

Die Multiphotonen-Ionisations(MUPI)-Massenspektrometrie**

Von Jürgen Grotemeyer* und Edward W. Schlag

Neue analytische
Methoden (34)

Die Massenspektrometrie ist eines der wichtigsten analytischen Hilfsmittel in Chemie, Biologie, Medizin und verwandten Bereichen. In den letzten 30 Jahren wurden Methoden sowohl zur quantitativen als auch zur qualitativen Analyse unterschiedlichster Substanzen entwickelt. Von der Einführung des Lasers in die Chemie hat auch die Massenspektrometrie profitiert, da seine nicht-linearen Eigenschaften und seine Abstimmbarkeit für sie grundsätzlich neue Möglichkeiten eröffnen. Die Multiphotonen-Ionisations-Massenspektrometrie verknüpft UV-Spektroskopie und Massenspektrometrie, wodurch eine zweidimensionale Meßmethode entsteht, die substanzspezifische und sogar zustandsspezifische Analytik in bisher unbekanntem Maße ermöglicht. In diesem Fortschrittsbericht sollen Grundlagen und Möglichkeiten der MUPI-Massenspektrometrie vorgestellt und an Untersuchungen von Aminosäuren, Peptiden, Chlorophyllen und Zuckern erläutert werden. Die Multiphotonen-Ionisation läßt sich für jede Verbindung so steuern, daß ausschließlich das Molekülion gebildet wird. Durch Erhöhung der Laserlichtintensität lassen sich aber auch substanzspezifische Fragmentierungen des Moleküls einleiten, was zu einer einfachen und schnellen Identifizierung der Substanz beiträgt.

1. Einleitung

Analytische Fragen, also die Identifizierung einer Substanz und die Aufklärung ihrer Molekülstruktur, haben seit den Anfängen der Massenspektrometrie die Hauptrolle gespielt. Eine Verbindung kann einerseits über ihr Molekülion identifiziert werden, da die genaue Bestimmung des Molekulargewichts zur Elementzusammensetzung und zur Summenformel führt. Andererseits sind auch

Zerfälle des Molekülions, die ein spezifisches Fragmentierungsmuster liefern, wesentlich für die Identifizierung und Strukturaufklärung^[1].

Aussagekräftige Massenspektren sind nur bei Beachtung von vier prinzipiellen technischen Anforderungen zu erwarten:

- Die zu untersuchende Substanz muß entweder in Form intakter Moleküle in die Gasphase überführt und dann ionisiert werden, oder sie muß in einem Schritt verdampft und ionisiert werden.
- Verdampfung und Ionisation sollen nach Möglichkeit so schonend sein, daß das Signal des Molekülions ausreichend intensiv ist. Es sollen jedoch möglichst auch die Signale von substanzspezifischen Fragment-Ionen beobachtbar sein.
- Die entstandenen Ionen müssen nach ihrer Masse aufgetrennt werden, und das mit möglichst hoher Präzision.

[*] Dr. J. Grotemeyer, Prof. Dr. E. W. Schlag
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der
Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-8046 Garching

[**] Es existiert eine Vielzahl von Abkürzungen für die Photonen-Ionisation: MPI, REMPI, R2PI oder REMPI/F beschreiben immer eine Zweiphotonen-Anregung, die zur Ionisation führt. Wir verwenden für die Multiphotonen-Ionisation den Oberbegriff MUPI, da, wie in diesem Beitrag beschrieben, auch Drei-, Vier- oder Multiphotonen-Absorptionen über „erlaubte“ Zwischenzustände sowie nicht-resonante Absorptionen zur Ionisation führen können.

- Schließlich müssen diese Ionen nachgewiesen werden; dabei darf keine Diskriminierung aufgrund der Masse auftreten.

In der letzten Dekade wurden Techniken entwickelt, die diese Anforderungen zumindest partiell erfüllen können, und es wurde der Meßbereich für Routineuntersuchungen von einigen 100 Da auf einige 1000 Da ausgedehnt. Die treibende Kraft dabei war, daß vor allem in der Biochemie immer größere Moleküle analysiert werden sollen.

Dieser Fortschrittsbericht soll zeigen, daß die „optische Ionisation“ mit einer Laserlichtquelle in der Massenspektrometrie ein prinzipiell neues und generell anwendbares Ionisationsverfahren ist. Die Kopplung der Massenspektrometrie mit der Ionisation durch abstimmbares Laserlicht ergibt ein zweidimensionales analytisches Verfahren, das sowohl absorptionsspektroskopische als auch massenspektrometrische Information liefert. Ebenfalls zweidimensionale Verfahren sind die Kopplung von Massenspektrometrie und Gaschromatographie (GC/MS)^[2], Flüssigkeitschromatographie (LC/MS)^[3] oder auch Massenspektrometrie (MS/MS)^[4].

2. Allgemeines zur Methode

Die in den letzten Jahren entwickelten Verfahren, um schwerflüchtige und große Moleküle^[*] massenspektrometrisch zu untersuchen, sind häufig nur auf spezielle Probleme anwendbar. Generell einsetzbar sind die *Particle-Impact*-Methoden, bei denen Atome Ionen aus einer Matrix „herausschlagen“: die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS)^[5], die Fast-Atom-Bombardment (FAB)-Methode^[6], die ²⁵²Cf-Plasma-Desorption (²⁵²Cf-PD)^[7] und die Laser-Desorption (LD)-Methode^[8]. Daneben werden aber auch die direkte chemische Ionisation (DCI)^[9] und die Feld-Desorption (FD)^[10] zur Untersuchung großer Moleküle eingesetzt.

Obwohl sich diese Methoden in ihren technischen Ausführungen erheblich unterscheiden, haben sie doch eines gemeinsam: Desorption und Ionisation sind miteinander gekoppelt^[11]; eine Steuerung des Ionisationsprozesses und damit des Ausmaßes der Fragmentierung ist nicht möglich. Im allgemeinen kann nicht das Molekül nachgewiesen werden, sondern Addukt-Ionen, die durch Anlagerung von Protonen und/oder Alkalimetall-Kationen entstehen. Auch wird häufig die Matrixsubstanz mitionisiert, was zu einem erheblichen Anteil nicht-substanzspezifischer Ionen und damit zu Komplikationen bei der Interpretation des Massenspektrums führen kann. Will man eine „abstimmbare Ionisation“ erreichen, müssen Verdampfung und Ionisation zeitlich getrennt werden.

In einem MUPI-Massenspektrometrie-Experiment wird eine Substanz zunächst verdampft, was auf mehrere Arten möglich ist (siehe Abschnitt 2.2); die Moleküle in der Gasphase werden dann durch Laserlicht ionisiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Ein solcher

Zweistufenprozeß liefert höhere Ionenausbeuten und ist variabler als die einstufigen Direkt-Ionisationen.

2.1. Multiphotonen-Ionisation

Durch Multiphotonen-Ionisation entsteht aus einem neutralen Molekül ein Radikalkation, wie auch bei allen konventionellen Impact-Ionisationsverfahren, z. B. der Elektronenstoß-Ionisation (EI), der Ionisation durch Ladungsaustausch (CE) oder der Einphotonen-Ionisation (PI)^[1], so daß MUPI mit diesen Verfahren verglichen werden muß.

Die abstimmbare Multiphotonen-Ionisation wurde erstmals 1978 von Boesl et al.^[12] und Zandee et al.^[13] angewendet und seither in mehreren Übersichten diskutiert^[14-17]. Während bei den konventionellen Ionisationsmethoden dem Molekül in *einem* Schritt eine Energie zugeführt wird, die größer ist als seine Ionisationsenergie, so daß zusätzlich zur Ionisation Fragmentierungen ausgelöst werden, ist bei MUPI die Energie eines einzelnen Photons geringer als die Ionisationsenergie (Abb. 1). Die Wellenlänge des Photons wird auf die Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand und einem angeregten Zustand des neutralen Moleküls abgestimmt. Durch Absorption mehrerer Photonen muß dann die zur Ionisation notwendige Energie im Molekül akkumuliert werden.

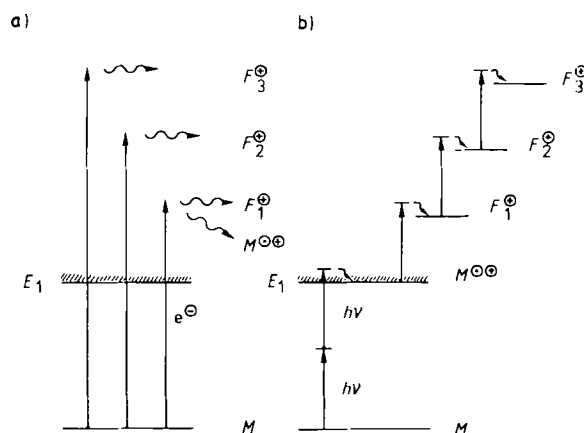


Abb. 1. Unterschied zwischen a) Elektronenstoß-Ionisation (EI) und b) Multiphotonen-Ionisation (MUPI). E_1 = erste Ionisationsenergie, F_1^+ , F_2^+ , F_3^+ = Fragment-Ionen. Anders als bei EI werden die Molekülionen $M^{\bullet+}$ bei MUPI mit schmälerer Energieverteilung und wenig Überschußenergie gebildet.

Die Absorption von Photonen durch Moleküle ist im allgemeinen ein Prozeß mit geringer Ausbeute. Wenn jedoch die Wellenlänge der eingestrahlten Photonen gerade der Energiedifferenz zwischen dem Molekülgrundzustand und einem angeregten Molekülzustand entspricht, wird die Absorptionseffizienz um mehrere Größenordnungen gesteigert (Resonanzverstärkung)^[18,19], vor allem wenn die Photonenwellenlänge mit einem Maximum im UV/VIS-Spektrum des Moleküls zusammenfällt.

Im einfachsten Fall führt die Absorption von zwei UV-Photonen zur Ionisation (Abb. 2a). Aber auch die Drei-

[*] Die Einteilung der in diesem Beitrag besprochenen Moleküle in kleine (<300 Da), mittlere (300-1000 Da) und große Moleküle (>1000 Da) ist willkürlich.

[*] Im allgemeinen entstehen bei SI-, FAB-, CI-, ²⁵²Cf-PD- und LD-Massenspektrometrie Addukt-Ionen aus dem Molekül und einem Proton oder einem Alkalimetall-Kation.

oder Vierphotonen-Ionisation^[20, 21] ist möglich (Abb. 2b, c). Auch eine Multiphotonen-Ionisation mit Photonen verschiedener Wellenlänge (Abb. 2d) läßt sich durchführen. Abbildung 2e zeigt eine nicht-resonante Zweiphotonen-Ionisation, für die allerdings sehr viel intensiveres Laserlicht benötigt wird als für die resonante Anregung.

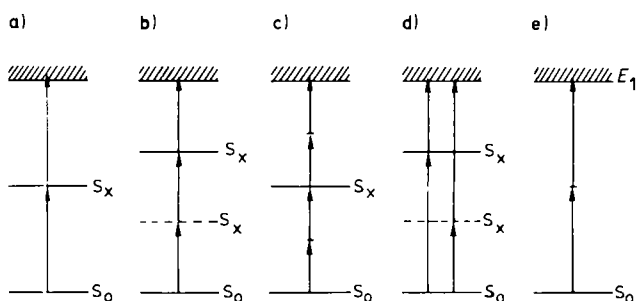


Abb. 2. Einige prinzipielle Möglichkeiten von MUPI. S_x steht für „erlaubte“ Zwischenzustände, bei denen es sich meist um S_1 -Zustände handelt. Es können aber auch höhere Zustände benutzt werden. a) „Normale“ resonante Zweiphotonen-Ionisation. b) Resonante Dreiphotonen-Ionisation über zwei Zwischenzustände. c) Vierphotonen-Ionisation über einen resonanten Zwischenzustand. d) Resonante Zweiphotonen-Ionisation mit Photonen unterschiedlicher Wellenlänge. e) Nicht-resonante Zweiphotonen-Ionisation.

Zusätzlich läßt sich mit MUPI eine gezielte, zustandsselektive Bildung der Molekülionen erreichen. An mehreren Verbindungen wurde gezeigt^[22], daß bei MUPI die Molekülionen überwiegend in einem wohldefinierten Schwingungszustand, meist dem Schwingungsgrundzustand, gebildet werden. Die beim Ionisationsschritt zugeführte Überschußenergie wird von dem aus dem Molekül entfernten Elektron als kinetische Energie mitgenommen, so daß die Molekülionen gleiche oder nur wenig unterschiedliche Energien haben (Abb. 1). Bei EI hingegen bleibt die Überschußenergie in den Ionen; dies führt zu einer breiten Energieverteilung, die die Energieverteilung der Stoßelektronen widerspiegelt.

