

46. Nachweis von Fragment-Genesen im Massenspektrometer

3. Mitteilung¹⁾

Aminosäuresequenz-Analyse in Oligopeptiden und Oligopeptid-Gemischen mit Hilfe der DADI-Massenspektrometrie

von Urs Peter Schlunegger, Peter Hirter und Hans von Felten²⁾

Institut für organische Chemie der Universität Bern
Erlachstrasse 9a, CH-3012 Bern

(28. XI. 75)

Detection of Fragment Genesis in the Mass Spectrometer. III. Analysis of Amino-Acid Sequence in Oligopeptides and in Mixtures of Oligopeptides by DADI-Mass Spectrometry. – *Summary.* The amino acid sequence was analysed by DADI mass spectrometry in simple oligopeptides and in mixtures containing two or three peptides.

Einleitung. – Um die Entwicklung der Aminosäuresequenz-Analyse im Massenspektrometer haben sich bereits mehrere Arbeitsgruppen bemüht [1]. Besonders im Falle von kleineren Oligopeptiden bietet sich die Massenspektrometrie als relativ rasche und empfindliche Alternativmethode zu den heute weit verbreiteten Sequenzanalysen in Lösung an. Allerdings ist mit gewissen Schwierigkeiten bei der Auswertung der Massenspektren von Oligopeptid-Derivaten zu rechnen: Neben den interessierenden, sequenzcharakteristischen Fragment-Ionen lassen sich im klassischen Massenspektrum eine grosse Zahl anderer Ionen beobachten, die auf Umlagerungen im Massenspektrometer, Thermolysen oder Neben-Fragmentierungen zurückzuführen sind. Um diese Schwierigkeiten bei der Auswertung zu umgehen, war daher ein massenspektrometrisches Verfahren zu suchen, das sequenzcharakteristische von anderen Ionen zu differenzieren gestattet, bzw. Analysen von Ionengemischen ermöglicht. Die DADI-Massenspektrometrie (*Direct Analysis of Daughter Ions*) erfüllt diese Forderung in hohem Masse. Sie gestattet, genetische Beziehungen zwischen einem Ion und dessen Folge-Ionen nachzuweisen [2]. Die Analyse dieser genetischen Zusammenhänge zwischen verschiedenen Ionen von der Molekel (oder von einem beliebigen Ion aus) bis zum kleinen Fragment hinunter ergibt die sogenannten Fragmentierungszüge der betreffenden Molekel-, bzw. Ionensorte³⁾.

Im Falle von Oligomeren – wie zum Beispiel bei Oligopeptiden – wiederholt sich in der Molekel definitionsgemäss ein Grundstruktur-Element periodisch. Es ist daher zu erwarten, dass auch in der massenspektrometrischen Fragmentierung eine analoge Periodizität in Erscheinung tritt. Gelingt es einen Fragmentierungszug zu verfolgen, der parallel zu einer solchen Strukturperiodizität verläuft, lässt sich eine Analyse der Baustein-Sequenz durchführen. Wie sich zeigte, ist dies bei Oligopeptiden der Fall.

¹⁾ Als 2. Mitteilung gilt [2].

²⁾ Auszug aus den Licentiatsarbeiten von P. Hirter und H. von Felten am Institut für organische Chemie der Universität Bern.

³⁾ Definition der Begriffe, vgl. [2].

Über Versuche zur Aminosäuresequenz-Analyse in Oligopeptiden durch Verfolgen des sequenzcharakteristischen Fragmentierungszuges mit Hilfe der DADI-Massenspektrometrie soll im folgenden berichtet werden.

Der Nachweis des sequenzcharakteristischen Fragmentierungszuges in einfachen Oligopeptiden. – Aus der klassischen Massenspektrometrie ist bekannt, dass nach Elektronenstoss-Ionisierung unter anderen die Bindungen beidseits der Carbonylgruppen in der Peptidkette leicht brechen. Die dabei entstehenden Fragmente X, Y, Z, ... (Fig. 1) sind je aus einer unterschiedlichen Zahl von Amin-

