unter nahezu nativen Bedingungen das Massenspektrum dominiert. Diese Resultate lieferten in der Entwicklung der ESI-MS erste Indizien für die Möglichkeit, physiologisch bedeutende Wechselwirkungen auf massenspektrometrischem Weg analysieren zu können. Die Bedeutung der Konformation auf die resultierende Ladungsverteilung wurde in der Folge ferner durch pH-Variation [Loo91], Zusatz von organischen Lösungsmitteln [Loo91] und Erwärmung der Analytlösung [Mir93] demonstriert.

Ebenfalls führt die Reduktion von Disulfidbrücken zur Bildung einer weniger kompakten Struktur des Proteins und damit zur Erhöhung des mittleren Ladungszustands in der ESI [Ogo92]. Auch Wärmezufuhr während der Desolvatisierung der initialen Tropfen bewirkt die Denaturierung eines Proteins (und damit den Nachweis höherer Ladungszustände), sofern die Analytlösung mit Ammoniumacetat versetzt ist [Mir96]. Dieses Phänomen wurde zunächst auf die längere Lebensdauer elektrolythaltiger Tröpfchen zurückgeführt, welche die Zufuhr von Wärme zum Analyten über einen längeren Zeitraum ermöglicht [Mir96]; als weitere Ursache sind jedoch ebenfalls Veränderungen des pH-Werts in den Tröpfchen durch Verdampfen flüchtiger Lösungskomponenten zu diskutieren.

Einfluß auf die resultierende Ladungsverteilung hat ebenfalls die Polarität des eingesetzten Lösungsmittels, ausgedrückt in dessen Dielektrizitätskonstanten. Loo et al. zeigten, daß Lösungsmittel mit einer niedrigen Dielektrizitätskonstante bei Proteinen zur Entstehung niedrigerer Ladungszustände führen, als sie bei Verwendung eines Lösungsmittels mit hoher Dielektrizitätskonstanten beobachtet werden [Loo88]. Die Arbeiten von Wang und Cole [Wan96] ergaben für diquarternäre Ammoniumsalze in einer Reihe von Lösungsmitteln einen vergleichbaren Trend, einhergehend mit einer Abnahme der Gesamtintensität des Ionensignals. Zur Erklärung der Veränderung der beobachteten Ladungsverteilung bei Variation der Lösungsmittelpolarität kann die elektrolytische Dissoziation des Analyten in Lösung herangezogen werden. Erfolgt für ein Analyt-Dikation M^{2+} in Verbindung mit zwei Gegenionen A^- die Dissoziation gemäß:



so vermag ein stärker polares Lösungsmittel die resultierenden Ionen besser zu stabilisieren und begünstigt damit den Nachweis des Analyten in höheren Ladungszuständen [Col93], [Wan96].

Die Verteilung der Ladungszustände in der ESI wird ferner auch von der Konzentration des Analyten in Lösung beeinflusst [Wan95]. Eine Vergrößerung der Analytkonzentration vergrößert die Leitfähigkeit der Lösung und damit auch den über die Spraykapillare abfließenden Strom (vgl. Kap. 3.1.1, (Gl. 3.5)), so daß prinzipiell mehr Ladungsträger in den Tröpfchen zur Verfügung stehen. Allerdings ist die Zunahme der Ladungsträger geringer als die konzentrationsbedingte Zunahme der Analytteilchen und ihren Gegenionen. Die Zunahme der Analytkonzentration führt demnach zur vermehrten Bildung von Ionenpaaren aus Analyt-

und Gegenionen, was eine Verringerung des Ladungszustands in der ESI-MS zur Folge hat [Wan95] (vgl. Kap. 3.1.3.3).

3.1.3.5. *Der Einfluß von Reaktionen in der Gasphase auf die resultierende Verteilung der Ladungszustände*

Wie in Kap. 3.1.3.3 beschrieben, wird die Verteilung der Ladungszustände in der ESI erheblich durch Reaktionen in einem Cluster aus Analytione, Gegenionen und Lösungsmittelmolekülen beeinflusst. Ob und in welchem Maße Protonentransferreaktionen zwischen Analyt und anderen Komponenten des Clusters ablaufen, wird durch die Protonenaffinitäten der Reaktanden bestimmt. Dient als Analyt ein Protein oder Peptid, so ist die Protonenaffinität der einzelnen Stellen innerhalb der Sequenz nicht mit derjenigen der isolierten Aminosäuren identisch. Polarisierbare Abschnitte der Proteinsequenz vermögen eine protonierte Stelle auch in der Gasphase zu solvatisieren und somit zu stabilisieren, während die bereits protonierten Stellen im Analytione die Protonenaffinität durch Coulomb-Abstoßung verringern. Die Kombination dieser beiden Effekte bewirkt somit eine „tatsächliche Protonenaffinität“ jeder einzelnen Stelle, die von Proteinsequenz und bereits vorliegendem Ladungszustand abhängig ist. Ein Überblick zu Protonentransferreaktionen in der Gasphase findet sich z.B. bei Williams [Wil96].

In Experimenten zur Protonenübertragung zwischen mehrfach protonierten Analytione und einer Base in der Gasphase bewirkt die Abhängigkeit der Protonenaffinität von Coulomb-Wechselwirkungen eine erhöhte Reaktivität der hohen Ladungszustände im Vergleich zu ihren niedriger geladenen Analogen ([McL91], [Ogo92]). Bei gegebenem Ladungszustand sind dabei die räumliche Distanz zwischen den geladenen Stellen und damit die Konformation eines mehrfach geladenen Proteins in der Gasphase von Bedeutung. Wird durch Disulfidbrücken eine kompakte Struktur eines Proteins stabilisiert, so befinden sich die geladenen Stellen in geringerer Distanz zueinander als im reduzierten Protein gleichen Ladungszustands. Dementsprechend weist bei gegebenem Ladungszustand das Protein mit intakten Disulfidbrücken eine höhere Reaktivität in Protonentransferreaktionen auf ([Ogo92], [Ogo94]). Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß ein mehrfach protoniertes Protein in der Gasphase eine möglichst gestreckte Konformation annimmt, um den Einfluß der Coulomb-Repulsion zwischen den geladenen Stellen zu minimieren [Sch95a]. Downard et al. [Dow95] konnten allerdings bei der Untersuchung mehrerer synthetischen Peptide keine Korrelation zwischen der räumlichen Distanz protonierbarer Stellen in der Sequenz und dem maximalen Ladungszustand in der ESI nachweisen.

Nach einem von Williams und Mitarbeitern entwickelten Modell [Sch95a] bestimmt die tatsächliche Protonenaffinität eines Proteins im Vergleich zur Protonenaffinität des Lösungsmittels letztendlich, welchen maximalen Ladungszustand es in der ESI-MS annehmen kann. Im nach dem *charged residue*-Modell verbleibenden Cluster aus Lösungsmittelmolekülen und Analyt steht eine gewisse Anzahl von Protonen zur Ladung zur Verfügung, um die das Protein und die Lösungsmittelmoleküle konkurrieren. Ein Protonentransfer findet stets zum Teilchen mit höchster Protonenaffinität statt, so daß zunächst basische Stellen der Proteinsequenz protoniert werden. Erreicht allerdings das Protein einen Ladungszustand, in welchem seine tatsächliche Protonenaffinität geringer als die des Lösungsmittels ist, so tritt eine Protonierung des Lösungsmittels ein. Der massenspektrometrisch beobachtete maximale Ladungszustand stellt demnach die Grenze dar, ab welcher eine Protonierung des Lösungsmittels eintritt [Sch95a]. Die Resultate von Sterner et al. [Ste99] weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, daß bei der Verwendung von Lösungsmittelgemischen die Protonenaffinität der schwerer flüchtigen Mischungskomponente relevant ist. Der Einfluß von Gegenionen, die ebenfalls im verbleibenden Cluster enthalten sein können, wird in diesen Betrachtungen allerdings außer acht gelassen.

Der so vorgegebene maximal mögliche Ladungszustand eines Analyten kann mittels weiterer, durch instrumentelle Parameter induzierter Reaktionen ebenfalls verringert werden. Stöße im Eingangsbereich des Massenspektrometers (vgl. Kap. 3.2.3) werden als Auslöser weiterer Protonenübertragungsreaktionen zu Lösungsmittelmolekülen, anderen Komponenten des verbleibenden Clusters oder Restgas in der Druckstufe angesehen [Wan97]. Auch in diesen Protonenübertragungsreaktionen sind die „tatsächliche Protonenaffinität“ des Analyten und damit sein Ladungszustand von Relevanz.

Nicht nur in Protonenübertragungsreaktionen, sondern auch in unimolekularen Zerfallsreaktionen weisen die höheren Ladungszustände eines Analyten eine erhöhte Reaktivität auf, wie von Busman et al. durch Vergleich der entsprechenden Aktivierungsenergien am Beispiel von Melittin ermittelt werden konnte [Bus92]. Wird im Eingangsbereich des Massenspektrometers die Fragmentierung des Analyten durch Stöße induziert, so nimmt die Signalintensität höherer Ladungszustände schneller ab als die der niedrigen. Formal ist daher unter CID-Bedingungen eine Verschiebung der Ladungsverteilung zu niedrigeren Ladungszuständen zu beobachten (vgl. [Wan97]). Dies ist allerdings nicht nur Konsequenz der erhöhten Reaktivität hoher Ladungszustände; sie erfahren im elektrischen Feld im Eingangsbereich zudem eine stärkere Beschleunigung als niedriger geladene Analytionen, was eine vergleichsweise erhöhte Stoßenergie zur Folge hat (vgl. Kap. 3.2.3).

3.2. Praktische Aspekte der Elektrospray-Ionisierung

Die in Kap. 3.1 erläuterten theoretischen Grundlagen zur Elektrospray-Ionisierung haben Auswirkungen für die analytische Praxis, nicht zuletzt auch für den Nachweis von nicht-kovalenten Komplexen. Die Probenpräparation legt dabei die Startbedingungen auf dem Weg des Analyten aus der Lösung in die Gasphase fest. Die Mechanismen zur Tropfenbildung sowie zur Desolvatisierung und Ionisierung der Analyte stellen in der Folge Forderungen an Sprayquelle und Desolvatisierungsparameter, die in diesem Abschnitt kurz erläutert werden sollen. Ein Überblick zu instrumentellen Aspekten der ESI findet sich z.B. bei Bruins [Bru97].

3.2.1. *Probenpräparation*

Die Zusammensetzung der Probenlösung definiert die Ausgangsbedingungen für eine Analyse mittels ESI-MS. Zur Analyse von Proteinen im positiven Ionenmodus finden in der Regel Mischungen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln unter Zusatz von einigen Prozent Säure Verwendung. Das bereits eingangs erwähnte bewährte Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Wasser (v:v 1:1) mit Zusatz weniger Prozent Essigsäure wird zur Vereinfachung im folgenden als „Standard-Mix“ bezeichnet. Der Nachweis von nicht-kovalenten Komplexen erfolgt dagegen meist aus wäßriger Lösung, der gegebenenfalls Puffer (häufig Ammoniumacetat in einer Konzentration von 20 mmol/l) zugesetzt sind.

Der Analyt wird meist in einer Konzentration zwischen 10^{-6} mol/l und 10^{-5} mol/l eingesetzt. Wie am Beispiel von verschiedenen organischen Basen experimentell gezeigt werden konnte ([Iko90], [Tan91]), steigt die Signalintensität der detektierbaren Ionen zwar bis zu einer Konzentration von 10^{-5} mol/l an, erreicht dann aber eine Sättigung, so daß die Verwendung von Analytlösungen deutlich höherer Konzentration keine praktischen Vorteile mit sich bringt.

Die Reinheit der zu analysierenden Probe stellt einen kritischen Parameter in der ESI-MS dar. Liegen neben dem interessierenden Analyten noch andere Komponenten in der Probe vor, so finden deren Ionisierung und Freisetzung in die Gasphase in Konkurrenz statt, was unter Umständen die Ausbeute an nachweisbaren erwünschten Analytionen erheblich verringert. Die Verschlechterung der Analytsignalausbeute ist um so ausgeprägter, je effizienter die konkurrierenden Teilchen in die Gasphase überführt werden und je höher ihre Konzentration in Lösung im Vergleich zum Analyten ist (vgl. Kap. 3.1.2). Gerade Verunreinigungen mit Substanzen, die eine hohe Oberflächenaktivität aufweisen, können in der ESI-MS kritisch sein. So hat z.B. der Zusatz eines nichtionischen Tensids bereits in geringeren Konzen-

trationen als der zu untersuchende Analyt eine Abnahme der Analytsignalintensitäten zur Folge [Jur94].

Wie von Kebarle et al. [Iko90], [Tan91] gezeigt werden konnte, enthalten selbst „saubere“ Analytlösungen in der Regel bereits „fremden“ Elektrolyt in einer Konzentration von etwa 10^{-5} mol/l. Der Zusatz von Salzen zu Proteinlösungen wirkt sich jedoch erst in höheren Konzentrationen drastisch auf die Analytsignalintensität aus. Wird z.B. zu einer Myoglobinlösung ($c = 5 \cdot 10^{-6}$ mol/l) in 1:1 Methanol-Wasser mit 0,1% Essigsäure CsCl zugesetzt (vgl. [Wan97]), so tritt bei einer Salzkonzentration von 10^{-4} mol/l eine Abnahme der Ionensignale des Myoglobins ein. Bei einer Salzkonzentration von 10^{-3} mol/l dominieren bereits die Signale des Salzes das resultierende ESI-Massenspektrum.

Problematisch ist eine Verunreinigung mit Salzen auch im Hinblick auf eine mögliche Adduktbildung der Kationen und Anionen mit dem Analyten (vgl. Kap. 3.1.3.3). Können die Addukte nicht vor der MS-Analyse dissoziiert werden, verteilt sich das Gesamtionensignal des Analyten auf eine größere Zahl von Einzelsignalen (protonierter Analyt und verschiedene Addukte), so daß die absolute Intensität der Einzelsignale abnimmt.

3.2.1.6. *Das eingesetzte Lösungsmittel*

Die Eigenschaften des Lösungsmittels und des Analyten üben – wie in Kap. 3.1 beschrieben – einen deutlichen Einfluß auf den Zerstäubungs-, Desolvatisierungs- und Ionisierungsschritt in der ESI aus. In der Praxis kann beobachtet werden, daß bei Verwendung des bewährten Standard-Mix die ESI-MS-Analyse von Proteinen meist problemlos möglich ist. Dagegen sind mit dem Einsatz von wäßrigen Lösungen, wie sie für den Nachweis von nicht-kovalenten Komplexen meist notwendig sind, in der Regel erhebliche Schwierigkeiten verbunden. Die rein qualitativen Unterschiede zwischen dem Standard-Mix und Wasser (ohne Pufferzusätze), basierend auf den in Kap. 3.1.1 und 3.1.2 vorgestellten Grundlagen, sind daher an dieser Stelle nochmals explizit zusammengestellt.

- Für die Zerstäubung des Standard-Mix ist wegen dessen niedrigerer Oberflächenspannung auch eine niedrigere *onset*-Spannung notwendig (Gl. 3.2). Bei der Verwendung von Wasser besteht dagegen wegen der erforderlichen höheren Spannung eine größere Gefahr elektrischer Entladungen zwischen Spraykapillare und Gegenelektrode, was den ESI-Prozeß erheblich stören kann.

- Die gebildeten Initialtropfen des Standard-Mix sind gemäß (Gl. 3.3) und (Gl. 3.5) kleiner und höher geladen, da die Leitfähigkeit aufgrund des Säurezusatzes höher als die des Wassers ist. Damit kann die Freisetzung der Analytionen aus dem Standard-Mix effizienter erfolgen (s. Kap. 3.1.2).
- Ein effizienteres Schrumpfen der Initialtropfen und damit relativ viele Zerfallsereignisse (s. Kap. 3.1.2.1) werden im Fall des Standard-Mix durch die relativ leichte Verdampfbarkeit der Mischungskomponente Methanol ermöglicht. Die Verkleinerung der Tropfen durch Lösungsmittelverdampfung ist bei Verwendung von Wasser deutlich erschwert.
- Für Untersuchungen im positiven Ionenmodus tragen Peptid- oder Proteinmoleküle im Standard-Mix aufgrund des Säurezusatzes die „richtige“ (positive) Ladung, um beim Zerfall der initialen Tropfen mit hoher Wahrscheinlichkeit in die *offspring droplets* zu gelangen und in der Folge in Gasphasenionen überführt zu werden (vgl. Kap. 3.1.2). Bei der Verwendung wäßriger Lösungen wird dagegen die Ladung eines solchen Moleküls nur durch sein eigenes Säure-Base-Gleichgewicht bestimmt, so daß die „richtige“ Ladung nicht von vornherein gewährleistet ist.

Es wird ersichtlich, daß die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel für Standard-ESI generell problematischer ist als der Einsatz des Standard-Mix. Dennoch ist die Zugänglichkeit auch wäßriger Lösungen im Hinblick auf den intakten Nachweis nicht-kovalenter Komplexe erforderlich. Durch Weiterentwicklungen des Sprayquellenaufbaus, insbesondere durch Etablierung der Nano-ESI-Technik (Kap. 3.2.2.8), konnten die Schwierigkeiten jedoch weitgehend überwunden werden.

3.2.2. *Sprayquellen*

Wie in Kap. 3.1.2.2 beschrieben, erfolgt eine besonders effiziente Freisetzung des Analyten aus kleinen und hochgeladenen Initialtropfen, so daß der Sprayprozeß selbst einen entscheidenden Anteil am Gelingen einer Analyse hat.

In der ursprünglichen Form der Elektrospray-Ionisierung erfolgt die Zerstäubung der Analytlösung aus einer Edelstahlkapillare mit einem Innendurchmesser von ca. 100 µm bei einer Flußrate von ca. 5 µl/min. Zur erfolgreichen Zerstäubung ist eine Potentialdifferenz von 3 – 5 kV zwischen der Analytlösung und der Gegenelektrode erforderlich, die für den positiven Ionenmodus meist durch Anheben des Spraykapillarenpotentials eingestellt wird. Prinzipiell ist auch das relative Absenken des Gegenelektrodenpotentials möglich; diese

Variante findet z.B. in Sektorfeldgeräten Anwendung. Um Kontaminationen innerhalb des Massenspektrometers durch größere Lösungstropfen zu reduzieren, wird die Sprayquelle häufig aus der Achse versetzt oder schräg zum Eingang ins MS positioniert ^[1].

Die Eigenschaften des eingesetzten Lösungsmittels haben dabei, wie in Kap. 3.2.1.6 beschrieben, einen deutlichen Einfluß auf den Verlauf des Zerstäubungsvorgangs. Bei gegebenem Lösungsmittel stellt die Flußrate der Analytlösung einen kritischen Parameter für den Zerstäubungs- und in der Folge auch für den Desolvatisierungsschritt dar. Gemäß (Gl. 3.3) nimmt bei der Zerstäubung eines gegebenen Lösungsmittels der Tropfenradius mit Erhöhung der Flußrate zu, so daß eine effiziente Freisetzung von Analytionen in die Gasphase zunehmend erschwert wird. Im Idealfall gleicht die größere Probenmenge, die dabei dem Prozeß unterworfen wird, diesen negativen Effekt gerade aus, so daß sich die Intensität des resultierenden Ionensignals kaum ändert. Wie Kostianin et al. [Kos94] zeigen konnten, ist in der ESI eher die Konzentration des Analyten in der Lösung von Relevanz. Elektrospray-Ionisierung gelingt im Standardaufbau nur bei Flußraten der Probenlösung bis maximal ca. 20 µl/min [Bru97]. Aber auch zu geringe Flußraten ($\ll 1\mu\text{l}/\text{min}$) sind in der Standard-ESI problematisch; unter diesen Bedingungen verläuft der Abbau der Flüssigkeit unter Umständen schneller als durch die Flußrate nachgeliefert werden kann.

In der Vergangenheit wurden einige Modifikationen der Standard-Sprayquelle vorgestellt, bei deren Entwicklung folgende analytische Anforderungen im Mittelpunkt standen:

- Handhabung besonders großer Flußraten (bis zu 1 ml/min), wie sie insbesondere bei Kopplung der ESI-MS an die HPLC entstehen (z.B. [Bru87], [Fin93])
- Handhabung kleiner Flußraten, wie sie beispielsweise aus kapillarelektrophoretischen Trennungen resultieren (z.B. [Smi88], [Han98], [Bar99])
- Sprühen von problematischen Lösungsmitteln, insbesondere wäßrigen Lösungen (z.B. [Cho91], [Gal93], [Wil96a])
- Minimierung des Probenverbrauchs (z.B. [Wil96a], [Ger98], [Hon99], [Lee99]).

Einige Sprayquellenmodifikationen, die sich in kommerziell erhältlichen ESI-MS-Systemen etablieren konnten und auch zur Untersuchung wäßriger Analytlösungen eingesetzt werden, sollen im folgenden beschrieben werden. Eine besondere Stellung nimmt dabei die Nano-ESI-Quelle ein, die sich in mehrerer Hinsicht von anderen ESI-Sprayquellen unterscheidet.

¹ Beispielsweise ist im sogenannten Z-Spray™ (Fa. Micromass) die Sprayquelle in einem Winkel von 90° vor der Eingangsöffnung montiert.

3.2.2.7. Modifikationen der Standard-Sprayquelle

Die Zerstäubung wäßriger Lösungen kann häufig erreicht werden, wenn der Sprayprozeß pneumatisch unterstützt wird. Dieses Verfahren trägt den Namen „Ionspray™“ und wurde in erster Linie für die Handhabung hoher Flußraten in der ESI entwickelt [Bru87]. Bei dieser Modifikation der Standard-Sprayquelle tritt an der Spitze der Spraykapillaren ein zum Probenfluß koaxialer Gasstrom (meist N₂) aus, der den Abbau der Probenlösung in ein Aerosol aus kleinen, geladenen Tropfen unterstützt (s. Abb. 3.6 A).

Mit Hilfe dieser Technik kann eine direkte Kopplung der ESI an die Flüssigkeitschromatographie erfolgen, wobei Flußraten bis zu 1 ml/min noch zerstäubt werden können. Aufgrund der pneumatischen Unterstützung ist zur Erzeugung eines stabilen Sprays eine geringere Potentialdifferenz zwischen Spraykapillare und Gegenelektrode erforderlich als bei Verwendung einer Standard-ESI-Sprayquelle. Damit besteht bei Verwendung wäßriger Lösungen mit den für ESI typischen Flußraten zumindest eine verringerte Gefahr elektrischer Entladungen zwischen Kapillare und Gegenelektrode. Das Problem der Entladungsreaktionen, welches insbesondere bei Untersuchungen im negativen Ionenmodus auftritt, kann zusätzlich verringert werden, wenn Sprayquellen mit einer speziellen Schutzgasatmosphäre (z.B. O₂ [Yam84a] oder SF₆) zur Zerstäubung eingesetzt werden. Dem Schutzgas kommt dabei die Aufgabe zu, als Elektronenfänger aufzutreten und den Einsatz elektrischer Entladungen zu erschweren.

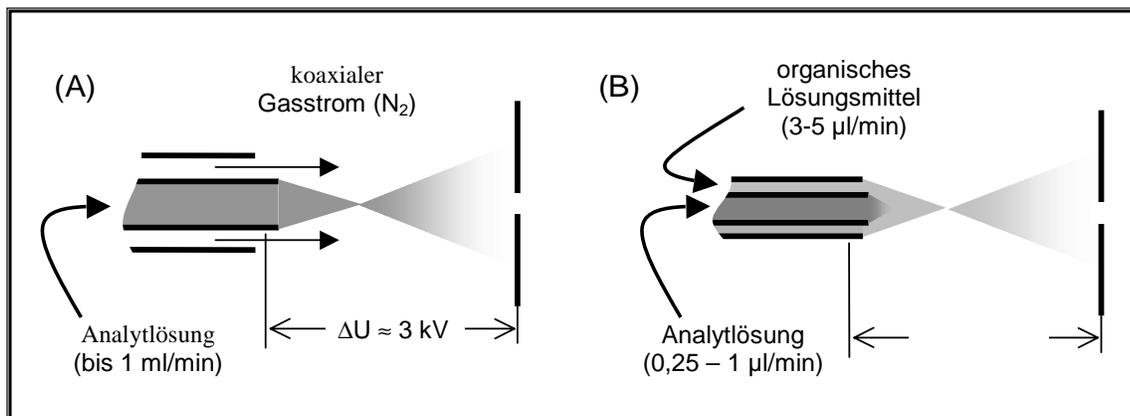


Abb. 3.6: Modifizierte Sprayquellen für die ESI-MS. A) IonSpray(nach [Bru87], B) sheath flow-Technik [nach Smi88]

Eine andere Möglichkeit, die Schwierigkeiten wäßriger Lösungsmittel zu umgehen, wird in der *sheath flow*-Technik geliefert [Smi88] (Abb. 3.6 B). Dieses Verfahren wurde ursprünglich entwickelt, um bei der Kopplung an die Kapillarelektrophorese die sehr kleinen Flußraten der Probenlösung den Anforderungen der ESI anzupassen. In diesem Aufbau wird direkt an der

Spitze der Spraykapillaren ein weiteres (organisches) Lösungsmittel, z.B. Methanol, mit einer Flußrate von 3-5 µl/min zugemischt und so ein ausreichendes Flüssigkeitsvolumen pro Zeiteinheit für die Zerstäubung zur Verfügung gestellt. Auch wäßrige Lösungen können auf diese Weise mit organischem Lösungsmittel versetzt und die Zerstäubung so erleichtert werden, so daß bei Verwendung dieser Sprayquelle ein Nachweis von intakten nicht-kovalenten Komplexen erfolgen kann [Has94].

3.2.2.8. *Die Nano-ESI-Quelle*

Eine besondere Modifikation der Sprayquelle ist in der analytischen Praxis zu Bedeutung gelangt: die von Wilm und Mann entwickelte sogenannte Nano-ESI-Quelle. Sie besteht aus einer dünnen Glaskapillare, die zu einer feinen Spitze mit einem Innendurchmesser von etwa 1 µm ausgezogen ist. Zur Analyse wird dann ein kleines Volumen der Probenlösung (typischerweise 1 µl) in die Kapillare gefüllt. Im ursprünglichen Aufbau sind die Kapillaren, insbesondere deren Spitzen, mit einer dünnen Schicht Gold bedampft, um an der Öffnung den elektrischen Kontakt mit der Analytlösung zu gewährleisten. Alternativ kann der Kontakt auch über einen dünnen Platin- (z.B. [Sch99]) oder Wolframdraht [Fon98], [Fon99] hergestellt werden, der direkt in die Analytlösung eintaucht. Die optimale Position der Sprayquelle vor der Eingangsöffnung des Massenspektrometers ist von der Geometrie des Eingangsbereichs (s. Kap. 3.2.3) abhängig; im Aufbau mit geheizter Transferkapillare beträgt der Abstand typischerweise wenige Millimeter. Zum Versprühen der Analytlösung ist eine Potentialdifferenz von nur 500-1000 V zur Gegenelektrode erforderlich; der dabei resultierende Strom liegt in der Größenordnung von 5 – 20 nA. Eine Besonderheit der Nano-ESI ist, daß der Fluß der Analytlösung durch die Kapillaröffnung allein durch den Elektrospray-Prozeß hervorgerufen wird, wobei Flußraten im Bereich von 20 – 40 nl/min entstehen. Die initial gebildeten Tropfen sind erheblich kleiner als unter Standard-ESI-Bedingungen und optisch nicht mehr zu beobachten. Auf der Basis theoretischer Betrachtungen wird für die initialen Tropfen ein Radius in der Größenordnung von 100 nm angegeben [Wil96a].

Ein Vorteil der Nano-ESI liegt in dem sehr geringen Probenverbrauch, mit dem auch sehr kleine Probenmengen der ESI-MS-Analyse zugänglich gemacht werden können. Dabei weist das Verfahren eine im Vergleich zur Standard-ESI erheblich größere Toleranz gegenüber Verunreinigungen mit Salz auf [Wil96a], [Jur99]. Der Einsatz dieser Technik erlaubt ein problemloses Sprühen wäßriger Lösungen und den Nachweis darin enthaltener Analyte, was gerade für die Untersuchung von nicht-kovalenten Komplexen von großem Wert ist. Diese

Methode erlaubt ebenfalls die massenspektrometrische Analyse von Kohlenhydraten, welche mit Standard-ESI erst nach chemischer Derivatisierung untersucht werden können [Bah97], [Pfe00].

Ein Vergleich zwischen Standard-ESI- und Nano-ESI-Quelle auf der Basis der in Kap. 3.1.1 und Kap. 3.1.2 beschriebenen Mechanismen verdeutlicht nochmals die prinzipiellen Unterschiede zwischen beiden Sprayquellen. Die zum Vergleich erforderlichen Vorgaben sind in Abb. 3.7 zusammengestellt; die daraus resultierenden Daten finden sich in Tab. 3.1. Zur Vereinfachung soll eine statistische Verteilung der Analytteilchen in der Lösung sowie in den ESI-generierten Tröpfchen angenommen werden; einem Einfluß der Oberflächenaktivität des Analyten wird daher keine Rechnung getragen.

Bedingt durch die Unterschiede in der Quellengeometrie besteht ein deutlicher Unterschied in den zu erwartenden Einsatzspannungen für den Sprayprozeß, V_{on} . Die berechneten Werte für beide Sprayquellen geben dabei in guter Übereinstimmung die in der Praxis üblicherweise auftretenden Werte wieder.

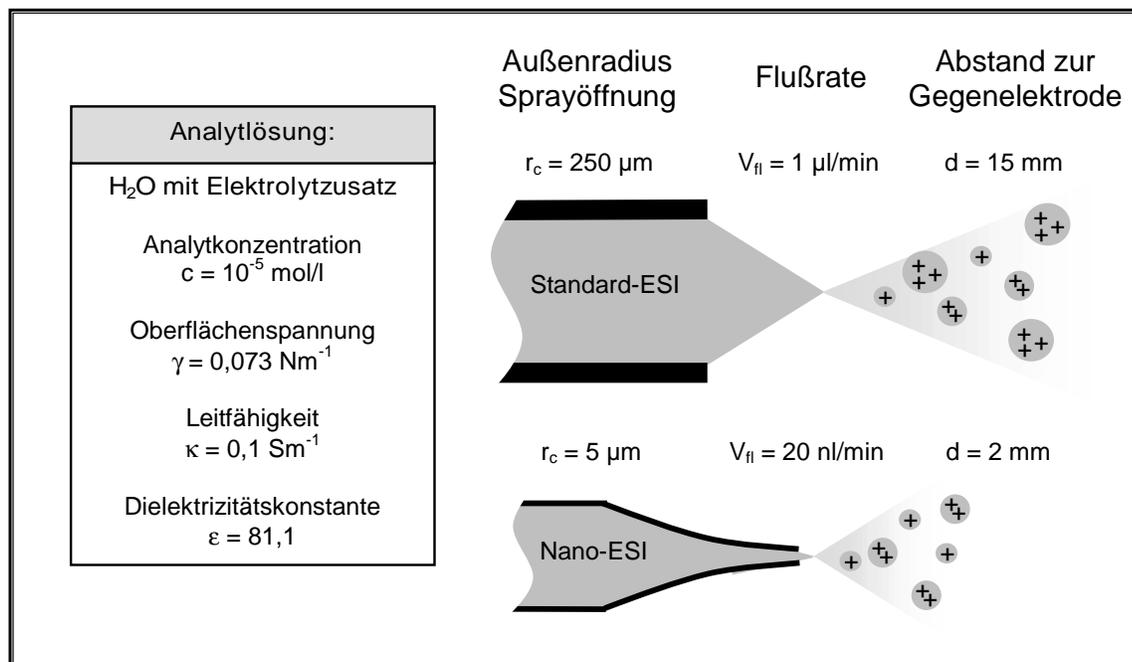


Abb. 3.7: Vorgaben für den nachfolgenden Vergleich zwischen Standard-ESI und Nano-ESI. Die angegebene Leitfähigkeit einer wäßrigen Lösung entspricht einer Konzentration starken Elektrolyts in der Größenordnung von 10^2 mol/l oder dem Zusatz weniger Prozent Essigsäure. Die vorgegebenen Abmessungen liegen im Bereich der in der Praxis üblichen Werte.

3. Vom gelösten Analyten zum Gasphasenion

	Standard-ESI	Nano-ESI
Einsatzspannung V_{on} (Gl. 3.2)	4680 V	890 V
Tropfenradius (Gl. 3.3)	493 nm	134 nm
Tropfenvolumen	$5 \cdot 10^{-16}$ l	$1 \cdot 10^{-17}$ l
Analytmoleküle pro Tropfen	3023	61
Rayleigh-Limit eines Tropfens (Gl. 3.6)	$6,99 \cdot 10^{-15}$ C	$9,91 \cdot 10^{-16}$ C
Ladung eines Tropfens (50% des Rayleigh-Limits)	$3,49 \cdot 10^{-15}$ C = 21816 Elementarladungen = $7,23 \cdot 10^{-5}$ mol/l	$4,94 \cdot 10^{-16}$ C = 3085 Elementarladungen = $5,11 \cdot 10^{-4}$ mol/l
resultierender Strom	116 nA	16 nA
Tropfenradius beim 1. Zerfall (80% des Rayleigh-Limits)	360 nm	98 nm
erforderlicher Volumenverlust bis zum 1. Zerfall	$3,1 \cdot 10^{-16}$ l	$6,1 \cdot 10^{-18}$ l
Verhältnis Oberfläche zu Volumen	$6,1 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^7$
Radius des Resttropfens aus dem 1. Zerfall	358 nm	97 nm
Radius der <i>offspring droplets</i> aus dem 1. Zerfall (vgl. S. 22)	36 nm	9,8 nm
Analytmoleküle pro <i>offspring droplet</i>	3	0,1

Tab. 3.1: Vergleich zwischen Tropfen, die mittels Standard-ESI bzw. mittels Nano-ESI generiert werden. Die zur Abschätzung verwendeten Vorgaben finden sich in Abb. 3.7.

Entscheidend für die Größe der aus dem Sprayprozeß resultierenden Tröpfchen ist gemäß (Gl. 3.3) bei gegebenem Lösungsmittel die Flußrate der Analytlösung. Die Abschätzung zeigt, daß durch Anwendung der Nano-ESI-Technik Tröpfchen mit deutlich geringerem Radius und entsprechend erheblich geringerem Volumen entstehen. Für die initialen Tröpfchen kann eine Ladung entsprechend 50% ihres Rayleigh-Limits (Gl. 3.6) angenommen werden; die daraus resultierenden theoretischen Stromflüsse stehen sowohl für die Standard-ESI als auch die Nano-ESI in guter Übereinstimmung mit den in der Praxis zu beobachtenden Werten. Die abgeschätzte Ladung der Tröpfchen entspricht einer Konzentration überschüssiger (einwertiger) Ladungsträger von etwa $7 \cdot 10^{-5}$ mol/l in Standard-ESI-Tröpfchen bzw. etwa $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l in Nano-ESI-Tröpfchen. Die Entstehung überschüssiger Ladungsträger kann dabei entweder auf die Entladung der entsprechenden Menge Gegenionen aus einer ausreichend konzentrierten Elektrolytlösung zurückzuführen sein, oder sie ist Folge von Redoxreaktionen während des Sprayprozesses, wie in Kap. 3.1.1 beschrieben.

Die erheblich geringere Größe der initialen Tröpfchen aus dem Nano-ESI-Prozeß bringt gerade bei schwer verdampfenden Lösungsmitteln wie Wasser im Vergleich zur Standard-ESI deutliche Vorteile in den Schritten des Tropfenzerfalls (vgl. Kap. 3.1.2.1). Um den zum Zerfall relevanten Tropfenradius zu erreichen, muß aus initialen Nano-ESI-Tröpfchen nur etwa 1/100 des Lösungsmittelvolumens durch Verdunstung entfernt werden, wie es im Fall der Standard-ESI-Tröpfchen erforderlich ist. Zudem weisen initiale Nano-ESI-Tröpfchen eine verhältnismäßig größere Oberfläche als Standard-ESI-Tröpfchen auf, was die Verdunstung von Lösungsmittelmolekülen zusätzlich begünstigt. Die nach dem unsymmetrischen Zerfall bei Erreichen von 80% des Rayleigh-Stabilitätslimits verbleibenden Resttröpfchen sind im Fall der Nano-ESI ebenfalls deutlich kleiner und können nach Verdunstung einer geringeren Lösungsmittelmenge als vergleichbare Standard-ESI-Tröpfchen erneut zerfallen. Im Fall der Nano-ESI-Tröpfchen ist demnach eine deutlich geringere Zeitspanne zwischen den einzelnen Desintegrationsschritten zu erwarten. Dies ermöglicht den Resttröpfchen, in der Zeitspanne der Desolvatisierung eine größere Anzahl von Zerfallsereignissen zu durchlaufen, so daß insgesamt ein größerer Anteil des initialen Tropfens (und damit des darin enthaltenen Analyten) der massenspektrometrischen Analyse zugänglich gemacht wird.

Die geringe Größe der initialen Tröpfchen in der Nano-ESI hat ebenfalls zur Folge, daß schon die *offspring droplets* des ersten Zerfalls die für die Ionenfreisetzung erforderliche Größe von 10 nm erreichen können (vgl. Kap. 3.1.2.2). Unter den zur Abschätzung gewählten Bedingungen enthält durchschnittlich jeder zehnte *offspring droplet* ein einzelnes Analytteilchen, das schließlich entsprechend den vorgestellten Mechanismen in ein detektierbares Gasphasenion überführt werden kann. Auch die aus den unsymmetrischen Zerfallsereignissen verbleibenden Resttropfen sind relativ klein, so daß im Idealfall eine vollständige Verdampfung des Lösungsmittels und damit ein Nachweis des geladenen Restes möglich sein sollte. Im Vergleich hierzu sind in der Standard-ESI zwei unsymmetrische Zerfallsschritte der initialen Tröpfchen bzw. *offspring droplets* der ersten Generation erforderlich, um die zur Ionenfreisetzung kritische Größe zu unterschreiten. Bei statistischer Verteilung des Analyten in der Lösung enthält danach durchschnittlich nur jeder 300. *offspring droplet* der zweiten Generation ein einzelnes Analytteilchen, welches in der Folge freigesetzt und detektiert werden kann (vgl. Abb. 3.2). Die aus dem ersten Zerfall verbleibenden Resttropfen können dabei zwar nach Verdampfung von Lösungsmittel erneut unsymmetrisch zerfallen, aber aufgrund ihrer Größe ist eine vollständige Verdampfung des Lösungsmittels unwahrscheinlich. Der größte Anteil ihrer Bestandteile ist demnach für die Analyse verloren.

Der Vergleich macht deutlich, daß für die Überführung eines gelösten Analyten in massenspektrometrisch detektierbares Gasphasenion mit Hilfe der Nano-ESI-Technik bessere Ausgangsbedingungen herrschen, als sie bei Einsatz der Standard-ESI erreicht werden. Gerade bei Verwendung wäßriger Lösungen oder schlecht freizusetzender Analytteilchen ist diese Technik daher von besonderem Wert.

Die Methode der Nano-ESI ist im praktischen Einsatz allerdings auch mit einigen Schwierigkeiten behaftet. So ist das Verfahren bislang nicht automatisierbar und daher nur bedingt für *high-throughput*-Analysen nutzbar. Die Herstellung von Spraykapillaren mit definiertem Öffnungsdurchmesser ist oft problematisch, und die Kapillarenöffnung verstopft während des Sprayvorgangs häufig durch in der Analytlösung enthaltene Fremdpartikel. Ferner haftet eine erhebliche Menge der Analytsubstanz an der Innenwand der Kapillare [Dül99a], was gerade für die Analyse stark verdünnter Lösungen problematisch ist. Insbesondere bei Verwendung neutraler Analytlösungen können zudem im Glas enthaltene Salze die Analytlösung verunreinigen und zum verstärkten Nachweis von Na⁺-Addukten der Analytionen führen ^[1].

3.2.3. *Zwischen Sprayquelle und Massenanalysator*

Während die Zerstäubung der Analytlösung unter Atmosphärendruck verläuft, erfolgt der Nachweis der Analytionen – je nach eingesetztem Massenspektrometertyp (s. Kap. 4) – im Druckbereich zwischen 10⁻¹ und 10⁻⁸ Pa. Um trotz der erforderlichen Öffnung im Massenspektrometer (im folgenden „*nozzle*“ genannt; Durchmesser im Bereich von 0,5 mm) die nötige Druckdifferenz aufrecht zu erhalten, findet ein differenziell bepumptes Vakuumsystem Anwendung. Ein System mit drei Druckstufen ist in Abb. 3.8 schematisch dargestellt (nach [Bru97]).

Die einzelnen Druckstufen sind voneinander durch *skimmer* ^[2] oder Lochblenden getrennt, deren Öffnungsdurchmesser ebenfalls in der Größenordnung von 0,5 mm liegt. Einen möglichst effizienten Transport von Analytionen in den Massenanalysator gewährleisten häufig zusätzliche ionenoptische Bauteile oder Transfermultipole. Der Übergang von Atmosphärendruck ins Vakuumsystem ist mit erheblichen Verlusten verbunden. Wie Zook et al. [Zoo97] zeigen konnten, erreicht im Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom (siehe unten) nur ca. 0,1% des an der Kapillare abfließenden Stroms den ersten *skimmer*. Weitere

¹ U. Bahr, J. W. Goethe-Universität Frankfurt, persönliche Mitteilung

² Als *skimmer* (oder Abschäler) werden trichterförmige Bauteile bezeichnet, welche beispielsweise zum Herausschälen des Kerns eines Molekularstrahls eingesetzt werden.

Verluste auf dem Weg zum Massenanalysator begründen die Abschätzung der Autoren, daß letztendlich nur 0,001% des initialen Stroms den MS-Detektor erreicht.

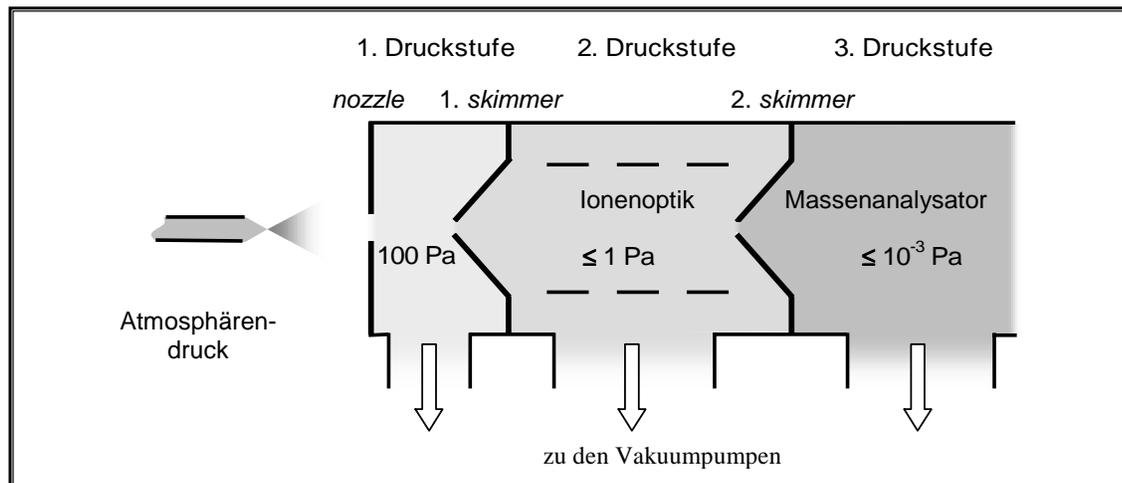


Abb. 3.8: Schematische Darstellung eines Vakuumsystems mit drei differenziell bepumpten Druckstufen (nach [Bru97])

Durch die *nozzle* gelangen sowohl die geladenen Analytträger als auch Lösungsmitteldampf und umgebendes Gas in die erste Druckstufe, wobei die Strömungsgeschwindigkeit maximal Schallgeschwindigkeit beträgt. Mit der Expansion ist eine starke Abkühlung des Gasgemischs verbunden, was zur Kondensation von Lösungsmittel auf die Analytträger führen kann. Dieser Effekt wird in der Molekularstrahltechnik zur Präparation von molekularen Clustern aus den Komponenten einer solchen Expansion genutzt (siehe hierzu z.B. [Cam84]); er ist in der ESI-MS allerdings unerwünscht und wird durch einen geeigneten Aufbau im Eingangsbereich unterbunden (siehe unten).

Die Desolvatisierung und Ionisierung des Analyten finden zwischen Atmosphärendruckseite und erstem Skimmer statt. Dem Aufbau dieses Bereichs kommt in der ESI daher besondere Bedeutung zu, denn die gewählten Desolvatisierungsbedingungen leisten einen entscheidenden Beitrag zum Erfolg einer Analyse. Aufgabe des Übergangsbereichs ist die Zufuhr von Energie zu den geladenen Tröpfchen und ihren Zerfallsprodukten. Damit wird nicht nur die Kondensation von Lösungsmittel auf den Analytträgern verhindert, sondern außerdem die Entfernung flüchtiger Komponenten aus den Tröpfchen unterstützt und somit die Freisetzung von Analytionen ermöglicht (s. Kap. 3.1.2). Die Zufuhr von Energie erfolgt in der Regel durch Kombination zweier Verfahren: der Zufuhr von Wärme durch geheizte Bauelemente und Energiezufuhr durch Stöße, welche die bewegten Analytträger mit umgebenden Gasmolekülen eingehen.

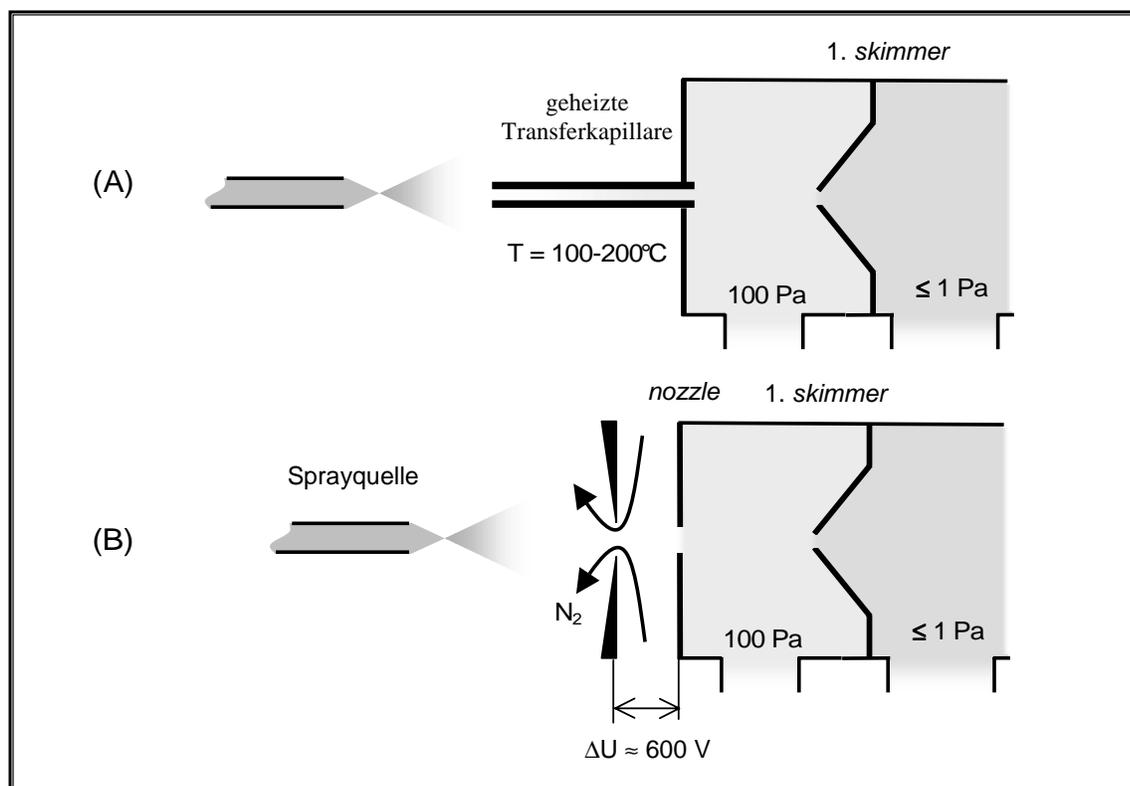


Abb. 3.9: Grundtypen des Aufbaus im Eingangsbereich des Massenspektrometers. A) mit geheizter Transferkapillare; B) mit geheiztem Stickstoffgegenstrom (Fa. SCIEX)

Es lassen sich im unmittelbaren Eingangsbereich zwei Grundtypen des Aufbaus unterscheiden, die mit mehr oder weniger ausgeprägten Modifikationen in den kommerziell erhältlichen ESI-MS-Systemen zu finden sind (Abb. 3.9). Der Aufbau mit geheizter Transferkapillare (Abb. 3.9 A), der auf Chowdhury et al. [Cho90] zurückgeht, zeichnet sich durch eine etwa 10 – 20 cm lange Kapillare mit einem Innendurchmesser von etwa 0,5 mm aus, die typischerweise auf Temperaturen zwischen 100°C und 200°C aufgeheizt wird. Während der Verweilzeit der Tröpfchen in der Transferkapillare wird auf diese Weise die Verdampfung von Lösungsmittel unterstützt und die Desolvatisierung des Analyten ermöglicht.

Im zweiten Aufbautyp (Abb. 3.9 B) wird der Raum zwischen der *nozzle* und einer vorgelagerten geheizten Blende von Stickstoff durchspült. Der vorgeheizte Stickstoff strömt durch die Öffnung der Blende den geladenen Tröpfchen entgegen und heizt diese somit auf. Im Bereich zwischen Blende und dem Eingang ins Massenspektrometer werden die geladenen Tröpfchen durch eine geeignete Potentialdifferenz zwischen den Bauteilen beschleunigt, was einen zusätzlichen Effekt der Trocknung durch Stöße mit sich bringt. Als Desolvatisierungsparameter sind in diesem Aufbau demnach die Stärke des Gasstroms, die Temperatur der Blende und die Potentialdifferenz zwischen Blende und *nozzle* anzusehen. Je effizienter jeder

der beiden Aufbautypen die Lösungsmittelverdampfung unterstützt, desto mehr Zerfallsereignisse können die initialen Tropfen während des Transports in die erste Druckstufe durchlaufen. Die Zeitspanne, die ein Tropfen den desolvatisierenden Bedingungen ausgesetzt ist, hängt im wesentlichen von der Geometrie des Aufbaus ab. Als Größenordnung wird eine Dauer von einigen ms angenommen [Keb93].

Die weitere Desolvatisierung der Analytioneen erfolgt in beiden Aufbautypen im Bereich der ersten Druckstufe bei einem Druck von etwa 100 Pa durch Stöße mit dem darin befindlichen Restgas. Die geladenen Teilchen werden zu diesem Zweck in einem elektrischen Feld zwischen *nozzle* bzw. Transferkapillare und darauffolgendem Skimmer beschleunigt, wobei die regelbare Potentialdifferenz zwischen beiden Bauteilen die Dosierung der Energieübertragung bei diesem Prozeß ermöglicht. Typische Werte der Potentialdifferenz liegen in der Praxis zwischen 10 und 300 V. Auch der Druck in der ersten Druckstufe ist ein für die Desolvatisierung kritischer Parameter ([Rog99], [Str99]), der gerade bei der Analyse von nicht-kovalenten Komplexen von Bedeutung ist; er kann aber in der Mehrzahl der kommerziell erhältlichen MS-Systeme nicht variiert werden. Eine ausführliche Diskussion zum Einfluß des Drucks findet sich in Kap. 6.1 und 6.2 der vorliegenden Arbeit.

Je effizienter die Vortrocknung der Analytträger erfolgt, desto weniger Energie muß für die Präparation vollständig desolvatisierter, aber immer noch intakter Analytioneen durch diese Stöße zugeführt werden. Wird bei diesem Prozeß zuviel Energie zugeführt, so kann das die Fragmentierung des Analyten zur Folge haben (vgl. Abb. 3.3). Gerade bei der ESI-MS von Analyten mit nur schwachen Bindungen, wie sie die Verbindungsklasse der nicht-kovalenten Komplexe darstellen, ist daher eine sorgfältige Abstimmung aller Desolvatisierungsparameter für den intakten Nachweis notwendig.

Die Desolvatisierung durch Stöße nach Beschleunigung im elektrischen Feld hat Konsequenzen, wenn Analytioneen in einer breiten Ladungsverteilung diesen Prozeß durchlaufen. Analytioneen in hohen Ladungszuständen werden stärker beschleunigt als solche in niedrigen, so daß unter Umständen die hohen Ladungszustände bereits fragmentieren, während die niedrigen Ladungszustände noch als Cluster mit schwer verdampfbaren Komponenten nachgewiesen werden.

Durch Stöße induzierte Fragmentierungsreaktionen (*collision induced dissociation*, CID) auf dem Weg in den Massenanalysator können ebenfalls analytisch genutzt werden. Wie von van Dongen et al. [Van99] gezeigt werden konnte, ähneln die Spektren protonierter Peptidionen nach CID in der ersten Druckstufe denjenigen, die in der MS/MS nach CID in einer Stoßzelle nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Fragmentanalyse in der „echten“ MS/MS (s. Kap. 4.2.3) ist hier keine aktive Auswahl des Vorläuferions möglich, so daß insbesondere bei der Untersuchung von Mischungen der Informationsgehalt der resultierenden Spektren eingeschränkt ist. Für die sogenannte *up-front-CID* (oder „*poor man's MS/MS*“, [Bru97]) bieten sich sowohl der Bereich in der ersten Druckstufe als auch die Region zwischen erstem Skimmer und einem nachfolgenden Transfermultipol an (s. Abb. 3.8). Die an den Bauteilen angelegten Potentialdifferenzen regeln dabei den Energieeintrag in die Analytionen und damit auch das Ausmaß der Fragmentierung.

4. MASSENSPEKTROMETRISCHE VERFAHREN

Der Begriff „Massenspektrometrie“ (MS) bezeichnet allgemein Verfahren, mit deren Hilfe Ionen in der Gasphase entsprechend ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses m/z aufgetrennt werden [Röm95]. Die Auftrennung kann in der Praxis auf der Basis unterschiedlicher instrumenteller Konzepte realisiert werden. Je nach MS-Methode liegen der Trennung Wechselwirkungen der geladenen Teilchen unter vermindertem Druck mit elektrischen bzw. magnetischen Feldern zugrunde. Aus diesen Wechselwirkungen resultieren Bewegungen der verschiedenen Ionen, die für jedes diskrete m/z -Verhältnis charakteristisch sind. Ein geeignetes Detektionssystem (vgl. [Eva90]) registriert im Anschluß die aufgetrennten Ionen; das Detektorsignal wird dann zum Massenspektrum prozessiert. Die Kalibrierung der Massenskala kann entweder durch gesonderte Analyse einer Standardsubstanz genau bekannter Molekülmasse erfolgen (externe Kalibrierung) oder durch Zusatz einer Standardsubstanz direkt zur analysierten Probe (interne Kalibrierung).

Übliche Massenanalytoren in Verbindung mit ES-Ionenquellen sind heute:

- Quadrupol-Massenspektrometer
- Sektorfeld-Massenspektrometer
- Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometer (*quadrupole ion trap*-, QIT)
- Penning-Ionenfallen-Massenspektrometer (auch *fourier transform ion cyclotron resonance*-, FTICR, genannt)
- Flugzeit-Massenspektrometer (*time-of-flight*-, TOF)

Ein Überblick zu den Prinzipien verschiedener Methoden findet sich z.B. bei Lehmann [Leh96], De Hoffmann et al. [DeH96], Duckworth et al. [Duc86] bzw. Jennings und Dolnikowski [Jen90]. Die Grundlagen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten MS-Methoden, TOF-MS und QIT-MS, sind in den Kapiteln 4.1 und 4.2 zusammengestellt.

Die verschiedenen Verfahren lassen sich nach der Art des Ioneneinlasses in den Analysator in zwei Gruppen einteilen. In Quadrupol-Ionenfalle, Penning-Ionenfalle und Flugzeit-Massenspektrometer erfolgt ein diskontinuierlicher Einlaß von Ionenpaketen in den Analysator, welche im Anschluß massenselektiert und detektiert werden. Im Idealfall sind auf diese Weise aus der Analyse eines einzelnen Ionenpakets Informationen über das gesamte Massenspektrum zugänglich. Quadrupol- und Sektorfeld-Massenspektrometer beruhen dagegen auf kontinuierlichem Ioneneinlaß. Bei der m/z -Analyse über einen bestimmten Massenbereich

4. Massenspektrometrische Verfahren

wird das System schrittweise nur für diskrete m/z -Verhältnisse durchlässig gemacht, während die Ionen aller anderen m/z -Verhältnisse ausgeblendet werden.

Jedes massenspektrometrische Verfahren wird durch eine Reihe von Merkmalen charakterisiert, die den Rahmen für dessen Einsatzmöglichkeiten in analytischen Fragestellungen bilden. Zur Übersicht sind typische Leistungsmerkmale kommerzieller MS-Systeme in Tab. 4.1 zusammengestellt.

	Ioneneinlaß in den Analysator	Druck im Analysator [Pa]	Massenbereich [Thomson]	Massen- auflösung $m/\Delta m$ [*]	Massen- genauigkeit bis zu
Quadrupol- MS	k	$< 10^{-2}$ (a)	4000 (b)	500 – 5000 (b)	100 ppm (c)
Sektorfeld- MS	k	10^{-4} (c)	15000 (a)	50000 (b)	< 1 ppm (a)
FTICR-MS	d	10^{-7} - 10^{-8} (d)	20000 (e)	$> 10^5$ bei m/z 1000 (f)	wenige ppm (d)
QIT-MS	d	10^{-2} - 10^{-1} (g)	6000 (h)	10^3 – 10^4 (e)	50 – 100 ppm (g)
TOF-MS	d	10^{-5} (i)	> 1000000 (b)	5000-15000 (i)	10-20 ppm (i)

Tab. 4.1: Zusammenstellung einiger Eigenschaften ausgewählter Massenanalysatoren; k: kontinuierlicher Ioneneinlaß, d: diskontinuierlicher Ioneneinlaß; *: die Massenauflösung ist aufgrund der unter Umständen verschiedenen Definitionsgrundlagen nur als Richtwert anzusehen (siehe Text). Quellen: (a) [Jen90], (b) [Leh96], (c) [McE97], (d) [Ams96], (e) [Coo91], (f) [Wil98], (g) [Bie97], (h) [DeH96], (i) [Che97] (j) [Wai99].

Es existieren für verschiedene massenspektrometrische Verfahren unterschiedliche Obergrenzen der analysierbaren m/z -Verhältnisse und damit unterschiedliche zugängliche Massenbereiche. Da in der ESI unter Standardbedingungen (vgl. Kap. 3) Analytitionen häufig in hohen Ladungszuständen mit m/z -Verhältnissen im Bereich von 500-2000 Thomson entstehen, wird an das Kriterium des Massenbereichs in diesem Fall keine hohe Anforderung gestellt. Sollen dagegen ESI-generierte Analytitionen in niedrigen Ladungszuständen massenspektrometrisch untersucht werden, wie es bei der Analyse von nicht-kovalenten Komplexen meist der Fall ist, so kann ein ausreichend großer Massenbereich für den Erfolg der Analyse entscheidend sein.

Innerhalb eines zugänglichen Massenbereichs gibt die Massenauflösung $R = m/\Delta m$ an, ob zwei (hypothetische) einfach geladene Ionen der Massen m und $(m+\Delta m)$ noch getrennt beobachtet werden können. Der Begriff der Auflösung ist allerdings nicht einheitlich definiert. Die Definition reicht von der Angabe der Signalbreite auf halber Signalthöhe in der TOF-MS (*full width at half maximum*, FWHM) bis zur Forderung in der Sektorfeld-MS, daß

die Überlagerung zweier benachbarter Signale maximal 10 % der Gesamtsignalintensität betragen darf. Da die Definitionsgrundlage in der Regel nicht zusammen mit den veröffentlichten Werten angegeben wird, sind Vergleiche von Leistungsdaten verschiedener MS-Methoden mit Vorsicht anzustellen, so daß die in Tab. 4.1 angegebenen Werte nur als Anhaltspunkte angesehen werden können. Für viele analytische Fragestellungen ist ebenfalls die Genauigkeit der Massenbestimmung (angegeben in ppm) von Relevanz. Sie ist üblicherweise im Fall einer internen Kalibrierung des Massenspektrums erheblich genauer als bei externer Kalibrierung.

Von analytischer Bedeutung ist weiterhin, welcher Anteil von Ionen, die eine Quelle verlassen, prinzipiell massenspektrometrisch analysiert werden kann (Nachweispotential oder *duty cycle*). Bei Verwendung einer kontinuierlichen Ionenquelle (z.B. ESI) in Verbindung mit Massenanalysatoren mit diskontinuierlichem Ioneneinlaß wird das Nachweispotential im wesentlichen durch die Geschwindigkeit des Analysevorgangs bestimmt. Alle Ionen, die während der Massenanalyse die Quelle verlassen, sind für einen Nachweis verloren, sofern sie nicht durch zusätzliche apparative Maßnahmen vor dem Massenanalysator gespeichert werden können. In der Kombination kontinuierlicher Ionenquellen mit Massenanalysatoren mit kontinuierlichem Ioneneinlaß beträgt das Nachweispotential für ein fest gewähltes m/z -Verhältnis „100%“ (*single ion monitoring*-, SIM-Modus). Soll aber ein Massenbereich untersucht werden, so hängt das gesamte Nachweispotential wiederum von der Geschwindigkeit ab, mit welcher der gesamte Bereich abgetastet wird.

4.1. Flugzeit-Massenspektrometrie

In der modernen Analytik von Biopolymeren hat sich die Flugzeit-Massenspektrometrie (*time-of-flight-MS*, TOF-MS) etablieren können und stellt heute eine leistungsfähige Nachweismethode dar. Innerhalb der letzten Jahre hat die TOF-MS-Technik erhebliche Verfeinerungen und Weiterentwicklungen erfahren, nicht zuletzt bedingt durch die Entwicklung der MALD-Ionisierung [Kar85], [Kar87] und der damit verbundenen Notwendigkeit, den Nachweis von Ionen mit hohen m/z -Verhältnissen auf massenspektrometrischem Weg zu ermöglichen. Auch in ESI-MS von Biopolymeren, insbesondere von nicht-kovalenten Komplexen, ist die Kopplung der Ionenquelle an einen TOF-Massenanalysator vorteilhaft. Ein Überblick zur TOF-MS und den zugrundeliegenden Prinzipien findet sich z.B. bei Guilhaus [Gui95], [Gui97] oder Cotter [Cot99].

4.1.1. Grundlagen der Flugzeit-Massenspektrometrie

Ionen erfahren unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes eine Beschleunigung, deren Ausmaß sowohl von ihrer Masse als auch ihrer Ladung abhängig ist. Prinzip der TOF-MS ist es nun, eine Population von Ionen („Ionenpaket“) zu einem definierten Zeitpunkt in einem elektrischen Feld definierter Ausdehnung zu beschleunigen und sie anschließend eine feldfreie Driftstrecke zum Detektor durchqueren zu lassen. Der Zeitpunkt ihrer Ankunft am Detektor (und damit ihre Flugzeit) wird durch die Geschwindigkeit festgelegt, die aus der Beschleunigung resultiert.

Das Verfahren erfordert die Präparation von einzelnen Ionenpaketen in zeitlichen Abständen und eignet sich daher hervorragend für die Kopplung an diskontinuierliche Ionisierungsmethoden wie MALDI. Bei Einsatz kontinuierlicher Ionisierungsmethoden wie ESI muß dagegen die Entstehung von Ionenpaketen und deren Beschleunigung zu definierten Zeitpunkten durch zusätzliche apparative Maßnahmen gewährleistet werden.

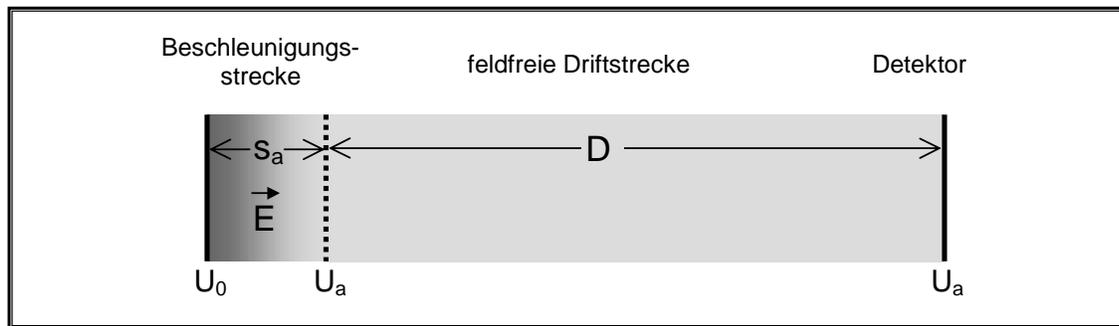


Abb. 4.1: Schematische Darstellung eines linearen TOF-MS mit einstufiger Beschleunigungsstrecke; s_0 : Länge der Beschleunigungsstrecke, D : Länge der Driftstrecke; E : elektrisches Feld, bestimmt durch die Potentiale U_0 und U_a sowie s_0

Der Aufbau eines linearen TOF-MS mit einstufiger Beschleunigungsstrecke ist in Abb. 4.1 schematisch dargestellt. Die Beschleunigung a von Ionen mit verschiedenen m/z -Verhältnissen erfolgt in einem elektrischen Feld der Stärke E gemäß:

$$(Gl. 4.1) \quad a = \frac{E \cdot q}{m} \quad \text{mit } q = z \cdot e$$

mit m : Masse
 q : Ladung
 e : Elementarladung

Die Zeit t_s , welche ein Ion in einer Beschleunigungsstrecke der Länge s_a verbringt, ergibt sich dabei zu:

$$(Gl. 4.2) \quad t_s = \sqrt{2 \frac{m \cdot s_a}{q \cdot E}}$$

mit m : Masse
 s_a : Länge der Beschleunigungsstrecke
 q : Ladung des Ions
 E : elektrische Feldstärke

Nach Durchlaufen einer Beschleunigungsstrecke und dem Eintreten in die feldfreie Driftstrecke der Länge D weisen die Ionen dann eine Driftgeschwindigkeit v_D auf, die durch (Gl. 4.3) wiedergegeben wird. Die resultierende Driftzeit t_D unter feldfreien Bedingungen über die Distanz D folgt der Beziehung in (Gl. 4.4).

$$(Gl. 4.3) \quad v_D = \sqrt{\frac{2 \cdot q \cdot E \cdot s_a}{m}}$$

$$(Gl. 4.4) \quad t_D = \frac{D}{\sqrt{(2 \cdot q \cdot E \cdot s_a)/m}}$$

Die Zeit, in welcher die Ionen die Beschleunigungsstrecke durchlaufen, und ihre Driftzeit gehen additiv in die zu beobachtende Gesamtflugzeit ein. Im typischen Aufbau eines TOF-MS-Experiments erfolgt eine Beschleunigung auf Translationsenergien in der Größenordnung von keV über eine Strecke von wenigen mm und anschließend eine feldfreie Driftstrecke in der Größenordnung von 1 m. Unter diesen Bedingungen überwiegt die Driftzeit über die Beschleunigungszeit; die resultierenden Flugzeiten der Ionen liegen in der Größenordnung von 100 μ s [Gui95].

Wie aus den Gleichungen (Gl. 4.1) bis (Gl. 4.4) ersichtlich wird, erfahren Ionen mit niedrigem m/z -Verhältnis eine stärkere Beschleunigung und erreichen somit den Detektor zu früheren Zeitpunkten als Ionen mit höheren m/z -Werten. Der zugängliche Massenbereich ist theoretisch unbegrenzt, da zur Detektion von Ionen mit hohen m/z -Verhältnissen prinzipiell nur eine ausreichende Wartezeit bis zu deren Auftreffen auf dem Detektor notwendig ist. In der Praxis erfährt diese Eigenschaft zwar Einschränkungen, die aus der Natur des Detektionssystems resultieren (s. unten), aber dennoch ist ein ausgedehnterer Massenbereich als in anderen MS-Typen der Messung zugänglich. So konnten in der MALDI-TOF-MS bereits Ionen mit einem m/z -Verhältnis von mehr als 1000 kDa nachgewiesen werden [Kar97b]. In der ESI-MS von nicht-kovalenten Komplexen, die häufig in niedrigen

Ladungszuständen gebildet werden, ist dieses Merkmal der TOF-MS von besonderer Relevanz.

Das Detektorsignal in Abhängigkeit der Zeit spiegelt in der Folge die m/z -Verhältnisse aller Ionen aus dem ursprünglich beschleunigten Ionenpaket wider, so daß aus einem einzigen Beschleunigungsereignis prinzipiell das komplette Massenspektrum zugänglich ist. In der Praxis erfolgt allerdings meist ein Aufsummieren über eine gewisse Anzahl von Einzelspektren, um die Zusammensetzung der Ionenpopulationen statistisch gesichert wiedergeben zu können. Die Repetitionsrate des Experiments wird durch die Flugzeit der langsamsten Ionen (mit dem höchsten m/z -Verhältnis) begrenzt. Da aber die Flugzeiten in der Regel in der Größenordnung von nur 100 μs liegen, sind dennoch Repetitionsraten im Bereich von mehreren kHz möglich. Somit kann grundsätzlich in kurzer Zeit eine große Zahl von Einzelspektren aufgenommen und summiert werden, was gerade für die Kopplung der ESI-MS an schnelle Trennverfahren vorteilhaft ist (vgl. [Che99]).

Als Detektionssysteme in der TOF-MS (vgl. [Gui95]) dienen häufig Vielkanalplatten (*microchannelplates*, MCP), in denen ein auftreffendes Ion eine Kaskade von Sekundärionen auslöst. Üblicherweise wird auf diese Weise ein Verstärkungsfaktor von 10^5 - 10^7 erzielt; da die Anzahl der ausgelösten Elektronen allerdings vom Impuls des auftreffenden Ions bestimmt wird, nehmen die Elektronenausbeuten bei Ionen mit sehr hohen m/z -Verhältnissen stark ab. Der aus dem Auftreffen eines Ions resultierende Strompuls mit einer Länge von typischerweise 1-5 ns [Gui95] wird in einen Spannungspuls konvertiert. Die Prozessierung erfolgt meist entweder nach dem Prinzip der schnellen Analog-Digital-Wandlung (ADC) mit integrierenden Transientenrekordern oder durch Einsatz eines TDC (*time-to-digital converter*). Das Prinzip des TDC besteht in der Registrierung der Zeitintervalle zwischen diskreten Ereignissen, im Fall der TOF-MS also zwischen dem Start des Ionenpakets und dem sukzessiven Auftreffen der Ionen mit verschiedenen m/z -Verhältnissen auf dem Detektor. Wird das Detektorsignal zuvor durch einen Diskriminator verarbeitet, so kann die ansteigende Flanke eines Peaks mit einer Zeitauflösung $< 1\text{ns}$ registriert werden.

4.1.2. Der Einfluß der Startbedingungen

In der TOF-MS wird die Auflösung der detektierten Ionensignale in der Regel nach der FWHM-Definition angegeben. Es gilt [Gui95]:

$$(Gl. 4.5) \quad \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t}$$

Unterschiede in der Ankunftszeit von Ionen mit gleichen m/z -Werten können sich – neben gerätebedingten Parametern (vgl. [Gui95], [Lai94]) – bei Verwendung zeitlich konstanter elektrischer Felder auch aus unterschiedlichen Startpositionen in der Beschleunigungsstrecke und aus Unterschieden in der initialen Geschwindigkeit der Ionen parallel zur Beschleunigungsrichtung ergeben. Einige der möglichen Fälle sind in Abb. 4.2 schematisch dargestellt.

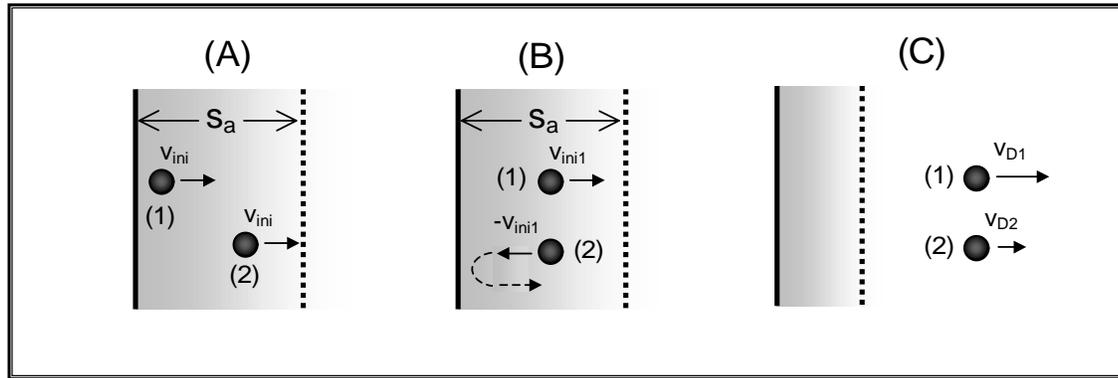


Abb. 4.2: Schematische Darstellung einiger möglicher Unterschiede zwischen Ionen mit gleichem m/z -Verhältnis, die zu einer Verschlechterung der Auflösung in der linearen TOF-MS führen

Unterschiedliche Startorte von Ionen mit gleichem m/z -Verhältnis und gleichen Geschwindigkeiten v_{ini} (Abb. 4.2 A) bewirken eine längere Aufenthaltszeit des weiter von der Driftstrecke entfernten Ions (1) in der Beschleunigungsstrecke. Allerdings erfährt ein solches Ion auch eine stärkere Beschleunigung, so daß seine resultierende Driftgeschwindigkeit höher ist und es das Ion (2) einzuholen vermag. Es existiert somit ein Ort in der feldfreien Driftstrecke, den beide Ionen zu gleicher Zeit durchlaufen („Ortsfokus“, „Fokussierung 1. Ordnung“); die Ionen weisen allerdings unterschiedliche kinetische Energien auf. Im Fall einer einstufigen Beschleunigung wird der Ortsfokus nach einer Driftstrecke von $2s_a$ erreicht (vgl. [Wil55]). Ein an der entsprechenden Stelle positionierter Detektor könnte beide Ionen zur gleichen Zeit nachweisen; allerdings sind die mit diesen kurzen Flugstrecken verbundenen Flugzeiten für eine praktische Nutzung dieser Fokussierung im linearen TOF zu gering. Werden die Ionen allerdings zunächst in einem schwachen und unmittelbar danach in einem stärkeren elektrischen Feld beschleunigt (zweistufige Beschleunigung nach Wiley und McLaren [Wil55]), so wird der Ortsfokus erst nach längeren Driftstrecken erreicht und ist damit praktisch nutzbar.

