

Massenspektrometrische Untersuchungen, IV<sup>1)</sup>MASSENSPEKTREN VON *N*-ACETYL-PEPTIDEN EINFACHER  
MONOAMINOCARBONSÄUREN

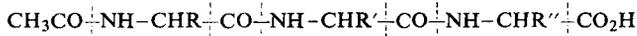
VON KURT HEYNS und HANS-FRIEDRICH GRÜTZMACHER

*H. Brockmann zum 60. Geburtstag freundschaftlich gewidmet*

Aus dem Chemischen Staatsinstitut der Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie

Eingegangen am 18. April 1963

Die Massenspektren von 14 *N*-Acetyl-dipeptiden und *N*-Acetyl-tripeptiden sowie eines *N*-Acetyl-pentapeptids und eines cyclischen Hexapeptids werden angegeben. Die charakteristischen Ionen entstehen durch Spaltung der Bindungen zwischen  $\alpha$ -C-Atom und Carboxylgruppe sowie durch Spaltung der Peptidbindungen:



Mit Hilfe dieser Ionen läßt sich die Aminosäuresequenz eines Peptids aus dem Massenspektrum seines *N*-Acetyl-Derivats ablesen. Es wird untersucht, inwieweit die Unterschiede in den Zerfallsmechanismen der Molekül-Ionen der *N*-Acetyl-aminosäuren beim Einbau dieser Aminosäuren in das Peptid erhalten bleiben. Diese Unterschiede sind nur dann von Bedeutung, wenn die betreffende Aminosäure im Peptid C-endständig vorliegt. — Prolin und Hydroxyprolin im Peptid verursachen das Auftreten zusätzlicher Ionen, die eine Analyse des Massenspektrums erschweren.

Zur Umwandlung in für Massenspektrometrie geeignete Derivate ist die Reduktion von Peptiden mit  $\text{LiAlH}_4$  zu den entsprechenden Aminoalkoholen<sup>2)</sup> oder ihre Überführung in Trifluoracetyl-peptidmethylester<sup>3)</sup> vorgeschlagen worden. Durch Fortentwicklung der von REED<sup>4)</sup> vorgeschlagenen Methode des direkten Einlasses organischer Substanzen in das Massenspektrometer wurde auch die Analyse schwer flüchtiger Substanzen möglich<sup>5)</sup>. Wir haben daher *N*-acetylierte Peptide untersucht, mit dem Ziel, eine massenspektrometrische Sequenzanalyse zu erreichen. Auf Grund der Erfahrungen mit Aminosäuren<sup>1)</sup> haben wir zuerst die Massenspektren von Peptiden untersucht, die nur Monoaminomonocarbonsäuren enthalten.

1) III. Mitteilung: K. HEYNS und H.-F. GRÜTZMACHER, Liebigs Ann. Chem. **667**, 194 (1963).

2) K. BIEMANN, F. GAPP und J. SEIBL, J. Amer. chem. Soc. **81**, 2274 (1959).

3) E. STENHAGEN, Z. analyt. Chem. **181**, 462 (1961).

4) P. DE MAYO und R. I. REED, Chem. and Ind. **1956**, 1481.

5) K. HEYNS und H.-F. GRÜTZMACHER, Angew. Chem. **74**, 387 (1962).

Die Massenspektren freier Peptide, auf die es zwei kurze Hinweise<sup>6,7)</sup> gibt, sind für eine Sequenzanalyse wenig geeignet. Die Aminosäure-Bausteine können zwar leicht identifiziert werden; wegen wenig intensiver Peaks ist es jedoch schwierig, die endständigen Aminosäuren einwandfrei zu bestimmen. Außerdem werden freie Peptide in der heißen Ionenquelle thermisch verändert. Man beobachtet z. B. bei der Aufnahme von H-Ala-Gly-OH\*) einen Anstieg der Peaks bei MZ 128 und 85 relativ zum übrigen Spektrum (Abb. 1). Dies beruht auf thermischer Wasserabspaltung

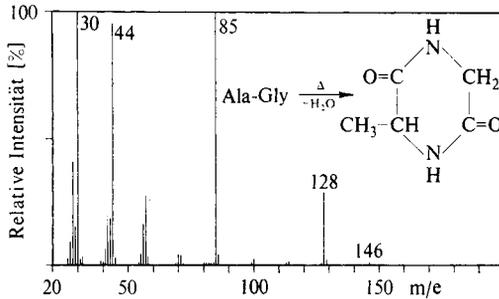
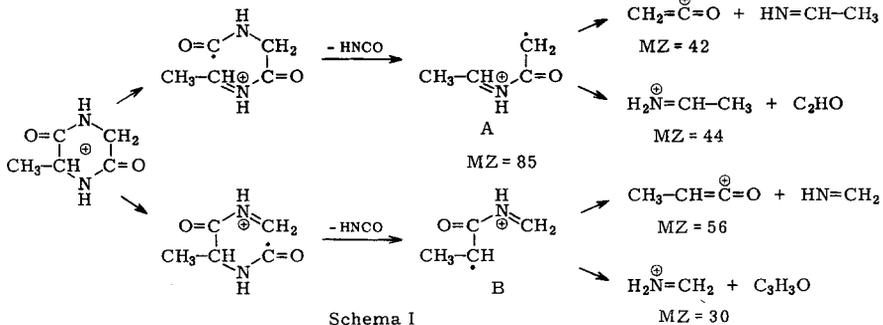


