

CONTROLE ANALYTIQUE NON DESTRUCTIF DES REACTIONS SUPPORTEES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.

I. DEPROTECTION DE BOC-AMINOACIDES EN SYNTHESE PEPTIDIQUE SUR SUPPORT POLYACRYLIQUE.

J.L. Aubagnac*, M. Calmes, J. Daunis, B. El Amrani et R. Jacquier

Unité Associée au CNRS n°468 - Place Bataillon - 34060 Montpellier Cédex - France

F.M. Devienne et R. Combarieu

Laboratoire de physique moléculaire des Hautes Energies - BP2-06530 Peymeinade France

Abstract : MBSA-FAB ionization method and mass tandem spectrometry has been applied to the non destructive monitoring of the deprotection step in solid phase peptide synthesis.

Le contrôle analytique de l'élaboration d'une chaîne peptidique sur un polymère réticulé insoluble, l'évaluation d'une méthodologie, la mise en évidence d'éventuelles réactions secondaires interviennent généralement en fin de synthèse et nécessitent le clivage préalable du peptide de son support (1). Les méthodes analytiques non destructrices sont peu nombreuses. En dehors du dosage volumétrique ou spectrophotométrique des groupes amino libres (2), seules deux études structurales ont été jusqu'à présent réalisées sur support, par RMN du ^{19}F (3) et du ^{13}C (4). La spectrométrie de masse n'avait fait l'objet d'aucune étude jusqu'à présent.

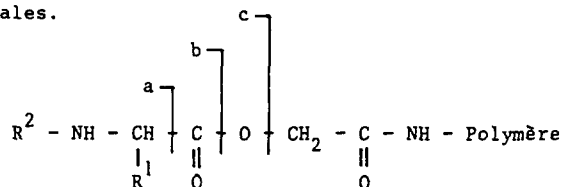
Nous avons utilisé la résine polyacrylique précédemment décrite (5) et employée en synthèse peptidique grâce à un maillon bromacétamido (6) ; ce dernier permet l'ancrage réversible, par l'intermédiaire d'une liaison ester, d'un aminoacide N-protégé, mis en réaction sous forme de son sel de césium (7). Deux échantillons supportés de Boc-valine 1 et de Boc-phénylalanine 2 (Boc=t-butyloxycarbonyle) ont ainsi été préparés ; leur déprotection par l'acide trifluoroacétique dans les conditions standard conduit respectivement à 3 et 4. Les spectres de ces produits, placés dans une matrice de glycérol, ont été enregistrés avec le spectromètre déjà décrit (8), en utilisant la méthode d'ionisation MBSA-FAB (Molecular Beam Solid Analysis-Fast Atom Bombardment) (9).

Dans le cas de la Boc-valine supportée 1, la complexité apparente du spectre de masse en mode positif (figure 1) résulte de la superposition des spectres de plusieurs composés : aminoacide, support polyacrylique, glycérol (G) (en particulier m/z 93 correspondant à $\text{G}+\text{H}^+$ et m/z 57) et impuretés (m/z 133 correspondant à Cs^+). On observe cependant nettement un ion caractéristique m/z 218 correspondant à $\text{M}+2\text{H}^+$ (M=masse du fragment $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{NO}_4$). Cet ion a été identifié par la technique de spectrométrie

de masse par tandem (10), permettant d'enregistrer son spectre CAD (Collision Activated Dissociations) (Figure 2). Les fragmentations sont indiquées dans la figure 3 et sont compatibles avec les données de la littérature (11).

Il paraît vraisemblable qu'après protonation de la partie aminoacide (sans localisation du proton sur un site donné) par transfert d'un proton à partir de la matrice de glycérol (12), la fragmentation de la liaison ester est accompagnée du transfert intramoléculaire d'un deuxième proton provenant de la matrice polyacrylique; ce processus libère l'ion $M+2H^{+}$, le polymère restant à l'état de fragment non chargé.

Le tableau I, qui réunit les ions caractéristiques des produits étudiés, montre sans ambiguïté que les réactions de déprotection de 1 et de 2 en 3 et 4 respectivement ont été totales.



Produit	R ¹	R ²	Ions caractéristiques		
			a	b+2H	c+2H
<u>1</u>	iso-C ₃ H ₇	Boc	-	-	218
<u>2</u>	C ₆ H ₅ CH ₂	Boc	-	-	266
<u>3</u>	iso-C ₃ H ₇	H	72	*	-
<u>4</u>	C ₆ H ₅ CH ₂	H	120	150**	166

*Ion m/z 192 formé par la rupture (b) et l'association avec une molécule de G
 **Ion m/z 240 formé par la rupture (b) et l'association avec une molécule de G

Tableau I. Ions caractéristiques des aminoacides supportés

Dans le cas de 2, l'ion $M+2H^{+}$ (m/z 266) a été identifié par son spectre CAD ; les fragmentations sont identiques à celles de la Figure 3.

