

61. Nachweis von Fragment-Genesen im Massenspektrometer

5. Mitteilung

Aminosäure-Sequenzanalyse: Vergleich der DADI/MIKE-, 'linked scan'- und Kollisionsaktivierungs-Spektrometrie an aliphatischen Aminosäuren

von René Steinauer, Hansjörg Walther und Urs Peter Schlunegger

Institut für organische Chemie der Universität Bern, Freiestrasse 3, CH-3012 Bern

(18.I.80)

Detection of Fragment Genesis in the Mass Spectrometer. V. Amino Acid Sequence Analysis by DADI/MIKE, Linked Scan and Collisional Activation Mass Spectrometry. Aliphatic Amino Acids

Summary

The amino acid sequence in tripeptides and tetrapeptides has been analyzed by DADI/MIKE and B/E-'linked scan' spectrometry, as well as by collisional activation in the first and second field free region of a mass spectrometer embodying the inverse *Nier-Johnson* geometry. Collisional activation enhances the intensity of fragment ions.

Einleitung. – Schon seit längerer Zeit wird die Massenspektrometrie in der Peptidanalytik eingesetzt. Die Aminosäuresequenz von Oligopeptiden lässt sich damit an kleinen Substanzmengen ermitteln [1] [2]. In Peptiden – wie in anderen Polymeren – wiederholt sich ein Grundstrukturelement periodisch; das führt zu einer Periodizität in der massenspektrometrischen Fragmentierung. Entsprechende ionisierte Fragmente lassen sich im konventionellen Massenspektrum nachweisen. Oft sind aber diese wichtigen, sequenzcharakteristischen Ionen nicht leicht zu erkennen, da sie durch Signale konkurrenzierender Fragmentierungen überdeckt werden.

Neue Wege eröffnete die DADI/MIKE-Spektrometrie¹⁾, weil damit genetische Beziehungen zwischen einem Ion und dessen Folge-Ionen nachgewiesen werden [3] [4]. Auf diese Weise lassen sich auch sequenzcharakteristische Fragment-Ionen aus Oligopeptiden selektiv verfolgen. Die genetische Reihenfolge und die Masse dieser ausgewählten Ionen führen zur Aminosäure-Sequenz des untersuchten Oligopeptides [5]. Eine solche Analyse lässt sich grundsätzlich auch an unreinen Proben [6] oder an Peptid-Gemischen [7] durchführen.

¹⁾ DADI/MIKE = Direct Analysis of Daughter Ions/Mass-analyzed Ion Kinetic Energy Spectrometry.

Zusätzliche Informationen sind von der Anwendung der sogenannten Kollisionsaktivierung²⁾ zu erwarten [8]. Dabei werden die Ionen durch Kollision mit Gas-Teilchen - meistens Helium - zusätzlich angeregt, was eine stärkere Fragmentierung bewirkt. Dadurch entstehen in der Regel mehr und intensivere Signale von Folge-Ionen [9-11].

Es war zu prüfen, ob solche ionenreichere Fragmentierungen und die neue B/E-*'linked scan'*-Technik³⁾ [12] [13] die Aminosäuresequenzanalyse erleichtern.

Messmethoden. - *DADI/MIKE-Spektrometrie.* Mit der DADI/MIKE-Spektrometrie werden Fragmentierungen von Ionen im zweiten feldfreien Raum (FFR)⁴⁾ erfasst. Durch Konstanthalten von Beschleunigungsspannung und Magnetfeld wird eine einzige Ionen-Spezies ausgewählt, deren Folge-Ionen aus Zerfällen im zweiten FFR durch Verändern des elektrischen Feldes gemessen werden. Das Prinzip der DADI/MIKE-Spektrometrie in der Aminosäure-Sequenzanalyse wurde früher [5] eingehend behandelt. Ausgehend vom Molekel-Ion werden die nacheinander abgespaltenen CO- und Aminfragmente bis zur N-terminalen Aminosäure erfasst.