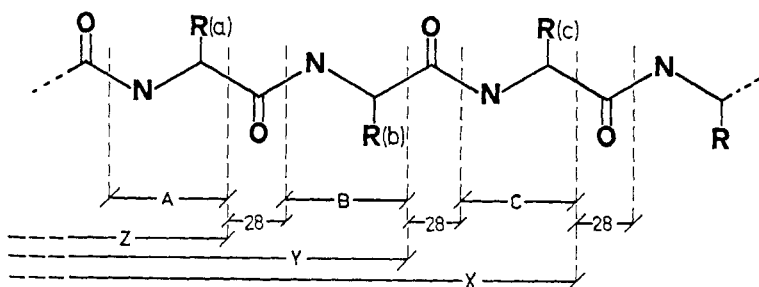


Fig. 1. Schematische Darstellung der Genese der DADI-messbaren, sequenzcharakteristischen Fragmente aus Oligopeptid-Derivaten. Die Reste R(i) definieren die sequenzcharakteristischen Bruchstücke A, B, C

fragmenten A, B, C, ... und Carbonylgruppen (CO) zusammengesetzt. Die Aminfragmente A, B, C, ... unterscheiden sich voneinander nur durch die verschiedenen, die Aminosäure charakterisierenden Reste R(a), R(b), R(c), ... Diese Aminfragmente geben uns daher Auskunft über die Art der vorhandenen Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz wird in diesem Schema durch den Fragmentierungszug $(X + CO) \rightarrow X \rightarrow (Y + CO) \rightarrow Y \rightarrow (Z + CO) \rightarrow Z \rightarrow \dots$ charakterisiert⁴⁾.

Leider ist dieser leicht überschaubare Fragmentierungszug in klassischen Massenspektren in der Regel durch eine Vielzahl weiterer Fragmentierungszüge überlagert (z.B. Fragmentierungen der Seitenketten R(i), Umlagerungen, etc.). Die resultierenden Massenspektren sind daher auch nicht immer leicht interpretierbar.

Hier bringt die DADI-Massenspektrometrie die prinzipiell neue Möglichkeit, den sequenzcharakteristischen Fragmentierungszug $(X + 28) \rightarrow X \rightarrow (Y + 28) \rightarrow Y \rightarrow \dots$ vergleichsweise selektiv aufzudecken. Dies liess sich am Beispiel eines Hexapeptides zeigen, das uns zufälligerweise zur Verfügung stand⁵⁾. Aus dem DADI-Spektrum des Molekel-Ions dieser Verbindung liess sich direkt die Sequenz mehrerer Aminosäuren ableiten. Wie aber aus dem Spektrum (Fig. 2) hervorgeht, fällt die Intensität der DADI-Signale mit dem Kleinerwerden der Fragment-Ionen rasch ab. Dadurch wird die Präzision der Messungen und gleichzeitig die Aussagekraft der Analyse geringer. Normalerweise lässt sich auf diese Weise die Sequenz von nur etwa zwei bis drei Aminosäuren mit hinreichender Sicherheit bestimmen. Wie die Erfahrung

⁴⁾ Nomenklatur und Darstellungsart wurden früher definiert [3].

⁵⁾ Von U. P. Schlunegger an der Tagung der Arbeitsgemeinschaft Massenspektrometrie der GdCh, 5. Juni 1973 in München/Martinsried vorgetragen.