Les trois modes de fragmentation mis en évidence ont été confirmés par étude des spectres CAD correspondants. Ainsi pour 4, le spectre CAD de m/z 120 ($\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}_2^+$) est constitué par les ions m/z 103 (perte de NH_3), m/z 91 (C_7H_7^+) et m/z 77 (C_6H_5^+). Le spectre CAD de l'ion m/z 140 comporte deux ions abondants m/z 222 (perte de H_2O) et m/z 120 (perte de G + CO).

Notons enfin dans le spectre de 1 (Figure 1) la présence des ions m/z 133 et m/z 225 (spectre CAD : un seul ion à m/z 133) correspondant respectivement à Cs^+ et à $\text{G}+\text{Cs}^+$; le spectre de 2 contient également les ions m/z 133, m/z 398 ($\text{M}+\text{H}+\text{Cs}^+$) et m/z 530 ($\text{M}+2\text{Cs}^+$); ceci indique une insuffisance des lavages, même dans les conditions standard, après la réaction de couplage du Boc-aminoacide sur le support.

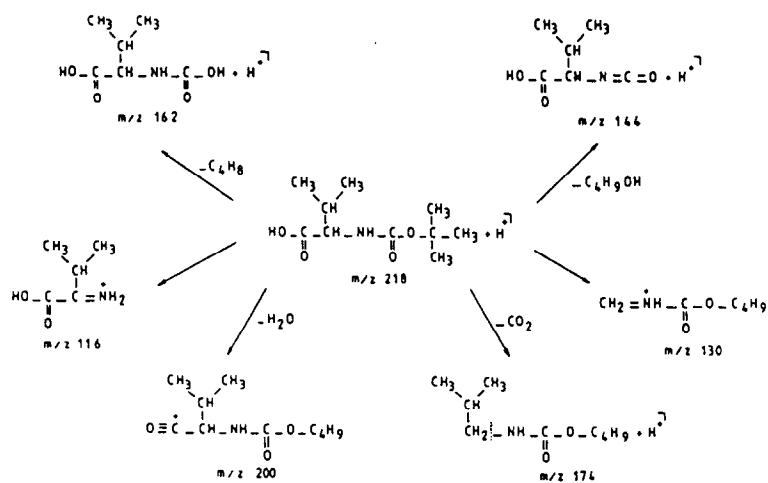
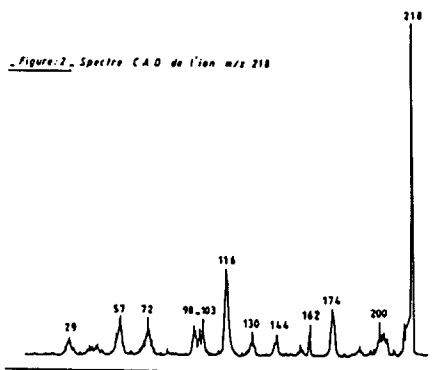
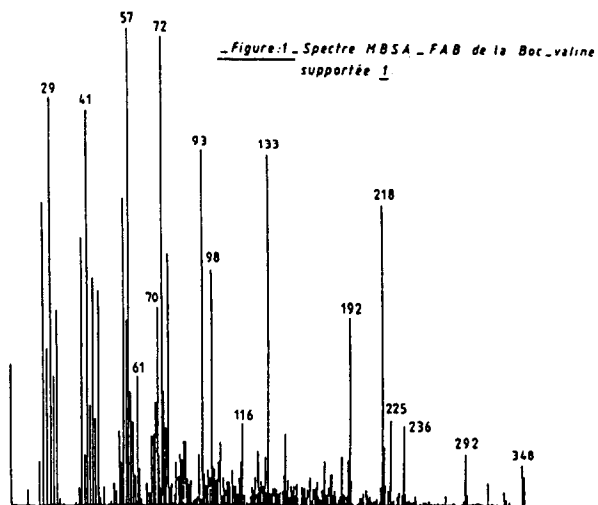


Figure 3 Fragmentations de l'ion m/z 218

Ces résultats préliminaires ouvrent la voie à une large utilisation de la spectrométrie de masse comme méthode analytique non destructive des réactions supportées. L'utilisation du FAB pour des analyses quantitatives, selon les données de la littérature (13), est également envisagée.