Ein Nachteil der DADI/MIKE-Spektren sind die oft breiten Signale⁵⁾, wodurch die Massenzuordnung erschwert ist.

B/E-*'linked scan'*. Mit dieser Messtechnik werden die im ersten FFR gebildeten Folge-Ionen untersucht. Bei gleichbleibender Beschleunigungsspannung werden das magnetische Feld (B) und das elektrische Feld (E) gleichzeitig so verändert, dass B/E konstant bleibt. So erhält man zu einem Vorläufer-Ion alle Signale der Folge-Ionen, die im ersten FFR entstehen. Die Doppelfokussierung⁶⁾ bewirkt eine Energiediskriminierung, so dass die registrierten Signale schmal und gut aufgelöst sind. Somit lassen sich die Massen der Folgeprodukte leicht bestimmen. Deshalb ist diese Messtechnik eine willkommene Ergänzung zur DADI/MIKE-Spektrometrie.

Kollisionsaktivierung. Es wurde erkannt, dass die Fragmentierung der Vorläufer-Ionen stark erhöht werden kann, wenn diese durch Kollision mit Neutralteilchen zusätzlich angeregt werden [9] [14] [15]. Dank der dadurch erzielten grösseren Ausbeute an Folge-Ionen, erhält man wertvolle Hinweise auf die Struktur der Molekel und ihrer Zerfälle. Besonders bei Vorläufer-Ionen, die sich kaum fragmentieren, ist die CA-Methode sehr hilfreich.

Vergleicht man die DADI/MIKE- mit den entsprechenden B/E-*'linked scan'*-Spektren, so ist zu beachten, dass sich die Vorläufer-Ionen bei den beiden Messtechniken nicht zum gleichen Zeitpunkt nach ihrer Entstehung fragmentieren. Deshalb sind Unterschiede in der Anzahl der registrierten Signale und deren Intensitäten zu erwarten.

Im folgenden werden die DADI/MIKE-, B/E-*'linked scan'*- und CA-Spektren eines Oligopeptides vergleichend dargestellt.

2) Collisional Activation: CA, auch Stossaktivierung genannt.

3) Vgl. unten: Messmethoden.

4) In einem Massenspektrometer mit inverser *Nier-Johnson*-Geometrie.

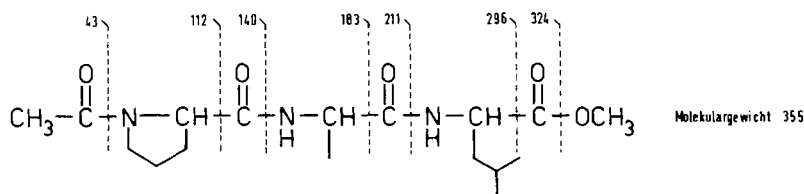
5) Ein Teil der Überschussenergie der angeregten Ionen wird in Form von Translationsenergie freigesetzt, was eine Signalverbreiterung bewirkt [12].

6) Die Folge-Ionen passieren das B- und das E-Feld.

Resultate. – Zehn Tri- und Tetrapeptidmethylester mit Acetyl- oder Trifluoracetyl-Schutzgruppen wurden untersucht. Die Oligopeptide waren aus den aliphatischen Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin und Prolin aufgebaut⁷⁾.

Am Beispiel von Ac-Pro-Ala-Leu-OMe ist in *Schema 1* das typische Fragmentierungsverhalten der sequenzcharakteristischen Ionen dargestellt.

Schema 1. Sequenzcharakteristische Ionen eines Peptides.



Ausgehend vom Molekel-Ion mit m/z 355 wurden alle Ionen der Aminosäure-Sequenz mit m/z 324, 296, 211, 183, 140, 112 untersucht. Das Molekel-Ion hat eine relative Intensität von 3%⁸⁾.