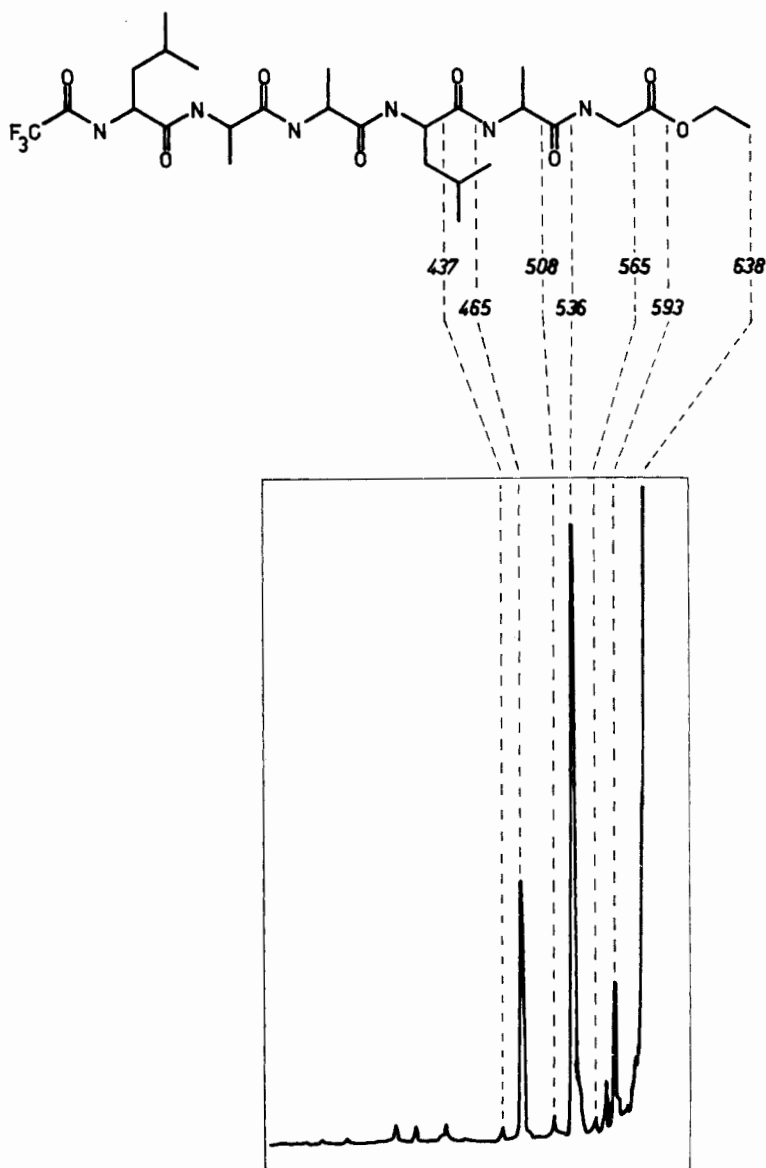


Fig. 2. DADI-Spektrum des Molekel-Ions eines *N*-Trifluoracetyl-hexapeptid-äthylesters mit schematischer Zuordnung der Signale zu den Fragmentierungs-Stellen

zeigte, bringt hier das schrittweise Verfolgen konsekutiver Ionengenerationen eine grundsätzliche Verbesserung. In der Praxis stellt man das DADI-Massenspektrometer auf das Molekel-Ion, bzw. ein interessierendes Fragment-Ion ein (durch Variation des Magnetfeldes) und registriert davon das zugehörige DADI-Spektrum. Da die zuerst beobachtbaren Signale grosser Intensität sequenzcharakteristisch sein können, lassen

sich die interessierenden Folge-Ionen relativ leicht ermitteln. Diese – anschliessend mit dem Magnetfeld ausgewählt – ergeben dann wiederum das nächste sequenzcharakteristische Folge-Ion usw. Es müssen somit für die Sequenzermittlung konsekutiv die DADI-Spektren der Ionen $(X + CO)^+$, X^+ , $(Y + CO)^+$, Y^+ , $(Z + CO)^+$, Z^+ ... gemessen werden (Fig. 1).

Dieses Vorgehen sei am Beispiel des N-Acetyl-valyl-alanyl-leucin-methyl-esters (1) demonstriert (Fig. 3). Das DADI-Spektrum des Ions m/e 326 zeigte als erstes das

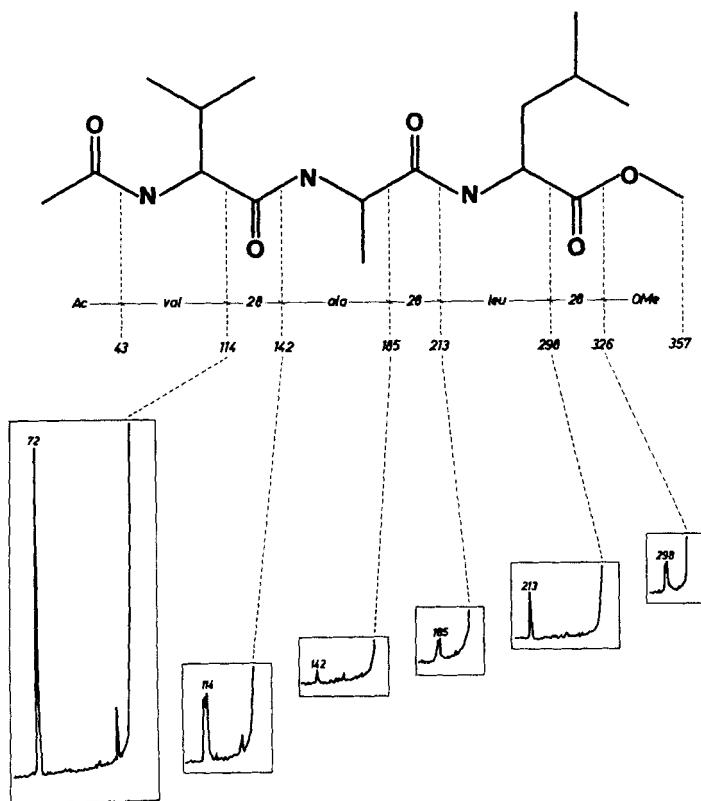


Fig. 3. DADI-Spektren konsekutiver Ionengenerationen aus N-Acetyl-val-ala-leu-methylester (1). Der jeweils erste dominante Pik ist sequenzcharakteristisch