Fall B in Abb. 4.2 zeigt zwei Ionen gleichen m/z -Verhältnisses, die sich am gleichen Ort innerhalb der Beschleunigungsstrecke befinden und initial mit entgegengesetzter Geschwindigkeit bewegen. Ion (2) wird im Beschleunigungsfeld zunächst abgebremst und erst dann zur feldfreien Driftstrecke beschleunigt, so daß die Beschleunigung formal vom ursprünglichen

Startort zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt. Die benötigte „*turn-around-time*“ des Ions (2) ist nicht durch statische elektrische Felder zu kompensieren [Gui95].

Im Fall C (Abb. 4.2) befinden sich zwei Ionen mit gleichem m/z -Verhältnis und unterschiedlicher kinetischer Energie im Ortsfokus. Der Energieunterschied zwischen diesen Ionen kann durch den Einsatz eines sogenannte Reflektors ^[1] kompensiert werden, was als „Fokussierung 2. Ordnung“ oder „Energiefokussierung“ bezeichnet wird (vgl. [Mam73]). In der Reflektor-TOF-MS treten die Ionen am Ende der feldfreien Driftstrecke in ein abbremsendes Gegenfeld (ein- oder mehrstufig) ein und werden in Gegenrichtung wieder herausbeschleunigt (Abb. 4.3). Die Eindringtiefe eines Ions in den Reflektor (und damit seine Aufenthaltszeit) ist um so größer, je mehr kinetische Energie es besitzt. Bei geeigneter Wahl des Gegenfeldes kann auf diese Weise erreicht werden, daß zwei Ionen trotz unterschiedlicher Geschwindigkeit im Ortsfokus zur gleichen Zeit den Detektor erreichen.

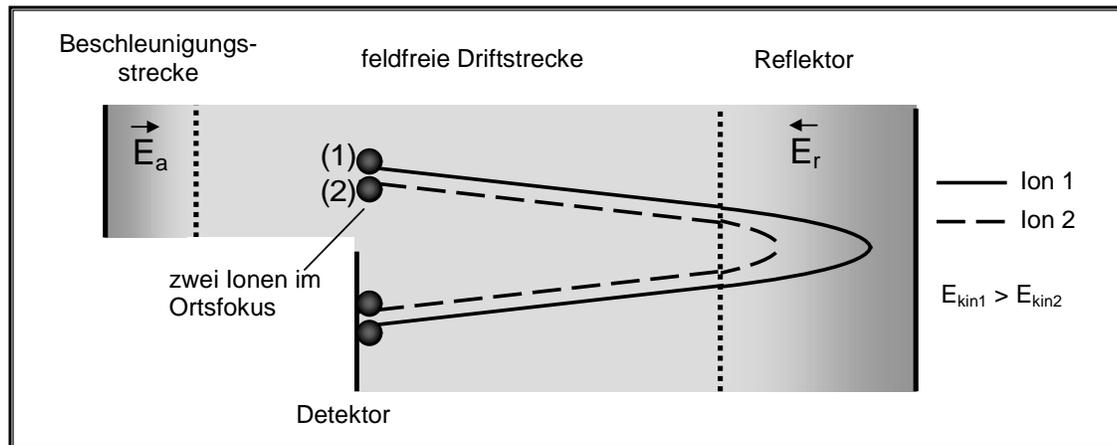


Abb. 4.3: Schematische Darstellung eines Reflektor-TOF-MS mit den Flugbahnen zweier Ionen mit gleichem m/z -Verhältnis, aber unterschiedlicher kinetischer Energie; E_a : elektr. Feld in der Beschleunigungsstrecke, E_r : elektr. Feld im Reflektor

In den heutigen TOF-MS-Systemen findet oft eine Kombination von zweistufiger Extraktion und Reflektor Anwendung, um ein optimales Auflösungsvermögen des Massenspektrometers zu ermöglichen. Die Systeme sind idealerweise so dimensioniert, daß der Ortsfokus als „virtuelle Objektebene“ für den Reflektor dient, welcher dann die Unterschiede in der kinetischen Energie der Ionen kompensiert.

In der MALDI-Massenspektrometrie kann eine zusätzliche Verbesserung der Auflösung im axialen TOF-MS durch das Verfahren der „verzögerten Extraktion“ (*delayed extraction*, DETM) erzielt werden (vgl. z.B. [Juh96]). Diese Technik, die auf einem zeitverzögerten

¹ Bei Mamyrin et al. [Mam73] findet sich die Bezeichnung „Reflektor“.

Anlegen der Potentialdifferenz in der ersten Beschleunigungsstrecke beruht, vermag Ionen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten in der Beschleunigungsstrecke auf den Detektor zu fokussieren, so daß sie zu gleicher Zeit nachgewiesen werden können. Allerdings gelingt die Kompensation der Geschwindigkeitsunterschiede durch Anpassung von Verzögerungszeit und Beschleunigungsspannung stets nur für Ionen innerhalb eines engen Massenfensters.

4.1.3. Flugzeit-Massenspektrometer mit orthogonaler Extraktion

Die Methode der TOF-MS bietet, wie bereits in den Abschnitten zuvor erwähnt, Vorteile in der Analyse ESI-generierter Ionen. Um allerdings eine kontinuierliche Ionenquelle, wie sie die ESI darstellt, an ein TOF-MS-System koppeln zu können, muß die Bildung von einzelnen Ionenpaketen bewerkstelligt werden. Hier hat sich der Einsatz von Flugzeit-Massenspektrometern mit orthogonaler Extraktion (*orthogonal acceleration TOF*, oTOF) bewährt. Einen Überblick hierzu liefern z.B. [Dod94], [Gui95], [Che97], [Che99].

Die Entwicklung von oTOF-Systemen zur Kopplung an kontinuierliche Ionenquellen geht auf die Arbeiten von Dodonov und Mitarbeitern ([Dod94], [Mir94a], [Lai94]) und Guilhaus und Mitarbeitern [Daw89] zurück. Kernstück des Konzepts ist der Bereich der orthogonalen Extraktion, der in Abb. 4.4 schematisch dargestellt ist.

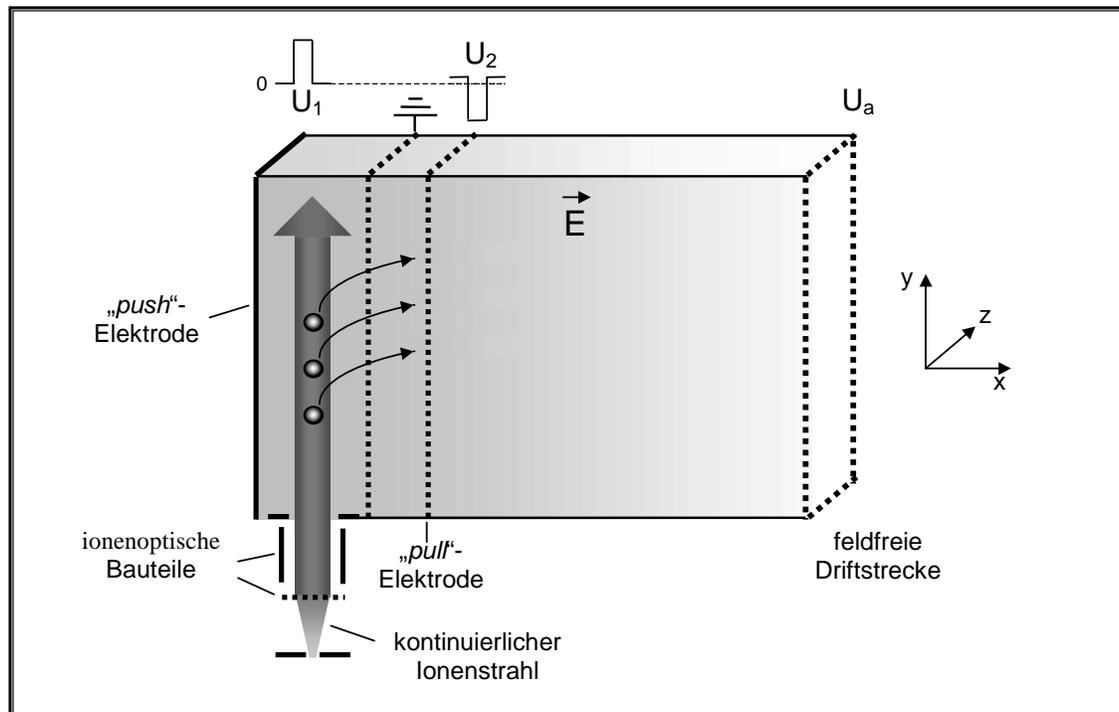


Abb. 4.4: Schematische Darstellung des Extraktionsraums im oTOF-MS.

Der kontinuierliche Ionenstrahl niedriger Energie wird durch ionenoptische Bauteile (beispielsweise elektrostatische Linsen) parallelisiert und gelangt in den Extraktionsraum, in dem während der Füllzeit feldfreie Verhältnisse herrschen. Zur Extraktion positiver Ionen wird für eine kurze Zeit die rückwärtige Platte („*push*-Elektrode“) auf ein positives Potential U_1 gebracht; je nach Konzeption des Systems kann an das zweite Netz („*pull*-Elektrode“) gleichzeitig ein negatives Potential U_2 angelegt werden. Die Ionen erfahren daraufhin eine Beschleunigung in x-Richtung aus dem Extraktionsraum heraus und werden im anschließenden elektrischen Feld weiter beschleunigt. Die Abstimmung der angelegten Potentiale aufeinander bei gegebener Geometrie bestimmt letztendlich, ob die Beschleunigung formal in einer Stufe (z.B. [Ver94]) oder in zwei Stufen erfolgt (z.B. [Daw89]).

Haben die letzten Ionen den Extraktionsbereich verlassen, so wird dieser wieder in einen feldfreien Zustand versetzt und mit Ionen aus dem kontinuierlichen Strahl gefüllt. Um Durchgriffe des elektrischen Feldes aus der Beschleunigungsregion in den Extraktionsbereich zu verhindern, kann währenddessen an das zweite Netz eine positive Spannung von wenigen Volt angelegt werden [Dod94], [Ver94]. Der Extraktionsraum ist in der Regel so dimensioniert, daß er wieder gefüllt ist, sobald die Ionen mit den höchsten m/z -Verhältnissen den Detektor am Ende der feldfreien Driftstrecke erreichen. Typischerweise weist er eine Länge von 5-10% der Driftstrecke auf [Gui95].

In der Praxis, insbesondere bei Einsatz einer ESI-Quelle, ist meist die Präparation eines idealerweise parallelen Ionenstrahls im Extraktionsraum nur schwer realisierbar [Boy92], [Gui95]. Die Ionen weisen somit Geschwindigkeiten in x-, y- und z-Richtung auf, wobei die Beiträge in x- und z-Richtung allerdings erheblich kleiner als diejenigen in y-Richtung sind (vgl. Abb. 4.4). Ferner sind die Ionen über ein Volumen endlicher Ausdehnung verteilt. Sowohl die Geschwindigkeitskomponente als auch räumliche Verteilung in x-Richtung haben nachteiligen Einfluß auf die erreichbare Auflösung im linearen TOF mit einstufiger Beschleunigung (vgl. Kap. 4.1.2). Durch den Einsatz eines Reflektors in geeigneter Instrumentengeometrie kann die Auflösung erheblich verbessert werden [Gui95], [Lai94], [Dod94], [Ver94]. Die zusätzliche Fokussierung des Ionenstrahls vor Eintritt in den Extraktionsraum durch Einsatz eines rf-Quadrupols verbessert die Auflösung ebenfalls [Kru95].

Die Ionen behalten während des Beschleunigungsvorgangs und während des Weges durch die feldfreie Driftstrecke ihre ursprüngliche Geschwindigkeit in y- und z-Richtung bei, so daß der Detektor ausreichend groß und gegenüber dem Extraktionsraum entsprechend in y-Richtung

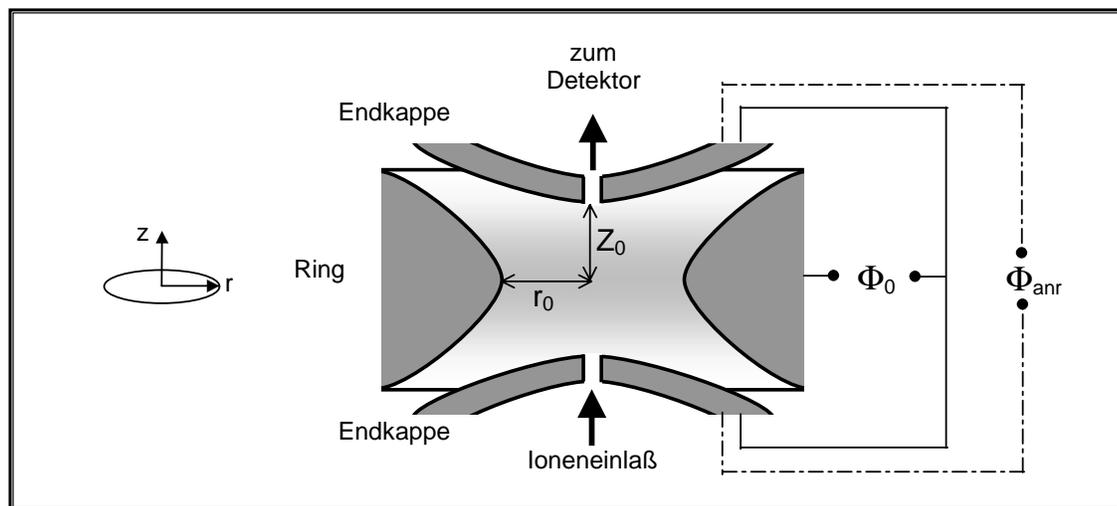
verschoben angeordnet sein muß. Zwar kann die Bewegung in y -Richtung durch den Einsatz von Ablenkelektroden hinter der Beschleunigungsregion kompensiert werden, doch ist mit dieser Technik eine Verschlechterung der erreichbaren Auflösung verbunden [Gui94].

4.2. Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometrie

Die Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometrie (*quadrupole ion trap MS*, QIT-MS) stellt – wie die TOF-MS – eine leistungsfähige Methode in der ESI-MS dar. Die QIT, ursprünglich zur Speicherung von Ionen entwickelt (vgl. [Pau90]), bietet insbesondere die Option konsekutiver MS^n -Experimente, welche umfassende Strukturanalysen ermöglichen. Einen Überblick zu den Grundlagen und Einsatzmöglichkeiten der QIT-MS liefern z.B. [Bie97], [McL94], [Coo91].

4.2.1. Das Prinzip der Quadrupol-Ionenfalle

Das der QIT zugrundeliegende Prinzip besteht in der Speicherung von Ionen in einem dreidimensionalen Quadrupolfeld, welches zwischen einem hyperbolisch geformten Ring und zwei hyperboloiden Schalen („Endkappen“) erzeugt wird. Der Aufbau ist in Abb. 4.5



schematisch dargestellt.

Abb. 4.5: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Quadrupol-Ionenfalle. Erläuterungen siehe Text

Im Idealfall befinden sich die Ionen bereits in der Mitte der Zelle (bzw. werden dort erzeugt) und besitzen zu Beginn der Speicherung nur eine niedrige kinetische Energie. Zur Stabilisierung der Ionen ist dann ein sich periodisch änderndes elektrisches Feld erforderlich,

4. Massenspektrometrische Verfahren

das durch Anlegen einer Spannung Φ_0 gemäß (Gl. 4.6) zwischen Ringelektrode und Endkappen generiert wird:

$$(Gl. 4.6) \quad \Phi_0 = U + V \cos(\omega t)$$

mit U: Gleichspannung
 V: Wechselspannung (Amplitude)
 ω : Frequenz der Wechselspannung

Die Ionen führen daraufhin in der Falle Bewegungen in radialer (r-) und axialer (z-) Richtung aus. Ob diese Bewegungen stabil sind und ein Ion somit in der Falle gespeichert werden kann, hängt von den dimensionslosen Parametern a und q der jeweiligen Raumrichtung ab, die sich aus der Lösung der Mathieu-Differentialgleichung ergeben.

$$(Gl. 4.7) \quad a_z = -2a_r = \frac{-16zU}{m(r_0^2 + 2Z_0^2)\omega^2}$$

$$(Gl. 4.8) \quad q_z = -2q_r = \frac{-8zV}{m(r_0^2 + 2Z_0^2)\omega^2}$$

mit z: Ladung des Ions
 m: Masse des Ions
 r_0 : Radius der Ringelektrode
 Z_0 : kleinster Abstand zwischen der Mitte der Falle und einer der Endkappen

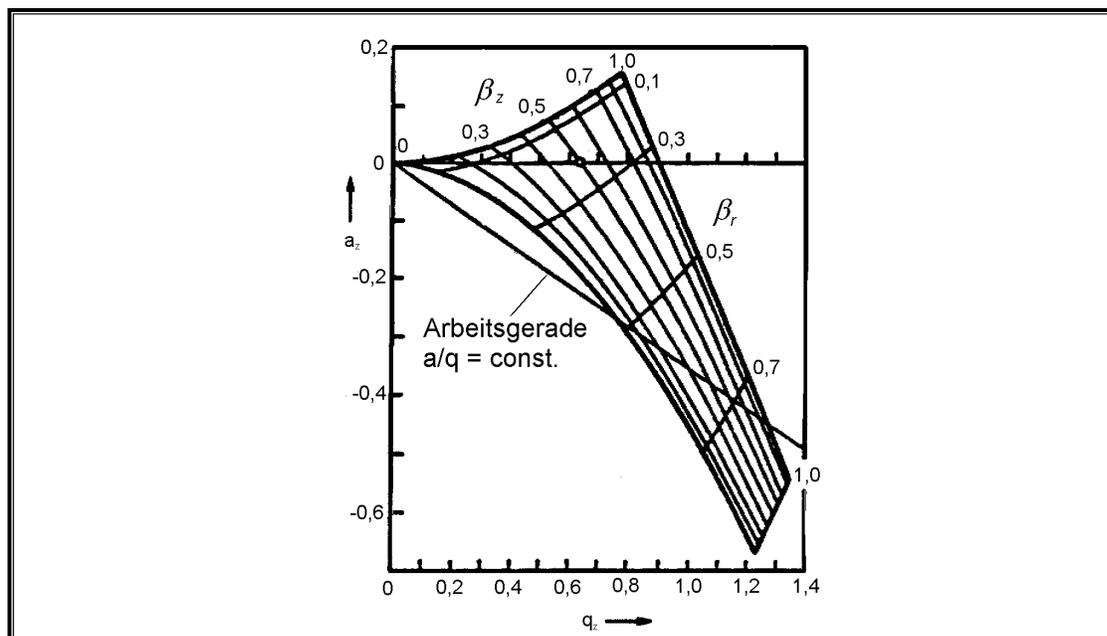


Abb. 4.6: a_z - q_z -Diagramm mit Stabilitätsbereich und einer willkürlich festgelegten Arbeitsgeraden (nach [Pau90]). Im Betrieb der Quadrupol-Ionenfalle als Massenanalysator gilt in der Regel $a_z=0$, so daß die Arbeitsgerade auf der q_z -Achse zu liegen kommt.

Die Mathieu-Parameter a und q eines Ions mit gegebenem m/z -Verhältnis werden (Gl. 4.7) und (Gl. 4.8) zufolge durch die Wahl von U und V bestimmt. Wie weiterhin aus den Gleichungen ersichtlich ist, sind a und q umgekehrt proportional zum Masse-zu-Ladungs-Verhältnis der Ionen. Kombinationen von a und q , bei denen die Bewegung in beiden Richtungen stabil und damit eine Speicherung möglich ist, ergeben in einem a,q -Diagramm einen Stabilitätsbereich (vgl. Abb. 4.6). Außerhalb dieses Bereichs ist die Bewegung in mindestens einer Richtung instabil, so daß keine Speicherung erfolgen kann.

Geraden mit $a/q = \text{const}$ werden im a,q -Diagramm als Arbeitsgeraden bezeichnet. Im Betrieb der QIT als Massenanalysator wird in der Regel $U = 0$ gewählt ($a_z = a_r = 0$), so daß in diesem Fall die Arbeitsgerade auf der q -Achse zu liegen kommt. Die Grenze des Stabilitätsbereichs stellt unter diesen Bedingungen $q_z = 0,908$ dar; ab diesem Wert tritt Instabilität in z -Richtung auf. Bei gegebenem V und ω sowie gegebener Zellengeometrie existiert somit gemäß (Gl. 4.8) eine scharfe Untergrenze für das m/z -Verhältnis speicherbarer Ionen. Die Obergrenze des m/z -Verhältnisses, ab welcher eine Speicherung nicht mehr erfolgen kann, ist weniger scharf definiert. Gespeicherte Ionen befinden sich in einer sogenannten „scheinbaren Potentialmulde“, deren Tiefe für ein Ion mit gegebenem m/z -Verhältnis mit steigender Amplitude der Wechselspannung (V) zunimmt. Allerdings ist bei gegebenen Betriebsbedingungen der Falle die Tiefe der scheinbaren Potentialmulde umgekehrt proportional zum m/z -Verhältnis der Teilchen. Mit zunehmenden m/z -Werten steigt somit die Wahrscheinlichkeit von Verlusten aus der Falle an (vgl. [McL94a]).

In der QIT gefangene Ionen führen in r - und z -Richtung Schwingungsbewegungen aus, die als Überlagerung einer langsamen (sog. säkularen) Schwingung mit sehr viel schnelleren Mikrobewegungen beschrieben werden können [Pau90]. Die fundamentalen Frequenzen der Schwingungen in r - und z -Richtung $\omega_{r,z}$ werden gegeben durch:

$$(Gl. 4.9) \quad \omega_{r,z} = \beta_{r,z} \frac{\omega}{2}$$

mit $\beta_{r,z}$: frequenzbestimmender Faktor
 ω : Frequenz der Wechselspannung

Die frequenzbestimmenden Faktoren $\beta_{r,z}$ hängen von den Mathieu-Parametern ab, so daß jedem Punkt im Stabilitätsbereich des a_z,q_z -Diagramms eindeutig ein Wertepaar β_r, β_z zugeordnet werden kann (vgl. Abb. 4.6). Aufgrund der Abhängigkeit von den Mathieu-Parametern ist die Schwingungsfrequenz von Ionen mit gegebenem m/z -Verhältnis ebenfalls von der Wahl der Spannungen U und V abhängig.

4.2.2. *Die Quadrupol-Ionenfalle als Massenanalysator*

Im Betrieb der Quadrupol-Ionenfalle als Massenspektrometer in Verbindung mit einer externen Ionenquelle (z.B. einer ESI-Quelle) besteht ein einfaches MS-Experiment formal aus zwei zeitlich aufeinanderfolgenden Teilschritten:

- (A) dem Akkumulieren von Ionen in der Falle
- (B) der m/z -Analyse der gefangenen Ionenpopulation

Die Durchführung beider Schritte ist prinzipiell auf verschiedenen Wegen möglich; im Hinblick auf das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte QIT-Massenspektrometer wird daher besonderes Augenmerk auf die Arbeitsweise des Finnigan LCQTM gelegt (vgl. [Bie97]).

Im Akkumulationsschritt (A) gelangen die beispielsweise durch eine ESI-Quelle generierten Ionen nach dem Passieren des Eingangsbereichs (vgl. Kap. 3.2.3) durch ein Loch in einer der Endkappen in die Falle (s. Abb. 4.5). Im Gegensatz zu den Idealbedingungen (vgl. Kap. 4.2.1) befinden sie sich demnach nicht im Zentrum der Zelle und weisen zudem noch eine initiale kinetische Energie in der Größenordnung von 4 – 20 eV auf [Bie97]. Zu ihrer Speicherung ist daher die Anwesenheit eines sogenannten „Badgases“ (in der Regel Helium bei einem Druck von 0,01 – 0,1 Pa) erforderlich, mit welchem die Ionen beim Fangprozeß stoßen. Die kinetische Energie der Ionen wird somit verringert, und sie werden im Zentrum der Falle konzentriert. Zur Akkumulation von Ionen mit verschiedenen m/z -Verhältnissen stellt die Amplitude der Wechselspannung zwischen Ringelektrode und Endkappen (und damit die Tiefe der „scheinbaren Potentialmulde“, vgl. Kap. 4.2.1) einen relevanten Parameter dar. Ist sie zu gering, können Ionen mit hohen m/z -Verhältnissen nicht gefangen werden; ist sie allerdings zu hoch, können Ionen mit labilen Bindungen bereits infolge von Stößen fragmentieren [McL94a], [Van91]. Um das Fangen über einen großen m/z -Bereich hinweg zu ermöglichen, kann die Amplitude der Wechselspannung während des Akkumulationsschritts in mehreren Schritten gesteigert werden [Bie97]. Die Dauer der Ionenakkumulation bestimmt bei gegebenem Ionenstrom und gegebenen Betriebsbedingungen der Falle die Anzahl der gespeicherten Ionen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Anwesenheit zu vieler Ionen in der Falle in der Folge die Leistungsfähigkeit der Massenanalyse beeinträchtigt. Die Akkumulationsdauer wird daher über den meßbaren Ionenstrom angepaßt; typische Zeiten liegen im Bereich von 1 μ s bis 1000 ms [Bie97].

Der Schritt der Massenanalyse (B) der nach dem Akkumulationsschritt gespeicherten Ionenpopulation beruht auf dem Prinzip, die Bewegungen von Ionen mit unterschiedlichen m/z -Verhältnissen zu verschiedenen Zeiten in z -Richtung instabil werden zu lassen. Die Ionen

verlassen daraufhin die Falle durch eine zu diesem Zweck durchbohrte Endkappe (s. Abb. 4.5) und können im Anschluß detektiert werden. Zur Entfernung aus der Falle stehen in der Regel zwei alternative Methoden zur Verfügung.

Die Grundform des massenselektiven Instabilitäts-scans^[1] führt Ionen mit unterschiedlichem m/z -Verhältnis nacheinander an die Stabilitätsgrenze bei $q_z = 0,908$ (mit $U = 0$) heran. Nach (Gl. 4.8) ergibt sich der Zusammenhang zwischen m/z -Verhältnis und der Lage auf der Arbeitsgeraden zu:

$$(Gl. 4.10) \quad m/z = \frac{8V}{(r_0^2 + 2Z_0^2) \cdot \omega^2 q_z}$$

Durch kontinuierliche Vergrößerung von V , der Amplitude der angelegten Wechselspannung, werden daher die Ionen in der Reihenfolge zunehmender m/z -Werte aus der Falle entfernt und können dann nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wird die Geschwindigkeit, mit der das Abtasten des zu untersuchenden m/z -Bereichs durch Variation der Wechselspannungsamplitude erfolgt, als „Scangeschwindigkeit“ bezeichnet. Sie beträgt typischerweise mehr als 5000 Thomson/s.

Im massenselektiven Instabilitäts-scan mit resonanter Anregung wird zusätzlich eine dipolare Wechselspannung der Form $\Phi_{\text{anr}} = V_{\text{anr}} \cos(\omega_{\text{anr}} t)$ an die Endkappen angelegt. Instabilität tritt in diesem Fall bei einem Wert von q_z (und damit β_z) auf, an dem die Resonanzbedingung $\omega_z = \omega_{\text{anr}}$ erfüllt ist (vgl. (Gl. 4.9)) – es entsteht formal ein wohldefiniertes „Loch“ im Stabilitätsbereich. Die Schwingungsamplitude der resonant angeregten Ionen wächst, bis sie schließlich die Falle in z -Richtung durch eine der Endkappen verlassen. Wiederum wird im *scan* die Amplitude der Wechselspannung zwischen Ringelektrode und Endkappen kontinuierlich vergrößert, so daß die gefangenen Ionen in der Reihenfolge ihrer m/z -Verhältnisse an den q_z -Wert der Instabilität geführt werden (Gl. 4.10). Ein Vorteil der resonanten Anregung ist, daß Instabilität auch bei relativ niedrigen q_z -Werten hervorgerufen werden kann und damit auch Ionen mit höheren m/z -Verhältnissen aus der Falle entfernt werden können, ohne allzu hohe Wechselspannungsamplituden V einsetzen zu müssen. Im Vergleich zur Grundform des massenselektiven Instabilitäts-scans konnte auf diese Weise der zugängliche m/z -Bereich von 650 bis auf bis zu 70000 Thomson erhöht werden [Coo91]. Im Routineinsatz der QIT-MS ist der Massenbereich allerdings begrenzt (Finnigan LCQTM: 4000 Thomson, Finnigan LCQ^{deca}TM: 20000 Thomson, Bruker EsquireTM: 6500 Thomson).

¹ Als *scan* (engl.: abtasten) wird in der Folge die kontinuierliche Variation einer Größe über einen bestimmten Wertebereich bezeichnet.

Als Detektionssystem sind in der QIT-MS beispielsweise Konversionsdynoden in Kombination mit Elektronenvervielfachern geeignet. Die erreichbare Gesamtverstärkung des Systems ergibt sich dabei aus dem Konversionsfaktor und dem Verstärkungsfaktor am Elektronenvervielfacher; sie kann bis zu 10^7 betragen (vgl. [DeH96]). Der resultierende Stromimpuls wird in einen Spannungsimpuls umgewandelt und im Anschluß computergestützt prozessiert.

Die erreichbare Auflösung im QIT-MS-Experiment hängt – neben den Eigenschaften des Detektionssystems – entscheidend davon ab, wie zeitgleich Ionen mit gleichem m/z -Verhältnis aus der Falle entfernt werden. Dies wird durch folgende Aspekte beeinflusst:

- Jedes in der Falle anwesende Ion stört mit seinem elektrischen Feld das zur Speicherung und Massenanalyse angelegte Feld (sog. Raumladungseffekt); dieser Effekt wird um so größer, je mehr Ionen sich in der Falle befinden. Die Störung wirkt sich auf die Bewegung aller Ionen in der Falle aus und führt neben Signalverbreiterungen auch zur Abnahme der Signalintensität und zur Verschiebung des detektierten m/z -Werts. Der Einfluß von Raumladungseffekten kann verringert werden, wenn im Akkumulationsschritt nur ein Bruchteil der prinzipiell speicherbaren Anzahl von Ionen in die Falle eingelassen wird [Bie97].
- Je geringer die gewählte Scangeschwindigkeit ist, desto genauer erfolgt das Abtasten des interessierenden m/z -Bereichs und desto höher ist die resultierende Auflösung. In der Praxis wird bei Verkleinerung der Scangeschwindigkeit allerdings auch der zu untersuchende m/z -Bereich verkleinert, um die Dauer des Experiments nicht drastisch zu erhöhen und somit den *duty cycle* zu verschlechtern.

4.2.3. Mehrstufige MS-Experimente: MS^n

Die Quadrupol-Ionenfalle bietet die Möglichkeit, mehrstufige MS-Experimente an den gespeicherten Ionen in zeitlich aufeinanderfolgenden Stufen ablaufen zu lassen. Ein zweistufiges MS-Experiment (MS^2) gliedert sich dabei in nachfolgende Teilschritte, wobei die Schritte der Akkumulation (A) und der Analyse (D) mit denen des einstufigen Experiments identisch sind und bereits in Kap. 4.2.2 beschrieben wurden:

- (A) das Akkumulieren von Ionen in der Falle
- (B) die Isolation der interessierenden Ionen
- (C) die Anregung
- (D) die m/z -Analyse der resultierenden Fragmentionen

Zur Durchführung weiterer Stufen werden die Schritte (B) und (C) entsprechend oft wiederholt. Da allerdings die Anzahl der in der Falle gespeicherten Ionen mit jeder MS-Stufe und damit auch die detektierbare Ionensignalintensität prinzipbedingt abnimmt, ist die Zahl der erreichbaren Stufen begrenzt. In der Praxis lassen sich auf diese Weise bereits bis zu acht Stufen (MS^8) erreichen^[1].

Zur Isolation (B) des interessierenden Ions in der Falle bietet sich – neben anderen Methoden – beispielsweise die Entfernung aller anderen Ionen nach dem Prinzip der resonanten Anregung an (zum Überblick vgl. [Bie97]). Bei gegebenen Betriebsbedingungen der Falle kommen den Ionen aller m/z -Verhältnisse charakteristische β_z -Werte und damit Schwingungsfrequenzen ω_z gemäß (Gl. 4.9) zu. Wird nun an die Endkappen eine passende Überlagerung von dipolaren Wechselspannungen definierter Frequenzen und Amplituden angelegt, welche die Frequenz des zu isolierenden Ions ausspart (*tailored waveform*, TWF), werden alle anderen Ionen aus der Falle entfernt.

Im nachfolgenden Schritt (C) erfolgt die resonante Anregung des isolierten Ions durch Anlegen einer Wechselspannung passender Frequenz und geringer Amplitude (weniger als 5 V) über einen Zeitraum von 5-30 ms an die Endkappen. In dieser Zeit durchläuft ein gefangenes Ion Stöße mit dem in der Falle enthaltenen Badgas Helium und kann bei ausreichendem Energieeintrag stoßinduziert fragmentieren (*collision induced dissociation*, CID). Während des Anregungsschritts wird die Amplitude der Wechselspannung zwischen Ringelektrode und Endkappen so gewählt, daß für das anzuregende Ion ein q_z -Wert im Bereich von 0,2 – 0,3 resultiert. Diese Maßnahme stellt einen Kompromiß dar, sowohl das interessierende Ion in einem ausreichend starken Feld zu fangen als auch möglichst viele potentielle Fragmentierungsprodukte trotz geringerer m/z -Verhältnisse q_z -Werte innerhalb des Stabilitätsbereichs annehmen zu lassen (vgl. (Gl. 4.10)). Fragmentionen, die ein m/z -Verhältnis unterhalb des kritischen Werts aufweisen, können nicht mehr nachgewiesen werden.

¹ A. Pfenninger, J. W. Goethe-Universität Frankfurt, persönliche Mitteilung

5. MATERIALIEN UND METHODEN

5.1. Sprayquellen

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen ESI-MS-Experimente wurden unter Verwendung einer Standard-ESI-Quelle oder alternativ einer Nano-ESI-Quelle durchgeführt. Bei der Standard-ESI-Quelle wurde die Analytlösung mittels einer Spritzenpumpe (Sage Instruments, Modell 341 B) durch eine *fused silica*-Kapillare unmittelbar zur Spitze einer Stahlkapillaren (360 µm Außendurchmesser, 180 µm Innendurchmesser) zugeführt, wobei die Flußraten der Analytlösung typischerweise 1 und 5 µl/min betragen. Die Positionierung der Standard-Sprayquelle vor dem Eingangsbereich ermöglichten Präzisions-Verschiebetische. Die eingesetzten Nano-ESI-Quellen beruhen auf der Konzeption der Fa. Protana, Dänemark. Die Positionierung vor dem Eingangsbereich erfolgt unter optischer Kontrolle mit Hilfe von Präzisions-Verschiebetischen. Als Sprayquellen dienten Borosilikatglas-Kapillaren (Fa. Clark Electromedical Instruments, 1,2 m Außendurchmesser, 0,69 mm Innendurchmesser), die mit einem Kapillarenzuggerät (Fa. Sutter Instruments, Modell P-97) zu einer feinen Spitze ausgezogen wurden. Die Goldbeschichtung der Glaskapillaren erfolgte in einem Sputter-Gerät (Fa. Emitech, Modell K 550).

5.2. Massenspektrometer

Für die Durchführung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente standen drei verschiedene Massenanalytoren zur Verfügung: das PerSeptive Biosystems MICKEY, das PE Biosystems MARINER™ sowie das Finnigan LCQ™.

5.2.1. *PerSeptive Biosystems MICKEY*

Das oTOF-MS-System MICKEY wurde von der Firma PerSeptive Biosystems als Prototyp des MARINER™ (vgl. Kap. 5.2.2) entwickelt und hergestellt. Im ursprünglichen Aufbau verfügte es über eine Sprayquelle nach dem IonSpray™-Prinzip (vgl. Kap. 3.2.2); der Eingangsbereich war nach dem Prinzip des geheizten Stickstoffgegenstroms in Verbindung mit einer geheizten *nozzle* (vgl. Kap. 3.2.3) konzipiert. Eine schematische Darstellung des Aufbaus findet sich in Abb. 5.1; die typischerweise an den einzelnen Bauteilen angelegten Potentiale und Betriebstemperaturen sind in Tab. 5.1 zusammengestellt. Die grau unterlegten Felder in Tab. 5.1 kennzeichnen dabei die zur Desolvatisierung relevanten Parameter.

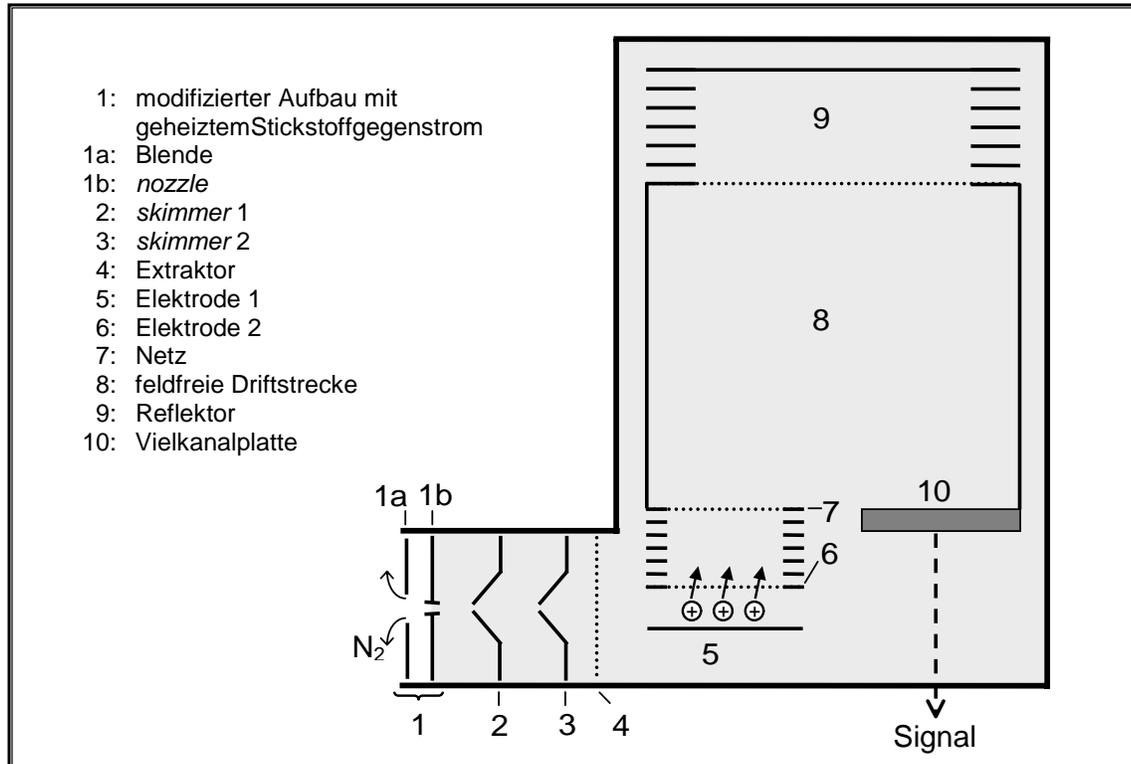


Abb. 5.1: Aufbau des PerSeptive Biosystems MICKEY

Im Verlauf der Arbeit erfolgten im Hinblick auf eine verbesserte Leistungsfähigkeit, insbesondere im Bereich der Desolvatisierungseffizienz, mehrere Modifikationen des Systems.

Die ursprünglich vorhandene Blende wurde durch eine Blende mit separater Spannungsversorgung und separater Heizung ersetzt. Die typischen Betriebsbedingungen dieses Aufbaus sind ebenfalls in Tab. 5.1 aufgeführt. Diese Modifikation des Aufbaus erlaubt die Einstellung einer zusätzlichen Potentialdifferenz zwischen Blende und *nozzle*. Dies erlaubt eine Beschleunigung der ESI-generierten geladenen Tröpfchen durch den entgegenströmenden Stickstoff, was den Prozeß der Desolvatisierung unterstützt. Der Stickstoff selbst wird indirekt durch Kontakt mit der geheizten Blende aufgeheizt; allerdings ist aufgrund der relativ kleinen Kontaktfläche mit einer Gastemperatur unterhalb der Blendentemperatur zu rechnen. Sowohl die Potentialdifferenz zwischen Blende und *nozzle* als auch die Blendentemperatur liefern zusätzliche Variationsmöglichkeiten der Desolvatisierungsbedingungen. Während sich mit diesem Aufbau gute Resultate in Verbindung mit einer Standard-ESI-Quelle erzielen lassen, erweist sich die Kopplung und Einstellung einer Nano-ESI-Quelle eher als problematisch.

		typische Werte (positiver Ionenmodus)
(a) Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom		
Blende	U_{Bl}	+ 50 bis + 400 V
<i>nozzle</i>	U_{Noz}	= U_{Bl}
	T_{Noz}	80 bis 115 °C
(b) modifizierter Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom		
Blende	U_{Bl}	+ 400 V
	T_{Bl}	80 bis 110 °C
<i>nozzle</i>	U_{Noz}	+ 50 bis + 400 V
	T_{Noz}	80 bis 110 °C
(c) Aufbau mit geheizter Transferkapillare		
Transferkapillare	U_{Kap}	+ 20 bis + 400 V
	T_{Kap}	50 – 150 °C
<i>skimmer 1</i>	U_{Sk1}	+ 17 V
<i>skimmer 2</i>	U_{Sk2}	+ 12 V
Extraktor	U_{Ext}	- 10 V
Elektrode 1	U_{El1}	geschaltet von 0 auf + 350 V
Elektrode 2	U_{El2}	geschaltet von + 10 auf - 165 V
Netz (Beschleunigung)	U_{Besch}	- 2800 V
Reflektor (Rückseite)	U_{Ref}	+ 1060 V
Vielkanalplatte (Rückseite)	U_{Det}	- 600 V

Tab. 5.1: Typische Betriebsbedingungen des PerSeptive Biosystems MICKEY. Die zur Optimierung der Desolvatisierungsbedingungen relevanten Parameter sind grau unterlegt.

In der Folge wurde der Eingangsbereich zu einer geheizten Transferkapillare mit einer Länge von etwa 10 cm umgestaltet; die typischen Betriebsbedingungen finden sich in Tab. 5.1. Im praktischen Einsatz zeigte sich, daß im Fall der geheizten Transferkapillaren tendenziell niedrigere Potentialdifferenzen zwischen Eingangsbereich und nachfolgendem ersten *skimmer* eingestellt werden können, als im Fall des geheizten Stickstoffgegenstroms zum Nachweis desolvatisierter Analytionen in ausreichender Signalintensität erforderlich sind. Für einen weitergehenden Vergleich sei an dieser Stelle auf Kap. 6.1 verwiesen. Weiterhin zeigte sich, daß diese Modifikation des Aufbaus auch in Verbindung mit einer Nano-ESI-Quelle gut zu handhaben und daher für dieses analytische Verfahren der Aufbau der Wahl ist.

5.2.2. PE Biosystems MARINER

Das oTOF-MS MARINER™ der Fa. PE Biosystems, stellt eine Weiterentwicklung des in Kap. 5.2.1 beschriebenen Systems dar. Der Ionenstrahl passiert auf dem Weg in den Massenanalysator zusätzlich ein Transferquadrupol sowie einige ionenoptische Bauteile, die eine verbesserte Parallelisierung des Strahls im Extraktionsraum und damit eine Verbesserung der erreichbaren Auflösung gewährleisten (vgl. Kap. 4.1). Der Aufbau des Geräts ist in Abb. 5.2 skizziert; die typischen Betriebsbedingungen finden sich in Tab. 5.2.

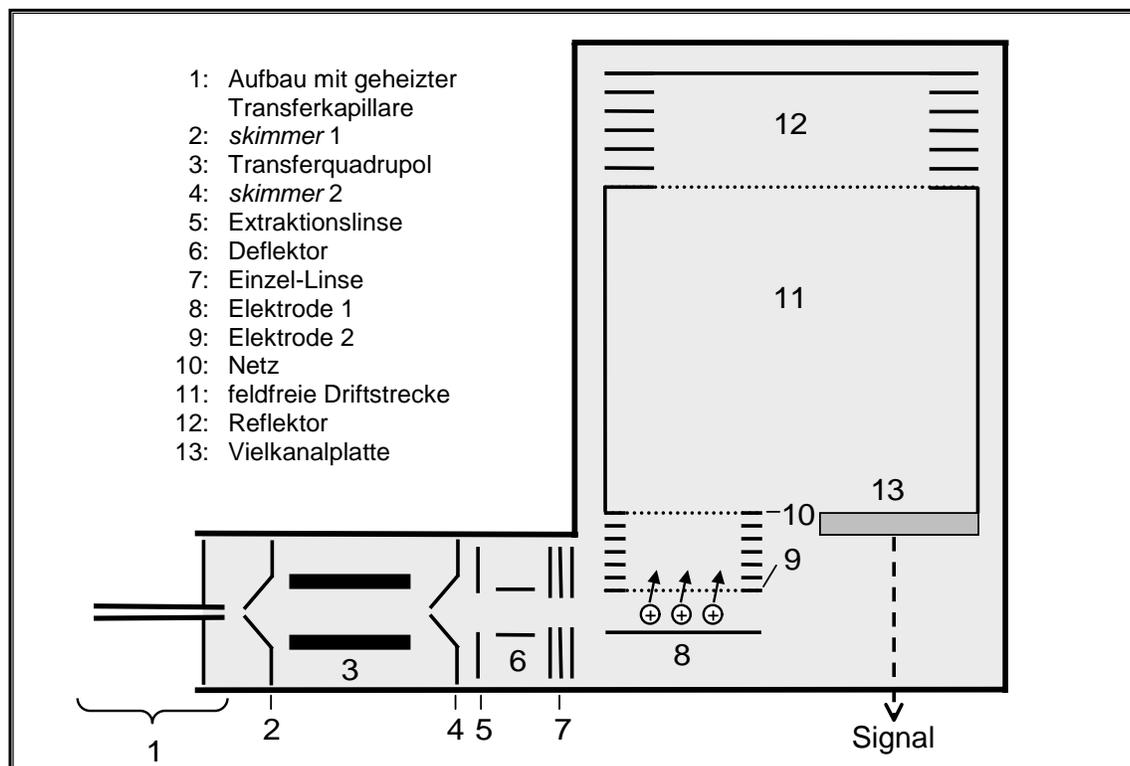


Abb. 5.2: Aufbau des PE Biosystems MARINER (Quelle: PE Biosystems MARINER™ User's Guide).

Im ursprünglichen Aufbau war der Eingangsbereich ebenfalls nach dem Prinzip des geheizten Stickstoffgegenstroms konstruiert und wurde später durch einen Aufbau mit geheizter Transferkapillare ersetzt. In der praktischen Anwendung zeigte sich, daß auch an diesem MS-System der Aufbau mit geheizter Transferkapillare bessere Möglichkeiten für die Kopplung zu einer Nano-ESI-Quelle liefert. Die Einstellung der Desolvatisierungsbedingungen erfolgt auch im MARINER™ im wesentlichen anhand der Betriebsbedingungen des Eingangsbereichs und wird an die jeweilige Analyseabsicht angepaßt. Aber auch in der Region zwischen erstem skimmer und Transferquadrupol sind noch Stöße zwischen Analytationen und Restgasmolekülen möglich, so daß eine zu hohe Potentialdifferenz zwischen diesen Bauteilen bei labilen Molekülen zu Fragmentierungsreaktionen führen kann.

		typische Werte (positiver Ionenmodus)
(a) Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom		
<i>nozzle</i>	U_{Noz}	+ 80 bis + 300 V
	T_{Noz}	110 bis 190 °C
(b) Aufbau mit geheizter Transferkapillare		
Transferkapillare	U_{Kap}	+ 20 bis + 300 V
	T_{Kap}	50 – 200 °C
<i>skimmer 1</i>	U_{Sk1}	+ 5 bis + 30 V
Quadrupol; RF-Amplitude	U_{RF}	+ 700 bis + 1000 V
Quadrupol, DC	U_{Quad}	+ 0,5 bis + 10 V
<i>skimmer 2</i>	U_{Sk2}	0 V
Deflektor	U_{Def}	+ 1 bis - 1 V
Einzel-Linse	U_{Einz}	- 15 bis - 40 V
Elektrode 1	U_{El1}	geschaltet auf + 600 bis + 850 V
Elektrode 2	U_{El2}	geschaltet auf - 250 bis - 350 V
Netz (Beschleunigung)	U_{Besch}	- 4000 V
Reflektor (Rückseite)	U_{Ref}	+ 1550 V
Vielkanalplatte (Rückseite)	U_{Det}	+ 2000 V

Tab. 5.2: Typische Betriebsbedingungen des PE Biosystems MARINER (Quelle: PE Biosystems MARINER User's Guide). Die zur Optimierung der Desolvatisierungsbedingungen relevanten Parameter sind grau unterlegt.

5.2.3. Finnigan LCQ

Das Finnigan LCQ™ beruht in seiner Funktionsweise auf dem Prinzip der Quadrupol-Ionenfalle (vgl. Kap. 4.2). Eine schematische Darstellung des Systems wird in Abb. 5.3 gegeben; typische Betriebsbedingungen sind in Tab. 5.3 zusammengefaßt.

Der Eingangsbereich in das Massenspektrometer wird durch eine geheizte Transferkapillare gebildet. Der nachfolgende *skimmer* ist leicht aus der Achse der Transferkapillare verschoben, um Kontaminationen des Massenanalysators durch größere Lösungsmitteltropfen zu verhindern. Eine zylindrische Linse zwischen den Bauteilen ermöglicht aber den Transport von Ionen durch den *skimmer* hindurch. Die Desolvatisierungskonditionen des Finnigan LCQ™ werden durch die Betriebsbedingungen der Transferkapillaren und der zylindrischen Linse festgelegt. Auf dem weiteren Weg in den Analysator passiert der Ionenstrahl zwei Transferoktapole, die durch eine Zwischenlinse voneinander getrennt sind.

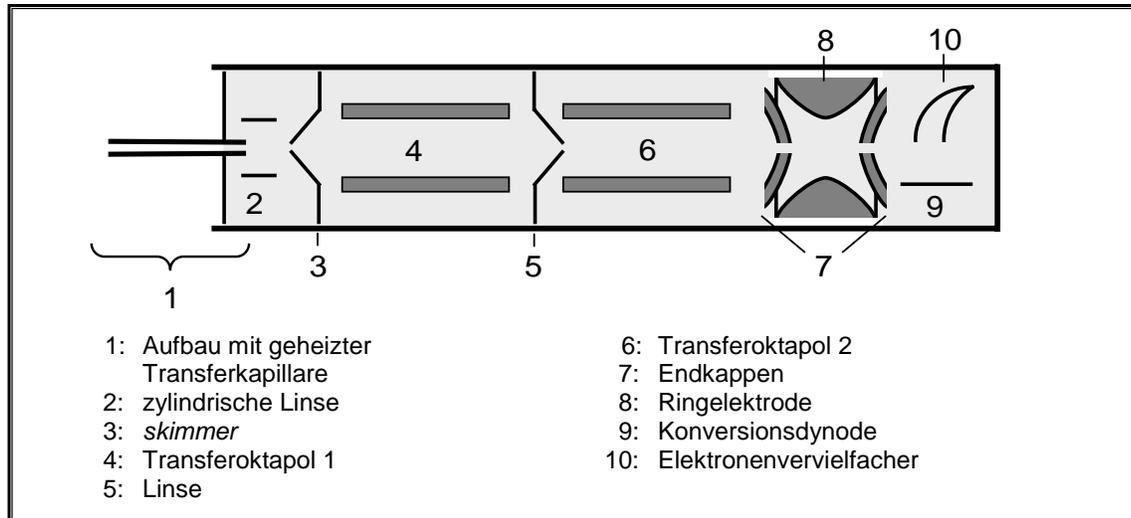


Abb. 5.3: Aufbau des Finnigan LCQ (Quelle: Finnigan LCQ Operator's Manual)

		typische Werte (positiver Ionenmodus)
Transferkapillare	U_{Kap}	0 bis + 50 V
	T_{Kap}	50 bis 200 °C
zylindrische Linse (<i>tube lens</i>)	U_{TL}	0 bis + 50 V
<i>skimmer</i>	U_{Ski}	0 V
1. Transferoktapol (RF)	U_{RF1}	730 V
1. Transferoktapol (DC)	U_{Okt1}	- 3 V
Linse	U_{Lin}	- 16 V
2. Transferoktapol (RF)	U_{RF2}	730 V
2. Transferoktapol (DC)	U_{Okt2}	- 7 V

Tab. 5.3: Typische Betriebsbedingungen des Finnigan LCQ (Quelle: Finnigan LCQ Operator's Manual). Die zur Optimierung der Desolvatisierungsbedingungen relevanten Parameter sind grau unterlegt.

Das LCQ bietet neben den mehrstufigen MS-Experimenten (vgl. Kap. 4.2.3) ebenfalls die Möglichkeit, Analytionen schon vor Erreichen der Quadrupol-Ionenfalle stoßinduziert zu fragmentieren („CID-Option“). Zu diesem Zweck wird die Potentialdifferenz zwischen *skimmer* und erstem Transferoktapol erhöht, die Ionen im resultierenden Feld beschleunigt und so zu Stößen mit dem Restgas angeregt. Die Auswahl von „10% CID“ entspricht in der CID-Option des LCQ einer Erhöhung der Potentialdifferenz um 10 V.

6. PHYSIKALISCHE RANDBEDINGUNGEN

Während des Wegs von der Sprayquelle in den Massenanalysator passieren die mittels ESI gebildeten geladenen Spezies unterschiedliche Bauelemente des MS-Systems. Zu diesen gehören sowohl zur Desolvatisierung relevante Bereiche des Massenspektrometers als auch nachfolgende ionenoptische Bauteile. Die Einflüsse, die auf dieser Strecke zunächst auf geladene Tröpfchen, später auch auf freie Analytionen, ausgeübt werden, stellen so die „physikalischen Randbedingungen“ der ESI-MS-Analyse dar. Die Kenntnis dieser Randbedingungen ist im Hinblick auf eine erfolgreiche Analyse von entscheidender Bedeutung, und ihre Charakterisierung bildete einen wesentlichen Teilspekt der vorliegenden Arbeit.

6.1. Die Transferkapillare und der geheizte Stickstoffgegenstrom im Vergleich

Das ESI-oTOF-Massenspektrometer MICKEY kann sowohl im Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom als auch in der Variante mit geheizter Transferkapillare betrieben werden (vgl. Kap. 5.2.1). Der Wechsel des Aufbautyps hat dabei Konsequenzen für die Betriebsbedingungen des Systems. Dies gilt sowohl im Hinblick auf die in die erste Druckstufe gelangenden Mengen an Raumluft als auch im Hinblick auf den Prozeß der Desolvatisierung der Analyte.

6.1.1. *Die Strömung von Luft ins Massenspektrometer*

In der ESI-MS gelangen durch die Öffnung im Eingangsbereich des Massenspektrometers sowohl die ESI-generierten geladenen Teilchen als auch größere Mengen Raumluft oder gegebenenfalls des eingesetzten Gegenstromgases (z.B. Stickstoff). Gerade das Gelangen von Raumluft ins Massenspektrometer kann als kritisch angesehen werden, da auf diese Weise ebenfalls Fremdstoffe eingeschleust werden können. Werden diese Fremdstoffe zudem ionisiert, so führen sie in den resultierenden Massenspektren zu unerwarteten und störenden Signalen. Eine Abschätzung der in das Massenspektrometer gelangenden Gasvolumina ist daher sinnvoll. Im Hinblick auf die ESI-generierten geladenen Teilchen ist außerdem von Interesse, wie lange sie im Eingangsbereich des Massenspektrometers verweilen. Einen Überblick über die zur Abschätzung dieser Bedingungen erforderlichen Grundlagen der Strömungslehre liefern beispielsweise Wutz und Walcher [Wut82].

Für den nachfolgenden Vergleich werden die Bedingungen des MICKEY im Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom sowie mit geheizter Transferkapillare herangezogen. Die entsprechenden Abmessungen sowie eine Abschätzung der Druckverhältnisse sind in Tab. 6.1

6. Physikalische Randbedingungen

zusammengestellt. Als Näherung soll von der Strömung von Luft bei einer Temperatur von 20°C ausgegangen werden.

	<i>nozzle</i> (im Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom)	geheizte Transferkapillare
Innendurchmesser d	0,05 cm	0,05 cm
Länge l	3,5 cm	12 cm
Außendruck p ₀	1000 mbar (= 10 ⁵ Pa)	1000 mbar (= 10 ⁵ Pa)
Innendruck p ₂	1 mbar (= 10 ² Pa)	1 mbar (= 10 ² Pa)

Tab. 6.1: Abmessungen und Druckverhältnisse in den Aufbauten mit geheiztem Stickstoffgegenstrom und geheizter Transferkapillare

Die viskose Strömung von Luft erfolgt unter den gewählten Bedingungen turbulent, und in beiden Aufbautypen können die Öffnungen als „langes Rohr“ (mit $l/d > 50$) angesehen werden. Während der Strömung des Gases durch das „lange Rohr“ tritt demnach Verblockung ein, sobald die Strömung Schallgeschwindigkeit erreicht [Wut82]. Der entsprechende Verblockungsdruck p_2^* , der den maximal einstellbaren Druckabfall über die gesamte Länge der Öffnung festlegt, ergibt sich gemäß:

$$(Gl. 6.1) \quad p_2^* = \frac{4,51}{d} \cdot \left(\frac{d^3 \cdot p_0^2}{2l} \right)^{4/7} \quad \text{in mbar}$$

mit d,l in cm, p in mbar

Der zugehörige Verblockungsgasstrom q_{pV}^* kann dann mit Hilfe von (Gl. 6.2) ermittelt werden und dient zur Ermittlung des anströmenden Gasvolumens und der Anströmungsgeschwindigkeit auf der Außenseite:

$$(Gl. 6.2) \quad q_{pV}^* = 134 \cdot d \cdot \left(\frac{d^3}{1} \cdot \frac{p_0^2 - p_2^{*2}}{2} \right)^{4/7} \quad \text{in mbar} \cdot l \cdot s^{-1}$$

mit l,d in cm; p in mbar

Die Verweildauer des Gases in der Kapillaren läßt sich nur abschätzen, da sich die Geschwindigkeit über die Länge der *nozzle* bzw. Kapillare hinweg bis zur Verblockung ändert. Zur Ermittlung der Größenordnung der Zeit wird näherungsweise der Mittelwert aus Anströmgeschwindigkeit und der Endgeschwindigkeit bei Verblockung (Schallgeschwindigkeit 330 m/s) eingesetzt.

Anhand dieser Beziehungen lassen sich die für beide Aufbautypen charakteristischen Größen für die Strömung von Gas ins Massenspektrometer ermitteln, die in Tab. 6.2 zusammengestellt sind. Den Abschätzungen zufolge gelangt im Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom deutlich mehr Gas (Faktor ca. 1,75) zusammen mit dem ESI-generierten Aerosol in das

Massenspektrometer. Bedingt durch das größere Gasvolumen, das durch die *nozzle* in die erste Druckstufe gelangt, sollte der Druck p_2 in diesem Bereich ebenfalls etwa um den Faktor 1,75 größer sein. Auf die Resultate der Gleichungen (Gl. 6.1) und (Gl. 6.2) hat diese Veränderung allerdings keinen Einfluß, da diese unabhängig vom tatsächlichen Innendruck p_2 ermittelt werden. Das Gas, das durch die *nozzle* in die erste Druckstufe gelangt, sollte im wesentlichen Stickstoff sein, so daß trotz der größeren Gasmenge eine verminderte Gefahr der Kontaminierung mit Fremdstoffen zu erwarten ist. Der Vergleich macht ebenfalls deutlich, daß die Verweilzeit im Fall der *nozzle* erheblich kürzer als im Fall der Transferkapillaren ist.

	<i>nozzle</i> (im Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom)	geheizte Transferkapillare
Verblockungsdruck p_2^*	468 mbar	232 mbar
Verblockungsgasstrom q_{pV}^*	30 mbar \cdot l \cdot s $^{-1}$	17 mbar \cdot l \cdot s $^{-1}$
anströmendes Gasvolumen bei p_0	$3 \cdot 10^{-5}$ m 3 s $^{-1}$	$1,7 \cdot 10^{-5}$ m 3 s $^{-1}$
Anströmgeschwindigkeit bei p_0	153 ms $^{-1}$	87 ms $^{-1}$
Verweildauer in der Kapillare	$1,4 \cdot 10^{-4}$ s	$5,8 \cdot 10^{-4}$ s

Tab. 6.2: Abgeschätzte Strömungsbedingungen im Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom bzw. mit geheizter Transferkapillare.

Werden wie unter den Bedingungen der ESI geladene Teilchen in einer viskosen Strömung durch eine Kapillare transportiert, so können Verluste durch Entladung an der Kapillarenwand auftreten. Wie Lin und Sunner zeigen konnten [Lin94], sind diese Verluste durch Diffusion zur Kapillarenwand prinzipiell umso größer, je länger die Verweilzeit der Teilchen in der Kapillare ist. Dieser Effekt ist besonders beim Transport isolierter Ionen zu erwarten; der Einfluß auf geladene Tröpfchen ist erheblich geringer. Die im vorgehenden Vergleich eingesetzten Abmessungen von *nozzle* bzw. Transferkapillare sind so dimensioniert, daß in beiden Aufbautypen ein relativ effizienter Transport von Ionen gewährleistet werden kann.

Die während der Verweilzeit in einem geheizten Bauteil von den ESI-generierte Tröpfchen aufgenommene Energie ermöglicht die Verdampfung von Lösungsmittel und liefert so einen Beitrag zur Desolvatisierung der Analytionen. Im Fall der *nozzle* ist dieser Beitrag erheblich geringer, so daß hier für eine erfolgreiche Desolvatisierung zusätzlich eine möglichst effiziente Wechselwirkung der Tröpfchen mit dem Gegenstromgas unabdingbar ist.

6.1.2. Die desolvatisierende Wirkung verschiedener Aufbautypen im Vergleich

Im folgenden soll der Einfluß beider Aufbauten auf die Desolvatisierung der Analyte verglichen werden. Als möglichst übersichtliches Modellsystem für diesen Vergleich dient das Salz Bariumbromid, dessen Massenspektrum die Desolvatisierungsbedingungen anhand einfacher Indikatorsignale widerspiegelt.

6.1.2.9. Bariumbromid als Indikator für die Desolvatisierungsbedingungen

Zur Untersuchung vieler grundsätzlicher Fragestellungen in der ESI-MS sind Lösungen von Metallsalzen, wie zum Beispiel von Bariumbromid, besonders geeignet. Das Massenspektrum beschränkt sich in der Regel auf eine geringe Anzahl von Signalen, deren Zuordnung gerade im Fall des Bariumbromids durch charakteristische Isotopenverhältnisse erleichtert wird. Ferner liegt der Analyt schon in Lösung in Form präformierter Ionen vor, so daß der Einfluß zusätzlicher Effekte während der Ionisierung (vgl. Kap. 3.1.3) vermindert wird.

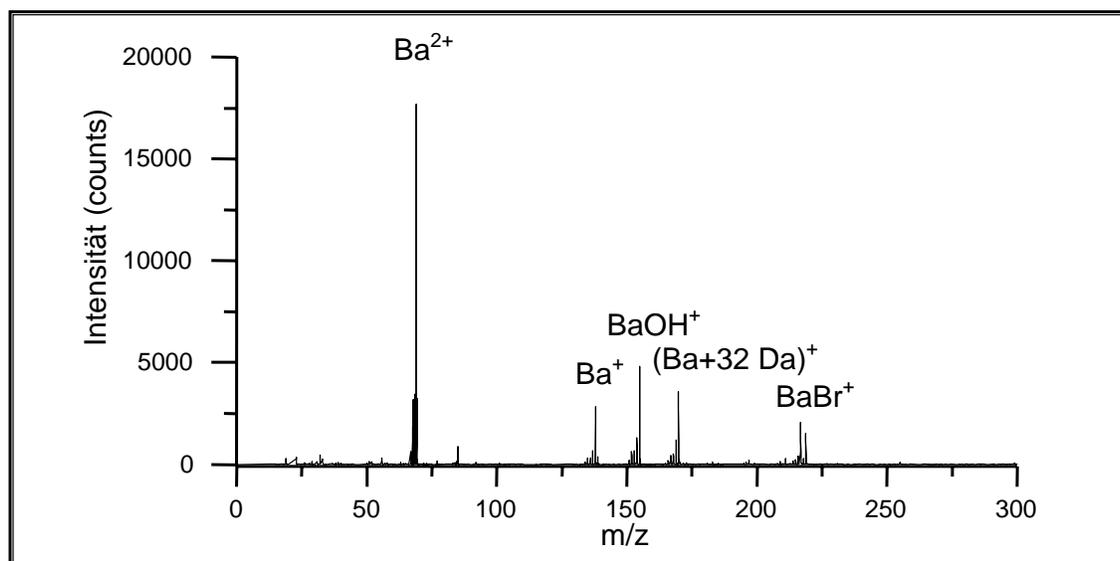


Abb. 6.1: ESI-oTOF-Massenspektrum (MARINER mit geheizter Transferkapillare) von Bariumbromid, $c = 10^{-4} \text{ mol/l}$ in Methanol. $T_{\text{Kap}} = 100^\circ\text{C}$, $U_{\text{Kap}} = 200 \text{ V}$, $U_{\text{Sk1}} = 17 \text{ V}$

Abb. 6.1 zeigt ein typisches ESI-Massenspektrum (MICKEY) von Bariumbromid, $c = 10^{-4} \text{ mol/l}$ in Methanol im Aufbau mit geheizter Transferkapillare. Die zu beobachtenden Signale entsprechen den isolierten Ionen Ba^{2+} und Ba^+ ; daneben treten ebenfalls Signale entsprechend BaOH^+ , BaBr^+ und einem Addukt $(\text{Ba}+32 \text{ Da})^+$ auf. BaOH^+ ist das Produkt einer stoßinduzierten Reaktion des zweiwertigen Metallkations mit dem Lösungsmittel, welche die C-O-Bindung des Methanols heterolytisch spaltet. Formal bleibt in der Folge ein OH^- an das Metallkation koordiniert (vgl. [Koh97a]).

Das Addukt $(\text{Ba} + 32 \text{ Da})^+$ ist bei Verwendung anderer Lösungsmittel ebenfalls zu beobachten, so daß es nicht auf die Anlagerung eines Methanol-Moleküls zurückzuführen sein sollte. Ferner nimmt die Intensität dieses Signals bei Verstärkung des Stickstoffgegenstroms ab (ohne Abbildung). Am MARINER ergibt sich die genaue Masse des häufigsten Isotops des Addukts nach interner Kalibrierung der Massenskala mit den monoisotopischen Signalen $^{138}\text{Ba}^+$ und $^{138}\text{Ba}^{81}\text{Br}^+$ zu 169,8879 Da (Mittelwert aus fünf Einzelmessungen, Standardabweichung 0,0003). Die monoisotopischen Massen ^[1] möglicher Ionen mit einer Nominalmasse entsprechend $(\text{Ba} + 32 \text{ Da})^+$ sowie die Abweichung zum experimentell ermittelten Wert sind in Tab. 6.3 zusammengestellt. Auf der Grundlage dieser Betrachtungen ist das Signal $(\text{Ba} + 32 \text{ Da})^+$ offensichtlich auf BaO_2^+ -Ionen zurückzuführen.

	$M_{\text{theoretisch}}$	Differenz zum experimentell ermittelten Wert (169,8879 Da)
BaCH_3OH^+	169,9309 Da	$\Delta = + 0,0430 \text{ Da}$
BaO_2^+	169,8945 Da	$\Delta = + 0,0067 \text{ Da}$
BaS^+	169,8768 Da	$\Delta = - 0,0111 \text{ Da}$

Tab. 6.3: Exakte monoisotopische Massen ^[1] möglicher Ionen mit einer Nominalmasse entsprechend $(\text{Ba} + 32 \text{ Da})^+$ sowie die Abweichung zum experimentell ermittelten Wert.

Das Intensitätsverhältnis der Signale Ba^{2+} , Ba^+ und BaBr^+ ist bei gegebenen Lösungsmiteleigenschaften und Spraybedingungen empfindlich von der Wahl der Desolvatisierungsbedingungen abhängig. Es kann daher - wie im vorliegenden Fall - als „Indikator“ im Vergleich zwischen zwei verschiedenen Bautypen zur Desolvatisierung dienen.

Das Intensitätsverhältnis $\text{Ba}^{2+}/\text{Ba}^+$:

Grundsätzlich ist in der ESI-MS von Metallsalzlösungen der Nachweis isolierter zweiwertiger Metallkationen nur unter der Voraussetzung möglich, daß die zweite Ionisierungsenergie des Metalls geringer als die Ionisierungsenergie anderer Komponenten der Lösung ist. Ist diese Bedingung nicht erfüllt, so ist nach einer Elektronentransferreaktion in der Gasphase nur noch das einwertige Metallkation als reduziertes Produkt nachzuweisen (vgl. z.B. [Bla90]). Im hier eingesetzten Modellsystem beträgt die zweite Ionisierungsenergie von Barium 10,00 eV [CRC95], die Ionisierungsenergie des Lösungsmittels Methanol 10,85 eV [CRC95], so daß diese Voraussetzung für einen Nachweis des isolierten Ba^{2+} -Ions prinzipiell erfüllt ist. Elektronentransferreaktionen und damit Bildung des isolierten Ba^+ -Ions finden erst nach Stoßaktivierung statt, und zwar um so ausgeprägter, je stärker die Anregung erfolgt. Dementsprechend nimmt in der massenspektrometrischen Untersuchung von Bariumbromid am

¹ Die exakten Atommassen wurden der „web elements periodic table“, Dept. of Chemistry, University of Sheffield, entnommen (<http://www.shef.ac.uk/chemistry/web-elements>)

MICKEY das Verhältnis der Signalintensitäten Ba^{2+}/Ba^+ ab, je stärker die Stoßaktivierung in der ersten Druckstufe ist bzw. je effizienter die Vortrocknung der ESI-Tröpfchen im Eingangsbereich erfolgt.

Das Intensitätsverhältnis $(Ba^{2+}+Ba^+)/BaBr^+$:

Neben den isolierten Metallkationen ist im ESI-Massenspektrum von Bariumbromid ebenfalls das Ionenpaar $BaBr^+$ zu beobachten, dessen Signalintensität Rückschlüsse auf die Desolvatisierungsbedingungen im Eingangsbereich zuläßt. Als Bezugsgröße dienen hierbei die Signalintensitäten der isolierten Metallkationen Ba^{2+} und Ba^+ ^[1]. Wie in Kap. 3.1.2 beschrieben, verbleiben während den asymmetrischen Zerfallsschritten der initialen ESI-Tröpfchen relativ große „Resttropfen“, die nach weiterer Lösungsmittelverdampfung erneut zerfallen können.

Bedingt durch die Lösungsmittelverdampfung nimmt die Analytkonzentration in den „Resttropfen“ zu und damit auch die Wahrscheinlichkeit zum Nachweis von Ionenpaaren aus Analyt- und Gegenionen in den ESI-Massenspektren (vgl. Kap. 3.1.2). Je effizienter die Verdampfung von Lösungsmittel unterstützt wird, um so mehr Ionen resultieren aus der Freisetzung aus Tröpfchen höherer Analytkonzentration, und um so größer sollte der Anteil an $BaBr^+$ relativ zu den isolierten Metallkationen sein. Eine Verkleinerung des Verhältnisses $(Ba^{2+}+Ba^+)/BaBr^+$ zeigt somit eine verstärkte Vortrocknung in der Desolvatisierung an.

6.1.2.10. Der geheizte Stickstoffgegenstrom und die geheizte Transferkapillare im praktischen Vergleich

Abb. 6.2 zeigt eine Gegenüberstellung der ESI-oTOF-Massenspektren von Bariumbromid sowohl nach Desolvatisierung im geheizten Stickstoffgegenstrom (Abb. 6.2 A) als auch nach Desolvatisierung in der geheizten Transferkapillare (Abb. 6.2 B) bei konstanter Potentialdifferenz in der ersten Druckstufe. Die Temperaturen der heizbaren Bauteile wurden dabei auf eine maximale Gesamtintensität des Ionensignals optimiert. Es ist deutlich zu erkennen, daß im Fall der geheizten Transferkapillare sowohl ein höherer Anteil Ba^+ als auch $BaBr^+$ nachgewiesen werden kann. Die resultierenden Intensitätsverhältnisse sind in Tab. 6.4 zusammengestellt.

	geheizter Stickstoffgegenstrom	geheizte Transferkapillare
Ba^{2+}/Ba^+	7,7	2,0
$(Ba^{2+}+Ba^+)/BaBr^+$	73,2	19,6

Tab. 6.4: Intensitätsverhältnisse ausgewählter Signale aus den Spektren dargestellt in Abb. 6.2 A und B.