Das DADI/MIKE-Spektrum vom Molekel-Ion zeigt folgende Fragmentierungen: Verlust von CH₃OH (m/z 323), C₄H₈ (m/z 299, Leucin-Seitenkette), [COOCH₃]⁺ (m/z 296, Sequenz-Ion), [Leu-COOCH₃+H] (m/z 210, Sequenz-Ion), [CO-Leu-COOCH₃]⁺ (m/z 183, Sequenz-Ion), [CO-Ala-CO-Leu-COOCH₃]⁺ (m/z 112, Sequenz-Ion). Das Ion m/z 146 besteht aus dem in [10] und [16] beschriebenen C-terminalen [Leu-COOCH₃]⁺-Bruchstück, das nach Umlagerung von zwei H-Atomen entsteht.

Mit Stossaktivierung im zweiten FFR treten zusätzliche Signale bei m/z 140, 97, 86 und 69 auf, die den einzelnen Aminfragmenten oder [Aminfragment+CO] entsprechen. Die Intensitäten der Fragmente m/z 210, 183, 146 und 112 sind deutlich grösser als im normalen DADI/MIKE-Spektrum. Es muss beachtet werden, dass die Massenzahl wegen der Signaltbreite nur auf ± 1 Masseneinheit genau bestimmt wurde.

Das B/E-'linked scan'-Spektrum zeigt die gleichen Fragmente wie das DADI/MIKE-Spektrum, wobei die Sequenz-Ionen m/z 296 und 210 sehr intensiv sind. Die integren Massen sind sicher bestimmbar und ergänzen damit die Resultate der DADI/MIKE-Spektren.

Mit CA im ersten FFR erhält man grössere Signalintensitäten, aber nur wenig zusätzliche Fragmente, die vor allem im unteren Massenbereich zu finden sind (m/z 140, 100, 99). Vgl. *Figur 1*.

Das nächste Ion mit Masse m/z 324 zeigt im DADI/MIKE-Spektrum die Abspaltung von CO. Dieses charakteristische Triplettsignal [7] tritt in allen Spektren als sehr intensives Sequenz-Ion auf (m/z 296). Im CA-Spektrum erscheinen zusätzlich die Signale m/z 211 (Verlust des Leucin-Aminfragmentes), m/z 140 und 112 (Sequenz-Ionen).

⁷⁾ Siehe exper. Teil.

⁸⁾ Bei Oligopeptid-Methylestern besitzen die Molekel-, [M-OCH₃]⁺- und [M-COOCH₃]⁺-Ionen allgemein eine schwache Intensität (rel. Int. $\leq 1\%$).