Bei zunehmender Laserleistung führt eine Absorption von Photonen durch das Molekülion zu Fragmentierungsreaktionen. Mehrere Mechanismen, um das Auftreten von Fragmentierungsreaktionen zu erklären, sind diskutiert worden^[23–27]. Allgemein akzeptiert ist inzwischen das „Ladder-Switching“-Modell, das durch experimentelle Befunde^[28] und die Ergebnisse theoretischer Arbeiten^[29] gestützt wird. Wie in Abbildung 1 gezeigt, absorbiert das neutrale Molekül zwei Photonen auf seiner „Absorptionsleiter“ und wird ionisiert. Die innere Energie des Molekülions ist dabei nur geringfügig größer als die Ionisationsenergie. Das entstandene Molekülion absorbiert ein oder mehrere Photonen, wodurch die erste Fragmentierungsreaktion eingeleitet wird. Damit ist ein Wechsel auf die Absorptionsleiter des Fragment-Ions verbunden. Dieses Fragment-Ion kann nun wieder Photonen aufnehmen und weiter fragmentieren. Dieser Absorptions-Fragmentierungs-Mechanismus kann bei genügender Lichtintensität und typischen Laserpulsdauern von 6–10 ns mehrfach durchlaufen werden und sogar zur Zerlegung des Moleküls in seine Atome führen.

Da die Ionen bei MUPI mit wenig Überschußenergie entstehen, nimmt der Anteil metastabiler Ionen erheblich zu^[30, 75, 87]. Dieser Aspekt ist für energetische und dynami-

sche Untersuchungen von Elementarreaktionen in der Gasphase von Bedeutung (siehe Abschnitt 3).

2.1.1. Weiche Ionisation

Die Absorptionsausbeute hängt deutlich von der Intensität des Laserlichts ab. Hält man die Intensität klein, etwa um Werte von 10^6 W cm^{-2} , so läßt sich die Mehrfachabsorption von Photonen begrenzen und eine ausschließliche Bildung von Molekülionen erreichen. In Abbildung 3a ist dies am Massenspektrum vom *p*-Xylol gezeigt. Da wegen der geringen Intensität des Laserlichts eine Photonenabsorption durch die Molekülionen praktisch unmöglich ist, finden keine Fragmentierungen statt. Die durch MUPI geschaffene Möglichkeit, die Bildung von Fragment-Ionen gezielt zu induzieren, ist in der Massenspektrometrie einzigartig. Selbst bei großen Molekülen kann die Ionisation auf die ausschließliche Bildung der Molekülionen abgestimmt werden.

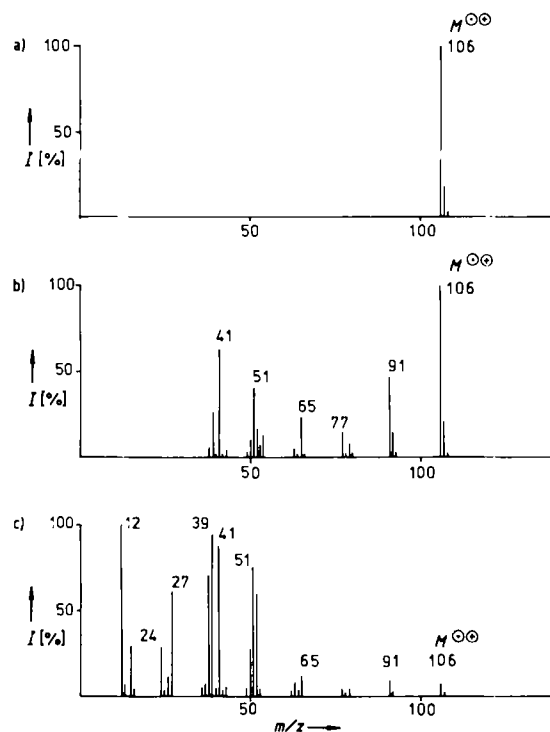


Abb. 3. MUPI-Massenspektren von *p*-Xylol. a) Weiche Ionisation ohne Fragmentierung des Molekülions, Lichtintensität ca. 10^6 W cm^{-2} . b) Partiiell harte Ionisation für eine teilweise Fragmentierung, Lichtintensität ca. 10^7 W cm^{-2} . c) Sehr harte Ionisation für ausgeprägte Fragmentierung, Lichtintensität ca. 10^9 W cm^{-2} . I = relative Intensität. Anregungswellenlänge $\lambda = 272 \text{ nm}$.

2.1.2. Harte Ionisation

Eine Steigerung der Lichtintensität führt zu einer Absorption von Photonen durch das Molekülion, das daraufhin die kinetisch und energetisch günstigste Fragmentierung eingeht. Eine solche moderate Ionisation/Fragmentierung wird von uns als „partiell harte Ionisation“ bezeichnet.

Für das Massenspektrum in Abbildung 3b wurde die Intensität der eingestrahlten Photonen so justiert, daß neben dem Signal des Molekülions auch die der Produkte erster Fragmentierungsreaktionen, z. B. m/z 91, zu beobachten sind.

Wird die Intensität des Laserlichts noch weiter erhöht, so treten zusätzliche Fragmentierungen auf, die je nach Lichtintensität bis zum Zerfall des Moleküls in die Atome führen können. Abbildung 3c zeigt dies sehr drastisch. Hier ist die Fragmentierung bis zur Bildung von atomarem Kohlenstoff fortgeschritten. Dafür muß das *p*-Xylol-Molekül etwa neun Photonen der Wellenlänge 272 nm aufgenommen haben. So viel Energie kann mit keiner der konventionellen massenspektrometrischen Methoden in einem Molekül akkumuliert werden.

Welche einzigartigen Vorteile die Möglichkeit, das Ausmaß der Fragmentierung durch Veränderung der Lichtintensität zu steuern, bei der Bearbeitung analytischer Fragen hat, wird in Abschnitt 3 dargestellt.

2.1.3. Selektive Ionisation durch Wahl der Photonenenergie

Bei der Multiphotonen-Ionisation kann nicht nur die Intensität, sondern auch die Wellenlänge des Lichts variiert werden. Das Absorptionsmaximum eines Moleküls und somit die Lage des „erlaubten“ Zwischenzustands sind als intrinsische Eigenschaften substanzspezifisch. Das hat große Bedeutung bei der Untersuchung von Substanzgemischen, da die Komponente, bei der die Energie des Zwischenzustands zur eingestrahlt Wellenlänge paßt, bevorzugt ionisiert wird; dadurch wird eine empfindliche Spurenanalytik möglich. So lassen sich beispielsweise in Blutserum einige Metalle und Organometallverbindungen in Konzentrationen von 1 ng pro mL Serum quantitativ bestimmen^[31]. Dabei kann sowohl das UV/VIS-Spektrum, gemessen für eine substanzspezifische Masse wie das Molekülion, als auch das Massenspektrum der Substanz, gemessen bei einer festen Wellenlänge, zur Identifizierung dienen.

Dieses Analysenverfahren wurde wiederholt erfolgreich angewendet^[32–37], sowohl auf Gemische mehrerer Substanzen als auch zum Nachweis von Strukturisomeren^[38].

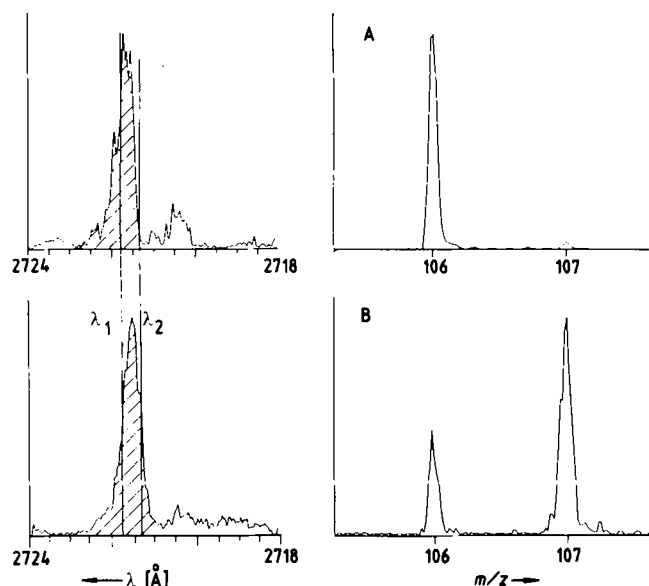


Abb. 4. Links: Massenselektierte Absorptionsspektren von *p*-Xylol; oben: Spektrum der Spezies m/z 106; unten: Spektrum der Spezies m/z 107. Normalerweise ist im Massenspektrum von *p*-Xylol das Intensitätsverhältnis m/z 106: m/z 107 = 100:8.8. Wie die Massenspektren (rechts) zeigen, läßt sich durch Wahl der Anregungsenergie für das MUPI-Experiment (λ_1 für A, λ_2 für B) dieses Verhältnis drastisch beeinflussen (100:0.5 in A; 50:100 in B).

Ein Beispiel für die selektive Anregung aus einem Gemisch zeigt Abbildung 4^[39]. Hier ist eine Probe *p*-Xylol mit natürlichem Isotopengehalt (100/8.8 für $^{12}\text{C}_8\text{H}_{10}/^{13}\text{C}^{12}\text{C}_7\text{H}_{10}$) untersucht worden. Nimmt man massenselektierte UV/VIS-Spektren von *p*-Xylol (m/z 106) und seinem ^{13}C -Isotopomer (m/z 107) auf, so erhält man die auf der linken Seite von Abbildung 4 dargestellten Absorptionsspektren. Es ist erkennbar, daß sich die Lage der Absorptionsmaxima der beiden Moleküle geringfügig unterscheidet. Durch Wahl der Photonenenergie gemäß diesen massenselektierten Absorptionsspektren läßt sich das Signal für das mono- ^{13}C -Xylol-Molekülion im Massenspektrum verstärken oder unterdrücken (Abb. 4 rechts). Die Verstärkung des Spektrums einer in einem Gemisch nur in Spuren enthaltenen Substanz ist eine Möglichkeit, die nur die Multiphotonen-Ionisation bietet.

2.2. Verdampfung der Moleküle

Die Gasphasen-UV/VIS-Absorptionsspektren von polyatomaren Molekülen zeigen bei Raumtemperatur normalerweise breite, strukturlose Banden, da eine große Anzahl der Vibrations- und Rotationszustände populiert ist. Will man Moleküle mit der MUPI-Massenspektrometrie untersuchen, sollten sie thermisch möglichst wenig angeregt sein, damit dank schmalerer Absorptionsbanden eine selektivere Anregung möglich ist. Die Abkühlung kann durch isentropische Expansion eines Gasstrahls, der aus Trägergas mit einem geringen Anteil der zu untersuchenden Probe besteht^[40–42], in ein Vakuum erreicht werden.

Bei typischen massenspektrometrischen Experimenten mit Überschallgasstrahlen, auch als „Seeded Supersonic Beam Expansion“ bezeichnet, läßt man ein Argon-Substanz-Gemisch aus einem Reservoir durch eine Düse mit einer Öffnung von 100–500 μm expandieren. Die dabei erreichbaren Temperaturen betragen etwa 2 K für die Translations- sowie 20 K und 50 K für die Rotations- bzw. Vibrationsfreiheitsgrade^[39].

Diese Einlaßmethode ähnelt der einer GC/MS-Kopplung. Daher läßt sich anstelle des Reservoirs leicht ein Gaschromatograph oder ein HPLC-Gerät vorschalten. Mehrere Autoren haben eine GC/MS-Kopplung unter den Bedingungen der Überschallgasstrahlen und der Multiphotonen-Ionisation beschrieben^[43–46], und jüngst haben Johnston et al. über die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der MUPI-Massenspektrometrie berichtet^[47]. Diese Kopplungsmethoden unter Verwendung von MUPI sind aber noch nicht ausgereift.

Die Chromatographie mit überkritischen Gasen^[48, 49], die in den letzten Jahren verstärktes Interesse gefunden hat, ist für die Kombination mit der MUPI-Massenspektrometrie gut geeignet, da hier hochverdichtete Trägergase als Lösungsmittel benutzt werden. Bei der isentropischen Expansion lassen sich diese Gase sehr leicht von den Probenmolekülen trennen, ohne daß sich Cluster aus Trägergasmolekülen und Probenmolekülen bilden, was bei der Flüssigkeitschromatographie häufig der Fall ist. Bisher wurden nur kleinere Moleküle bis etwa 250 Da mit dieser Methode untersucht^[50, 51].