¹ Die MS²-Analyse von $BaBr^+$ zeigt, daß Ba^+ nicht aus diesem Clusterion gebildet wird.

Zur Interpretation dieser Resultate muß berücksichtigt werden, daß mit dem Umbau eine Veränderung der Druckverhältnisse in der ersten Druckstufe einhergeht, welche ebenfalls einen Einfluß auf die resultierenden Desolvatisierungsbedingungen nehmen. Da eine Messung des Drucks in diesem Bereich am MICKEY nicht möglich ist, soll auf die in Kap. 0 angestellten Abschätzungen zurückgegriffen werden. Im vorliegenden Beispiel ist im Aufbau mit *nozzle* mit einem um den Faktor 1,75 höheren Druck als im Aufbau mit Transferkapillare zu rechnen; die mittlere freie Weglänge eines Teilchens im Gasraum nimmt somit um den Faktor $1/1,75$ ab ^[1]. Demnach sollten die ESI-generierten Spezies auf dem Weg von der *nozzle* zum ersten *skimmer* in erster Näherung die 1,75-fache Anzahl von Stößen mit Gasmolekülen durchlaufen.

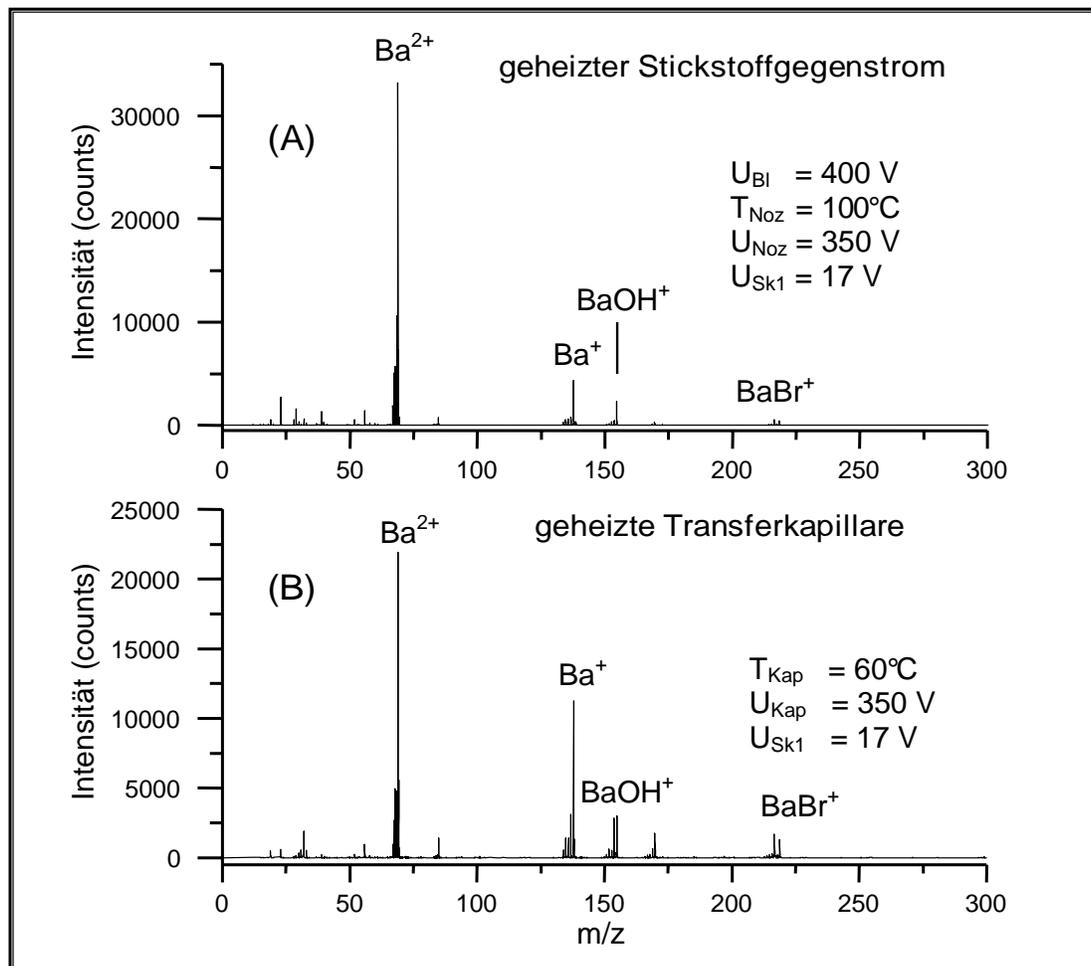


Abb. 6.2: ESI-oTOF-Massenspektren (MICKEY) von Bariumbromid, $c = 10^{-4} \text{ mol/l}$ in Methanol. (A): Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom, (B): Aufbau mit geheizter Transferkapillare.

¹ Die mittlere freie Weglänge ist umgekehrt proportional zum Druck; vgl. [Atk90].

Die Energie, die durch einen solchen Stoß auf das Analytteilchen übertragen werden kann, hängt aber unter anderem von der Geschwindigkeit ab, mit welcher das Analytteilchen auf ein Gasmolekül trifft. Wird die mittlere freie Weglänge im Raum verringert, so sind die Teilchen eine kürzere Zeit der Beschleunigung im elektrischen Feld ausgesetzt, bevor sie erneut mit einem Gasmolekül kollidieren. Die Analytteilchen treffen demnach bei höherem Druck mit geringerer Geschwindigkeit und damit um den Faktor $1/1,75$ geringerer kinetischer Energie auf die Gasmoleküle ^[1]. Im Fall der *nozzle* ist daher eine größere Anzahl von Stößen, allerdings mit geringerer Energieübertragung bei jedem einzelnen Stoß, zu erwarten. Zudem benötigen die Ionen bei höherem Druck aufgrund der niedrigeren Geschwindigkeit eine längere Zeit, um die erste Druckstufe zu passieren. Die Gesamtmenge der zum Analyten zugeführten Energie beim Passieren der ersten Druckstufe ist allerdings in beiden Fällen identisch.

Bei gegebener Potentialdifferenz in beiden Aufbautypen zeigt das Intensitätsverhältnis Ba^{2+}/Ba^+ im Fall der Transferkapillare eine verstärkte Reduktion von Ba^{2+} zu Ba^+ an. Ob dies allein eine Folge der veränderten Stoßbedingungen in der ersten Druckstufe darstellt, oder ob eine effizientere Trocknung in der Transferkapillare verantwortlich ist, kann an dieser Stelle nicht unterschieden werden. Die Intensitätsverhältnisse $(Ba^{2+}+Ba^+)/BaBr^+$ zeigen jedoch ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen beiden Aufbautypen auf. Im Fall der Transferkapillaren erlaubt der verstärkte Nachweis des Clusterions $BaBr^+$ die Folgerung, daß in diesem Aufbau die für die Desolvatisierung relevante Verdampfung des Lösungsmittels besser unterstützt wird. Am MICKEY ist daher insbesondere bei Verwendung schwer verdampfbarer Lösungsmittel wie H_2O der Aufbau mit geheizter Transferkapillaren dem Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom vorzuziehen.

6.2. Die Desolvatisierung von Makromolekülionen

6.2.1. *Die Aktivierung nicht-kovalenter Komplexe während der Desolvatisierung*

Wie in Kap. 3.2.3 beschrieben, stellt der Energieeintrag während der Desolvatisierung von Makromolekülionen einen kritischen Parameter dar. Wird das Analyt während dieses Prozesses zu stark angeregt, so kann die Fragmentierung des Teilchens sowohl unter Bruch nicht-kovalenter als auch kovalenter Bindungen die Folge sein. Ist die Anregung dagegen zu gering, so ist der Nachweis desolvatisierter Analytionen in ausreichender Signalintensität nicht mehr gewährleistet. Der Einfluß der Desolvatisierungsbedingungen auf die

¹ Die Geschwindigkeit einer beschleunigten Bewegung ist proportional zur Wurzel der zurückgelegten Strecke, vgl. [Ger89].

resultierenden ESI-oTOF-Massenspektren soll an dieser Stelle am Beispiel zweier nicht-kovalenter Komplexe, Concanavalin A und Streptavidin-Biotin, demonstriert werden.

Das Protein Concanavalin A, isoliert aus der Schwertbohne [Röm95], bildet in Lösung in Abhängigkeit vom pH-Wert nicht-kovalent gebundene Multimere definierter Größen aus. So liegt es bei pH-Werten < 5 vorwiegend in Form isolierter Untereinheiten der Masse 25500 Da vor; im pH-Bereich um 5,5 vorwiegend als Dimer der Masse 51000 Da und bei pH-Werten > 7 als Tetramer der Masse 102000 Da [Lig93]. Der Nachweis dieser Komplexe ist mittels ESI-MS möglich [Lig93], [Wan96a], wobei auch die pH-Abhängigkeit der Komplexbildung durch Verwendung entsprechender Lösungen wiedergegeben werden kann [Lig94].

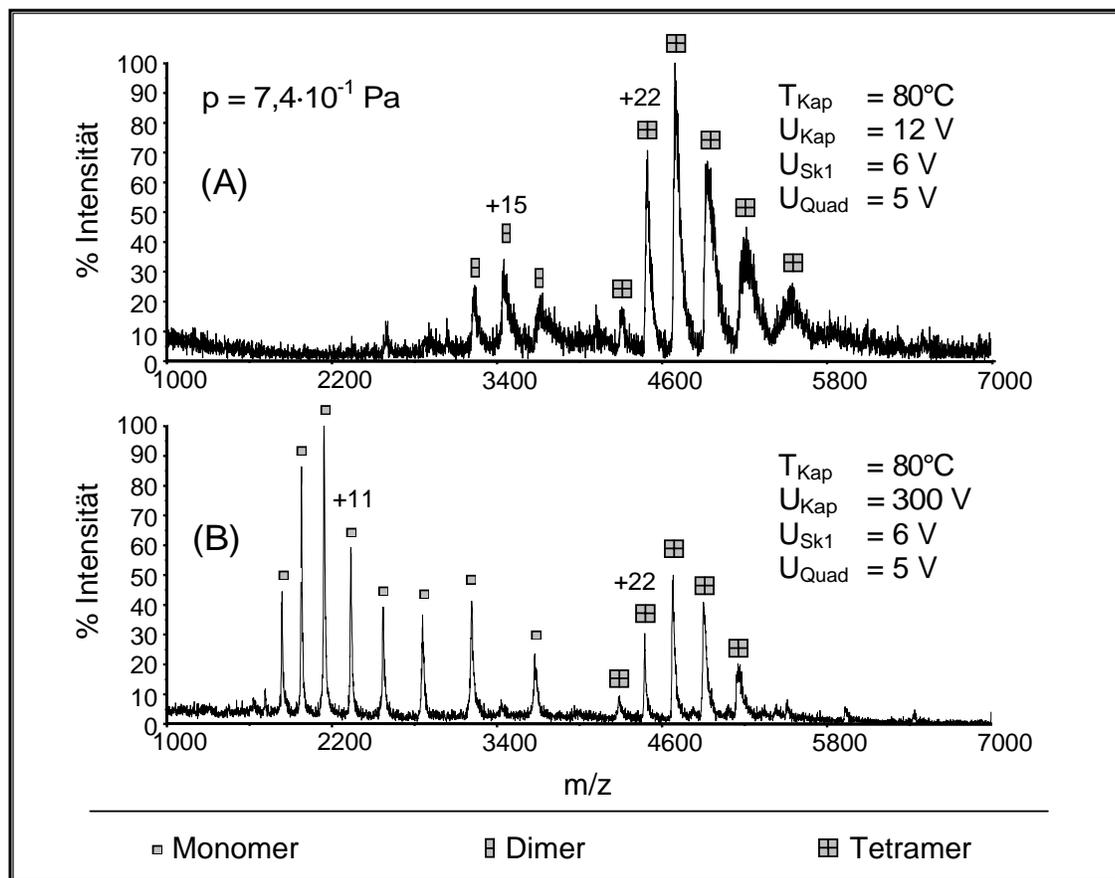


Abb. 6.3: Nano-ESI-oTOF-Massenspektren (MARINER) von Concanavalin A, $c = 10^{-5}$ mol/l in 20 mM Ammoniumacetat, mit Ammoniakwasser auf pH 8,5 eingestellt. Druck in der zweiten Druckstufe: $7,4 \cdot 10^{-1}$ Pa; (A): schonende Desolvatisierungsbedingungen; (B): Stoßaktivierung zwischen Transferkapillare und erstem skimmer.

Abb. 6.3 zeigt die Nano-ESI-oTOF-Massenspektren (MARINER) einer Concanavalin A-Lösung ($c = 10^{-5}$ mol/l) in 20 mM Ammoniumacetat, welche mit Ammoniakwasser auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt wurde. Der Druck in der zweiten Druckstufe (zwischen erstem

und zweitem *skimmer*) ^[1] beträgt $7,4 \cdot 10^{-1}$ Pa. Bei niedriger Temperatur der Transferkapillare und geringer Potentialdifferenz in der ersten Druckstufe kann das intakte Tetramer nachgewiesen werden; daneben sind ebenfalls Signale der Dimere zu beobachten (Abb. 6.3 A). Das Spektrum weist allerdings aufgrund einer nur geringen Signalintensität ein recht geringes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis auf. Ferner sind die Signale relativ breit, was auf unspezifische Anlagerungen anderer Komponenten der Analytlösung an die Molekülonen zurückzuführen sein dürfte. Durch Verschärfung der Desolvatisierungsbedingungen, beispielsweise durch Erhöhung der Potentialdifferenz zwischen Transferkapillare und erstem *skimmer*, kann die Qualität des Spektrums hinsichtlich Signal-zu-Rauschen-Verhältnis und Signalbreite erheblich verbessert werden (Abb. 6.3 B). Allerdings ist mit der verstärkten Aktivierung ebenfalls die merkliche Dissoziation des Tetramers in die Untereinheiten verbunden.

Bei der Analyse von nicht-kovalenten Komplexen mittels ESI-MS ist ein Nachweis in guter Signalintensität häufig erst nach Anpassung des Drucks in der ersten Druckstufe möglich ^[2], [Rog99], [Str99]). Wird am MARINER der Druck zwischen Transferkapillare und erstem *skimmer* durch kontrollierten Einlaß von N_2 erhöht, so ergibt sich unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen (analog zu Abb. 6.3 A) das in Abb. 6.4 A dargestellte Spektrum. Der Druck in der zweiten Druckstufe erhöht sich dabei von $7,2 \cdot 10^{-1}$ Pa auf 2,1 Pa. Auch unter diesen Bedingungen wird das nicht-kovalent gebundene Concanavalin-Tetramer mit dominanter Signalintensität nachgewiesen; im Vergleich zu Abb. 6.3 A ist das Spektrum von deutlich höherer Qualität.

Bei verstärkter Aktivierung durch Vergrößerung der Potentialdifferenz zwischen erstem *skimmer* und Transferquadrupol (Abb. 6.4 B), zwischen Transferkapillare und erstem *skimmer* (Abb. 6.4 C) bzw. Erhöhung der Transferkapillarentemperatur (Abb. 6.4 D) kann der Anteil an Monomer-Signalen im Vergleich zu Abb. 6.4 A tendenziell erhöht werden. Die Auswirkungen aller drei Möglichkeiten zur Aktivierung sind in diesem Beispiel nahezu gleich. Bemerkenswert ist allerdings, daß die Aktivierung in Verbindung mit erhöhtem Druck in der ersten Druckstufe zu einem deutlich geringeren Maß zur Fragmentierung in die Untereinheiten führt, als bei niedrigerem Druck zu beobachten ist (Abb. 6.3 B) [Rog99].

¹ Die Messung des Drucks in der ersten Druckstufe ist am MARINER nicht möglich; Druckveränderungen in diesem Bereich können daher nur indirekt anhand der Druckveränderungen in der zweiten Druckstufe beobachtet werden.

² U. Bahr, J. W. Goethe-Universität Frankfurt, persönliche Mitteilung

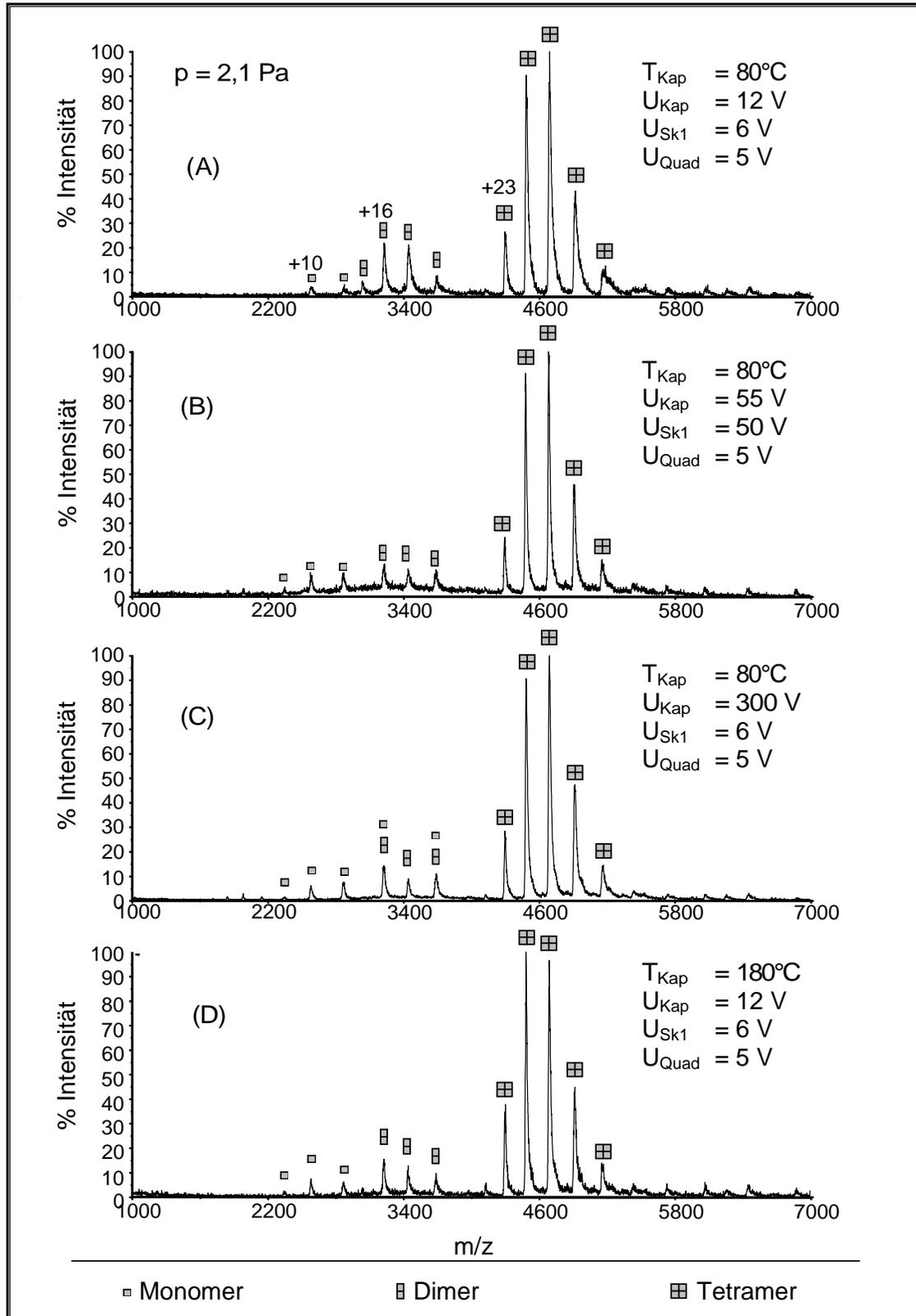


Abb. 6.4: Nano-ESI-oTOF-Massenspektren (MARINER) von Concanavalin A, $c = 10^{-5} \text{ mol/l}$ in 20 mM Ammoniumacetat, mit Ammoniakwasser auf pH 8,5 eingestellt. Druck in der zweiten Druckstufe: 2,1 Pa

Auch beim Nachweis von Streptavidin bzw. dem Streptavidin-Biotin-Komplex stellt der Druck in der ersten Druckstufe einen kritischen Parameter dar. Das Protein Streptavidin, isoliert aus dem Bakterium *Streptomyces Avidinii*, besteht aus vier identischen Proteinuntereinheiten mit einer Masse von etwa 13 kDa, welche durch nicht-kovalente Wechselwirkungen verbunden sind. In Lösung ist das Streptavidin-Tetramer in der Lage, mit vier D-Biotin-Molekülen ($M = 244$ Da) einen äußerst stabilen nicht-kovalenten Komplex zu bilden (vgl. beispielsweise [Web89]). Der Nachweis sowohl des intakten Streptavidin-Tetramers [Sch95] wie auch des Streptavidin-Biotin-Komplexes ([Sch95b], [Eck95], [Che98a]) ist mittels ESI-MS prinzipiell möglich, so daß dieses System eine geeignete Überprüfung der Leistungsfähigkeit des MARINER darstellt.

Wird der Druck im Bereich zwischen erstem und zweitem *skimmer* bei $7,4 \cdot 10^{-1}$ Pa belassen, ist weder der Nachweis des intakten Tetramers noch des Streptavidin-Biotin-Komplexes in ausreichender Signalintensität möglich. Nach Erhöhung des Drucks auf 1,98 Pa ergeben sich die in Abb. 6.5 dargestellten Massenspektren.

Abb. 6.5 A zeigt das Nano-ESI-oTOF-Massenspektrum einer Streptavidin-Lösung, $c = 10^{-5}$ mol/l in 20 mM Ammoniumacetat unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen. Im Spektrum sind ausschließlich die Signale des intakten Tetramers zu erkennen, die aufgrund massenspektrometrisch nicht auflösbarer Anlagerungen eine Verbreiterung zu höheren m/z -Werten aufweisen (vgl. dekonvolutierte Spektrum, Einschub in Abb. 6.5 A). Die verstärkte Aktivierung des Komplexes durch Erhöhung der Potentialdifferenz zwischen Transferkapillare und erstem *skimmer* bewirkt die Fragmentierung des Streptavidin-Tetramers in die monomeren Untereinheiten (ohne Abbildung). Wird nun der Analytlösung D-Biotin im Überschuß zugesetzt ($c = 10^{-4}$ mol/l), so sind im zugehörigen Massenspektrum unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen weitere Signale entsprechend der Anlagerung von Biotin-Einheiten an die Streptavidin-Tetramere zu erkennen (Abb. 6.5 B). Neben dem aus der Lösung bekannten spezifischen Komplex mit vier Biotin-Molekülen, der auch in Abb. 6.5 B in dominanter Signalintensität nachgewiesen wird, sind ebenfalls unspezifische Anlagerungen von bis zu 6 Biotin-Molekülen pro Tetramer zu beobachten. Die Bildung dieser unspezifischen Aggregate bei Verwendung eines Biotin-Überschusses konnte ebenfalls von Chernushevich et al. [Che98a] beobachtet werden. Sowohl unspezifische Biotin-Addukte als auch die spezifischen Streptavidin-Biotin-Komplexe fragmentieren unter Abspaltung der Biotin-Einheiten durch den Einfluß einer erhöhten Potentialdifferenz zwischen Transferkapillare und erstem *skimmer* (Abb. 6.5 C). Das Massenspektrum zeigt in der Folge die isolierten Untereinheiten, Dimere, Trimere und Tetramere.

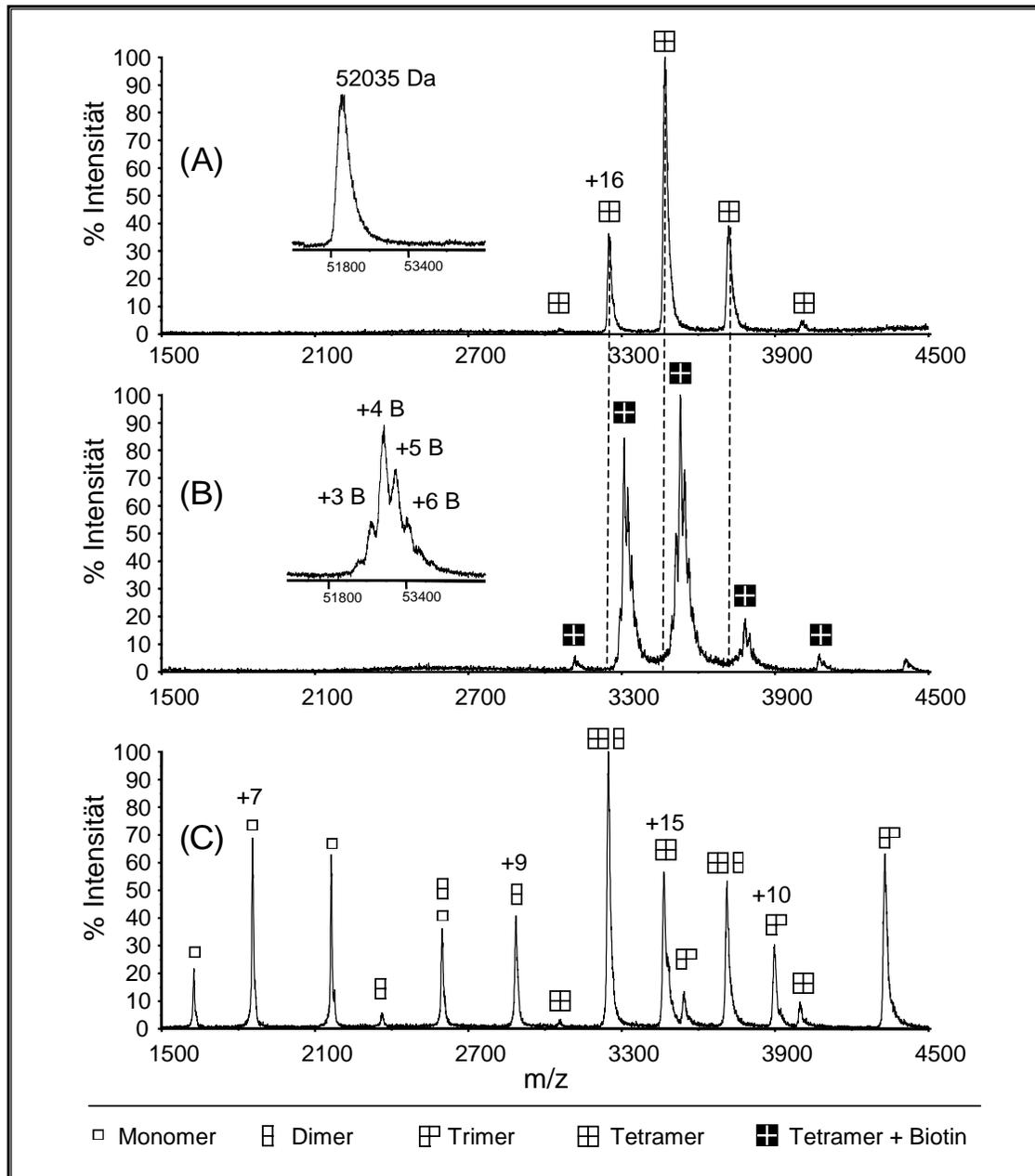


Abb. 6.5: Nano-ESI-oTOF-Massenspektren (MARINER) von Streptavidin ($c = 10^{-5}$ mol/l) in 20 mM Ammoniumacetat. Einschübe: dekonvolutierte Spektren. (A) Streptavidin-Lösung; (B): Zusatz von D-Biotin ($c = 10^{-4}$ mol/l); (C): Zusatz von D-Biotin unter CID-Bedingungen

Die vorgestellten Beispiele zeigen deutlich, daß der Nachweis nicht-kovalenter Komplexe auch am MARINER bei der Wahl schonender Desolvatisierungsbedingungen grundsätzlich möglich ist. Dabei weist der Druck im Raum zwischen Transferkapillare und erstem *skimmer* erheblichen Einfluß auf die zu beobachtenden Spektren auf, was auf die bereits in Kap. 6.1.2.10 beschriebenen veränderten Bedingungen für die Aktivierung und damit Desolvatisierung der Analyte zurückzuführen ist. Für die schonende Desolvatisierung eines nicht-kovalenten Komplexes ist die größere Anzahl energieärmerer Stöße bei Erhöhung des Drucks

in der ersten Druckstufe besonders vorteilhaft (vgl. [Rog99]). Während bei energiereichen Stößen die inneren Freiheitsgrade der Analyt-Ionen in Analyt-Lösungsmittel-Clustern angeregt werden und die Komplexe somit fragmentieren, haben energieärmere Stöße dagegen offenbar bevorzugt die Abspaltung von Lösungsmittelmolekülen aus dem Cluster zur Folge. Die veränderten Stoßbedingungen bei Erhöhung des Drucks erlauben daher selbst bei der Wahl höherer Potentialdifferenzen zwischen Transferkapillare und *skimmer* noch den Nachweis des intakten Komplexes. Eine vergleichbare Potentialdifferenz bei niedrigem Druck führt dagegen bereits zu ausgeprägter Fragmentierung.

Bei Erhöhung des Drucks in der ersten Druckstufe ist zu berücksichtigen, daß diese Maßnahme ebenfalls höhere Drucke in Transferquadrupol und TOF-Massenanalysator zur Folge hat. So steigt der Druck im TOF-Massenanalysator im oben genannten Beispiel von $1,46 \cdot 10^{-4}$ Pa auf $3,50 \cdot 10^{-4}$ Pa an. Für die Analyt-Ionen resultieren somit auch in anderen Bereichen des Massenspektrometers veränderte Bedingungen. Werden beispielsweise Stöße zwischen erstem *skimmer* und Transferquadrupol induziert, so sind auch hier Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der Stöße und dem resultierenden Energieeintrag in die Analyte zu erwarten. Der Druck im oTOF-Massenanalysator hat dagegen Einfluß auf die erreichbare Auflösung des Systems [Che96]; im Sinne einer verbesserten Signalintensität muß daher unter Umständen eine verringerte Auflösung in Kauf genommen werden, wenn ein Druckanstieg in diesem Bereich nicht durch eine Erhöhung der Pumpleistung verhindert wird.

6.2.2. *Die Stoßaktivierung verschiedener Ladungszustände*

Der Energieeintrag in Analyt-Ionen während der Desolvatisierung ist nicht nur in der Analyse von nicht-kovalenten Komplexen ein kritischer Schritt. Auch Makromoleküle mit ausschließlich kovalenten Wechselwirkungen können während dieses Prozesses gegebenenfalls fragmentieren, unter anderem unter Abspaltung von CO_2 oder H_2O . Die Produkte dieser Fragmentierungsreaktion sind im Falle kleiner Analyte häufig noch als separate Signale neben dem Vorläuferion zu beobachten. Im Falle größerer Analyte führen sie dagegen in der Regel wegen des begrenzten Auflösungsvermögens des Massenspektrometers nur zur Verbreiterung des beobachtbaren Signals zu niedrigeren m/z -Werten hin. Wie in Kap. 3.1.3.3 beschrieben, ist das Ausmaß der Stoßaktivierung während des Desolvatisierungsschritts unter anderem vom Ladungszustand des betreffenden Ions abhängig. Wird ein Analyt durch den ESI-Prozeß in einer sehr breiten Verteilung der Ladungszustände erzeugt, so kann diese Abhängigkeit für die Optimierung der Desolvatisierungsparameter problematisch sein.

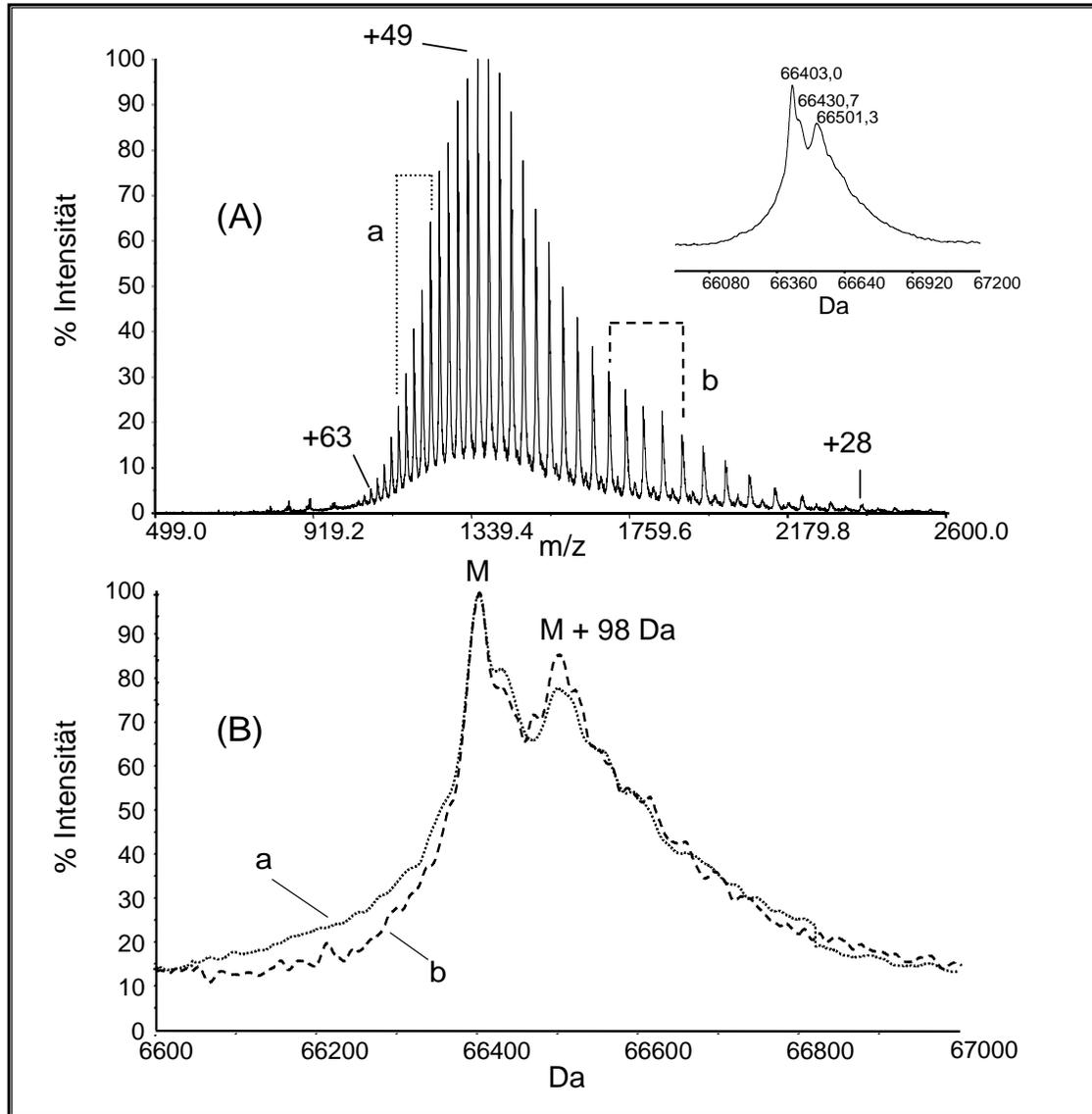


Abb. 6.6: (A) Nano-ESI-oTOF-Massenspektren (MARINER), von Albumin aus Rinderserum (BSA), $c = 10^{-5}$ mol/l in MeOH/H₂O/HAc 48:48:4; Einschub: dekonvolviertes Massenpektrum aus allen Signalen im dargestellten Massenbereich (B) Dekonvolvierte Spektren aus den Ladungszuständen +54 bis +58 (Kurve a) bzw. +35 bis +39 (Kurve b)

Dies kann am Beispiel des Nano-ESI-oTOF-Massenspektrums von Albumin aus Rinderserum (*bovine serum albumin*, BSA), einem Protein mit einer Molekülmasse von 66399 Da ^[1], verdeutlicht werden. Abb. 6.6 A zeigt ein typisches Spektrum von BSA, aufgenommen unter moderaten Desolvatisierungsbedingungen ($T_{\text{Kap}} = 200$ °C, $U_{\text{Kap}} = 50$ V, $U_{\text{Sk1}} = 12$ V, $U_{\text{Quad}} = 5$ V). Die Verteilung der Ladungszustände reicht dabei etwa von 63-fach bis 28-fach protonierten Molekülonen. Wie im dekonvolvierten Massenpektrum (Einschub in Abb. 6.6) zu erkennen ist, treten neben dem Molekülon ebenfalls Anlagerungen auf, von denen zwei

¹ Datenbank des Swiss Institute of Bioinformatics, Expert Protein Analysis System ExPASy (<http://www.expasy.ch>)

zumindest teilweise aufgelöst werden können. Die Schulter bei (M+27,7) Da kann anhand der Masse nicht eindeutig zugeordnet werden; das Signal entsprechend (M+98,3) Da läßt sich durch die Anlagerung von Phosphorsäure bzw. Schwefelsäure erklären (vgl. Kap. 3.1.3.1, [Cho90b]). Daneben ist das Signal sowohl zu niedrigeren als auch zu höheren m/z-Werten verbreitert, was als massenspektrometrisch nicht mehr auflösbare Produkte aus Abspaltungsreaktionen bzw. Anlagerungen an das Molekülion interpretiert werden kann.

Zum Vergleich zwischen hohen und niedrigen Ladungszuständen wird nur eine Auswahl von Signalen aus dem ursprünglichen Massenspektrum zur Berechnung des dekonvolutierten Spektrums herangezogen (Abb. 6.6 B). Zur Berechnung der Kurve a in Abb. 6.6 B dienen die Ladungszustände +54 bis +58, zur Berechnung der Kurve b die Ladungszustände +35 bis +39. Es zeigt sich, daß in den hohen Ladungszuständen eine tendenzielle Verbreiterung des Signals zu niedrigen m/z-Werten auftritt, während die niedrigen Ladungszustände verstärkt die Anlagerung von 98 Da aufweisen. Ferner bleibt im in Abb. 6.6 dargestellten Fall die Anlagerung der Masse 98 Da auch dann erhalten, wenn bereits eine Fragmentierung des Molekülions einsetzt.

Das unterschiedliche Ausmaß der Fragmentierung kann als Folge unterschiedlicher Stoßaktivierung der Ionen auf dem Weg vom Eingangsbereich in den Massenanalysator erklärt werden. Unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes erfahren die Ladungszustände zwischen +54 und +58 eine etwa um den Faktor 1,5 größere Beschleunigung, als sie für die Ladungszustände zwischen +35 und +39 resultiert. Demnach ist auch der Energieeintrag durch Stöße mit Restgas in die höheren Ladungszustände erhöht, so daß in diesem Fall eine verstärkte Fragmentierung zu erwarten ist. Im dargestellten Beispiel können die Desolvatisierungsparameter nicht für alle Ladungszustände gleichzeitig auf minimale Fragmentierung und minimale Anlagerungen optimiert werden. Die gewählten Bedingungen stellen vielmehr einen Kompromiß über die gesamte Ladungsverteilung dar.

6.3. Die Axialgeschwindigkeit der Ionen im oTOF-MS

Bei der Analyse von ESI-Ionen in einem Flugzeit-Massenspektrometer mit orthogonaler Extraktion kommt der Geschwindigkeit, mit der die Ionen in den Extraktionsraum gelangen, ebenfalls Bedeutung zu. Da die Ionen diese Axialgeschwindigkeit in y-Richtung (vgl. Kap. 4.1.3) während der Analyse im oTOF-Massenspektrometer beibehalten, stellt sie die Bedingung dafür dar, ob ein Ion mit einem bestimmten m/z -Verhältnis den Detektor trifft oder nicht. Wie in Kap. 0 beschrieben, treten Ionen maximal mit Schallgeschwindigkeit in die erste Druckstufe ein. Beim Passieren weiterer ionenoptischer Bauteile resultiert eine weitere Beschleunigung, so daß unter der Voraussetzung eines genügend geringen Drucks in diesem Bereich die Axialgeschwindigkeit weiter zunimmt.

Eine Abschätzung der resultierenden Axialgeschwindigkeit und der zurückgelegten Distanz in y-Richtung soll die Unterschiede zwischen zwei hypothetischen Ionen mit m/z -Verhältnissen von 1000 Thomson bzw. 4000 Thomson verdeutlichen. Als initiale Axialgeschwindigkeit soll für beide Ionen der Wert von 330 m/s angenommen werden (vgl. Kap. 0); die zusätzliche Beschleunigung erfolgt dann zwischen zwei Bauteilen mit einer Potentialdifferenz von 3 V, 8 V bzw. 13 V. Die Beschleunigung im oTOF-MS soll mit einer Spannung von 4000 V erfolgen; als Länge der feldfreien Driftstrecke wird 1 m angenommen. Zur Abschätzung der Gesamtflugzeit wird von der idealisierten Annahme ausgegangen, daß die Verweilzeit eines Ions im Reflektor gleich der Aufenthaltszeit in der feldfreien Driftstrecke sei. Die Resultate der Abschätzung auf der Basis der in Kap. 4.1.1 beschriebenen Prinzipien der Beschleunigung von Ionen im elektrischen Feld finden sich in Tab. 6.5.

	m/z 1000	m/z 4000
initiale Quergeschwindigkeit v_{Qini}	330 ms^{-1}	330 ms^{-1}
Driftgeschwindigkeit im TOF v_{TOF}	27783 ms^{-1}	13891 ms^{-1}
geschätzte Flugzeit t_{TOF}	72 μs	144 μs
Querbeschleunigung mit 3 V		
Axialgeschwindigkeit v_{axial}	1091 ms^{-1}	710 ms^{-1}
zurückgelegte Distanz s_{axial}	7,9 cm	10,2 cm
Querbeschleunigung mit 8 V		
Axialgeschwindigkeit v_{axial}	1573 ms^{-1}	951 ms^{-1}
zurückgelegte Distanz s_{axial}	11,3 cm	13,7 cm
Querbeschleunigung mit 13 V		
Axialgeschwindigkeit v_{axial}	1914 ms^{-1}	1122 ms^{-1}
zurückgelegte Distanz s_{axial}	13,8 cm	16,2 cm

Tab. 6.5: *Abgeschätzte Axialgeschwindigkeit v_{axial} und zurückgelegte Distanz in y-Richtung s_{axial} während der Flugzeit zweier Ionen im oTOF.*

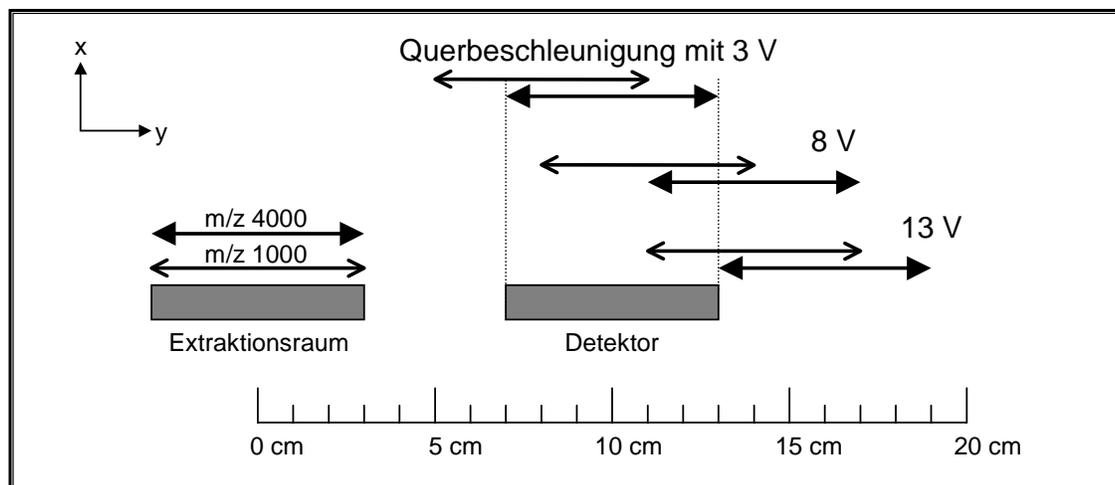


Abb. 6.7: Anknüpfungsorte von Ionenpaketen verschiedener m/z -Verhältnisse, deren Geschwindigkeit in y -Richtung durch Beschleunigung im elektrischen Feld variiert wurde. Für die Ionenpakete wurde eine Ausdehnung in y -Richtung von 6 cm angenommen; der hypothetische Detektor befindet sich in einer Entfernung von 10 cm und weist einen Durchmesser von 6 cm auf.

Ausgehend von gleichmäßig verteilten Ionen in einem Extraktionsraum der Länge 6 cm und einem Detektor mit einem Durchmesser von 6 cm, der in einer Distanz von 10 cm in y -Richtung angeordnet ist, ergeben sich aus den in Tab. 6.5 zusammengestellten Werten die in Abb. 6.7 dargestellten räumlichen Verhältnisse. Aufgrund der längeren Flugzeit der Ionen mit $m/z = 4000$ im oTOF-Massenspektrometer legen diese eine entsprechend größere Distanz in y -Richtung als die Ionen mit $m/z = 2000$ zurück. Mit steigender Axialbeschleunigung steigt die Geschwindigkeit aller Ionen in y -Richtung an und damit die Distanz s_{axial} , die sie während der Flugzeit überwinden. Dies hat zur Folge, daß unter Umständen ein großer Teil der extrahierten Ionen mit hohem m/z -Verhältnis den Detektor nicht mehr trifft. Die Ionen mit niedrigem m/z -Verhältnis legen dagegen eine vergleichsweise kürzere Strecke in y -Richtung zurück, so daß sie auch bei höherer Axialbeschleunigung noch auf den Detektor gelangen. Diesen Bedingungen entsprechend erfolgt der Nachweis von Ionen mit hohem m/z -Verhältnis bei hoher Axialbeschleunigung weniger effizient; sie werden gegenüber den Ionen mit niedrigem m/z -Verhältnis in den Massenspektren diskriminiert.

Die experimentelle Bestätigung der vorgestellten Betrachtungen erfolgt am Beispiel der in Abb. 6.8 dargestellten Nano-ESI-oTOF-Massenspektren (MARINER) von Rinderhämoglobin, einem nicht-kovalenten Komplex aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten, welche jeweils nicht-kovalent mit einer Häm-Gruppe verknüpft sind.

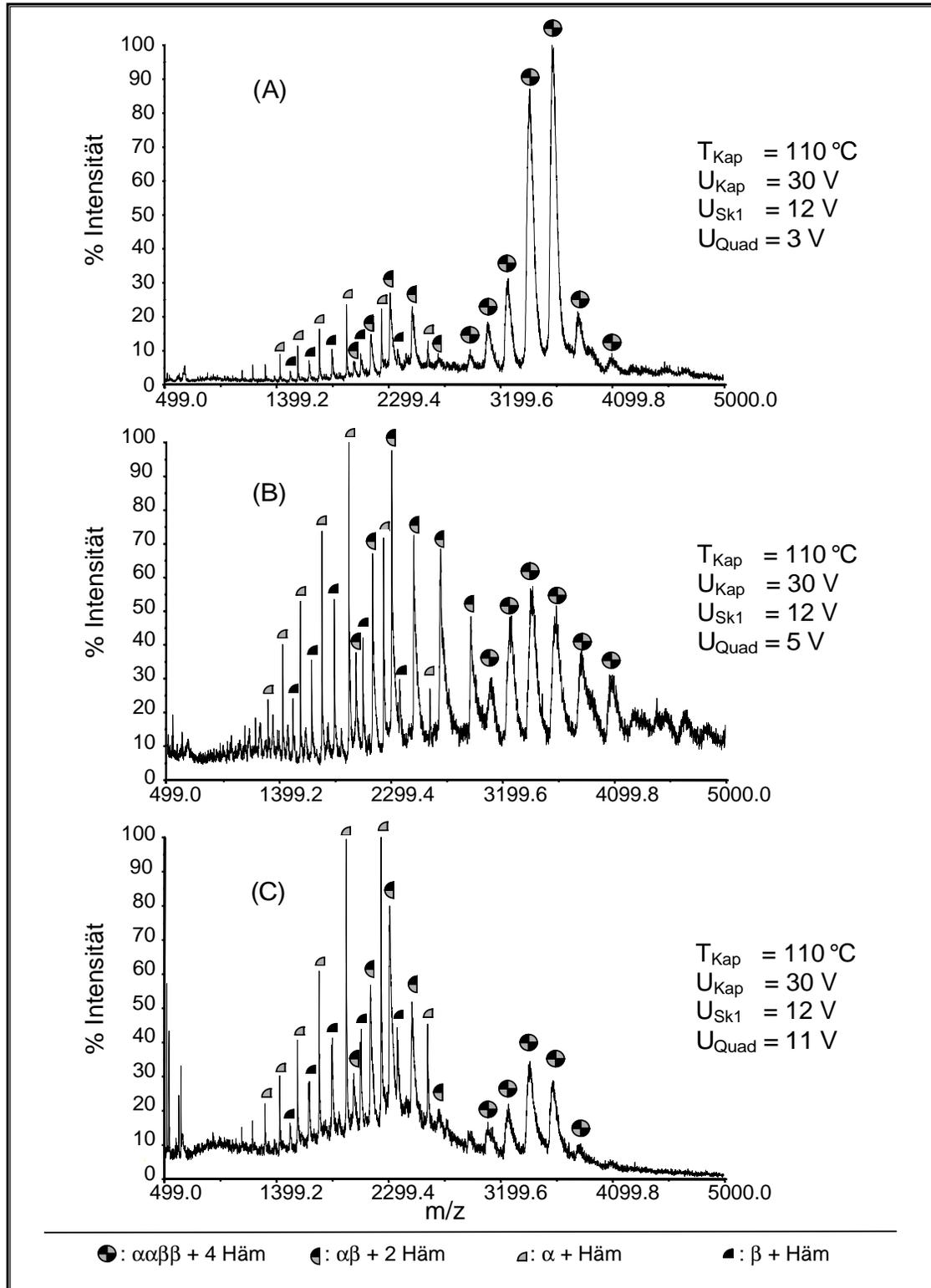


Abb. 6.8: Nano-ESI-oTOF-Massenspektren (MARINER) von Rinderhämoglobin, $c = 10^{-5}\text{ mol/l}$, in Wasser. $U_{Kap} = 30\text{ V}$, $T_{Kap} = 110^{\circ}\text{C}$, $U_{Sk1} = 12\text{ V}$, Spannung am Transferquadrupol variabel

Unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen zeigt das Spektrum die Signale des intakten nicht-kovalenten Tetramers, Signale der gemischten Dimere sowie Signale der Hämgebundenen Untereinheiten. Wird die Potentialdifferenz zwischen Transferquadrupol und zweitem *skimmer* von 3 V über 5 V auf 11 V erhöht (Abb. 6.8 A bis C), so ist eine deutliche Abnahme der Signale im hohen m/z -Bereich zu beobachten, während die Signalintensitäten im niedrigen m/z -Bereich zunehmen.

Zur Erklärung dieser Beobachtung kann eine stoßinduzierte Fragmentierung als unwahrscheinlich angesehen werden; im Bereich zwischen Transferquadrupol und zweitem *skimmer* sollten Stöße mit Restgasmolekülen wenig zur Anregung der Analytionen beitragen. Ferner bleibt das an den ersten *skimmer* angelegte Potential während dieser Meßreihe konstant, so daß die für eine Fragmentierung noch relevante Potentialdifferenz zwischen erstem *skimmer* und Transferquadrupol sogar abnimmt. Die Veränderung in den Spektren kann vielmehr mit der zunehmenden Beschleunigung, welche die Ionen zwischen Transferquadrupol und zweitem *skimmer* erfahren, erklärt werden. Die Quergeschwindigkeit der Ionen nimmt zu, so daß Ionen mit hohen m/z -Verhältnissen unter Umständen den Detektor nicht mehr erreichen und so gegenüber Ionen mit niedrigen m/z -Verhältnissen diskriminiert werden. Demnach stellt gerade bei der Untersuchung von nicht-kovalenten Komplexen in niedrigen Ladungszuständen mittels ESI-oTOF-MS auch die Quergeschwindigkeit einen kritischen Parameter dar. Bei der Optimierung der Betriebsbedingungen des Systems im Hinblick auf einen möglichst effizienten Nachweis dieser Spezies muß daher auch diese Größe berücksichtigt werden.

7. DER EINFLUSS DER ZERSTÄUBUNGSBEDINGUNGEN AUF DAS IONENSIGNAL

Die Zerstäubung der Analytlösung hat als initialer Schritt des ESI-Prozesses entscheidenden Anteil am Erfolg einer Analyse. Wie in Kap. 3.1.2 beschrieben, werden Analytionen besonders effizient aus kleinen und hochgeladenen Tröpfchen freigesetzt, so daß unter diesen Bedingungen ein Analyt in guter Signalausbeute in den Massenspektren nachgewiesen werden kann. Die gezielte Produktion solcher Tröpfchen ist daher in der ESI-MS wünschenswert.

Im vorliegenden Kapitel werden Untersuchungen zum Einfluß der zeitlich veränderlichen Zerstäubungsbedingungen in den diskontinuierlichen Spraymoden der ESI auf das resultierende Ionensignal vorgestellt. In Kap. 7.1 findet sich eine kurze Beschreibung der zugrundeliegenden Phänomenologie. Die Resultate der Untersuchungen sind in Kap. 7.3 zusammengestellt; die Diskussion erfolgt gesondert in Kap. 7.4.

7.1. Die diskontinuierliche Zerstäubung von Flüssigkeiten unter den Bedingungen der ESI-MS

Unter den Bedingungen der ESI-MS lassen sich bei konstanter Flußrate der Analytlösung in Abhängigkeit vom gewählten Kapillarenpotential verschiedene Arten der Zerstäubung, sogenannte Spraymoden, beobachten (vgl. Kap. 3.1.1). Eine ausführliche Diskussion der Ursachen dieser diskontinuierlichen Desintegration findet sich beispielsweise bei Juraschek [Jur98].

Da mit der Emission von Flüssigkeit aus der Kapillare stets ein meßbarer Strom über die Spraykapillare abfließt, können diese Spraymoden sowohl durch optische Untersuchung der Sprayquelle als auch anhand des über die Spraykapillaren abfließenden Stroms charakterisiert werden [Jur97], [Jur98]. Die Strom-Zeit-Kurven der drei üblicherweise auftretenden Spraymoden sind in Abb. 7.1 schematisch dargestellt. Bei relativ hohem Kapillarenpotential erfolgt ein kontinuierlicher Abbau der Flüssigkeit über einen *jet* in ein Aerosol geladener Tröpfchen („Spraymodus III“), so daß der resultierende Strom zeitlich konstant ist. Bei mittleren Kapillarenpotentialen dagegen wird die Flüssigkeit diskontinuierlich in Form kurzer Sprayimpulse mit einer Frequenz in der Größenordnung von 1 bis 2 kHz emittiert, was sich im Strom-Zeit-Diagramm durch aufeinanderfolgende Stromimpulse äußert („Spraymodus II“). Der im zeitlichen Mittel über die Kapillare abfließende Strom ist dabei geringer als im Spraymodus III. Zwischen den einzelnen Sprayimpulsen relaxiert der Spraykonus an der Kapillarenspitze und bildet erst zu Beginn des darauffolgenden Emissionsimpulses wieder

einen *jet* aus. Niedrige Kapillarenpotentiale bewirken schließlich eine Zerstäubung in Impulssequenzen mit einer Frequenz zwischen 10 und 50 Hz, wobei jede Impulssequenz aus etwa 25 einzelnen Impulsen mit einer Frequenz in der Größenordnung von 1 bis 2 kHz besteht („Spraymodus I“). Im zeitlichen Mittel ist der über die Kapillare abfließende Strom wiederum geringer als im Spraymodus II [Jur97].

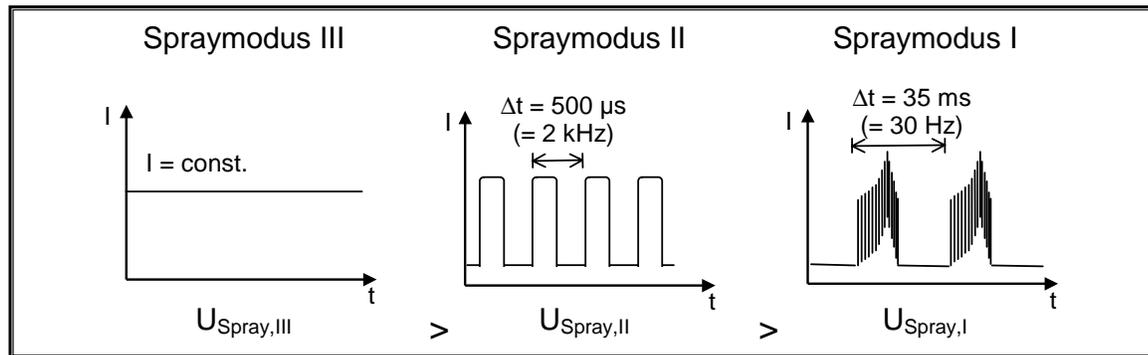


Abb. 7.1: Schematische Darstellung (nicht maßstabgetreu) charakteristischer Strom-Zeit-Kurven, die mit den in Abhängigkeit vom Kapillarenpotential U_{Spray} einhergehenden Spraymoden verbunden sind (nach [Jur97]).

Die massenspektrometrische Untersuchung des ES-Ionensignals in den verschiedenen axialen Spraymoden bei konstanter Flußrate einer Analytlösung zeigt, daß insgesamt im Spraymodus III die höchsten Signalintensitäten resultieren. Allerdings ist ebenfalls beim Übergang zwischen den Spraymoden I und II im Bereich der diskontinuierlichen Zerstäubung ein lokales Maximum der Signalintensität zu beobachten. Abb. 7.2 zeigt dies am Beispiel einer Bariumbromid-Lösung, $c = 10^{-3}$ mol/l in Methanol/Wasser (v:v 1:1) (aus [Jur97a]).

Das Auftreten des lokalen Maximums in der Gesamtintensität des Ionensignals ist bemerkenswert, da der über die Spraykapillare abfließende Strom in diesem Bereich erheblich geringer ist als im Spraymodus III. Somit gelangen bei Sprayspannungen im Bereich des lokalen Maximums während der Zerstäubung im Durchschnitt weniger Ladungsträger auf die entstehenden Tröpfchen. Als Ursache der erhöhten Signalintensität bei vergleichsweise niedrigem Strom wird diskutiert [Jur97], daß zu Beginn eines einzelnen Emissionsimpulses zunächst kleine, höhergeladene Tröpfchen entstehen, aus welchen in der Folge die Analytionen sehr effizient freigesetzt werden können. Gegen Ende eines Emissionsimpulses sollten dagegen größere Tropfen mit geringerer Ladung gebildet werden, die nur noch in geringem Maße zum detektierbaren Ionensignal beitragen.

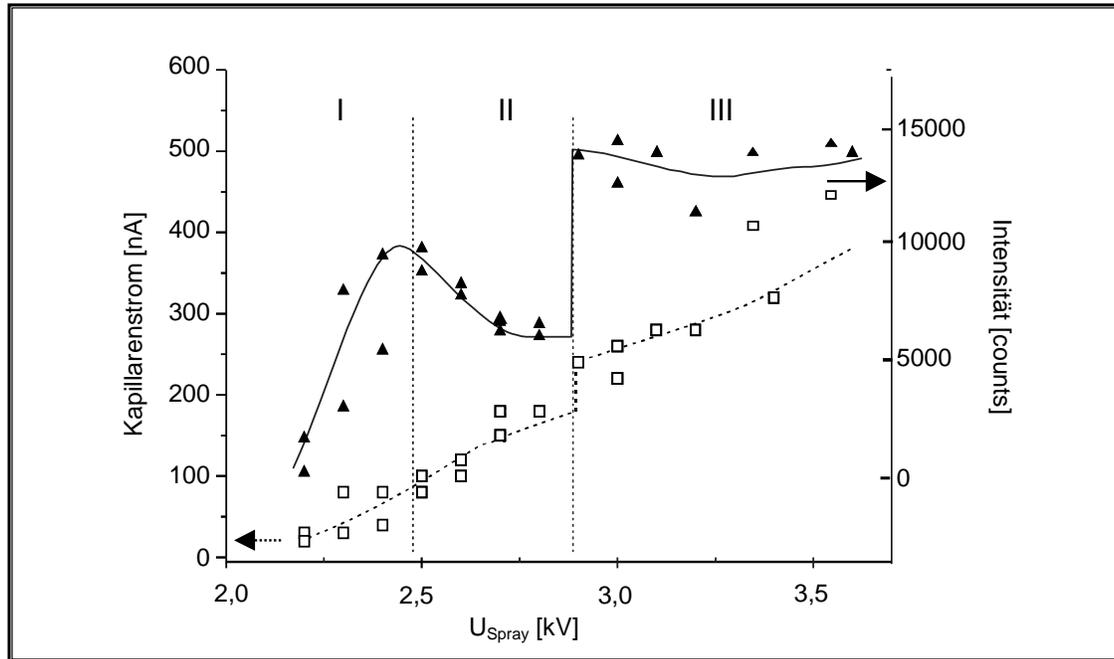


Abb. 7.2: Einfluß der Zerstäubungsbedingungen auf den über die Kapillare abfließenden Strom und das Gesamtionensignal. Analyt: Bariumbromid, $c = 10^{-3}$ mol/l in Methanol/Wasser (v:v 1:1)

Im Hinblick auf ein besseres Verständnis der Zerstäubungsphänomene ist es von Interesse, die Vorgänge während der diskontinuierlichen Emission von Flüssigkeit näher zu untersuchen. Während Massenspektrometer mit kontinuierlichem Ioneneinlaß (vgl. Kap. 4) in den diskontinuierlichen Spraymoden nur einen zeitlichen Mittelwert des Ionensignals zu registrieren vermögen, bietet die TOF-MS die Möglichkeit, die Phase der einzelnen Sprayimpulse mit den orthogonalen Extraktionsimpulsen zu korrelieren. Diese Maßnahme erlaubt es, die einzelnen Phasen der Emissionsimpulse gezielt zu untersuchen.

7.2. Die Synchronisation des oTOF-Experiments mit den Emissionsimpulsen

Um Veränderungen des Ionensignals über den Zeitraum eines Emissionsimpulses der Analytlösung beobachten zu können, ist eine Synchronisation der diskontinuierlichen Zerstäubung mit den Extraktionsereignissen im oTOF-Massenspektrometer erforderlich. Prinzipiell muß hierzu mit Einsetzen der Emission ein „Start“-Signal korreliert werden, das mit einer definierten Zeitverzögerung (*delay*) die orthogonale Extraktion auslöst und so die Analyse eines bestimmten Bereichs des Ionenpakets ermöglicht.

Erfolgt die Emission der Analytlösung mit konstanter Frequenz, so ist es nicht erforderlich, den *delay* der Ankunft des tatsächlich auslösenden Emissionsimpulses anzupassen. Unter der vereinfachenden Annahme, daß die Ionen eines Emissionsimpulses die Strecke zwischen Spraykapillare und Extraktionsraum mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von

7. Der Einfluß der Zerstäubungsbedingungen auf das Ionensignal

330 m/s zurücklegen ^[1] und die zu überwindende Distanz 20 cm beträgt, erreicht ein Ionenpaket nach einer Zeit von 606 μs den Extraktionsraum. Gleichzeitig erfolgen bei einer Pulsationsfrequenz von 1,5 kHz die Emissionsereignisse an der Spraykapillare im Abstand von etwa 667 μs . Löst demnach ein Emissionsimpuls b das „Start“-Signal aus (vgl. Abb. 7.3), so sollte sich das 667 μs zuvor emittierte Ionenpaket a noch im Extraktionsraum befinden und kann durch geeignete Wahl des *delays* untersucht werden.

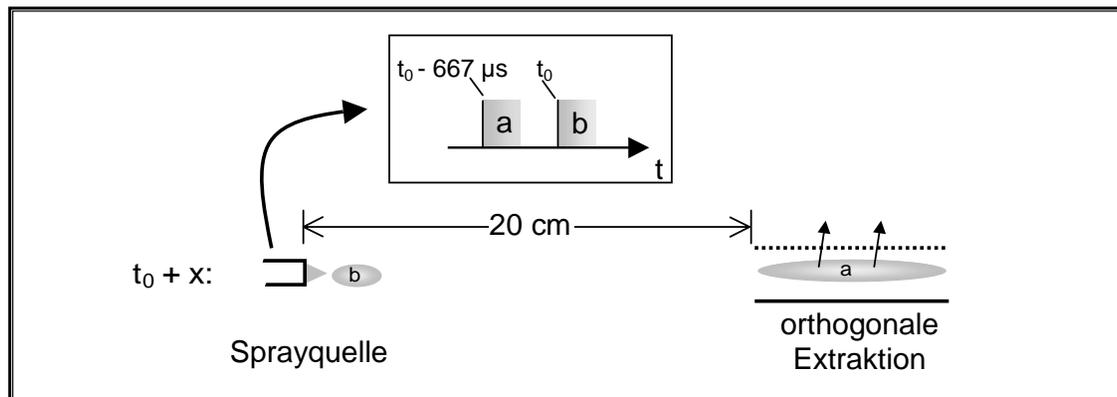


Abb. 7.3: Aufenthaltsorte zweier zeitlich aufeinanderfolgenden Emissionsimpulse bei einer Pulsationsfrequenz von 1,5 kHz und einer durchschnittlichen Geschwindigkeit der Ionenpakete von 330 m/s.

Voraussetzung für eine Synchronisation dieser Art ist, daß die Emissionsereignisse mit konstanter Frequenz erfolgen und die Start-Signale zu scharf definierten Zeitpunkten ausgegeben werden. Unter dieser Bedingung sind die in Kap. 7.1 beschriebenen, natürlich auftretenden Pulsationsphänomene nur eingeschränkt als Bezugsereignis für eine Synchronisation nutzbar. Unter den realen Betriebsbedingungen der ESI-MS sind die mit der Emission von Flüssigkeit einhergehenden Stromimpulse – nach Umwandlung in Spannungsimpulse – nur in Überlagerung mit einer Reihe von Störsignalen zu beobachten. Ein zuverlässiges und definiertes Auslösen des Start-Signals anhand der Messung des über die Kapillare abfließenden Stroms kann somit nicht gewährleistet werden. Die Schwierigkeiten der Synchronisation lassen sich überwinden, wenn die diskontinuierliche Emission von Flüssigkeit durch Variation des an der Spraykapillare anliegenden Potentials stimuliert wird. Der Gleichspannung wird zu diesem Zweck eine Wechselfrequenz mit einer Amplitude von 600 V überlagert, deren Frequenz der natürlichen Pulsationsfrequenz angepaßt wird. Das Start-Ereignis kann in diesem Fall auf die zeitliche Veränderung des Wechselfrequenzanteils bezogen werden; die Detektion des über die Spraykapillare abfließenden Stroms ist für die Synchronisation nicht mehr erforderlich.

¹ Die maximale Geschwindigkeit bei der Strömung in das Massenspektrometer (330 m/s, vgl. Kap. 6.1.1) wird näherungsweise als Mittelwert angenommen. Im Bereich der Sprayquelle ist die Geschwindigkeit niedriger; nach dem Passieren der ersten Druckstufe allerdings deutlich höher als dieser Wert.

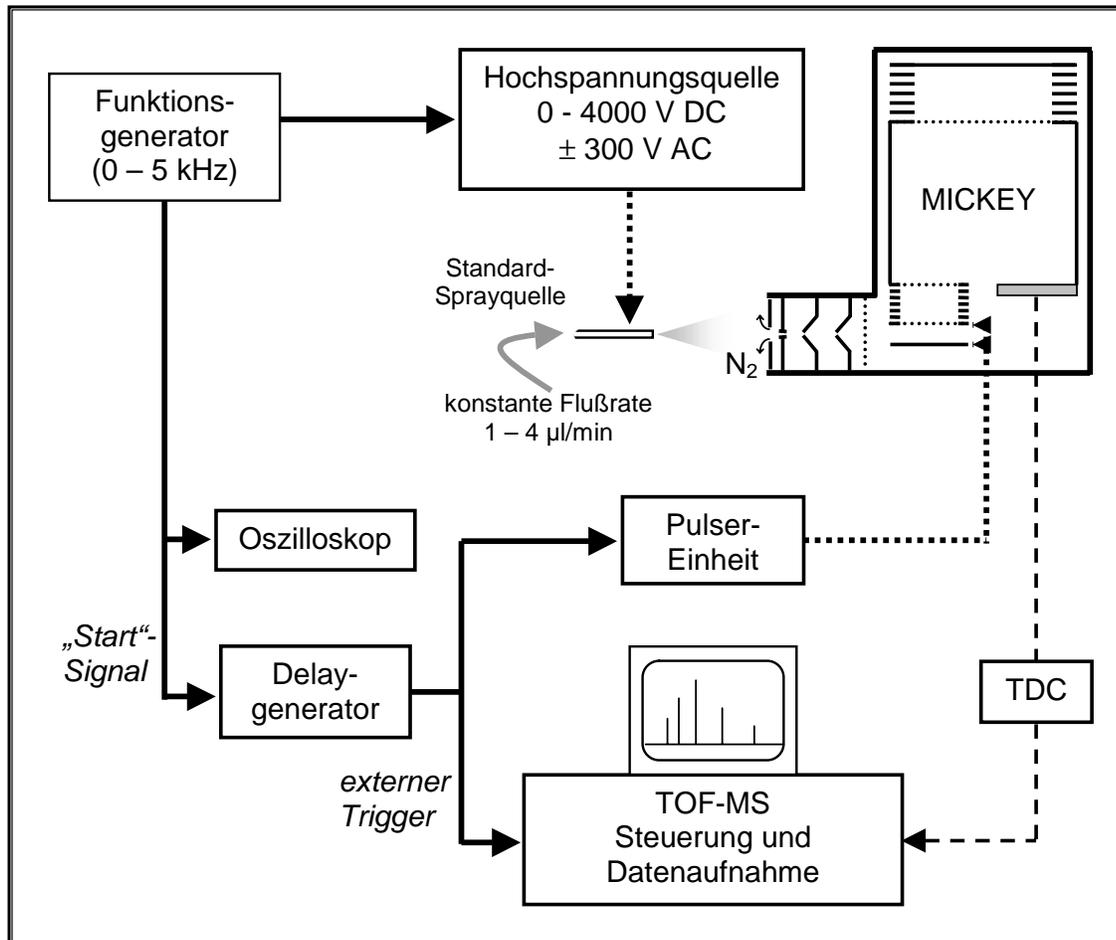


Abb. 7.4: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Aufnahme von synchronisierten ESI-oTOF-Massenspektren (MICKEY).

Eine schematische Darstellung des Aufbaus zur Aufnahme von synchronisierten ESI-oTOF-Massenspektren mit Hilfe des MICKEY (im Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom) findet sich in Abb. 7.4. Ein Funktionsgenerator (Philips PM 6671) gibt die Frequenz des synchronisierten Experiments vor, wobei das zeitlich veränderliche, sinusförmige Signal sowohl an die Hochspannungsquelle (Elektronik-Werkstatt des Instituts für Physikalische Chemie, Universität Bonn) als auch an den Delay-Generator (Stanford Research Systems, DG 535) weitergeleitet wird. Zur Kontrolle des vom Frequenzgenerator gelieferten Signals dient ein Oszilloskop (LeCroy 9350 A). Die Hochspannungsquelle liefert das für die Zerstäubung erforderliche Potential an eine Standard-Sprayquelle, wobei eine überlagerte Wechselspannung entsprechender Frequenz die diskontinuierliche Emission der Analytlösung bei konstanter Flußrate gewährleistet. Das vom Delay-Generator ausgehende Signal dient als externer *trigger* des TOF-Steuerungs- und Datenaufnahmesystems und steuert gleichzeitig die Pulser-Einheit der Extraktionselektroden für die orthogonale Extraktion. Analog zu den nicht-synchronisierten Experimenten erfolgt die Detektion des Ionensignals über eine

Vielkanalplatte, deren Signal durch einen TDC (*time to digital converter*) prozessiert und von der Datenaufnahmeeinheit in ein Massenspektrum umgewandelt wird.

7.3. Ergebnisse: Synchronisierte ESI-oTOF-MS

7.3.1. *Bariumbromid als Modellsystem*

Zur Charakterisierung der Zerstäubungsbedingungen während der diskontinuierlichen Emission von Analytlösung dient der Analyt Bariumbromid als Modellsystem. Wie in Kap. 6.1.2.1 erwähnt, spiegelt das Intensitätsverhältnis zwischen den Signalen isolierter Ba^{2+} - bzw. Ba^+ -Ionen und BaBr^+ -Ionenpaaren die Konzentration dieses Analyten in den geladenen Tröpfchen wider und kann somit als Sonde für die Lösungsmittelverdampfung während der Desolvatisierung (vgl. Kap. 3.1.2) herangezogen werden. Größe und Ladung der initialen Tropfen legen unter gegebenen Desolvatisierungsbedingungen fest, welches Lösungsmittelvolumen bis zum Erreichen des Rayleigh-Limits verdampft werden muß. Vergleicht man zwei Tropfen gleicher Ladung, aber unterschiedlicher Größe, so ist aus dem größeren Tropfen die Verdampfung größerer Mengen Lösungsmittel erforderlich, bis er schließlich bei Erreichen des Rayleigh-Limits unsymmetrisch zerfällt. Die Konzentration eines Analyten ist somit beim Zerfall des größeren Tropfens ebenfalls größer. Unter konstanten Desolvatisierungsbedingungen und Verwendung einer Analytlösung gegebener Konzentration kann somit das Intensitätsverhältnis $\text{Ba}^{2+}/\text{BaBr}^+$ als relatives Maß für die Größe der initialen Tropfen herangezogen werden; es ist um so höher, je kleiner die entsprechenden Tropfen sind (vgl. [Jur97])

Abb. 7.5 und Abb. 7.6 fassen die Resultate von synchronisierten ESI-oTOF-MS-Experimenten mit einer Bariumbromid-Lösung zusammen, wobei die Emissionsimpulse im Fall von Abb. 7.5 mit einer Frequenz von 1,0 kHz und von Abb. 7.6 mit 1,5 kHz angeregt werden. In beiden Versuchsreihen liegt der Analyt in einer Konzentration von 10^{-3} mol/l in einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Wasser (v:v 1:1) vor, und die Flußrate der Analytlösung beträgt in beiden Fällen 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Massenspektren bei verschiedenen *delays* werden unter identischen Desolvatisierungsbedingungen mit einer Aufnahmedauer von 10 s registriert. Die angegebenen Signalintensitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei Einzelmessungen; die Fehlerbalken geben die absolute maximale Abweichung einer Einzelmessung vom Mittelwert an. Das Verhältnis $\text{Ba}^{2+}/\text{BaBr}^+$ der jeweiligen Mittelwerte zu den verschiedenen *delay*-Zeiten ist in Abb. 7.5 B bzw. Abb. 7.6 B dargestellt.