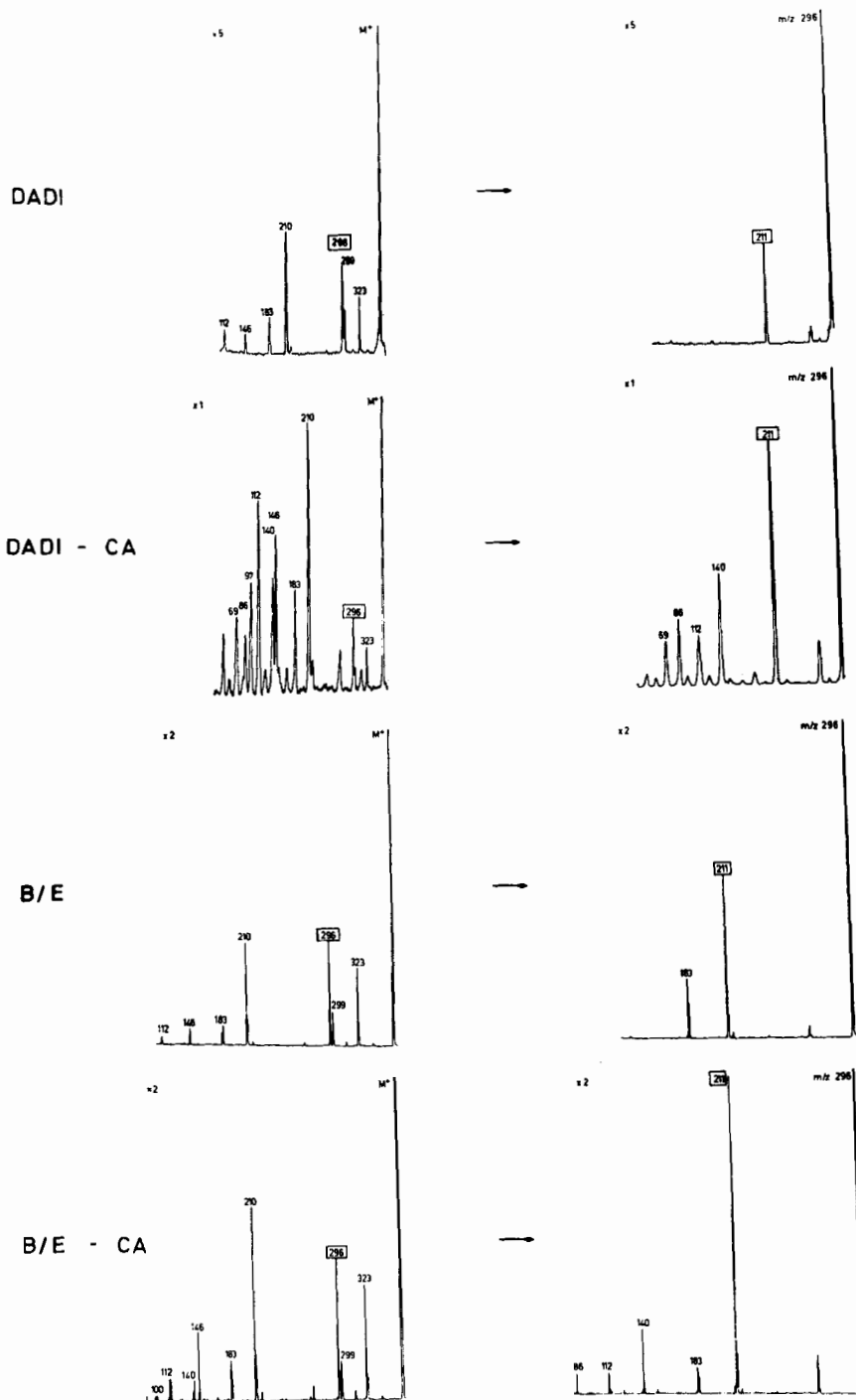
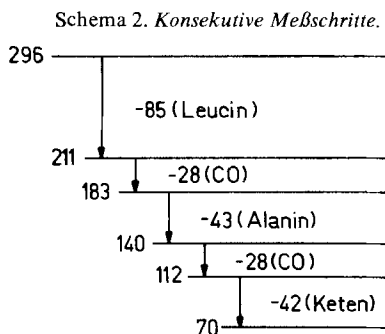


Fig. 1. Vergleich der DADI-, B/E- und CA-Spektren von Ac-Pro-Ala-Leu-OMe

Der B/E-Scan ergibt die gleichen Resultate wie die DADI/MIKE-Methode. Auch nach der Kollision mit Helium im ersten FFR werden nur wenig neue Fragmente beobachtet (m/z 140, 113, 88).

Die Messreihe wird nun so fortgesetzt, dass von jedem sequenz-charakteristischen Ion die Folge-Ionen bestimmt werden und so die vollständige Aminosäuresequenz des Peptides ermittelt wird. Dieses Vorgehen ist in *Schema 2* vereinfacht dargestellt.



