

MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN
VON ACYLIERTEN PEPTIDEN

K. Heyns und H. F. Grützmacher

Chemisches Staatsinstitut der Universität Hamburg
Institut für Organische Chemie

(Received 2 September 1963)

Die Bestimmung der Aminosäuresequenz von Peptiden mit Hilfe der Massenspektrometrie war bisher nur auf Umwegen möglich, weil wegen der geringen Flüchtigkeit der Peptide ein für die Aufnahme eines Massenspektrums notwendiger Partialdruck von 10^{-2} Torr im Einlaßsystem des Massenspektrometers nicht erreicht werden konnte. Zur Umwandlung der Peptide in hinreichend flüchtige Derivate ist die Überführung in N-Trifluoracetyl-peptid-methylester ¹⁾ oder Reduktion zu Aminoalkoholen ²⁾ empfohlen worden. Die dazu notwendigen chemischen Umsetzungen sind aber mit kleinen Probemengen nur umständlich durchzuführen.

Nach Weiterentwicklung ³⁾ der von R. I. Reed ⁴⁾ vorgeschlagenen Methode des direkten Einlasses der Meßprobe in die Ionenquelle des Massenspektrometers können auch die Massenspektren von kleineren freien Peptiden erhalten werden. Es hat sich jedoch gezeigt, daß diese Massenspektren für eine Sequenzanalyse der Peptide wenig geeignet sind.

Wie unten gezeigt wird, ist dies jedoch an Hand der Massenspektren von acylierten Peptiden möglich.

F. Weygand und Mitarb. ⁵⁾ berichteten kürzlich über die mit Hilfe des direkten Probeneinlasses erhaltenen Massenspektren von N-Trifluoracetyl-peptid-methylestern. Sie konnten auf diese Weise Massenspektren von Pentapeptidderivaten aufnehmen. Wir haben nach der gleichen Einlaßmethode Massenspektren von N-Acetyl- und N-Trifluoracetylpeptiden aufgenommen ⁶⁾. Diese Peptidderivate können leicht mit besonders geringen Substanzmengen durch Lösen der Peptide in einem Gemisch Essigsäure/Acetanhydrid bzw. Trifluoressigsäure/Trifluoracetanhydrid und Eindampfen der Lösung im Vakuum erhalten werden. Die Flüchtigkeit dieser Verbindungen reicht aus, um Massenspektren von acylierten Pentapeptiden aufzunehmen. Eine Reduktion dieser Peptidderivate zu den entsprechenden Aminoalkoholen oder eine Veresterung ist daher nicht notwendig.

Im Vergleich zu freien Peptiden besitzen acylierte Peptide neben ihrer größeren Flüchtigkeit den Vorteil, daß ihr N-terminaler Aminosäurerest durch den Acylrest markiert ist. In ihren Massenspektren tritt daher ein charakteristischer peak bei der MZ ^{*)} des "Acylamin"-Ions $\text{CH}_3\text{CO-NHCHR}^\oplus$ bzw. $\text{CF}_3\text{CO-NHCHR}^\oplus$ auf. Durch diesen peak wird die N-terminale Aminosäure angezeigt und die Deutung des Massenspektrums wesentlich erleichtert.

Als Beispiele sind in FIG. 1 und 2 die Massenspektren von N-Acetyl-leucyl-valyl-alanin und N-Trifluoracetyl-glycyl-valyl-leucin angegeben. Die "Acylamin"-Ionen bei den MZ 128

^{*)} $\overline{\text{MZ}}$ = Massenzahl ^{*)} M = Molekulargewicht

$(\text{CH}_3\text{CO-NHCH}^{\oplus}-\text{C}_4\text{H}_9)$ und 126 ($\text{CF}_3\text{CO-NHCH}_2^{\oplus}$) treten deutlich hervor. "Acetylamin"-Ionen können den Acetylrest als Keten eliminieren und in das für die betreffende Aminosäure typische "Amin"-Ion übergehen. Auf diese Weise wird der intensive peak bei der MZ 86 im Massenspektrum des Acetyl-leucylpeptids gebildet. " Trifluoracetylamin " - Ionen zeigen diese Spaltung nicht. Die Ionen der MZ 30 in FIG. 2 besitzen einen anderen Ursprung. Dieser Unterschied der beiden Acylgruppen ist aus dem Verhalten der Acetyl- und Trifluoracetyl-aminosäuren bei Elektronenstoß bekannt ⁷⁾. Auf ähnlichem Wege können auch die "Amin"-Ionen der übrigen Aminosäurereste des Peptids entstehen. Das Massenspektrum eines N-Acetylpeptids besitzt daher intensive peaks bei den MZ der "Amin"-Ionen aller im Peptid enthaltenen Aminosäuren. So können in FIG. 1 die peaks der MZ 44, 72 und 86 dem Alanin, Valin und Leucin zugeordnet werden. Im Massenspektrum eines N-Trifluoracetyl-peptids fehlt dagegen das "Amin"-Ion der N-terminalen Aminosäure; in FIG. 2 beobachtet man große peaks nur bei den MZ 72 und 86. Die im Peptid enthaltenen Aminosäuren können so aus dem Massenspektrum seines Acylderivats leicht ermittelt werden.