Auch die Thermospray-Methode^[52, 53] ist von Levy et al.^[54] abgewandelt benutzt worden, um schwerflüchtige

Verbindungen wie Tryptophan als Neutramoleküle in die Gasphase zu bringen.

Alle diese Einlaßverfahren sind zur Trennung von Gemischen oder zur Verdampfung kleinerer, thermisch belastbarer Moleküle gut geeignet, können jedoch bislang nicht auf größere, thermisch labile Moleküle angewendet werden. Die für solche Verbindungen entwickelten Methoden haben zum Ziel, in einem Schritt zu verdampfen und zu ionisieren. Es werden dabei aber mehr neutrale Moleküle desorbiert als Ionen produziert. So haben Untersuchungen von Cotter et al.^[55] bei der Laser-Desorption mit einem IR-Laser sowie von Budzikiewicz et al.^[56] und Campana et al.^[57] bei der FAB-Methode gezeigt, daß bei diesen Verfahren grundsätzlich wesentlich mehr neutrale Moleküle desorbiert werden, als Ionen entstehen. Typische Werte für das Verhältnis zwischen Neutramolekülen und Ionen sind etwa $10^4:1$ bei der Laser-Desorption^[55]. Zur Klärung der Vorgänge bei der Desorption wurden theoretische Arbeiten durchgeführt^[11,58]. Ein Verständnis aller Details wurde jedoch noch nicht erreicht.

Um das günstige Verhältnis von Neutramolekülen zu Ionen auszunutzen, wenden wir seit 1983 ein Tandem-Verfahren aus Laserverdampfung in einem Überschallgasstrahl (Laser Evaporation of Intact Molecules, LEIM) und anschließender Multiphotonen-Ionisation an^[59,60]. Für ein typisches LEIM-MUPI-Experiment (Abb. 5) wird die zu

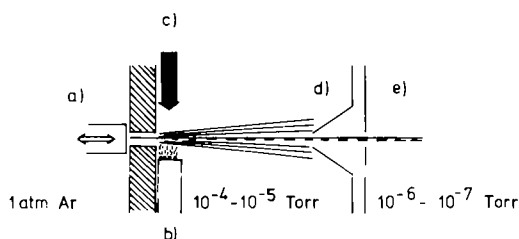


Abb. 5. Typischer experimenteller Aufbau für die Laser-Desorption in einen Überschallgasstrahl. a) Gepulstes Ventil mit Düse; b) Probenträger, montiert vor der Düse im Vakuum; c) Laserlichtstrahl, hier von einem CO₂-IR-Laser; d) Skimmer; e) Ionenquelle.

untersuchende Substanz in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, die Lösung auf einen Probenträger aufgetragen und das Lösungsmittel verdampft. Dadurch wird der Probenträger mit einigen hundert bis tausend Molekülschichten der Substanz belegt. Anschließend wird er im Vakuum vor die Öffnung der Überschallstrahldüse montiert. Durch IR-Photonen werden Moleküle von der Oberfläche in den expandierenden Überschallstrahl desorbiert. Dadurch werden die inneren Freiheitsgrade der Moleküle abgekühlt und diese zugleich als Molekülstrahl in die Ionenquelle transportiert. Das gepulste System dieses Experiments besteht aus einem gepulsten Ventil zur Erzeugung des Überschallgasstrahls und einem kleinen CO₂-Laser zur Desorption der neutralen Moleküle.

2.3. Massenspektrometrischer Nachweis der erzeugten Ionen

Grundsätzlich können die durch MUPI erzeugten Ionen mit jedem Massenspektrometertyp analysiert werden. Al-

lerdings sind Geräte, die für ein kontinuierliches, cyclisches Überstreichen des Massenbereichs ausgelegt wurden, für eine Kopplung mit MUPI nur schlecht geeignet; dies gilt z.B. für die Magnetsektorfeld-Geräte. Massenspektrometer, die sich besser mit MUPI koppeln lassen, sind Quadrupol-Geräte, ICR-Geräte^[*] und Flugzeitmassenspektrometer, da diese Geräte auch in einem gepulsten Modus betrieben werden.

2.3.1. Quadrupol- und ICR-Massenspektrometrie

In den ersten Arbeiten^[12,61,62], die sich mit dem massenspektrometrischen Nachweis der durch MUPI erzeugten Ionen beschäftigten, wurden Quadrupol-Geräte zur Massentrennung benutzt. Quadrupol-Massenspektrometer sind in der GC/MS-Kopplung beliebt, da sie leicht zu bedienen sind und einen schnellen Scancycus haben. Allerdings ist der erfassbare Massenbereich auf etwa 2000 Da begrenzt, und das Massenauflösungsvermögen^[**] ist gering, so daß sie zur Kopplung mit MUPI nur eingeschränkt geeignet sind. Auch ist die Transmission dieser Geräte limitiert.

Die ICR-Massenspektrometrie ist ebenfalls mit MUPI gekoppelt worden^[63-65]. Sie bietet den Vorteil extremer Massenauflösung^[66]. Allerdings ist der Massenbereich zur Zeit auf etwa 4000 Da beschränkt. Die Anwendung der ICR-Technik erfordert, daß wenige Ionen gebildet werden^[67]. Da MUPI aber selbst bei geringer Laserlichtintensität beträchtliche Ionenausbeuten liefert, lassen sich die bislang benutzten Ionenquellen nur schwer mit einem ICR-Gerät koppeln. Vielleicht wird diese Kopplung in Zukunft aber doch noch interessant, wenn man sie bei hoher Massenauflösung und gleichzeitiger kompletter Aufzeichnung des Massenspektrums betreiben kann.

2.3.2. Flugzeitmassenspektrometrie

Ein massenspektrometrisches Nachweisverfahren, das die Pulsstruktur der Ionenerzeugung durch MUPI nutzt, ist die Flugzeit- oder Time-of-Flight (TOF)-Massenspektrometrie^[68]. Flugzeitmassenspektrometer sind sehr einfache Systeme mit extrem hoher Transmission, bei denen, im Gegensatz zu allen anderen Massenspektrometern, zu jedem Laserpuls ein komplettes Massenspektrum aufgezeichnet wird. Sie bestehen im wesentlichen aus einer Ionenquelle, einem Flugrohr und einem Detektor. Gekoppelt mit einer EI-Ionenquelle konnte aufgrund der breiten Verteilung der kinetischen Energie der erzeugten Ionen nur ein Auflösungsvermögen von 200-400 erreicht werden. Diese geringe Auflösung ist der Grund dafür, daß Flugzeitmassenspektrometer, obwohl seit über 40 Jahren bekannt, selten benutzt worden sind.

Durch die Entwicklung gepulster Ionenquellen, z.B. SIMS^[69] oder Plasma-Desorptions^[70]-Verfahren, aber auch wegen MUPI^[39] hat das Interesse an Flugzeitmassenspek-

[*] ICR = Ionen-Cyclotron-Resonanz.

[**] Die Signale zweier Massen sind aufgelöst, wenn sie durch ein „Tal“ getrennt sind; in der Massenspektrometrie sind dabei die Definitionen „10% Tal“ und „50% Tal“ gebräuchlich. In diesem Beitrag wird immer die „50% Tal“-Definition verwendet. Bei einem Auflösungsvermögen von 1000 geben die Massen 500.0 und 500.5 noch getrennte Signale.

trometern in den letzten Jahren wieder zugenommen. Mit einem zweistufigen Beschleunigungsfeld nach *Wiley und McLaren*^[71] in Verbindung mit der Multiphotonen-Ionisation konnte schon in einem linearen Flugzeitmassenspektrometer ein Auflösungsvermögen von etwa 400 für die gleichzeitige Registrierung aller Massen erreicht werden^[72].

Versuche, das Auflösungsvermögen von linearen Flugzeitmassenspektrometern weiter zu erhöhen^[73], waren nur wenig erfolgreich. *Mamyrin et al.*^[74] dagegen setzten ein elektrostatisches Feld am Ende der Flugstrecke ein, das den Ionenstrahl reflektiert. Dadurch wird nicht nur die Flugstrecke der Ionen verlängert, sondern es können auch Unterschiede in der kinetischen Energie von Ionen gleicher Nominalmasse und damit Flugzeitunterschiede in gewissen Grenzen kompensiert werden (Abb. 6). Die durch

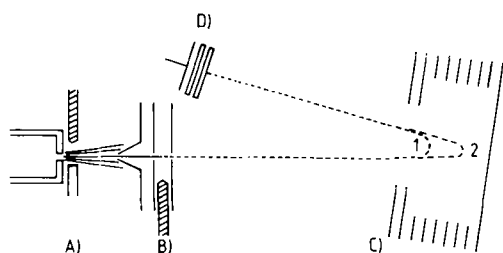


Abb. 6. Schematische Darstellung des Reflektron-Flugzeitmassenspektrometers. 1) Flugweg von Ionen einer Masse mit geringer kinetischer Energie; 2) Flugweg von Ionen derselben Masse mit hoher kinetischer Energie. A) Verdampfungsstufe; B) Laserlichtstrahl zur Ionisation; C) Reflektorfeld; D) Detektor.

MUPI erzeugten Ionen werden in unserem Experiment mit einem konstanten Feld von etwa 800 V beschleunigt und durchfliegen dann eine feldfreie Driftstrecke von etwa 80 cm. An deren Ende werden die nach ihrer Masse getrennten Ionenpakete durch ein kurzes Bremsfeld hart abgebremst und im folgenden Reflektorfeld mit nur noch geringer Energie reflektiert. Nach dem Austritt aus dem Reflektor und dem Bremsfeld durchfliegen die Ionen dann die Driftstrecke in umgekehrter Richtung, bis sie auf den Detektor treffen. Ionen mit höherer kinetischer Energie dringen tiefer in das Reflektorfeld ein und haben somit eine etwas längere Flugstrecke als Ionen mit kleinerer kinetischer Energie. Dadurch werden Flugzeitunterschiede innerhalb der einzelnen Ionenpakete ausgeglichen.

So gelang *Boesl et al.*^[75] bereits 1982 die Kombination einer Multiphotonen-Ionisationsquelle mit einem Reflektron-Flugzeit(RETOf)-Massenspektrometer, und er erreichte in den ersten Versuchen schon ein Auflösungsvermögen von 3800. Andere experimentelle Anordnungen eines solchen reflektierenden Feldes in Verbindung mit MUPI sind von *Lubman et al.*^[76] und *El-Sayed et al.*^[77] beschrieben worden.

Durch Optimierung der Parameter sind noch beträchtlich höhere Auflösungen möglich. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß die Gitter, die im klassischen RETOf-Massenspektrometer zur besseren Definition der elektrostatischen Felder dienen, eine starke Streuung der Ionen verursachen, was Transmission und Auflösungsvermögen negativ beeinflusst. An einem gitterlosen Spiegel wird der Ionenstrahl dagegen sauber reflektiert und zugleich fokus-

siert. *Boesl et al.*^[78] erreichten ein Auflösungsvermögen von über 10000, indem sie einen Überschallstrahl zur Abkühlung der Translationsfreiheitsgrade der neutralen Moleküle verwendeten, den Laserpuls von 5–8 ns auf etwa 1.5 ns verkürzten und die Laserlichtintensität reduzierten^[79,79,80]. Eine weitere Steigerung erscheint nicht ausgeschlossen. Diskutiert werden Werte für das Auflösungsvermögen eines Reflektron-Flugzeitmassenspektrometers von 100000 bis 1000000^[80].

Inzwischen wird die Methode des reflektierenden elektrostatischen Feldes auch mit anderen Ionisationsverfahren kombiniert (mit SIMS^[81], ²⁵²Cf-PD^[82]).

Die Vorzüge des Flugzeitmassenspektrometers gegenüber anderen Geräten sind vielfältig: Der Massenbereich ist nahezu unbegrenzt; zu jedem Laserpuls wird ein vollständiges Massenspektrum registriert; es lassen sich bis zu 100 Massenspektren pro Sekunde aufnehmen, wobei diese Zahl nur durch die Kapazitäten der Datenverarbeitung limitiert ist; Massenauflösungsvermögen und Transmission sind bereits heute besser als bei Quadrupol- und kleineren Magnetsektorfeld-Geräten^[83]. Darüber hinaus verfügt die Flugzeitmassenspektrometrie über eine physikalische Eigenschaft, die sie einzigartig macht: Die Auflösung nimmt mit wachsender Masse zu. Der Nachweis metastabiler Ionen^[75], unerlässlich für MS/MS-Untersuchungen, ist durch die Einführung des reflektierenden Feldes ebenfalls möglich.