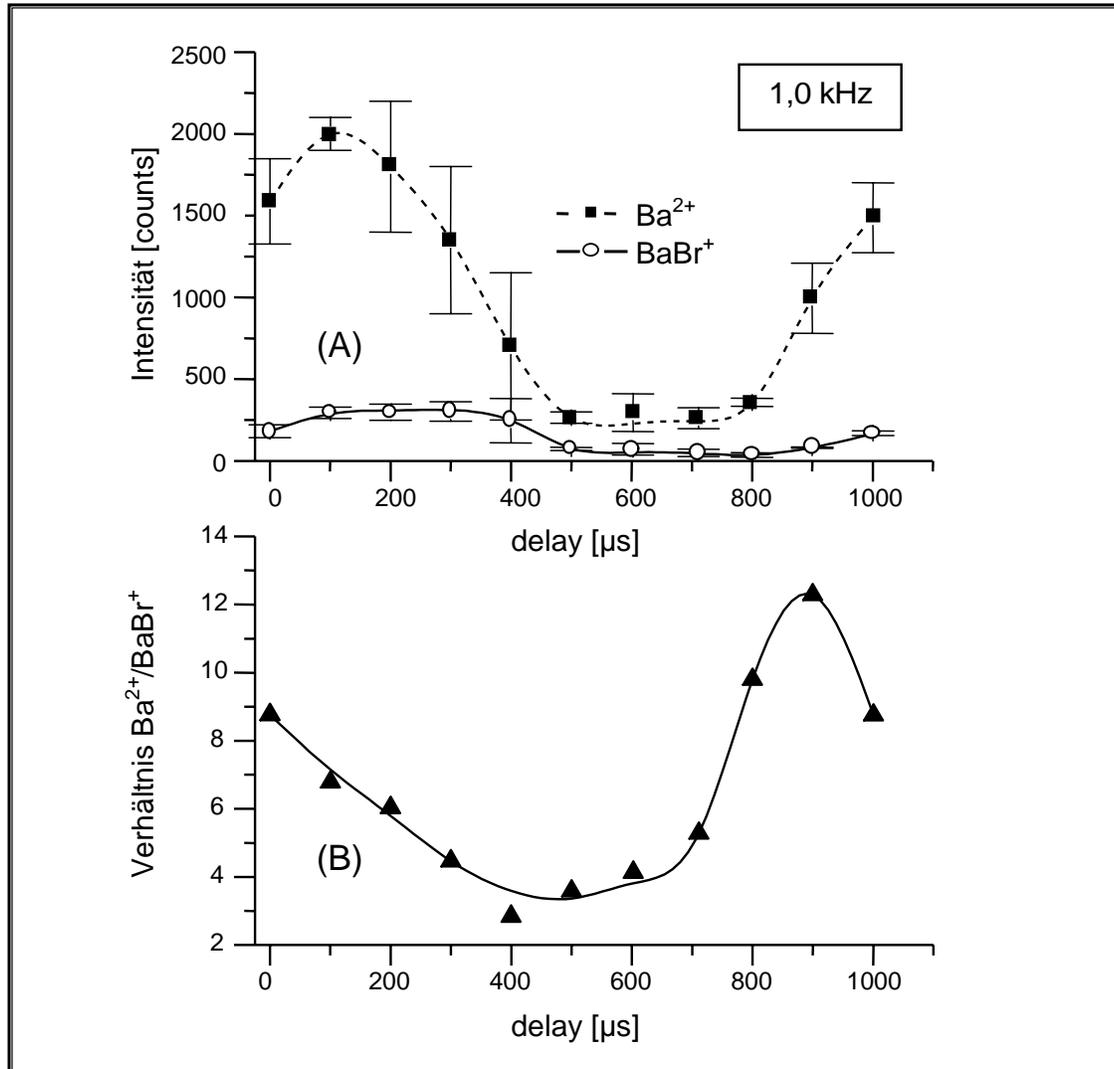


Abb. 7.5: (A) Ausgewählte Signalintensitäten aus synchronisierten ESI-oTOF-MS-Experimenten; Frequenz der Emissionsimpulse: 1,0 kHz; (B) Verhältnis der Signalintensitäten Analyt: Bariumbromid, $c = 10^{-3} \text{ mol/l}$ in Methanol/Wasser (v:v 1:1). Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom; $U_{\text{Noz}} = 300 \text{ V}$

Es ist zu erkennen, daß sowohl die Intensitäten des Ba^{2+} als auch des BaBr^+ drastischen Veränderungen bei Variation des *delays* unterworfen sind. Wird die Extraktion ohne Zeitverzögerung ausgelöst, so sind bereits Ionensignale im Massenspektrum zu erkennen; die Intensität beider Signale durchläuft ein Maximum, geht bei höherem *delay* auf ein Minimum zurück und steigt schließlich wieder an. Der Vergleich der Experimente bei den Emissionsfrequenzen von 1,5 und 1,0 kHz zeigt daneben, daß im Fall einer Anregungsfrequenz von 1,0 kHz über einen längeren Zeitraum ein nur geringes Ionensignal zu detektieren ist als bei einer Anregungsfrequenz von 1,5 kHz.

Die beiden ausgewählten Spezies, Ba^{2+} und $BaBr^+$, werden in beiden Versuchsreihen mit unterschiedlichem *delays* mit maximaler Intensität nachgewiesen, so daß das Verhältnis $Ba^{2+}/BaBr^+$ ebenfalls Veränderungen unterworfen ist und in beiden Fällen bei *delay*-Zeiten zwischen 400 und 500 μs ein Minimum durchläuft.

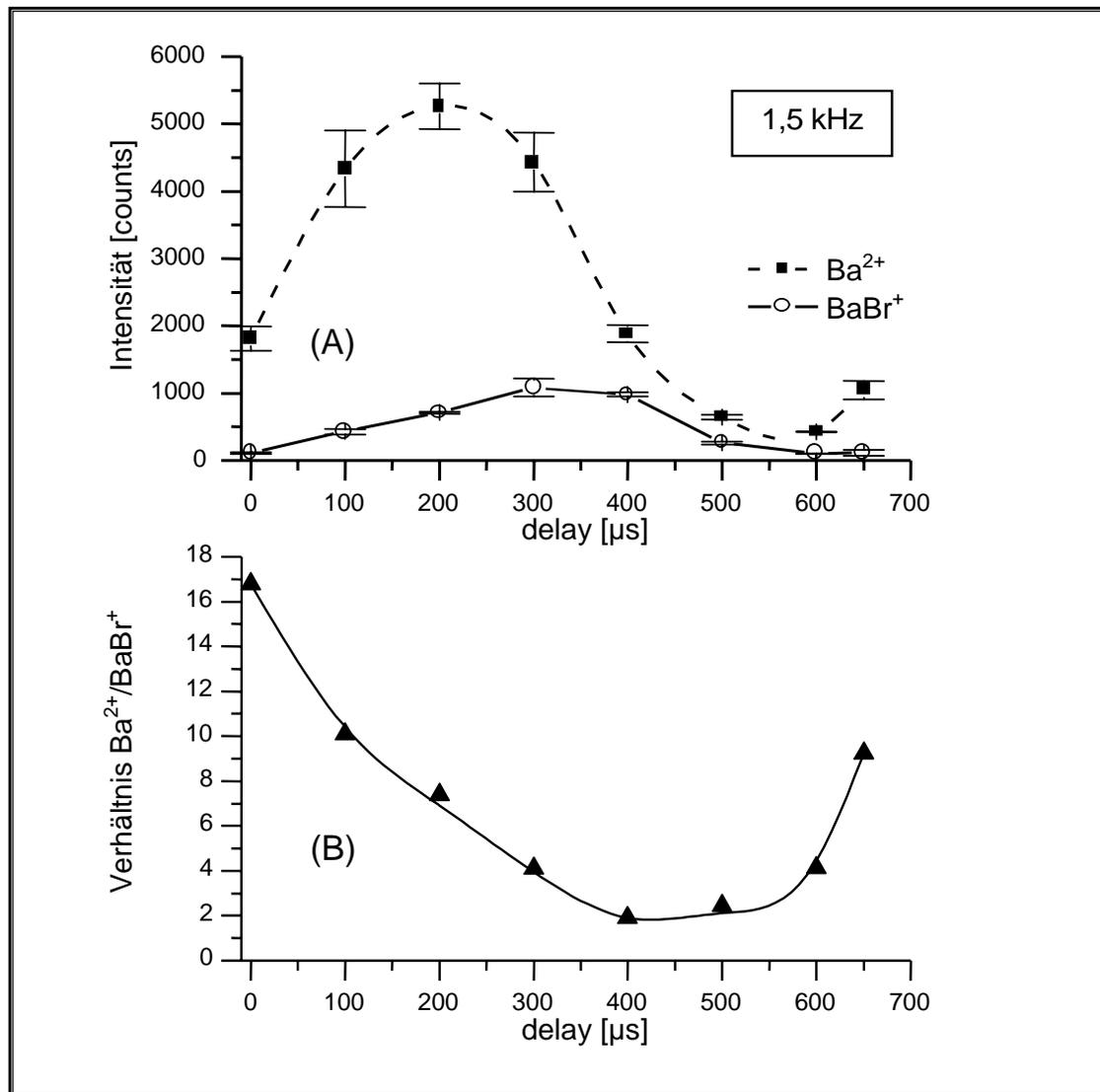


Abb. 7.6: (A) Ausgewählte Signalintensitäten aus synchronisierten ESI-oTOF-MS-Experimenten; Frequenz der Emissionsimpulse: 1,5 kHz; (B) Verhältnis der Signalintensitäten Analyt: Bariumbromid, $c = 10^{-3}$ mol/l in Methanol/Wasser (v:v 1:1). Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom; $U_{Noz} = 300$ V

7.3.2. Angiotensin II und Maltoheptaose

Der Einfluß der Zerstäubungsbedingungen bei der diskontinuierlichen Emission der Analytlösung soll ebenfalls an einer Mischung von Analyten untersucht werden, deren unterschiedliche Eigenschaften Unterschiede für den Nachweis mittels ESI-MS mit sich bringen. Als Modellsystem dient eine Mischung aus Angiotensin II (Ang), einem Peptid der

Molekülmasse 1046 Da, und dem Oligosaccharid Maltoheptaose (Mal) mit einer Molekülmasse von 1153 Da. Während der Nachweis von Peptiden auch mittels Standard-ESI-MS problemlos möglich ist, können Saccharide unter Einsatz einer Standard-Sprayquelle aus Analytlösungen vergleichbarer Konzentration häufig nur mit schlechter Signalintensität nachgewiesen werden.

Um einen Nachweis beider Analyte aus einer Mischung mit annähernd gleicher Signalintensität zu gewährleisten, wurden Angiotensin II und Maltoheptaose in unterschiedlichen Konzentrationen in einer Mischung aus Methanol und Wasser (v:v 1:1) mit Zusatz von 5 Vol.-% Essigsäure und NaCl in einer Konzentration von 5 mmol/l gelöst. Abb. 7.7 zeigt ein typisches Massenspektrum (nicht-synchronisiert) einer Mischung von Angiotensin II in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l und Maltoheptaose in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Angiotensin II wird überwiegend als zweifach protoniertes Molekülion $[\text{Ang}+2\text{H}]^{2+}$ und mit geringer Intensität ebenfalls in einfach protonierter Form $[\text{Ang}+\text{H}]^+$ nachgewiesen. Maltoheptaose wird im wesentlichen als einfach Natrium-angelagertes Molekülion $[\text{Mal}+\text{Na}]^+$ detektiert.

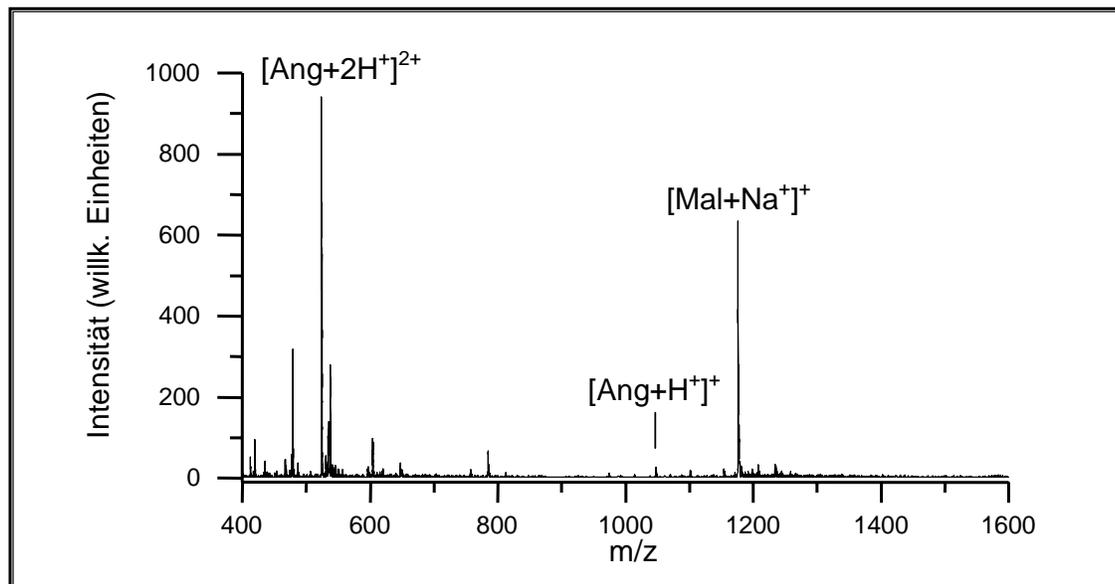


Abb. 7.7: ESI-oTOF-Massenspektrum (MICKEY mit Standard-Sprayquelle und Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom) einer Mischung von Angiotensin II, $c = 2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l und Maltoheptaose, $c = 5 \cdot 10^{-4}$ mol/l, in Methanol/Wasser (v:v 1:1) mit 5% Essigsäure und 5 mM NaCl.

Abb. 7.8 zeigt zusammengefaßt die Resultate von ESI-oTOF-MS-Experimenten synchronisiert mit den Emissionsimpulsen an der Spraykapillare mit der oben vorgestellten Mischung aus Angiotensin II und Maltoheptaose. Als repräsentative Ionensignale der Analyte sind das zweifach protonierte Angiotensin-Molekülion sowie das Natrium-angelagerte

Maltoheptaose-Molekülon dargestellt. Bei einer Flußrate der Analytlösung von 2 µl/min beträgt das DC-Kapillarenpotential 3 kV, die Emission von Flüssigkeit wird mit einer Frequenz von 1,5 kHz stimuliert. Die dargestellten Punkte geben den Mittelwert aus drei Einzelmessungen (Aufnahmedauer je 10 s) wider; die Fehlerbalken entsprechen dem absoluten maximalen Fehler der Einzelmessungen.

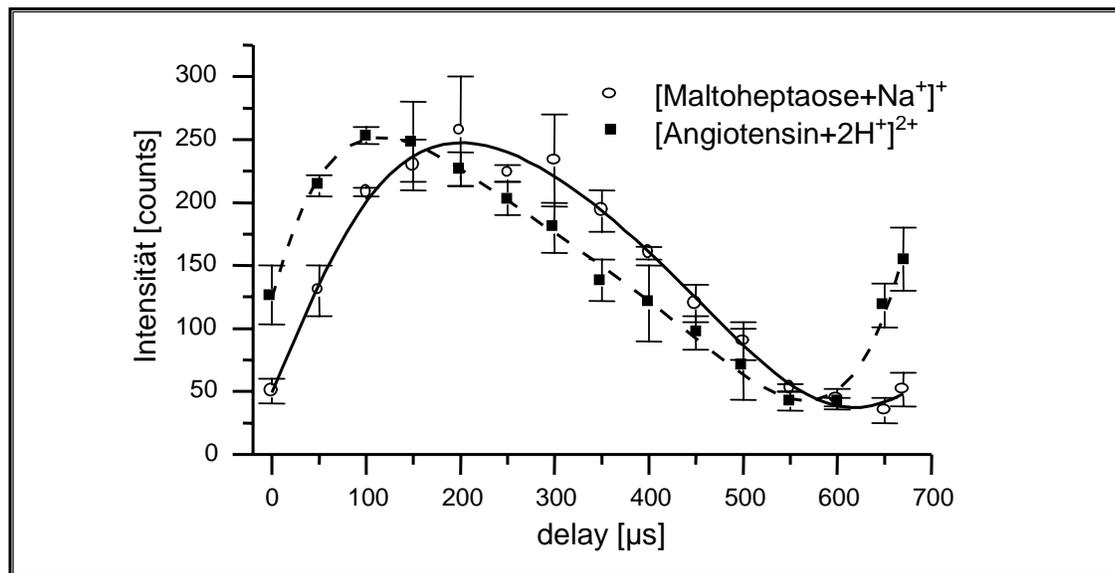


Abb. 7.8: Ausgewählte Signalintensitäten aus synchronisierten ESI-oTOF-MS-Experimenten einer Lösung von Angiotensin II, $c = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ und Maltoheptaose, $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$, in Methanol/Wasser (v:v 1:1) 5% Essigsäure, 5 mM NaCl.

Die Darstellung läßt erkennen, daß auch in diesem Untersuchungssystem mit Veränderung des *delays* eine Veränderung des Ionensignals einhergeht. Dabei erreicht die Signalintensität des Analyten Angiotensin II nach einem *delay* von 100 µs ein Maximum und fällt zu einem Minimum nach 550 µs ab. Im Fall der Maltoheptaose ist dagegen erst nach einem *delay* von 200 µs eine maximale Signalintensität zu beobachten, das Minimum tritt nach einem *delay* von 600 µs auf.

7.4. Diskussion

Wird eine Analytlösung diskontinuierlich zerstäubt und die resultierenden Ionenpakete mittels eines synchronisierten ESI-oTOF-Experiments zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert, so ist mit der Variation des *delays* eine deutliche Veränderung der Signalintensitäten und Intensitätsverhältnisse in den Massenspektren verbunden. Der Anstieg der Signalintensitäten und das anschließende Durchlaufen eines Minimums zeigen in allen Untersuchungsreihen an, daß die an der Spraykapillare gebildeten Pakete bis in den Extraktionsraum erhalten bleiben und noch zu einem großen Teil getrennt von zuvor oder danach emittierten Sprayimpulsen

beobachtet werden können. Der zeitliche Abstand der einzelnen Pakete nimmt dabei erwartungsgemäß zu, wenn die Frequenz der diskontinuierlichen Emission abnimmt (Abb. 7.5 und Abb. 7.6). In allen Versuchsreihen geht allerdings das detektierbare Ionensignal im Bereich des Intensitätsminimums nicht vollständig zurück, so daß von einer Verbreiterung der Pakete während des Transports ausgegangen werden muß. Bedingt durch diese Verbreiterung können sich so aufeinanderfolgende Pakete bereits zu einem gewissen Maße überlagern.

Mehrere Faktoren sind als Ursache der Verbreiterung denkbar:

- Verwirbelungen während des Anströmens der geladenen Tröpfchen bei Atmosphärendruck in die *nozzle* hinein
- Verwirbelungen während der turbulenten Strömung durch die *nozzle* hindurch (vgl. Kap. 6.1.1)
- unterschiedliche Axialbeschleunigung von Ionen verschiedener m/z -Verhältnisse auf dem Weg in den Extraktionsraum (vgl. Kap. 6.3)

Während sich die beiden erstgenannten Faktoren unabhängig von den Eigenschaften der transportierten Ionen auswirken sollten, könnte der Einfluß der Axialbeschleunigung eine systematische Anreicherung von Ionen niedriger m/z -Verhältnisse im vorderen Teil eines Pakets bewirken. Der aus der Axialbeschleunigung resultierende Effekt soll daher abgeschätzt werden. Eine freie Beschleunigung von Ionen (ohne Stöße mit Restgas) sollte aufgrund der Druckverhältnisse erst im Bereich zwischen dem zweiten *skimmer* und dem Eingang in den Extraktionsraum erfolgen. Am MICKEY beträgt der Abstand dieser Bauteile etwa 2 cm; die Potentialdifferenz zwischen diesen Bauteilen wird typischerweise auf 12 V eingestellt. Vom Eingang bis zur Mitte des Extraktionsraums legen die derart beschleunigten Teilchen dann eine Distanz von etwa 3 cm zurück. Die Gesamtflugzeiten ^[1] der Ionen vom zweiten *skimmer* in die Mitte des Extraktionsraums, die sich aus den Gleichungen für die Bewegung von Ionen im elektrischen Feld ergeben (vgl. Kap. 4.1.1), sind in Tab. 7.1 zusammengestellt.

	Ba ²⁺ (m/z 68)	BaBr ⁺ (m/z 218)	[Ang+2H] ²⁺ (m/z 524)	[Mh+Na] ⁺ (m/z 1176)
Flugzeit <i>skimmer</i> - Extraktionsraum	12 μ s	21 μ s	33 μ s	50 μ s
Differenz	9 μ s		17 μ s	

Tab. 7.1: Die Flugzeiten von Ionen verschiedener m/z -Verhältnisse über die Distanz zwischen zweitem *skimmer* und der Mitte des Extraktionsraums.

¹ Die Gesamtflugzeit setzt sich aus der Zeit in der Beschleunigungsregion zwischen zweitem *skimmer* und Extraktionsraum sowie der Driftzeit in die Mitte des Extraktionsraums zusammen.

Bei der Untersuchung von Bariumbromid bzw. der Mischung von Angiotensin II und Maltoheptaose in synchronisierten ESI-oTOF-Experimenten sind die Intensitätsmaxima der Spezies in einem zeitlichen Abstand von mehr als 100 μs zu beobachten. Die aus der Axialbeschleunigung resultierenden Unterschiede in der Ankunftszeit der Ionen in der Mitte des Extraktionsraum sind dagegen erheblich geringer. Es ist daher zu folgern, daß die beobachteten zeitlichen Unterschiede in den Intensitätsmaxima von Ba^{2+} und BaBr^+ bzw. Angiotensin II und Maltoheptaose nicht allein auf deren unterschiedliche Flugzeit in den Extraktionsraum beruhen. Die beobachteten zeitlichen Unterschiede der Intensitätsmaxima sind daher auf unterschiedliche Zerstäubungsbedingungen während eines Emissionsimpulses zurückzuführen.

Zieht man das Verhältnis $\text{Ba}^{2+}/\text{BaBr}^+$ als qualitatives Maß für die Größe der initialen Tröpfchen heran, so wird aus Abb. 7.5 B und Abb. 7.6 B ersichtlich, daß die Tröpfchengröße in den einzelnen Phasen der diskontinuierlichen Zerstäubung deutlichen Veränderungen unterworfen ist. Zu Beginn eines Emissionsimpulses werden zunächst kleinere Tröpfchen gebildet (hohes $\text{Ba}^{2+}/\text{BaBr}^+$ -Verhältnis). Die Tröpfchengröße nimmt dann im Verlauf des Emissionsimpulses immer weiter zu, was anhand der Abnahme des $\text{Ba}^{2+}/\text{BaBr}^+$ -Signalverhältnisses gefolgert werden kann. Dieses Resultat steht im Einklang mit der in Kap. 7.1 beschriebenen Hypothese der Tropfengrößenverteilung während eines Emissionsimpulses (vgl. [Jur97]).

Im Fall des Analytensystems Angiotensin II und Maltoheptaose ist es für die Interpretation der Resultate erforderlich, die unterschiedlichen Eigenschaften dieser beiden Analyte im Hinblick auf ihre Ionisierung und Freisetzung aus den geladenen Tröpfchen zu berücksichtigen. Unterschiede bestehen beispielsweise in folgenden Punkten:

- Maltoheptaose liegt auch in saurer Lösung im wesentlichen ungeladen vor, während das Peptid unter diesen Bedingungen durch Säure-Base-Reaktionen protoniert wird. Im positiven Ionenmodus kann das Peptid demnach als Oberflächenladungsträger auftreten; das Oligosaccharid dagegen nicht.
- Die Oligosaccharid-Moleküle sind hydrophil, während das Peptid ebenfalls hydrophobe Strukturen aufweist und somit oberflächenaktiv ist.

Wie in Kap. 3.1.1 beschrieben, führt an der Spitze der Spraykapillare die Ladungstrennung nach dem elektrophoretischen Mechanismus zu einer Anreicherung von Ladungsträgern auf der Flüssigkeitsoberfläche. Setzt nun an der Spitze der Spraykapillare die Emission geladener Tröpfchen ein, so sollten in Analogie zu den Verhältnissen beim unsymmetrischen

Tropfenzerfall (vgl. Kap. 3.1.2) bevorzugt die Teilchen in die ersten Tropfen gelangen, die eine hohe Aufenthaltswahrscheinlichkeit an der Flüssigkeitsoberfläche aufweisen. Erst zu einem späteren Zeitpunkt sollten Teilchen aus dem Inneren der Flüssigkeit die Spraykapillare verlassen. Auf der Basis der oben erwähnten Eigenschaften besteht für Angiotensin II eine höhere Aufenthaltswahrscheinlichkeit an der Flüssigkeitsoberfläche als sie dem Oligosaccharid zukommt. Die höhere Konzentration des Oligosaccharids in der Lösung gleicht diesen Nachteil nur teilweise wieder aus. Daher gelangt das Peptid zu früheren Zeitpunkten des Emissionsimpulses in die geladenen Tröpfchen und wird ebenfalls zu einem früheren Zeitpunkt mit maximaler Signalintensität nachgewiesen.

Überträgt man diese Resultate auf die Verhältnisse beim unsymmetrischen Zerfall geladener Tröpfchen, so wird erneut deutlich, aus welchem Grund unter Standard-Spraybedingungen Oligosaccharide im Vergleich zu Peptiden wenig effizient nachgewiesen werden können. Während Peptide beim unsymmetrischen Zerfall mit hoher Wahrscheinlichkeit in die *offspring droplets* gelangen, verbleiben die hydrophilen Oligosaccharide bevorzugt in den Resttropfen, die der massenspektrometrischen Analyse nicht mehr zugänglich sind. Erst unter den Bedingungen der Nano-ESI mit ihren erheblich kleineren initialen Tröpfchen besteht eine gute Nachweismöglichkeit dieser Spezies (vgl. [Bah97]).

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen an den Modellsystemen Bariumbromid bzw. Angiotensin II und Maltoheptaose auf, daß bei der diskontinuierlichen Emission von Analytlösungen während eines Emissionsimpulses sowohl die Größe der emittierten Tröpfchen als auch deren Zusammensetzung zeitlichen Veränderungen unterworfen sind. Gerade im Fall zweier verschiedenartiger Analyte sollten die Prozesse an der Spraykapillare die Verhältnisse beim unsymmetrischen Tropfenzerfall zu einem gewissen Maße widerspiegeln. Das Verfahren der Synchronisation der diskontinuierlichen Zerstäubung mit den Extraktionsimpulsen des oTOF-Massenspektrometers kann somit als Werkzeug dienen, um Einblicke in die für die Prinzipien der Desolvatisierung relevanten Schritte zu gewinnen.

Das Verfahren hat sich für die Analyse einzelner Sprayimpulse bewährt und erlaubt es, gezielte Phasen der diskontinuierlichen Emission zur Aufnahme von Massenspektren zu verwenden. Dennoch ist es für eine Anwendung im routinemäßigen Einsatz der ESI-oTOF-MS wenig geeignet, da die Repetitionsrate des Experiments von typischerweise 5 bis 10 kHz auf 1 bis 2 kHz herabgesetzt wird. Im Hinblick auf die Detektion einer maximalen Ionensignalintensität ist daher ein nicht-synchronisiertes Experiment in Verbindung mit einer kontinuierlichen Zerstäubung im Spraymodus III vorzuziehen.

8. DER EINFLUß DES LÖSUNGSMITTELS AUF DAS RESULTIERENDE IONENSIGNAL IN DER ESI-MS

In der ESI-Massenspektrometrie kommt dem Lösungsmittel, in welchem ein Analyt der Analyse zugeführt wird, besondere Bedeutung zu. Wie bereits in Kap. 3.1 ausführlich beschrieben wird, liefern die Eigenschaften des Lösungsmittels die entscheidenden Rahmenbedingungen für den Transfer eines Analyten aus der Lösung in ein massenspektrometrisch detektierbares Gasphasenion. Sie beeinflussen sowohl Art als auch Intensität der detektierbaren Ionensignale, wobei diese beiden Merkmale im folgenden unter dem Begriff „resultierendes Ionensignal“ zusammengefaßt werden. Prinzipiell ist der Einfluß eines Lösungsmittels auf das resultierende Ionensignal in der ESI-MS unter drei verschiedenen Gesichtspunkten zu betrachten, deren Kombination sich auf Art und Intensität der detektierbaren Signale auswirkt.

- Das Lösungsmittel stellt in kondensierter Phase die „chemische Umgebung“ des Analyten dar und legt somit fest, in welcher Form der Analyt in Lösung vorliegt. Das Lösungsmittel in seiner Eigenschaft als chemische Umgebung des Analyten bestimmt daher die Ausgangsbedingungen jeder Analyse.
- Während der Zerstäubung der Analytlösung, dem weiteren Zerfall der initialen Tröpfchen und der damit einhergehenden Desolvatisierung des Analyten kommt dem Lösungsmittel die Rolle einer „Trägerkomponente“ für den Analyten in die Gasphase zu (vgl. Kap. 3.1.2). Die Eigenschaften des Lösungsmittels haben in diesen Phasen der ES-Ionisierung Einfluß auf die Größe der initialen Tröpfchen [Fer94] und das Ausmaß der Lösungsmittelverdampfung [Ray82], [Keb93]. Sie haben somit entscheidenden Anteil am Erfolg einer Analyse.
- Während des Transfers eines Analyten in die Gasphase bzw. nach diesem Prozeß stellen ebenfalls in der Gasphase befindliche Lösungsmittelmoleküle potentielle Reaktionspartner des Analyten dar (vgl. Kap. 3.1.3.3, [Sch95a], [Ste99]). Insbesondere bei Anregung des Analyten durch Stöße (z.B. während der Desolvatisierung) haben die Gasphasenreaktionen einen deutlichen Einfluß auf das resultierende Ionensignal.

Der breite Einflußbereich des Lösungsmittels hat zur Folge, daß ein komplexer Zusammenhang zwischen Lösungsmiteleigenschaften und den resultierenden Massenspektren herrscht. Wird in der Praxis die Zusammensetzung des Lösungsmittels variiert, so ändern sich in der Regel mehrere relevante Eigenschaften gleichzeitig. Diesem Umstand muß Rechnung getragen werden, wenn der Einfluß des Lösungsmittels auf das resultierende Ionensignal Ziel

einer Untersuchung ist. Um einen Einfluß des Lösungsmittels auf die chemische Umgebung des Analyten bzw. im Hinblick auf Gasphasenreaktionen auf möglichst überschaubarer Basis zu halten, bietet sich der Einsatz von Salzen als Modellanalyte an.

Im Hinblick auf die chemische Umgebung des Analyten stellt im Fall von Salzlösungen die Polarität des Lösungsmittels den entscheidenden Faktor dar. Diese bestimmt, in welchem Ausmaß die elektrolytische Dissoziation des Salzes in Lösung erfolgen kann ([Col93], [Wan96]), und legt somit Art und Anzahl der prinzipiell detektierbaren Spezies fest. Dienen Salze mit zweiwertigen Metallkationen als Analyte, so sind die in der Gasphase ablaufenden Reaktionen im wesentlichen Elektronentransferprozesse. Reaktionen dieser Art wurden bereits durch ESI-MS²-Untersuchungen von Clustern aus Metallkationen und Lösungsmittelmolekülen intensiv studiert ([Bla90], [Jay90], [Che92a], [Koh97], [Koh97a]). Ihr Ablauf wird entscheidend durch die Ionisierungsenergie des Lösungsmittels in Relation zur zweiten Ionisierungsenergie des Metalls beeinflusst. Ist die zweite Ionisierungsenergie des Metalls höher als die Ionisierungsenergie des Lösungsmittels, so kann ein zweiwertiges Metallkation M²⁺ nur in Form eines Clusters nachgewiesen werden, in dem es durch eine gewisse Anzahl von Lösungsmittelmolekülen solvatisiert wird. Sobald die Anzahl der Lösungsmittelmoleküle im Cluster einen kritischen Wert unterschreitet, erfolgt eine Reduktion des Metallkations von M²⁺ zu M⁺. Der kritische Wert ist dabei für ein gegebenes Lösungsmittel um so höher, je höher die zweite Ionisierungsenergie des Metallkations ist (vgl. [Bla90]). Metalle, deren zweite Ionisierungsenergie niedriger als die des Lösungsmittels ist, können dagegen vollständig desolvatisiert in Form von M²⁺-Ionen nachgewiesen werden [Bla90].

8.1. Ergebnisse

Bei der ESI-MS-Analyse von Bariumbromid hat das verwendete Lösungsmittel entscheidenden Einfluß auf die resultierenden Massenspektren. Abb. 8.1 zeigt die ESI-oTOF-Massenspektren (MICKEY) von Bariumbromid aus den Alkoholen Methanol (MeOH, Abb. 8.1 A), Ethanol (EtOH, Abb. 8.1 B), 1-Propanol (PrOH, Abb. 8.1 C) und 1-Butanol (BuOH, Abb. 8.1 D) bei identischen Desolvatisierungsbedingungen und identischer Akkumulationsdauer. Alle Massenspektren zeigen die bereits in Kap. 6.1.2.1 beschriebenen charakteristischen Signale des Analyten Bariumbromid. Im Fall der 1-Butanol-Lösung tritt zusätzlich noch ein Signal bei m/z 97,1 auf, das auf natriumangelagerte Butanolmoleküle zurückzuführen ist.

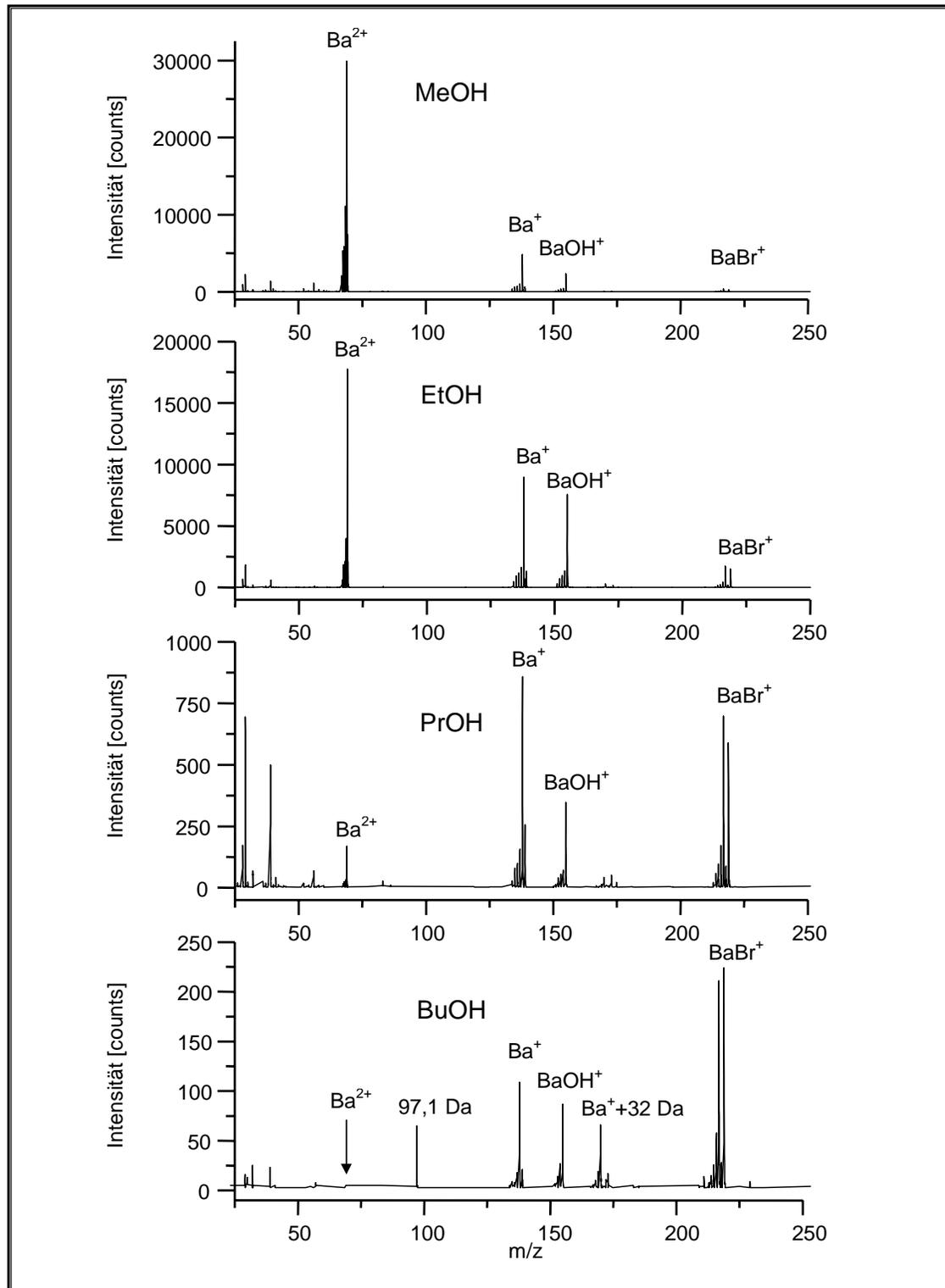


Abb. 8.1: ESI-oTOF-Massenspektren von Bariumbromid, $c = 10^{-4} \text{ mol/l}$ in verschiedenen Alkoholen bei identischen Desolvatisierungsbedingungen (MICKEY im Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom, $U_{Bl} = 400 \text{ V}$, $U_{noz} = 350 \text{ V}$, $T_{noz} = 100^\circ\text{C}$); (A) Methanol, (B) Ethanol, (C) 1-Propanol, (D) 1-Butanol

Es ist zu erkennen, daß die entsprechenden Massenspektren in mehrerer Hinsicht erhebliche Unterschiede aufweisen. So nimmt einerseits die Gesamtintensität innerhalb der homologen Reihe drastisch ab, und auch die relativen Verhältnisse der Ionensignalintensitäten untereinander sind Veränderungen unterworfen.

Die Massenspektren sollen im folgenden anhand charakteristischer Indikatorsignale des Analyten Bariumbromid beurteilt werden. Die Intensitäten isolierter Bariumionen relativ zum Bariumbromid-Clusterion BaBr^+ werden empfindlich durch Vorgänge in Lösung beeinflusst. Das Verhältnis $(\text{Ba}^{2+}+\text{Ba}^+)/\text{BaBr}^+$ ^[1] wird daher zur Beurteilung der Rolle des Lösungsmittels als „chemische Umgebung“ des Analyten herangezogen. Da Ba^+ -Ionen die Produkte von Redoxreaktionen in der Gasphase darstellen (vgl. Kap. 6.1.2.1), dient das Verhältnis $\text{Ba}^{2+}/\text{Ba}^+$ als qualitativer Indikator der Vorgänge, die der Analyt in der Gasphase durchläuft. Die entsprechenden Intensitätsverhältnisse, $(\text{Ba}^{2+}+\text{Ba}^+)/\text{BaBr}^+$ und $\text{Ba}^{2+}/\text{Ba}^+$, die für die untersuchten Lösungsmittel resultieren, sind in Abb. 8.2 A und Abb. 8.2 B dargestellt. Die Datenpunkte stellen – wie auch in allen folgenden Abbildungen – jeweils den Mittelwert aus drei Einzelmessungen dar; die Fehlerbalken geben die maximale Abweichung einer Einzelmessung vom Mittelwert an.

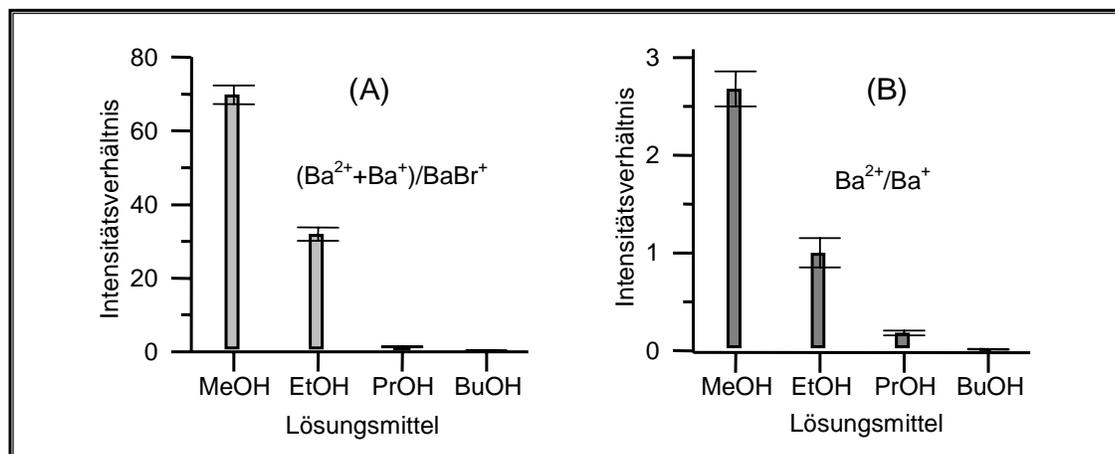


Abb. 8.2: Zusammenfassung der ESI-MS-Untersuchungen von Bariumbromid, $c = 10^{-4}$ mol/l in verschiedenen Alkoholen (A) Verhältnis der Signalintensitäten $(\text{Ba}^{2+}+\text{Ba}^+)/\text{BaBr}^+$; (B) Verhältnis der Signalintensitäten $\text{Ba}^{2+}/\text{Ba}^+$; jeweils Mittelwert aus drei Einzelmessungen.

Es ist zu erkennen, daß innerhalb der homologen Reihe Methanol – Ethanol – Propanol – Butanol das Intensitätsverhältnis der Signale der isolierten Bariumionen relativ zum Signal BaBr^+ von etwa 70 bis auf 0,4 abnimmt (Abb. 8.2 A). Ebenfalls sinkt in identischer Reihenfolge der Anteil des Ba^{2+} relativ zum reduzierten Ba^+ von 2,7 bis auf einen Wert von 0,02 (Abb. 8.1 B). Die eingesetzten Lösungsmittel unterscheiden sich in einer Reihe von

¹ Zur Berechnung der Verhältnisse werden im folgenden die monoisotopischen Signale ^{138}Ba und $^{138}\text{Ba}^{79}\text{Br}$ herangezogen.

8. Der Einfluß des Lösungsmittels auf das resultierende Ionensignal in der ESI-MS

Eigenschaften, die in enger Verknüpfung sowohl die chemische Umgebung des Analyten und die Gasphasenreaktionen beeinflussen als auch veränderte Eigenschaften als Trägersubstanz zur Folge haben. Einige Eigenschaften der Lösungsmittel, die in dieser Hinsicht von Bedeutung sind, sind in Tab. 8.1 zusammengestellt. Da die tatsächliche Temperatur der Tropfen nicht bekannt ist, kann der angegebene Dampfdruck der Lösungsmittel bei einer Temperatur von 50°C nur als Richtwert zur Verdeutlichung der Tendenz angesehen werden.

	Dampfdruck bei 50°C [kPa]	Oberflächen- spannung [Nm^{-1}]	Viskosität [Nsm^{-2}]	Ionisierungs- energie [eV]	Dielektrizitäts- konstante
MeOH	55,5	0,0225	$5,5 \cdot 10^{-4}$	10,85	32,6
EtOH	29,5	0,0226	$1,2 \cdot 10^{-3}$	10,47	24,3
PrOH	12,2	0,0237	$2,3 \cdot 10^{-3}$	10,22	20,1
BuOH	4,5	0,0247	$2,9 \cdot 10^{-3}$	10,06	17,8
H ₂ O	12,3	0,0730	$1,03 \cdot 10^{-3}$	12,6	81,1

Tab. 8.1: Ausgewählte Eigenschaften der verwendeten Alkohole. Die Eigenschaften von Wasser sind zum Vergleich gegenübergestellt (aus [CRC95]).

In der massenspektrometrischen Analyse ist stets der Gesamteffekt bei Variation des Lösungsmittels zu beobachten, so daß an dieser Stelle keine detaillierten Aussagen über die tatsächliche Rolle des Lösungsmittels möglich sind. Durch Variation von Lösungsmittelzusammensetzung und Desolvatisierungsbedingungen soll der tatsächliche Einfluß auf den Analyten im ESI-Prozeß eingegrenzt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Kapiteln 8.1.1, 8.1.2 und 8.1.3 zusammengestellt; die Diskussion der Resultate erfolgt gesondert in Kap. 8.2.

8.1.1. Variation der Lösungsmittelzusammensetzung

Abb. 8.3 zeigt eine Zusammenfassung von ESI-oTOF-MS-Experimenten (MICKEY im Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom), in welchen Bariumbromid aus Mischungen der Alkohole Ethanol, 1-Propanol und 1-Butanol (v.v 1:1) bei identischen Desolvatisierungsbedingungen und identischer Akkumulationsdauer analysiert wird. Zum Vergleich sind ebenfalls die entsprechenden Signalintensitäten mit dem Lösungsmittel Methanol unter den gewählten Bedingungen dargestellt. Während die Gesamtintensität des Ionensignals bei Variation einer Mischungskomponente nahezu unverändert bleibt, ist das relative Verhältnis der einzelnen Ionensignale zueinander dennoch deutlichen Veränderungen unterworfen.

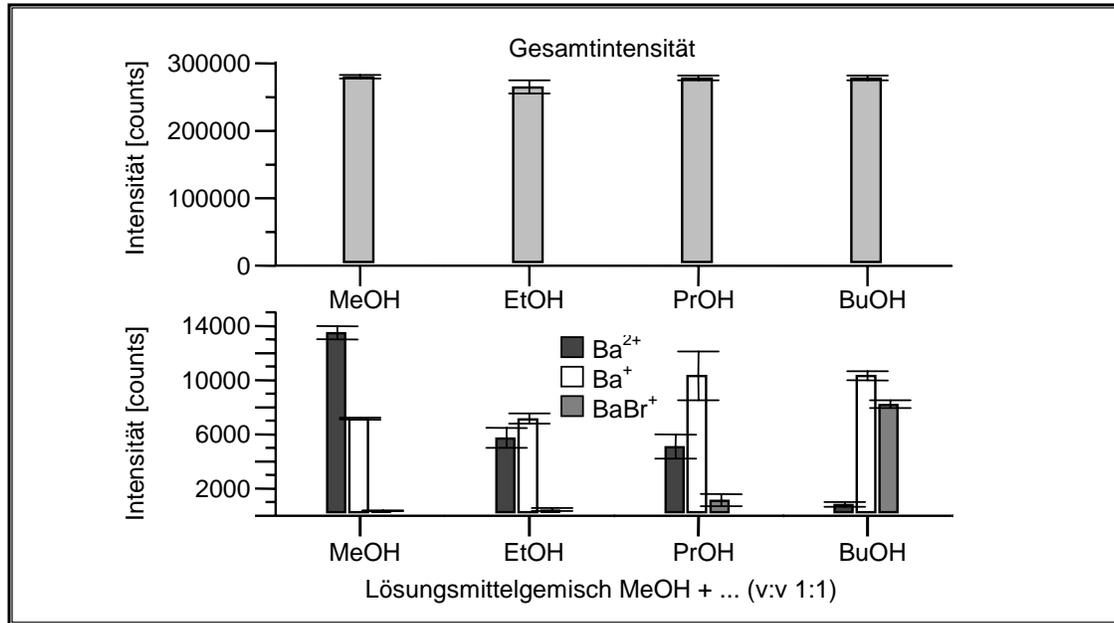


Abb. 8.3 Zusammenfassung von ESI-oTOF-MS-Analysen von Bariumbromid, $c = 10^{-4}$ mol/l in Mischungen aus Methanol und Ethanol, 1-Propanol bzw. 1-Butanol (v:v 1:1); Desolvatisierungsbedingungen: $U_{Bl} = 400$ V, $U_{noz} = 300$ V, $T_{noz} = 100^{\circ}\text{C}$; jeweils Mittelwert aus drei Einzelmessungen

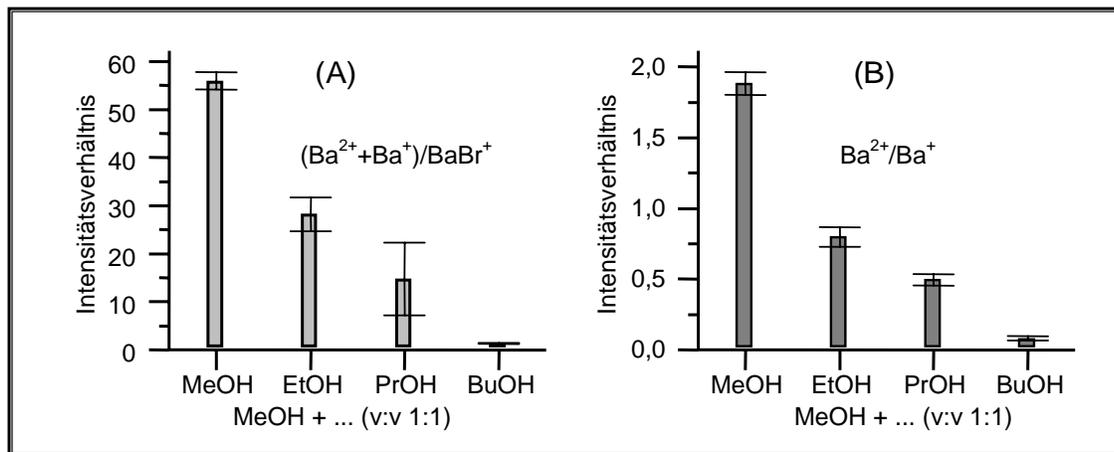


Abb. 8.4: Verhältnisse ausgewählter Signalintensitäten aus den in Abb. 8.3 zusammengefaßten Massenspektren von Bariumbromid in verschiedenen Alkohol-Mischungen. (A) $(\text{Ba}^{2+} + \text{Ba}^{+}) / \text{BaBr}^{+}$; (B) $\text{Ba}^{2+} / \text{Ba}^{+}$.

Die entsprechenden Intensitätsverhältnisse $(\text{Ba}^{2+} + \text{Ba}^{+}) / \text{BaBr}^{+}$ und $\text{Ba}^{2+} / \text{Ba}^{+}$ dieser Untersuchungsreihe sind in Abb. 8.4 A und Abb. 8.4 B zusammengestellt. Der Anteil der isolierten Bariumionen Ba^{2+} und Ba^{+} relativ zu BaBr^{+} (Abb. 8.4 A) nimmt demnach auch innerhalb dieser Reihe ab; allerdings sind gerade im Fall der Propanol/Methanol- und Butanol/Methanol-Mischung die Absolutwerte des Intensitätsverhältnisses erheblich höher als bei Verwendung der reinen Alkohole (vgl. Abb. 8.2 A). Einem ähnlichen Trend folgt das in Abb. 8.4 B dargestellte Intensitätsverhältnis $\text{Ba}^{2+} / \text{Ba}^{+}$, welches für die Mischungen mit

Propanol bzw. Butanol ebenfalls signifikant höhere Werte als im Fall der reinen Alkohole annimmt (vgl. Abb. 8.2).

Für eine weitere Untersuchungsreihe finden Mischungen aus Propanol und Wasser in verschiedenen prozentualen Anteilen Anwendung. Abb. 8.5 zeigt eine Zusammenfassung der ESI-oTOF-Analysen von Bariumbromid-Lösungen in den verschiedenen Propanol/Wasser-Mischungen. Um eine gute Zerstäubung der Analytlösung zu gewährleisten, beträgt der minimale Propanol-Gehalt der Mischungen in diesen Untersuchungsreihen 10 %. Der Vergleich zeigt, daß mit zunehmendem Anteil Propanol in der Mischung eine tendenziell höhere Gesamtintensität des Ionensignals resultiert, wobei ebenfalls die relative Intensität der einzelnen Signale Veränderungen unterliegt.

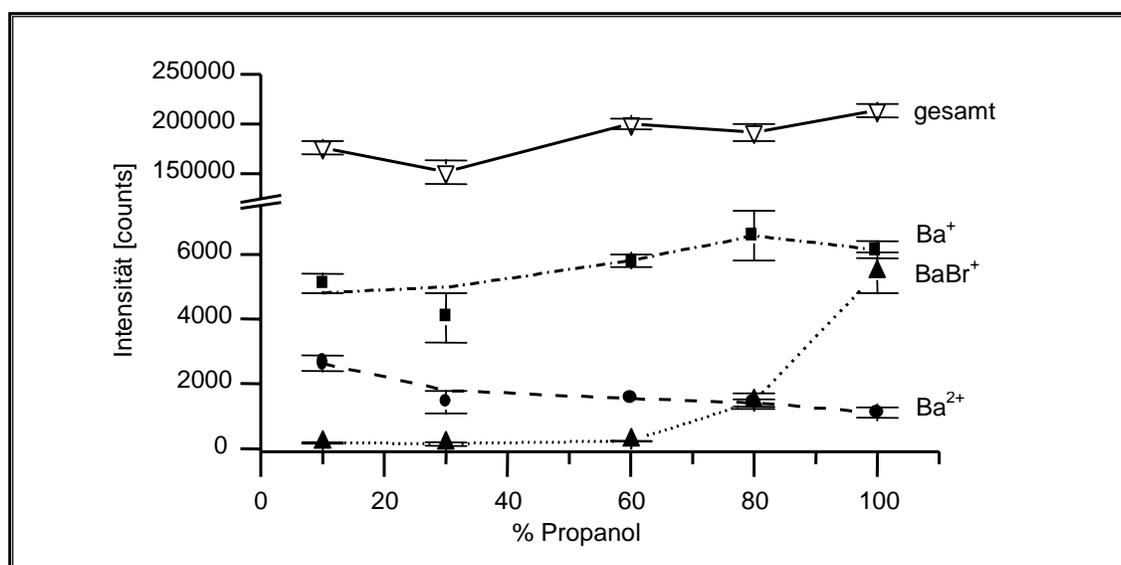


Abb. 8.5: Zusammenfassung von ESI-oTOF-MS-Analysen von Bariumbromid, $c = 10^{-4}$ mol/l in Mischungen aus Wasser und verschiedenen prozentualen Anteilen Propanol. Desolvatisierungsbedingungen: $U_{Bl} = 400$ V, $U_{noz} = 300$ V, $T_{noz} = 100^{\circ}\text{C}$.

Die Intensitätsverhältnisse ausgewählter Ionensignale sind in Abb. 8.6 A und Abb. 8.6 B gezeigt. Es ist ersichtlich, daß das Intensitätsverhältnis $(\text{Ba}^{2+} + \text{Ba}^+) / \text{BaBr}^+$ mit abnehmendem Propanolgehalt (und damit höherem Wassergehalt) erheblich höhere Werte annimmt, als sie bei Verwendung einer reinen Propanol-Lösung zu beobachten sind (Abb. 8.6 A). Demnach hat ein höherer Anteil von Wasser in der Mischung einen verstärkten Nachweis der isolierten Bariumionen relativ zum Clusterion BaBr^+ zur Folge. Das Intensitätsverhältnis $\text{Ba}^{2+} / \text{Ba}^+$ (Abb. 8.6 B) nimmt ferner mit zunehmendem Propanol-Anteil kontinuierlich ab.

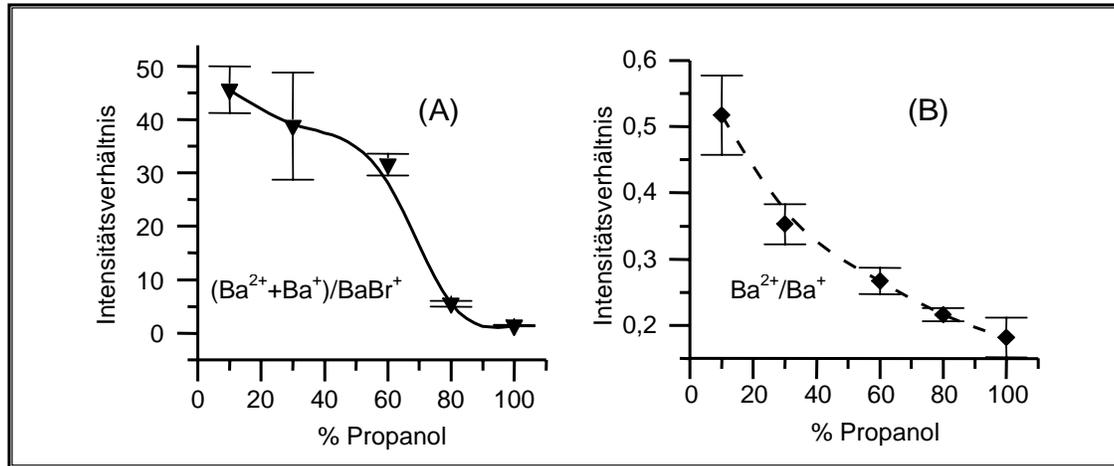


Abb. 8.6: Verhältnisse ausgewählter Signalintensitäten aus den in Abb. 8.5 zusammengefaßten Massenspektren von Bariumbromid in Mischungen aus Wasser und verschiedenen prozentualen Anteilen Propanol. (A) $(Ba^{2+}+Ba^+)/BaBr^+$; (B) Ba^{2+}/Ba^+ .

8.1.2. Variation der Desolvatisierungsbedingungen

Durch systematische Variation der Desolvatisierungsbedingungen soll der Einfluß der Eigenschaften eines Lösungsmittel auf sein Verhalten als Trägersubstanz im ESI-Prozeß untersucht werden. Hierzu finden Bariumbromidlösungen mit einer Konzentration von 10^{-4} mol/l in den Alkoholen Methanol, Ethanol, Propanol und Butanol Verwendung. Die Experimente werden am MICKEY im Aufbau mit geheizter Transferkapillare durchgeführt, in welchem der Eintrag thermischer Energie während des Desolvatisierungsprozesses einen empfindlichen Parameter darstellt.

Wird bei konstanter Potentialdifferenz zwischen Transferkapillare und Skimmer (350 V) die Temperatur der Transferkapillaren schrittweise erhöht, so ergeben sich für die verschiedenen Alkohole die in Abb. 8.7 zusammengefaßten Gesamtintensitäten des Ionensignals. Es ist deutlich zu erkennen, daß bei gegebener Potentialdifferenz zwischen Transferkapillare und erstem *skimmer* für jedes verwendete Lösungsmittel eine optimale Temperatur der Transferkapillare existiert, bei welcher ein Nachweis des gelösten Analyten mit maximaler Signalintensität erfolgt. Dabei nimmt die optimale Temperatur im Verlauf der Reihe Methanol – Ethanol – Propanol – Butanol immer höhere Werte an (vgl. Abb. 8.7).

Für alle untersuchten Alkohole nehmen die Intensitätsverhältnisse $(Ba^{2+}+Ba^+)/BaBr^+$ sowie Ba^{2+}/Ba^+ mit steigender Temperatur der Transferkapillaren ab (ohne Abbildung). Dies spiegelt, wie in Kap. 6.1.2 beschrieben, die verstärkte Desolvatisierung der Analyte und die damit verbundene verstärkte Aktivierung wider.

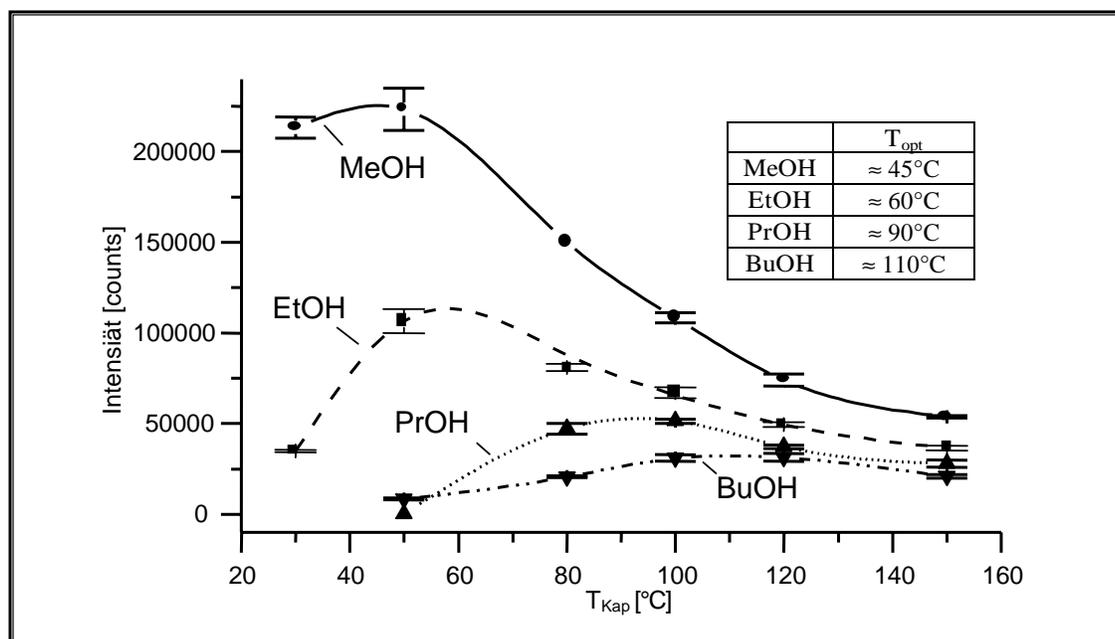


Abb. 8.7: Gesamtionensignal in ESI-oTOF-MS-Experimenten in Abhängigkeit der Transferkapillarentemperatur. Analyt: Bariumbromid, $c = 10^{-4}$ mol/l in den angegebenen Alkoholen. Desolvatisierungsparameter: $U_{Kap} = 350$ V, T_{Kap} variabel.

8.1.3. Der Einfluß des Analyten

Eine Überprüfung, in welcher Weise die Wechselwirkungen des Analyten mit dem Lösungsmittel die Desolvatisierung beeinflussen, soll anhand einer Mischung der Analyte Turanose und Octylglucosid erfolgen. Sowohl das Disaccharid Turanose als auch das modifizierte Saccarid Octylglucosid werden unter den Bedingungen der ESI-MS im positiven Ionenmodus im wesentlichen durch Anlagerung eines Na^+ ionisiert. Während das Octylglucosid allerdings aufgrund seines hydrophoben Octylrestes eine ausgeprägte Oberflächenaktivität in Lösung aufweist, ist Turanose ein hydrophiles Molekül ohne oberflächenaktive Eigenschaften.

Beide Substanzen liegen in einer Mischung aus Methanol und Wasser (v:v 1:1) mit Zusatz von 1 mM NaCl in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l vor. Die Massenspektren werden bei konstanter Potentialdifferenz zwischen Transferkapillare und erstem *skimmer* und variabler Temperatur der Transferkapillaren aufgenommen. Abb. 8.8 zeigt in einer Zusammenfassung die Intensitäten der Ionensignale von Turanose und Octylglucosid, die auf diese Weise detektiert werden können.

Der Vergleich macht deutlich, daß das Octylglucosid bei einer Temperatur der Transferkapillaren von etwa 120°C mit maximaler Signalintensität nachgewiesen werden kann. Im Fall der Turanose ist dagegen eine maximale Signalintensität erst bei deutlich höherer Temperatur, also verstärkter Desolvatisierung in der Transferkapillare, zu beobachten.

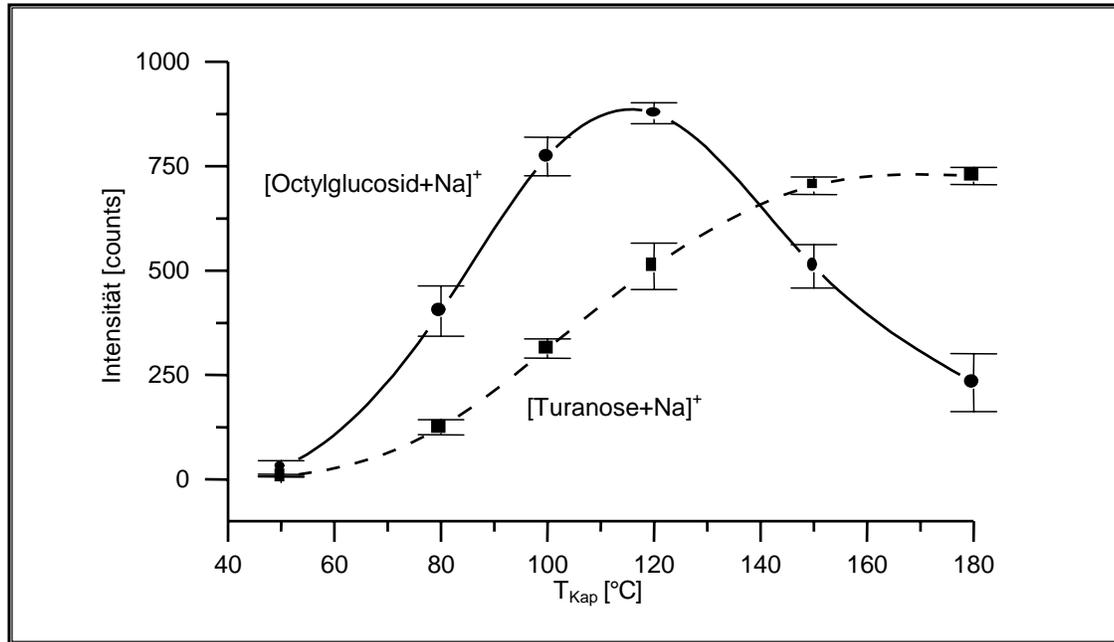


Abb. 8.8: Zusammenfassung der ESI-oTOF-MS-Untersuchungen (MICKEY im Aufbau mit geheizter Transferkapillare) einer Mischung aus Octylglucosid und Turanose (jeweils $c = 10^{-4}$ mol/l) in Methanol/Wasser (v:v 1:1) 0,1 mM NaCl. $U_{\text{Kap}} = 200$ V, T_{Kap} variabel.

8.2. Diskussion

8.2.1. Das Lösungsmittel als chemische Umgebung des Analyten

Werden bei der Untersuchung des Modellanalyten Bariumbromid die Eigenschaften des Lösungsmittels variiert, so weisen die resultierenden Massenspektren Unterschiede sowohl im Hinblick auf die insgesamt nachzuweisende Ionensignalintensität als auch bezüglich der Verhältnisse typischer Ionensignale auf. Die verwendeten Alkohole der homologen Reihe unterscheiden sich in ihren Eigenschaften erheblich (vgl. Tab. 8.1). Dies sollte zwar ausgeprägte Effekte im Hinblick auf die Veränderung der chemischen Umgebung bewirken, beeinflusst aber ebenfalls erheblich die Charakteristik des Systems während der Zerstäubung und Desolvatisierung.

Der in Lösung relevante Prozeß für den massenspektrometrischen Nachweis der ausgewählten Ionen stellt die elektrolytische Dissoziation des Salzes Bariumbromid dar ([Col93], [Wan96]). Diese erfolgt prinzipiell in zwei Schritten:



Wie in Kap. 3.1.3.2 erläutert, vermag ein Lösungsmittel die geladenen Produkte der Dissoziationsreaktionen um so besser zu stabilisieren, je polarer es ist. Die Polarität eines Lösungs-

mittels kann dabei durch seine Dielektrizitätskonstante beschrieben werden. Dieses Maß zugrundeliegend ist zu erwarten, daß in der Reihe der homologen Alkohole von Methanol bis 1-Butanol die Dissoziation des Bariumbromids zunehmend erschwert wird (vgl. Tab. 8.1). Damit enthält eine Lösung in 1-Butanol mehr BaBr^+ -Ionen und undissoziiertes BaBr_2 als es bei einem Lösungsmittel höherer Polarität der Fall ist. Als Konsequenzen der Veränderungen in der Dissoziation stehen zwei Aspekte zur Diskussion (vgl. [Wan96]):

- Eine 1-Butanol-Lösung enthält eine größere Anzahl BaBr^+ -Clusterionen relativ zu isolierten Ba^{2+} -Ionen als es bei Alkoholen mit höherer Dielektrizitätskonstanten gegeben ist. Mit der relativen Zunahme der BaBr^+ -Ionen in der Lösung steigt auch die Wahrscheinlichkeit eines massenspektrometrischen Nachweises dieser Spezies an. Als Konsequenz nimmt das Verhältnis $(\text{Ba}^{2+}+\text{Ba}^+)/\text{BaBr}^+$ in der Reihe Methanol – Ethanol – 1-Propanol – 1-Butanol ab.
- Aufgrund der verminderten Dissoziation des Analyten sollte eine 1-Butanol-Lösung insgesamt eine geringere Anzahl von Ladungsträgern enthalten, als es beispielsweise im Fall einer Methanol-Lösung gegeben ist. Demnach stehen vom Analyten Bariumbromid in einer alkoholischen Lösung prinzipiell um so weniger präformierte Ionen für die Analyse zur Verfügung, je geringer die Polarität des Lösungsmittels ist. Es ist somit denkbar, daß das insgesamt detektierbare Ionensignal in der homologen Reihe der Alkohole abnimmt.

Werden die Alkohole Ethanol, 1-Propanol und 1-Butanol in binären Mischungen mit Methanol als Lösungsmittel eingesetzt, so ist die resultierende Polarität des Lösungsmittels auf die Eigenschaften beider Mischungskomponenten zurückzuführen. Die Angabe eines Zahlenwerts in Form der Dielektrizitätskonstante ist für diese Mischungen nicht möglich; die Polarität einer Mischung sollte allerdings zwischen den Lösungsmittelpolaritäten der jeweiligen Mischungskomponenten liegen. Dies vermag die Beobachtung zu erklären, daß das Signalverhältnis $(\text{Ba}^{2+}+\text{Ba}^+)/\text{BaBr}^+$ in den binären Mischungen höhere Werte annimmt, als sie für die reinen Alkohole Ethanol, 1-Propanol und 1-Butanol beobachtet werden können (vgl. Abb. 8.2 und Abb. 8.4).

Es kann auf qualitativer Basis vorausgesetzt werden, daß die Polarität der Mischungen in der Reihenfolge Methanol/Ethanol – Methanol/1-Propanol – Methanol-1-Butanol abnimmt. Diese Annahme zugrundeliegend, ist auch in den untersuchten binären Alkohol-Mischungen mit abnehmender Lösungsmittelpolarität die Abnahme des Signalverhältnisses $(\text{Ba}^{2+}+\text{Ba}^+)/\text{BaBr}^+$ zu erklären. Die Mischungen unterscheiden sich in ihrer Polarität untereinander allerdings in geringerem Maße, als es bei den reinen alkoholischen Lösungen der Fall ist. Daher sind die

Veränderungen innerhalb der Reihe weniger ausgeprägt. Im Gegensatz zu den Untersuchungen der reinen alkoholischen Lösungen ist die Gesamtintensität des Ionensignals im Fall der binären Mischungen trotz veränderter Polarität annähernd konstant. Es ist daher zu folgern, daß in der Reihe der reinen alkoholischen Lösungen neben der verringerten Dissoziation des Bariumbromids noch ein weiterer Effekt für die Abnahme der Gesamtintensität des Ionensignals verantwortlich sein muß. Dieser Effekt kann nicht die veränderte chemische Umgebung des Analyten zur Ursache haben. Er muß vielmehr auf veränderte Eigenschaften des Lösungsmittels als Trägerkomponente zurückzuführen sein.

Im Fall der Lösungsmittelgemische aus 1-Propanol und Wasser in verschiedenen prozentualen Anteilen kann die Polarität der Mischungen ebenfalls für Veränderungen des Intensitätsverhältnisses $(\text{Ba}^{2+} + \text{Ba}^+)/\text{BaBr}^+$ verantwortlich gemacht werden. Die Mischungen sind um so polarer, je höher der Anteil der Mischungskomponente Wasser ist. Demnach nimmt die Dissoziation des Bariumbromids und damit das Intensitätsverhältnis $(\text{Ba}^{2+} + \text{Ba}^+)/\text{BaBr}^+$ mit steigendem Propanolanteil ab. Ferner ist zu beobachten, daß die Gesamtintensität des Ionensignals mit steigendem Propanolanteil der Mischung trotz verringerter Dissoziation tendenziell zunimmt. Dies unterstützt die bereits im Fall der binären Alkohol-Mischungen angestellte Folgerung, daß die Dissoziation des Analyten in Lösung nicht allein für die resultierende Gesamtintensität des Ionensignals verantwortlich sein kann.