Diskussion. - Die mit oben beschriebener Analysetechnik durchgeführte Aminosäure-Sequenzbestimmung war bei jedem untersuchten Oligopeptid erfolgreich. Beim Vergleich der verschiedenen Messtechniken und bei der Beurteilung der einzelnen Spektren wurden folgende Feststellungen gemacht:

1) Im allgemeinen zeigte sich, dass die DADI/MIKE- und B/E-Spektren der untersuchten Peptide sehr ähnlich sind. In beiden feldfreien Räumen zerfallen die einander entsprechenden Ionen zu gleichen Fragmenten. Beim DADI/MIKE-Scan ist die Intensität der Fragmente oft grösser als beim B/E-*'linked scan'*;

2) Die Kollisionsaktivierung erlaubt, mit beiden Messtechniken vom Molekel- oder (Molekel-COOCH₃)-Ion aus, mehrere Ionen der Aminosäure-Sequenz zu beobachten. Die Fragmentierung wird in diesem Fall so ausgeprägt, dass auch Ionen mit kleineren Massen registriert werden, die ohne Bedeutung für eine Sequenzanalyse sind;

3) Die Signale in den DADI/MIKE-Spektren werden durch CA verbreitet; dagegen wird beim B/E-*'linked scan'* die gute Auflösung durch CA nicht beeinträchtigt;

4) Manchmal beobachtet man Fragment-Ionen mit einer Masse, die um eine Masseneinheit höher oder tiefer liegt als erwartet. Dies ist dann der Fall, wenn die Ionen durch Umlagerung ein Proton aufnehmen oder abgeben (vgl. [17]);

5) Bei Vorläuferionen mit sehr kleinen Intensitäten im Normalspektrum (rel. Int. $\leq 0,1\%$) treten in den Folge-Ionen-Spektren oft etliche schwache Signale auf, die keinem einfachen Zerfall zuzuordnen sind. Das sind meistens Artefakte. Sie entstehen bei der DADI/MIKE-Spektrometrie z. B. durch Zerfälle im ersten FFR und bei der B/E-*'linked scan'*-Spektrometrie im zweiten FFR. Unter gewissen Voraussetzungen (siehe [18-20]) werden diese Zerfälle aber trotzdem registriert. Auch bei

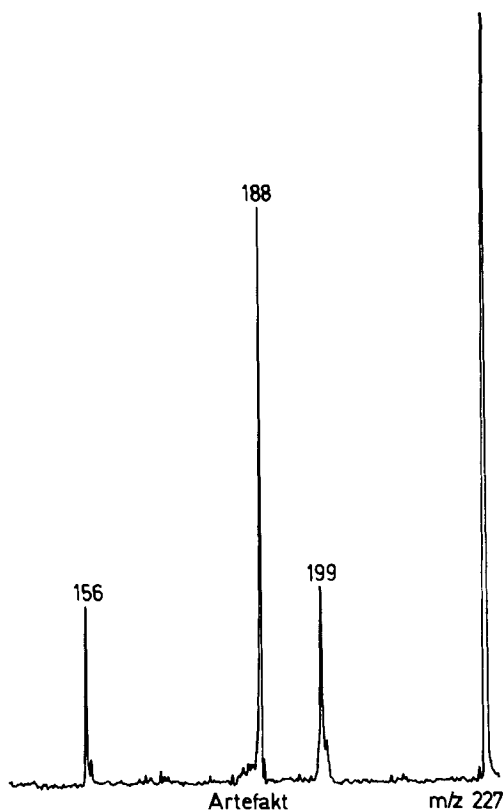


Fig. 2. Artefakt-Signal im B/E-linked scan'-Spektrum von Fragment-Ion m/z 227 aus *Ac-Leu-Ala-Leu-OMe*

intensiven Vorläufer-Ionen treten solche Artefakte auf, wie das Beispiel in *Figur 2* zeigt.