Die charakteristischen Ionen im oberen Massenbereich lassen sich durch Spaltungen der Bindungen zu beiden Seiten der Carbonylgruppen der Peptidbindungen erklären, wie es in den Formeln der FIG. 1 und 2 schematisch angedeutet ist. Diese Spaltungen sind aus den Massenspektren der Trifluoracetyl-peptid-methyl-ester bekannt. Mit ihrer Hilfe kann die Aminosäuresequenz des Peptids bestimmt werden. Zusätzlich kön-

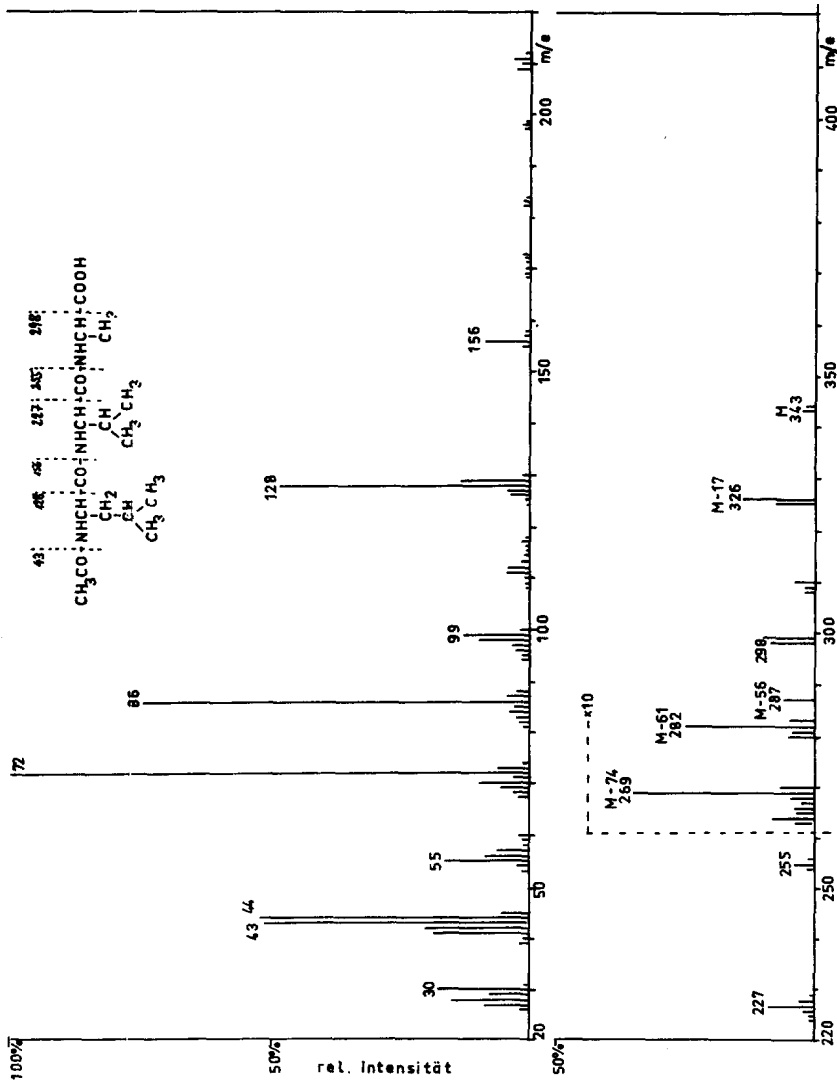


FIG.1. Massenspektrum des N-Acetyl-leucyl-valyl-alanins bei 70 eV

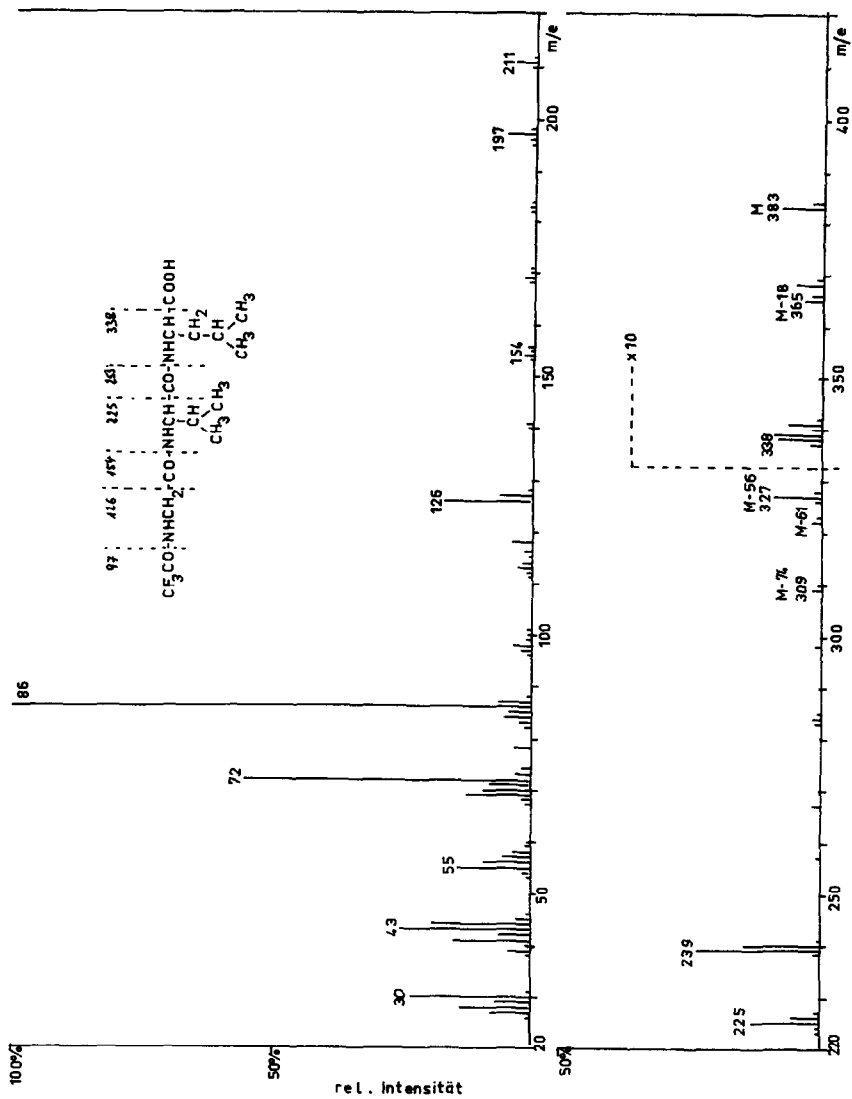


FIG.2. Massenspektrum des N-Trifluoroacetyl-glycyl-valyl-leucins bei 70 eV

nen jedoch Ionen auftreten, deren Entstehung durch Eliminierung der Seitenketten oder Spaltungen in diesen Seitenketten bedingt wird. Die Bildung analoger, für die einzelnen Aminosäuren typischer Ionen ist aus den Massenspektren der Aminosäurederivate bekannt (7,8,9,10). Beispiele für diese Ionen in den abgebildeten Massenspektren sind die Ionen M-56^{*}) und M-74. Diese für Leucin und Isoleucin typischen Ionen entstehen durch Eliminierung der Seitenkette als Buten und zusätzliche Abspaltung eines H₂O-Moleküls. Analog wird das Ion MZ 99 (FIG.1) aus dem N-terminalen Acetyl-leucyl-Rest gebildet.