8.2.2. *Das Lösungsmittel als Trägerkomponente*

Haben die Unterschiede in der Gesamtintensität des Ionensignals unterschiedliches Verhalten der Lösungsmittel als Trägersubstanz zur Ursache, so stellt sich die Frage, auf welche der spezifischen Lösungsmittelleigenschaften dies im wesentlichen zurückzuführen ist. Im Idealfall soll das Lösungsmittel vollständig vom Analyt verdampft sein, wenn dieses den Massenanalysator erreicht, um die Detektion vollständig desolvatisierter Analytionen zu ermöglichen. Ebenfalls ist von Relevanz, einen möglichst großen Anteil der ursprünglich in der Lösung vorhandenen Analytionen durch unsymmetrische Tropfenzerfallsereignisse (Bildung von *offspring droplets*) der massenspektrometrischen Analyse zuzuführen. Die Gesamtintensität des detektierbaren Ionensignals spiegelt in der Folge wider, in welchem Umfang die beiden Anforderungen durch das Lösungsmittel mit seinen charakteristischen Eigenschaften erfüllt werden.

In den in Abb. 8.1 vorgestellten Untersuchungsreihen weisen alle eingesetzten Lösungsmittel eine vergleichbare Oberflächenspannung auf (vgl. Tab. 8.1). Demnach können die erheblichen Unterschiede in der Gesamtintensität, wie sie im Fall der reinen Alkohole beobachtet

8. Der Einfluß des Lösungsmittels auf das resultierende Ionensignal in der ESI-MS

werden, nicht auf diese Lösungsmiteleigenschaft zurückzuführen sein. Die Lösungsmittel unterscheiden sich allerdings sowohl in ihrer Viskosität, ihrem Dampfdruck und ihrer Dielektrizitätskonstanten deutlich.

Der Vergleich mit den in Abb. 8.5 vorgestellten Resultaten der 1-Propanol/Wasser-Mischungen zeigt, daß der Viskosität der Lösung in den Untersuchungsreihen kein erheblicher Einfluß auf die Gesamtintensität zukommen kann. Die Lösungen weisen bei einem Mischungsverhältnis von 60 % Propanol und 40 % Wasser ein Viskositätsmaximum auf (vgl. Tab. 8.2). Dieser lokale Extremwert schlägt sich nicht signifikant in der beobachteten Gesamtintensität nieder (vgl. Abb. 8.5), obwohl die Unterschiede in der Viskosität der Mischungen vergleichbar mit denen der reinen Alkohole sind. Vielmehr ist zu beobachten, daß aus Lösungen mit geringerem 1-Propanol-Gehalt trotz niedrigerer Viskosität nur eine geringere Gesamtintensität des Ionensignals detektiert werden kann. Dies steht zunächst im Widerspruch zu den Resultaten von Guevremont et al., die am Beispiel von Ethylenglycol-Lösungen eine Abnahme der Gesamtintensität mit zunehmender Viskosität der Lösung beobachteten [Gue93]. Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Viskositäten der untersuchten Ethylenglycol-Lösungen dabei Veränderungen im Bereich einer Größenordnung unterworfen waren.

	% 1-Propanol in Wasser					
	0	10	30	60	80	100
Viskosität [Nsm ⁻²]	$1,03 \cdot 10^{-3}$	$1,59 \cdot 10^{-3}$	$2,62 \cdot 10^{-3}$	$3,14 \cdot 10^{-3}$	$2,79 \cdot 10^{-3}$	$2,26 \cdot 10^{-3}$

Tab. 8.2: Viskosität von 1-Propanol/Wasser-Mischungen (aus [CRC95])

Sowohl Dampfdruck als auch Dielektrizitätskonstante weisen allerdings einen erheblichen Einfluß auf die Intensität des detektierbaren Ionensignals auf. Die in Abb. 8.7 zusammengefaßten Resultate zeigen, daß bei gegebener Potentialdifferenz zwischen Transferkapillare und erstem *skimmer* für jedes der untersuchten Lösungsmittel eine optimale Temperatur der Transferkapillaren und damit ein optimales Ausmaß an Aktivierung zur Desolvatisierung existiert. Ist die Temperatur niedriger, so reicht der Energieeintrag offensichtlich nicht zur vollständigen Desolvatisierung der Ionen vor dem massenspektrometrischen Nachweis aus, so daß die resultierende Gesamtintensität geringer ist. Im Fall einer zu hohen Temperatur können Ionen dagegen bereits desolvatisiert vorliegen, bevor sie die erste Druckstufe vollständig durchlaufen haben. Stöße dieser Spezies mit Restgasmolekülen – oder im Extremfall mit der Innenwand der Transferkapillare – können dann zur Neutralisation der Ionen führen und eine geringere Gesamtintensität bewirken.

Der Vergleich der für die verschiedenen Alkohole ermittelten optimalen Transferkapillarentemperaturen macht deutlich, daß in der Reihe der Alkohole Methanol – Ethanol – 1-Propanol – 1-Butanol ein steigender Energieeintrag erforderlich ist, um den Analyten Bariumbromid zu desolvatisieren und detektieren. Wie in Kap. 3.1.2 beschrieben, bestimmen sowohl die Verdampfungsrate des Lösungsmittels als auch die Größe der initialen Tröpfchen, in welchem Ausmaß die zur Desolvatisierung relevanten *offspring droplets* gebildet werden können. Im Fall der untersuchten Alkohole treten dabei in beider Hinsicht Unterschiede auf.

- Aus den in Tab. 8.1 zusammengestellten Lösungsmiteleigenschaften geht hervor, daß der Dampfdruck der Alkohole bei gegebener Temperatur mit steigender Länge der Kohlenstoffkette abnimmt. Damit ist zu erwarten, daß ein initiales 1-Butanol-Tröpfchen eine deutlich längere Zeitspanne bis zum Erreichen des kritischen Radius am Rayleigh-Limit benötigt als ein initiales Methanol-Tröpfchen gleicher Größe. Soll die Verdampfungsrate aus einem 1-Butanol-Tröpfchen vergleichbare Werte zu einem Methanol-Tröpfchen annehmen, so muß dem 1-Butanol-Tröpfchen deutlich mehr Energie zugeführt werden.
- Der Radius der initialen Tröpfchen ist um so kleiner, je höher die Leitfähigkeit der Lösung bzw. je geringer die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels ist (vgl. Kap. 3.1.1, [Fer94]). In den vorgestellten Untersuchungsreihen besteht zwischen diesen Eigenschaften allerdings ein enger Zusammenhang. In einem wenig polaren Lösungsmittel wie 1-Butanol, das eine niedrige Dielektrizitätskonstante aufweist, ist von einem relativ geringen Dissoziationsgrad des Bariumbromids auszugehen, so daß die resultierende Leitfähigkeit der Lösung ebenfalls geringer ist (vgl. Kap. 8.2.1). Unter der Voraussetzung, daß zwischen den Leitfähigkeiten der verschiedenen Lösungen größere Unterschiede bestehen als zwischen den Werten der Dielektrizitätskonstanten, nimmt der Radius der initialen Tröpfchen in der Reihenfolge Methanol – Ethanol – 1-Propanol – 1-Butanol tendenziell zu. Mit zunehmendem Tropfenradius nimmt das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen des Tropfens ab, so daß die Verdampfung von Lösungsmittel zunehmend erschwert wird.

Die beiden vorgestellten Faktoren vermögen die Beobachtung zu erklären, daß die Gesamtintensität des Ionensignals bei Verwendung der reinen Alkohole mit zunehmender Länge der Kohlenstoffkette abnimmt. Dabei sollte die nachgewiesene Abnahme der Ionensignalintensität eine Folge beider Effekte sein.

Das Ausmaß der Aktivierung, die für eine optimale Desolvatisierung eines Analyten erforderlich ist, hängt ebenfalls von der Art des Analyten und seinen Wechselwirkungen mit

dem Lösungsmittel ab. Dies kann aus den in Abb. 8.8 zusammengefaßten Experimenten an Mischungen aus Octylglucosid und Turanose gefolgert werden. Bei gegebener Potentialdifferenz in der ersten Druckstufe wird das oberflächenaktive Octylglucosid bei einer niedrigeren Transferkapillarentemperatur optimal desolvatisiert, als sie im Fall der hydrophilen Turanose erforderlich ist. Als Grund für die Notwendigkeit einer verstärkten Aktivierung im Fall der Turanose sind zwei Phänomene zu diskutieren. Wie bereits in Kap. 3.1.2 beschrieben, erfolgt die Freisetzung von Analytionen prinzipiell aus Tröpfchen mit einem Radius in der Größenordnung von 10 nm. Diese kritische Tröpfchengröße wird unter Standard-Spraybedingungen erst nach einem erneuten Zerfall der *offspring droplets* der ersten Generation erreicht (vgl. Abb. 3.2; im dort vorgestellten Beispiel resultieren Tröpfchen mit $R = 13,9$ nm und $R = 1,4$ nm). Da während des unsymmetrischen Tropfenzerfalls bevorzugt Teilchen mit hoher Aufenthaltswahrscheinlichkeit an der Oberfläche in die *offspring droplets* gelangen [Keb97], sollte das Octylglucosid bevorzugt in die kleineren Tröpfchen gelangen, während die Turanose in den größeren Tröpfchen verbleibt. Demnach muß zur Desolvatisierung der Turanose prinzipiell mehr Lösungsmittel entfernt werden, als es im Fall des Octylglucosids erforderlich ist. Neben diesem Umstand, der eine verstärkte Aktivierung im Fall der Turanose erforderlich macht, ist ebenfalls die unmittelbare Wechselwirkung des Lösungsmittels mit dem Analyten zu berücksichtigen. Die im Lösungsmittelgemisch vorhandenen Wassermoleküle vermögen mit den OH-Gruppen der Analyte in Wechselwirkung zu treten. Das Disaccharid Turanose weist eine größere Anzahl von OH-Gruppen auf als das modifizierte Monosaccharid Octylglucosid, so daß die Turanose in stärkerem Maße solvatisiert vorliegt. Die stärkere Hydratisierung erfordert daher eine stärkere Aktivierung zur Desolvatisierung der Turanose.

8.2.3. *Das Lösungsmittel als Reaktionspartner in der Gasphase*

Zur Beurteilung der Eigenschaften des Lösungsmittels als Reaktionspartner in der Gasphase wird in den vorliegenden Untersuchungen das Verhältnis der Signale Ba^{2+}/Ba^{+} herangezogen. Die Faktoren, die sich auf den Wert des Signalverhältnisses auswirken, wurden bereits in Kap. 6.1.2.1 beschrieben.

Der Vergleich der zweiten Ionisierungsenergie des Bariums (10,0 eV [CRC95]) mit der Ionisierungsenergie aller verwendeten Lösungsmittel (vgl. Tab. 8.1) zeigt, daß während der Desolvatisierung des Analyten kein spontaner Elektronentransfer zwischen diesen Spezies zu erwarten ist. Aufgrund dieser Tatsache ist der Nachweis isolierter Ba^{2+} -Ionen in den Massenspektren generell möglich (vgl. Abb. 8.1). In den vorgestellten Untersuchungsreihen

liegt jedoch zwischen *nozzle* bzw. geheizter Transferkapillare und erstem *skimmer* eine hohe Potentialdifferenz an, so daß die Ionen beim Passieren der ersten Druckstufe in hohem Maße Stöße mit Restgasmolekülen unterlaufen. Das Restgas in der ersten Druckstufe besteht dabei sowohl aus Raumluft als auch aus Lösungsmitteldampf. Ein noch solvatisiertes Ba^{2+} -Ion sollte durch einen solchen Stoß bevorzugt neutrale Lösungsmittelmoleküle verlieren (vgl. [Bla90]). Trifft dagegen ein isoliertes Ba^{2+} -Ion auf ein Restgasmolekül, so kann eine Elektronentransferreaktion unter Bildung von Ba^+ ablaufen, sofern der Stoß ausreichend energiereich ist. Diese Vorgänge sind in Abb. 8.9 nochmals schematisch zusammengestellt.

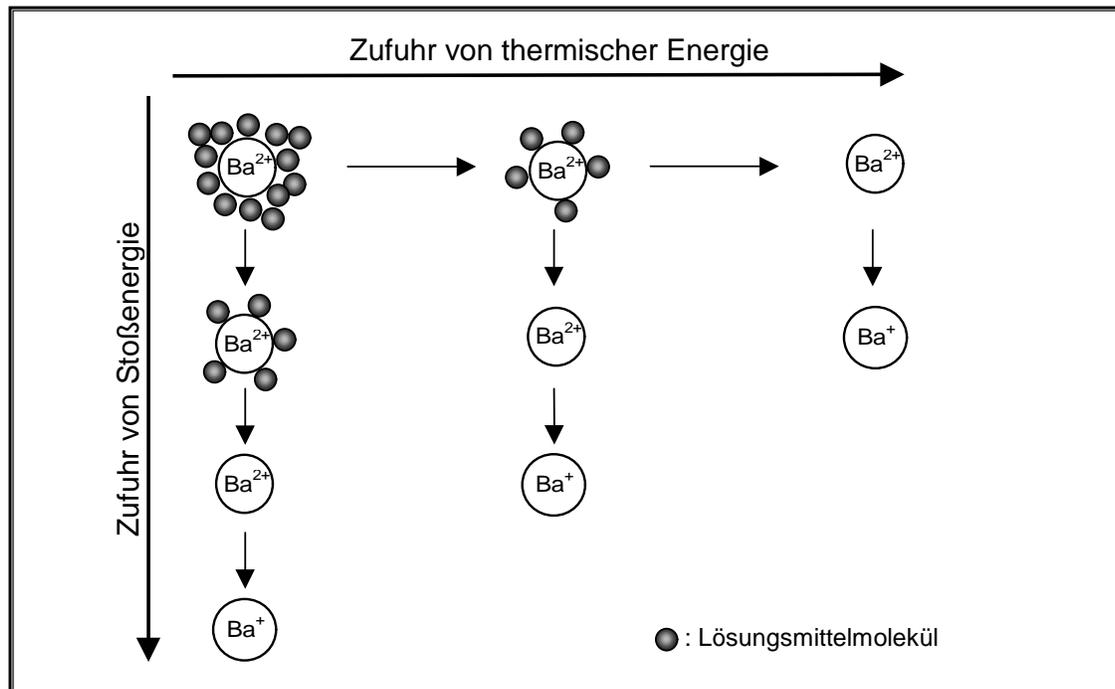


Abb. 8.9: Schematische Darstellung der Vorgänge bei Zufuhr von thermischer Energie und bei Stoßaktivierung. Durch Stoß kann Ba^{2+} zu Ba^+ reduziert werden; der Stoßpartner wird im Gegenzug oxidiert.

In den vorgestellten Untersuchungen ist das Verhältnis $\text{Ba}^{2+}/\text{Ba}^+$ bei Variation des Lösungsmittels erheblichen Veränderungen unterworfen (vgl. Abb. 8.2 B, Abb. 8.4 B, Abb. 8.6 B). Demnach muß die Bildung von Ba^+ im wesentlichen auf eine Reaktion von Ba^{2+} mit den Lösungsmittelmolekülen zurückzuführen sein. Im Fall der reinen Alkohole nimmt es in der Reihenfolge Methanol – Ethanol – 1-Propanol – 1-Butanol ab, was in erster Näherung mit der Abnahme der Ionisierungsenergien der Alkohole zu korrelieren ist. In der Reihe der 1-Propanol/Wasser-Mischungen nimmt das Signalverhältnis mit steigendem Gehalt von 1-Propanol ebenfalls ab, wobei 1-Propanol die Mischungskomponente mit niedrigerer Ionisierungsenergie darstellt. Die Unterschiede in der Ionisierungsenergie der verschiedenen Alkohole sind allerdings nur gering, so daß die Veränderung des Signalverhältnisses $\text{Ba}^{2+}/\text{Ba}^+$

noch weitere Ursachen haben sollte. Dabei ist zu berücksichtigen, daß das Ausmaß einer Stoßaktivierung von der Masse der Stoßpartner (und damit von der Masse der Restgasmoleküle) abhängig ist. Der Stoß eines Ba^{2+} -Ions mit einem 1-Butanol-Molekül ist somit energiereicher als der Stoß mit einem Methanol-Molekül. Bei Anwesenheit von 1-Butanol-Molekülen im Restgas wird somit ein Ba^{2+} -Ion mit höherer Wahrscheinlichkeit während der Passage der ersten Druckstufe reduziert, als es bei Anwesenheit von Methanol-Molekülen gegeben ist.

Auffällig ist in den vorgestellten Untersuchungsreihen, daß keine Signale der oxidierten Alkohole (in Form von $\text{R-OH}^{\cdot+}$) in den Massenspektren nachgewiesen werden können. Dies steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Kohler et al. [Koh97a], die bei der MS^2 -Analyse von solvatisierten zweiwertigen Metallkationen M^{2+} zwar das reduzierte M^+ -Ion, aber kein oxidiertes Reaktionsprodukt nachweisen konnten. Zur Erklärung wurde von Kohler et al. vorgeschlagen, daß der betreffende Alkohol zunächst unter Übertragung von OH^- auf das Kation fragmentiert und erst im Anschluß ein Elektronentransfer zwischen Hydroxylion und Metallkation stattfindet.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Untersuchungen, daß zwischen den Eigenschaften des Lösungsmittels und dem resultierenden Ionensignal komplexe Zusammenhänge herrschen. Die Beurteilung des Lösungsmiteleinflusses wird dabei durch den Umstand erschwert, daß mit der Variation des Lösungsmittels stets eine ganze Reihe von Eigenschaften verändert werden. Dies führt unter Umständen zu erheblichen Unterschieden im Hinblick auf die chemische Umgebung des Analyten in Lösung, auf die Rolle des Lösungsmittels als Trägerkomponente und auf dessen Rolle als Reaktionspartner in der Gasphase.

In Analogie zu den von Wang und Cole für diquarternäre Ammoniumverbindungen vorgestellten Resultaten [Wan96] zeigt sich, daß auch bei der ESI-MS von mehrwertigen Metallkationen mehr Clusterionen nachgewiesen werden können, wenn die Polarität des Lösungsmittels gering ist. Die Gesamtintensität des detektierbaren Ionensignals hängt allerdings nicht nur von der Anzahl der verfügbaren Analytionen ab, welche durch das Dissoziationsgleichgewicht in Lösung festgelegt wird. Sie ist vielmehr deutlich von den Eigenschaften des Lösungsmittels als Trägerkomponente des Analyten abhängig. Hierfür sind in erster Linie die Leitfähigkeit der Lösung sowie die Verdampfbarkeit des Lösungsmittels verantwortlich (vgl. Kap. 3.1.1 und Kap. 3.1.2). Eine Abhängigkeit von der Viskosität des Lösungsmittels konnte in den untersuchten Systemen jedoch nicht nachgewiesen werden.

9. ESI-MS-UNTERSUCHUNGEN ZUR DIMERISIERUNG VON GRAMICIDIN D

Auf der Basis der in den vorhergehenden Kapiteln vorgestellten Erkenntnisse zum grundsätzlichen Einfluß von Lösungsmitteln auf das Ionensignal in der ESI-MS soll im folgenden Abschnitt der Einfluß des Lösungsmittels auf einen speziellen Analyten untersucht werden. Als Modellsystem dienen die verschiedenen Peptidvarianten des Peptidgemischs Gramacidin D. Diese Peptide bilden in Lösung nicht-kovalent gebundene Dimere, deren Charakteristika in Kap. 9.1 beschrieben werden.

9.1. Die Peptidmischung Gramacidin D

Die Peptidmischung Gramacidin D, isoliert aus *Bacillus brevis*, setzt sich aus insgesamt sechs verschiedenen Komponenten zusammen, welche sich in den Aminosäuren in den Positionen 1 und 11 unterscheiden (vgl. Abb. 9.1). Die Sequenz dieser linearen Peptide zeichnet sich durch unpolare Aminosäuren aus, die alternierend D- oder L-konfiguriert sind; C- und N-Terminus sind in Form von Amiden modifiziert. Aufgrund ihrer überwiegenden unpolaren Eigenschaften sind die Peptide in Wasser unlöslich, können aber in organischen Lösungsmitteln gelöst werden (vgl. [Röm95]).

$\text{OHC}-\text{X}_1-\text{Gly}-\text{L-Ala}-\text{D-Leu}-\text{L-Ala}-\text{D-Val}-\text{L-Val}-\text{D-Val}-\text{L-Trp}-\text{D-Leu}$ $\begin{array}{c} \\ \text{Y}_{11} \\ \end{array}$ $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}-\text{L-Trp}-\text{D-Leu}-\text{L-Trp}-\text{D-Leu}$					
	Symbol	M_{mono}	X_1	Y_{11}	Anteil
Valin-Gramacidin A	A	1881,07 Da	Val	Trp	80 %
Isoleucin-Gramacidin A	A*	1895,09 Da	Ile	Trp	
Valin-Gramacidin B	B	1842,06 Da	Val	Phe	5 %
Isoleuchin-Gramacidin B	B*	1856,08 Da	Ile	Phe	
Valin-Gramacidin C	C	1558,05 Da	Val	Tyr	15 %
Isoleucin-Gramacidin C	C*	1872,07 Da	Ile	Tyr	

Abb. 9.1: Die verschiedenen Bestandteile der Peptidmischung Gramacidin D. Sequenz nach [Röm95] und [Mer89]; Anteil der Komponenten in der Mischung aus [Sal98]; monoisotopische Massen ermittelt mit dem IsoPro Isotopic Abundance Calculator V. 2.1 anhand der Summenformeln.

Die biologische Bedeutung des Membranpeptids Gramacidin liegt in dessen antibiotischer Wirkung, wobei die Konformation des Gramacidins einen entscheidenden Einfluß auf die funktionellen Aktivitäten aufweist (vgl. [Kil92]). Die Struktur von Gramacidin, insbesondere der Hauptkomponente Gramacidin A, wurde in der Vergangenheit bereits intensiv untersucht.

Eine Funktion des Gramicidins ist die Ausbildung von Ionenkanälen durch biologische Membranen, welche den Transport einwertiger Metallkationen durch die Lipiddoppelschicht ermöglichen. In dieser Funktion liegt Gramicidin als Dimer in der sogenannten „Kanal-Konformation“ vor, in der die N-Termini zweier Peptid-Monomere (jeweils in helikaler Konformation) miteinander wechselwirken. Die hydrophoben Seitenketten der Aminosäurereste sind nach außen gerichtet und ermöglichen so die Inkorporation des Dimers in die Lipiddoppelschicht; der Ionentransport erfolgt durch das hydrophile Innere der Helices (vgl. [Kil92]). Eine schematische Darstellung des Gramicidin A-Dimers in der Kanal-Konformation findet sich in Abb. 9.2.



Abb. 9.2: Das Gramicidin A-Dimer in der Kanal-Konformation^[1].

In organischen Lösungsmitteln ist ebenfalls die Dimerisierung von Gramicidin zu beobachten, wobei diese Reaktion durch unpolare Lösungsmittel begünstigt wird. Dies konnte experimentell durch Zirkulardichroismus und Fluoreszenzmessungen (z.B. [Vea74a]) bzw. HPSEC-Studien (*high-performance size-exclusion chromatography*) [Sal97] an Gramicidin A gezeigt werden. So enthält eine Lösung von Gramicidin A in Dimethylsulfoxid bei einer Konzentration von 100 mg/ml ($\approx 2,6 \cdot 10^{-2}$ mol/l bezogen auf das Dimer) zu 70 – 80 % die Peptid-Monomere. In einer methanolischen Lösung gleicher Konzentration liegen dagegen bereits zu 80 % Dimere vor [Vea74a]. Die Bildung von Dimeren G_2 aus den Monomeren G erfolgt in einer Gleichgewichtsreaktion gemäß:



¹ Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>); RasWin Molecular Graphics V. 2.6 - Darstellung

Die Gleichgewichtskonstante der Reaktion ist dabei von der Polarität des verwendeten Lösungsmittels abhängig; sie wurde für Gramacidin A in Methanol zu $2 \cdot 10^2$ l/mol und in Ethanol zu $3 \cdot 10^4$ l/mol bestimmt [Vea74a].

In organischen Lösungsmitteln liegen die Gramacidin-Dimere vorwiegend in der „Poren-Konformation“ vor, in welcher die Peptid-Einheiten einen antiparallelen helikalen Doppelstrang ausbilden ([Vea74], [Fos74]). Wie durch Röntgenstrukturanalyse an Gramacidin-Cäsium-Komplexen gezeigt werden konnte, wird die Pore durch 28 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Untereinheiten stabilisiert. Der Innendurchmesser wurde zu 490 pm bestimmt, so daß das Dimer auch in dieser Konformation zur Aufnahme von Kationen in der Lage ist [Wal88].

Massenspektrometrische Untersuchungen zur Dimerisierung von Gramacidin wurden bereits mit Hilfe des LILBID-Verfahrens (*laser induced liquid beam ionization/desorption*) vorgenommen (vgl. [Pfe95], [Kle96], [Kle96a], [Kle96b]). Es konnte gezeigt werden, daß die nicht-kovalent gebundenen Dimere bei nicht zu starkem Energieeintrag intakt in die Gasphase überführt und im Anschluß detektiert werden können. Ferner spiegeln die LILBID-Massenspektren qualitativ die Lage des Dimerisierungsgleichgewichts in Lösung wider, wie durch Untersuchungen an verschiedenen Alkoholen und an Gramacidin-Lösungen verschiedener Konzentrationen nachgewiesen wurde. Auch mit Hilfe der ESI-MS können intakte Gramacidin-Dimere nachgewiesen werden, wobei der Anteil der Dimere im Massenspektrum die Verhältnisse in Lösung reflektiert [Bou00].

9.2. Ergebnisse

Wie in der in Abb. 9.1 dargestellten Aminosäuresequenz der verschiedenen Gramacidin-Arten zu erkennen ist, weisen die Peptide keine basischen Gruppen auf, so daß unter den Bedingungen der ESI-MS keine Protonierung dieser Spezies erfolgt. Um eine Kationisierung der Analyte durch Na^+ zu ermöglichen, wurde den untersuchten Analytlösungen NaCl in einer Konzentration von 10^{-3} bis 10^{-2} mol/l zugesetzt. Die Analyse erfolgte unter Verwendung der Standard-Sprayquelle am MARINER, wobei zur Desolvatisierung der Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom oder alternativ der Aufbau mit geheizter Transferkapillare eingesetzt wurden.

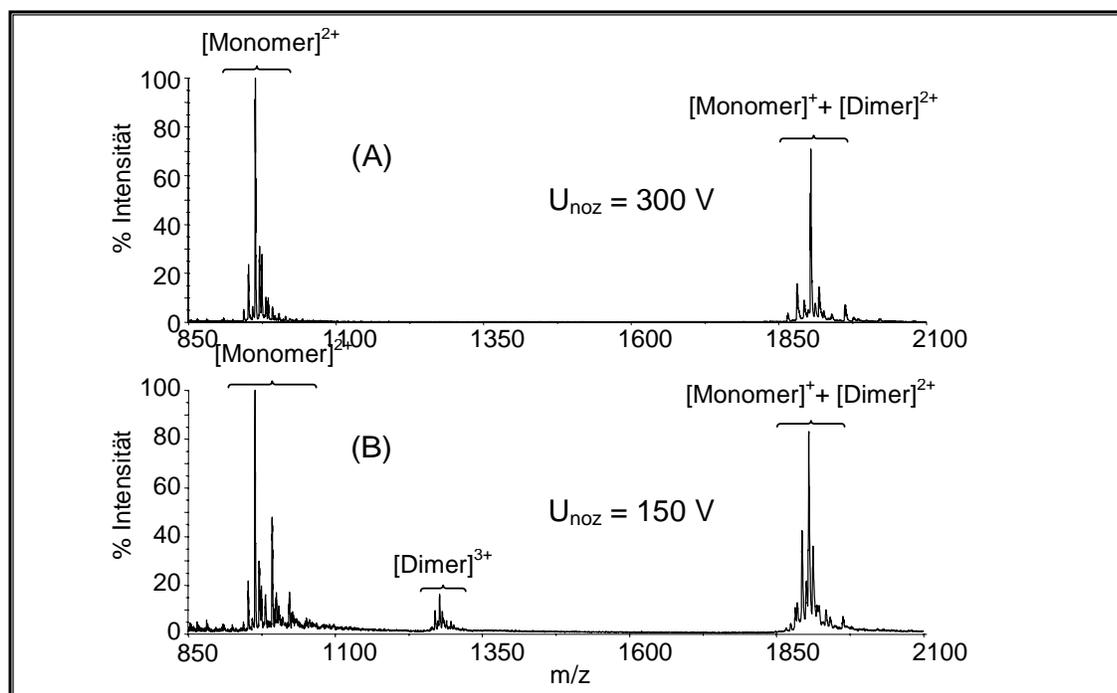


Abb. 9.3: ESI-oTOF-Massenspektren (MARINER mit geheiztem Stickstoffgegenstrom) von Gramicidin D, $c = 2 \cdot 10^{-5}$ mol/l in 2-Propanol. A) $U_{\text{noz}} = 300$ V; B) $U_{\text{noz}} = 150$ V.

Die resultierenden Massenspektren der Analyse von Gramicidin D sind empfindlich vom Ausmaß der Aktivierung während der Desolvatisierung abhängig. Wie in Abb. 9.3 A am Beispiel einer Gramicidin D-Lösung ($c = 2 \cdot 10^{-5}$ mol/l in 2-Propanol) ^[1] gezeigt, sind bei starker Aktivierung des Analyten während der Desolvatisierung ($U_{\text{noz}} = 300$ V) im wesentlichen die Signale der natriumangelagerten Peptid-Monomere und weiteren Anlagerungen von NaCl an die Analytionen zu erkennen. Die beobachteten Isotopenabstände weisen ferner die Signalgruppe von 850 – 1000 Thomson als Analytionen im Ladungszustand +2 aus, während die Signalgruppe im Bereich von 1850 – 2000 Thomson im wesentlichen durch Peptid-Monomere im Ladungszustand +1 gebildet wird. Unter schonenderen Desolvatisierungsbedingungen ^[2] kann dagegen eine weitere Signalgruppe beobachtet werden, welche durch dreifach natriumangelagerte Dimere gebildet wird (Abb. 9.3 B; Zuordnung der Signale vgl. Tab. 9.1). Die Signalgruppe von 850 – 1000 Thomson entspricht wie im Fall stärkerer Aktivierung den Peptid-Monomeren im Ladungszustand +2. Deutliche Veränderungen sind allerdings in der Signalgruppe von 1850 – 2000 Thomson zu beobachten, denn neben den Signalen der einfach natriumangelagerten Monomere werden nun ebenfalls zweifach natriumangelagerte Dimere detektiert. Die entsprechend vergrößerten Ausschnitte aus den in

¹ Alle angegebenen Analytkonzentrationen beziehen sich auf die Konzentration der Monomere.

² Die Desolvatisierungsbedingungen wurden auf eine maximale Signalintensität der Dimere bei insgesamt gutem Signal/Rauschen-Verhältnis der Spektren optimiert.

Abb. 9.3 A und Abb. 9.3 B dargestellten Massenspektren sind zum Vergleich nochmals in Abb. 9.4 gegenübergestellt.

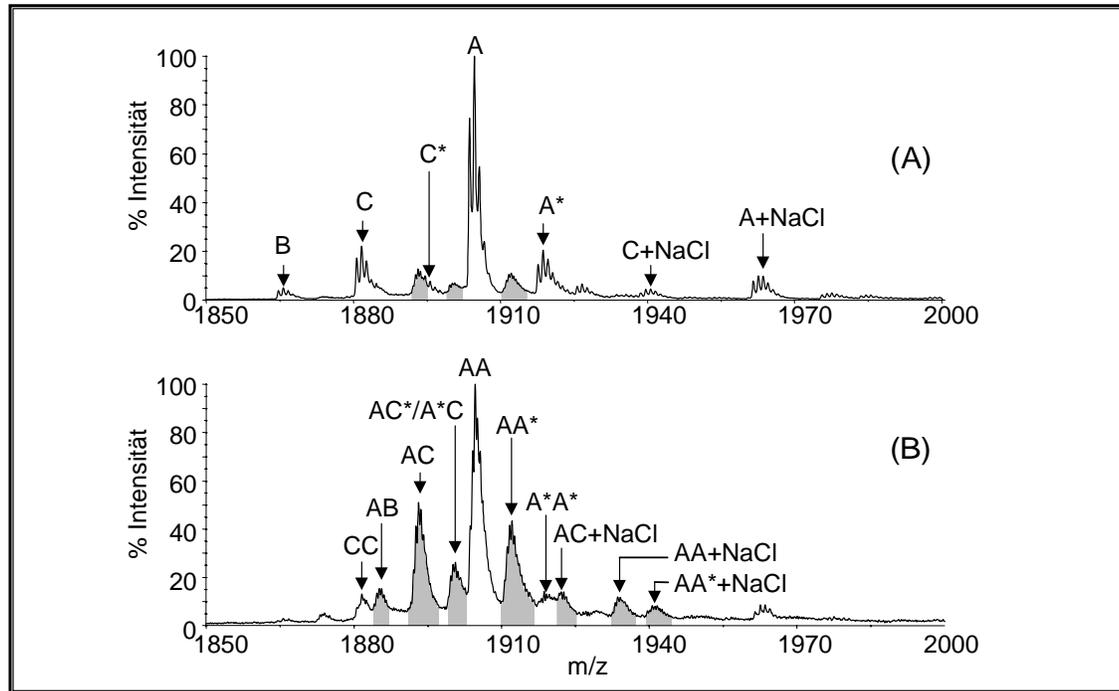


Abb. 9.4: Vergrößerte Darstellung des m/z -Bereichs 1850 – 2000 aus Abb. 9.3. A) $U_{noz} = 300$ V, Beschriftung der einfach natriumangelagerten Ionen; B) $U_{noz} = 150$ V, Beschriftung der zweifach natriumangelagerten Ionen. Die Signale der gemischten Dimere sind grau unterlegt.

Wie in Abb. 9.4 A deutlich zu erkennen ist, tritt bei der Analyse des Peptidgemischs die Hauptkomponente Gramacidin A als natriumangelagertes Molekülion ebenfalls in dominanter Signalintensität in den Massenspektren auf. Weitere Signale entsprechen den Komponenten A*, B, C und C*; Signale des Gramacidin B* können dagegen nicht detektiert werden. Neben den Signalen der Ionen im Ladungszustand +1 sind noch weitere Signale mit schwacher Intensität zu beobachten, die gemischten Dimeren im Ladungszustand +2 entsprechen (grau unterlegt). Unter schonenderen Desolvatisierungsbedingungen nimmt die Intensität dieser Signale gemischter Dimere deutlich zu (Abb. 9.4 B). Ferner kann an den anderen Signalen nicht mehr die Isotopenverteilung des Ladungszustands +1 erkannt werden, so daß auch diese Signale vermutlich zu einem hohen Anteil aus zweifach geladenen homogenen Dimeren resultieren.

Die Signale homogener Dimere im Ladungszustand +2 können unter Umständen von Signalen der Monomere im Ladungszustand +1 überlagert sein, so daß ein eindeutiger Nachweis dieser Dimere nur anhand des beobachteten Isotopenabstands erfolgen kann. Der Nachweis geringer Anteile Dimere wird somit durch die Auflösung des Massenanalysators

9. ESI-MS-Untersuchungen zur Dimerisierung von Gramacidin D

begrenzt. Dahingegen ermöglichen es die gemischten Gramacidin-Dimere, auch geringe Anteile von Gramacidin-Dimeren in den Massenpektren zuverlässig nachzuweisen. Die Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf die Dimerisierung von Gramacidin D soll daher im folgenden anhand dieser gemischten Dimeren-Signale erfolgen.

m/z [Thomson]	Ladungs- zustand	Zuordnung	m/z [Thomson]	Ladungs- zustand	Zuordnung
944,6	+2	[B+2Na] ²⁺	1865,9	+1	[B+Na] ⁺
952,5	+2	[C+2Na] ²⁺	1881,9	+1	[C+Na] ⁺
964,0	+2	[A+2Na] ²⁺		+2	[CC+2Na] ²⁺
971,0	+2	[A*+2Na] ²⁺	1885,6	+2	[AB+2Na] ²⁺
982,0	+2	[C+3Na+Cl] ²⁺	1893,5	+2	[AC+2Na] ²⁺
993,0	+2	[A+3Na+Cl] ²⁺	1901,0	+2	[AC*+2Na] ²⁺
1000,5	+2	[A*+3Na+Cl] ²⁺			[A*C+2Na] ²⁺
			1905,1	+1	[A+Na] ⁺
1262,2	+3	[CC+3Na] ³⁺		+2	[AA+2Na] ²⁺
1264,7	+3	[AB+3Na] ³⁺	1912,5	+2	[AA*+2Na] ²⁺
1270,0	+3	[AC+3Na] ³⁺	1918,8	+1	[A*+Na] ⁺
1274,7	+3	[AC*+3Na] ³⁺		+2	[A*A*+2Na] ²⁺
		[A*C+3Na] ³⁺	1922,0	+2	[AC+3Na+Cl] ²⁺
1277,7	+3	[AA+3Na] ³⁺	1934,0	+2	[AA+3Na+Cl] ²⁺
1282,3	+3	[AA*+3Na] ³⁺	1940,6	+1	[C+2Na+Cl] ⁺
			1941,0	+2	[AA*+3Na+Cl] ²⁺

Tab. 9.1 Zuordnung der resultierenden Signale (mittlere Masse) für die Untersuchung von Gramacidin D, $c = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ in 2-Propanol unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen (vgl. Abb. 9.3 B). Die gemischten Dimere im Ladungszustand +2 sind grau unterlegt.

9.2.1. ESI-MS-Analyse von Gramacidin D in verschiedenen Alkoholen

Der Einfluß des Lösungsmittels auf den Nachweis von Gramacidin-Dimeren in der ESI-MS soll anhand von Lösungen des Analyten in den Alkoholen Methanol, Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol und 1-Butanol untersucht werden. Als Maß für die Verdampfbarkeit dieser Lösungsmittel ist ihr Dampfdruck bei einer Temperatur von 50°C in Tab. 9.2 zusammengestellt. Die Polarität der Lösungsmittel soll anhand zweier Größen beurteilt werden, deren Werte sich ebenfalls in Tab. 9.2 finden:

- die Dielektrizitätskonstante, welche ein Maß für die makroskopische Polarität eines Lösungsmittels darstellt.

- der empirische, dimensionlose E_T^N -Parameter ^[1], der die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und Gelöstem auf mikroskopischer Basis berücksichtigt (eine Übersicht liefert beispielsweise Reichardt [Rei97]).

	Dielektrizitätskonstante ^(a)	$E_T^{N(b)}$	Dampfdruck bei 50°C [kPa] ^(a)
Methanol	32,6	0,7654	55,5
Ethanol	24,3	0,6543	29,5
1-Propanol	20,1	0,6173	12,2
2-Propanol	18,3	0,5525	23,9
1-Butanol	17,8	0,6019	4,5

Tab. 9.2: Einige Eigenschaften der verwendeten Lösungsmittel. ^(a) [CRC95], ^(b) [Rei69]

Bei der ESI-MS-Analyse zeigt sich, daß bei gegebenen Desolvatisierungsbedingungen die Gesamtintensität des Ionensignals in der Reihe Methanol – Ethanol – 2-Propanol – 1-Propanol – 1-Butanol abnimmt (ohne Abbildung). Ferner unterscheiden sich die resultierenden Massenspektren in den beobachteten Ladungszuständen der Analyte. Die relativen Signalintensitäten (auf das Signal mit der höchsten Intensität normiert), die für die verschiedenen Signalgruppen aus $[\text{Monomer}]^{2+}$, $[\text{Dimer}]^{3+}$ und $[\text{Monomer}]^+$ bzw. $[\text{Dimer}]^{2+}$ beobachtet werden, sind in Tab. 9.3 zusammengestellt. Jede Signalgruppe wird hierbei durch das Signal mit höchster Intensität repräsentiert. Signale entsprechend den einfach geladenen Gramicidin-Dimeren $[\text{Dimer}]^+$ können im Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom bei keinem der verwendeten Lösungsmittel detektiert werden.

	$[\text{Monomer}]^{2+}$ $[\text{A}+2\text{Na}]^{2+}$	$[\text{Dimer}]^{3+}$ $[\text{AA}+3\text{Na}]^{3+}$	$[\text{Monomer}]^+ + [\text{Dimer}]^{2+}$ $[\text{A}+\text{Na}]^+ + [\text{AA}+2\text{Na}]^{2+}$
Methanol	100 %	-	ca. 5 %
Ethanol	100 %	ca. 15 %	ca. 5 %
1-Propanol	100 %	< 5 %	ca. 25 %
2-Propanol	100 %	ca. 20 %	ca. 80 %
1-Butanol	100 %	ca. 10 %	ca. 85 %

Tab. 9.3: Relative Signalintensitäten (normiert auf das Signal $[\text{A}+2\text{Na}]^{2+}$) bei Untersuchung von Gramicidin D, $c = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ in verschiedenen Lösungsmitteln.

Die Massenspektren, die bei Verwendung der verschiedenen Alkohole resultieren, weisen Unterschiede innerhalb der von $[\text{Monomer}]^+$ bzw. $[\text{Dimer}]^{2+}$ gebildeten Signalgruppen auf. Der jeweils entsprechende Massenbereich von 1850 – 2000 Thomson ist in Abb. 9.5 A bis E dargestellt, wobei die Signale der detektierten gemischten Dimere grau unterlegt sind.

¹ Die Lösungsmittelpolarität wird empirisch anhand der UV/Vis-Absorptionsbanden gelöster Indikatorfarbstoffe ermittelt. Dem polaren Lösungsmittel Wasser wird auf der dimensionslosen E_T^N -Skala der Wert 1,000 zugeordnet; dem unpolaren Tetramethylsilan der Wert 0,000. Experimentell ermittelte Polaritäten anderer Lösungsmittel werden auf diese Werte normiert angegeben.

9. ESI-MS-Untersuchungen zur Dimerisierung von Gramicidin D

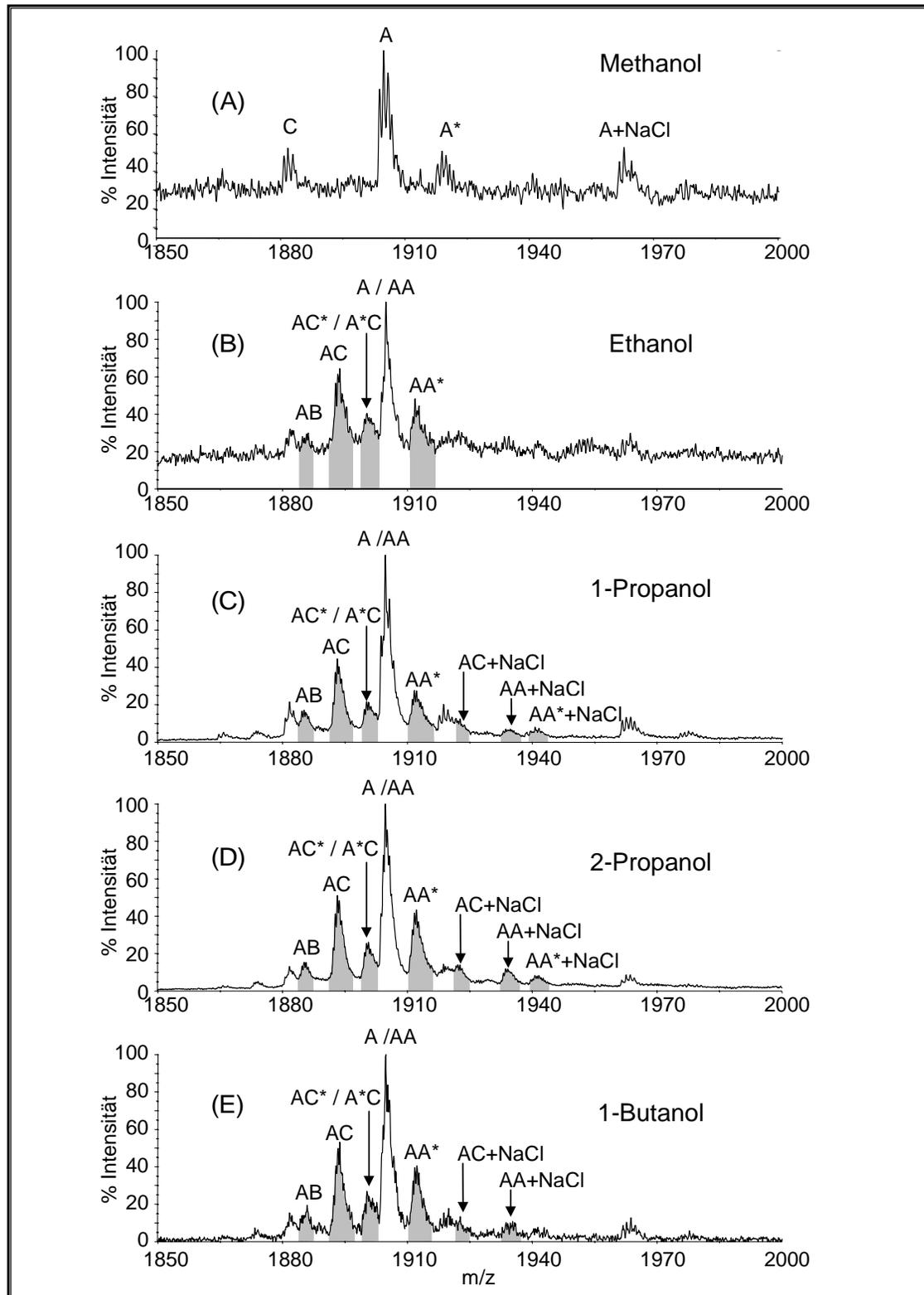


Abb. 9.5: ESI-oTOF-Massenspektren (MARINER mit geheiztem Stickstoffgegenstrom) von Gramicidin D, $c = 10^{-5} \text{ mol/l}$ in verschiedenen Alkoholen, $U_{\text{noz}} = 150 \text{ V}$; A) Methanol; B) Ethanol; C) 1-Propanol; D) 2-Propanol; E) 1-Butanol.

Es ist zu erkennen, daß mit Ausnahme der Methanol-Lösung aus allen untersuchten Lösungsmitteln gemischte Gramacidin-Dimere detektiert werden können. Im Fall der Methanol-Lösung sind dagegen Signale der Monomere im Ladungszustand +1 anhand der Isotopenabstände eindeutig zu identifizieren. Bei Verwendung der Lösungsmittel Methanol und Ethanol ist die Intensität der Signalgruppe $[\text{Monomer}]^+$ bzw. $[\text{Dimer}]^{2+}$ relativ zum Signal $[\text{Monomer}]^{2+}$ gering (vgl. Tab. 9.3), so daß die in Abb. 9.5 dargestellten Ausschnitte ein relativ geringes Signal/Rauschen-Verhältnis aufweisen. Die relative Signalintensität der gemischten Dimere im Vergleich zu den homogenen Dimeren bzw. einfach geladenen Monomeren ist für die Alkohole Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol und 1-Butanol allerdings nahezu identisch.

9.2.2. Gramacidin D in Lösungsmittelgemischen

Am Beispiel von Gramacidin-Dimeren in Lösungsmittelgemischen soll untersucht werden, ob Veränderungen der Lösungsmittelzusammensetzung während der Desolvatisierung des Analyten einen Einfluß auf die Dimerisierung von Gramacidin D ausüben. Während der Desolvatisierung sollte aus einer Lösungsmittelmischung zunächst die leichter flüchtige Komponente verdampfen, so daß die Lösungsmittelpolarität in den Tröpfchen im Laufe der Zeit vermehrt durch die schwerer flüchtige Komponente bestimmt wird. Dies konnte von Zhou et al. ebenfalls experimentell mit Hilfe von Lösungen eines solvatochromen Farbstoffs ermittelt werden [Zho00].

Da die Dimerisierung von Gramacidin D empfindlich von der Polarität des Lösungsmittels abhängig ist, könnte diese Reaktion eine mögliche Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung in den Tröpfchen widerspiegeln. Um diese Fragestellung zu überprüfen, dienen als Lösungsmittelsysteme binäre Mischungen aus 1,2-Propanol/2-Propanol und Methanol/2-Propanol (v:v 1:1). Die Dielektrizitätskonstante der reinen Lösungsmittel als Maß für die Polarität und ihr Dampfdruck bei einer Temperatur von 50°C als Maß für die Verdampfbarkeit sind in Tab. 9.1 zusammengestellt.

	Dielektrizitätskonstante	Dampfdruck bei 50°C [kPa]
Methanol	32,6	55,5
2-Propanol	18,3	23,9
1,2-Propandiol	27,5	0,175

Tab. 9.4: Einige Eigenschaften der untersuchten Lösungsmittel (aus [CRC95]).

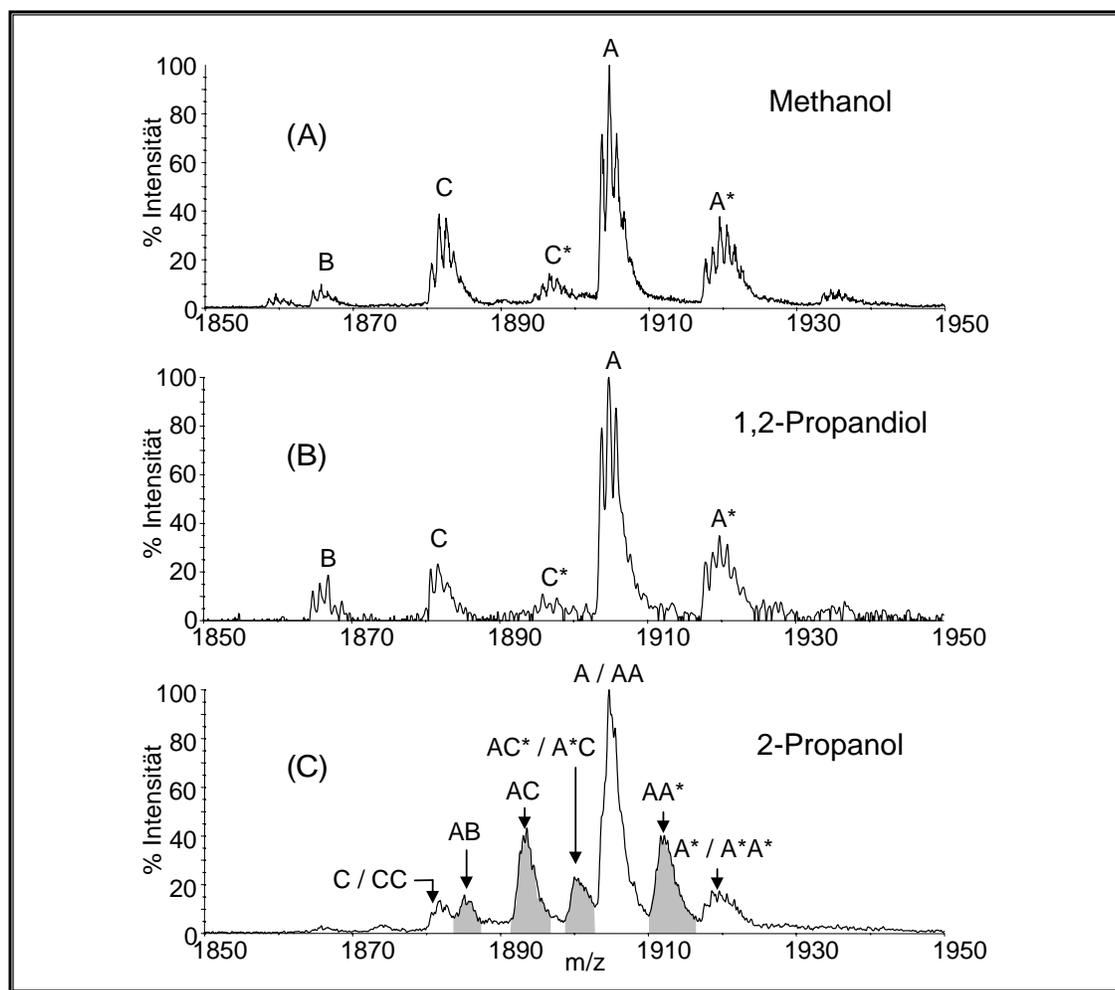


Abb. 9.6: Vergrößerte Ausschnitte der ESI-oTOF-Massenspektren (MARINER im Aufbau mit geheizter Transferkapillare) von Gramicidin D, $c = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$, $U_{\text{kap}} = 20 \text{ V}$, $T_{\text{kap}} = 200^\circ\text{C}$; A) Methanol; B) 1,2-Propanol; C) 2-Propanol.

Vergrößerte Ausschnitte der ESI-oTOF-Massenspektren, die bei Verwendung der reinen Lösungsmittel (MARINER im Aufbau mit geheizter Transferkapillare) resultieren, sind in Abb. 9.6 A bis Abb. 9.6 C dargestellt; weitere Charakteristika der Spektren finden sich in Tab. 9.5. Die Desolvatisierung erfolgte hierbei bei einer Spannung an der Transferkapillare von 20 V und einer Temperatur der Transferkapillare von 200°C . Abb. 9.6 ist zu entnehmen, daß im Fall der beiden polaren Lösungsmittel, Methanol und 1,2-Propanediol, überwiegend Signale der Peptid-Monomere im Ladungszustand +1 detektiert werden können. Bei Verwendung des Lösungsmittels geringster Polarität, 2-Propanol, kann die Existenz von Dimeren dagegen anhand der gemischten Dimere belegt werden (vgl. Abb. 9.6 C). Die Spektren, die aus den Lösungsmitteln Methanol und 2-Propanol bei Desolvatisierung in der geheizten Transferkapillare resultieren, unterscheiden sich von den Resultaten, die im Aufbau mit geheiztem Stickstoffgegenstrom erhalten werden (vgl. Tab. 9.3 und Abb. 9.5). So sind bei Verwendung der geheizten Transferkapillare Signale der einfach geladenen Dimere in den

Massenspektren zu beobachten (vgl. Tab. 9.5), während dreifach geladene Dimere in geringerer Intensität detektiert werden.

Wird die Temperatur der Transferkapillaren niedriger gewählt, so werden die Analytionen aus den Lösungsmitteln Methanol und 2-Propanol bevorzugt in höheren Ladungszuständen nachgewiesen. Die Signale der zweifach geladenen Monomere bzw. dreifach geladenen Dimere (sofern vorhanden) nehmen dementsprechend gegenüber der Signalgruppe im m/z -Bereich von 1850 – 1950 zu. Im Fall der 1,2-Propandiol-Lösung können dagegen bei niedrigeren Temperaturen der Transferkapillaren keine Massenspektren registriert werden.

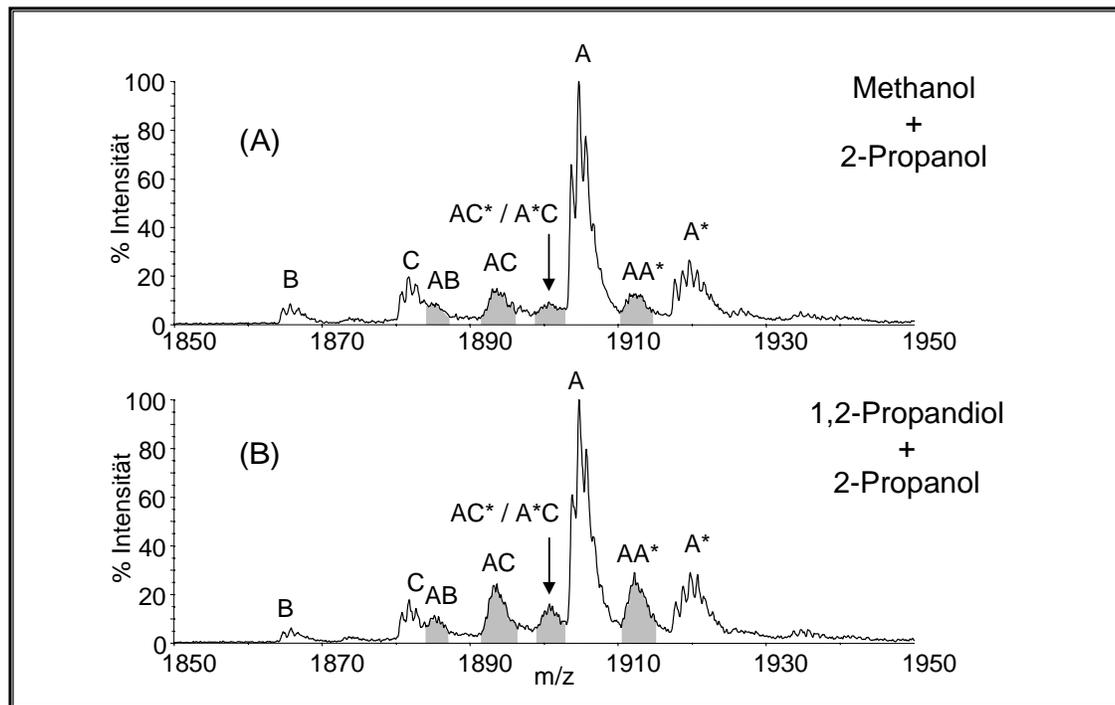


Abb. 9.7: Vergrößerte Ausschnitte der ESI-oTOF-Massenspektren (MARINER im Aufbau mit geheizter Transferkapillare) von Gamicidin D, $c = 10^{-5}$ mol/l, $U_{kap} = 20$ V, $T_{kap} = 200^{\circ}\text{C}$; A) Methanol/2-Propanol (v:v 1:1) B) 1,2-Propandiol/2-Propanol (v:v 1:1).

Ausschnitte der Massenspektren, die für die Analyse des Gamicidin D aus den Lösungsmittelgemischen Methanol/2-Propanol bzw. 1,2-Propanol/2-Propanol erhalten werden, sind in Abb. 9.7 dargestellt; weitere Charakteristika der Massenspektren finden sich in Tab. 9.5. Als Desolvatisierungsbedingungen wurden erneut eine Temperatur der Transferkapillaren von 200°C und ein Potential von 20 V gewählt. Aus beiden Lösungsmittelgemischen sind geringe Mengen Gamicidin-Dimere zu beobachten, wie anhand der grau unterlegten Signale der gemischten Dimere zu erkennen ist. Die Peptid-Monomere im Ladungszustand +1 ergeben allerdings in beiden Fällen noch die dominanten Signale im

9. ESI-MS-Untersuchungen zur Dimerisierung von Gramicidin D

dargestellten Massenbereich, wie anhand der beobachteten Isotopenabstände der entsprechenden Signale gefolgert werden kann.

	$[\text{Monomer}]^{2+}$ $[\text{A}+2\text{Na}]^{2+}$	$[\text{Dimer}]^{3+}$ $[\text{AA}+3\text{Na}]^{3+}$	$[\text{Monomer}]^+$ + $[\text{Dimer}]^{2+}$ $[\text{A}+\text{Na}]^+ + [\text{AA}+2\text{Na}]^{2+}$	$[\text{Dimer}]^+$ $[\text{AA}+\text{Na}]^+$
Methanol	100 %	-	ca. 70 %	< 5 %
2-Propanol	ca. 40 %	ca. 5 %	100 %	ca. 5 %
1,2-Propandiol	ca. 80 %	-	100 %	< 5 %
Methanol / 2-Propanol	100 %	-	ca. 55 %	< 5 %
1,2-Propandiol / 2-Propanol	ca. 95 %	-	100 %	ca. 5 %

Tab. 9.5: Relative Signalintensitäten im m/z -Bereich von 850 – 2100 (normiert auf das Signal höchster Intensität) bei Untersuchung von Gramicidin D in verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen.

Wird die Temperatur der Transferkapillaren gesenkt, so ist für beide Lösungsmittelgemische eine Verschiebung der Ionensignale zu höheren Ladungszuständen zu beobachten (ohne Abbildung). Eine Veränderung der Signalintensität der gemischten Dimere relativ zum dominanten Signal der Gruppe im m/z -Bereich zwischen 1850 und 1950 Thomson tritt allerdings bei keinem der Lösungsmittelgemische in Erscheinung.

Die Untersuchung von Gramicidin D in den Lösungsmittelgemischen wurde ebenfalls im Aufbau des MARINER mit geheiztem Stickstoffgegenstrom durchgeführt. In diesem Aufbau besteht zusätzlich die Möglichkeit, die Temperatur im Raum um die Sprayquelle durch Heizen der Schutzabdeckungshalterung zu erhöhen und so die Verdampfung von Lösungsmittel aus den geladenen Tröpfchen zu unterstützen. Bei Verwendung dieses Aufbaus ergeben sich Resultate, die den vorgestellten Ergebnissen im Aufbau mit geheizter Transferkapillare entsprechen (ohne Abbildung). Auch bei Variation der Temperatur im Raum um die Sprayquelle durch Heizen der Schutzabdeckung auf Temperaturen zwischen 40°C und 75°C sind keine signifikanten Veränderungen der Signalintensität gemischter Dimere relativ zum Signal $[\text{A}+\text{Na}]^+ + [\text{AA}+2\text{Na}]^{2+}$ zu beobachten.

9.3. Diskussion

Wird das Peptidgemisch Gramicidin D mittels ESI-MS analysiert, so können – mit Ausnahme der Mischungskomponente Gramicidin B* – alle Varianten dieses Peptids als natrium-angelagerte Molekülionen nachgewiesen werden. Alle Gramicidin-Varianten weisen untereinander große Ähnlichkeit in ihrer Primärstruktur und damit in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften auf. Es ist daher zu erwarten, daß alle Gramicidin-Varianten mit

ähnlicher Effizienz im ESI-Prozeß ionisiert werden; somit sollten die relativen Intensitätsverhältnisse der Monomer-Signale weitgehend die Mengenverhältnisse der Peptide in der Mischung wiedergeben. Der Vergleich mit den in Abb. 9.4 A beobachteten relativen Intensitäten der Monomer-Signale $[A+Na]^+ + [A^*+Na]^+$ (ca. 77 %), $[B+Na]^+$ (ca. 3 %) und $[C+Na]^+ + [C^*+Na]^+$ (ca. 20 %) ergibt, daß diese tatsächlich annähernd mit den bekannten Anteilen der Varianten an der Mischung übereinstimmen (vgl. Abb. 9.1). Der Anteil der Variante Gramacidin B* an der Mischung ist offenbar zu gering, um mit signifikanter Signalintensität in den Massenspektren detektiert zu werden.

Die vorgestellten Untersuchungen zeigen ferner, daß der Nachweis intakter, nicht-kovalent gebundener Gramacidin-Dimere mittels ESI-MS prinzipiell möglich ist. Selbst bei starker Stoßaktivierung während der Desolvatisierung können noch schwache Signale der gemischten Dimere neben den Signalen der Peptid-Monomere beobachtet werden (vgl. Abb. 9.4 A). Die relativ hohe Stabilität der Dimere dürfte dabei auf die hohe Zahl der Wasserstoffbrückenbindungen (vgl. Kap. 9.1) zurückzuführen sein, die im Dimer in der Poren-Konformation auftreten.

9.3.1. *Der Einfluß der Lösungsbedingungen auf den Nachweis von Gramacidin-Dimeren*

Die vorgestellten Resultate zeigen, daß mit der Variation des Lösungsmittels bei der Analyse von Gramacidin D erhebliche Unterschiede in den resultierenden Massenspektren zu beobachten sind (vgl. Abb. 9.5 und Tab. 9.3). Allen untersuchten Lösungen ist allerdings gemein, daß die Signale der zweifach geladenen Gramacidin-Monomere die dominanten Signale in den Massenspektren darstellen. Anhand des Massenwirkungsgesetzes der Dimerisierungsreaktion (Gl. 9.1) kann der relative Anteil der Dimere im Verhältnis zu den Monomeren in Lösung berechnet werden. Es gilt (vgl. [Vea74a]):

$$(Gl. 9.2 a) \quad K = \frac{c_{\text{Dimer}}}{c_{\text{Monomer}}^2}$$

$$(Gl. 9.2 b) \quad c_{\text{Dimer}} = \frac{1}{2}(c_0 - c_{\text{Monomer}})$$

mit: K = Gleichgewichtskonstante
 c_0 = Ausgangskonzentration, bezogen auf das Monomer

9. ESI-MS-Untersuchungen zur Dimerisierung von Gramacidin D

Nach dem Einsetzen von (Gl. 9.2 b) in (Gl. 9.2 a) ergibt sich die sinnvolle Lösung der resultierenden quadratischen Gleichung zu:

$$(Gl. 9.3) \quad c_{\text{Monomer}} = \frac{-1 + \sqrt{1 + 8Kc_0}}{4K}$$

Die resultierenden Gleichgewichtskonzentrationen der Gramacidin-Monomere und Dimere bei einer Ausgangskonzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l in den Lösungsmitteln Methanol und Ethanol sind in Tab. 9.6 zusammengestellt.

	Methanol	Ethanol
K (nach [Vea74a])	$2 \cdot 10^2$ l/mol	$3 \cdot 10^4$ l/mol
c_{Monomer}	$1,98 \cdot 10^{-5}$ mol/l	$1,17 \cdot 10^{-5}$ mol/l
c_{Dimer}	$7,97 \cdot 10^{-8}$ mol/l	$4,13 \cdot 10^{-6}$ mol/l
Verhältnis $n_{\text{Monomer}}/n_{\text{Dimer}}$	250 : 1	2,8 : 1

Tab. 9.6: Anhand der Gleichgewichtskonstanten berechnete Konzentrationen von Gramacidin-Monomeren und Gramacidin-Dimeren bei einer Gesamtkonzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l (bezogen auf das Monomer).

Bei der eingesetzten Gramacidin-Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l liegt demnach ein erheblicher Anteil des Analyten in der monomeren Form vor. Somit ist auch in der ESI-MS-Analyse von Gramacidin D aus unpolaren Lösungsmitteln die Detektion erheblicher Mengen monomerer Peptid-Ionen zu erwarten.

Der Anteil der Dimer-Signale relativ zu den Monomer-Signalen sollte in den vorgestellten Resultaten in engem Zusammenhang mit den Stoffmengenverhältnissen beider Spezies stehen, wie sie durch die Lage des Dimerisierungsgleichgewichts gegeben werden. Bei der Variation des Lösungsmittels ist allerdings zu berücksichtigen, daß daraus ebenfalls Konsequenzen für den ESI-Prozeß selbst resultieren. Wie bereits in Kap. 8 diskutiert, nimmt die Gesamtintensität des Ionensignals ab, je schwerer das Lösungsmittel zu verdampfen ist. Bedingt durch diesen Umstand werden auch in den vorliegenden Untersuchungsreihen im Fall der 1-Butanol-Lösung die geringsten absoluten Signalintensitäten detektiert.

Gramacidin-Monomere werden bei Verwendung des Aufbaus mit geheiztem Stickstoffgegenstrom in den Massenspektren im Ladungszustand +2 und +1 nachgewiesen, Gramacidin-Dimere hingegen in den Ladungszuständen +3 und +2. Soll daher anhand der ESI-MS-Spektren der Dimer-Anteil relativ zum Monomer-Anteil bestimmt werden, so ist zu berücksichtigen, daß sich Monomer-Signale im Ladungszustand +1 und Dimer-Signale im Ladungszustand +2 teilweise überlagern. Ein Vergleich kann allerdings auf qualitativer Basis mit Hilfe der Signale gemischter Dimere erfolgen. Da sich die Signalintensität der gemischten

Dimere relativ zum Signal $[A+Na]^+[AA+2Na]^{2+}$ bei Verwendung der Lösungsmittel Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol und 1-Butanol kaum ändert, ist zu folgern, daß das Verhältnis $[\text{Monomer}]^+ / [\text{Dimer}]^{2+}$ für diese Lösungsmittel konstant ist. Die relative Intensität des Signals $[A+Na]^+[AA+2Na]^{2+}$ kann daher als Maß für den Anteil der Dimere in den Massenspektren herangezogen werden. Mit Hilfe der relativen Intensitäten der Signale $[\text{Monomer}]^{2+}$, $[\text{Dimer}]^{3+}$ und $[\text{Monomer}]^+ + [\text{Dimer}]^{2+}$ (als Maß für den Anteil der Dimere) kann somit bestimmt werden, daß der Anteil der Dimere in folgender Reihenfolge zunimmt:

Methanol > Ethanol > 1-Propanol > 1-Butanol \approx 2-Propanol

Diese Reihenfolge korreliert mit der Abnahme der Lösungsmittelpolarität, wenn diese durch den empirischen Polaritätsparameter E_T^N ausgedrückt wird, welcher die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und Gelöstem berücksichtigt (vgl. Tab. 9.2). Dies erscheint plausibel, da das Ausmaß der Dimerisierung in Lösung um so stärker ist, je weniger das Lösungsmittel um die intermolekularen Wasserstoffbrücken im Dimer zu konkurrieren vermag [Sal97]. Ebenso korreliert die Reihenfolge im wesentlichen mit einer Abnahme der Dielektrizitätskonstanten der Lösungsmittel; allerdings wäre auf dieser Grundlage im Fall der 1-Butanol-Lösung der höchste Anteil an Dimeren zu erwarten.

Auch wenn der E_T^N -Parameter gut geeignet ist, die relativen Unterschiede zwischen den untersuchten Alkoholen zu beschreiben, so ist eine grundsätzliche Korrelation zwischen E_T^N -Wert und Ausmaß der Dimerisierung in Lösung nicht möglich. Wie aus Untersuchungen in Lösung bekannt ist, liegt Gramicidin A im Lösungsmittel Dimethylsulfoxid im wesentlichen als Monomer vor [Vea74a]. Dieses Lösungsmittel zeichnet sich durch eine hohe Dielektrizitätskonstante aus, sein E_T^N -Wert ist aber gering, so daß in diesem Fall das Ausmaß der Dimerisierung eher mit der Dielektrizitätskonstanten in Verbindung zu bringen ist.

Der Nachweis eines zunehmenden Anteils von Gramicidin-Dimeren in der Reihe der untersuchten Lösungsmittel steht in Übereinstimmung mit den Befunden der LILBID-Experimente ([Pfe95], [Kle96], [Kle96a]). Die LILBID-Untersuchungen zeigten in der Reihe der Lösungsmittel Methanol – Ethanol – 1-Propanol – 1-Butanol ebenfalls in qualitativer Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Gramicidin in kondensierter Phase einen verstärkten Nachweis der Gramicidin-Dimere in den Massenspektren. Im Unterschied zu den vorgestellten Resultaten der ESI-MS-Analyse wurden Gramicidin-Monomere und Gramicidin-Dimere mittels LILBID allerdings im wesentlichen im Ladungszustand +1 detektiert; eine Identifizierung gemischter Dimere konnte aufgrund der relativ hohen Signalbreiten in den Massenspektren aber nicht erfolgen.

9.3.2. *Die Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung während der Desolvatisierung*

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt beschrieben wurde, hat die Polarität des Lösungsmittels entscheidenden Einfluß auf den Anteil der detektierten Dimere in der ESI-MS-Analyse von Gramacidin D. Daher könnten Veränderungen der Lösungsmittelzusammensetzung während der Desolvatisierung eine Veränderung der relativen Anteile von Dimer-Signalen in den Massenspektren hervorrufen.

Die Lösungsmittel Methanol und 1,2-Propandiol weisen – gemessen an ihrer Dielektrizitätskonstanten ^[1] – eine deutlich höhere Polarität als 2-Propanol auf (vgl. Tab. 9.4). Dieser Tatsache entsprechend werden aus den reinen Lösungsmitteln Methanol und 1,2-Propandiol überwiegend Gramacidin-Monomere nachgewiesen, während bei Verwendung von 2-Propanol größere Anteile von Dimeren im Massenspektrum zu erkennen sind (vgl. Abb. 9.6). Die Polarität der Mischungen von Methanol und 2-Propanol bzw. 1,2-Propandiol und 2-Propanol liegt zwischen der Polarität der reinen Mischungskomponenten (vgl. Kap. 8). Wird Gramacidin D aus diesen Mischungen mittels ESI-MS analysiert, so ist der Anteil der Dimer-Signale im Vergleich zu den reinen polareren Mischungskomponenten deutlich erhöht (vgl. Abb. 9.7).

Im Lösungsmittelgemisch Methanol/2-Propanol stellt Methanol die leichter verdampfbare Komponente dar. Demnach sollte während der Desolvatisierung im ESI-Prozeß der Methanol-Anteil in den Tröpfchen abnehmen und deren Polarität somit geringer werden. Im Fall der 1,2-Propandiol/2-Propanol-Mischung ergeben sich dagegen umgekehrte Verhältnisse. In diesem System stellt 2-Propanol die leichter verdampfbare Komponente dar, so daß die Polarität der Tröpfchen bei zunehmender Lösungsmittelverdampfung zunimmt. Würde somit mit Veränderung der Lösungsmittelpolarität in den Tröpfchen eine Veränderung des Dimeren-Anteils in den Massenspektren einhergehen, so sollte im Fall der Methanol/2-Propanol-Mischung ein höherer Anteil an Dimeren nachgewiesen werden als im Fall der 1,2-Propandiol/2-Propanol-Mischung. Diese Beobachtung kann allerdings in der Praxis nicht gemacht werden, wie der Vergleich der Massenspektren in Abb. 9.7 zeigt. Auch bei verstärkter Zufuhr von thermischer Energie zu den Tröpfchen – bedingt durch eine höhere Temperatur der Transferkapillaren oder durch Heizen des Sprayraums – sind keine signifikanten Veränderungen der Dimeren-Signale relativ zum Signal $[A+Na]^+ + [AA+2Na]^{2+}$ zu beobachten. Prinzipiell sollte es unter den Bedingungen der ESI-MS möglich sein, zwei

¹ Der Polaritätsparameter E_T^N ist für 1,2-Propanol nicht verfügbar. Das strukturverwandte Ethylenglycol weist einen E_T^N -Wert von 0,7901 auf [Rei69], so daß auf qualitativer Basis 1,2-Propandiol auf dieser Polaritätsskala ebenfalls erheblich polarer als 2-Propanol sein sollte.

räumlich getrennte Peptid-Monomere (die allerdings nicht als Oberflächenladungsträger auftreten) während der Desolvatisierung in unmittelbaren Kontakt zueinander zu bringen, wie die folgenden Betrachtungen zeigen sollen.