Das Ion m/z 227 verliert CO und (CO + Alanin-Aminfragment). Ein Zerfall zu m/z 188 ist aber nicht vernünftig (es wären 39 Masseneinheiten). Die Berechnung zeigt, dass es sich um den Übergang m/z 156 \rightarrow m/z 128 (–CO) im zweiten FFR handeln muss⁹⁾. Solche Artefakte sind in den Spektren der metastabilen Ionen von Peptiden selten. Sie sind meistens leicht erkennbar, weil sie sich mit dem Fragmentierungsverhalten von Peptiden nicht erklären und sich durch Berechnung Zerfällen im nicht beobachteten FFR zuordnen lassen;

6) Allgemein wurde bei den *N*-terminalen acetylierten Aminosäuren eine Keten-Abspaltung festgestellt. Diese ist im Falle von Glycin sehr schwach, kann aber durch Kollisionsaktivierung verstärkt werden;

7) Bei Glycin beobachtet man oft keine CO-Abspaltung. Dagegen misst man einen Verlust von 57 Masseinheiten, entsprechend dem [Glycin-Aminfragment + CO].

⁹⁾ Berechnungen von Artefakten sind in [18] und [19] angegeben.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die DADI/MIKE-Spektrometrie von Oligopeptiden durch die B/E-*'linked scan'*-Technik sehr gut ergänzt wird. Die Kombination der beiden Techniken mit der Stossaktivierung liefert optimale Resultate.

Wir danken dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* (Projekt Nr. 2.249-0.79) für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Die DADI/MIKE- und B/E-*'linked scan'*-Spektren wurden auf einem modifizierten, doppel-fokussierenden Massenspektrometer mit inverser *Nier-Johnson*-Geometrie gemessen (*Varian* MAT CH5-DF). Messbedingungen: Beschleunigungsspannung 3 kV, Elektronenstoss-Ionisation (1 mA, 70 eV), Ionenquellentemperatur 250°. Probenzuführung: Direkteinlass, Temperatur 125–200°. Für einen vollständigen Vergleich der Messmethoden sind einige mg Peptid und mehrere Stunden Arbeit nötig.

'Linked scan'-Einrichtung: Die Messungen wurden mit einer käuflichen Einheit von *Varian* MAT durchgeführt. Stossaktivierungs-Einrichtung: Um bei der Kollisionsaktivierung in den feldfreien Räumen den Druck nur lokal erhöhen zu können, wurden Stosskammern eingebaut, in die das Kollisionsgas eingeleitet wird. Im ersten FFR wurde die Stosskammer unmittelbar vor dem Eintrittspalt und im zweiten FFR nahe nach dem Zwischenbildspalt eingebaut. Den Druck des Kollisionsgases (He) in den Stossräumen regelte man mit Hilfe von Nadelventilen. Für die in dieser Arbeit ausgeführten Messungen wurde er so eingestellt, dass der fokussierte Vorläuferpik auf 30% seiner Anfangsintensität reduziert wurde.

Die Oligopeptide¹⁰⁾ wurden stufenweise aufgebaut und nach der Zweiphasenmethode [21] [22] gereinigt. Die Schutzgruppen waren der Methylester am C-Terminus und die BOC¹¹⁾-Gruppe am N-Terminus. Die BOC-Gruppe wurde mittels Trifluoressigsäure entfernt und in Dichlormethan erfolgte die Kupplung mit dem nächsten Aminosäure-Hydroxysuccinimidester. Im letzten Schritt wurde die BOC-Gruppe abgespalten und das Amino-Ende mit Methanol/Acetanhydrid 4:1 [23] acetyliert.