Bibliographie

- 1- J.R. Benson, P.C. Louie et R.A. Bradshaw, in E. Gross et J. Meienhofer, *The peptides*, 4, 217 (1981), Academic Press; E. Bayer, P. Hunziker, M. Mutter, R.E. Sievers et R. Uhmann, *J. Amer. Chem. Soc.*, 94, 265 (1972); D. Yamashiro, J. Blake et C.H. Li, *Tetrahedron Letters*, 1469 (1976); S. Mosjov, A.R. Mitchell et R.B. Merrifield, *J. Org. Chem.*, 45, 555 (1980); H. Rink, P. Sieber et F. Raschdorf, *Tetrahedron Letters* 25, 621 (1984).
- 2- G. Barany et R.B. Merrifield, in E. Gross et J. Meienhofer, *The peptides*, 2, 149 (1980), Academic Press; P. Villemoes, T. Christensen et K. Brunfeldt, *Acta Chem. Scand.*, B32, 703 (1978); V.K. Sarin, S.B.H. Kent, J.P. Tam et R.B. Merrifield, *Anal. Biochem.*, 117, 147 (1981); K. Barlos, D. Papaioannou et C. Sañida, *Ann. Chem.*, 1308 (1984).
- 3- S.L. Manatt, C.F. Amsden, C.A. Bettison, W.T. Frazer, G.T. Gudman, B.E. Lenk, J.F. Lubetich, E.A. Mc Nelly, S.C. Smith, D.J. Templeton et R.P. Pinnell, *Tetrahedron Letters*, 21, 1397 (1980).
- 4- R. Epton, P. Goddard et K.J. Ivin, *Polymer*, 21, 1367 (1980).
- 5- C. Aspisi, B. Calas, J. Daunis, M. Follet, R. Jacquier et J. Parello, *Brevet européen* 81.408 (1982); *Brevet US* 4.436.874 (1984); F. Baleux, V. Clavelin, J. Daunis, R. Jacquier, B. Calas et J. Parello, *Makromol. Chem.*, 185, 2305 (1984).
- 6- F. Baleux, J. Daunis, R. Jacquier et B. Calas, *Tetrahedron Letters*, 25, 5893 (1984)
- 7- B.F. Gisin, *Helv. Chim. Acta*, 56, 1476 (1973).
- 8- J.L. Aubagnac, F.M. Devienne et R. Combarieu, *Tetrahedron Letters*, 24, 2263 (1983).
- 9- F.M. Devienne et J. Giroud, 5th International symposium on molecular beams, Nice, 1975; M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick et A.N. Tyler, *Chem. Comm.*, 325 (1981).
- 10- F.W. McLafferty, *Tandem mass spectrometry*, Wiley, 1983.
- 11- H.R. Morris, M. Panico, M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick et A. Tyler, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 101, 623 (1981); D.F. Hunt, W.M. Bone, J. Shabanowitz, J. Rhodes et J. M. Ballard, *Anal. Chem.*, 53, 1704 (1981) et *Biomed. Mass Spectrom.*, 8, 397 (1981); J.B. Westmore, W. Ems et K.G. Standing, *Biomed. Mass Spectrom.*, 9, 119 (1982); M.L. Gross, D. McCreary, F. Crow, K.B. Tomer, M.R. Pope, L.M. Ciuffetti, H.W. Knoche, J.M. Daly et L.F. Dunkle, *Tetrahedron Letters*, 23, 5381 (1982); M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick et A.N. Tyler, *Biomed. Mass Spectrom.*, 9, 208 (1982); I. Katakuse et D.M. Desiderio, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 54, 1 (1983); W. Hberma, J.P. Kamerling, A.J. Scotboom, G.J.M. van Scharrenburg, B.N. Green et I.A.S. Lewis, *Biomed. Mass Spectrom.*, 10, 13 (1983); D.M. Desiderio et I. Katakuse, *Anal. Biochem.*, 129, 425 (1983); I.J. Amster, M.A. Baldwin, M.T. Cheng, C.J. Proctor et F.W. Mc Lafferty, *J. Amer. Chem. Soc.*, 105, 1654 (1983); G.V. Garner, D.B. Gordon, L.W. Tetler et R.D. Sedgwick, *Org. Mass Spectrom.*, 18, 436 (1983).
- 12- E. Clayton et A.J.C. Wakefield, *Chem. Comm.*, 969 (1984).
- 13- S.J. Gaskell, B.G. Brownsey, P.W. Brooks et B.N. Green, *Biomed. Mass Spectrom.* 10, 215 (1983); K.L. Clay et R.C. Murphy, *Id.*, 11, 47 (1984); C.F. Beckner et R.M. Caprioli, *Id.*, 11, 60 (1984); W.D. Lehmann, M. Kessler et W.A. König, *Id.*, 11, 217 (1984).

(Received in France 7 December 1984)