Unter Standard-Spraybedingungen weisen die initialen Tröpfchen einen Radius von etwa 500 nm auf (vgl. Kap. 3.1, Abb. 3.2), so daß bei einer Analytkonzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l (bezogen auf die Peptid-Monomere) jedes Tröpfchen ca. 6300 Analytmoleküle enthält. Die *offspring droplets* des ersten unsymmetrischen Tropfenzerfalls enthalten bei einem Radius von etwa 37 nm durchschnittlich noch sechs Analytmoleküle. Es stehen somit prinzipiell genug Gramacidin-Monomere in den Tröpfchen zur Verfügung, um eine Veränderung des Dimer-Anteils in den Massenspektren hervorrufen zu können. Die Zeitskala der Desolvatisierung liegt in der Größenordnung von 1 ms (vgl. Kap. 3.1), so daß ein Makromolekül bei einem Diffusionskoeffizienten in der Größenordnung von 10^{-6} cm²s⁻¹ in dieser Zeit eine Strecke von mehr als 400 nm zurückzulegen vermag (vgl. [Atk90]). Demnach ist es grundsätzlich möglich, daß sich zwei Gramacidin-Monomere während der Desolvatisierung in den Tröpfchen treffen.

Dennoch ist mit dem Aufeinandertreffen zweier Monomere in Lösung nicht zwangsläufig auch eine Dimerisierungsreaktion verbunden. Wie aus Untersuchungen in Lösung bekannt ist, stellt die Dimerisierung selbst den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion dar [Vea74a]. Die Dimerisierung folgt dabei einem Zeitgesetz 2. Ordnung bezüglich der Konzentration der Monomere. Die Geschwindigkeitskonstante ist ferner um so größer, je unpolarer das Lösungsmittel ist (Methanol: 4 [l/(mol·s)]; Ethanol 12 [l/(mol·s)] [Vea74a]). Legt man näherungsweise die Geschwindigkeitskonstante der Dimerisierung in Ethanol für die vorliegenden Untersuchungen zugrunde, so beträgt die Halbwertszeit der Reaktion bei einer Analytkonzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l gemäß (Gl. 9.4) [Atk90] ca. 4170 s.

$$(Gl. 9.4) \quad t_{1/2} = \frac{1}{c_0 k}$$

Der unveränderte Anteil der Dimere in den Massenspektren ist demnach darauf zurückzuführen, daß die Dimerisierungsreaktion im Vergleich zur Zeitskala der Desolvatisierung langsam verläuft. Selbst wenn zwei Peptid-Monomere in den Tröpfchen aufeinandertreffen, ist dennoch die Zeit zu kurz, um nicht-kovalent gebundene Dimere in signifikantem Ausmaß auszubilden. Als Erklärungsansatz ist ebenfalls anzuführen, daß die Gramacidin-Monomere bereits in Lösung Komplexe mit den vorhandenen Na⁺-Ionen bilden. Diese Spezies könnten im ESI-Prozeß als Oberflächenladungsträger auftreten, so daß eine

„freie“ Diffusion der Monomere in den Tröpfchen nicht mehr gewährleistet ist. Einer Bildung von Gramicidin-Dimeren wird unter dieser Voraussetzung somit entgegengewirkt.

Zusammenfassend zeigen die in diesem Kapitel vorgestellten Resultate, daß sich die Veränderungen des Dimerisierungsgleichgewichts von Gramicidin in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel auch in den ESI-Massenspektren widerspiegeln. Anhand der gemischten Dimere, welche die verschiedenen, natürlich vorkommenden Gramicidin-Varianten untereinander bilden, können relativ geringe Mengen an Dimeren neben größeren Anteilen Monomeren eindeutig identifiziert werden. Auf qualitativer Basis sind somit vergleichende Untersuchungen zur Dimerisierung in verschiedenen Lösungsmitteln möglich, wobei die schonenden Bedingungen der ES-Ionisierung den Nachweis der intakten nicht-kovalenten Komplexe ermöglichen.

10. DIE CHARAKTERISIERUNG VON PEPTID-ANIONEN-ADDUKTEN

In der ESI-MS kommt den Vorgängen, die ein Analyt während des Transfers aus der Lösung in die Gasphase durchläuft, besondere Bedeutung zu. Wie in Kap. 3.1.3 beschrieben, stellen die Prozesse im wesentlichen Protonentransferreaktionen in der Gasphase dar, an die sich das Verdampfen ungeladener Spezies aus einem molekularen Cluster anschließt. Massenspektrometrisch detektierbare unspezifische Addukte eines Analyten können als letzter Rest eines solchen Clusters angesehen werden.

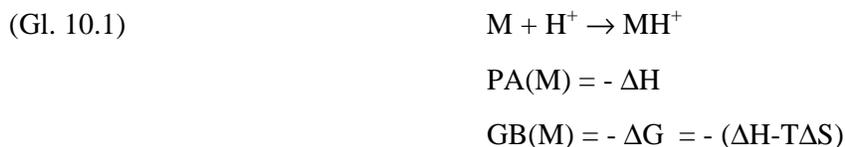
Die Bildung von unspezifischen Addukten aus Analyt und anderen Komponenten der Lösung stellt in der Regel einen unerwünschten Effekt in der ESI-MS dar. Das Gesamtionensignal des Analyten verteilt sich dann auf eine große Zahl von Einzelsignalen, so daß die resultierende absolute Intensität des Analytionensignals gering ist. Ferner resultieren relativ breite Signale, wenn die Anlagerungen kleinerer Moleküle an den Analyten nicht mehr massenspektrometrisch auflösbar sind, was eine exakte Ermittlung der Molekülmasse des Analyten erschwert. Sind nicht-kovalente Komplexe Gegenstand einer ESI-MS-Analyse, so können unspezifische Addukte häufig nicht durch verstärkte Aktivierung entfernt werden, ohne den Komplex selbst zu zerstören.

Die Untersuchung der Faktoren, die für die Stabilität unspezifischer Addukte in der ESI-MS relevant sind, ist im Hinblick auf ein umfassenderes Verständnis des ESI-Prozesses von besonderem Interesse. In Kap. 10.1 sind die bekannten Aspekte von Protonentransferreaktionen, insbesondere unter Beteiligung von Peptiden und Proteinen, zusammengestellt. Die Resultate der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen finden sich in Kap. 10.2; die Diskussion der Ergebnisse erfolgt in Kap. 10.3.

10.1. Protonentransferreaktionen in der Gasphase an Peptiden und Proteinen

Die Untersuchung von Protonentransferreaktionen in der Gasphase stellt einen weiträumigen Forschungsbereich dar, über den sich in der Literatur ausführliche Zusammenfassungen finden (vgl. z.B. [Har97], [Gre97]). An dieser Stelle sollen nur die Definitionen dieser Reaktion sowie die für Peptide relevanten Aspekte umrissen werden.

Das Bestreben eines Teilchens M, ein Proton zu binden, wird durch seine Protonenaffinität (PA) bzw. seine Gasphasenbasizität (GB) beschrieben. Betrachtet man eine Reaktion gemäß (Gl. 10.1), so gilt für diese Größen (vgl. [Har97]):



Definitionsgemäß läßt die Beobachtung einer Reaktion des Typs:



den Schluß zu, daß die Bedingung $\text{PA(B)} > \text{PA(M)}$ bzw. $\text{GB(B)} > \text{GB(M)}$ gegeben ist. Der Unterschied zwischen Protonenaffinität und Gasphasenbasizität eines Moleküls besteht in dem Anteil $\text{T}\Delta\text{S}$, der die mit der Protonenübertragung einhergehende Entropieveränderung berücksichtigt. Der Anteil $\text{T}\Delta\text{S}$ enthält einerseits die Entropieabnahme bei der Bindung eines Protons ($\text{T}\Delta\text{S}$ bei 298 K = $-32,6$ kJ/mol^[1]); andererseits trägt er der Entropieveränderung bei Protonierung des Moleküls M Rechnung [Har97]. Die Gasphasenbasizitäten einiger ausgewählter Substanzen, sowohl neutraler Moleküle als auch einiger Anionen, sind in Tab. 10.1 zusammengestellt. Die Werte der ausgewählten Aminosäuren beziehen sich auf die isolierten Moleküle (vgl. unten).

	GB (kJ/mol)		GB (kJ/mol)
Ammoniak	819	Dichloracetat	1347
Glycin	852	Chlorid	1373
Histidin	950	Glycin-Anion	1404
Lysin	951	Formiat	1415
Arginin	1007	Butansäure-Anion	1420
Trifluoracetat	1323	Acetat	1429

Tab. 10.1: Gasphasenbasizitäten einiger ausgewählter Substanzen (aus: Datenbank des National Institute of Standards, <http://webbook.nist.gov>)

Gasphasenbasizitäten und Protonenaffinitäten werden experimentell nach verschiedenen Untersuchungsansätzen ermittelt, deren Grundlagen beispielsweise bei Harrison [Har97] bzw. Green und Lebrilla [Gre97] zusammengestellt sind. Die Methoden beruhen zunächst auf einer Messung der Gasphasenbasizität, welche dann unter Berücksichtigung des Anteils $\text{T}\Delta\text{S}$ in die Protonenaffinität konvertiert werden kann. Einer dieser Ansätze, die sogenannte kinetische Methode (vgl. [McL81], [Coo94]), beruht auf der Untersuchung von Addukten des Typs $\text{B}_1\text{-H}^+\text{-B}_2$ (sogenannte protonengebundene Dimere), in welchen die Basen B_1 und B_2 um ein Proton konkurrieren. Relative Gasphasenbasizität und Protonenaffinität einer Substanz können unter Verwendung von Referenzbasen anhand der Fragmentierung der protonengebundenen Dimere ermittelt (vgl. (Gl. 10.3)) werden.

¹ Gasphasenbasizität und Protonenaffinität werden häufig in der Einheit kcal/mol angegeben; im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden gegebenenfalls die in kJ/mol umgerechneten Werte verwendet. (1 kcal/mol = 4,184 kJ/mol).



Das interessierende protonengebundene Dimer wird im Rahmen eines MS^2 -Experiments massenselektiert und schließlich stoßinduziert fragmentiert. Die relativen Signalintensitäten beider möglicher Produktionen spiegeln die Differenz der zur Dissoziation erforderlichen Energien und damit die Differenz der Protonenaffinitäten von B_1 und B_2 wider. Die Potentialkurve einer solchen Fragmentierungsreaktion ist in Abb. 10.1 für den Fall dargestellt, daß die Spezies B_1 und B_2 nur geringe strukturelle Unterschiede aufweisen (nach [Coo94]).

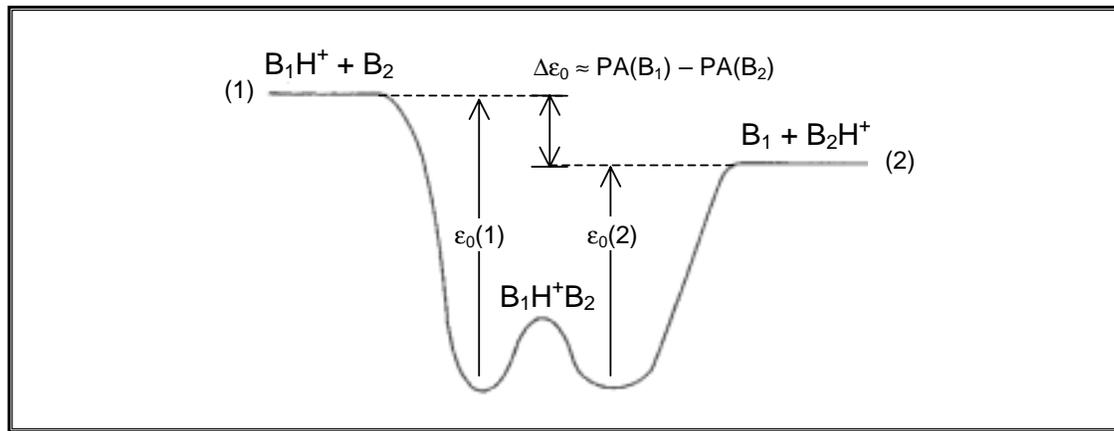


Abb. 10.1: Potentialkurve eines protonengebundenen Dimers und der aus einer Fragmentierung resultierenden Produktionen. ϵ_0 : zur Fragmentierung kritische Energie (nach [Coo94]).

Die Minima in dieser Potentialkurve sind dabei auf die Wechselwirkung zwischen einem Ion und dem verbleibenden Molekül zurückzuführen, für deren Ausmaß die Ladung des Ions bzw. das permanente Dipolmoment μ und das induzierte Dipolmoment μ_{ind} des Moleküls verantwortlich sind. Die potentielle Energie, die aus dieser Wechselwirkung im Vergleich zu den räumlich getrennten Teilchen resultiert, ergibt sich gemäß (vgl. [Hol85], [Atk90], [Ger89], [Bur88]):

$$(Gl. 10.4 a) \quad E_{\text{Ion-Dipol}} = -\frac{q \cdot \mu \cdot \cos \Theta}{4\pi \cdot \epsilon_0 \cdot r^2} \quad (\text{Ion/permanenter Dipol})$$

$$(Gl. 10.4 b) \quad E_{\text{Ion-ind. Dipol}} = -\frac{1}{2} \cdot \frac{q^2 \cdot \alpha}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^4} \quad (\text{Ion/induzierter Dipol})$$

mit: q : Ladung des Ions
 r : Abstand Ion-Molekül
 μ : permanentes Dipolmoment des Moleküls
 Θ : Lage des Dipol-Vektors relativ zum elektrischen Feld der Punktladung q
 α : Polarisierbarkeit des Moleküls; $\mu_{\text{ind}} = (q \cdot \alpha) / (4\pi \cdot \epsilon_0 r^2)$

Protonentransferreaktionen an Peptiden und Proteinen sind Gegenstand intensiver Forschung (vgl. Kap. 3.1.3.3), wobei neben der Untersuchung struktureller Merkmale dieser Spezies ebenfalls Augenmerk auf die Ermittlung ihrer Gasphasenbasizität gerichtet wird. Eine Übersicht zu diesem Thema findet sich beispielsweise bei [Coo94], [Wil96], [Har97], [Gre97]. Am Beispiel von Polyglycinen verschiedener Größe konnte gezeigt werden, daß die Gasphasenbasizität des ungeladenen Peptids nicht mit der Gasphasenbasizität der entsprechenden isolierten Glycin-Moleküle identisch ist, sondern um 38 bis 87 kJ/mol höhere Werte annimmt [Zha93], [Wu93], [Che93]. Ferner ließ sich ermitteln, daß eine Protonierung bevorzugt am N-Terminus des Peptids eintritt, während die Protonierung am Sauerstoff der Amid-Bindung energetisch ungünstiger ist [Zha93], [Wu93]. Als Grund der gesteigerten Basizität am N-Terminus wird eine Stabilisierung der Ladung durch intramolekulare Wechselwirkungen, beispielsweise durch Wasserstoffbrücken zum Sauerstoff einer Amid-Gruppe in der Peptidbindung, angenommen. Auch im Fall von Peptiden mit basischen Aminosäuren führt der Einfluß dieser sogenannten Selbstsolvatisierung zu einer um 54 bis 75 kJ/mol gesteigerten Gasphasenbasizität im Vergleich zur isolierten Aminosäure [Sch94].

Im Fall eines bereits protonierten Analyten werden Protonentransferreaktionen zusätzlich von Coulomb-Wechselwirkungen beeinflusst (vgl. [Sch94], [Vek95], [Wil96]). Einerseits erhöht die Anwesenheit mehrerer positiver Ladungen auf dem Molekül durch repulsive Coulomb-Wechselwirkungen die Tendenz zur Abgabe eines Protons. Andererseits entstehen bei einer Reaktion des Typs in (Gl. 10.5) zwei Ladungsträger gleicher Polarität und somit mit repulsiven Wechselwirkungen, so daß bei der Trennung der Produkte eine sogenannte „reverse Aktivierungsbarriere“ überwunden werden muß (vgl. Abb. 10.2 für den Fall $n = 2$ nach [Wil96]).

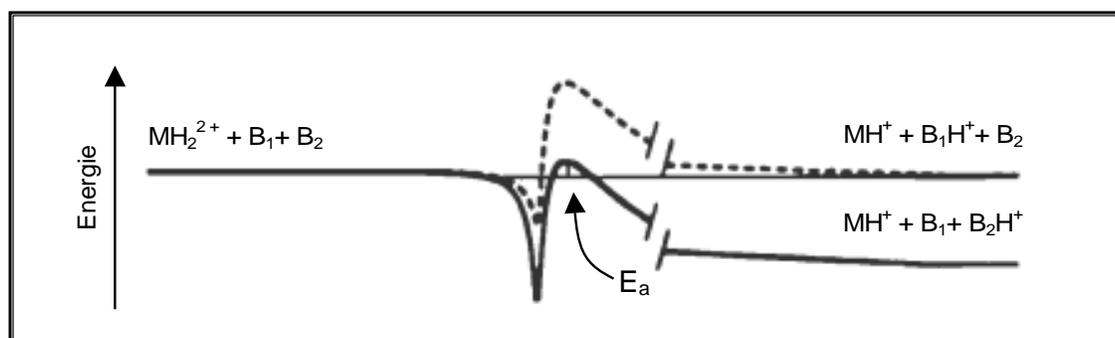
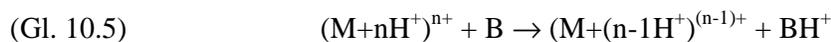


Abb. 10.2: Qualitatives Interaktionspotential für eine Protonentransferreaktion zwischen einem zweifach protonierten Molekül MH_2^{2+} und neutralen Basen mit $PA(B_2) > PA(B_1)$ (nach [Wil96]).

Die Übertragung eines Protons vom geladenen Molekül MH_2^{2+} auf eine neutrale Referenzbase B_1 mit gleicher Protonenaffinität wie MH^+ ist aufgrund dieser Barriere kinetisch gehemmt und läuft nur langsam ab. Ein Protonentransfer mit ausreichend hoher Geschwindigkeit tritt erst beim Anbieten einer anderen Referenzsubstanz höherer Protonenaffinität (B_2) ein, sobald die reverse Aktivierungsbarriere niedrig genug ist.

Intramolekulare Wechselwirkungen können die Protonentransferreaktionen eines Moleküls in der Gasphase in erheblichem Maße beeinflussen. Beispielsweise ist die zwitterionische Form, die Aminosäuren und Peptide üblicherweise in Lösung annehmen, an sich in der Gasphase energetisch ungünstig, da eine Carboxylatgruppe eine erheblich höhere Gasphasenbasizität als eine Aminogruppe aufweist. Können aber C- und N-Terminus eines Peptids miteinander in Wechselwirkung treten, so wird diskutiert, daß die zwitterionische Form durch Bildung einer Salzbrücke stabilisiert wird. Die resultierende Coulomb-Anziehung zwischen den unterschiedlich geladenen Gruppierungen des Moleküls kompensiert in diesem Fall den formal endothermen Prozeß der Bildung eines isolierten Ionenpaars [Cam95]. Auch protonierte basische Aminosäuren eines Peptids können mit einer Carboxylatgruppe eine solche Salzbrücke bilden, wobei intramolekulare Wechselwirkungen mit polaren Gruppen des Peptids die getrennten Ladungen weiter zu stabilisieren vermögen [Sch96a].

10.2. Ergebnisse

10.2.1. *Neurotensin-Addukte mit verschiedenen Anionen*

Zur Untersuchung von Analyt-Anionen-Addukten wurde Neurotensin ($M = 1672$ Da, vgl. Abb. 10.5), ein im Säugetiergehirn vorkommendes Peptid mit hormonähnlichen Aktivitäten [Mer89], gewählt; als Anionen dienen Acetat (Ac^-), Formiat (Fo^-), Chlorid (Cl^-), Dichloracetat (DCA^-) und Trifluoracetat (TFA^-). Besondere Beachtung soll bei der Charakterisierung der Addukte deren Stabilität zukommen.

Ausgehend von den Standardbedingungen der ESI-MS-Analyse von Peptiden und Proteinen wird Neurotensin in Mischungen aus Methanol und einer 0,2 M wäßrigen Lösung der zum Anion korrespondierenden Säure mit einer Konzentration von 10^{-5} mol/l gelöst und mittels Nano-ESI am LCQ untersucht. Die Desolvatisierungsbedingungen werden jeweils so eingestellt, daß ein Nachweis der Addukte in möglichst hoher Signalintensität erreicht wird. Im positiven Ionenmodus ist keine ausgeprägte Adduktbildung zwischen Neurotensin und den ausgewählten Anionen zu beobachten; die weiteren Untersuchungen werden daher im negativen Ionenmodus angestellt.

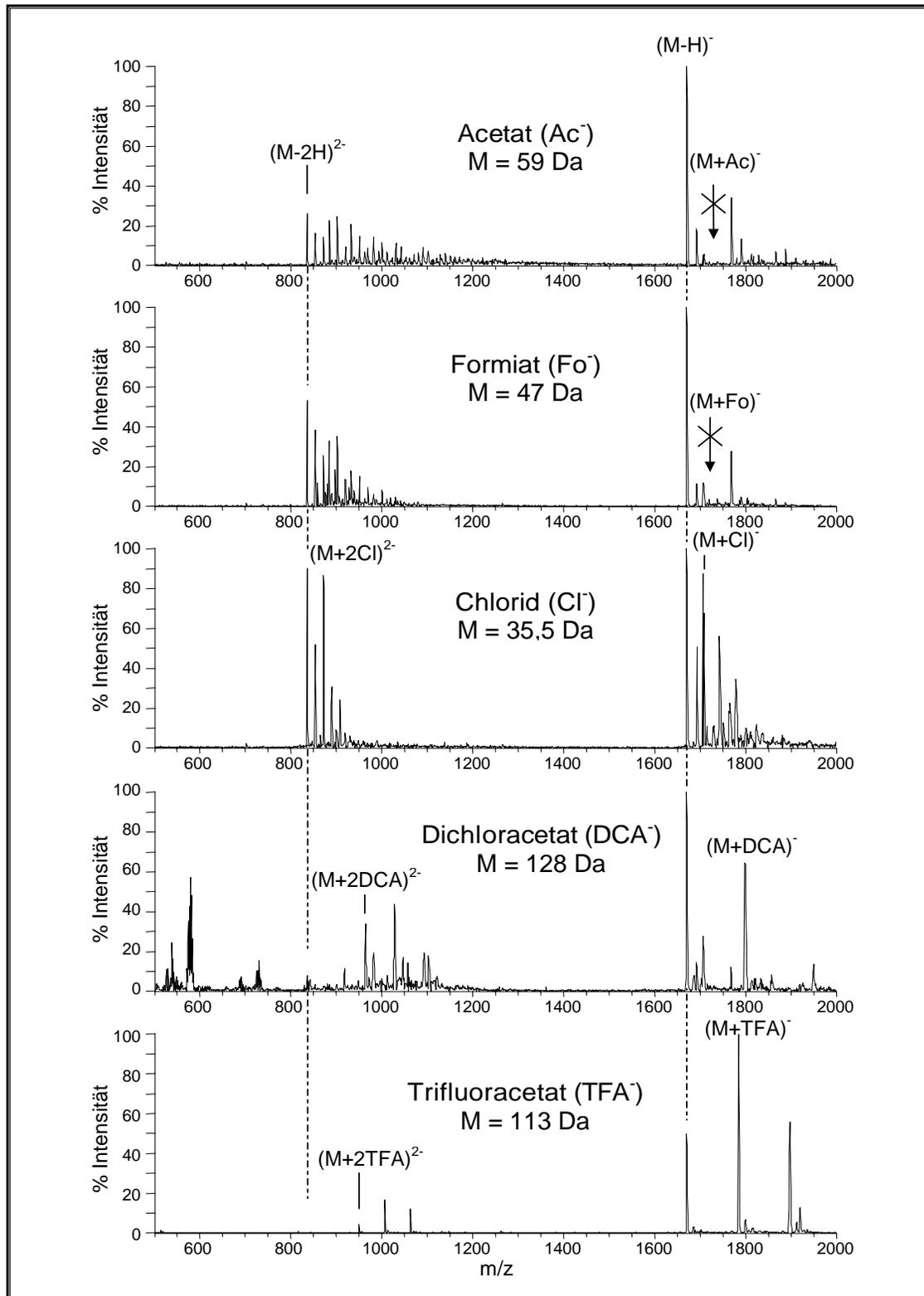


Abb. 10.3: Nano-ESI-Massenspektren (LCQ), negativer Ionenmodus, von Neurotensin, $c = 10^{-5} \text{ mol/l}$ in Methanol/0,2 M Säure (v:v 1:1). Die zu den verschiedenen Säuren korrespondierenden Basen sind in den Massenspektren angegeben.

Die Massenspektren, die aus der Untersuchung der verschiedenen Lösungen im negativen Ionenmodus resultieren, sind in Abb. 10.3 zusammengestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß der Nachweis des Peptids in deprotonierter Form auch aus saurer Lösung ohne Schwierigkeiten möglich ist. Ferner zeigt sich, daß die Anionen Chlorid, Dichloracetat und Trifluoracetat ausgeprägte Anlagerungen an das Peptid bilden, wobei in Abb. 10.3 nur einige ausgewählte Signale beschriftet sind. Die Addukte werden sowohl im Netto-Ladungszustand -2 als auch im Netto-Ladungszustand -1 nachgewiesen. Die Zusammensetzung der einzelnen Addukte wird allgemein durch (Gl. 10.6) wiedergegeben:



mit X^- : entsprechendes Anion
 n : Anzahl der Anionen
 Y^+ : positiver Ladungsträger (H^+ oder Na^+)
 m : Anzahl positiver Ladungsträger

Im Gegensatz dazu können Acetat- und Formiat-Anlagerungen aus den entsprechenden Lösungen selbst unter sehr schonenden Desolvatisierungsbedingungen nicht beobachtet werden. Die entsprechenden Massenspektren weisen unter diesen Bedingungen vielmehr in beiden Fällen eine Reihe von Addukten nach, die formal als Anlagerungen von H_3PO_4/H_2SO_4 ($M = 98$ Da), HCl und $NaCl$ an das deprotonierte Molekülion interpretiert werden können. Diese Spezies wurden der Analytlösung nicht gezielt zugesetzt; ihre Anwesenheit ist vielmehr auf Verunreinigungen der Probenlösung zurückzuführen.

MS^2 -Untersuchungen der Addukte des Typs $(M+X)^-$ (mit $X = Cl^-, DCA^-, TFA^-$) zeigen, daß diese Spezies unter Abspaltung der zum Anion korrespondierenden Säure, HX , fragmentieren (Tab. 10.2). In den MS^2 -Spektren ist daraufhin das Signal des einfach deprotonierten Neurotensin-Molekülions zu beobachten. Die Fragmentierung wird in allen untersuchten Fällen bei sehr ähnlicher Aktivierung des Vorläuferions in der Quadrupol-Ionenfalle erreicht. Eine Unterscheidung der verschiedenen Addukte hinsichtlich ihrer relativen Stabilität kann daher anhand dieser Experimente nicht erfolgen.

Addukt $(M+X)^-$	m/z des Vorläuferions (beobachtet)	m/z des Fragmentions (beobachtet)	entspricht Abspaltung von
$(M+Cl)^-$	1706,7	1670,9	HCl
$(M+DCA)^-$	1799,2	1670,9	HDCA
$(M+TFA)^-$	1784,4	1671,2	HTFA

Tab. 10.2: Zusammenfassung der MS^2 -Untersuchungen (Nno-ESI, LCQ, negativer Ionenmodus) verschiedener Addukte. Analyt: Neurotensin, $c = 10^{-5}$ mol/l, in Methanol / 0,2 M Säure HX (v:v 1:1).

10. Die Charakterisierung von Peptid-Anionen-Addukten

Um Informationen über die relative Stabilität zu gewinnen, soll daher die Fragmentierung gemischter Addukte des Typs $[\text{MH}^+\text{X}_1^-\text{X}_2^-]^-$ (mit $\text{X}_1^- = \text{Anion 1}$; $\text{X}_2^- = \text{Anion 2}$) in MS^2 -Experimenten untersucht werden. Der Analyt Neurotensin wird zu diesem Zweck in Lösungsmittelgemischen gelöst, die aus Methanol sowie einer wässrigen Lösung zweier Säuren (jeweils 10 mmol/l) unter Zusatz von Ammoniakwasser NH_4OH in einer Konzentration von 30 mmol/l bereitet werden. Der resultierende pH-Wert der wässrigen Lösung liegt dabei im Bereich von 7,5. Somit kann gewährleistet werden, daß trotz der unterschiedlichen Stärke der verwendeten Säuren beide Anionen in der Lösung vorliegen. Die jeweiligen Analytlösungen werden mittels Nano-ESI am LCQ im negativen Ionenmodus untersucht, wobei die Desolvatisierungsbedingungen jeweils auf einen Nachweis der interessierenden Addukte optimiert werden.

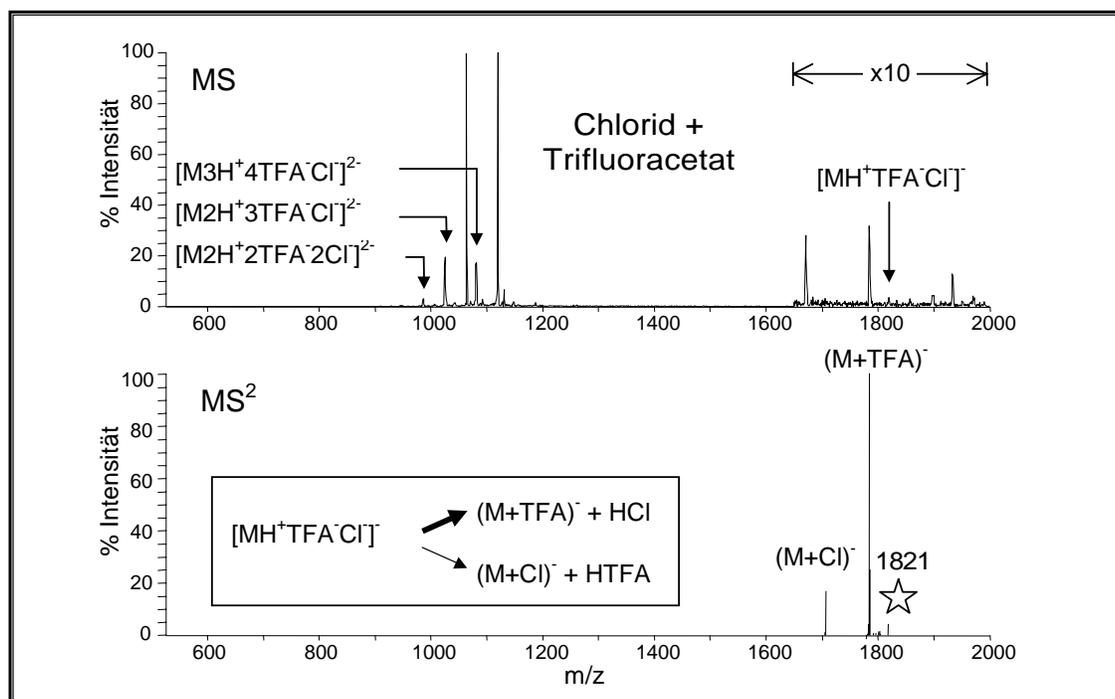


Abb. 10.4: oben: Nano-ESI-Massenspektrum (LCQ, negativer Ionenmodus) von Neurotensin, $c = 10^{-5}$ mol/l in einer Mischung aus Methanol/Wasser mit 10 mmol/l HTFA, 10 mmol/l HCl und 30 mmol/l NH_4OH ; unten: MS^2 -Spektrum mit dem Addukt $[(\text{M}+\text{H}^+)\text{TFA}^-\text{Cl}]^-$ als Vorläuferion.

Abb. 10.4 (oben) zeigt exemplarisch das Massenspektrum von Neurotensin in Gegenwart von Trifluoracetat und Chlorid unter optimierten Desolvatisierungsbedingungen. Die Signale der entsprechenden gemischten Addukte sind im Spektrum gekennzeichnet; daneben können sowohl das einfach deprotonierte Molekülion als auch die formale Anlagerung von Trifluoressigsäure an das einfach bzw. zweifach deprotonierte Molekülion beobachtet werden. Das interessierende Addukt $[\text{MH}^+\text{TFA}^-\text{Cl}]^-$ ist im Massenspektrum nur mit geringer

Signalintensität zu beobachten. Dennoch kann es zur Durchführung des MS²-Experiments in der Ionenfalle isoliert und schließlich zur Fragmentierung angeregt werden. Das resultierende MS²-Spektrum ist in Abb. 10.4 unten dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Fragmentierung des gemischten Addukts überwiegend unter Abspaltung eines Moleküls HCl verläuft. Das Fragmentation entsprechend einer Abspaltung von HTFA ist nur in erheblich geringerer Signalintensität zu beobachten.

Die Resultate der Untersuchung aller gemischten Addukte, die auf analogem Weg gewonnen werden, sind in Tab. 10.3 zusammengefaßt. Es zeigt sich, daß ausschließlich in den Kombinationen der Anionen Trifluoracetat, Dichloracetat und Chlorid untereinander gemischte Addukte in den Massenspektren zu beobachten sind. Die Signalintensität der Spezies des Typs $[\text{MH}^+\text{X}_1^-\text{X}_2^-]$ ist in allen Fällen relativ gering, aber dennoch ausreichend für eine MS²-Analyse dieser Addukte. Gemischte Addukte mit einem Acetat- oder Formiatanion sind dagegen in keinem der untersuchten Fälle zu beobachten.

Addukt $[\text{MH}^+\text{X}_1^-\text{X}_2^-]$	m/z des Vorläuferions (beobachtet)	beobachtete Fragmentionen	überwiegende Abspaltung
$[\text{MH}^+\text{TFA}^-\text{DCA}^-]$	1913,8	1785,2 1799,2	HDCA
$[\text{MH}^+\text{TFA}^-\text{Cl}^-]$	1821,5	1783,9 1706,0	HCl
$[\text{MH}^+\text{DCA}^-\text{Cl}^-]$	1836,0	1799,4 1706,7	HCl

Tab. 10.3: Zusammenfassung der MS²-Experimente (LCQ, negativer Ionenmodus) gemischter Addukte aus Neurotensin und verschiedenen Anionen. Das mit höherer Signalintensität beobachtete Fragmention ist jeweils fett gedruckt.

10.2.2. Trifluoracetat-Addukte verschiedener Peptide

Da Trifluoracetat in hohem Maße zur Ausbildung von Addukten neigt, wird dieses Anion zur Herstellung von Peptid-Anion-Addukten verschiedener Peptide gewählt. Zur Untersuchung der Reaktionen in Addukten im negativen Ionenmodus dienen die vier Peptide Neurotensin, Substanz P, Bradykinin und $[\text{Glu}^1]$ -Fibrinopeptid, deren Sequenzen in Abb. 10.5 zusammengestellt sind. Die Peptide werden in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l (bzw. 10^{-6} mol/l im Fall von Substanz P) in einem Gemisch aus Methanol und Wasser (v:v 1:1) mit einem Gehalt von 30 mmol/l Ammoniak (NH₄OH) und 20 mmol/l Trifluoressigsäure (HTFA) gelöst. Der resultierende pH-Wert der Lösung beträgt dabei etwa 7,5, so daß die Trifluoressigsäure vollständig deprotoniert vorliegen sollte.

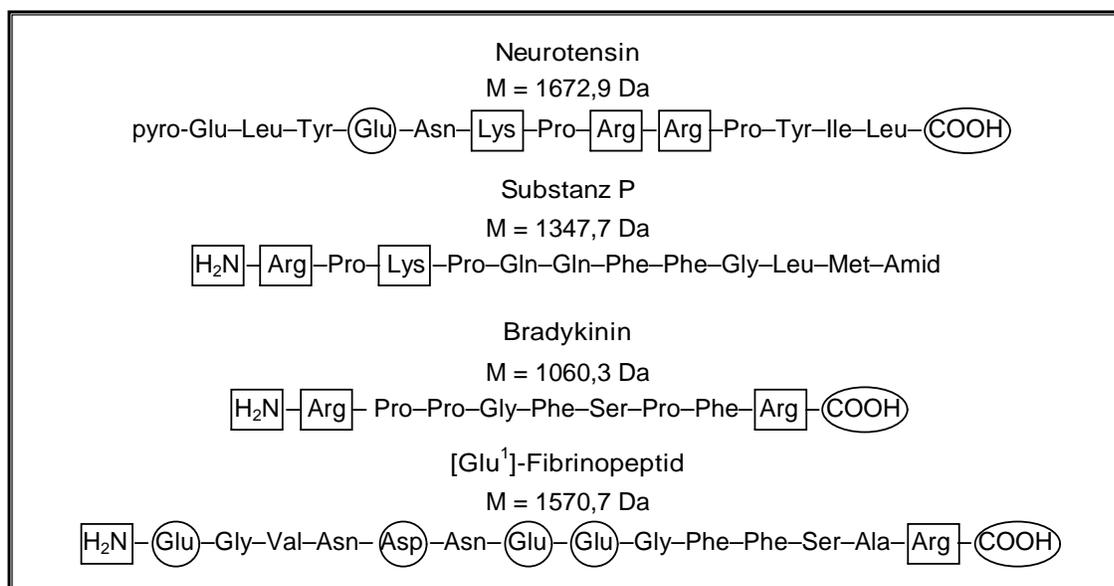


Abb. 10.5: Sequenzen und Molekülmassen der verwendeten Peptide (nach [Mer89], ^[1]); basische Stellen der Sequenz sind durch einen Kasten; saure durch einen Kreis gekennzeichnet.

Die Analyse erfolgt mittels Nano-ESI am LCQ im negativen Ionenmodus, wobei die Desolvatisierungsbedingungen im Hinblick auf eine ausgeprägte Entstehung von Analyt-Anionen-Addukten optimiert werden. Repräsentative Massenspektren dieser Untersuchungen sind in Abb. 10.6 bis Abb. 10.9 dargestellt.

Neurotensin enthält in seiner Sequenz drei basische Aminosäuren und eine Glutaminsäure. Der N-Terminus liegt in Form einer pyro-Glutaminsäure vor (vgl. Abb. 10.5). Im Nano-ESI-Massenspektrum im negativen Ionenmodus aus oben genanntem Lösungsmittelgemisch wird Neurotensin in den Ladungszuständen -2 und -1 nachgewiesen (Abb. 10.6), wobei in deutlichem Ausmaß Addukte zwischen Peptid, Trifluoracetationen und Natriumionen zu beobachten sind. Die Natriumionen wurden dabei der Analytlösung nicht gezielt zugesetzt, sondern sind vielmehr auf ubiquitäre Salzverunreinigungen der Probensubstanz zurückzuführen. Die Zusammensetzung der einzelnen Addukte, die anhand des beobachteten m/z -Verhältnisses und des Ladungszustands ermittelt werden kann, ist der Tabelle in Abb. 10.6 zu entnehmen ^[2]. Entsprechend der Anzahl der Trifluoracetationen und dem resultierenden Ladungszustand enthalten alle Addukte eine bestimmte Anzahl positiver Ladungsträger in Form von H^+ und Na^+ . Auffällig ist dabei, daß die beobachteten Addukte maximal drei H^+ -Ladungsträger aufweisen. Enthält das Addukt formal vier positive Ladungsträger, so wird davon mindestens einer durch ein Na^+ gestellt (vgl. Signalgruppe II.7 in Abb. 10.6).

¹ Datenbank des Swiss Institute of Bioinformatics, Expert Protein Analysis System ExPASy (<http://www.expasy.ch>)

² In der Beschriftung der Signale gibt die römische Ziffer den Ladungszustand des Addukts und die arabische Ziffer die Anzahl der Trifluoracetationen an.

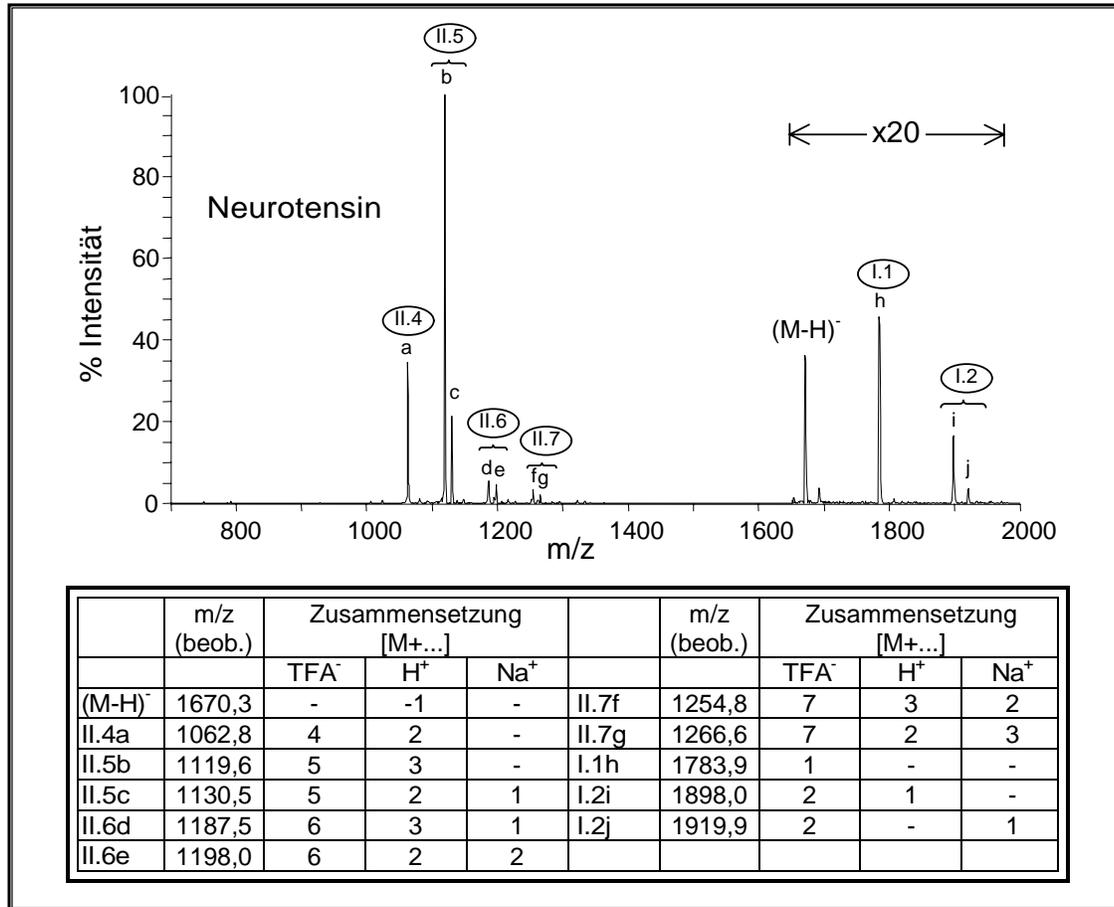


Abb. 10.6: Nano-ESI-Massenspektrum (LCQ) von Neurotensin, $c = 10^{-5}$ mol/l in Methanol/Wasser (v:v 1:1), 30 mM NH_4OH , 20 mM HTFA. Zuordnung der Ionensignale siehe Tabelle.

Abb. 10.7 zeigt das Nano-ESI-Massenspektrum (negativer Ionenmodus) von Substanz P. Das Peptid enthält zwei basische Aminosäuren sowie den freien N-Terminus; der C-Terminus liegt in Form eines Amids vor (vgl. Abb. 10.5). Substanz P wird im wesentlichen im Ladungszustand -1 als Addukt mit mehreren Trifluoracetationen und der entsprechenden Anzahl positiver Ladungsträger nachgewiesen. Neben Na^+ -Addukten sind im Fall von Substanz P ebenfalls Addukte mit K^+ -Ionen zu beobachten, welche als Verunreinigung in der Analytlösung vorliegen. Ein einfach deprotoniertes Molekülion des Peptids tritt im Massenspektrum nicht auf. Die Zusammensetzung der beobachteten Addukte ist in Abb. 10.7 tabellarisch aufgeführt. Es zeigt sich, daß Addukte mit mehreren Trifluoracetationen maximal drei Ladungsträger in Form von H^+ enthalten. Enthält ein Addukt vier positive Ladungsträger, so wird einer davon durch Na^+ bzw. K^+ gestellt (vgl. Signalgruppe 5 in Abb. 10.7).

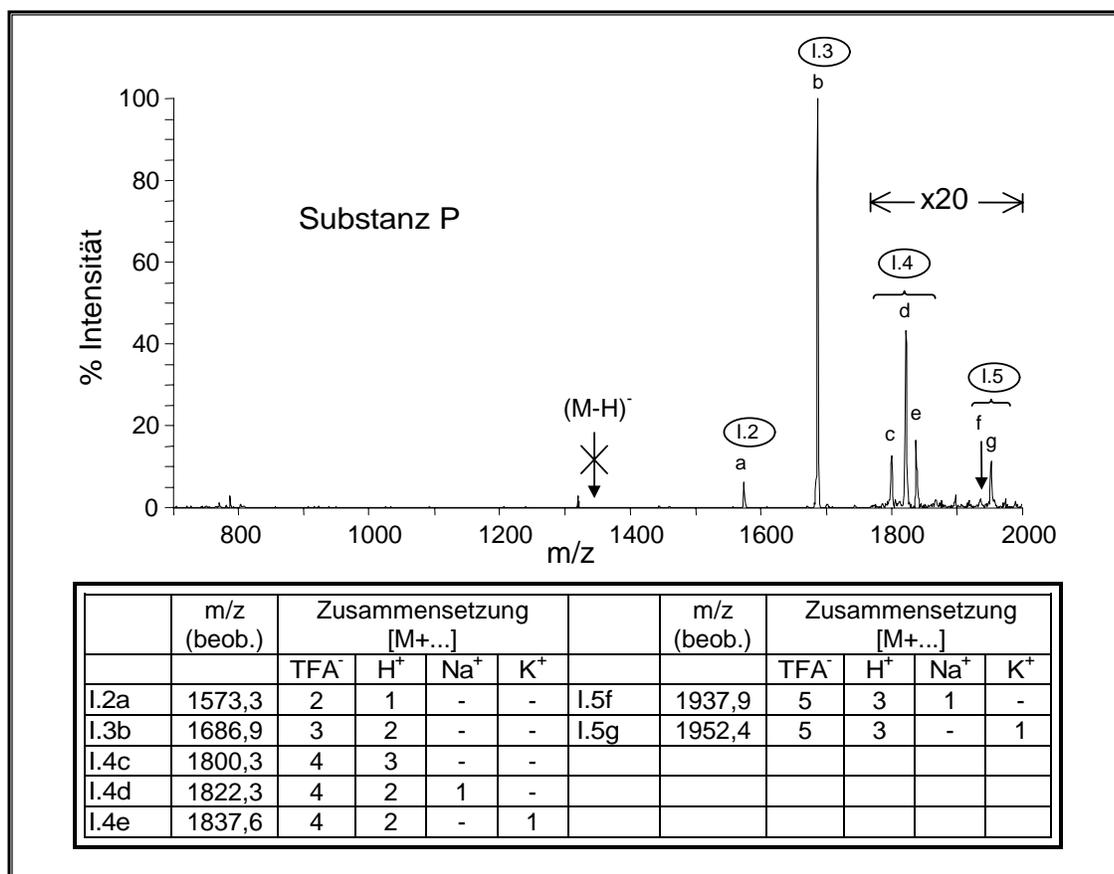


Abb. 10.7: Nano-ESI-Massenspektrum (LCQ) von Substanz P, $c = 10^{-6}$ mol/l in Methanol/Wasser (v:v 1:1), 30 mM NH_4OH , 20 mM HTFA. Zuordnung der Ionensignale siehe Tabelle.

Das Nano-ESI-Massenspektrum von Bradykinin, einem Gewebehormon [Mer89], im negativen Ionenmodus ist in Abb. 10.8 dargestellt. Die Sequenz des Nonapeptids weist zwei basische Aminosäuren auf; C- und N-Terminus liegen in unmodifizierter Form vor (Abb. 10.5). Auch dieses Peptid wird im Ladungszustand -1 nachgewiesen und ist im Massenspektrum sowohl als deprotoniertes Molekülion als auch mit ausgeprägten Anlagerungen von Trifluoracetationen, Na^+ und K^+ zu beobachten. Die Zusammensetzung der einzelnen Addukte ist in Abb. 10.8 tabellarisch zusammengestellt. Es wird ersichtlich, daß im Fall von Bradykinin formal maximal drei H^+ in einem Addukt zu beobachten sind, wobei die Intensität des entsprechenden Signals bereits recht gering ist. Addukte mit mehr als drei positiven Ladungsträgern enthalten eine entsprechende Anzahl von Na^+ bzw. K^+ .

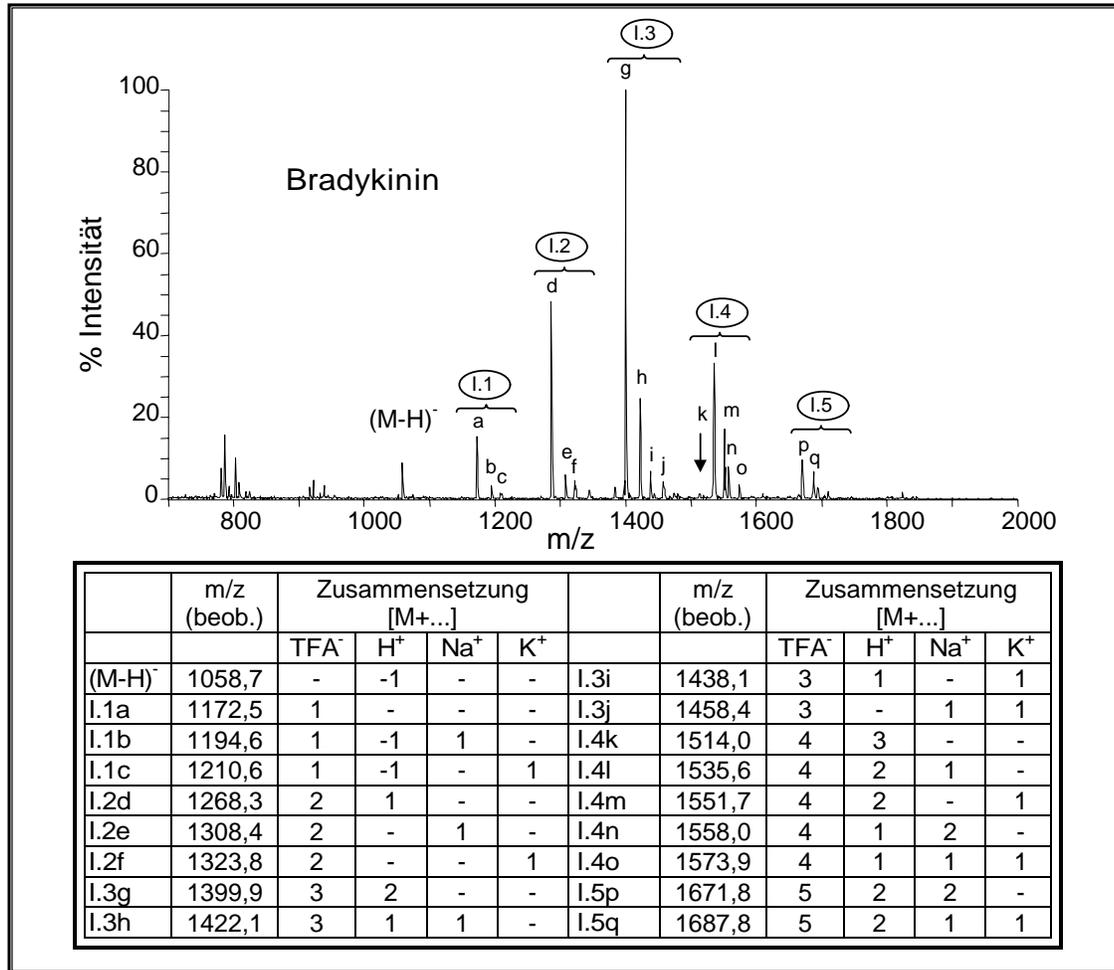


Abb. 10.8: Nano-ESI-Massenspektrum (LCQ) von Bradykinin, $c = 10^{-5}$ mol/l in Methanol/Wasser (v:v 1:1), 30 mM NH_4OH , 20 mM HTFA. Zuordnung der Ionensignale siehe Tabelle.

[Glu¹]-Fibrinopeptid, das vierte Peptid der untersuchten Reihe, stellt eine Modifikation des Fibrinopeptid B dar, welches bei der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin freigesetzt wird. Die Peptidsequenz enthält eine basische Aminosäure und vier saure Aminosäuren; C- und N-Terminus liegen in unmodifizierter Form vor. Das Massenspektrum im negativen Ionenmodus weist das Peptid sowohl im Ladungszustand -2 als auch im Ladungszustand -1 nach (Abb. 10.9). Die Zusammensetzung der beobachteten Addukte ist der Tabelle in Abb. 10.9 zu entnehmen. Der Vergleich der Signalgruppen 2.4 und 2.5 in Abb. 10.9 zeigt, daß im Fall des [Glu¹]-Fibrinopeptids maximal zwei H^+ in den Addukten beobachtet werden können. Enthält ein Addukt formal eine größere Anzahl positiver Ladungsträger, so werden diese wiederum durch Na^+ gebildet.

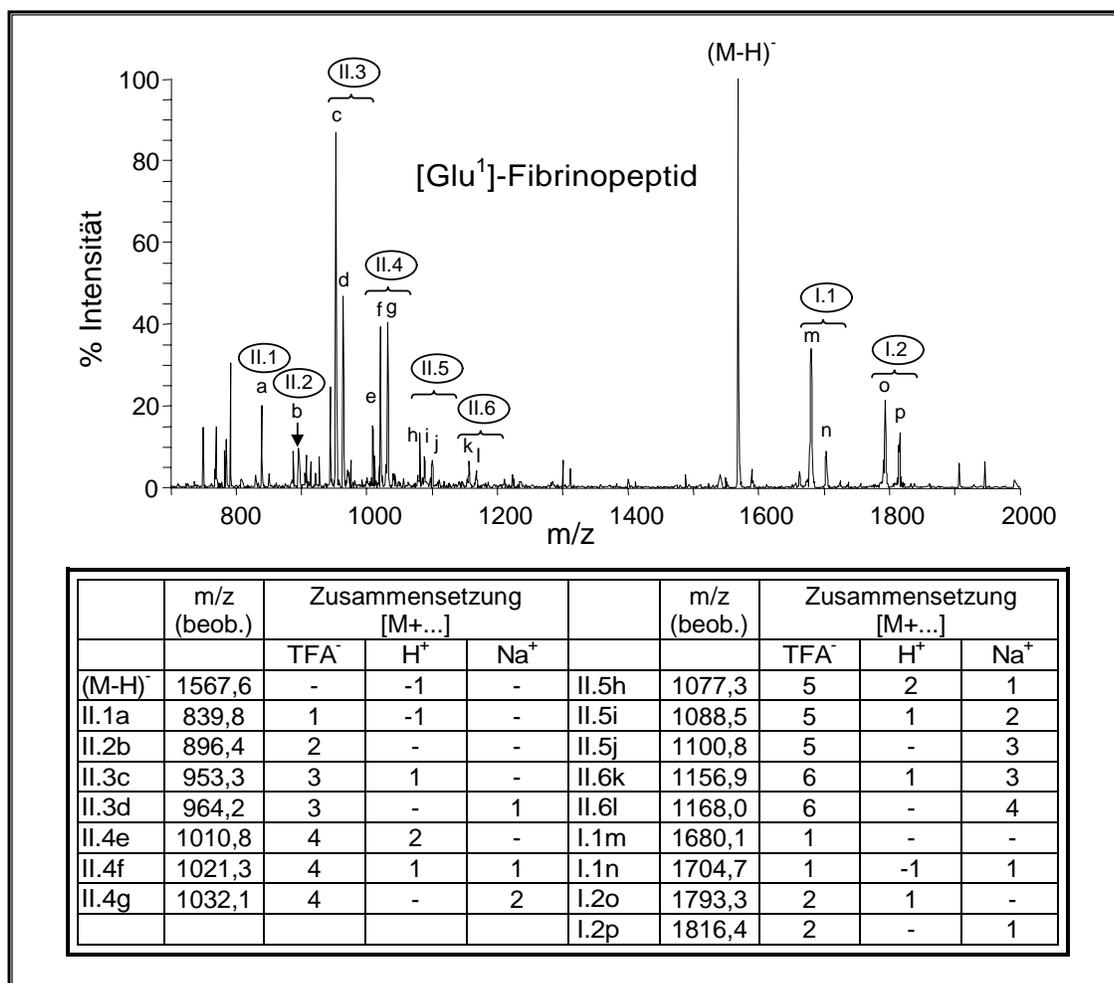


Abb. 10.9: Nano-ESI-Massenspektrum (LCQ) von $[Glu^1]$ -Fibrinopeptid, $c = 10^{-5}$ mol/l in Methanol/Wasser (v:v 1:1), 30 mM NH_4OH , 20 mM HTFA. Zuordnung der Ionensignale siehe Tabelle.

10.3. Diskussion

Der Ladungszustand eines Peptids in Lösung wird empfindlich durch Säure-Base-Reaktionen und damit durch den pH-Wert der Lösung bestimmt. Wird das Peptid allerdings unter den Bedingungen der ESI-MS in die Gasphase transferiert, so legen Gasphasenreaktionen letztendlich fest, welche Ionen massenspektrometrisch detektiert werden können. Entsprechend den Modellvorstellungen zum Mechanismus der Ionisierung (vgl. Kap. 3.1.3) und in Analogie zu den Vorgängen in protonengebundenen Dimeren wird in einem molekularen Cluster bei Verfügbarkeit eines Protons stets das Teilchen protoniert, welches die höchste Protonenaffinität aufweist. Resultiert durch diesen Prozeß ein Neutralteilchen, so kann dieses aus dem Cluster verdampfen. Die Addukte zwischen Peptid und Anionen stellen in diesem Prozeß einen Zwischenzustand dar, der nur dann beobachtet werden kann, wenn die Teilchen während des Desolvatisierungsprozesses nicht zu stark angeregt werden.

Im Fall der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Peptide und Anionen ist eine ausgeprägte Adduktbildung nur im negativen Ionenmodus zu beobachten. Bei der Untersuchung neutraler oder saurer Analytlösungen im negativen Ionenmodus stellen die Anionen die überschüssigen Ladungsträger auf der Oberfläche der initialen Tropfen dar, und sie gelangen somit mit hoher Wahrscheinlichkeit in die *offspring droplets*, aus welchen die Freisetzung der Analytionen erfolgt (vgl. Kap. 3.1.2). Wird das Lösungsmittel aus dem verbleibenden molekularen Cluster vollständig entfernt, so kommen Peptide und Anionen in unmittelbarem Kontakt, und es entstehen Peptid-Anionen-Addukte (Abb. 10.10 A). Im positiven Ionenmodus dagegen werden die überschüssigen Ladungsträger in der Regel durch Protonen, protonierte Analytionen oder Na^+ -Ionen gestellt, und die positiven Ionen (z.B. protonierte Peptide) gelangen bevorzugt in die *offspring droplets*. Für die Anionen in ihrer Eigenschaft als Gegenionen besteht somit im positiven Ionenmodus eine geringere Wahrscheinlichkeit, ebenfalls in die *offspring droplets* zu gelangen. Zudem begünstigt der Überschuss an Protonen die Protonierung der Anionen, bevor diese überhaupt in Kontakt mit dem Peptid gelangen. Die Bildung von Peptid-Anionen-Addukten findet daher im positiven Ionenmodus in deutlich geringerem Ausmaß statt (Abb. 10.10 B).

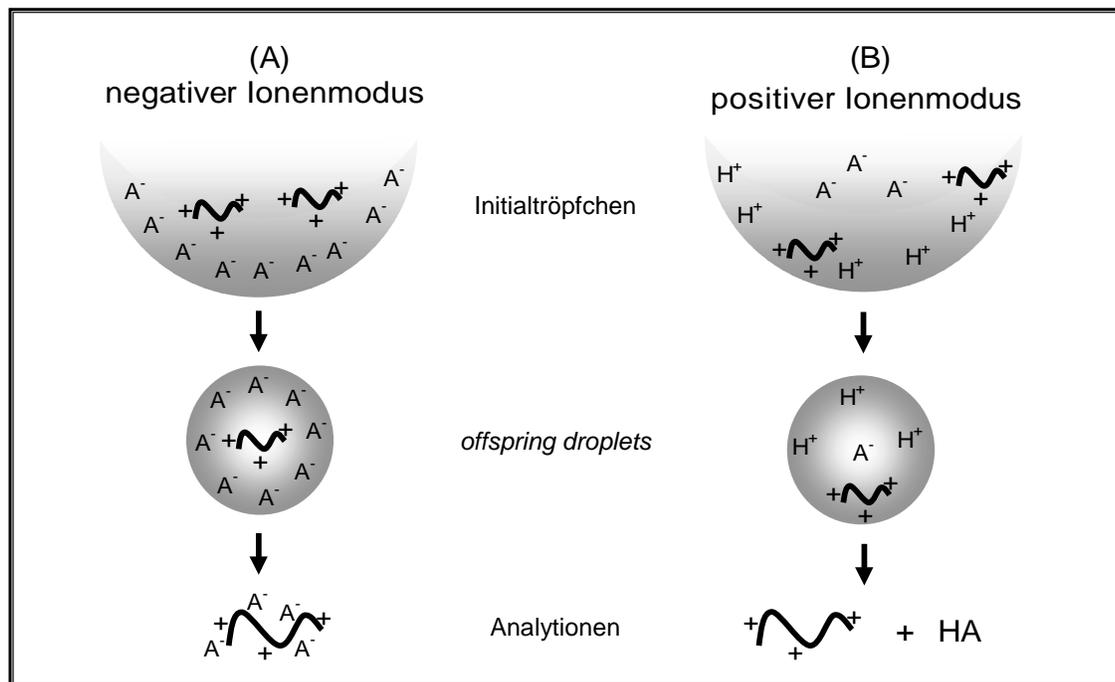


Abb. 10.10: Schematische Darstellung der Verteilung von Analyt und Anionen beim Zerfall der initialen Tropfen am Beispiel neutraler oder saurer Analytlösungen. A^- : Anion. (A) negativer Ionenmodus, (B) positiver Ionenmodus.

10.3.1. Einfache Neurotensin-Anionen-Addukte

Die in Kap. 10.2.1 vorgestellten Resultate zeigen, daß der Nachweis von Addukten aus Neurotensin und verschiedenen Anionen in deutlichem Maße von der Art des eingesetzten Anions abhängig ist. Bereits aus dem Auftreten oder Fehlen eines Addukts in den entsprechenden Massenspektren lassen sich dabei erste Rückschlüsse auf die Stabilität dieser Spezies ziehen. In einem Addukt der Form $(M+X)^-$ mit $X = \text{Anion}$, die das Peptid Neurotensin mit den verschiedenen Anionen zu bilden vermag, konkurrieren formal das deprotonierte Peptid und das Anion um ein Proton. Da die Glutaminsäure-Carboxylatgruppe des Neurotensins (vgl. Abb. 10.5) eine etwas höhere Gasphasenbasizität als die C-terminale Carboxylatgruppe aufweisen sollte, kommt für eine Deprotonierung bevorzugt der C-Terminus in Frage. Dessen Gasphasenbasizität sollte wiederum in der Größenordnung einer deprotonierten α -Aminocarbonsäure und damit in der Größenordnung des Glycin-Anions liegen (vgl. Tab. 10.1). Aus dem Vergleich der Gasphasenbasizitäten der untersuchten Spezies in Tab. 10.1 ergibt sich, daß eine Reaktion der Form



somit nur dann freiwillig abläuft, wenn das Addukt ein Anion in Form Acetat oder Formiat enthält. Die Wechselwirkungen zwischen dem resultierenden Peptidion und der entstandenen Säure sind offenbar so gering, daß ein solches Teilchen bereits während der Desolvatisierung leicht zerfällt. Die Dissoziation vor der massenspektrometrischen Analyse bewirkt, daß es in den Spektren nicht beobachtet werden kann. In Addukten von Neurotensin mit Chlorid, Dichloracetat und Trifluoracetat sollte dagegen das Proton – entsprechend den Gasphasenbasizitäten – bevorzugt am C-Terminus des Peptids angelagert sein. Da die Addukte mit diesen Anionen in den Massenspektren in deutlichem Maße nachgewiesen werden, ist zu folgern, daß der Energieeintrag während der Desolvatisierung nicht zur Dissoziation dieser Teilchen ausreicht. Werden die Addukte durch Stöße stark angeregt, beispielsweise im Rahmen eines MS^2 -Experiments, so kann auch aus den Addukten mit Chlorid, Dichloracetat und Trifluoracetat eine Abspaltung der korrespondierenden Säure beobachtet werden. Der Energieeintrag ermöglicht somit den Transfer eines Protons zum Teilchen niedrigerer Gasphasenbasizität. Anhand der MS^2 -Spektren läßt sich allerdings nicht beurteilen, ob und in welchem Maße eine Fragmentierung der Form $(M+X)^- \rightarrow M + X^-$ stattfindet; die Einschränkungen des Massenbereichs des LCQ im MS^2 -Betrieb lassen einen Nachweis der entsprechenden Anionen nicht zu (vgl. Kap. 4.2.3).

10.3.2. *Der Einfluß des Anions auf die Adduktbildung*

In den in Kap. 10.2.1 vorgestellten Untersuchungen von gemischten Peptid-Anionen-Addukten des Typs $[\text{MH}^+\text{X}_1^-\text{X}_2^-]$ (mit M = neutrales Peptid) konkurrieren formal drei verschiedene Spezies um ein verfügbares Proton. Entsprechend der in Kap. 10.3.1 vorgestellten Argumentation können derartige Addukte nur unter der Voraussetzung beobachtet werden, daß beide beteiligten Anionen X_1^- und X_2^- eine geringere Gasphasenbasizität als das deprotonierte Peptid aufweisen. Ist diese Voraussetzung nicht erfüllt, so ist das betreffende Anion in der Lage, das neutrale Peptid zu deprotonieren. Das Addukt fragmentiert in der Folge unter Abspaltung der Säure HX. Gemischte Peptid-Anionen-Addukte sind demnach prinzipiell nur in Anwesenheit der Anionen Trifluoracetat, Dichloracetat und Chlorid zu beobachten.

Aus den Resultaten der MS^2 -Experimente (vgl. Tab. 10.3) ergibt sich die in (Gl. 10.8) zusammengestellte Reihenfolge bevorzugt abgespaltener Säuren HX.



Da keine Addukte des Peptids mit den Anionen Acetat und Formiat beobachtet werden konnten, ist zu folgern, daß die korrespondierenden Säuren dieser Anionen leichter abzuspalten sind als HCl, HDCA und HTFA. Eine qualitative Unterscheidung zwischen Acetat und Formiat ist allerdings auf dieser Basis nicht möglich.

Anhand der Gasphasenbasizitäten der Komponenten des Addukts $[\text{MH}^+\text{X}_1^-\text{X}_2^-]$ kann das energetisch bevorzugte Produkt einer Protonentransferreaktion ermittelt werden. Am neutralen Neurotensin-Molekül weisen die basischen Arginin-Seitenketten die höchste Gasphasenbasizität auf und kommen so als potentielle Protonierungsstellen in Frage. Der Vergleich der Gasphasenbasizitäten zeigt allerdings, daß auch unter Berücksichtigung von Effekten der Selbstsolvatisierung am Peptid der Protonentransfer bevorzugt zu den beteiligten Anionen erfolgt. Demnach sollten die Unterschiede zwischen deren Gasphasenbasizitäten entscheidend beeinflussen, welche Säure HX das energetisch günstigste Reaktionsprodukt darstellt. Der Vergleich mit den in Tab. 10.1 zusammengestellten Werten zeigt, daß die beobachtete Reihenfolge mit der Abnahme der Gasphasenbasizität der Anionen korreliert.

Für die Fragmentierung der gemischten Addukte ist ebenfalls von Bedeutung, welche Stabilisierung das Addukt gegenüber den isolierten Produkten einer Protonentransferreaktion aufweist. Unter den Bedingungen der ESI-MS konnte bereits gezeigt werden, daß die Polarisierbarkeit eines Moleküls erheblich die Stabilität verschiedener Alkaliion-Säureamid-Addukte beeinflusst [Str99a]. Auch bei der Untersuchung protonengebundener Dimere

spiegeln sich die Ion-Molekül-Wechselwirkungen zwischen den Produkten einer Protonen-transferreaktion in der meßbaren Bindungsenergie wider [Pri98]. Die Stärke der Ion-Molekül-Wechselwirkungen in den beobachteten Addukten soll am Beispiel von HCl in Gegenwart einer Punktladung abgeschätzt werden, wobei der abschirmende Einfluß des Peptids auf diese Wechselwirkung vernachlässigt wird.

Ein HCl-Molekül weist ein Dipolmoment von $3,7 \cdot 10^{-30}$ Cm auf; seine Polarisierbarkeit α beträgt $2,9 \text{ C}^2\text{J}^{-1}\text{m}^{-1}$ [CRC95]. Bei Wechselwirkung des Moleküls mit einer Punktladung im Abstand $r = 250 \text{ pm}$ ^[1] ergibt sich gemäß (Gl. 10.4 a) eine maximale Ion-Dipol-Wechselwirkungsenergie von 51 kJ/mol (bei $\Theta = 0^\circ$). Der Beitrag der Wechselwirkung zwischen Ion und induziertem Dipol (Gl. 10.4 b) ergibt sich zu 46 kJ/mol, so daß die gesamte Wechselwirkungsenergie in der Größenordnung von 100 kJ/mol liegt. Die Wechselwirkungsenergie zwischen Trifluoressigsäure bzw. Dichloressigsäure und einer Punktladung sollte ebenfalls in dieser Größenordnung liegen.

Diese Stabilisierung hat zur Folge, daß die gemischten Addukte des Typs $[\text{MH}^+\text{X}_1^-\text{X}_2^-]$ massenspektrometrisch beobachtet werden können. Erst bei ausreichender Anregung, beispielsweise durch Stöße im Rahmen eines MS^2 -Experiments, fragmentieren sie unter Abspaltung der korrespondierenden Säure zum Anion mit der höheren Gasphasenbasizität.

10.3.3. *Der Einfluß des Peptids auf die Adduktbildung*

Die in den Kapiteln 10.2.1 und 10.2.2 vorgestellten Resultate zeigen, daß die beobachteten Addukte – entsprechend ihrem Netto-Ladungszustand – neben dem Peptid und einer gewissen Anzahl von Anionen auch positive Ladungsträger in Form von H^+ und Na^+ enthalten. Bei Untersuchung verschiedener Peptide zeigt sich dabei, daß in Addukten des Typs $[\text{M}+n\text{TFA}^-+m\text{Y}^+]^{(n-m)-}$ (mit $\text{Y}^+ = \text{H}^+$ oder Na^+) die maximale Anzahl der enthaltenen Protonen der Anzahl der basischen Aminosäuren zuzüglich des N-Terminus entspricht. Enthält ein Addukt mehr positive Ladungsträger, so sind diese Na^+ - oder K^+ -Ionen. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß Addukte mit einer größeren Anzahl von H^+ bereits vor der massenspektrometrischen Analyse unter Abspaltung von HTFA fragmentieren. Die formale Übertragung eines Na^+ auf ein Trifluoracetation führt dagegen zur Entstehung eines schwer verdampfbaren neutralen Teilchens, so daß in einem solchen Fall NaTFA im detektierten Adduktion enthalten bleibt.

In den vorgestellten Untersuchungsreihen liegen die Peptide in der Analytlösung bei pH 7,5 in Lösung an den Carboxylgruppen in deprotonierter Form vor, während die basischen Gruppen

¹ Der Abstand entspricht der typischen Bindungslänge in einer Wasserstoffbrückenbindung, vgl. [Hol85]

noch überwiegend protoniert sind ^[1]. Während des ESI-Prozesses gelangen die Peptidionen in einen molekularen Cluster, der neben Trifluoracetat ebenfalls NH_4^+ als Gegenionen enthält. Aufgrund der vergleichsweise geringen Gasphasenbasizität des NH_3 (vgl. Tab. 10.1) finden im Anschluß Protonentransferreaktionen zum deprotonierten Peptid und Trifluoracetat statt. Aufgrund der Gasphasenbasizitäten (vgl. Tab. 10.1) sollten dabei zunächst die Carboxylat-Gruppen des Peptids protoniert werden. Treten basische Aminosäuren und N-Terminus in Konkurrenz mit Trifluoracetat, so ist auch unter Berücksichtigung der Selbstsolvatisierung ein Protonentransfer zu Trifluoracetat energetisch begünstigt (vgl. Kap. 10.1).

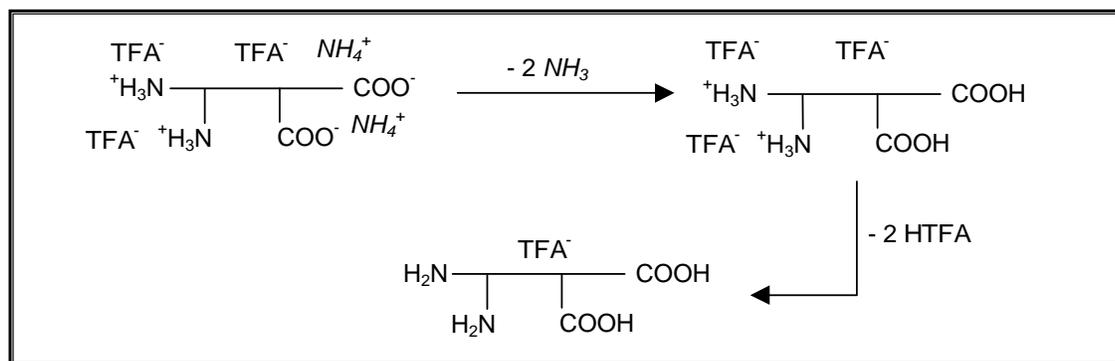


Abb. 10.11: Schematische Darstellung der aufgrund der Gasphasenbasizitäten zu erwartenden Protonentransferreaktionen in einem molekularen Cluster aus deprotoniertem Peptid, Trifluoracetat und Ammoniumionen.