sehr intensive, um 28 Masseneinheiten kleinere Folge-Ion m/e 298. Dies bedeutet offensichtlich eine Abspaltung von CO. Der erste intensive Pik bei m/e 213 im DADI-Spektrum des Folge-Ions 298 entspricht der Abspaltung des Aminfragmentes von Leucin (85 Masseneinheiten). Die folgenden Mess-Schritte ergaben sinngemäss m/e 213 \rightarrow 185 (CO-Abspaltung), m/e 185 \rightarrow 142 (Abspaltung des Aminfragmentes von Alanin), etc. Anders ausgedrückt, man misst die konsekutive Abspaltung der Fragmente 28, C, 28, B, 28, A ... (Fig. 1). Das stetig wiederkehrende Fragment 28 (CO) kann daher als Quittung dafür aufgefasst werden, dass das Messprogramm der richtigen Aminosäuresequenz folgt. Das Erkennen dieser Quittung ist zusätzlich

vereinfacht, da das DADI-Signal für die CO-Abspaltung aus peptidischen Ionen in unserem Gerät (CH-5DF) eine auffallende Feinstruktur aufweist (vgl. Fig. 4, Signale m/e 298, 199, 128). Es handelt sich um ein Triplet⁶⁾, dessen Spitzen nominell den Abspaltungen von 27, 28 und 29 Masseneinheiten entsprechen. Dieses Verhalten liess sich auch am Beispiel des N-Acetyl-leucyl-alanyl-valin-methyl-esters (**2**, Fig. 4), wie

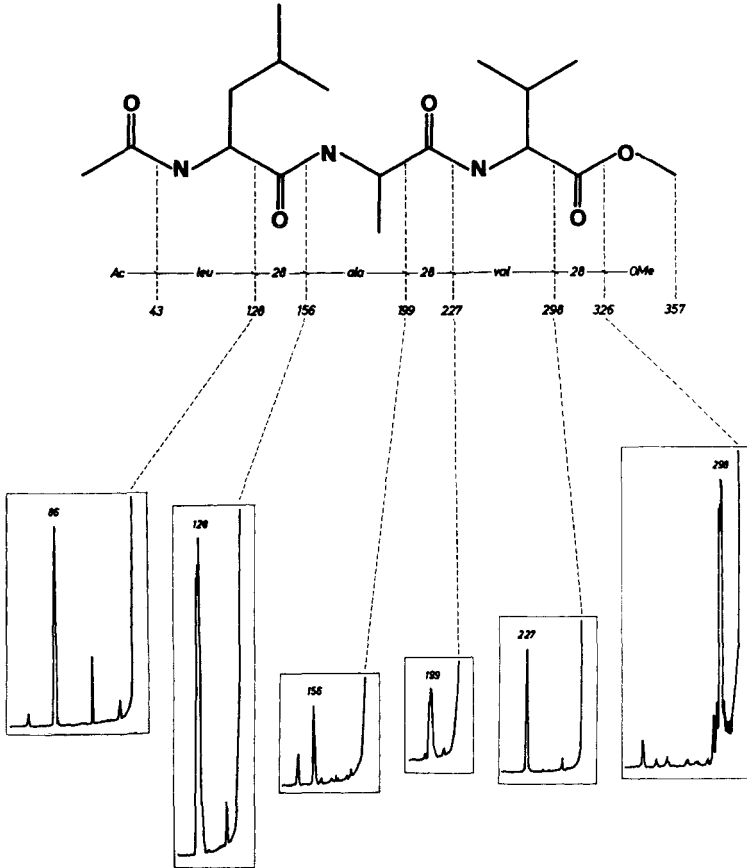


Fig. 4. DADI-Spektren konsekutiver Ionengenerationen aus N-Acetyl-leu-ala-val-methylester (**2**). Die sequenzcharakteristischen Ionen sind in allen Spektren dominant. Die Signale für die CO-Abspaltungen zeigen eine Tripletstruktur (vgl. auch Fig. 3, 5 und 6)

auch am N-Acetyl-valyl-leucyl-alanin-methyl-ester (**3**) beobachten. Das konsequente Verfolgen der sequenz-charakteristischen Ionen mit Hilfe der DADI-Massenspektrometrie dürfte damit zumindest für Oligopeptide mit einfachen Aminosäuren eine weitere Möglichkeit der relativ schnellen Aminosäuresequenz-Analyse darstellen.