Der Ort der Verdampfung läßt sich auf wenige µm definieren, was z. B. für Oberflächenuntersuchungen von großer Bedeutung ist. Das Zeitfenster der Probennahme ist wegen des Laserpulses nur wenige ns groß. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit der Spektrenaufnahme können z. B. von einem Einsekundensignal eines Gaschromatographen 10 bis 100 Spektren erhalten werden.

3. Diskussion beispielhafter Massenspektren

Die MUPI-Massenspektrometrie wurde lange Zeit nur für kinetische Untersuchungen der Zerfallsprozesse kleinerer Moleküle in der Gasphase genutzt^[84]. Dafür gut geeignet ist sie wegen der sehr genau definierten Energie zur Ionisation und Fragmentierung von Molekülen, aber auch weil Reaktionen metastabiler Ionen untersucht werden können.

Erst seit etwa 1983 fand MUPI Eingang in allgemeine massenspektrometrische Untersuchungen, speziell von organischen und biochemisch relevanten Verbindungen. Im folgenden sollen nun einige solche Untersuchungen vorgestellt werden.

3.1. Kleine Moleküle

Kleine Arene wie Benzol^[85], Alkylbenzole^[86–88], halogen-substituierte aromatische Verbindungen^[89], aromatische Amine^[90,91], Phenol^[92] und aromatische Aldehyde^[93], aber auch Organometallverbindungen sowie zwei- und dreiatomige Verbindungen sind mit der MUPI-Massenspektrometrie ausführlich untersucht worden. Im Vordergrund standen dabei die physikalischen Vorgänge bei der Ionisation durch Multiphotonen-Anregung oder Details bestimmter Fragmentierungsreaktionen. Einen guten Über-

blick über solche Untersuchungen geben *El-Sayed et al.*^[16] und *Neusser*^[84]. Alle untersuchten Verbindungen waren leicht flüchtig und ließen sich somit einfach in die Ionenquelle einbringen. Hier sollen nun Massenspektren von kleineren, biochemisch relevanten Molekülen, die entweder thermisch labil oder schwerflüchtig sind, behandelt werden. Aminosäuren, mit ihrer Häufung von polaren hydrophilen und hydrophoben Gruppen, sind ein gutes Beispiel dafür.

EI-Massenspektren freier Aminosäuren sind gut bekannt^[94–97]. In den meisten Fällen tritt kein oder nur ein sehr schwaches Signal für das Molekülion auf. Abbildung 7 zeigt MUPI-Massenspektren der Aminosäure L-Tyrosin,

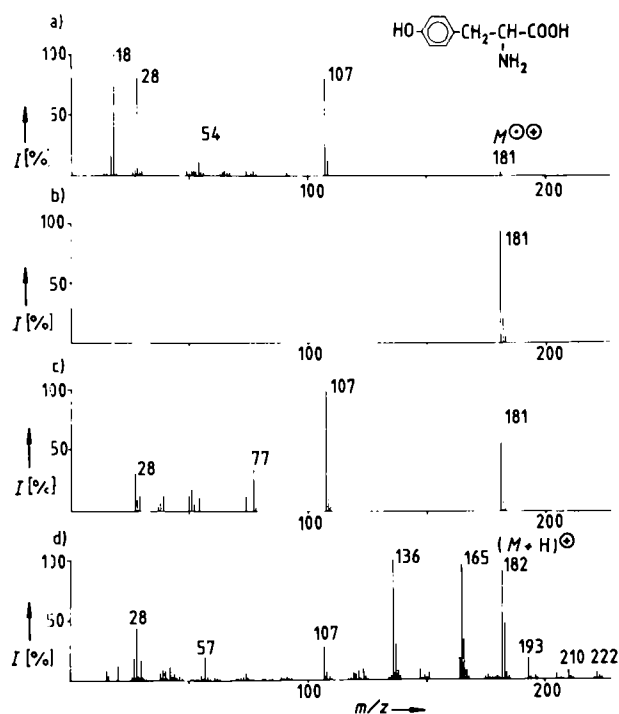


Abb. 7. Vergleich von L-Tyrosin-Massenspektren. a) EI-Massenspektrum; man beachte die geringe Intensität des Molekülion-Signals bei m/z 181. b) Massenspektrum nach weicher MUPI; es wird nur das Molekülion gebildet. c) Massenspektrum nach partiell harter MUPI; Anregungswellenlänge $\lambda = 272$ nm. d) CI(Methan)-Massenspektrum, Methanplasma-Ionen sind subtrahiert.

die nach Laserverdampfung erhalten wurden^[98], und zum Vergleich ein EI- und ein CI-Massenspektrum. Die Vorteile von MUPI treten dabei deutlich hervor. So ist in dem durch weiche MUPI erhaltenen Spektrum das Molekülion-Signal der Basispeak (Abb. 7b), während es im EI-Spektrum mit nur 5% relativer Intensität auftritt (Abb. 7a). Das CI-Massenspektrum (Abb. 7d) liefert zwar nach Untergrundkorrektur das Signal des H-Addukt-Molekülions mit relativ guter Intensität; die Identifizierung dieses Ions ist jedoch durch das Auftreten der Signale größerer Anlagerungsprodukte deutlich erschwert.

Intensiveres Laserlicht (partiell harte Ionisation) führt zum Massenspektrum in Abbildung 7c. Trotz ausgeprägter Fragmentierung ist das Molekülion-Signal immer noch beachtlich intensiv. Es wurde gezeigt^[98], daß sich die Massenspektren der Aminosäuren bei einer Änderung der Anregungswellenlänge um bis zu 40 nm hinsichtlich der Fragmentierungen nur wenig ändern, daß aber die Verhältnisse

der Signalintensitäten drastisch beeinflußt werden können. Dieses Verhalten läßt sich auf die unterschiedlichen Absorptionsquerschnitte der Fragment-Ionen zurückführen. Extreme Intensitätsänderungen beobachtet man z. B. bei Tryptophan^[99].

Bei aromatischen Aminosäuren ist die zur Ionisation benutzte Wellenlänge in der Regel mit einer Absorption im aromatischen Ringsystem korreliert. Dagegen enthält die Aminosäure Arginin keine chromophore Gruppe, die oberhalb 250 nm absorbiert. In diesem Fall kann also nur eine nicht-resonante Multiphotonen-Anregung stattfinden (siehe auch Abschnitt 2.1). Arginin ist besonders thermosensitiv, so daß bisher weder EI- noch CI-Massenspektren publiziert wurden. Die Feld-Desorptions-Methode liefert ein Massenspektrum, allerdings nur unter Protonierung des Moleküls^[100]. Im MUPI-Massenspektrum (Abb. 8) wird zum erstenmal das Signal des Molekülions von Arginin beobachtet. Dieses Ion ist vor allem deshalb von Interesse, weil Arginin extrem polar und eine der stärksten organischen Säuren ist.

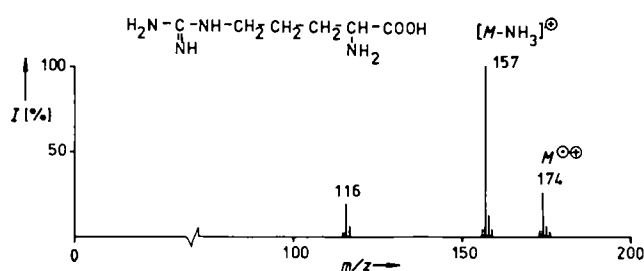


Abb. 8. Massenspektrum vom L-Arginin nach nicht-resonanter MUPI. Ionisationswellenlänge $\lambda = 250$ nm.

Von den Aminosäurederivaten sind die Phenylthiohydantoine^[101] bereits durch MUPI-Massenspektrometrie untersucht worden^[98, 102]. Dabei konnte weniger als ein Femtogramm dieser Verbindungen in der Gasphase nachgewiesen werden^[102]. Einige Phenylthiohydantoine ließen sich jedoch nicht anhand ihrer Molekülionen nachweisen. Demgegenüber konnten wir zeigen^[98], daß bei optimaler Abstimmung der Wellenlänge alle Verbindungen so weich ionisiert werden können, daß ausschließlich die Molekülionen entstehen.

Lubman et al. berichten^[103], daß auch bei Dipeptiden, die aromatische Aminosäuren enthalten, in mehreren Fällen Massenspektren gemessen wurden, die kein Signal für das Molekülion enthielten. Als Beispiel sei Phenylalanyltyrosin (Abb. 9) diskutiert. Das Massenspektrum zeigt

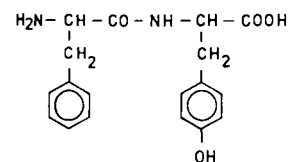


Abb. 9. Das Dipeptid Phenylalanyl-tyrosin.

nach *Lubman et al.*^[103] ausschließlich das Signal für den Verlust eines Hydroxyradikals aus dem Molekülion. Dies ist auf den verwendeten Aufbau zur Verdampfung und Ionisation zurückzuführen und kann durchaus vermieden werden. Abbildung 10 zeigt die durch weiche und durch

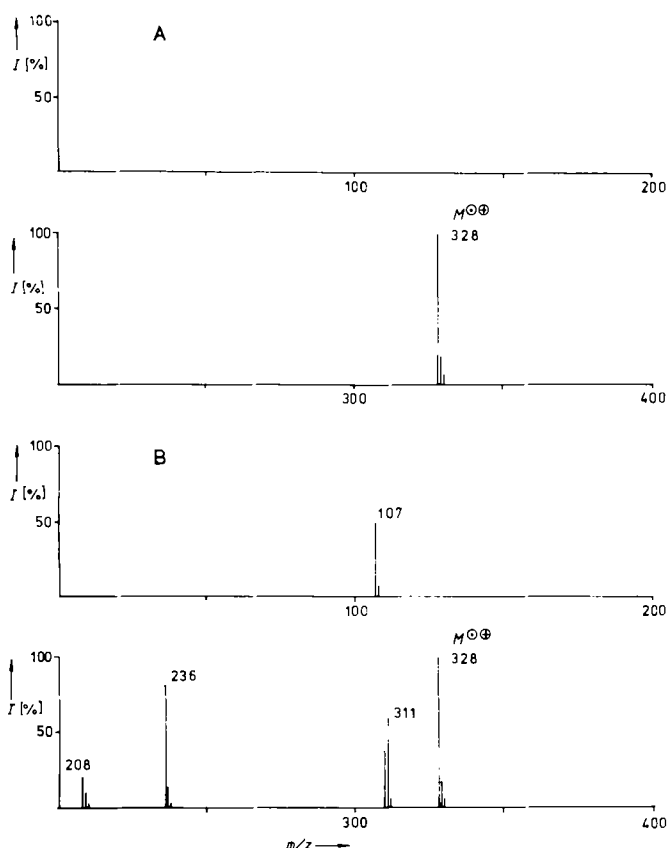


Abb. 10. Vergleich der durch weiche (A) und partiell harte (B) MUPI erhaltenen Massenspektren von Phenylalanyl tyrosin. Anregungswellenlänge $\lambda = 272$ nm. Das Signal in B bei m/z 209 ist auf die Bildung des X_1' -Fragmentes (siehe Abb. 13) zurückzuführen.

partiell harte MUPI erhaltenen Massenspektren dieser Verbindung, gemessen unter anderen experimentellen Bedingungen^[104, 105]. Nach weicher MUPI wird nur das Molekülion-Signal beobachtet. Mit Steigerung der Laserlichtintensität setzt eine Vielzahl von Fragmentierungen ein. Die wesentlichen Fragment-Ionen haben m/z 236 und 208. Sie entsprechen der Bildung eines Acylium-Ions beim Bruch der Peptidbindung (m/z 236) und der Abspaltung von CO aus diesem Ion (m/z 208). Der Bruch der Peptidbindung als bevorzugte Fragmentierung ließ sich bei über 50 untersuchten Dipeptiden nachweisen^[104–106].

Abbildung 11 zeigt ein Massenspektrum von Saccharose, das durch nicht-resonante Multiphotonen-Ionisation erhalten wurde. Saccharose ist ein bereits klassisches Bei-

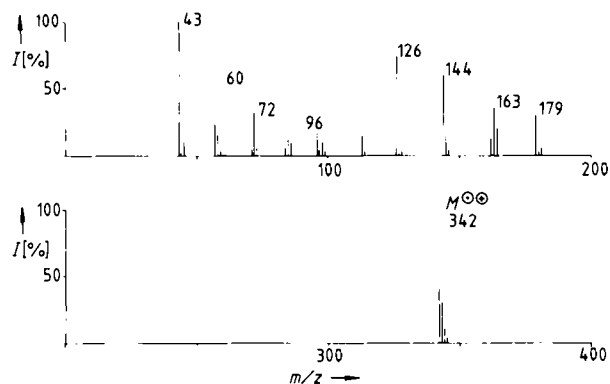


Abb. 11. Massenspektrum von Saccharose nach partiell harter, nicht-resonanter MUPI. Anregungswellenlänge $\lambda = 252$ nm. Das Signal bei m/z 43 rührt vom Acylium-Ion her.

spiel dafür, daß die Elektronenstoß-Ionisation nicht zur Detektion des Molekülions führt. Es wurde sogar kontrovers diskutiert, ob Molekülionen von Zuckern, speziell der Saccharose, unter EI- oder FD-Bedingungen überhaupt existieren^[107]. Unter MUPI-Bedingungen dagegen ist das Molekülion von Saccharose nachweisbar^[108].