Die in Kap. 10.2.2 vorgestellten Resultate zeigen darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen der maximalen Anzahl im Addukt enthaltener Protonen und der Anzahl basischer Gruppen in der Sequenz auf. Daher ist es für die Stabilität der Addukte und damit für ihren massenspektrometrischen Nachweis offensichtlich von Bedeutung, welche Gasphasenbasizität die Stelle des Peptids aufweist, die mit einem Trifluoracetation in Konkurrenz um ein Proton tritt. Ist an einer Protonentransferreaktion auf der Seite des Peptids eine Gruppierung geringer Gasphasenbasizität beteiligt, so ist die Stabilität des resultierenden Addukts nicht mehr für einen intakten Nachweis ausreichend. Zur Erklärung dieses Phänomens bieten sich zwei verschiedene Ansätze an, die im folgenden diskutiert werden sollen.

Der eine zur Diskussion stehende Erklärungsansatz beruht auf der Berücksichtigung der räumlichen Verhältnisse während der Protonentransferreaktionen im molekularen Cluster. Voraussetzung für eine Reaktion ist, daß die Reaktanden sich in räumlichem Kontakt miteinander befinden. Konkurrieren eine basische Aminosäure und ein Trifluoracetat-Ion um ein Proton, so ist der Transfer zum Trifluoracetat-Ion energetisch begünstigt. Allerdings

¹ So weist beispielsweise ein Glutaminsäure-Rest einen pK_s -Wert von 4,3 auf; ein Lysin-Rest besitzt einen pK_s von 10,5 (vgl. [CRC95]).

liegen die basischen Gruppen des Peptids bei pH 7,5 bereits protoniert in Lösung vor, so daß zum Protonentransfer im Cluster ein Trifluoracetation zufällig an einer protonierten basischen Gruppe lokalisiert sein muß. Ist diese Bedingung nicht erfüllt, so sollte auch kein Protonentransfer zu beobachten sein.

Stehen ein Trifluoracetation und eine protonierte basische Gruppe des Peptids miteinander in räumlichem Kontakt, so sind die unmittelbaren Wechselwirkungen zwischen diesen Gruppen ebenfalls für die Stabilität des Addukts von Relevanz. In Analogie zu den Verhältnissen bei Bildung eines intramolekularen Peptid-Zwitterions (vgl. Kap. 10.1) ist prinzipiell ebenfalls eine Struktur des Addukts möglich, in der eine protonierte Gruppe des Peptids und ein Trifluoracetation in Form einer Salzbrücke vorliegen. Der Effekt bei Bildung einer Salzbrückenstruktur kann an einem vereinfachenden Beispiel demonstriert werden.

Abb. 10.12 A zeigt schematisch die Potentialkurve eines protonengebundenen Dimers aus Trifluoracetat und dem Lysin-Rest eines Peptids. Die Differenz der Protonenaffinitäten von Lysin und Trifluoracetat (vgl. Tab. 10.1) beträgt ohne Berücksichtigung von Selbstsolvatisierungseffekten innerhalb des Peptids 372 kJ/mol. Die Protonierung des Trifluoracetats ist somit energetisch stark begünstigt, wenn jeweils von räumlich getrennten Reaktionsprodukten ausgegangen wird. Im protonengebundenen Dimer stehen jedoch die Reaktionsprodukte in direktem räumlichen Kontakt miteinander. Ein Protonentransfer zum Trifluoracetat führt unter dieser Bedingung zu einer Stabilisierung des Addukts durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, deren Ausmaß von der räumlichen Anordnung beider Dipole zueinander abhängig ist. Die maximale potentielle Energie der Wechselwirkung ergibt sich in einer kolinearen Anordnung beider Dipole, in der das positive Ende des einen Dipols am negativen Ende des anderen Dipols angeordnet ist. Es gilt unter dieser Bedingung (vgl. [Bur88]):

$$(Gl. 10.9) \quad E_{\text{Dipol-Dipol}} \propto -\frac{2\mu_1\mu_2}{r^3}$$

mit μ_1, μ_2 : Dipolmomente der Moleküle
r: Abstand der Moleküle

Die maximale Wechselwirkungsenergie liegt für zwei Moleküle mit Dipolmomenten im Bereich von $5 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$ ($= 1,5 \text{ Debye}$) und einem Abstand von 300 pm in der Größenordnung von 10 kJ/mol . Die resultierende Stabilisierung gegenüber räumlich getrennten Molekülen ist demnach bei Protonentransfer zum Trifluoracetat sehr gering.

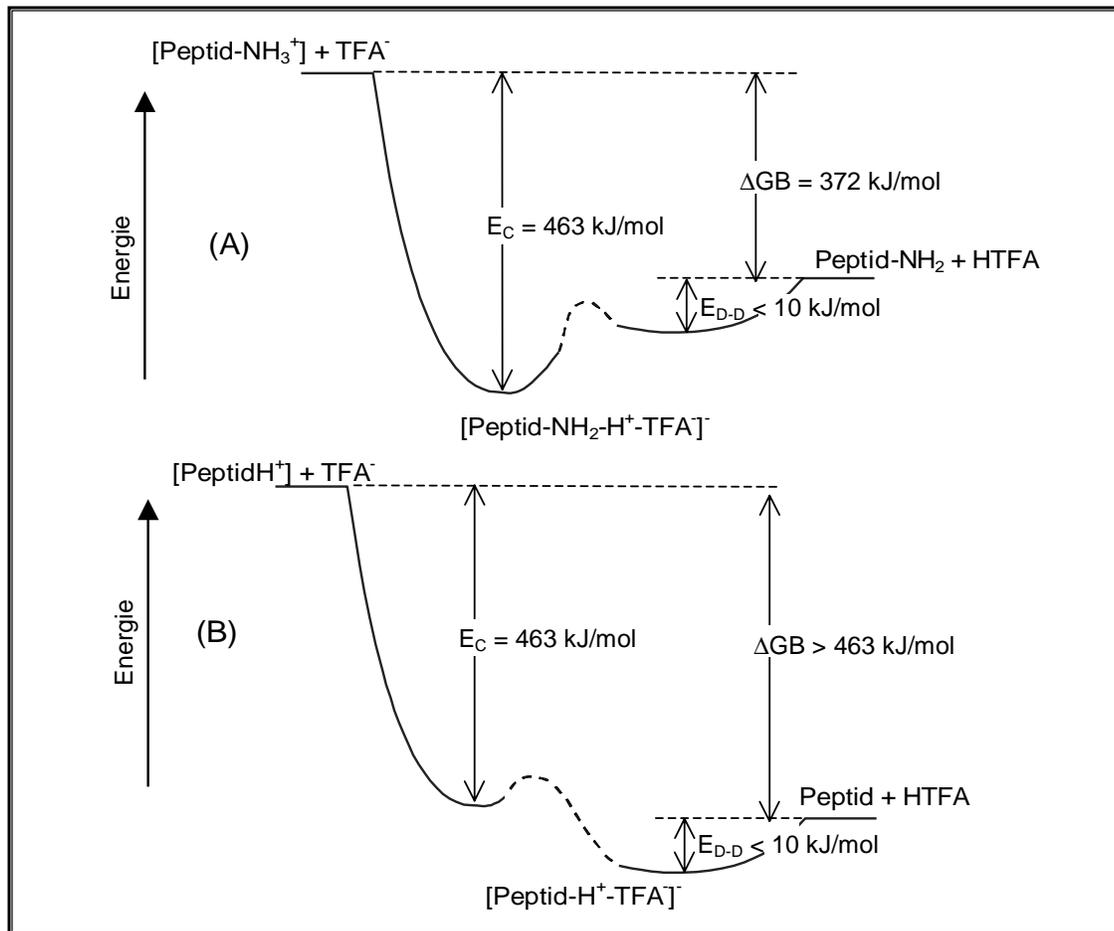


Abb. 10.12: Schematische Darstellung der Potentialkurve eines protonengebundenen Dimers aus Trifluoracetat und einem Peptid. (A) Konkurrenz mit einem Lysin-Rest; (B): Konkurrenz mit einer Stelle erheblich geringerer Gasphasenbasizität. E_C : Coulomb-Energie bei einem Bindungsabstand von 300 pm ; E_{D-D} : Dipol-Dipol-Wechselwirkungsenergie bei einem Bindungsabstand von 300 pm

Wird das Proton dagegen formal auf den Lysin-Rest übertragen, so resultiert ein Ionenpaar, dessen Coulomb-Energie E_C gemäß (Gl. 10.10) beschrieben wird:

$$(Gl. 10.10) \quad E_C = \frac{q_1 q_2}{4\pi \cdot \epsilon_0 r}$$

mit q_1, q_2 : Ladung der Ionen

10. Die Charakterisierung von Peptid-Anionen-Addukten

Bei einem Bindungsabstand von 300 pm ist ein solches Ionenpaar um 463 kJ/mol gegenüber den getrennten Ionen stabilisiert. Diesen Betrachtungen zufolge stellt die Salzbrückenstruktur des Addukts ein Minimum der Potentialkurve dar, wobei gilt:

$$(Gl. 10.11) \quad \Delta GB + E_{D-D} < E_C$$

mit ΔGB : Differenz der Gasphasenbasizitäten
 E_{D-D} : Energie der Dipol-Dipol-Wechselwirkung
 E_C : Energie der Coulomb-Wechselwirkung

Ist die Differenz der Gasphasenbasizitäten der Reaktionspartner größer als die Stabilisierung, die aus der Wechselwirkung eines Ionenpaars resultiert, so hat die Potentialkurve den in Abb. 10.12 B schematisch dargestellten Verlauf. Das Minimum der Kurve beruht hier nur auf der schwachen Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen neutralem Peptid und Trifluoressigsäure, so daß ein solches Addukt im Vergleich zu Fall A in geringerem Maße stabilisiert ist.

Unter Berücksichtigung von Effekten der Selbstsolvatisierung sollten alle basischen Aminosäuren sowie der N-Terminus des Peptids eine ausreichend hohe Gasphasenbasizität aufweisen, um die Bedingung aus (Gl. 10.11) zu erfüllen. Ein Addukt, in dem eine basische Stelle des Peptids und ein Trifluoracetation um ein Proton konkurrieren, ist demnach durch den Einfluß der Coulomb-Wechselwirkung gegen Protonentransfer und Fragmentierung unter Abspaltung von Trifluoressigsäure stabilisiert. Das Addukt kann massenspektrometrisch nachgewiesen werden, sofern die Anregung während der Desolvatisierung gering ist. Tritt allerdings eine weniger basische Stelle des Peptids mit Trifluoracetat in Konkurrenz um ein Proton, so wird das Addukt in erheblich geringerem Maße stabilisiert. Es zerfällt daher während der Desolvatisierung vollständig unter Abspaltung von Trifluoressigsäure.

Die beiden vorgestellten Erklärungsansätze vermögen die Beobachtung zu beschreiben, daß in einem Addukt des Typs $[M+nTFA^-+mY^+]^{(n-m)+}$ (mit $Y^+ = H^+$ oder Na^+) die maximale Anzahl der H^+ mit der Anzahl der basischen Stellen im Peptid korreliert. Ob nur einer dieser Effekte letztendlich für dieses Phänomen verantwortlich ist oder es aus einer Kombination beider Effekte resultiert, kann auf der Basis der vorgestellten Resultate nicht entschieden werden.

Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen, daß die Vorgänge während der Freisetzung eines Analyten unter den Bedingungen der ESI-MS sehr komplexer Natur sind. Die Gasphasenbasizität der in einem molekularen Cluster vorhandenen Spezies legt prinzipiell die Richtung von Protonentransferreaktionen fest. Dennoch schließt eine hohe Gasphasenbasizität eines Anions im Cluster nicht automatisch eine gute Abspaltbarkeit der korrespondierenden

Säure aus dem Addukt ein. Die Stabilität eines Addukts wird vielmehr ebenfalls durch die Wechselwirkungen der Teilchen untereinander bestimmt.

Der massenspektrometrische Nachweis von Addukten kann im Fall der untersuchten Peptide auch im negativen Ionenmodus durch Verschärfung der Desolvatisierungsbedingungen unterbunden werden. Die Addukte fragmentieren unter diesen Bedingungen unter Abspaltung der zu den Anionen korrespondierenden Säuren. Dennoch ist diese Maßnahme nicht generell auf alle analytischen Problemstellungen übertragbar, denn gerade bei Untersuchung sehr labiler Analyte kann die verstärkte Anregung während der Desolvatisierung bereits eine ungewollte Fragmentierung zur Folge haben.

Addukte zwischen Peptiden und Anionen aus sauren oder neutralen Analytlösungen sind insbesondere im negativen Ionenmodus zu beobachten, während im positiven Ionenmodus für keines der untersuchten Anionen entsprechende Addukte massenspektrometrisch nachzuweisen sind. Auf der Basis der vorgestellten Resultate kann daher gefolgert werden, daß zur Vermeidung von Adduktbildungen mit Anionen in der ESI-MS-Analyse Untersuchungen im positiven Ionenmodus grundsätzlich vorzuziehen sind.

11. DIE STABILITÄT NICHT-KOVALENTER KOMPLEXE IN DER ESI-MS

Da der intakte Nachweis nicht-kovalenter Komplexe mittels ESI-MS ist prinzipiell möglich ist, wird dieses Verfahren in zahlreichen Untersuchungen zur Ermittlung der Stöchiometrie dieser Verbindungen eingesetzt. Daneben ist es ebenfalls wünschenswert, die Stabilität nicht-kovalenter Komplexe mit Hilfe dieser Methode zu ermitteln und so von den Vorteilen der Massenspektrometrie (Selektivität, Empfindlichkeit und Geschwindigkeit) auch auf diesem Gebiet zu profitieren. Da aber für biochemischen Fragestellungen die Stabilität von Komplexen in Lösung entscheidend ist, dagegen bei der ESI-MS die Stabilität des Komplexes in der Gasphase gemessen wird, ist bei der Interpretation der Ergebnisse Vorsicht geboten. In Lösung bestimmen sowohl van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen sowie hydrophobe Wechselwirkungen die Stärke der Bindung im Komplex (vgl. Kap. 2.1); in Abwesenheit des hochpolaren Lösungsmittels Wasser erfahren die Bindungsverhältnisse allerdings eine dramatische Änderung. Hier gewinnen Coulombwechselwirkungen aufgrund der fehlenden Abschirmung durch das polare Lösungsmittel an Bedeutung, während hydrophobe Wechselwirkungen vollständig entfallen. Die Stabilität in der Gasphase kann infolgedessen in krassem Widerspruch zur Stabilität in Lösung stehen. In diesem Zusammenhang berichten Feng et al. [Fen95] von der ungewöhnlich erhöhten Stabilität eines Spermin-Peptid-Komplexes in der Gasphase, der in Lösung nur eine schwache Bindung aufweist. Umgekehrt beobachteten Robinson et al. [Rob96] den Anteil nur geringer Mengen von intakten Komplexen in der Gasphase, die in Lösung im wesentlichen durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert werden. Auch eine große Zahl von DNA-Peptid- (bzw. RNA-Peptid-) Komplexen, die bisher mit ESI-MS nachgewiesen werden konnten, werden in der Gasphase durch Coulomb-Wechselwirkungen stabilisiert [Smi97].

Im vorliegenden Kapitel soll der Einfluß von Coulomb-Wechselwirkungen auf die Stabilität der Häm-Protein-Komplexe Myoglobin und Hämoglobin demonstriert werden. Die Resultate dieser Untersuchungen finden sich in Kap. 11.3; eine Diskussion erfolgt in Kap. 11.4. Die Strukturmerkmale dieser Verbindungen und bereits vorgenommene ESI-MS-Untersuchungen an diesen speziellen nicht-kovalenten Komplexen werden in den Kapiteln 11.1 und 11.2 vorgestellt.

11.1. Strukturmerkmale von Hämoglobin und Myoglobin

Hämoglobin und Myoglobin gehören zur Gruppe der globulären Proteine; beiden Proteinen kommt im Organismus die Funktion des Sauerstofftransports zu. Ihre Struktur ist in der Literatur eingehend beschrieben; einen Überblick hierzu findet sich z.B. bei Stryer [Str90]. Hämoglobin besteht aus insgesamt vier Protein-Untereinheiten, zwei α - und zwei β -Ketten, die als nicht-kovalenter Komplex zusammen die biologisch aktive Quartärstruktur ($\alpha_2\beta_2$) bilden. An jede der Untereinheiten ist über einen deprotonierten Histidinrest koordinativ ein Metalloporphyrinkomplex gebunden, das Häm. Myoglobin dagegen besteht nur aus einem Proteinstrang, an den ebenfalls über einen deprotonierten Histidinrest das Häm als prosthetische Gruppe koordinativ gebunden ist. Obwohl sich Myoglobin und die verschiedenen Untereinheiten des Hämoglobins in ihrer Aminosäuresequenz deutlich unterscheiden, weisen sie doch erhebliche Ähnlichkeiten in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur auf. Exemplarisch sind die Struktur des Myoglobins und der Häm-Gruppe in Abb. 11.1 dargestellt.

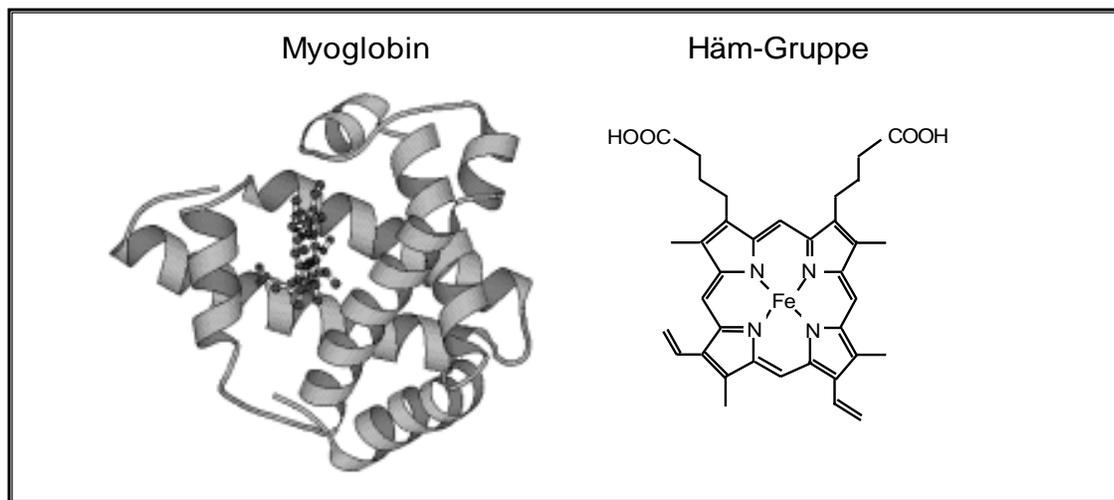


Abb. 11.1: Schematische Darstellung des Myoglobins^[1] und der Häm-Gruppe; hier in der Ferro-Form.

Der intakte Komplex aus Proteinstrang und prosthetischer Gruppe wird als „holo-Form“ bezeichnet, während das Protein nach Häm-Verlust in der „apo-Form“ vorliegt. Die Bindungsstelle des Häms befindet sich sowohl im Myoglobin als auch in den Hämoglobin-Untereinheiten in einer „Tasche“ des Proteinstrangs [Str90]. Am Beispiel von Myoglobin konnte gezeigt werden, daß dieses Strukturmerkmal auch nach säureinduzierter Denaturierung des Proteins teilweise erhalten bleibt [Sag90].

¹ Nach Promise Prosthetic Group and Metal Ions in Protein Active Sites Database V. 2.0 (<http://bmbsgi11.leeds.ac.uk/bmbknd/promise/1mbo.html>)

In den biologisch aktiven Formen von Hämoglobin und Myoglobin tritt das Eisen im Metalloporphyrinkomplex mit der Oxidationszahl +2 auf; der Komplex liegt in der sogenannten „Ferro-Form“ vor. Da dem Porphyrinring im Komplex die Ladung -2 zukommt, weist der Metalloporphyrinkomplex somit die Nettoladung Null auf.

Nur in dieser Ferro-Form ist das zentrale Eisenion in der Lage, im Häm-Protein-Komplex die letzte der sechs Koordinationsstellen reversibel mit O_2 zu besetzen. Kommerziell erhältliche Myoglobin- bzw. Hämoglobin-Proben sind jedoch in der Regel durch Kontakt mit Luftsauerstoff oxidiert, so daß hier das Eisen mit der Oxidationszahl +3 und somit das Häm in der einfach positiv geladenen „Ferri-Form“ vorliegt. Durch Zusatz von DTT (Dithiothreitol) zu Hämoglobin- bzw. Myoglobin-Lösungen kann das Ferri-Häm wieder zur Ferro-Form reduziert werden (vgl. z.B. [Kon94]).

11.2. Häm-Protein-Komplexe in der ESI-MS

Die Häm-Protein-Komplexe Hämoglobin und Myoglobin werden häufig als Modellsysteme für die Untersuchung nicht-kovalenter Komplexe (als typischer Vertreter der Gruppe „Protein/Cofaktor-Komplexe“) mittels ESI-MS herangezogen.

Covey et al. beobachteten bereits bei der Untersuchung von Myoglobin unter denaturierenden Lösungsbedingungen in den Massenspektren eine Serie von schwachen Signalen, die aus der Anlagerung einer Häm-Gruppe an das Protein resultieren [Cov88]. Unter nativen Lösungsbedingungen konnte in der Folge der Beweis erbracht werden, daß der in Lösung vorhandene nicht-kovalente Komplex unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen intakt in die Gasphase überführt werden kann ([Kat91], [Loo93], [Jaq93]). Holo-Myoglobin und die holo-Untereinheiten des Hämoglobins wurden seitdem intensiv mittels ESI-MS untersucht. Es finden sich Untersuchungen zu folgenden Schwerpunkten:

- Fragmentierung von holo-Myoglobin und der holo- α -Untereinheit des Hämoglobins ([Kon92], [Li93])
- Rückfaltung des Proteinstrangs und Häm-Bindung nach einer durch Säurezusatz induzierten Denaturierung in Lösung ([Fen93], [Lee99a])
- Stabilität von Häm-Protein-Komplexen in der Gasphase ([Kon94], [McL94], [Sch96], [Gro97], [Che98]) und Vergleich mit der Stabilität der Komplexe in Lösung [Hun97]
- Protonentransferreaktionen in der Gasphase [Ste97]

Das intakte Hämoglobin-Tetramer ([Lig94], [Apl96]) sowie Dimere aus holo- α und holo- β -Untereinheiten ([Loo93a], [Wan96a]) konnten ebenfalls bereits unter den Bedingungen der ESI-MS nachgewiesen werden.

11.3. Ergebnisse

Die im folgenden beschriebenen massenspektrometrischen Untersuchungen wurden mit Proteinlösungen in einer Konzentration von $c = 10^{-5}$ mol/l (bezogen auf den intakten nicht-kovalenten Komplex) in H₂O bzw. 10 mM NH₄Ac-Puffer durchgeführt. Um Einflüsse durch Lagerung der Probenlösung zu minimieren, wurden die Proteinlösung unmittelbar vor jeder Meßreihe durch Verdünnung einer bei -18°C gelagerten Stammlösung hergestellt. Reduktion des Häms von der Ferri- zur Ferro-Form ließ sich durch Zusatz von Dithiothreitol (DTT) in einer Konzentration von 1 mM zur Probenlösung und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für ca. 30 Minuten erreichen.

Die Zerstäubung erfolgte mit der Nanospray-Technik aus Glaskapillaren mit einer Öffnung von ca. 2 μm . Die massenspektrometrische Analyse erfolgte sowohl am Finnigan LCQ (QIT-MS) als auch am PE Biosystems MARINER (oTOF-MS) im Aufbau mit geheizter Transferkapillare. Eine Variation der Druckverhältnisse in der ersten Druckstufe am MARINER (vgl. Kap. 6.2.1) war zum Zeitpunkt dieser Untersuchung noch nicht möglich. Die Aufnahme aller vorgestellten Massenspektren erfolgte daher bei einem Druck in der zweiten Druckstufe in der Größenordnung von $5 \cdot 10^{-1}$ Pa.

11.3.1. *ESI-MS-Untersuchungen von Hämoglobin und Myoglobin im positiven Ionenmodus*

Abb. 11.2 zeigt die Nano-ESI-oTOF-Massenspektren von Myoglobin (Pottwal) aus wäßriger Lösung. Unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen, d.h. relativ niedriger Temperatur der Transferkapillaren und geringer Potentialdifferenz zwischen geheizter Transferkapillare und erstem *skimmer*, wird Myoglobin ausschließlich in der holo-Form detektiert (Abb. 11.2 A). Die Signale sind durch unspezifische Anlagerungen verbreitert, deren Masse zu 98 Da bestimmt werden kann. Sie sind daher auf Adduktbildung des Analyten mit in der Lösung vorhandenem Phosphat bzw. Sulfat zurückzuführen.

Bei Erhöhung der Potentialdifferenz zwischen Transferkapillare und *skimmer* und der damit verbundenen Aktivierung der Analytionen setzt die stoßinduzierte Fragmentierung (CID) des nicht-kovalenten Komplexes unter Verlust der Häm-Einheit ein. Bei einer Potentialdifferenz von 200 V (Abb. 11.3 B) werden apo- und holo-Form mit annähernd gleicher Signalintensität

11. Die Stabilität nicht-kovalenter Komplexe in der ESI-MS

nachgewiesen. Der dabei freigesetzte Metalloporphyrinkomplex lässt sich dabei als Häm⁺ in der Ferri-Form detektieren, wobei das intensivste monoisotopische Signal bei einem m/z von 616,2 Da nachgewiesen wird. Die aus den Signalen ermittelten Massen von apo- und holo-Myoglobin sind zusammen mit dem theoretischen mittleren Molekulargewicht in Tab. 11.1 zusammengestellt.

	M _{ermittelt}	M _{theoretisch}
holo-Myo	17814,8	17816,1 Da
apo-Myo	17198,3	17199,9 Da

Tab. 11.1: Ermittelte und theoretische Molekülmassen^[1] für Myoglobin (Pottwal) in holo- und apo-Form

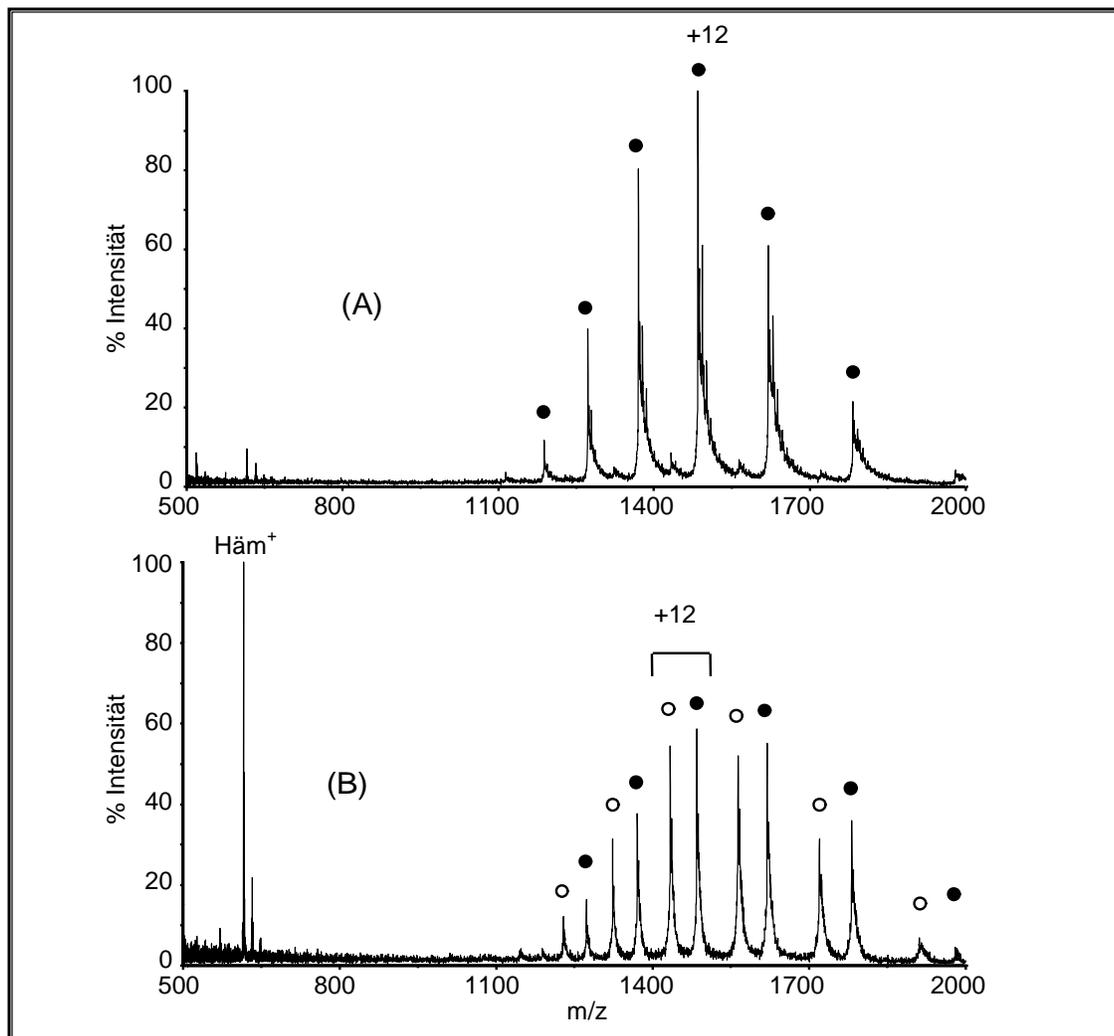
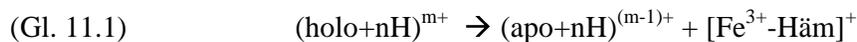


Abb. 11.2: Nano-ESI- Massenspektren (MARINER, positiver Ionenmodus) von Myoglobin (Pottwal), $c = 10^{-5}$ mol/l in H₂O, Signale der holo-Form: •, apo-Form: o ; A) $U_{Kap}=50V$, B) $U_{Kap}=200V$

¹ Datenbank des Swiss Institute of Bioinformatics, Expert Protein Analysis System ExPASy (<http://www.expasy.ch>)

Die Untersuchung von wäßrigen Myoglobin-Lösungen mit Hilfe der QIT-MS ergibt ähnliche Resultate (ohne Abbildung). Myoglobin wird unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen mit dominanter Signalintensität in der holo-Form nachgewiesen und zerfällt bei verstärkter Aktivierung unter Verlust der Häm-Gruppe in die apo-Form. Im Vergleich zu den Resultaten der TOF-MS-Analyse ist allerdings in den QIT-Massenspektren unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen ein höherer Anteil der apo-Signale zu beobachten. Dies kann einerseits auf die längere Zeitskala der Massenanalyse in der QIT-MS zurückgeführt werden (vgl. Kap. 4), welche die Wahrscheinlichkeit einer Fragmentierung erhöht. Daneben ist ebenfalls eine mögliche Aktivierung der Analytionen durch Stoß mit dem in der Falle enthaltenen Helium während des Fangprozesses zu berücksichtigen, die zur Fragmentierung des nicht-kovalenten Komplexes führen kann (vgl. Kap. 4.2.2, [Van91], [McL94a]).

Die MS^2 -Analyse der holo-Formen (ohne Abbildung) ergibt in Übereinstimmung mit [Che98],[Kon94],[Gro97] eine Fragmentierung des Komplexes gemäß:



Unter den vorliegenden Bedingungen enthält Myoglobin demnach im wesentlichen die Häm-Gruppe in der oxidierten Ferri-Form ($[\text{Fe}^{3+}\text{-Häm}]^+$).

Repräsentative Nano-ESI-TOF-Massenspektren von Hämoglobin (Rind) aus wäßriger Lösung sind in Abb. 11.3 zusammengestellt. Wie in Abb. 11.3 A zu erkennen ist, treten unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen die Ladungszustände des intakten Tetramers (inklusive der vier Häm-Einheiten) als dominante Signale im Massenspektrum auf. Allerdings ist die Signalbreite aufgrund verschiedener, hier nicht massenauflosbarer Anlagerungen deutlich erhöht. Durch Erhöhung der Potentialdifferenz zwischen Transferkapillare und erstem *skimmer* und der damit verbundenen vermehrten Anregung der Analytionen setzt die Fragmentierung des Tetramers ein (Abb. 11.3 B), so daß nun verstärkt das $\alpha\beta$ -Dimer (inklusive zwei Häm-Einheiten) sowie holo- α und holo- β nachgewiesen werden können. Signale, die den homogenen Dimeren $\alpha\alpha$ und $\beta\beta$ entsprechen, sind unter diesen Bedingungen nicht zu beobachten. Bei verstärkter Aktivierung des Analyten zwischen Transferkapillare und erstem *skimmer* setzt schließlich die Dissoziation der holo- α - und holo- β -Untereinheiten ein (Abb. 11.3 C). Ferner ist unter diesen drastischeren Bedingungen auch der Häm-Verlust aus dem Tetrameren zu beobachten, wie im Einschub in Abb. 11.3 C anhand der mit Pfeilen markierten Signale deutlich wird. Im höheren m/z -Bereich können in Übereinstimmung mit Light-Wahl et al. [Lig94] $\alpha\alpha\beta$ - bzw. $\alpha\beta\beta$ -Trimere (teilweise nach Häm-Verlust, Signale mit Pfeilen markiert) in niedrigen Ladungszuständen beobachtet werden.

11. Die Stabilität nicht-kovalenter Komplexe in der ESI-MS

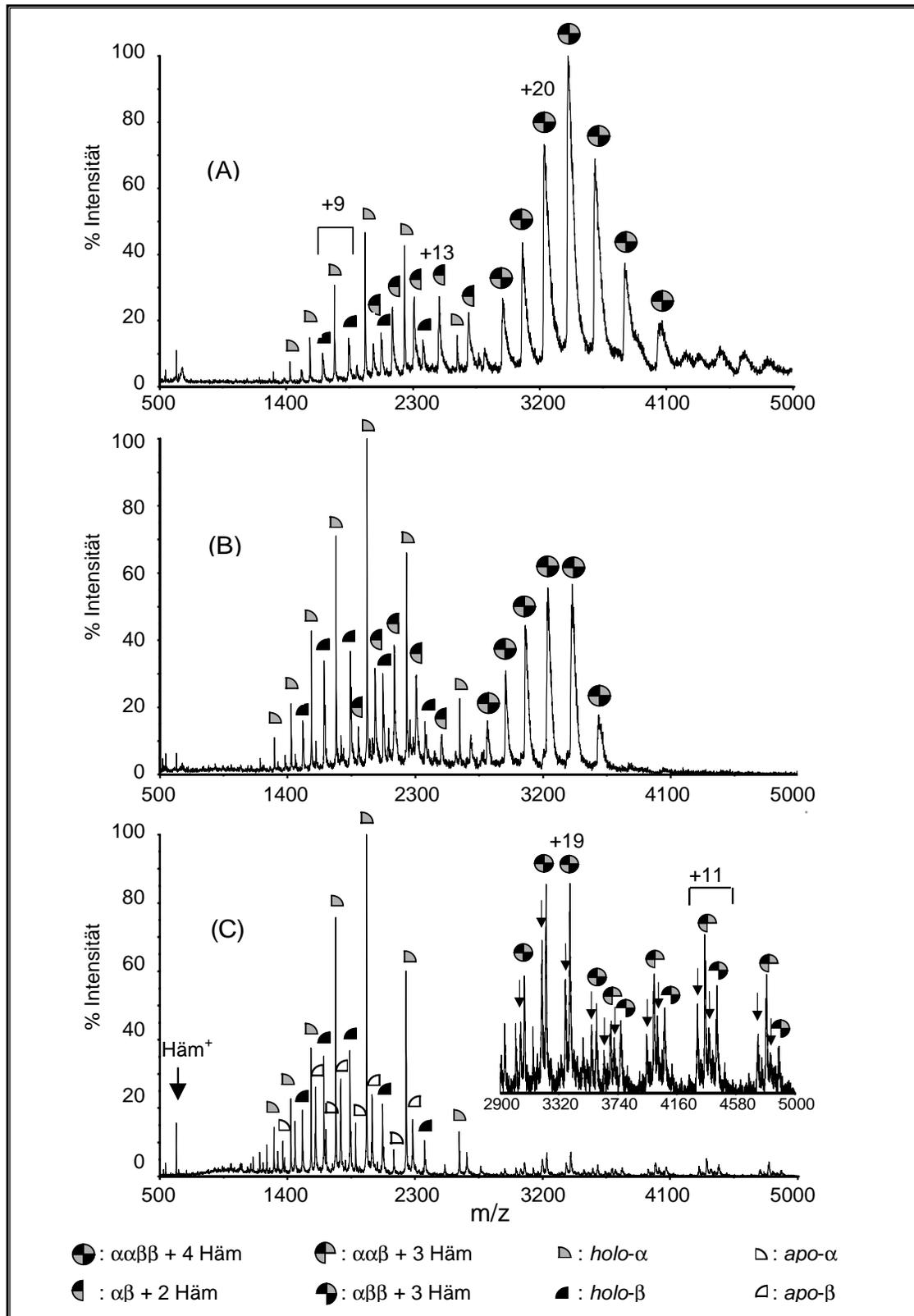


Abb. 11.3: Nano-ESI-Massenspektren (MARINER, positiver Ionenmodus) von Hämoglobin (Rind), $c = 10^{-5} \text{ mol/l}$ (bezogen auf Tetramer) aus H_2O , $T_{\text{Kap}} = 80^\circ\text{C}$, $U_{\text{ski}} = 6\text{V}$, $U_{\text{Quad}} = 5\text{V}$; A) $U_{\text{Kap}} = 13\text{V}$, B) $U_{\text{Kap}} = 50\text{V}$, C) $U_{\text{Kap}} = 300\text{V}$; die Pfeile kennzeichnen die Signale der Multimere nach Häm-Verlust.

Die nach interner Kalibrierung der Massenspektren mit den Signalen der holo- α -Untereinheiten ermittelten Molekülmassen im Vergleich zu den theoretischen Werten sind in Tab. 11.2 zusammengestellt.

	$M_{\text{ermittelt}}$	$M_{\text{theoretisch}}$
$\alpha\alpha\beta\beta + 4 \text{ Häm}$	64618 Da	64478 Da
$\alpha\alpha\beta + 3 \text{ Häm}$	47938 Da	47908 Da
$\alpha\beta\beta + 3 \text{ Häm}$	48875 Da	48809 Da
$\alpha\beta + 2 \text{ Häm}$	32260 Da	32239 Da
$\alpha + \text{Häm (holo-}\alpha\text{)}$	15669 Da	15669 Da
$\beta + \text{Häm (holo-}\beta\text{)}$	16567 Da	16570 Da

Tab. 11.2: Ermittelte Molekülmassen (oTOF-MS) und theoretische Molekülmassen^[1] für intaktes Hämoglobin (Rind) sowie einiger Fragmente. Die Signale der holo- α -Untereinheiten wurden zur internen Kalibrierung herangezogen.

Die Fragmentierung des Hämoglobin-Tetramers wird ebenfalls durch eine erhöhte Temperatur der Transferkapillaren bzw. eine größere Potentialdifferenz zwischen erstem *skimmer* und Transferquadrupol induziert (vgl. Kap. 6.2.1). Wird beispielsweise ausgehend von den Desolvatisierungsbedingungen gemäß Abb. 11.3 A die Potentialdifferenz zwischen erstem *skimmer* und Transferquadrupol von 1 V auf 25 V erhöht^[2], so sind ausschließlich die Signale der holo-Untereinheiten im Massenspektrum zu beobachten. Ein Zerfall der Untereinheiten unter Abspaltung der Häm-Gruppe tritt dabei nur in geringem Maße auf (ohne Abbildung).

Auch mit Hilfe des QIT-Massenanalysators kann der Nachweis des intakten Hämoglobin-Tetramers unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen erfolgen (ohne Abbildung). Allerdings werden im QIT-MS-System Ionen mit hohen m/z-Verhältnissen prinzipbedingt weniger effizient nachgewiesen (vgl. Kap. 4.2), so daß die Spektren ein geringeres Signal/Rauschen-Verhältnis aufweisen. Ferner sind die niedrigen Ladungszustände des Hämoglobin-Tetramers nicht der Messung zugänglich, da der Massenbereich des verwendeten Systems auf ein m/z-Verhältnis bis 4000 Thomson limitiert ist. Mit zunehmender Aktivierung des Analyten während der Desolvatisierung ist auch bei Verwendung des QIT-Massenanalysators die Fragmentierung des Komplexes unter Bildung der holo- und apo-Untereinheiten zu beobachten. Die MS²-Analyse der holo-Untereinheiten ergibt, daß diese in Analogie zu holo-Myoglobin unter Abspaltung von Ferri-Häm ($[\text{Fe}^{3+}\text{-Häm}]^+$) fragmentieren.

¹ Datenbank des Swiss Institute of Bioinformatics, Expert Protein Analysis System ExPASy (<http://www.expasy.ch>)

² Die Potentialdifferenz zwischen Transferkapillare und erstem *skimmer* bleibt weiterhin auf 7 V eingestellt.

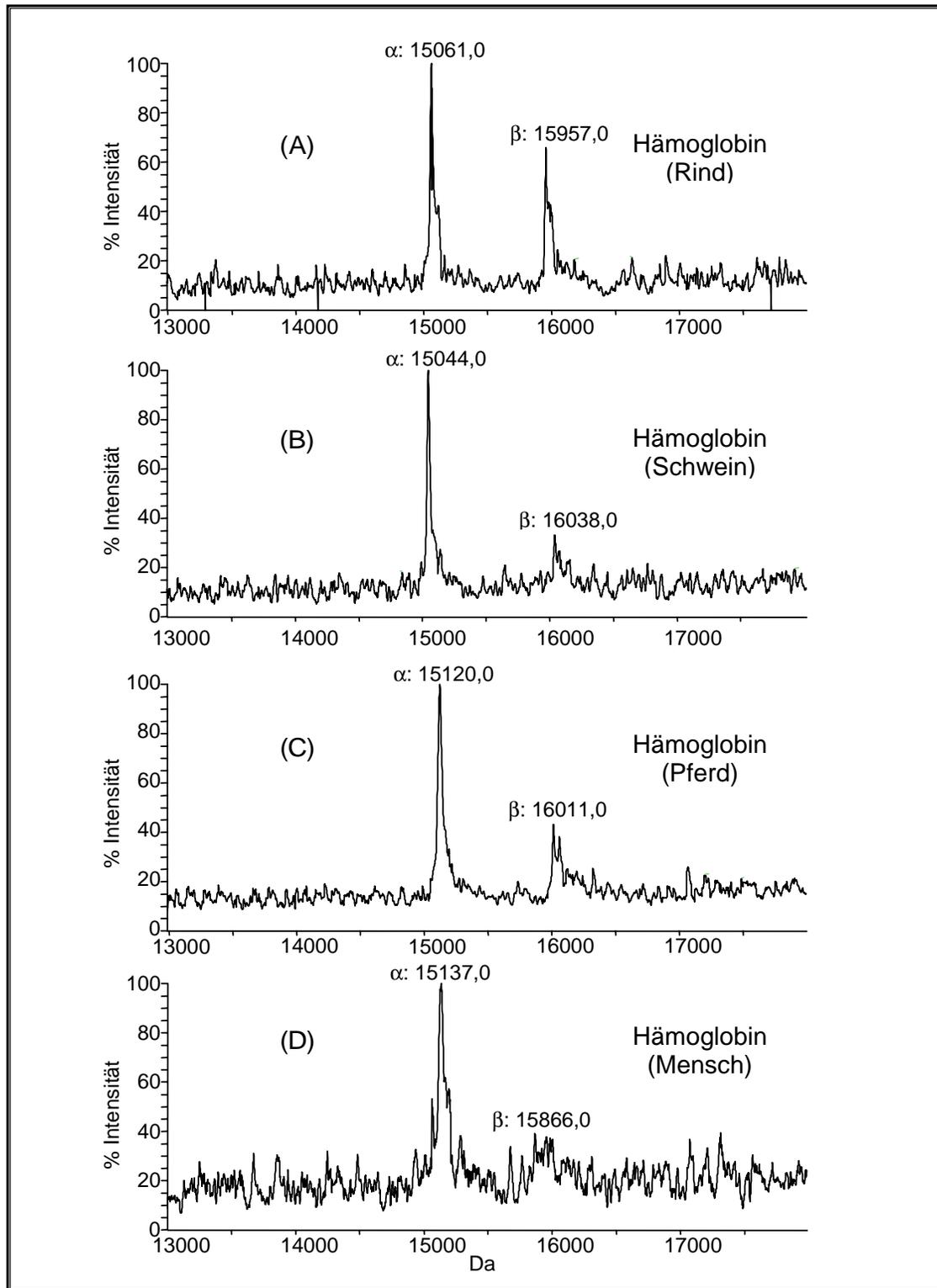


Abb. 11.4: Dekonvolutierte Nano-ESI-Massenspektren (LCQ, positiver Ionenmodus) verschiedener Hämoglobin-Arten $c = 10^{-5} \text{ mol/l}$ aus Methanol/Wasser (v:v 1:1), 4 % Essigsäure; A) Rind, B) Schwein, C) Pferd, D) Mensch

Auffallend ist in allen durchgeführten Untersuchungen, daß die β -Untereinheit des Hämoglobins sowohl in der holo- als auch in der apo-Form mit deutlich geringerer

Signalintensität als die α -Untereinheit nachgewiesen wird. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde daher Hämoglobin (Rind) unter denaturierenden Lösungsbedingungen aus dem Standard-Lösungsmittelgemisch (Methanol/Wasser v:v 1:1, Zusatz von 4 % Essigsäure) analysiert.

Als Massenanalysator diente das QIT-MS-System. Ferner wurden zum Vergleich die Hämoglobin-Arten von Pferd, Schwein und Mensch auf diesem Weg untersucht. Die daraus resultierenden dekonvolvierten Massenspektren sind in Abb. 11.4 zusammengestellt; einige Eigenschaften der entsprechenden apo-Protein-Untereinheiten finden sich in Tab. 11.3.

Es ist zu erkennen, daß für alle untersuchten Hämoglobin-Typen die β -Untereinheiten in erheblich geringerer Signalintensität als die entsprechenden α -Untereinheiten nachgewiesen werden. Dabei ist bei Verwendung von Rinderhämoglobin der Anteil der β -Untereinheiten relativ zu den α -Untereinheiten am höchsten. Bei Verwendung von humanem Hämoglobin wird der geringste Anteil der β -Untereinheiten detektiert.

	Rind		Schwein		Pferd		Mensch	
	α	β	α	β	α	β	α	β
$M_{\text{theo}}^{[1]}$ [Da]	15053	15954	15039	16034	15144	16008	15126	15867
$\text{pH}_{\text{iso}}^{[1]}$	8,19	7,02	8,76	7,25	8,73	6,52	8,73	6,81
Anz. basische Aminosäuren	24	23	24	24	24	24	24	23
Anz. saure Aminosäuren	12	15	12	15	12	16	12	13

Tab. 11.3: Merkmale der α - und β -Untereinheiten der untersuchten Hämoglobin-Arten. Die angegebenen isoelektrischen Punkte pH_{iso} stellen theoretisch berechnete Werte dar.

11.3.2. ESI-MS-Untersuchungen von Hämoglobin und Myoglobin im negativen Ionenmodus

Die ESI-QIT-Massenspektren von Myoglobin und Hämoglobin im negativen Ionenmodus sind in Abb. 11.5 bzw. Abb. 11.6 dargestellt. Die Desolvatisierungsbedingungen wurden zunächst auf den Nachweis der holo-Proteine optimiert (Abb. 11.5 A bzw. Abb. 11.6 A). Dabei sind im Fall des Hämoglobins im wesentlichen Signale der holo- α -Untereinheiten zu erkennen; die holo- β -Untereinheiten können nicht in merklicher Signalintensität detektiert werden.

¹ Datenbank des Swiss Institute of Bioinformatics, Expert Protein Analysis System ExPASy (<http://www.expasy.ch>)

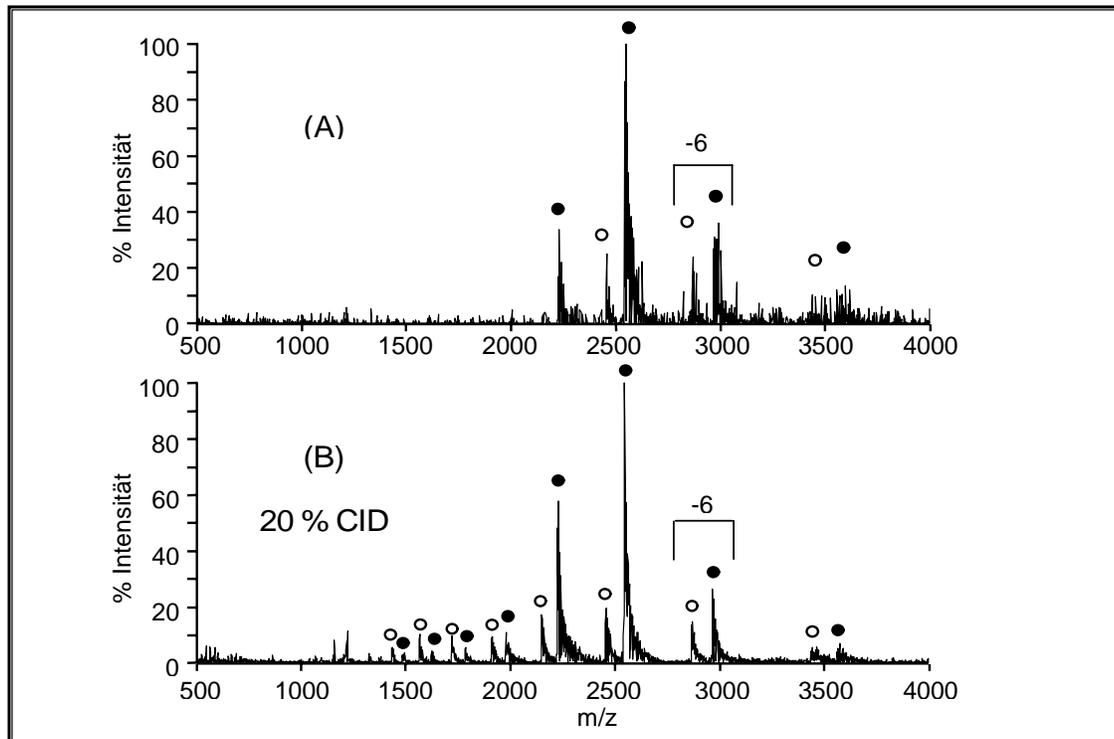


Abb. 11.5: Nano-ESI-Massenspektren (LCQ, negativer Ionenmodus) von Myoglobin (Pottwal), $c = 10^{-5} \text{ mol/l}$ aus H_2O , ●: holo-Myoglobin, ○: apo-Myoglobin; A) ohne CID, B) mit 20 % CID.

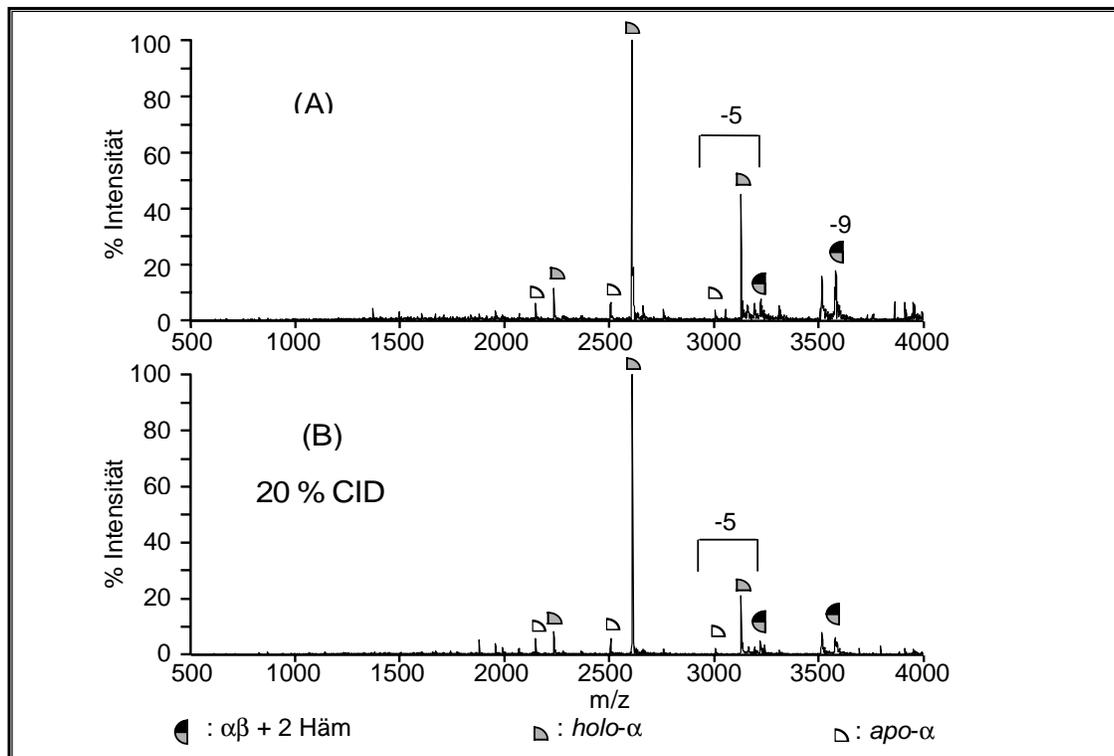


Abb. 11.6: Nano-ESI-Massenspektren (LCQ, negativer Ionenmodus) von Hämoglobin (Rind), $c = 10^{-5} \text{ mol/l}$ (bezogen auf Tetramer) aus H_2O ; A) ohne CID, B) mit 20 % CID.

Aufgrund der vermehrten Anlagerungen an den Analyten (vgl. Kap. 10) sind sowohl die Signale des Myoglobins als auch die Signale der holo- α -Untereinheiten im Vergleich zu den Spektren im positiven Ionenmodus merklich verbreitert; zudem weisen die Spektren ein niedrigeres Signal/Rauschen-Verhältnis auf. Der Schwerpunkt der Ladungsverteilung ist im Vergleich zum positiven Ionenmodus zu höheren m/z -Werten und damit niedrigeren Ladungszuständen verschoben.

Zur Aufnahme der in Abb. 11.5 B (Myoglobin) und Abb. 11.6 B (Hämoglobin) dargestellten QIT-Massenspektren wurden die Analytionen durch eine um 20 V erhöhte Potentialdifferenz zwischen *skimmer* und Transferoktapol zu Stößen angeregt („20 % CID“). Trotz der verstärkten Aktivierung ist weder eine signifikante Fragmentierung des holo-Myoglobins noch die Fragmentierung der holo- α -Untereinheiten des Hämoglobins zu beobachten. In beiden Fällen werden weiterhin die Häm-Protein-Komplexe in dominanter Signalintensität nachgewiesen.

11.3.3. *ESI-MS-Untersuchungen von Hämoglobin und Myoglobin nach Reaktion mit DTT*

Im folgenden soll der Einfluß der Ladung der Häm-Gruppe auf die resultierenden Massenspektren von Hämoglobin und Myoglobin untersucht werden. Wie in Kap. 11.1 erwähnt, kann durch Zusatz von DTT zur Analytlösung eine Reduktion der Häm-Gruppe von der Ferri-Form zur Ferro-Form erzielt werden. Die Ladung ändert sich infolgedessen von +1 ($[\text{Fe}^{3+}\text{-Häm}]^+$) zu ± 0 ($[\text{Fe}^{2+}\text{-Häm}]^{\pm 0}$); Ferro-Häm ist daher in den Massenspektren in Form von $[\text{Fe}^{2+}\text{-Häm+H}]^+$ nachzuweisen. Abb. 11.8 verdeutlicht dies am Beispiel der ESI-Massenspektren (MARINER, positiver Ionenmodus) von Myoglobin. Bei Verwendung der unbehandelten Lösung ist nach stoßinduzierter Fragmentierung zwischen Transferkapillare und erstem *skimmer* das Signal der Häm-Gruppe bei einem m/z -Verhältnis von 616,2 (entsprechend $[\text{Fe}^{3+}\text{-Häm}]^+$) mit höchster Intensität nachzuweisen (vgl. Abb. 11.7 A). Nach Inkubation der Analytlösung mit DTT tritt dagegen unter CID-Bedingungen das Signal bei 617,2 Thomson mit dominanter Signalintensität auf (vgl. Abb. 11.7 B). Es liegt somit eine Mischung zwischen $[\text{Fe}^{3+}\text{-Häm}]^+$ und $[\text{Fe}^{2+}\text{-Häm+H}]^+$ vor. Um das relative Mischungsverhältnis beider Komponenten anhand der Isotopenverteilung zu bestimmen, wurde die experimentell ermittelte Verteilung mit theoretisch berechneten Verteilungen ^[1] verglichen. Die beste Übereinstimmung wird dabei für eine Mischung aus 47 % $[\text{Fe}^{2+}\text{-Häm+H}]^+$ und 53 % $[\text{Fe}^{3+}\text{-Häm}]^+$ erreicht (Abb. 11.7C).

¹ Die Berechnung der theoretischen Isotopenverteilung von $[\text{Fe}^{3+}\text{-Häm}]^+$ ($\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4\text{Fe}$) und $[\text{Fe}^{2+}\text{-Häm+H}]^+$ ($\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_4\text{Fe}$) erfolgte mit Hilfe des *IsoPro Isotopic Abundance Calculator V. 2.1*.

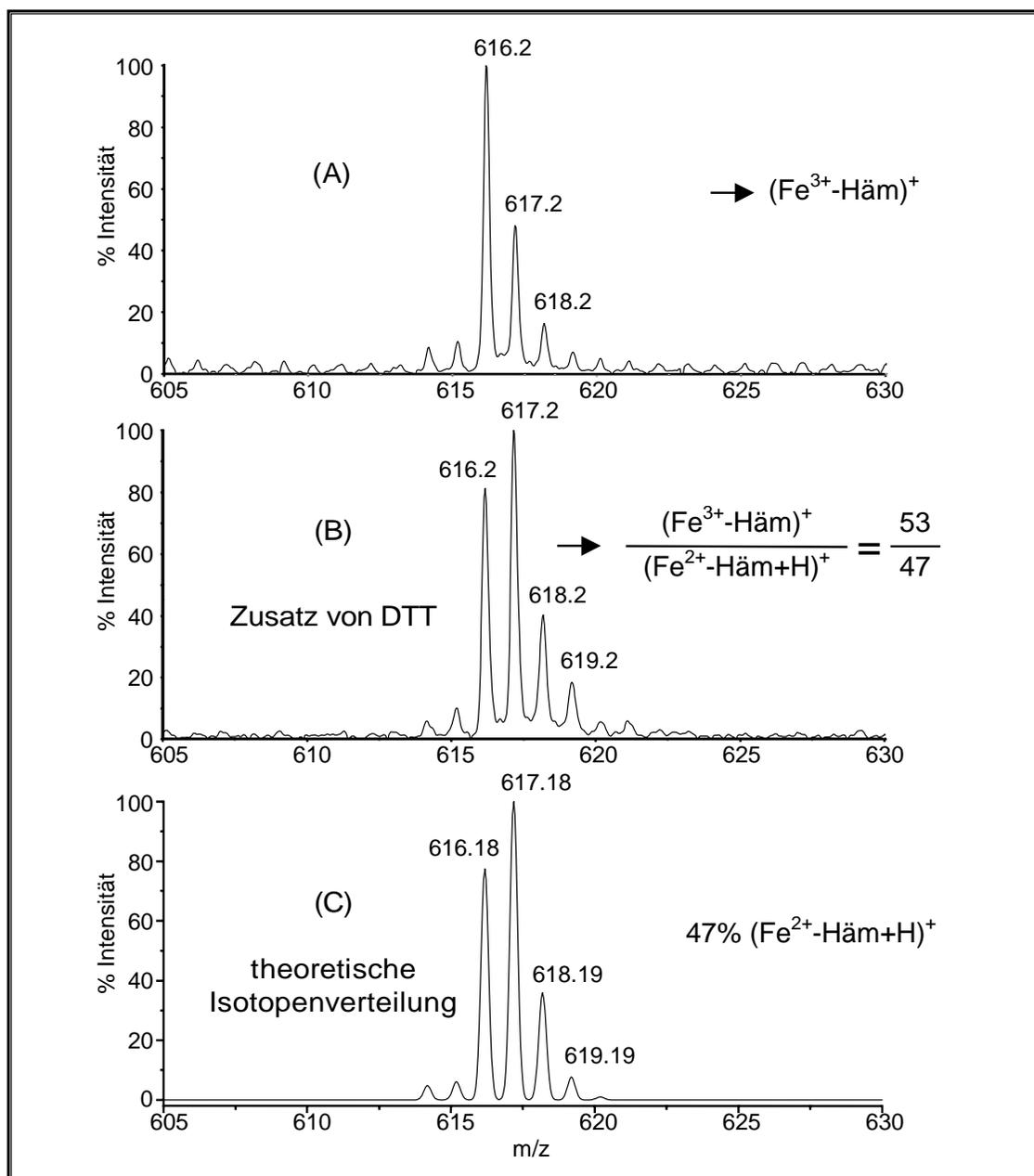
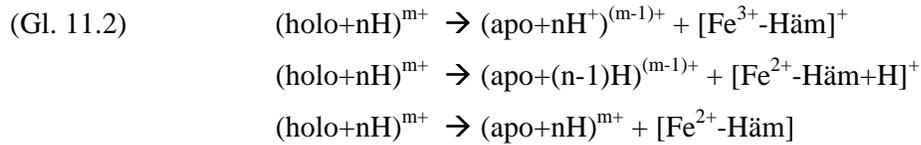


Abb. 11.7: Das Signal der Häm-Gruppe in Nano-ESI-Massenspektren (MARINER, positiver Ionenmodus) von Myoglobin, $c = 10^{-5}$ mol/l nach stoßinduzierter Fragmentierung zwischen geheizter Transferkapillare und erstem skimmer; A) wäßrige Lösung; B) nach Zusatz von 5 mM DTT, C) theoretische Isotopenverteilung einer Mischung aus 47% $[\text{Fe}^{2+}\text{-Häm+H}]^+$ und 53% $[\text{Fe}^{3+}\text{-Häm}]^+$.

Bei der MS^2 -Untersuchung der Häm-Protein-Komplexe am LCQ (positiver Ionenmodus) zeigt sich, daß nach der Inkubation der Analytlösung mit DTT ein Teil der Ionen unter Erhalt des ursprünglichen Ladungszustands in die apo-Untereinheiten fragmentiert, was dem Verlust einer neutralen Häm-Gruppe entspricht (ohne Abbildung). Ferner sind Fragmentierungsreaktionen unter Verlust von $[\text{Fe}^{3+}\text{-Häm}]^+$ und $[\text{Fe}^{2+}\text{-Häm+H}]^+$ zu beobachten.

Die Fragmentierungsreaktionen erfolgen nach Behandlung der Analytlösung mit DTT somit gemäß (vgl. [Kon94]):



Dies spiegelt ebenfalls wider, daß ein Teil der Analytmoleküle mit der Häm-Gruppe in der oxidierten Form ($[\text{Fe}^{3+}\text{-Häm}]^+$) vorliegt, während andere Analytmoleküle die Häm-Gruppe in der reduzierten Form ($[\text{Fe}^{2+}\text{-Häm}]$) enthalten.

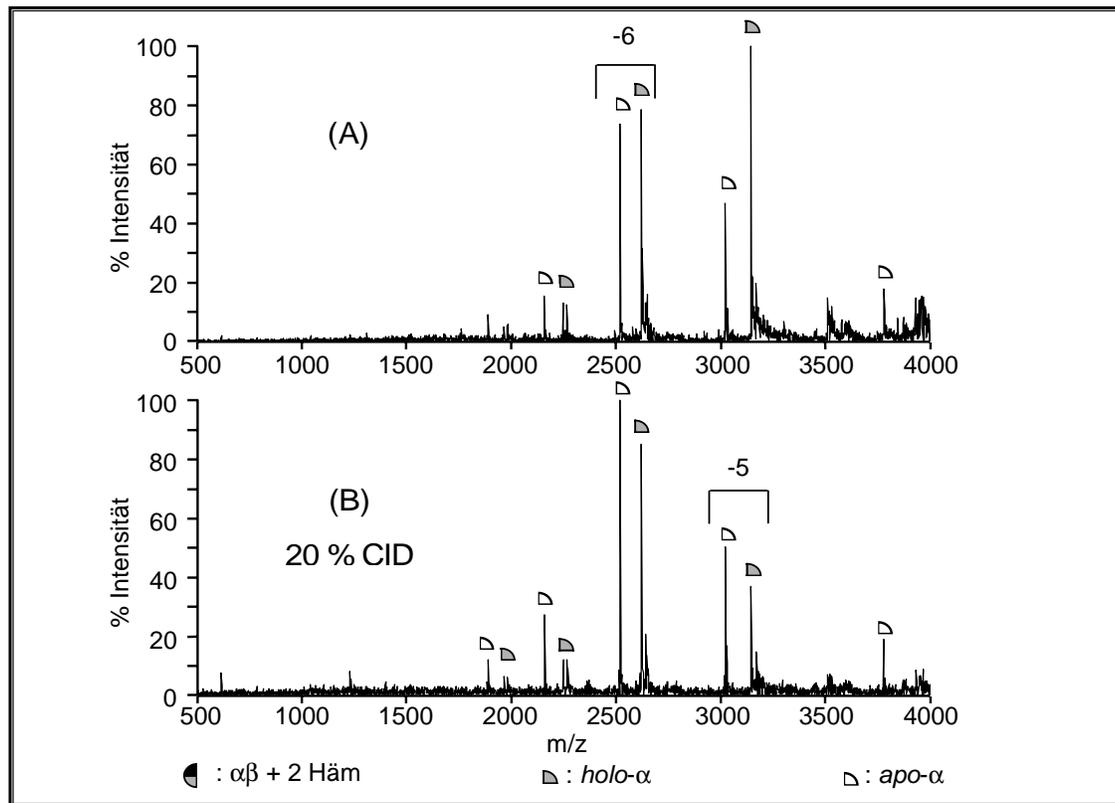


Abb. 11.8: Nano-ESI-Massenspektren (LCQ, negativer Ionenmodus) von Hämoglobin (Rind), $c = 10^{-5} \text{ mol/l}$ aus 5 mM DTT und $10 \text{ mM NH}_4\text{Ac}$; A) ohne CID, B) 10% CID

Im negativen Ionenmodus sind mit der Reduktion der Häm-Gruppe von der Ferri-Form zur Ferro-Form erhebliche Veränderungen in den Massenspektren zu beobachten; Abb. 11.8 zeigt dies am Beispiel von Hämoglobin am LCQ. Auch nach Inkubation mit DTT kann unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen die holo-Form als dominantes Signal beobachtet werden (Abb. 11.8 A).

Ein Teil der holo-Untereinheiten fragmentiert allerdings leicht unter Häm-Verlust, wie in Abb. 11.8 B für die Anregung entsprechend 10 % CID gezeigt ist. Ein den Hämoglobin-Untereinheiten analoges Verhalten im negativen Ionenmodus weist auch Myoglobin nach der Reaktion mit DTT auf (ohne Abbildung).

11.4. Diskussion

Unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen können die Häm-Globin-Komplexe des Myoglobins bzw. des Hämoglobins intakt in die Gasphase überführt und massenspektrometrisch detektiert werden. Darüber hinaus ist ebenfalls der Nachweis des intakten Hämoglobin-Tetramers möglich; das eingesetzte oTOF-MS-System erlaubt hierbei auch den Nachweis niedriger Ladungszustände des nicht-kovalenten Komplexes bei guter Spektrenqualität (vgl. [Lig94], [Apl96]). Verstärkte Aktivierung der Analytionen im Desolvatisierungsschritt bewirkt im positiven Ionenmodus die Fragmentierung der Komplexe. Dies führt im Fall des Hämoglobins zunächst zur Dissoziation des Protein-Tetramers; bei stärkerer Aktivierung ist der Verlust der Häm-Einheit aus den holo-Untereinheiten zu beobachten. Holo-Myoglobin fragmentiert ebenfalls unter Abspaltung der Häm-Gruppe.

11.4.1. *Die Unterschiede zwischen den α - und β -Untereinheiten des Hämoglobins*

Wird die Dissoziation des Hämoglobin-Tetramers durch Stöße in der Gasphase oder durch Zusatz von denaturierenden Komponenten zur Analytlösung induziert, so kann die β -Untereinheit stets nur in geringerer Signalintensität detektiert werden als die α -Untereinheit (Abb. 11.3 und Abb. 11.4). Diese Besonderheit steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen anderer Gruppen (vgl. beispielsweise [Gro97], [Li93], [Kon94]). Diese Beobachtung ist unerwartet, da beide Untereinheiten, bedingt durch die Summenformel des intakten Hämoglobins, in gleicher Menge in Lösung vorliegen sollten, wenn der Komplex durch Zugabe von Methanol und Essigsäure denaturiert wird. Das Phänomen ist für alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Hämoglobin-Varianten zu beobachten; der absolute Wert des Intensitätsverhältnisses α/β hängt aber offensichtlich von der Art der Probe ab.

Der Vergleich der in Tab. 11.3 zusammengestellten Eigenschaften der apo-Untereinheiten verschiedener Hämoglobin-Varianten zeigt, daß alle untersuchten Untereinheiten eine annähernd identische Anzahl von basischen bzw. sauren Aminosäuren innerhalb der Sequenz aufweisen. Ferner zeigen die Aminosäuresequenzen aller α -Untereinheiten ein hohes Maß an

Übereinstimmung, und auch die verschiedenen β -Untereinheiten ähneln sich stark in ihrer Sequenz (vgl. Anhang C).

Die beobachteten Unterschiede sollten demnach nicht auf unterschiedliche Primärstrukturen der Analyte zurückzuführen sein, und auch eine unterschiedliche Löslichkeit der Analyte kann als Ursache ausgeschlossen werden. In allen Hämoglobin-Varianten unterscheiden sich zwar α - und β -Untereinheiten deutlich in ihrem isoelektrischen Punkt, aber bei einer Analyse der denaturierten Proteine unter Zusatz von 4% Essigsäure sollten beide Untereinheiten in gleichem Maße protoniert und gelöst vorliegen.

Einen Hinweis auf die Ursache der unterschiedlichen Signalintensitäten gibt die Beobachtung, daß die Signale der β -Untereinheiten im Vergleich zu den α -Untereinheiten tendenziell verbreitert sind. Es ist denkbar, daß die β -Untereinheiten eine erhöhte Tendenz zur Bildung von unspezifischen Addukten mit anderen Komponenten der Analytlösung aufweisen. Infolgedessen verteilt sich das Gesamtionensignal der β -Untereinheiten auf mehrere Einzelsignale, so daß die detektierbare maximale Intensität geringer als die der α -Untereinheiten ist. Der Gehalt an Verunreinigungen in der Analytlösungen wird im wesentlichen durch die Reinheit der eingesetzten Analytsubstanz bestimmt. Weisen demnach die unterschiedlichen Hämoglobin-Varianten einen unterschiedlichen Reinheitsgrad auf, so ist auch in allen Fällen ein unterschiedliches Ausmaß an Adduktbildung in den Massenspektren zu erwarten.

11.4.2. *Die Stabilität der Häm-Protein-Komplexe gegenüber Häm-Verlust in der Gasphase*

In der Literatur finden sich Hinweise, daß unter moderaten Aktivierungsbedingungen die Stabilität nicht-kovalenter Komplexe in der Gasphase zumindest qualitativ mit der Stabilität in Lösung korreliert werden kann [Smi97]. Die hier gezeigten Resultate für die Stabilität von Hämoglobin gegenüber Häm-Verlust im positiven Ionenmodus spiegeln dieses Verhalten zumindest ansatzweise wider.

In Lösung findet man in Tetramer und Dimer eine festere Bindung zwischen Polypeptid und prosthetischer Gruppe als in den einzelnen holo-Untereinheiten. Gelöstes Hämoglobin dissoziiert daher zunächst in die holo-Untereinheiten, bevor das Häm aus dem Komplex abgespalten wird [Gat96]. Es gilt für die Stabilität in Lösung bezüglich des Häm-Verlusts:



Wie aus Abb. 11.3 deutlich wird, deckt sich dieses Verhalten mit Einschränkungen mit dem Verhalten dieses Komplexes unter den Bedingungen der ESI-MS. Auch im Fall der Gasphasenionen ist zunächst keine Abspaltung der Häm-Einheit aus dem Tetramer oder den $\alpha\beta$ -Dimeren zu erkennen. Bei moderater Aktivierung tritt zunächst ein Zerfall in die holo-Untereinheiten ein; erst diese fragmentieren unter Abspaltung des Häm. Aus diesen Resultaten läßt sich folgern, daß die Bindung zwischen einer Protein-Untereinheit und der Häm-Gruppe in der Gasphase stabiler ist als die Bindung zwischen zwei holo-Untereinheiten. Über die relative Stabilität der holo-Untereinheiten im Vergleich zu den Dimeren oder Tetrameren gegenüber Häm-Verlust kann jedoch keine Aussage gewonnen werden. Zur Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens wären MS^2 -Experimente an den Tetrameren oder Dimeren von Interesse; allerdings liegen die entsprechenden Signale außerhalb des m/z -Bereichs, in welchem eine MS^2 -Analyse am LCQ möglich ist.