Folgende Peptide wurden synthetisiert und gemessen: Ac-X-Ala-Leu-OMe (Aminosäure X, Schmelzpunkt, Molekulargewicht, Proben temperatur;) (Gly, 173–174°, 315, 150°; Ala, 249–251°, 329, 160°; Val, 249–250°, 357, 160°; Ile, 231°, 371, 155°; Leu, 214–215°, 371, 160°; Pro, Öl, 355, 125°); sowie die Tetrapeptide Ac-Gly-Gly-Gly-Gly-OMe (248° mit Zersetzung, 302, 155°); Ac-Ala-Ile-Leu-Val-OMe (280–281°, 470, 200°); Ac-Val-Ile-Gly-Leu-OMe (238–239°, 456, 170°); und das trifluoracetylierte Peptid TFA-Val-Ala-Leu-OMe (190–191°, 411, 135°).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *F. Weygand, A. Prox, H. H. Fessel & K. K. Sun*, *Z. Naturforsch.* 20b, 1169 (1965).
- [2] *M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin, E. I. Vinogradova, A. I. Miroshnikov, Yu. B. Alakhov, V. M. Lipkin, Yu. B. Shvetsov, N. S. Wulfson, B. V. Rosinov, V. N. Bochkarev & V. M. Burikov*, *Nature* 211, 361 (1966).
- [3] *U. P. Schlunegger*, *Angew. Chemie* 87, 731 (1975).
- [4] *M. H. Bozorgzadeh, R. P. Morgan & J. H. Beynon*, *Analyst* 103, 613 (1978).
- [5] *U. P. Schlunegger & P. Hirter*, *Isr. Journ. Chemistry* 17, 168 (1978).
- [6] *R. W. Kondrat & R. G. Cooks*, *Analyt. Chemistry* 50, 81A (1978); *T. L. Kruger, R. G. Cooks, J. L. McLaughlin & R. L. Ranieri*, *J. Org. Chemistry* 42, 4161 (1977); *G. A. McClusky, R. G. Cooks & A. M. Knevel*, *Tetrahedron Letters* 1978, 4471; *R. W. Kondrat, G. A. McClusky & R. G. Cooks*, *Analyt. Chemistry* 50, 1222 (1978).
- [7] *U. P. Schlunegger, P. Hirter & H. v. Felten*, *Helv.* 59, 406 (1976).

¹⁰⁾ Alle verwendeten Aminosäuren hatten L-Konfiguration.

¹¹⁾ Abkürzungen: BOC = *t*-Butyloxycarbonyl, Ac = Acetyl, TFA = Trifluoracetyl.

- [8] *K. Levsen & H. Schwarz*, *Angew. Chemie* 88, 589 (1976).
- [9] *F. W. McLafferty, R. Kornfeld, W. F. Haddon, K. Levsen, I. Sakai, P. F. Bente III, S.-C. Tsai & H. D. R. Schuddemage*, *J. Amer. chem. Soc.* 95, 3886 (1973).
- [10] *K. Levsen, H.-K. Wipf & F. W. McLafferty*, *Org. Mass Spectr.* 8, 117 (1974).
- [11] *V. Franchetti, B. S. Freiser & R. G. Cooks*, *Org. Mass Spectr.* 13, 106 (1978).
- [12] *R. K. Boyd & J. H. Beyon*, *Org. Mass Spectr.* 12, 163 (1977).
- [13] *D. S. Millington & J. A. Smith*, *Org. Mass Spectr.* 12, 264 (1977).
- [14] *A. Maquestiau, Y. van Haverbeke, C. de Meyer, R. Flammang & J. Perlaux*, *Bull. Soc. chim. Belg.* 85, 69 (1976).
- [15] *A. Maquestiau, Y. van Haverbeke, C. de Meyer & R. Flammang*, *Org. Mass Spectr.* 13, 207 (1978).
- [16] *P. Hirter*, Dissertation, Bern 1979.
- [17] *B. J. Millard*, *Tetrahedron Letters* 1965, 3041.
- [18] *T. Ast, M. H. Bozorgzadeh, J. L. Wiebers, J. H. Beynon & A. G. Brenton*, *Org. Mass Spectr.* 14, 313 (1979).
- [19] *R. P. Morgan, C. J. Porter & J. H. Beynon*, *Org. Mass Spectr.* 12, 735 (1977).
- [20] *W. F. Haddon*, *Analyt. Chemistry* 51, 983 (1979).
- [21] *K. Blaser*, Dissertation, Bern 1975.
- [22] *C. H. Schneider & W. Wirz*, *Helv.* 55, 1062 (1972).
- [23] *P. A. Leclercq & D. M. Desiderio*, *Analytical Letters* 4, 305 (1971).