Die Aminosäuresequenz-Analyse in Peptidgemischen. – Die DADI-Massenspektrometrie eignet sich, wie bereits erwähnt, in hohem Masse für Gemischuntersuchun-

⁶⁾ Die Feinstruktur des DADI-Signals für einen CO-Verlust kann auch in anderen Verbindungsklassen beobachtet werden und ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

gen, da vorgängig der eigentlichen Analyse eine Auswahl der interessierenden Ionen im Magnetfeld erfolgt [2]. Es lag daher nahe, eine Aminosäuresequenz-Analyse auch im Peptidgemisch zu versuchen. Als Modell wurden Gemische mit zwei und drei isomeren Tripeptiden gewählt, d. h., bei den Gemischkomponenten handelt es sich um Verbindungen, die aus den gleichen Aminosäuren, aber mit verschiedener Aminosäuresequenz aufgebaut worden waren. Die Molekel-Ionen zeigten somit identische Elementarzusammensetzungen. Es interessierte die Frage, ob auch im Peptidgemisch die konsekutive Abspaltung 28, C, 28, B, 28, A ... (Fig. 1) noch zufriedenstellend nach-

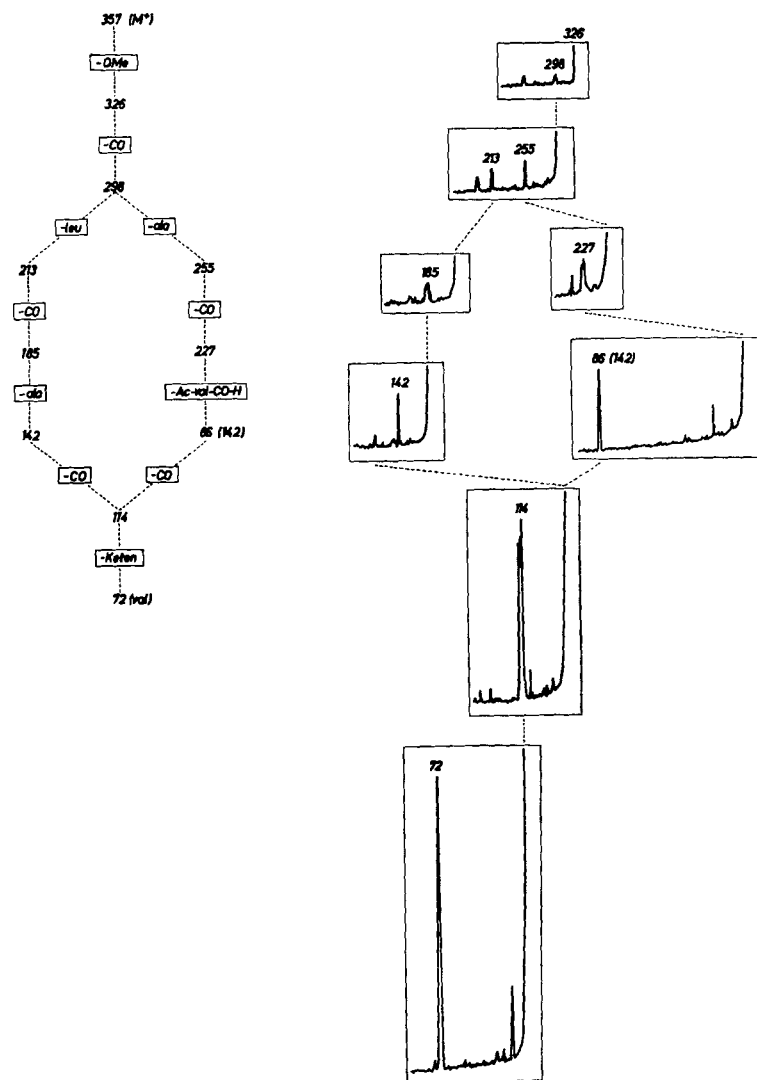


Fig. 5. Aminosäuresequenz-Analyse im Gemisch zweier Tripeptid-Derivate (2 + 3). Der Analysengang ist schematisch neben den DADI-Spektren der konsekutiven Ionengenerationen dargestellt. Die isomeren Ionen m/e 298 ergaben verschiedene Fragmentierungszüge.

weisbar bleibt. Dass dies tatsächlich der Fall ist, wurde an drei Gemischen mit je zwei Peptiden gefunden⁷⁾. Daraus sei das Beispiel der Mischung von **2** mit N-Acetyl-alanyl-leucyl-valin-methyl-ester (**3**) eingehender besprochen (Fig. 5). Es wurden je *ca.* 1 Milligramm der beiden Peptid-Derivate gemischt und ein Teil davon durchgemessen. Nach Abspaltung des Methoxy-Restes aus den Molekel-Ionen traten die noch