Ähnlichkeiten mit dem Dissoziationsverhalten in kondensierter Phase sind allerdings unter dem Einfluß stärkerer Aktivierung nicht mehr zu beobachten, wie in Abb. 11.3 C deutlich wird. Am Tetramer setzt nun erkennbar der sukzessive Verlust einzelner Häm-Einheiten ein. Mit vergleichbarer Intensität werden Protein-Trimere (ebenfalls nach teilweisem Häm-Verlust) detektiert, deren Existenz in Lösung nicht bekannt ist. Diese Trimere sind demnach das Produkt stoßinduzierter Fragmentierungsreaktionen in der Gasphase (vgl. [Lig94]).

Anlaß zur Diskussion gibt die Frage, ob die beobachteten $\alpha\beta$ -Dimerensignale auf die Dissoziation des Komplexes in Lösung zurückzuführen sind oder ob sie erst durch Fragmentierung des Tetramers in der Gasphase gebildet werden. Da $\alpha\beta$ aber als einzige Dimerenart und in völliger Abwesenheit der $\alpha\alpha$ - und $\beta\beta$ -Dimere zu beobachten ist, ist zu folgern, daß es sich um einen spezifisch in Lösung gebildeten Komplex handelt (vgl. [Loo93a]). Tatsächlich liegen unter physiologischen Bedingungen in Lösung das Hämoglobin-Tetramer und Dimere des Typs ($\alpha\beta + 2$ Häm) miteinander im Gleichgewicht vor [Loo93a]. Gegen einen Ursprung im stoßinduzierten Zerfall des Tetramers spricht weiterhin die Tatsache, daß im Hämoglobin-Tetramer zwischen zwei α -Untereinheiten vier Salzbrücken auftreten, zwischen einer α - und einer β -Einheit aber nur eine [Str90]. Da der Beitrag dieser Coulomb-Wechselwirkungen in der Gasphase an Bedeutung gewinnt, wäre unter diesen Umständen das $\alpha\alpha$ -Dimer sogar mit höherer Intensität im Spektrum zu erwarten.

Im positiven Ionenmodus ist der Verlust der nicht-kovalent gebundenen Häm-Gruppe aus den Komplexen leicht durch Verschärfung der Desolvatisierungsbedingungen zu erreichen. Bei Untersuchung der nicht-kovalenten Häm-Protein-Komplexe im negativen Ionenmodus ist

dagegen eine deutlich erhöhte Stabilität dieser Spezies gegenüber Häm-Verlust zu beobachten (vgl. Kap. 11.3.2). Unter Bedingungen, die im positiven Ionenmodus zur Fragmentierung der Untereinheiten unter Abspaltung der Häm-Gruppe führen, können im negativen Ionenmodus noch die Signale der intakten Komplexe detektiert werden. Diese Stabilität steht in keiner Relation zur Stabilität in kondensierter Phase; sie muß daher auf Wechselwirkungen zwischen Protein und prosthetischer Gruppe in der Gasphase zurückzuführen sein. Grundsätzlich sind zur Erklärung dieses Effekts zwei Aspekte zu diskutieren:

- Die Bindung zwischen Protein und Häm kommt über die koordinative Bindung eines deprotonierten Histidinrests an das zentrale Eisenion zustande; eine Protonierung an dieser Stelle könnte die Dissoziation des Komplexes zur Folge haben. Da der Analyt im negativen Ionenmodus in der Regel deprotoniert vorliegt, ist die Übertragung eines Protons an den relevanten Histidinrest unter diesen Bedingungen unwahrscheinlicher. Damit resultiert für die Komplexe eine erhöhte Stabilität gegenüber Häm-Verlust.
- Coulomb-Wechselwirkungen gewinnen in der Gasphase erheblich an Bedeutung. Demnach treten zwischen einem negativ geladenen Protein und einer positiv geladenen prosthetischen Gruppe starke attraktive Kräfte auf. Diese Coulomb-Wechselwirkung sollte den Komplex deutlich gegenüber Häm-Verlust stabilisieren.

Gegen die erste Hypothese spricht allerdings die Beobachtung von Gross et al [Gro97], daß die Aktivierungsenergie für den Zerfall von holo-Myoglobin im positiven Ionenmodus unabhängig vom Ladungszustand des Analytions ist. Eine Protonierung des entsprechenden Histidin-Rests sollte aber mit steigendem Ladungszustand und damit Protonierungsgrad wahrscheinlicher sein. Somit kann im negativen Ionenmodus die verminderte Tendenz zur Protonierung des bindenden Histidin-Rests nicht allein die Ursache für die beobachtete gesteigerte Stabilität der Komplexe sein. Ferner konnte in kondensierter Phase gezeigt werden, daß die Häm-Gruppe durch weitere Wechselwirkungen mit dem Proteinstrang in der Tasche der Bindungsstelle verbleibt, auch wenn der relevante Histidin-Rest durch Säurezugabe protoniert wird [Sag90].

Der zweite Aspekt, die Coulomb-Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Proteinstrang und einer positiv geladenen Häm-Gruppe, sollte allerdings erheblich zur Stabilität des Komplexes beitragen (vgl. Abb. 11.9 A). Auch wenn die Häm-Gruppe aus der biologisch relevanten Bindungsstelle entfernt wird, herrschen weiterhin attraktive Kräfte zwischen Proteinstrang und $[\text{Fe}^{3+}\text{-Häm}]^+$ (Ferri-Häm), die einer Dissoziation entgegenwirken. Die Detektion von Signalen entsprechend der holo-Formen der Proteine setzt demnach nicht

voraus, daß die spezifischen Wechselwirkungen zur Bindung der Häm-Gruppe erhalten bleiben. Das Ferri-Häm kann vielmehr stoßinduziert aus der „Bindungstasche“ entfernt werden und wird dennoch in Form eines Addukts mit dem Protein nachgewiesen.

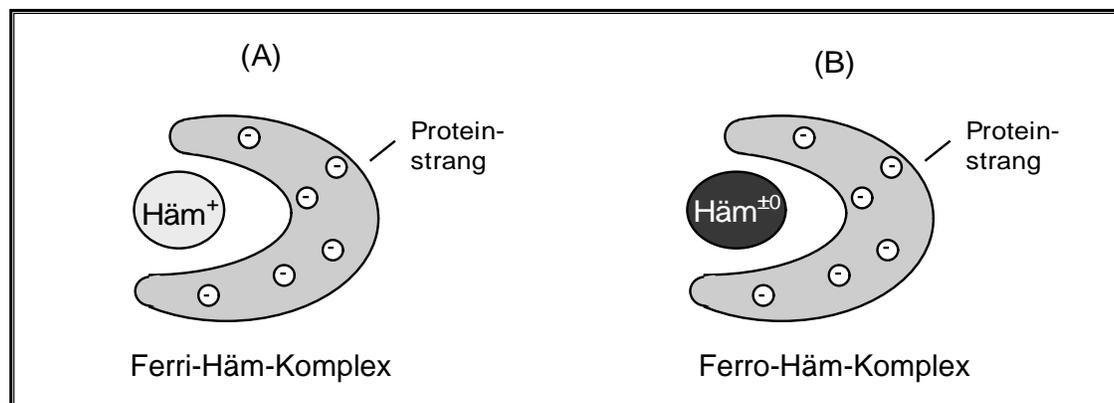


Abb. 11.9: Schematische Darstellung der Häm-Globin-Komplexe im negativen Ionenmodus. A) mit Ferri-Häm; B) mit Ferro-Häm.

Wie in den Massenspektren in Abb. 11.8 gezeigt, ändert sich die Stabilität der Komplexe im negativen Ionenmodus drastisch, wenn der Analytlösung zuvor DTT zugesetzt wird. Anhand der Isotopenverteilung in der Häm-Gruppe im positiven Ionenmodus läßt sich ermitteln, daß etwa die Hälfte aller detektierten Häm-Gruppen nach Zusatz von DTT ein Fe²⁺-Ion enthalten. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die stoßinduzierte Fragmentierung der holo-Proteine ebenfalls unter Abspaltung der neutralen Häm-Gruppe erfolgen kann (vgl. (Gl. 11.2)). Es enthalten demnach mehr als die Hälfte aller Analytmoleküle eine insgesamt ungeladene Häm-Gruppe [Fe²⁺-Häm] (Ferro-Häm); ein solcher Häm-Protein-Komplex im negativen Ionenmodus ist in Abb. 11.9 B schematisch dargestellt. Protein und prosthetische Gruppe sind unter diesen Bedingungen nicht mehr gegensätzlich geladen. In den Massenspektren ist im Gegenzug die „ungewöhnliche“ Stabilität des Komplexes verschwunden; bei Stoßaktivierung zeigt sich nun als Folge der Anregung der Zerfall eines Teils der Komplexe unter Verlust der Häm-Einheit. Erwartungsgemäß verbleibt noch ein Anteil der holo-Signale im Spektrum, welche die Häm-Gruppe weiterhin in der Ferri-Form tragen (vgl. Abb. 11.8).

Die vorgestellten Resultate zeigen, daß die Stabilität von Komplexen in der Gasphase im wesentlichen bestimmt, in welchem Ausmaß diese mittels ESI-MS detektiert werden können. In Lösung vorhandene spezifische Wechselwirkungen spiegeln sich zwar unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen in den resultierenden Massenspektren wider; die Stabilität dieser Spezies wird jedoch durch Wechselwirkungen in der Gasphase bestimmt. Der Vergleich der Häm-Protein-Komplexe in positiven und negativen Ionenmodus liefert ein

deutliches Beispiel, in welchem Ausmaß Coulomb-Wechselwirkungen in der Gasphase an Bedeutung gewinnen. Die resultierende Stabilität dieser Komplexe gegenüber stoßinduzierter Fragmentierung steht somit in keinem Zusammenhang mit der Stabilität in Lösung.

In einigen Fällen kann die Stabilität nicht-kovalenter Komplexe in der Gasphase mit der in Lösung korreliert werden (vgl. [Hun97] zur Stabilität von Myoglobin-Varianten). Dies ist insbesondere dann möglich, wenn sich die zu vergleichenden Verbindungen in ihrer Struktur stark ähneln und die Stabilisierung des Komplexes in Lösung nicht überwiegend aus hydrophoben Wechselwirkungen resultiert (vgl. [Loo97]). Dennoch ist es fraglich, ob die ESI-MS grundsätzlich eine geeignete Methode darstellt, wenn die Untersuchung der Stabilität nicht-kovalenter Komplexe in Lösung Ziel einer Analyse ist. Der Einfluß elektrostatischer Wechselwirkungen auf die Stabilität der Komplexe muß bei der Interpretation der Resultate unbedingt berücksichtigt werden.

12. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Der Nachweis nicht-kovalenter Komplexe mittels ESI-MS erfordert Analysebedingungen, die sich deutlich von den Bedingungen der etablierten Standard-ESI-MS kovalent gebundener Biopolymere unterscheiden. Für die ESI-MS-Analyse nicht-kovalenter Komplexe ist insbesondere die Einschränkungen auf das Lösungsmittel Wasser mit Zusatz von Salzen oder Puffern problematisch, was den Nachweis vollständig desolvatisierter Analytionen unter Erhalt der häufig relativ schwachen nicht-kovalenten Wechselwirkungen erschwert. Die Problematik für die massenspektrometrische Analyse nicht-kovalenter Komplexe steht dabei in engem Zusammenhang mit dem Mechanismus der Elektrospray-Ionisierung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, grundlegende Phänomene des ESI-Prozesses zu untersuchen und so ein besseres Verständnis der einzustellenden Randbedingungen beim ESI-massenspektrometrischen Nachweis nicht-kovalenter Komplexe zu erlangen.

Die Untersuchungen erfolgten dabei unter Verwendung geeigneter Modellsysteme, wie Salze, Kohlenhydrate, Peptide und ausgewählte nicht-kovalente Komplexe. Eine wesentliche Bedeutung kam der Charakterisierung der physikalischen Randbedingungen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten ESI-MS-Systeme zu. Auf experimenteller und theoretischer Basis wurden die verschiedenen Aufbautypen im Eingangsbereich des oTOF-MS-Systems MICKEY verglichen, wobei ein besonderes Augenmerk auf deren desolvatisierende Wirkung gelegt wurde. Es ließ sich zeigen, daß an diesem oTOF-MS-System der Aufbau mit geheizter Transferkapillare dem Aufbau mit Stickstoffgegenstrom vorzuziehen ist, um eine effiziente Desolvatisierung von Analytionen in der ESI zu erzielen.

Am oTOF-MS-System MARINER wurde die Bedeutung des Drucks in der ersten Druckstufe für die Desolvatisierung von Analytionen am Beispiel ausgewählter nicht-kovalenter Proteinkomplexe demonstriert. Dabei konnte gezeigt werden, daß eine Erhöhung des Drucks den Nachweis vollständig desolvatisierter, aber dennoch intakter nicht-kovalenter Komplexe dramatisch begünstigt. Dies kann auf die mit der Druckerhöhung einhergehenden Veränderungen der Stoßbedingungen der Analytionen mit dem Restgas beim Passieren der ersten Druckstufe sowie auf die größere Verweilzeit der Ionen in diesem Bereich zurückgeführt werden.

Als weitere Randbedingung für Untersuchungen an ESI-oTOF-MS-Systemen wurde zudem der Einfluß der Axialgeschwindigkeit der Ionen auf das Erreichen des Detektors auf der Grundlage theoretischer und experimenteller Befunde charakterisiert. Die Bedeutung der Axialgeschwindigkeit insbesondere für den Nachweis von Analytionen mit hohen m/z-Verhältnissen konnte dabei am Beispiel des nicht-kovalenten Komplexes Hämoglobin gezeigt werden.

Ebenfalls wurden ausgewählte Phasen des ESI-Prozesses bei der Überführung gelöster Analyte in massenspektrometrisch detektierbare Gasphasenionen untersucht. So wurde der Einfluß der Zerstäubungsbedingungen auf das resultierende Ionensignal am Beispiel der diskontinuierlichen Zerstäubung von Analytlösung getestet. Künstlich induzierte Zerstäubungsimpulse an der Spraykapillare wurden mit den Extraktionsimpulsen des verwendeten oTOF-MS-Systems synchronisiert, was die gezielte Analyse einzelner Phasen der diskontinuierlichen Emission von Flüssigkeit ermöglicht. Mit Hilfe des Modellanalyts Bariumbromid ließ sich anhand charakteristischer Indikatorsignale in den Massenspektren auf qualitativer Basis zeigen, daß zu Beginn einzelner Sprayimpulse zunächst kleine Tröpfchen an der Spraykapillare emittiert werden und die Tröpfchengröße im zeitlichen Verlauf des Emissionsimpulses zunimmt. Dieser Befund steht im Einklang mit der von Juraschek [Jur97] vorgestellten Verteilung der Tröpfchengrößen während der diskontinuierlichen Zerstäubung unter den Bedingungen der ESI-MS. Ferner konnte durch synchronisierte ESI-oTOF-Analyse am Modellsystem einer Zucker-Peptid-Mischung gezeigt werden, daß Analyte mit höherer Aufenthaltswahrscheinlichkeit an der Flüssigkeitsoberfläche bevorzugt (d.h. zu früheren Zeitpunkten der diskontinuierlichen Zerstäubung) in die geladenen Initialtröpfchen gelangen. Analyte, welche eine höhere Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Flüssigkeitsinneren aufweisen, gelangen mit geringerer Wahrscheinlichkeit und somit zu einem späteren Zeitpunkt eines Zerstäubungsimpulses in die Tröpfchen. Die vorgestellten Resultate stehen im Einklang mit den Modellvorstellungen zur Verteilung der Analyte beim für die Desolvatisierung relevanten unsymmetrischen Tropfenzerfall, die unter anderem die geringere Nachweiseffizienz hydrophiler Analyte zu erklären vermag.

Der Einfluß des Lösungsmittels auf das resultierende Ionensignal wurde im Rahmen dieser Arbeit im Hinblick auf seine Wirkung als chemische Umgebung des Analyten, auf seine Eigenschaften als Trägerkomponente des Analyten und auf seine Wirkung als Reaktionspartner der Analytionen in der Gasphase untersucht. Als Modellsystem diente der Analyt Bariumbromid in verschiedenen Alkoholen und Alkohol-Mischungen.

Die Untersuchungen ergaben, daß insbesondere die Polarität des eingesetzten Lösungsmittels einen relevanten Aspekt für dessen Wirkung als chemische Umgebung des Modellanalyten darstellt. Eine hohe Polarität des eingesetzten Lösungsmittels begünstigt die Dissoziation des Analyten in Lösung und wirkt somit dem Nachweis von Analyt-Gegenion-Addukten entgegen.

Als maßgebliche Eigenschaft in der Rolle der Trägerkomponente ließ sich am Modellanalyt Bariumbromid die Verdampfbarkeit des Lösungsmittels identifizieren. Untersuchungen an einer Analytmischung aus Turanose und Octylglucosid ergaben ferner, daß ebenfalls ausgeprägte Wechselwirkungen zwischen Analyt und Lösungsmittelmolekülen der Verdampfung des Lösungsmittels entgegenwirken. Eine geringe Verdampfbarkeit des Lösungsmittels und eine starke Solvatisierung des Analyten erschweren somit die Desolvatisierung der Analytionen und haben geringe Analytsignalintensitäten in den Massenspektren zur Folge. Ebenfalls ist dem Einfluß der Leitfähigkeit der Analytlösung und somit der Polarität des Lösungsmittels auf die Intensität des resultierenden Ionensignals Rechnung zu tragen. Reaktionen in der Gasphase sind in den ausgewählten Modellsystemen im wesentlichen stoßinduzierte Elektronentransferreaktionen zwischen Lösungsmittelmolekülen und zweiwertigen Metallkationen. Eine niedrige Ionisierungsenergie sowie ein hoher Energieeintrag während der Stoßaktivierung – und somit eine hohe Molekülmasse des Lösungsmittels – konnten dabei als begünstigende Faktoren für diese Reaktionen ermittelt werden.

Die Resultate zum grundsätzlichen Einfluß des Lösungsmittels dienten als Basis zur Untersuchung des Lösungsmiteinflusses auf die Bildung von Gramacidin D-Dimeren mit Hilfe der ESI-MS. Am Beispiel dieser nicht-kovalenten Peptidkomplexe konnte gezeigt werden, daß die resultierenden Massenspektren unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen die Veränderungen des Dimerisierungsgleichgewichts bei Variation des Lösungsmittels widerspiegeln. Die verschiedenen Komponenten der Peptidmischung Gramacidin D bilden zudem in Lösung gemischte Dimere, deren Signale in den Massenspektren eine eindeutige Identifizierung auch geringer Mengen Dimere zulassen. Es ließ sich ferner zeigen, daß die Veränderung der Zusammensetzung von Lösungsmittelgemischen während der Desolvatisierung aus kinetischen Gründen keinen Einfluß auf den detektierbaren Anteil Gramacidin-Dimere aufweist.

Untersuchungen zur unspezifischen Adduktbildung in der ESI-MS zwischen einem Analyten und weiteren Komponenten der Lösung wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Beispiel verschiedener Peptid-Anionen-Addukte durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß insbesondere im negativen Ionenmodus eine ausgeprägte unspezifische Adduktbildung eintritt, während im positiven Ionenmodus nur in geringem Maße Peptid-Anionen-Addukte zu beobachten sind. MS²-Untersuchungen der Addukte im negativen Ionenmodus ergaben, daß deren Dissoziation unter Abspaltung der zum Anion korrespondierenden Säure erfolgt, wobei in der Reihe der untersuchten Anionen die Stabilität des Addukts mit abnehmender Gasphasenbasizität des Anions zunimmt.

Es konnte aber ferner gezeigt werden, daß neben der Gasphasenbasizität noch weitere Faktoren für die Adduktstabilität von Bedeutung sind; insbesondere sind in diesem Zusammenhang dem Einfluß von Coulomb-Wechselwirkungen und räumlichen Faktoren im Addukt Rechnung zu tragen. Soll die Adduktbildung eines Analyten mit in der Lösung vorhandenen Anionen generell vermindert werden, so ist eine Analyse im positiven Ionenmodus vorzuziehen.

Untersuchungen zur Stabilität spezifischer nicht-kovalenter Komplexe in der ESI-MS wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Häm-Globin-Komplexe von Hämoglobin und Myoglobin durchgeführt. Unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen sind die in Lösung vorhandenen nicht-kovalenten Komplexe ebenfalls in den ESI-Massenspektren detektierbar. Durch vergleichende Untersuchungen im positiven und negativen Ionenmodus sowie durch Variation des Ladungszustands der Häm-Gruppe ließ sich allerdings zeigen, daß die Stabilisierung dieser Komplexe in der ESI-MS im wesentlichen auf Coulomb-Wechselwirkungen zwischen Protein und prosthetischer Gruppe in der Gasphase beruht. Die Resultate demonstrieren deutlich, daß die in der ESI-MS beobachtete Stabilität nicht-kovalenter Komplexe in der Gasphase unter Umständen erheblich von der biologisch relevanten Stabilität dieser Spezies in Lösung abweicht. Zwar kann mit Hilfe der ESI-MS die Stöchiometrie nicht-kovalenter Komplexe zuverlässig ermittelt werden; zur Ermittlung ihrer Stabilität sind jedoch analytische Untersuchungen in kondensierter Phase prinzipiell vorzuziehen.

Zum Nachweis nicht-kovalenter Komplexe mittels ESI-MS ist für jedes Instrument und jede neue analytische Fragestellung stets eine Optimierung der Analysebedingungen erforderlich. Die vorgestellten Resultate bestätigen anhand ausgewählter Beispiele, daß in Lösung vorhandene spezifische Komplexe intakt in Gasphasenionen überführt und massen-

spektrometrisch detektiert werden können, sofern die Analyseparameter sorgfältig angepaßt wurden. Dabei stellt der Energieeintrag in die Analytionen während der Desolvatisierung ebenso einen bedeutenden Parameter dar wie die Stabilität des nicht-kovalenten Komplexes in der Gasphase, welche in einigen Fällen durch die Wahl des „richtigen“ Ionenmodus zur Analyse beeinflußt werden kann. Ein grundsätzliches „Patentrezept“ zum erfolgreichen massenspektrometrischen Nachweis nicht-kovalenter Komplexe kann jedoch nicht gegeben werden.

Die Desolvatisierung von Analyten aus einem relativ schwer verdampfaren Lösungsmittel, wie z.B. Wasser, ist problematisch, und die Freisetzung hydrophiler Analytionen wird durch die ausgeprägte Solvatisierung dieser Spezies erschwert. Um neben diesen unabänderlichen Schwierigkeiten weitere Probleme, wie die Bildung von Addukten, zu vermeiden, sollten für die ESI-MS-Analyse möglichst saubere Proben Verwendung finden. Ist zur Stabilisierung des Komplexes in Lösung allerdings der Zusatz von Salzen erforderlich, so sollten unter anderem solche Anionen gewählt werden, die nur in geringem Maße Addukte bilden. Ferner ist im Hinblick auf eine Minimierung der Adduktbildung mit Anionen eine Untersuchung im positiven Ionenmodus vorzuziehen.

Für die Weiterentwicklung der ESI-MS zur Analyse nicht-kovalenter Komplexe ist eine weitere Optimierung der grundsätzlichen Desolvatisierungsmöglichkeiten wünschenswert, welche eine schonende Desolvatisierung des Analyten unter Erhalt der spezifischen nicht-kovalenten Wechselwirkungen ermöglichen. Ferner sind Methoden zu entwickeln, um Proben effizient und schnell zu reinigen, ohne die Proteinkomplexe irreversibel zu dissoziieren. Durch Entwicklungen dieser Art sollten erhebliche Fortschritte in der ESI-MS-Analytik nicht-kovalenter Komplexe möglich sein, die dem Ziel eines zuverlässigeren Einsatzes dieser Methode in der Routineanalytik biologisch bedeutender Proben näherkommen.

Literaturliste

- [Ale84] M. L. Aleksandrov, L. N. Gall, N. V. Krasnov, V. I. Nikolaev, V. A. Pavlenko, V. A. Shkurov; Dok. Akad. Nauk SSSR 277, 379-383 (1984)
- [Ams96] I. J. Amster; J. Mass Spectrom. 31, 1325-1339 (1996)
- [Apl96] R. T. Aplin, C. V. Robinson; Mass Spectrometry in the Biological Sciences, A. L. Burlingame, S. A. Carr (Hrsg.), Humana Press, Totowa, NJ, 69-84 (1996)
- [Atk90] P. W. Atkins; Physikalische Chemie, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Basel; 2. Nachdr. der 1. Aufl. (1990)
- [Bah97] U. Bahr, A. Pfenninger, M. Karas, B. Stahl; Anal. Chem. 69, 4530-4535 (1997)
- [Bar99] D. R. Barnidge, S. Nilsson, K. E. Markides; Anal. Chem. 71, 4115-4118 (1999)
- [Bie97] M. E. Bier, J. C. Schwartz; Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications, R. Cole (Hrsg.), Wiley-Interscience, 235-290 (1997)
- [Bla90] A. T. Blades, P. Jayaweera, M. G. Ikonou, P. Kebarle; J. Chem. Phys. 92, 5900-5906 (1990)
- [Bla91] A. T. Blades, M. G. Ikonou, P. Kebarle; Anal. Chem. 63, 2109-2114 (1991)
- [Bou00] M. Bouchard, D. R. Benjamin, P. Tito, C. V. Robinson; Biophys. J., 78, 1010-1017 (2000)
- [Boy92] J. G. Boyle, C. M. Whitehouse; Anal. Chem. 64, 2084-2089 (1992)
- [Bru87] A. P. Bruins, T. R. Covey, J. D. Henion; Anal. Chem. 59, 2642-2646 (1987)
- [Bru97] A. P. Bruins; Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications, R. Cole (Hrsg.), Wiley-Interscience, 107-136 (1997)
- [Buc93] M. V. Buchanan, M. Shahgholi, K. D. Cook; Proc. of the 41th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 764a-764b (1993)
- [Bur88] S. K. Burley, G. A. Petsko; Advances in Protein Chemistry, Vol. 39, Academia Press, San Diego, 125-189 (1988)
- [Bus92] M. Busman, A. L. Rockwood, R. D. Smith; J. Phys. Chem. 96, 2397-2400 (1992)
- [Cam84] R. Campargue; J. Phys. Chem. 88; 4466-4474, (1984)
- [Cam95] S. Campbell, M. T. Rodgers, E. M. Marzluff, J. L. Beauchamp; J. Am. Chem. Soc. 117, 12840-12854 (1995)
- [Che92a] Z. L. Cheng, K. W. M. Siu, R. Guevremont, S. S. Berman; Org. Mass Spectrom. 27, 1370-1376 (1992)
- [Che93] X. Cheng, Z. Wu, C. Fenselau; J. Am. Chem. Soc. 115, 4844-4848 (1993)
- [Che94] I. V. Chernushevich, A. N. Verentchikov, K. G. Standing, W. Ens; Proc. of the 42nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 989 (1994)
- [Che96] I. V. Chernushevich, A. N. Verentchikov, W. Ens, K. G. Standing; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 7, 32-349 (1996)
- [Che97] I. V. Chernushevich, W. Ens, K. G. Standing; Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications, R. Cole (Hrsg.), Wiley-Interscience, 203-234 (1997)
- [Che98] Y.-L. Chen, J. M. Campbell, B. A. Collings, L. Konerman, D. J. Douglas; Rapid Com. Mass Spectrom. 12, 1003-1010 (1998)

- [Che98a] I. V. Chernishevich, W. Ens, K. G. Standing; Proc. of the NATO Advanced Research Workshop on New Methods for the Study of Molecular Aggregates 1996, W. Ens, K. G. Standing, I. V. Chernushevich (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; 101-116 (1998)
- [Che99] I. V. Chernushevich, W. Ens, K. G. Standing; Anal. Chem., 71, 452A-461A (1999)
- [Cho90] S. K. Chowdhury, V. Katta, B. T. Chait; Rapid Com. Mass Spectrom. 4, 81-87 (1990)
- [Cho90a] S. K. Chowdhury, V. Katta, B. T. Chait; J. Am. Chem. Soc. 112, 9012-9013 (1990)
- [Cho90b] S. K. Chowdhury, V. Katta, R. C. Beavis, B. T. Chait; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1, 382-388 (1990)
- [Cho91] S. K. Chowdhury, B. T. Chait; Anal. Chem. 63, 1660-1664 (1991)
- [Clo94] M. Cloupeau, B. Prunet-Foch; J. Aerosol Sci. 25; 1021-1036 (1994)
- [Col93] R. B. Cole, A. K. Harrata; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 4, 546-556 (1993)
- [Col95] R. Colton, A. D'Agostino, J. C. Traeger; Mass Spectrom. Rev. 14, 79-106 (1995)
- [Con00] T. L. Constantopoulos, G. S. Jackson, C. G. Enke; Anal. Chim. Acta 406, 37-52 (2000)
- [Con99] T. L. Constantopoulos, G. S. Jackson, C. G. Enke; J. Am. Chem. Soc. Mass Spectrom. 10, 625-634 (1999)
- [Coo94] R. G. Cooks, J. S. Patrick, T. Kotiaho, S. A. McLuckey; Mass Spectrom. Rev. 13, 287-339 (1994)
- [Cot99] R. J. Cotter; Anal. Chem. 71, 445A-451A (1999)
- [Cov88] T. R. Covey, R. F. Bonner, B. I. Shushan, J. Henion; Rapid Com. Mass Spectrom. 2, 249-256 (1988)
- [CRC95] CRC Handbook of Chemistry and Physics, D.R. Lide (Hrsg.), 76. Aufl., CRC Press Boca Raton, New York, London, Tokyo (1995)
- [D'An67] D'Ans-Lax Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Band 1, E. Lax (Hrsg.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1967)
- [Daw89] J. H. J. Dawson, M. Guilhaus; Rapid Com. Mass Spectrom. 3, 155-159 (1989)
- [DeH96] E. De Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant; Mass Spectrometry: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore / Masson, Paris, Milan, Barcelone (1996)
- [Dod94] A. F. Dodonov, I. V. Chernushevich, V. V. Laiko; ACS Symposium Series, Time-of-Flight Mass Spectrometry, R. J. Cotter (Hrsg.), American Chemical Society, Washington, DC, 108-123 (1994)
- [Dol68] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice; J. Chem. Phys. 49, 2240-2249 (1968)
- [Dow95] K. M. Downard, K. Biemann; Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 148, 191-202 (1995)
- [Duc86] H. E. Duckworth, R. C. Barber, V. S. Venkatasubramanian; Mass Spectrometry, 2. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney (1986)
- [Dül94] T. Dülcks; Dissertation, Bonn (1994)
- [Dül99] T. Dülcks, R. Juraschek; J. Aerosol Sci. 30, 927-943 (1999)

-
- [Dül99a] T. Dülcks, M. Karas; Proc. of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1881-1882 (1999)
- [Eck95] K. Eckart, J. Spiess; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 6, 912-919 (1995)
- [Egg97] J. Eggers; Phys. Bl. 53, 431-434 (1997)
- [Enk97] C. G. Enke; Anal. Chem. 69, 4885-4893 (1997)
- [Eva90] S. Evans; Methods in Enzymology, Vol. 193: Mass Spectrometry, J. A. McCloskey (Hrsg.), Academic Press, San Diego, 61-86 (1990)
- [Fen93] R. Feng, Y. Konishi; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 4; 638-645 (1993)
- [Fen93a] J. B. Fenn; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 4, 524-535 (1993)
- [Fen95] R. Feng; Proc. of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1264 (1995)
- [Fen95a] R. Feng, A. L. Castelhana, R. Billedeau, Z. Yuan; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 6, 1105-1111 (1995)
- [Fen97] J. B. Fenn, J. Rosell, C. K. Meng; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 8, 1147-1157 (1997)
- [Fer00] J. Fernandez de la Mora; Anal. Chim. Acta 406, 93-104 (2000)
- [Fer94] J. Fernandez de la Mora, I. G. Loscertales; J. Fluid Mech. 260, 155-184 (1994)
- [Fin93] J. W. Finch, B. D. Musselman, J. F. Banks, C. M. Whitehouse; Proc. of the 41th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 287a-287b (1993)
- [Fon98] W.-Y. K. Fong; Proc. of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 893 (1998)
- [Fon99] K. W. Y. Fong, T.-W. D. Chan; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 10, 72-75 (1999)
- [Fos74] E. T. Fossel, W. R. Veatch, Y. A. Ovchinnikov, E. R. Blout; Biochemistry 13, 5264-5275 (1974)
- [Gal93] D. C. Gale, R. D. Smith; Rapid Com. Mass Spectrom. 7, 1017-1021 (1993)
- [Gam00] M. Gamero-Castano, J. Fernandez de la Mora; Anal. Chim. Acta 406, 67-91 (2000)
- [Gan91] B. Ganem, Y.-T. Li, J. D. Henion; J. Am. Chem. Soc. 113, 6294-6296 (1991)
- [Gan91a] B. Ganem, Y.-T. Li, J. D. Henion; J. Am. Chem. Soc. 113, 7818-7819 (1991)
- [Gat96] M. Gattoni, A. Boffi, P. Sarti, E. Chiancone; J. Biol. Chem. 271, 10130-10136 (1996)
- [Ger89] C. Gerthsen, H. O. Kneser, H. Vogel; Physik, 16. Aufl., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg (1989)
- [Ger98] S. Geromanos, J. Philip, G. Freckleton, P. Tempst; Rapid Com. Mass Spectrom. 12, 551-556 (1998)
- [Gom94] A. Gomez, K. Tang; Phys. Fluids 6, 404-414 (1994)
- [Gra94] J. M. Grace, J. C. M. Marijnissen; J. Aerosol Sci. 25, 1005-1019 (1994)
- [Gre97] K. M. Green, C. B. Lebrilla; Mass Spectrom. Rev. 16, 53-71 (1997)
- [Gro97] D. S. Gross, Y. Zhao, E. R. Williams; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 8, 519-524 (1997)
- [Gue92] R. Guevremont, K. W. M. Siu, J. C. Y. Le Blanc, S. S. Berman; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 3, 216-224 (1992)
- [Gue93] R. Guevremont, J. C. Y. Le Blanc, K. W. M. Siu; Org. Mass Spectrom. 28, 1345-1352 (1993)
- [Gui94] M. Guilhaus; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5, 588-595 (1994)
- [Gui95] M. Guilhaus; J. Mass Spectrom. 30, 1519-1532 (1995)

- [Gui97] M. Guilhaus, V. Mlynski, D. Selby; *Rapid Com. Mass Spectrom.* 11, 951-962 (1997)
- [Hag94] D. B. Hager, N. J. Dovichi; *Anal. Chem.* 66, 1593-1594 (1994)
- [Hag94a] D. B. Hager, N. J. Dovichi, J. Klassen, P. Kebarle; *Anal. Chem.* 66, 1300-1307 (1994)
- [Han98] J. C. Hannis, D. C. Muddiman; *Rapid Com. Mass Spectrom.* 12, 443-448 (1998)
- [Har97] A. G. Harrison; *Mass Spectrom. Rev.* 16, 201-217 (1997)
- [Has94] N. J. Haskins, A. E. Ashcroft, A. Phillips, M. Harrison; *Rapid Com. Mass Spectrom.* 8, 120-125 (1994)
- [Hil98] F. Hillenkamp; *Proc. of the NATO Advanced Research Workshop on New Methods for the Study of Molecular Aggregates, Canada, 1996*, Publ. von Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 181-191 (1998)
- [Hol85] A. F. Holleman, E. Wiberg; *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 91.-100. Aufl., N. Wiberg (Hrsg.), de Gruyter Verlag Berlin, New York (1985)
- [Hon99] C.-M. Hong, C.-T. Lee, Y.-M. Lee, C.-P. Kuo, C.-H. Yuan, J. Shiea; *Rapid Com. Mass Spectrom.* 13, 21-25 (1999)
- [Hun97] C. L. Hunter, A. G. Mauk, D. J. Douglas; *Biochemistry* 36, 1018-1025 (1997)
- [Iko90] M. G. Ikonou, A. T. Blades, P. Kebarle; *Anal. Chem.* 62, 957-967 (1990)
- [Iri76] J. V. Iribarne, B. A. Thomson; *J. Chem. Phys.* 64, 2287-2294 (1976)
- [Jaq93] M. Jaquinod, E. Leize, N. Potier, A.-M. Albrecht, A. Shanzer, A. van Dorselaer; *Tetrahedr. Lett.* 34, 2771-2774 (1993)
- [Jay90] P. Jayaweera, A. T. Blades, M. G. Ikonou, P. Kebarle; *J. Am. Chem. Soc.* 112, 2452-2454 (1990)
- [Jen90] K. R. Jennings, G. G. Dolnikowski; *Methods in Enzymology*, Vol. 193: *Mass Spectrometry*, J. A. McCloskey (Hrsg.), Academic Press, San Diego, 37-61 (1990)
- [Juh96] P. Juhasz, M. T. Roskey, I. P. Smirnov, L. A. Haff, M. L. Vestal, S. A. Martin; *Anal. Chem.* 68, 941-946 (1996)
- [Jur94] R. Juraschek; *Diplomarbeit*, Bonn (1994)
- [Jur97] R. Juraschek; *Dissertation*, Bonn (1997)
- [Jur97a] R. Juraschek, A. Schmidt, M. Karas, F.-W. Röllgen; *Proc. of the 45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*; 117 (1997)
- [Jur98] R. Juraschek, F. W. Röllgen; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 117, 1-15 (1998)
- [Jur99] R. Juraschek, T. Dülcks, M. Karas; *J. Am. Chem. Soc. Mass Spectrom.* 10, 300-308 (1999)
- [Kar00] M. Karas, M. Glückmann, J. Schäfer; *J. Mass Spectrom.* 35, 1-12 (2000)
- [Kar85] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp; *Anal. Chem.* 57, 2935-2939 (1985)
- [Kar87] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 78, 53-68 (1987)
- [Kar90] M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat, F. Hillenkamp; *Anal. Chim. Acta* 241, 175-185 (1990)
- [Kar90a] M. Karas, U. Bahr; *Trends Analyt. Chem.* 9, 321-325 (1990)
- [Kar97] T. Karancsi, P. Slegel, L. Novak, G. Pirok, P. Kovacs, K. Vekey; *Rapid Com. Mass Spectrom.* 11, 81-84 (1997)
- [Kar97a] M. Karas, U. Bahr; *Proc. of the NATO Advanced Study Institute on Mass Spectrometry in the Biomolecular Sciences, 1996*, R. M. Caprioli, A. Malorni, G. Sindona (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 33-53 (1997)

-
- [Kar97b] M. Karas; *J. Mass Spectrom.* 32, 1-3 (1997)
- [Kat91] V. Katta, B. T. Chait; *J. Am. Chem. Soc.* 113, 8534-8535 (1991)
- [Ke95] F. Ke, J. C. Y. Le Blanc, R. Guevremont, K. W. M. Siu; *Eur. Mass Spectrom.* 1, 253-260 (1995)
- [Keb00] P. Kebarle M. Peschke; *Anal. Chim. Acta* 406, 11-35 (2000)
- [Keb93] P. Kebarle, L. Tang; *Anal. Chem.* 65, 972A-986A (1993)
- [Keb97] P. Kebarle, Y. Ho; *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, R. Cole (Hrsg.), Wiley-Interscience, 3-64 (1997)
- [Kel92] M. A. Kelly, M. M. Vestling, C. C. Fenselau, P. B. Smith; *Org. Mass Spectrom.* 27, 1143-1147 (1992)
- [Keu89] *Taschenlexikon Chemie*, H. Keune (Hrsg.), VEB Deutscher Verlag für Grundstoff-industrie, Leipzig (1989)
- [Kil92] J. A. Killian; *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 391-425 (1992)
- [Kle96] W. Kleinekofort, J. Avdiev, B. Brutschy; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 152, 135-142 (1996)
- [Kle96a] W. Kleinekofort; *Dissertation*, Frankfurt am Main (1996)
- [Kle96b] W. Kleinekofort, A. Pfenninger, T. Plomer, C. Griesinger, B. Brutschy; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 156, 195-202 (1996)
- [Koh97] M. Kohler, J. A. Leary; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 162, 17-34 (1997)
- [Koh97a] M. Kohler, J. A. Leary; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8, 1124-1133 (1997)
- [Kon92] Y. Konishi, R. Feng; *Proc. of the 40th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 625-626 (1992)
- [Kon94] Y. Konishi, R. Feng; *Biochemistry* 33, 9706-9711 (1994)
- [Kos94] R. Kostianen, A. P. Bruins; *Rap. Com. Mass Spectrom.* 8, 549-558 (1994)
- [Kru95] A. N. Krutchinsky, I. V. Chernushevich, V. Spicer, W. Ens, K. G. Standing; *Proc. of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 126 (1995)
- [Lai94] V. V. Laiko, A. F. Dodonov; *Rapid Com. Mass Spectrom.* 8, 720-726 (1994)
- [Lar98] B. S. Larsen, C. N. McEwan (Hrsg.); *Mass Spectrometry of Biological Materials*, 2. Aufl., Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong (1998)
- [LeB94] J. C. Y. Le Blanc, J. Wang, R. Guevremont, K. W. M. Siu; *Org. Mass Spectrom.* 29, 587-593 (1994)
- [Lee99] T. D. Lee, L. Licklider, X.-Q. Wang, A. Desai, Y.-C. Tai; *Proc. of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 1797-1798 (1999)
- [Lee99a] V. W. S. Lee, Y.-L. Chen, L. Konermann; *Anal. Chem.* 71, 4154-4159 (1999)
- [Leh94] A. L. Lehninger, D. L. Nelson; M. M. Cox; *Prinzipien der Biochemie*, 2. Aufl., Spektrum Akadem. Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1994)
- [Leh96] W. D. Lehmann; *Massenspektrometrie in der Biochemie*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1996)
- [Li93] Y.-T. Li, Y.-L. Hsieh, J. D. Henion, B. Ganem; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 4, 631-637 (1993)
- [Lig93] K. J. Light-Wahl, B. E. Winger, R. D. Smith; *J. Am. Chem. Soc.* 115, 5869-5870 (1993)
- [Lig94] K. J. Light-Wahl, B. L. Schwartz, R. D. Smith; *J. Am. Chem. Soc.* 116, 5271-5278 (1994)
- [Loo88] J. A. Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith; *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 17, 411-414 (1988)
-

- [Loo91] J. A. Loo, R. R. Ogorzalek Loo, H. R. Udseth, C. G. Edmonds, R. D. Smith; *Rapid Com. Mass Spectrom.* 5, 101-105 (1991)
- [Loo93] J. A. Loo, A. B. Giordani, H. Muenster; *Rap. Com. Mass Spectrom.* 7, 186,189 (1993)
- [Loo93a] J. A. Loo, R. R. Ogorzalek Loo, P. C. Andrews; *Org. Mass Spectrom.* 28, 1640-1649 (1993)
- [Loo97] J. A. Loo; *Mass Spectrom. Rev.* 16, 1-23 (1997)
- [Loo98] J. A. Loo, K. A. Sannes-Lowery, P. Hu, D. P. Mack, H.-Y. Mei; *Proc. of the NATO Advanced Research Workshop on New Methods for the Study of Molecular Aggregates, Canada, 1996*, Publ. von Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; 83-99 (1998)
- [Lot99] F. Lottspeich; *Angew. Chem.* 111, 2630-2647 (1999)
- [Mam73] B. A. Mamyryn, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, V. A. Zagulin; *Sov. Phys. JETP* 37, 45-48 (1973)
- [Man97] B. A. Mansoori, D. A. Volmer, R. K. Boyd; *Rapid Com. Mass Spectrom.* 11, 1120-1130 (1997)
- [McE97] C. N. McEwen, B. S. Larsen; *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, R. Cole (Hrsg.), Wiley-Interscience, 177-202 (1997)
- [McL81] S. A. McLuckey, D. Cameron, R. G. Cooks; *J. Am.Chem. Soc.* 103, 1313-1317 (1981)
- [McL91] S. A. McLuckey, G. L. Glish, G. J. Van Berkel; *Anal. Chem.* 63, 1971-1978 (1991)
- [McL94] S. A. McLuckey, R. S. Ramsey; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5, 324-327 (1994)
- [McL94a] S. A. McLuckey, G. J. Van Berkel, D. E. Goeringer, G. L. Glish; *Anal. Chem.* 66, 689A-696A (1994)
- [Mer89] *The Merck Index*, 11. Aufl. , S. Budavari (Hrsg.), Merck&Co, Inc., Rayway (1989)
- [Mir93] U. A. Mirza, S. L. Cohen, B. T. Chait; *Anal. Chem.* 65, 1-6 (1993)
- [Mir94] U. A. Mirza, B. T. Chait; *Anal. Chem.* 66, 2898-2904 (1994)
- [Mir94a] O. A. Mirgorodskaya, A. A. Shevchenko, I. V. Chernushevich, A. F. Dodonov, A. I. Miroshnikov; *Anal. Chem.* 66, 99-107 (1994)
- [Mir96] U. A. Mirza, B.T. Chait; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 162, 173-181 (1997)
- [Mud96] D. C. Muddiman, X. Cheng, H. R. Udseth, R. D. Smith; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 7, 697-706 (1996)
- [Ogo92] R. R. Ogorzalek Loo, J. A. Loo, H. R. Udseth, J. L. Fulton, R. D. Smith; *Rapid Com. Mass Spectrom.* 6, 159-165 (1992)
- [Ogo94] R. R. Ogorzalek Loo, R. D. Smith; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5, 207-220 (1994)
- [Olu98] Z. Olumee, J. H. Callahan, A. Vertes; *Proc. of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 141 (1998)
- [Pau90] W. Paul; *Angew. Chem.* 102, 780-789 (1990)
- [Pfe00] A. Pfenninger; *Dissertation, Frankfurt am Main* (2000)
- [Pfe68] R. J. Pfeifer, C. D. Hendricks Jr.; *AIAA Journal*; 6, 496-502 (1968)
- [Pfe95] A. Pfenninger; *Diplomarbeit, Frankfurt/Main* (1995)
- [Pri98] W. D. Price, R. A. Jockusch, E. R. Williams; *J. Am. Chem. Soc.* 120, 3474-3484 (1998)
- [Prz96] M. Przybylski, M. O. Glocker; *Angew. Chem.* 108, 878-899 (1996)
- [Ray82] Lord Rayleigh, F. R. S.; *The London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal*; 5. Ser, 14, 184-186 (1882)

-
- [Rei69] C. Reichardt; *Chemische Taschenbücher* 4, W. Foerst, H. Grünewald (Hrsg.), Verlag Chemie (1969)
- [Rei97] C. Reichardt; *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 45, 759-763 (1997)
- [Rob96] C. V. Robinson, E. W. Chung, B. B. Kragelund, J. Knudsen, R. T. Aplin, F. M. Poulsen, C. M. Dobson, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 8646-8653 (1996)
- [Roe97] P. Roepstorff; *Curr. Opinion Biotechn.* 8, 6-13 (1997)
- [Rog99] H. Rogniaux, A. Van Dorselaer, P. Barth, J. F. Biellmann, J. Barbanton, M. Van Zandt, B. Chevrier, E. Howard, A. Mitschler, N. Potier, L. Urzhumtseva, D. Moras, A. Podjarny; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 635-647 (1999)
- [Röl87] F. W. Röllgen, E. Bramer-Weger, L. Bütfering; *J. de Physique C6*, 11, 48, 253-256 (1987)
- [Röm95] *Römpp Chemie-Lexikon*, J. Falbe, M. Regitz (Hrsg.), Thieme, Stuttgart, New York (1995)
- [Ros95] B. Rosinke, K. Strupat, F. Hillenkamp, J. Rosenbusch, N. Dencher, U. Krüger, H.-J. Galla; *J. Mass Spectrom.* 30, 1462-1468 (1995)
- [Sag91] J. T. Sage, D. Morikis, P. M. Champion; *Biochemistry* 30, 1227-1237 (1991)
- [Sal97] D. Salom, C. Banó, L. Braco, C. Abad; *Anal. Chim. Acta* 352, 309-317 (1997)
- [Sal98] D. Salom, E. Perez-Payá; J. Pascal, C. Abad; *Biochemistry* 37, 14279-14291 (1998)
- [San97] K. A. Sannes-Lowery, D. P. Mack, P. Hu, H.-Y. Mei, J. A. Loo; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8, 90-95 (1997)
- [Sch94] P. D. Schnier, D. S. Gross, E. R. Williams; *J. Am. Chem. Soc.* 117, 6747-6757 (1995)
- [Sch95] B. L. Schwartz, J. E. Bruce, G. A. Anderson, S. A. Hofstadler, A. L. Rockwood, R. D. Smith, A. Chilkoti, P. S. Stayton, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6, 459-465 (1995)
- [Sch95a] P. D. Schnier, D. S. Gross, E. R. Williams; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6, 1086-1097; (1995)
- [Sch95b] B. L. Schwartz, D. C. Gale, R. D. Smith, A. Chilkoti, P. S. Stayton; *J. Mass Spectrom.* 30, 1095-1102 (1995)
- [Sch96] P. D. Schnier, D. S. Gross, W. D. Price, Y. Zhao, E. R. William; *Proc. of the 44th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 473 (1996)
- [Sch96a] P. D. Schnier, W. D. Price, R. A. Jockusch, E. R. Williams; *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7178-7189 (1996)
- [Sch99] P. D. Schnier, G. J. Van Berkel; *Proc. of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 3029-3030 (1999)
- [Sha98] S. A. Shaffer, D. C. Prior, G. A. Anderson, H. R. Udseth, R. D. Smith; *Anal. Chem.* 70, 4111-4119 (1998)
- [Smi86] D. P. H. Smith; *IEEE Trans. on Industry Applications* 1A-22, 3, 527-535 (1986)
- [Smi88] R. D. Smith, J. A. Olivares, N. T. Nguyen, H. R. Udseth; *Anal. Chem.* 60, 436-441 (1988)
- [Smi90] R.D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, H. R. Udseth; *Anal. Chem.* 62, 882-899 (1990)
- [Smi91] R. D. Smith, J. A. Loo, R. R. Ogorzalek Loo, M. Busman, H. R. Udseth; *Mass Spectrom. Rev.* 10, 359-451 (1991)
- [Smi93] R. D. Smith, K. J. Light-Wahl; *Biol. Mass Spectrom.* 22, 493-501 (1993)
- [Smi94] D. L. Smith, Z. Zhang; *Mass Spectrom. Rev.* 13, 411-429 (1994)
-

- [Smi95] R. W. Smith; Proc. of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 901 (1995)
- [Smi97] R. D. Smith, J. E. Bruce, Q. Wu, Q. P. Lei; Chem. Soc. Rev. 26, 191-202 (1997)
- [Spr93] N. Sproch, T. Kruger; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 4, 964-967 (1993)
- [Ste97] J. L. Stephenson, G. J. Van Berkel, S. A. McLuckey; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 8, 637-644 (1997)
- [Ste99] J. L. Sterner, M. V. Johnston, G. R. Nicol, D. P. Ridge; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 10, 483-491 (1999)
- [Ste99a] I. I. Stewart; Spectrochim. Acta Part B, 54, 1649-1695 (1999)
- [Str90] L. Stryer; Biochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg (1990)
- [Str99] K. Strupat, N. Carte, H. Rogniaux, E. Leize, A. Van Dorsselaer; Proc. of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1287-1288 (1999)
- [Str99a] A. M. Striegel, P. Piotrowiak, S. M. Boué, R. B. Cole; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 10, 254-260 (1999)
- [Tan91] L. Tang, P. Kebarle; Anal. Chem. 63, 2709-2715 (1991)
- [Tay64] G. Taylor; Proc. Roy. Soc. A, 280, 383-397 (1964)
- [Thi00] M. Thierolf; Dissertation, Frankfurt am Main, in Vorbereitung (2000)
- [Tho79] B. A. Thomson, J. V. Iribarne; J. Chem. Phys. 71, 4451-4463 (1979)
- [Van91] G. J. Van Berkel, S. A. McLuckey, G. L. Glish; Anal. Chem. 63, 1098-1109 (1991)
- [Van96] G. J. Van Berkel, F. Zhou, J. T. Aronson; Proc. of the 44th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1088 (1996)
- [Van97] G. J. Van Berkel; Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications, R. Cole (Hrsg.), Wiley-Interscience, 65-106 (1997)
- [Van99] W. D. van Dongen, J. I. T. van Wijk, B. N. Green, W. Heerma, J. Haverkamp; Rapid Com. Mass Spectrom. 13, 1712-1716 (1999)
- [Vea74] W. R. Veatch, E. T. Fossel, E. R. Blout; Biochemistry 13, 5249-5256 (1974)
- [Vea74a] W. R. Veatch, E. R. Blout; Biochemistry 13, 5257-5264 (1974)
- [Vee99] T. D. Veenstra; Biophys. Chem. 79, 63-79 (1999)
- [Vek95] K. Vekey; Mass Spectrom. Rev. 14, 195-225 (1995)
- [Ver94] A. N. Verentchikov, W. Ens, K. G. Standing; Anal. Chem. 66, 126-133 (1994)
- [Wai99] D. Waidelich, J. Stahl-Zeng; Proc. of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 165 (1998)
- [Wal88] B. A. Wallace, K. Ravikumar; Science 241, 182-187 (1988)
- [Wan00] G. Wang, R. B. Cole; Anal. Chim. Acta 406, 53-65 (2000)
- [Wan94] G. Wang, R. B. Cole; Org. Mass Spectrom. 29, 419-427 (1994)
- [Wan95] G. Wang, R. B. Cole; Anal. Chem. 67, 2892-2900 (1995)
- [Wan96] G. Wang, R. B. Cole; J. Am. Soc. Mass Spectrom. 7, 1050-1058 (1996)
- [Wan96a] J. Wang, M. Busman, D. R. Knapp; Proc. of the 44th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1063 (1996)
- [Wan97] G. Wang, R. B. Cole; Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications, R. Cole (Hrsg.), Wiley-Interscience, 137-174 (1997)
- [Wan98] G. Wang; R. B. Cole; Anal. Chem. 70, 873-881 (1998)
- [Wan98a] H. Wang, M. Hackett; Anal. Chem. 70, 205-212 (1998)
- [Wat99] A. Wattenberg, F. Sobott, B. Brutschy; Proc. of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1331-1332 (1999)

-
- [Web89] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme; *Science* 243, 85-88 (1989)
- [Whi85] C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn; *Anal. Chem.* 57, 675-679 (1985)
- [Wig97] H. Wiggers, P. Walzel; *Chemie Ingenieur Technik* 69, 1066-1073 (1997)
- [Wil55] W. C. Wiley, I. H. McLaren; *Rev. Sci. Instr.* 26, 1150-1157 (1955)
- [Wil94] M. S. Wilm, M. Mann; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 136, 167-180 (1994)
- [Wil96] E. R. Williams; *J. Mass Spectrom.* 31, 831-842 (1996)
- [Wil96a] M. Wilm, M. Mann; *Anal. Chem.* 68, 1-8 (1996)
- [Wil98] E. R. Williams; *Anal. Chem.* 70, 179A-185A (1998)
- [Win92] B. E. Winger, K. J. Light-Wahl, R. D. Smith; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 3, 624-630 (1992)
- [Win93] B. E. Winger, K. J. Light-Wahl, R. R. Ogorzalek Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 4, 536-545 (1993)
- [Win97] R. L. Winston, M. C. Fitzgerald; *Mass Spectrom. Rev.* 16, 165-179 (1997)
- [Wu93] J. Wu, C. B. Lebrilla; *J. Am. Chem. Soc.* 115, 3270-3275 (1993)
- [Wut82] M. Wutz, H. Adam, W. Walcher; *Theorie und Praxis der Vakuumtechnik*, 2. Aufl., Friedrich Vieweg&Sohn, Braunschweig, Wiesbaden (1982)
- [Yam84] M. Yamashita, J. B. Fenn; *J. Phys. Chem.* 88, 4451 (1984)
- [Yam84a] M. Yamashita, J. B. Fenn; *J. Phys. Chem.* 88, 4671-4675 (1984)
- [Zen98] R. Zenobi, R. Knochenmuss; *Mass Spectrom. Rev.* 17, 337-366 (1998)
- [Zha93] K. Zhang, D. M. Zimmerman, A. Chung-Phillips, C. J. Cassidy; *J. Am. Chem. Soc.* 115, 10812-10822 (1993)
- [Zha98] D. Zhan, J. B. Fenn; *Proc. of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 146 (1998)
- [Zho00] S. Zhou, K. D. Cook; *Anal. Chem.* 72, 963-969 (2000)
- [Zho95] S. Zhou, M. Hamburger; *Rapid Com. Mass Spectrom.* 9, 1516-1521 (1995)
- [Zoo97] D. R. Zook, A. P. Bruins; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 162, 129-147 (1997)

Liste der verwendeten Analyte

[Glu ¹]-Fibrinopeptid	Sigma, Deisenhofen, D
Angiotensin II	Sigma, Deisenhofen, D
Bradykinin	Sigma, Deisenhofen, D
Concanavalin A (Schwertbohne)	Sigma, Deisenhofen, D
D-Biotin	Sigma, Deisenhofen, D
Dithiothreitol (DTT)	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Gramicidin D [Dubos] (<i>Bacillus brevis</i>)	Sigma, Deisenhofen, D
Hämoglobin (Mensch)	Sigma, Deisenhofen, D
Hämoglobin (Pferd)	Sigma, Deisenhofen, D
Hämoglobin (Rind)	Sigma, Deisenhofen, D
Hämoglobin (Schwein)	Sigma, Deisenhofen, D
Maltoheptaose	Sigma, Deisenhofen, D
Myoglobin (Pottwal)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg, D
Neurotensin	Sigma, Deisenhofen, D
Octylglucosid (Octyl-D-glucoopyranosid)	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Streptavidin (<i>Streptomyces avidinii</i>)	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Substanz P	Sigma, Deisenhofen, D
Turanose	Fluka Chemie AG, Buchs, CH

Aminosäuresequenzen verschiedener Hämoglobin-Varianten

im 1-Buchstaben-Code (nach Swissprot Proteindatenbank; <http://www.expasy.ch>). Saure Aminosäuren sind *fett kursiv* hervorgehoben, basische Aminosäuren sind fett dargestellt.

Sequenzen der α -Untereinheiten:

	Rind	Schwein	Pferd	Mensch		Rind	Schwein	Pferd	Mensch		Rind	Schwein	Pferd	Mensch		Rind	Schwein	Pferd	Mensch	
1	V	V	V	V		41	T	T	T	T	81	S	S	S	S	121	V	V	V	V
2	L	L	L	L		42	Y	Y	Y	Y	82	<i>E</i>	A	N	A	122	H	H	H	H
3	S	S	S	S		43	F	F	F	F	83	L	L	L	L	123	A	A	A	A
4	A	A	A	P		44	P	P	P	P	84	S	S	S	S	124	S	S	S	S
5	A	A	A	A		45	H	H	H	H	85	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	125	L	L	L	L
6	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>		46	F	F	F	F	86	L	L	L	L	126	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
7	K	K	K	K		47	<i>D</i>	N	<i>D</i>	<i>D</i>	87	H	H	H	H	127	K	K	K	K
8	G	A	T	T		48	L	L	L	L	88	A	A	A	A	128	F	F	F	F
9	N	N	N	N		49	S	S	S	S	89	H	H	H	H	129	L	L	L	L
10	V	V	V	V		50	H	H	H	H	90	K	K	K	K	130	A	A	S	A
11	K	K	K	K		51	G	G	G	G	91	L	L	L	L	131	N	N	S	S
12	A	A	A	A		52	S	S	S	S	92	R	R	R	R	132	V	V	V	V
13	A	A	A	A		53	A	<i>D</i>	A	A	93	V	V	V	V	133	S	S	S	S
14	W	W	W	W		54	Q	Q	Q	Q	94	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	134	T	T	T	T
15	G	G	S	G		55	V	V	V	V	95	P	P	P	P	135	V	V	V	V
16	K	K	K	K		56	K	K	K	K	96	V	V	V	V	136	L	L	L	L
17	V	V	V	V		57	G	A	A	G	97	N	N	N	N	137	T	T	T	T
18	G	G	G	G		58	H	H	H	H	98	F	F	F	F	138	S	S	S	S
19	G	G	G	A		59	G	G	G	G	99	K	K	K	K	139	K	K	K	K
20	H	Q	H	H		60	A	Q	K	K	100	L	L	L	L	140	Y	Y	Y	Y
21	A	A	A	A		61	K	K	K	K	101	L	L	L	L	141	R	R	R	R
22	A	G	G	G		62	V	V	V	V	102	S	S	S	S					
23	<i>E</i>	A	<i>E</i>	<i>E</i>		63	A	A	G	A	103	H	H	H	H					
24	Y	H	Y	Y		64	A	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	104	S	C	C	C					
25	G	G	G	G		65	A	A	A	A	105	L	L	L	L					
26	A	A	A	A		66	L	L	L	L	106	L	L	L	L					
27	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>E</i>		67	T	T	T	T	107	V	V	S	V					
28	A	A	A	A		68	K	K	L	N	108	T	T	T	T					
29	L	L	L	L		69	A	A	A	A	109	L	L	L	L					
30	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>E</i>		70	V	V	V	V	110	A	A	A	A					
31	R	R	R	R		71	<i>E</i>	G	G	A	111	S	A	V	A					
32	M	M	M	M		72	H	H	H	H	112	H	H	H	H					
33	F	F	F	F		73	L	L	L	V	113	L	H	L	L					
34	L	L	L	L		74	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	114	P	P	P	P					
35	S	G	G	S		75	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	115	S	<i>D</i>	N	A					
36	F	F	F	F		76	L	L	L	M	116	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>E</i>					
37	P	P	P	P		77	P	P	P	P	117	F	F	F	F					
38	T	T	T	T		78	G	G	G	N	118	T	N	T	T					
39	T	T	T	T		79	A	A	A	A	119	P	P	P	P					
40	K	K	K	K		80	L	L	L	L	120	A	S	A	A					

Sequenzen der β -Untereinheiten:

Die β -Untereinheit aus Rinderhämoglobin besteht im Gegensatz zu den anderen Varianten der b-Untereinheit nur aus 145 Aminosäuren. Zur Verdeutlichung des hohen Übereinstimmungsgrades mit den anderen Sequenzen beginnt die Numerierung in diesem Fall bei 2.

	Rind	Schwein	Pferd	Mensch		Rind	Schwein	Pferd	Mensch		Rind	Schwein	Pferd	Mensch		Rind	Schwein	Pferd	Mensch	
1		V	V	V		41	F	F	F		81	L	L	L		121	E	D	D	E
2	M	H	Q	H		42	F	F	F		82	K	K	K		122	F	F	F	F
3	L	L	L	L		43	E	E	D		83	G	G	G		123	T	N	T	T
4	T	S	S	T		44	S	S	S		84	T	T	T		124	P	P	P	P
5	A	A	G	P		45	F	F	F		85	F	F	F		125	V	N	E	P
6	E	E	E	E		46	G	G	G		86	A	A	A		126	L	V	L	V
7	E	E	E	E		47	D	D	D		87	A	K	A		127	Q	Q	Q	Q
8	K	K	K	K		48	L	L	L		88	L	L	L		128	A	A	A	A
9	A	E	A	S		49	S	S	S		89	S	S	S		129	D	A	S	A
10	A	A	A	A		50	T	N	N		90	E	E	E		130	F	F	Y	Y
11	V	V	V	V		51	A	A	P		91	S	L	L		131	Q	Q	Q	Q
12	T	L	L	T		52	D	D	G		92	H	H	H		132	K	K	K	K
13	A	G	A	A		53	A	A	A		93	C	C	C		133	V	V	V	V
14	F	L	L	L		54	V	V	V		94	D	D	D		134	V	V	V	V
15	W	W	W	W		55	M	M	M		95	K	Q	K		135	A	A	A	A
16	G	G	D	G		56	N	G	G		96	L	L	L		136	G	G	G	G
17	K	K	K	K		57	N	N	N		97	H	H	H		137	V	V	V	V
18	V	V	V	V		58	P	P	P		98	V	V	V		138	A	A	A	A
19	K	N	N	N		59	K	K	K		99	D	D	D		139	N	N	N	N
20	V	V	E	V		60	V	V	V		100	P	P	P		140	A	A	A	A
21	D	D	E	D		61	K	K	K		101	E	E	E		141	L	L	L	L
22	E	E	E	E		62	A	A	A		102	N	N	N		142	A	A	A	A
23	V	V	V	V		63	H	H	H		103	F	F	F		143	H	H	H	H
24	G	G	G	G		64	G	G	G		104	K	R	R		144	R	K	K	K
25	G	G	F	G		65	K	K	K		105	L	L	L		145	Y	Y	Y	Y
26	E	E	E	E		66	K	K	K		106	L	L	L		146	H	H	H	H
27	A	A	A	A		67	V	V	V		107	G	G	G						
28	L	L	L	L		68	L	L	L		108	N	N	N						
29	G	G	G	G		69	D	Q	H		109	V	V	V						
30	R	R	R	R		70	S	S	S		110	L	I	L						
31	L	L	L	L		71	F	F	F		111	V	V	V						
32	L	L	L	L		72	S	S	G		112	V	V	V						
33	V	V	V	V		73	N	D	E		113	V	V	V						
34	V	V	V	V		74	G	G	G		114	L	L	L						
35	Y	Y	Y	Y		75	M	L	V		115	A	A	A						
36	P	P	P	P		76	K	K	H		116	R	R	R						
37	W	W	W	W		77	H	H	H		117	N	R	H						
38	T	T	T	T		78	L	L	L		118	F	L	F						
39	Q	Q	Q	Q		79	D	D	D		119	G	G	G						
40	R	R	R	R		80	D	N	N		120	K	H	K						

Liste der verwendeten Abkürzungen

Ac ⁻	Acetat
BuOH	Butanol
CRM	<i>charged residue-Modell</i>
DCA ⁻	Dichloracetat
DTT	Dithiothreitol
ESI	Elektrospray-Ionisierung, <i>electrospray ionization</i>
EtOH	Ethanol
Fo ⁻	Formiat
FTICR	<i>fourier transform ion cyclotron resonance</i>
FWHM	<i>full width at half maximum</i>
GB	Gasphasenbasizität
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IEM	<i>ion evaporation-Modell</i>
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MCP	Vielkanalplatte, <i>microchannel plate</i>
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
oTOF	<i>orthogonal acceleration time of flight</i>
PA	Protonenaffinität
PrOH	Propanol
QIT	Quadrupol-Ionenfalle
TDC	<i>time-to-digital converter</i>
TFA ⁻	Trifluoracetat
TOF	<i>time of flight</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
IR	Infrarot
UV	Ultraviolett
LILBID	<i>laser induced liquid beam ionization/desorption</i>

ANDREA SCHMIDT

Westhochster Str. 95
65931 Frankfurt
geb. am 4.6.1970 in Frankfurt/M.

SCHULAUUSBILDUNG

1976-1980	Grundschule, Kathe-Kollwitz-Schule Frankfurt/M.-Zeilsheim
1980 – 1986	Helene-Lange-Gymnasium in Frankfurt/M.-Höchst
1986 – 1989	Friedrich-Dessauer-Gymnasium in Frankfurt/M.-Höchst

HOCHSCHULAUUSBILDUNG

10/1989 – 10/1995	Chemiestudium an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/M.
7/1992	Vordiplom
4/1995 – 10/1995	Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/M. Physikalische und Theoretische Chemie (Prof. B. Brutschy) Thema: „Laserspektroskopische Untersuchung des photoinduzierten Ladungstransfers in Mikrosolvatclustern“
seit 1/1996	Promotionsstudium im Fachbereich Chemie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/M. Instrumentelle Analytische Chemie (Prof. M. Karas)
6/1999 – 8/1999	Forschungsaufenthalt an der University of California, Berkeley, USA in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Williams, Dep. of Chemistry gefördert vom DAAD im Rahmen des Hochschulsonderprogramms III (Stipendiennr. D/99 03989)

TÄTIGKEITEN INNERHALB UND AUßERHALB DER HOCHSCHULE

1990 – 1992	in den Semesterferien als Werkstudentin in der Fa. Hoechst AG (Abt. Synthetika Süd)
10/1992 – 2/1994	studentische Hilfskraft im Fachbereich Humanmedizin, Zentrum der Biologischen Chemie Betreuung von Medizinstudenten im Biochemiepraktikum
4/1995 – 9/1995	studentische Hilfskraft im Fachbereich Chemie Betreuung der ungen „Physikalische Chemie“
seit 1/1996	wissenschaftliche Angestellte im Fachbereich Chemie Betreuung von Medizinstudenten im Chemiepraktikum und im praktikumsbegleitenden Seminar

Konferenzbeiträge:

- 1997 30. Diskussionstagung der Arbeitsgemeinschaft Massenspektrometrie (AGMS), Konstanz, Deutschland, 20.5. – 23.5.1997
Vortrag:
R. Juraschek, F. W. Röllgen, A. Schmidt, M. Karas
„Elektrospray-Ionisierungseffizienz in verschiedenen axialen Spraymoden“
45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Palm Springs, USA, 1.6. – 5.6.1997
Posterbeitrag:
R. Juraschek, A. Schmidt, M. Karas, F. W. Röllgen
„Electrospray Ionization Efficiency in different Spray Modes“
14th International Mass Spectrometry Conference (IMSC), Tampere, Finland, 25.8. – 29.8.1997
Posterbeitrag:
R. Juraschek, A. Schmidt, M. Karas, F. W. Röllgen
„Dependence of Electrospray Ionization Efficiency on Axial Spray Modes“
- 1998 DPG-Frühjahrstagung, Konstanz, Deutschland, 16.3. – 19.3.1998
Vortrag:
A. Schmidt, R. Juraschek, M. Karas, F. W. Röllgen
„Untersuchungen zum Einfluß verschiedener axialer Spraymoden auf die Ionisierungseffizienz in der Elektrospray-Massenspektrometrie“
46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando, USA, 31.5. – 4.6.1998
Posterbeitrag:
A. Schmidt, R. Juraschek, M. Karas
„Effect of Different Solvent Parameters on Ion Signals obtained in ESI TOF MS“
- 1999 32. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Oldenburg, Deutschland, 25.5. – 28.5.1999
Posterbeitrag:
A. Schmidt, M. Karas
„Einfluß von Coulomb-Wechselwirkungen auf die Stabilität von nicht-kovalenten Häm-Protein-Komplexen in der Gasphase“
47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, USA, 14.6. – 17.6.1999
Posterbeitrag:
A. Schmidt, M. Karas
„Effect of Electrostatic Interactions on the Stability of Noncovalent Complexes in ESI MS“
- 2000 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Long Beach, USA, 11.6.-15.6.2000
Posterbeitrag:
A. Schmidt, M. Karas
„Characterization of Peptide/Anion Adducts by nano ESI QIT MS“
-

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. M. Karas für die Anregung zu diesem interessanten Arbeitsgebiet und seine stete Bereitschaft zu anregenden Diskussionen, mit denen er den Fortgang der Arbeit zu jeder Zeit mit großem Engagement begleitet und gefördert hat.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die gute Zusammenarbeit und die einmalige Arbeitsatmosphäre, die mich immer motiviert und erfreut hat. Dieser Dank gilt insbesondere meinen Bürogefährten Dr. Anja Pfenninger, Matthias Glückmann und Michael Thierolf, die mir das Arbeiten in freundschaftlicher Atmosphäre ermöglichten. Das ausgesprochen fruchtbare Arbeitsklima in der Gruppe lieferte nicht nur gehaltvolle Nahrung für den Geist in Form angeregter Diskussionen, sondern legte auch Wert auf den Erhalt des leiblichen Wohls in den häufigen Mittags-Kochrunden. Mein Dank gilt ebenfalls Dr. Reinhard Juraschek, der in der Anfangszeit meiner Arbeit meine Abhärtung gegenüber den Tücken der ESI vorantrieb und mich im beherzten Gebrauch des Schraubenschlüssels im Kampf gegen technische Probleme unterwies.

Danken möchte ich auch den Angestellten im Arbeitskreis, Erika Sportiello, Walter Eckhard und Jürgen Döll, für die engagierte Unterstützung in organisatorischen Angelegenheiten und die gute Zusammenarbeit. Mein Dank gilt ebenfalls Ernst Winter für seine professionelle (und immer phänomenal schnelle) Hilfe aus der mechanischen Werkstatt.

Bei Prof. E. Williams, UC Berkeley, und den Mitgliedern seines Arbeitskreises, insbesondere Rebecca Jockusch, bedanke ich mich für die Einarbeitung in die FTICR-MS. Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst danke ich für das Stipendium (Stipendiennr. D/99 03989), das mir den zweimonatigen Aufenthalt in dieser Arbeitsgruppe ermöglichte.

Matthias Glückmann, Dr. Thomas Dülcks und – ganz besonders – Dr. Anja Pfenninger gilt mein herzlicher Dank für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Ich danke ebenfalls meiner Mutter Christa Schmidt, die mit Geduld und untrüglichen Spürsinn auch die verstecktesten Tippfehler entdeckte.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner Studienzeit stets unterstützten und mit reger Anteilnahme den Fortgang meiner Arbeit verfolgten. Ich bedanke mich ebenfalls bei meinen Freunden für den Ausgleich, den sie mir immer zu meiner Arbeit lieferten. Dabei danke ich insbesondere Anja Pfenninger, mit der mich mittlerweile 15 Jahre Arbeit im Bereich der Chemie und viele Jahre der Freundschaft verbinden.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Dirk Aderhold, der zwar einen großen Teil meiner Arbeit nur aus weiter Entfernung verfolgen konnte, aber dennoch immer nach Kräften Anteil genommen und mich seelisch und moralisch aufgebaut hat.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorgelegte Dissertation

„Untersuchungen des Elektrospray-Ionisierungsprozesses zum massenspektrometrischen
Nachweis nicht-kovalenter Komplexe“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schriften bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 10. Juli 2000

(Andrea Schmidt)