Die Fragmentierungen von Saccharose (Abb. 12) sind aus Pyrolyse-FI-Massenspektren wohlbekannt^[109]. Die Hauptfragmentierung ist der Bruch der Glycosidbindung, dem der sukzessive Verlust von Wassermolekülen folgt.

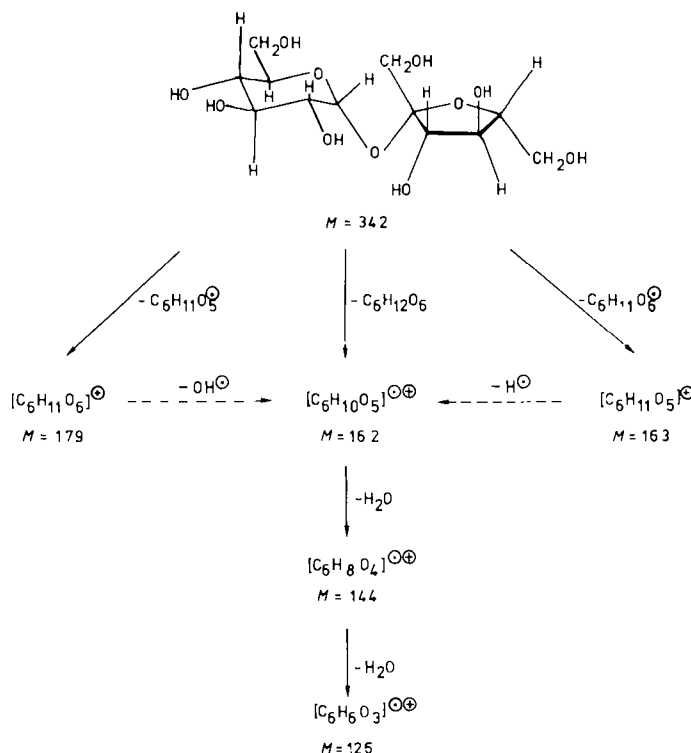


Abb. 12. Fragmentierungsschema von Saccharose. Die Abbauewege sind teilweise durch das Auftreten metastabiler Ionen belegt.

Weitere biochemisch relevante kleine Moleküle, von denen inzwischen MUPI-Massenspektren erhalten wurden, sind Steroide^[104, 107, 110], Catecholamine^[111], neuroleptische Drogen und Vitamine^[112, 113] sowie Purinbasen^[114].

3.2. Mittelgroße Moleküle

Auch von mehreren geschützten Tripeptiden wurden MUPI-Massenspektren aufgenommen^[115] und mit EI-Spektren^[116] verglichen. In den durch partiell harte Ionisation erhaltenen Massenspektren dominiert wieder der Bruch der Peptidbindung. Dabei finden sich vollständige Serien der A- und B-Fragmente (Abb. 13). Die Bezeichnung dieser Acylium- (B) und Acyliminium-Ionen (A) erfolgt nach Roepstorff und Fohlman^[117]. Neben den A- und B-Fragmenten, die das N-terminale Ende der Peptidkette enthalten, sind auch Bruchstücke der Y'-Serie (Abb. 13) nachweisbar. In diesen Fragment-Ionen ist das C-terminale Ende des Peptids enthalten.

In Abbildung 14 ist das Massenspektrum von Leucin-Enkephalin, einem ungeschützten Pentapeptid, nach partiell harter MUPI dargestellt^[118], in dem das Molekülion-Signal deutlich zu erkennen ist. Intensive Signale werden wieder für die Fragment-Ionen gefunden, die durch Bruch

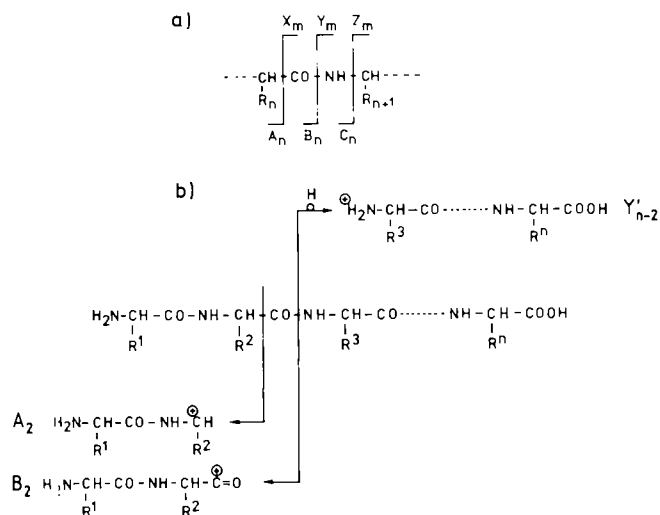


Abb. 13. a) Prinzipielle Fragmentierungen einer Peptidkette und Benennung der entstehenden Bruchstücke nach Roepstorff et al. [117]. Umlagerungsprodukte durch Wasserstoffwanderungen werden je nach Anzahl der umgelagerten Wasserstoffatome z. B. als A_n, A_n⁺, A_n⁺⁺ bezeichnet. b) Wesentliche Fragmentierungen von Peptiden, die in MUPI-Massenspektren beobachtet wurden.

von Peptidbindungen entstehen (Abb. 15), während, wie es für MUPI charakteristisch ist, Fragmentierungen in den Seitenketten nur in untergeordnetem Ausmaß beobachtet werden. Neben den kompletten Serien von A- und B-Fragmenten werden auch die Signale einiger Y'-Ionen (Abb. 13) beobachtet. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß diese komplementären Fragmente notwendig sind, um die Sequenz eines Peptids eindeutig zu beweisen.

Verschiedene kleinere Peptide wie das Pentagastrin^[119], das „Sleep inducing Peptide“ (SLP)^[106] und andere^[120] sind bereits erfolgreich MUPI-massenspektrometrisch untersucht worden. Die bevorzugte Fragmentierung ist dabei immer die Spaltung der Peptidbindung.

Auch die Spektren von Verbindungen anderer Substanzklassen, beispielsweise von Erythromycin, wurden aufge-

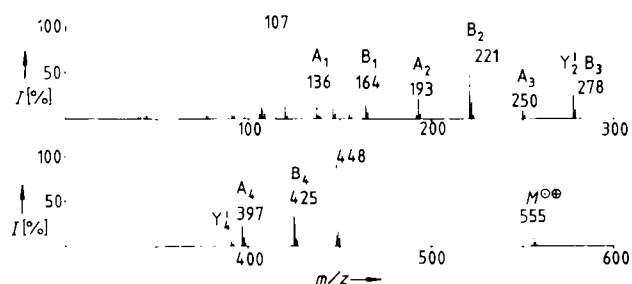


Abb. 14. Massenspektrum von Leu-Enkephalin nach partiell harter MUPI. Anregungswellenlänge $\lambda = 272$ nm.

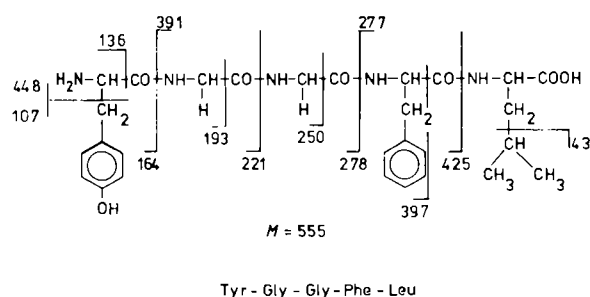


Abb. 15. Struktur und Fragmentierungen von Leu-Enkephalin.

nommen^[106]. Immer werden die Molekülonen mit hoher Effizienz gebildet, und es können substanzspezifische Fragment-Ionen nachgewiesen werden, ohne daß eine Derivatisierung vor der Untersuchung vorgenommen werden muß.

Durch MUPI gelang so erstmals der massenspektrometrische Nachweis von Porphyrinen^[121] und natürlichen Chlorophyllen^[122] ohne Schutzgruppen. Natürliches Chlorophyll und seine Derivate konnten in einer biologischen Probe, die ca. 30 verschiedene Substanzen, darunter Lipide und Glycoside, enthält, nachgewiesen werden. Abbildung 16 zeigt die EI- und MUPI-Massenspektren dieser Probe.

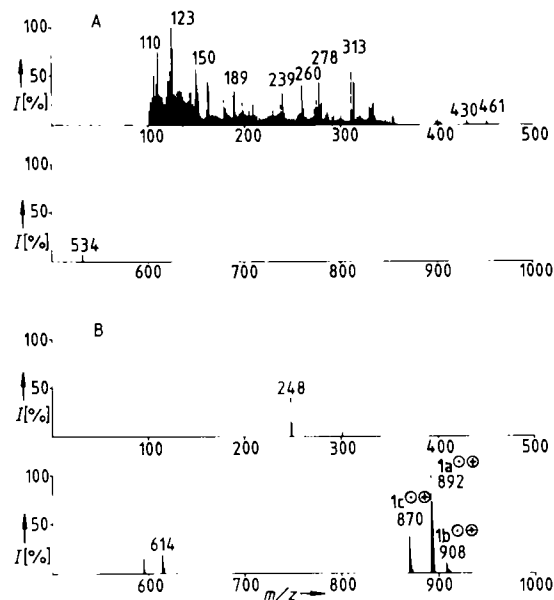


Abb. 16. Vergleich der EI- (A) und MUPI-Massenspektren (B) einer biologischen Probe aus *Spirulina geitlerie*. Im EI-Massenspektrum wurden die Ionen mit $m/z < 100$ unterdrückt. Anregungswellenlänge λ beim MUPI-Massenspektrum = 281 nm. Identifiziert werden konnten die Molekülonen: m/z 870 = Phäophytin a; m/z 892 = Chlorophyll a; m/z 908 = 10-Hydroxychlorophyll a.

Die Wellenlängenspezifität von MUPI (Abschnitt 2.3.1) ermöglicht eine Separierung der Substanzen, und es lassen sich deutlich drei verschiedene Chlorophyll-Derivate (Abb. 17) identifizieren, bei m/z 870 das Phäophytin a **1c**, bei m/z 908 das 10-Hydroxychlorophyll a **1b** und bei m/z 892 das Chlorophyll a **1a**.

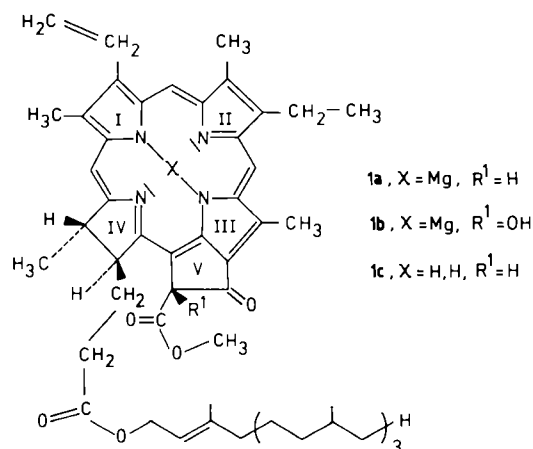


Abb. 17. Strukturen der massenspektrometrisch nachgewiesenen Chlorophylle **1a-c** in einer Probe von *Spirulina geitlerie*.

3.3. Große Moleküle

Auch im Massenbereich über 1000 Da, der bislang der SIMS, der FAB-Methode oder der Plasma-Desorption vorbehalten war, können durch MUPI in Verbindung mit LEIM sehr informative Massenspektren erhalten werden. So konnte gezeigt werden, daß durch Multiphotonen-Anregung eine weiche Ionisation und gezielte Fragmentierung des ungeschützten Decapeptids Angiotensin I (Abb. 18) möglich ist^[123]. Abbildung 19 gibt das Massenspektrum dieser Verbindung nach partiell harter Ionisation wieder. Intensive Signale stammen von Fragmentierungen benachbart zu den Peptidbindungen; deutlich sind die vollständigen Serien der A- und B-Fragmente zu erkennen, und auch hier werden wieder die wichtigen Signale der Y'-Bruch-

stücke gefunden, die den C-Terminus enthalten. Wie bei den kleineren Peptiden sind Fragmentierungen in den Aminosäureseitenketten von untergeordneter Bedeutung.