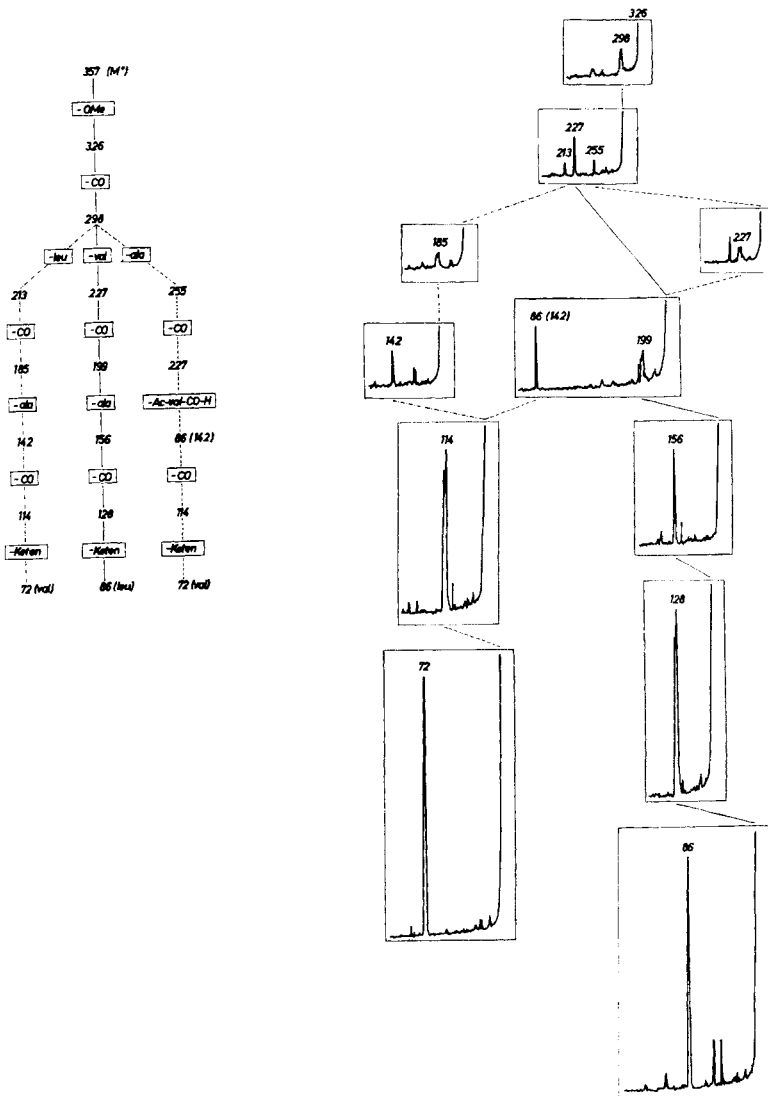


Fig. 6. Aminosäuresequenz-Analyse im Gemisch dreier, isomerer Tripeptid-Derivate (**1** + **2** + **3**).
In *m/e* 298 sind drei Ionenarten enthalten

⁷⁾ Von U. P. Schlunegger an der Tagung der Arbeitsgemeinschaft Massenspektrometrie der GdCh, 2. Oktober 1974 in Marburg a.d. Lahn vorgetragen.

gleichmassigen Fragment-Ionen m/e 326 und nach Verlust von CO die Ionen m/e 298 auf. Hier trennten sich erwartungsgemäss die Fragmentierungszüge durch Verlust des Alaninrestes zu m/e 255 aus der einen Spezies (aus **3**) und Abspaltung des Leucinrestes aus der anderen Ionenart (aus **2**) zu m/e 213. Diese beiden Fragment-Ionen – es handelt sich in beiden Fällen um Acyl-Kationen – spalten erwartungsgemäss je 28 Masseneinheiten (CO) ab, was durch die bereits erwähnte, charakteristische Feinstruktur (Triplet) der resultierenden Folge-Ionen m/e 227 und m/e 185 belegt wird. Der nächste Schritt besteht bei **2** im Verlust eines weiteren Aminrestes zu m/e 142 (Alanin). Beim zweiten Peptid (**3**) wäre ebenfalls ein Ion m/e 142 infolge Abspaltung des Aminrestes von Leucin (85 Masseneinheiten) zu erwarten. In diesem Falle übernimmt aber der Leucinrest ein Proton und die Ladung (m/e 86) und der acetylierte Valin-Rest geht als Neutralteilchen weg (dieses Verhalten wurde auch an der reinen Verbindung beobachtet). Um im System zu bleiben, muss bei diesem Peptid (**3**) die nächste DADI-Messung nicht am Ion m/e 86, sondern am komplementären Fragment bei m/e 142 anschliessen. Sowohl in der Reinsubstanz wie auch hier im Gemisch resultierte erwartungsgemäss ein erneuter CO-Verlust zu m/e 114. Der nächste Schritt besteht in einer Ketenabspaltung, die die Analyse abschliesst. Abgesehen von der beschriebenen, komplizierenden Verschiebung der Ladung auf den Leucinrest lässt sich somit die Aminosäuresequenz beider Peptide im Gemisch auf relativ einfache Weise aus den DADI-Daten ableiten. Dieser Befund wurde an zwei weiteren Zweiergemischen überprüft und erhärtet.