Eine systematische Untersuchung der Massenspektren von acylierten Peptiden (6), die wir zur Zeit noch fortführen, hat gezeigt, daß die Bildung solcher Ionen nicht nur von der Art der einzelnen Aminosäurereste abhängt, sondern auch von ihrer Stellung in der Peptidkette. So sind die für den einzelnen Aminosäurerest typischen Spaltreaktionen besonders ausgeprägt, wenn die betreffende Aminosäure C-terminal vorliegt.

Dem Bundesminister für Wissenschaftliche Forschung danken wir für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

LITERATUR

1. C.O. Andersson, Acta Chem.Scand., 12, 1353 (1958)
E. Stenhagen, Z.anal.Chem., 181, 462 (1961)
2. K. Biemann, F. Gapp, J. Seibl, J.Amer.chem.Soc., 81, 2274 (1959)
3. K. Heyns, H. F. Grützmaker, Angew.Chem., 74, 387 (1962)
4. R. I. Reed, J.Chem.Soc., 1958, 3432
5. F. Weygand, A. Prox, W. König, H. H. Fessel, Angew.Chem., 75, 724 (1963)
6. K. Heyns, H. F. Grützmaker, Liebigs Ann.Chem., im Druck
7. K. Heyns, H. F. Grützmaker, Liebigs Ann.Chem., im Druck
8. K. Heyns, H. F. Grützmaker, Z.Naturforsch., 16b, 293 (1961)
9. K. Biemann, J. Seibl, F. Gapp, J.Amer.chem.Soc., 83, 3795 (1961)
10. C.O. Andersson, R. Ryhage, E. Stenhagen, Arkiv.Kemi, 19, 417 (1962)