Einen Vergleich der Ergebnisse von Peptiduntersuchungen mit der FAB-MS/MS-Methode^[4, 124] unter Benutzung der Stoßaktivierung und der MUPI-Massenspektrometrie ermöglicht Abbildung 21. Das FAB-MS/MS-Experiment an Substanz P (Abb. 20) wurde von *Biemann et al.*^[125] mit einem Triple-Sektorinstrument durchgeführt. Dabei wurde das protonierte Molekül von den Fragment-Ionen massensepariert und dann mit einem Stoßgas zum Zerfall angeregt. Es entstehen im wesentlichen Fragment-Ionen der Serie A. Die entsprechende B-Serie tritt nur mit sehr viel geringerer Intensität auf. Ionen, die den C-Terminus enthalten, sind nicht nachzuweisen. Zusätzlich wird eine Vielzahl

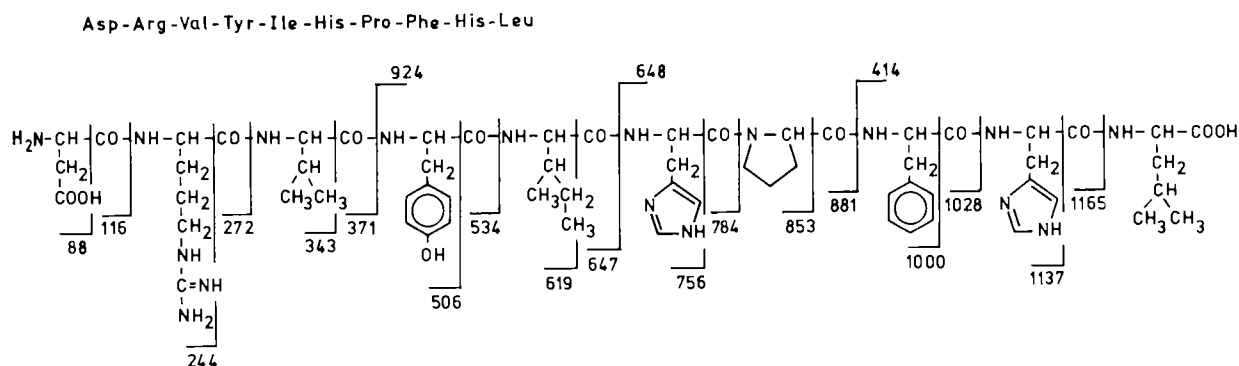


Abb. 18. Struktur und Fragmentierung von Angiotensin I ($M = 1295$).

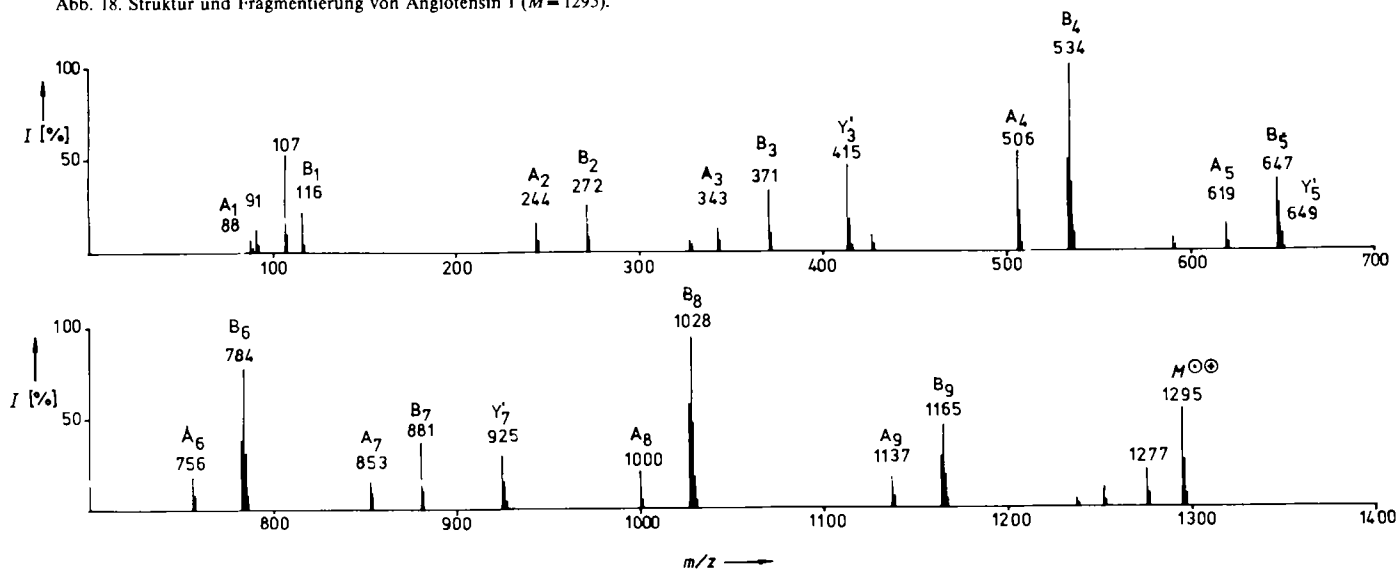


Abb. 19. Massenspektrum von Angiotensin I nach partiell harter MUPI. Anregungswellenlänge $\lambda = 272$ nm.

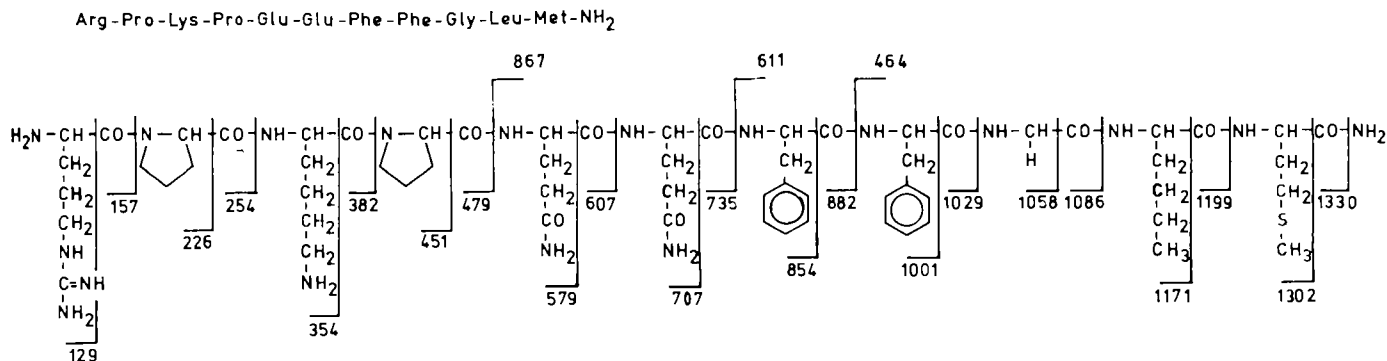


Abb. 20. Struktur und Fragmentierungen von Substanz P.

von Signalen beobachtet, die sich nicht eindeutig zuordnen lassen (Abb. 21a).

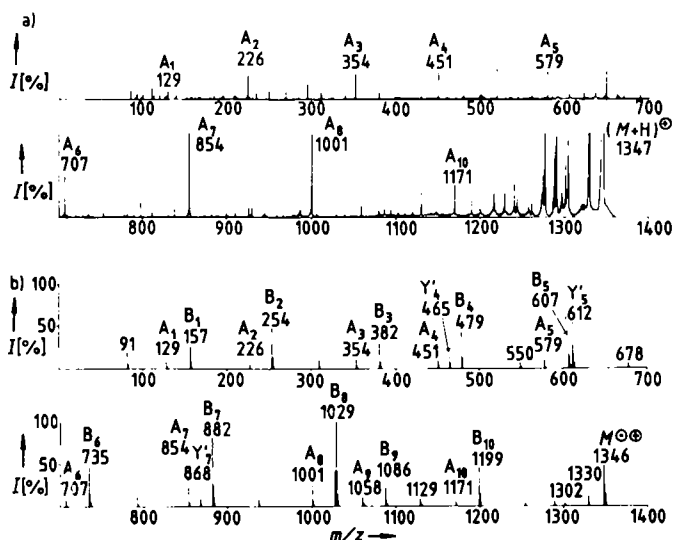


Abb. 21. Vergleich der Massenspektren von Substanz P a) aus einem FAB-MS/MS-Experiment, b) nach MUPI.

Dagegen zeigt das MUPI-Massenspektrum (Abb. 21b) dieser Verbindung wieder Signale für alle Ionen der A- und B-Serie mit deutlicher Intensität. Ionen, die sich auf Seitenketten-Fragmentierungen zurückführen lassen, sind von untergeordneter Bedeutung. Da, wie in allen bisher

vorgestellten MUPI-Massenspektren von Peptiden, auch hier Signale für Fragmente der Y'-Serie auftreten, läßt sich die Peptidsequenz eindeutig aus dem Spektrum ableiten.

Mit beiden Methoden können also Peptide in der Gasphase sequenziert werden. Allerdings ist das FAB-MS/MS-Experiment aufwendiger als die Untersuchung durch LEIM-MUPI-Massenspektrometrie.

Abbildung 22 zeigt FAB- und MUPI-Massenspektrum einer zunächst unbekannten Probe. Zu untersuchen war, ob die in Abbildung 23 gezeigte Verbindung, die sich bei

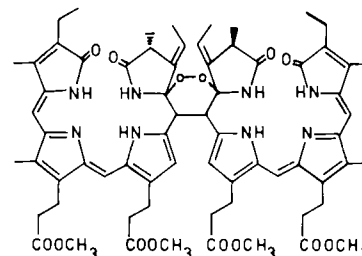


Abb. 23. Postulierte Struktur einer Verbindung in der für die Massenspektren in Abbildung 22 verwendeten Probe.

einer chemischen Umsetzung gebildet haben sollte^[126], in der Probe vorhanden war. MUPI liefert ein intensives Signal für das entsprechende Molekülion, während im FAB-Massenspektrum ausschließlich die Signale von Fragmentierungsprodukten auftreten. Somit konnte die MUPI-Massenspektrometrie neben anderen analytischen Methoden beim Nachweis der Verbindung helfen.

Als letztes Beispiel für die Möglichkeiten, mit der MUPI-Massenspektrometrie große Moleküle zu untersuchen, ist in Abbildung 24 das nach weicher Ionisation erhaltene Massenspektrum von Rinderinsulin dargestellt^[127].

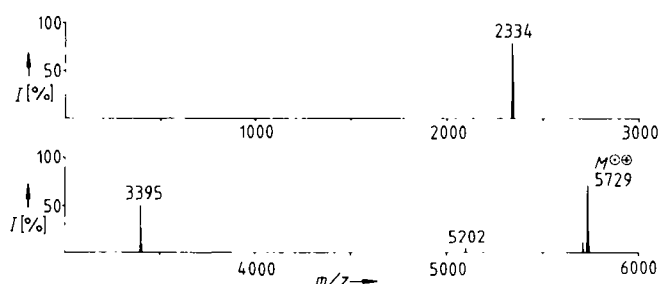


Abb. 24. MUPI-Massenspektrum von Rinderinsulin. Anregungswellenlänge $\lambda = 272$ nm.