Auch im Gemisch von drei Tripeptiden gleicher Aminosäure-Zusammensetzung, aber mit verschiedenen Aminosäuresequenzen, ergab sich ein analoger Befund. Die entsprechenden DADI-Spektren mit den Fragmentierungszügen sind in Fig. 6 wiedergegeben. Die drei Komponenten sind in etwa gleichen Mengen gemischt worden. Beim gemeinsamen Fragmentgemisch bei m/e 298 trennen sich die Fragmentierungszüge. Das konsequente Verfolgen der Abspaltungen von C, 28, B, 28, A ... führte zu den drei Sequenzen. Von besonderem Interesse dürfte hier die Kreuzung der beiden Fragmentierungszüge m/e 298 \rightarrow 227 \rightarrow 199 \rightarrow 156 ff und m/e 298 \rightarrow 255 \rightarrow 227 \rightarrow 142 (bzw. 86) \rightarrow 114 ff beim Ion m/e 227 sein. m/e 227 muss somit zwei Spezies enthalten, die aber mit Hilfe der Feinstruktur des CO-Abspaltungssignals leicht differenzierbar waren. Abschliessend lässt sich somit aussagen, dass mit Hilfe der DADI-Massenspektrometrie Aminosäuresequenzen in Oligopeptiden und sogar in Peptidgemischen ermittelt werden können. Die Anwendung dieser Möglichkeiten auf Peptide mit komplizierteren Aminosäuren und Versuche zur schnellen Detektion von Fehlsequenzen in synthetischen Produkten sind Gegenstand laufender Arbeiten.

Wir danken dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* (Projekt Nr. 2.885.73 und 2.386.75) für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil. – Die DADI-Spektren wurden mit einem Massenspektrometer Modell CH-5DF der Firma *Varian* MAT gemessen: Ionenquellentemperatur 250°, Elektronenstoss-Ionisation (70 eV), Proben temperatur 120–150°.

Zur Fehlerbeurteilung sind in Tabelle 1 die Messwerte der Peptide **1** und **2** (Mittelwerte von je drei Messungen), die berechnete durchschnittliche Massendifferenz zwischen Ausgangs-Ion und Folge-Ion ($M_1 - M_2$), sowie die maximalen Abweichungen gegen unten ($\bar{M}_2 - \bar{M}_{2min}$) und gegen oben ($M_{2max} - \bar{M}_2$) in Masseneinheiten angegeben. Vom Signal für die CO-Abspaltung ist jeweils

nur der Wert des ersten Piks des Triplets (entsprechend der Massendifferenz 27) aufgeführt. In Tabelle 2 sind die beobachteten Messfehler bei den Einzelpeptiden, bei den drei Gemischen mit je zwei Peptiden, sowie beim Gemisch mit drei Peptiden aufgeführt.

Aus diesen Tabellen geht hervor, dass sich einerseits die einzelnen Folge-Ionen mit hinreichender Genauigkeit bestimmen liessen. Die durchschnittliche Abweichung vom theoretischen Wert betrug 0,1 Masseneinheiten oder weniger – abgesehen von der relativ ungenauen Messung des Überganges ($M^+ - OCH_3$) \rightarrow ($M^+ - OCH_3 - CO$). Der grösste Einzelfehler dieser CO-Abspaltung belief sich auf *ca.* 0,4 Masseneinheiten. Andererseits ist aber auch ersichtlich, dass offenbar eine Verschlechterung der Präzision bei Gemischanalysen nicht eintritt (Tabelle 2). Die gefundenen Maximalfehler blieben durchwegs im Rahmen derjenigen bei Analysen von reinen Verbindungen.