Das intensivste Signal ist nach der Multiphotonen-Ionisation das des Molekülions bei m/z 5729, das in Massenspektren, die unter FAB- oder PD-Bedingungen aufgenommen wurden, weit weniger deutlich ist. Auch die wesentlichen Fragmentierungen sind leicht anhand der Signale für die A-Kette bei m/z 2334 und für die B-Kette bei m/z 3395 zu identifizieren. An dieser Stelle sei noch einmal darauf hingewiesen, daß bei MUPI-Massenspektren keine Untergrundkorrektur notwendig ist, wie sie bei anderen Verfahren üblicherweise angewendet wird. Abbildung 25 zeigt experimentelle und berechnete Isotopenmuster für die Signalgruppen des Molekülions sowie der A- und der

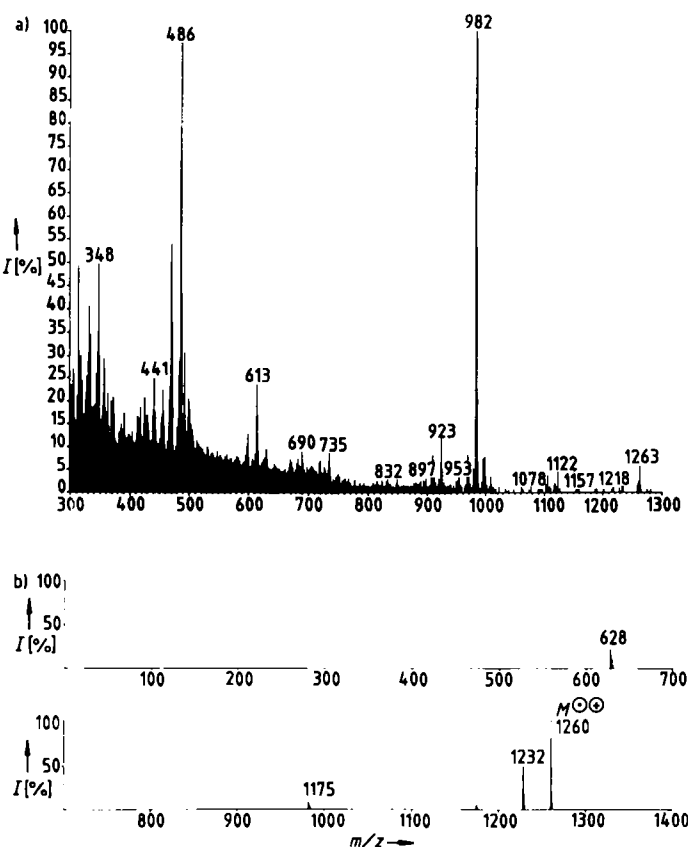


Abb. 22. Vergleich des FAB- (a) und MUPI-Massenspektrums (b) des Syntheseprodukts aus Abbildung 23.

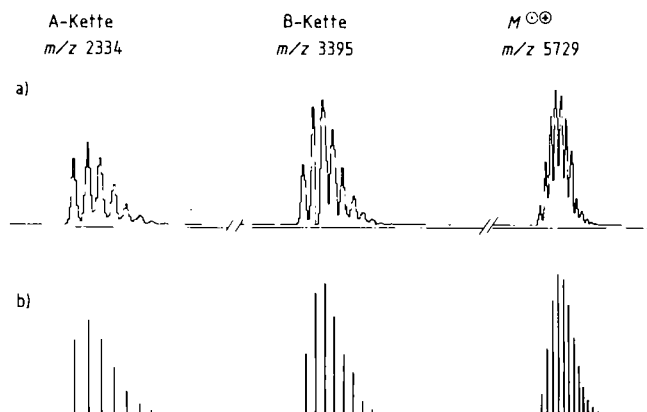


Abb. 25. Vergleich der experimentellen Intensitätsverhältnisse (a) für die Signalgruppen des Molekülions von Rinderinsulin sowie der Fragmentsignale für die A- und die B-Kette mit den aus der Elementarzusammensetzung berechneten Isotopenmustern (b).

B-Kette. Die Übereinstimmung von experimentellem und berechnetem Intensitätsverhältnis für die Signalgruppe des Molekülions beweist, daß das Insulin als intaktes Molekül ohne Addition von Protonen oder Alkalimetall-Kationen desorbiert und in der Gasphase ionisiert wird.

Diese Ergebnisse belegen, daß sich auch sehr große Moleküle durch MUPI-Massenspektrometrie analysieren lassen. Inzwischen ist eine Vielzahl weiterer Moleküle wie Gramicidine und andere^[105] mit dieser Technik untersucht worden.

4. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Fortschrittsbericht wurden einige der Möglichkeiten vorgestellt, die die Kopplung der Laser-Verdampfung intakter neutraler Moleküle mit der Multiphotonen-Ionisation und der Massenspektrometrie bietet, sowie mögliche Zukunftsperspektiven umrissen.

Die MUPI-Massenspektren organischer und biochemisch relevanter Verbindungen unterscheiden sich in einigen wesentlichen Punkten von Spektren, die durch andere massenspektrometrische Techniken erhalten werden. MUPI-Massenspektren zeigen immer ein intensives Signal für das Molekülion, so daß dessen Identifizierung leicht möglich ist. Da über die Anregungsenergie das Auftreten von Fragmentierungen gezielt beeinflußt werden kann, ermöglicht die MUPI-Massenspektrometrie sehr detaillierte Analysen. Die sich damit ergebenden Möglichkeiten für die massenspektrometrische, aber auch für die absorptionsspektroskopische Analytik sind bislang nur im Ansatz untersucht worden.

Ein wesentlicher Aspekt der hier beschriebenen Methode, der sie auch auf schwerflüchtige Verbindungen anwendbar macht, ist die lokale und zeitliche Trennung von Verdampfungs- und Ionisationsschritt. Dadurch werden intrinsische Schwierigkeiten der massenspektrometrischen Verfahren mit simultaner Verdampfung und Ionisation vermieden, und es resultiert ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis, so daß im Gegensatz zu anderen massenspektrometrischen Verfahren kein Subtraktionsverfahren nötig ist.

Die enorme Sensitivität der Multiphotonen-Ionisation ist ein weiterer Vorzug der MUPI-Massenspektrometrie. Substanzmengen im Femto- und sogar Subfemtogramm-Bereich lassen sich damit nachweisen, so daß auch die Spurenanalytik durch diese Methode neue Impulse erhält.

Die Erzeugung von Ionen mit Licht ist zur Zeit noch teurer als die mit herkömmlichen Verfahren^[128], aber die Vorzüge dieser Anregungsmethode sind evident. Der Flugzeitanalysator ist hingegen einfach, so daß die Kosten für das Gesamtgerät mit denen für andere Massenspektrometertypen vergleichbar sind.

Grenzen für die Anwendung von MUPI bei der Identifizierung von biologischem Material sind noch nicht abzusehen, denkt man an die intrinsischen Eigenschaften wie die weiche Ionisation und die Ionisationseffizienz als Funktion der Wellenlänge, an die unterschiedlichen Verbindungsklassen, die ionisiert werden können, sowie letztlich an die absolute Größe der Moleküle, die noch mit dieser Technik ionisiert werden können.

Um allerdings MUPI-Massenspektrometrie an Molekülen mit einer Masse von 20000–50000 Da betreiben zu können, sind nicht-massenlimitierte Detektoren erforderlich. Die bislang verwendeten, kommerziell erhältlichen Detektoren sind auf solche Probleme nicht ausgelegt. Es wurden bereits Lösungsvorschläge diskutiert^[129], die jedoch noch nicht ausreichend in die Praxis umgesetzt werden konnten.

Obwohl die MUPI-Massenspektrometrie ein noch junges Verfahren ist, ist die Richtung der weiteren Entwicklung heute schon deutlich abzusehen. Vor allem für die Aufklärung der Struktur von Biomolekülen hoher und höchster Massen wird die MUPI-Massenspektrometrie dank besserer Auflösung und größerer Empfindlichkeit immer wichtiger werden, daneben aber auch für Oberflächenstudien und Materialanalysen. Aufgrund der hohen Aufnahmegeschwindigkeit eignet sich die MUPI-Massenspektrometrie auch zum Verfolgen der Massenänderung schneller Prozesse in der Technik. Darüber hinaus ist sie wellenlängen- und zeitselektiv.

Befindet sich die Methode, Ionen mit Licht zu erzeugen, auch noch in der Entwicklung, so wird sie doch sicherlich in den nächsten Jahren verstärkt Eingang in die massenspektrometrische Analytik, die Qualitätskontrolle pharmazeutischer Produkte und die Spurenanalytik finden sowie auf klinische und pharmakologische Probleme angewendet werden.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeiten danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und dem Bundesministerium für Forschung und Technologie. Die Autoren danken Dr. U. Boesl und Herrn K. Walter für ihre Mitarbeit bei der Entwicklung der Multiphotonen-Ionisation und dem Aufbau des Flugzeit-massenspektrometers.

Eingegangen am 27. Juli 1987 [A 664]

[1] F. W. McLafferty: *Interpretation of Mass Spectra*, University Science Books, Mill Valley, CA, USA 1980.

[2] G. M. Mezei: *Practical Aspects of Gas Chromatography Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, New York 1984.

- [3] C. G. Edmonds, J. A. McCloskey, V. A. Edwards, *Biomed. Mass Spectrom.* 10 (1983) 237.
- [4] F. W. McLafferty (Hrsg.): *Tandem Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, New York 1983.
- [5] A. Benninghoven, W. Sichtermann, *Anal. Chem.* 50 (1978) 1180.
- [6] M. Barber, R. S. Bordoli, G. J. Elliot, R. D. Sedgewick, A. N. Tyler, *Anal. Chem.* 54 (1982) 645 A.
- [7] B. Sundqvist, R. D. Macfarlane, *Mass Spectrom. Rev.* 4 (1985) 421.
- [8] a) P. G. Kistemaker, G. J. Q. van der Peijl, J. Haverkamp in H. R. Morris (Hrsg.): *Soft Ionization Biological Mass Spectrometry*, Heyden, London 1981, S. 120; b) M. A. Posthumus, P. G. Kistemaker, H. L. C. Meuzelaar, *Anal. Chem.* 50 (1978) 985.
- [9] M. A. Baldwin, F. W. McLafferty, *Org. Mass Spectrom.* 7 (1973) 1353.
- [10] H. D. Beckey, *Field Ionization Mass Spectrometry*, Pergamon Press, Oxford 1971.
- [11] I. S. T. Tsong, S. H. Lin, B. V. King in C. J. McNeal (Hrsg.): *Mass Spectrometry in the Analysis of Large Molecules*, Wiley, Chichester 1986, S. 67.
- [12] U. Boesl, H. J. Neusser, E. W. Schlag, *Z. Naturforsch. A* 33 (1978) 1546.
- [13] L. Zandee, R. B. Bernstein, D. A. Lichtin, *J. Chem. Phys.* 69 (1978) 3274.
- [14] E. W. Schlag, H. J. Neusser, *Acc. Chem. Res.* 16 (1983) 335.
- [15] H. Kühlewind, U. Boesl, H. J. Neusser, E. W. Schlag, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 32 (1984) 205.
- [16] D. A. Gobeli, J. J. Yang, M. A. El-Sayed, *Chem. Rev.* 85 (1985) 529.
- [17] V. S. Letokhov: *Laser Photoionization Spectroscopy*, Academic Press, New York 1987.
- [18] G. Petty, C. Tai, F. W. Dalby, *Phys. Rev. Lett.* 34 (1975) 1207.
- [19] P. M. Johnson, C. E. Otis, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 32 (1981) 139.
- [20] H. Zacharias, H. Rottke, K. H. Welge, *Appl. Phys.* 24 (1981) 24.
- [21] J. C. Miller, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1702.
- [22] Übersicht: K. Kimura, *Adv. Chem. Phys.* 60 (1985) 161, zit. Lit.
- [23] D. H. Parker, R. B. Bernstein, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 60.
- [24] H. Kühlewind, H. J. Neusser, E. W. Schlag, *J. Phys. Chem.* 89 (1985) 5600.
- [25] J. Silberstein, N. Ohmici, R. D. Levine, *J. Phys. Chem.* 89 (1985) 5606.
- [26] F. Reberstrost, K. L. Kompa, A. Ben-Shaul, *Chem. Phys. Lett.* 77 (1981) 394.
- [27] F. Reberstrost, A. Ben-Shaul, *J. Chem. Phys.* 74 (1981) 3255.
- [28] a) U. Boesl, H. J. Neusser, E. W. Schlag, *J. Chem. Phys.* 72 (1980) 4327; b) *Chem. Phys. Lett.* 87 (1982) 1.
- [29] W. Dietz, U. Boesl, H. J. Neusser, E. W. Schlag, S. H. Lin, *Chem. Phys.* 66 (1982) 105.
- [30] a) R. G. Cooks, J. H. Beynon, R. M. Caprioli, G. R. Lester: *Metastable Ions*, Elsevier, Amsterdam 1973; b) H. Kühlewind, H. J. Neusser, E. W. Schlag, *Laser Chem.* 3 (1983) 3; c) *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 5452.
- [31] a) L. J. Moore, J. E. Hurst, E. H. Taylor, D. W. Beekman, M. T. Spaar, *Int. Phys. Conf. Ser.* 84 (1986) 239; b) D. E. Pratt, J. Eagles, R. Self, *Mass Spectrom.* 9 (1987) 407, zit. Lit.
- [32] U. Boesl, H. J. Neusser, E. W. Schlag, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 5058.
- [33] S. Leutwyler, U. Even, *Chem. Phys. Lett.* 81 (1981) 578.
- [34] D. A. Lichtin, S. Datta-Ghosh, K. R. Newton, R. B. Bernstein, *Chem. Phys. Lett.* 75 (1980) 214.
- [35] R. Trembreull, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* 54 (1984) 1962.
- [36] R. Trembreull, C. H. Sin, P. Li, H. M. Pang, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1186.
- [37] D. M. Lubman, *Anal. Chem.* 59 (1987) 31A, zit. Lit.
- [38] D. M. Lubman, R. Trembreull, C. H. Sin, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1084.
- [39] U. Boesl, J. Grotemeyer, K. Walter, E. W. Schlag, *Anal. Instrum. (NY)* 16 (1987) 151.
- [40] R. E. Smalley, L. Wharton, D. H. Levy, *Acc. Chem. Res.* 10 (1977) 139, zit. Lit.
- [41] J. B. Anderson, R. P. Andres, J. B. Fenn, *Adv. Chem. Phys.* 10 (1966) 275.
- [42] J. M. Hayes, G. J. Small, *Anal. Chem.* 55 (1983) 565 A.
- [43] C. M. Klimcak, J. F. Wessel, *Anal. Chem.* 52 (1980) 1233.
- [44] R. B. Opsal, *Dissertation*, Indiana University, Bloomington (USA) 1985.
- [45] S. W. Stiller, M. V. Johnston, *Anal. Chem.* 59 (1987) 567.
- [46] G. Rhodes, R. B. Opsal, J. T. Meek, J. P. Reilly, *Anal. Chem.* 55 (1983) 280.
- [47] G. R. Kinsel, K. R. Segar, M. V. Johnston, *Proc. 35th Annu. Conf. Mass Spectrom. Allied Top.* (Denver, CO, USA 1987), S. 405.
- [48] E. Klesper, A. H. Corvin, D. A. Turner, *J. Org. Chem.* 27 (1962) 700.
- [49] C. M. White, R. K. Houck, *HRC CC J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 9 (1986) 3.
- [50] C. H. Sin, H. M. Pang, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* 58 (1986) 490.
- [51] H. M. Pang, C. H. Sin, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1581.
- [52] C. R. Blakley, M. L. Vestal, *Anal. Chem.* 55 (1983) 750.
- [53] M. L. Vestal, G. J. Fergusson, *Anal. Chem.* 57 (1985) 2373.
- [54] T. R. Rizzo, Y. D. Park, D. H. Levy, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 277.
- [55] a) R. B. van Bremen, M. Snow, R. J. Cotter, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 49 (1983) 35; b) R. J. Cotter, *Anal. Chim. Acta* 195 (1987) 45.
- [56] E. Schröder, H. Münster, H. Budzikiewicz, *Org. Mass Spectrom.* 21 (1986) 707.
- [57] R. B. Freas, M. M. Ross, J. E. Campana, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 6195.
- [58] a) R. N. Zare, R. D. Levine, *Chem. Phys. Lett.* 136 (1987) 593; b) R. R. Lucchese in C. J. McNeal (Hrsg.): *Mass Spectrometry in the Analysis of Large Molecules*, Wiley, Chichester 1986, S. 151, zit. Lit.
- [59] W. E. Henke, H. von Weyssenhoff, H. L. Selzle, E. W. Schlag, *Verh. Dtsch. Phys. Ges.* 3 (1983) 139.
- [60] H. von Weyssenhoff, H. L. Selzle, E. W. Schlag, *Z. Naturforsch. A* 40 (1985) 674.
- [61] L. Zandee, R. B. Bernstein, *J. Chem. Phys.* 70 (1979) 1359, 2574.
- [62] G. J. Fisanick, T. S. Eichelberger, B. A. Heath, M. B. Robin, *J. Chem. Phys.* 72 (1980) 5571.
- [63] M. P. Irion, W. D. Bowers, R. L. Hunter, F. S. Rowland, R. T. McIver, Jr., *Chem. Phys. Lett.* 93 (1982) 375.
- [64] T. J. Carlin, B. S. Freiser, *Anal. Chem.* 55 (1983) 955.
- [65] T. M. Sack, D. A. McCreary, M. L. Gross, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1291.
- [66] Berichtet wurde von einem Auflösungsvermögen von 10^8 bei der Masse 40: H. Bamberg, K. P. Wancek, *Proc. 35th Annu. Conf. Mass Spectrom. Allied Top.* (Denver, CO, USA 1987), S. 1116.
- [67] K. P. Wancek, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 60 (1984) 11.
- [68] a) W. E. Stephens, *Bull. Am. Phys. Soc.* 21 (1946) 22; b) A. E. Cameron, D. F. Eggers, Jr., *Rev. Sci. Instrum.* 19 (1948) 605; c) M. M. Wolff, W. E. Stephens, *ibid.* 24 (1953) 616; d) H. S. Katzenstein, S. S. Freidland, *ibid.* 26 (1955) 324.
- [69] A. Benninghoven, *Z. Phys.* 230 (1970) 403.
- [70] D. F. Torgerson, R. P. Skowronski, R. D. Macfarlane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60 (1974) 616.
- [71] W. C. Wiley, I. M. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.* 26 (1955) 1150.
- [72] R. B. Opsal, K. G. Owens, J. P. Reilly, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1984.
- [73] a) W. R. Poschenrieder, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 9 (1972) 357; b) M. L. Muga, *Anal. Instrum. (NY)* 16 (1987) 31.
- [74] B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. K. Shmikk, V. A. Zagulin, *Sov. Phys. JETP (Engl. Transl.)* 37 (1973) 45.
- [75] U. Boesl, H. J. Neusser, R. Weinkauff, E. W. Schlag, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 4857.
- [76] D. M. Lubman, W. E. Bell, M. N. Kronick, *Anal. Chem.* 55 (1983) 1437.
- [77] T. L. Tai, M. A. El-Sayed, *Chem. Phys. Lett.* 130 (1986) 224.
- [78] K. Walter, U. Boesl, E. W. Schlag, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 71 (1986) 309.
- [79] R. Frey, G. Weiss, R. Kaminski, E. W. Schlag, *Z. Naturforsch. A* 40 (1985) 1349.
- [80] M. Yang, J. P. Reilly, *Anal. Instrum. (NY)* 16 (1987) 133.
- [81] E. Niehuis, T. Heller, H. Feld, A. Benninghoven in A. Benninghoven (Hrsg.): *Ion Formation from Organic Solids IFOS III*, Springer, Berlin 1986, S. 192.
- [82] a) R. D. Macfarlane, *Proc. 35th Annu. Conf. Mass Spectrom. Allied Top.* (Denver, CO, USA 1987), S. 1146; b) P. W. Geno, R. D. Macfarlane, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 77 (1987) 75.
- [83] C. Brunnée, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 76 (1987) 125.
- [84] Zu diesem Thema vgl. H. J. Neusser, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 79 (1987) 141.
- [85] H. Kühlewind, H. J. Neusser, E. W. Schlag, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 51 (1983) 255.
- [86] D. W. Squire, M. P. Barbalas, R. B. Bernstein, *J. Phys. Chem.* 87 (1983) 1701.
- [87] K. R. Newton, R. B. Bernstein, *J. Phys. Chem.* 87 (1983) 2246.
- [88] J. Grotemeyer, U. Boesl, K. Walter, E. W. Schlag, *Adv. Mass Spectrom.* 10 B (1986) 945.
- [89] B. D. Kopiltz, J. M. McVey, *J. Chem. Phys.* 80 (1984) 2271.
- [90] J. H. Catanzarite, Y. Haas, H. Reisler, C. Wittig, *J. Chem. Phys.* 78 (1983) 5506.
- [91] D. A. Lichtin, D. W. Squire, M. A. Winnik, R. B. Bernstein, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 2109.
- [92] R. S. Pandolfi, D. A. Gobeli, J. Lurie, M. A. El-Sayed, *Laser Chem.* 3 (1983) 29.
- [93] J. J. Young, D. A. Gobeli, R. S. Pandolfi, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem.* 87 (1983) 2255.
- [94] S. R. Heller, G. W. A. Milne (Hrsg.): *EPA/NINII - Mass Spectral Data Base*, NSRDS, Department of Commerce, Washington, D. C., USA 1978.
- [95] W. Vetter in G. R. Waller, O. C. Dermer (Hrsg.): *Biochemical Applications of Mass Spectrometry, First Suppl. Vol.*, Wiley-Interscience, New York 1980, S. 439 ff.
- [96] K. Biemann, J. A. McCloskey, *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 3192.
- [97] G. Junk, H. Svec, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 839.

- [98] J. Grotemeyer, U. Boesl, K. Walter, E. W. Schlag, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 78 (1987) 68.
- [99] T. R. Rizzo, Y. D. Park, L. Petenau, D. H. Levy, *J. Chem. Phys.* 83 (1985) 4819.
- [100] H. U. Winkler, H. D. Beckey, *Org. Mass Spectrom.* 6 (1972) 655.
- [101] P. Edman, *Acta Chem. Scand.* 4 (1950) 283.
- [102] F. Engelke, J. H. Hahn, W. Henke, R. N. Zare, *Anal. Chem.* 57 (1987) 909.
- [103] R. Trembreull, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1003.
- [104] J. Grotemeyer, K. Walter, U. Boesl, E. W. Schlag, *Proc. 35th Annu. Conf. Mass Spectrom. Allied Top.* (Denver, CO, USA 1987), S. 191.
- [105] J. Grotemeyer, J. Lindner, K. Walter, E. W. Schlag, *Z. Naturforsch.*, im Druck.
- [106] J. Grotemeyer, E. W. Schlag, unveröffentlicht.
- [107] a) H. J. Veith, F. W. Röllgen, *Org. Mass Spectrom.* 20 (1985) 689; b) D. E. C. Rogers, P. J. Derrick, *ibid.* 19 (1984) 490; c) P. J. Derrick, N. Tang-Trong, D. E. C. Rogers, *ibid.* 20 (1985) 690.
- [108] J. Grotemeyer, E. W. Schlag, *NATO-ASI Symp. Ser.*, im Druck.
- [109] H. R. Schulten, W. Görtz, *Anal. Chem.* 50 (1978) 428.
- [110] J. H. Hahn, R. Zenobi, R. N. Zare, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 2843.
- [111] R. Trembreull, D. M. Lubman, *Appl. Spectrosc.* 41 (1987) 431.
- [112] R. Trembreull, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1082.
- [113] K. Fujiwara, E. Voigtman, J. D. Winefordner, *Spectrosc. Lett.* 17 (1984) 9.
- [114] R. Trembreull, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1299.
- [115] J. Grotemeyer, U. Boesl, K. Walter, E. W. Schlag, *Org. Mass Spectrom.* 21 (1986) 645.
- [116] H. W. Ronge, H. F. Grützmacher, *Anal. Chem. Symp. Ser.* 7 (1981) 255.
- [117] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.* 11 (1984) 601.
- [118] J. Grotemeyer, E. W. Schlag in A. Benninghoven (Hrsg.): *Ion Formation from Organic Solids IV*. Springer, Berlin, im Druck.
- [119] R. Frey, G. Weiss, H. Kaminski, U. Boesl, J. Grotemeyer, K. Walter, E. W. Schlag, *Proc. 35th Annu. Conf. Mass Spectrom. Allied Top.* (Denver, CO, USA 1987), S. 538.
- [120] J. Grotemeyer, E. W. Schlag, *Org. Mass Spectrom.*, im Druck.
- [121] U. Boesl, J. Grotemeyer, K. Walter, E. W. Schlag, *Adv. Mass Spectrom.* 10B (1986) 985.
- [122] J. Grotemeyer, U. Boesl, K. Walter, E. W. Schlag, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 4233.
- [123] J. Grotemeyer, U. Boesl, K. Walter, E. W. Schlag, *Org. Mass Spectrom.* 21 (1986) 595.
- [124] a) K. Biemann, S. A. Martin, *Mass Spectrom. Rev.* 6 (1987) 1; b) B. N. Green, R. S. Bordoli in S. J. Gaskell (Hrsg.): *Mass Spectrometry in Biomedical Research*, Wiley, Chichester 1986, S. 235; c) M. M. Sheil, P. J. Derrick, *ibid.*, S. 251.
- [125] H. A. Scoble, S. A. Martin, K. Biemann, *Biochem. J.* 245 (1987) 621.
- [126] Von S. Schneider und E. Braslawski, Max-Planck-Institut für Strahlenchemie, Mülheim, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
- [127] J. Grotemeyer, E. W. Schlag, *Org. Mass Spectrom.* 22 (1987) 758.
- [128] Zu diesem Thema vgl. K. Kleinermanns, J. Wolfrum, *Angew. Chem.* 99 (1987) 38; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 38.
- [129] H. Jungclas, H. Danigel, L. Schmidt, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 52 (1983) 223.