Tabelle 1. Messwerte von zwei DADI-Sequenzanalysen in Tripeptid-Derivaten

DADI von <i>m/e</i>	M_2 berechnet	Mittelwert ESA-Spannung	$M_1 - M_2$	$\bar{M}_2 - M_{2min}$	$M_{2max} - \bar{M}_2$
<i>N-Acetyl-leu-ala-val-methyl-ester</i>					
326	299	506,45 464,67	27 ^{a)}	0,16	0,206
298	227	506,53 385,69	71	0,013	0,027
227	200	506,53 446,08	27 ^{a)}	0,004	0,004
199	156	506,40 397,16	43	0,005	0,006
156	129	506,62 418,44	27 ^{a)}	0,017	0,013
128	86	506,60 340,62	42	0,023	0,024
<i>N-Acetyl-val-ala-leu-methyl-ester</i>					
326	299	506,41 464,19	27 ^{a)}	0,315	0,392
298	213	506,55 362,29	85	0,141	0,147
213	186	506,44 442,49	27 ^{a)}	0,023	0,023
185	142	506,48 388,77	43	0,094	0,083
142	115	506,42 409,50	27 ^{a)}	0,084	0,056
114	72	506,44 319,98	42	0,013	0,027

^{a)} Es wird hier nur der erste Pik des beobachteten CO-Triplets angegeben.

Tabelle 2. Zur Aminosäuresequenz-Analyse in Tripeptid-Derivaten: Beobachtete maximale Messfehler (bei je 3 Einzelmessungen)

Tripeptid bzw. Gemisch	Maximale Abweichung des Mittelwertes vom erwarteten, ganzzahligen Wert	Abweichungen vom Mittelwert	
		niedrigster Einzelwert	höchster Einzelwert
1	0,18	0,31	0,39
2	0,15	0,16	0,20
3	0,18	0,19	0,21
1 + 2	0,39	0,12	0,12
2 + 3	0,13	0,20	0,18
1 + 3	0,21	0,18	0,19
1 + 2 + 3	0,19	0,24	0,22

Die maximalen Einzelfehler traten durchwegs bei der CO-Abspaltung aus dem ($M - \text{OCH}_3$)⁺-Ion auf.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. Biemann, Biochemical Applications of Mass Spectrometry, Editor: G. E. Waller, Wiley-Interscience, New-York, London, Sydney 1972, pp. 405–428.
 [2] U. P. Schlunegger, Angew. Chem. 87, 731–740 (1975).
 [3] U. P. Schlunegger, Helv. 58, 65 (1975).

47. Photochemische Reaktionen

87. Mitteilung [1]

Zur Photolyse von 9-Oxabicyclo[3.3.1]nonan-2-on¹⁾

von Rudolf Otto Duthaler und Camille Ganter

Laboratorium für Organische Chemie der Eidg. Technischen Hochschule, CH-8006 Zürich

(29. IX. 75)

Photolysis of Bicyclo[3.3.1]nonan-2-one. – *Summary.* Disproportionations, the secondary processes available to the acyl-alkyl biradical **b** ($X(9) = 0$) formed from 9-oxabicyclo[3.3.1]nonan-2-ones **a** ($X(9) = 0$) in a primary photochemical process by α -cleavage (Norris type I cleavage) were studied. Special attention was paid to the selectivity between the two possible H-abstractions: the one at C(3) (\rightarrow ketene **c**, $X(9) = 0$) and the other one at C(8) (\rightarrow alkenal **d**, $X(9) = 0$) and to the selectivity of the H-abstraction at a definite methylene group (C(3) or C(8)). In the case of ketene formation (\rightarrow **c**, $X(9) = 0$) the specificity of the insertion of the migrating H-atom at C(1) was studied. *endo*-6-Hydroxy-9-oxabicyclo[3.3.1]nonan-2-one (**6**) and derivatives of it (**7**, **8**, **16**, **17**, **19**, **21**, **30** and **38**) as well as *exo*-6-hydroxy-9-oxabicyclo[3.3.1]nonan-2-one (**41**) and its derivative **42** were used as substrates.

UV-irradiation of **6** in benzene yielded 1,5-dioxa-2-*cis*-decalone (**44**) by way of a ketene **g** ($R = H$) as demonstrated by the photolysis of **7** (\rightarrow **45**), **8** (\rightarrow **43**), and **17** (\rightarrow **47**). Specific labelings with deuterium proved that H-abstraction occurs intramolecularly at C(3) (e.g. **16** \rightarrow **54**; **6** + **16** \rightarrow **44** + **54**), that one of the H-atoms at C(3) migrates specifically to C(1) (**21** \rightarrow **55**,

¹⁾ Aus der Dissertation (Nr. 5108, ETHZ, 1973) von R. O. Duthaler. Über einen Teil der Resultate wurde von C. Ganter bereits an der Herbstversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Neuchâtel (11./12. 10. 1974) berichtet.