Abbildung 1. Massenspektrum von H-Ala-Gly-OH\*\*)

zum Dioxopiperazin. Das Dioxopiperazin ist flüchtiger als das Dipeptid, so daß man vorwiegend das Massenspektrum des ersteren erhält. Das aus H-Ala-Gly-OH entstehende 3-Methyl-dioxopiperazin gibt ein stabiles Molekül-Ion der Masse 128. Dieses verliert, in einer bei cyclischen Amiden bekannten Reaktion<sup>8)</sup>, ein HNC=O



Schema I

\*) Die Aminosäurereste in Peptiden werden in der üblichen abgekürzten Schreibweise angegeben. M = Molekulargewicht, MZ = Massenzahl, ME = Masseneinheiten.

\*\*\*) In den Abbildungen 1–8 ist auf der Ordinate die relative Intensität in % des häufigsten Ions aufgetragen.

6) K. BIEMANN, *Mass Spectrometry, Organic Chemical Applications*, McGraw-Hill-Book Comp., Inc., London 1962, S. 295.

7) G. SPITELLER, Vortrag am 25. 9. 1962 im Coll. des Laboratoriums voor Organische Scheikunde der Universität Amsterdam.

8) G. SPITELLER und M. SPITELLER-FRIEDMANN, *Mh. Chem.* **93**, 632 (1962).

Molekül unter Bildung eines Ions der Masse 85. Je nachdem, an welcher der beiden Peptidbindungen das  $\text{HNCO}$  abgespalten wurde, besitzt dieses Ion die Struktur A oder B (Schema I). Aus A bildet sich durch weiteren Zerfall das „Amin“-Fragment-Ion des Alanins mit der Masse 44, aus B analog dasjenige des Glycins mit der Masse 30. In geringem Maße verbleibt die positive Ladung auch bei den Keten-Fragmenten.

#### CYCLOPEPTIDE

Cyclische Peptide geben wegen ihrer thermischen Stabilität gut reproduzierbare Massenspektren. Ihr Zerfall im Massenspektrometer gleicht dem der Dioxopiperazine. Abbildung 2 gibt das Massenspektrum des cyclischen Hexapeptids Cyclo-(Gly-Ala-Phe)<sub>2</sub> wieder. Der intensive Peak des Molekül-Ions bei 550 ist typisch für cyclische Verbindungen. Die „Amin“-Fragment-Ionen der am Peptid beteiligten Aminosäuren

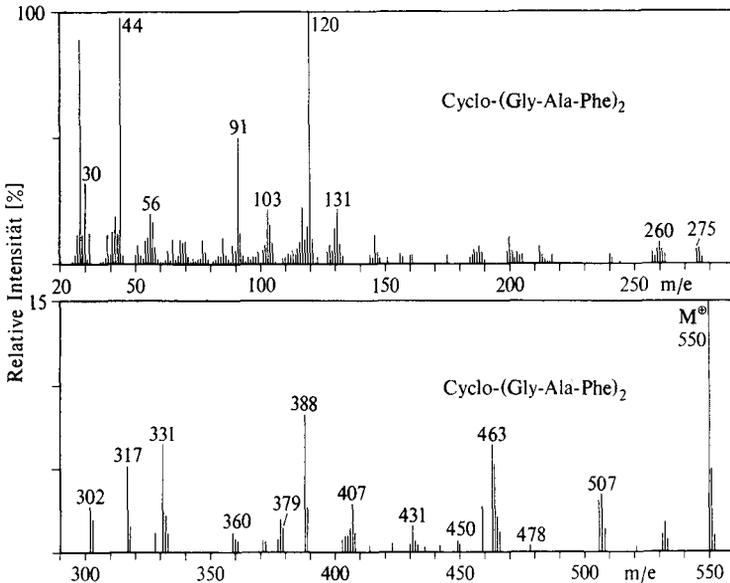
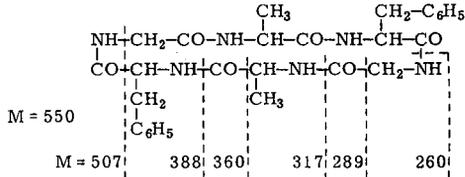


Abbildung 2. Massenspektrum von Cyclo-(Gly-Ala-Phe)<sub>2</sub>

mit den Massen 30 (Glycin), 44 (Alanin) und 120 (Phenylalanin) beherrschen den unteren Massenbereich des Spektrums. Die Ionen der Massen 91, 103 und 131 sind typisch für Phenylalaninpeptide. M und die im Peptid enthaltenen Aminosäuren können daher leicht bestimmt werden.

Die Ionen im oberen Massenbereich lassen sich deuten, wenn man als 1. Schritt wieder die Eliminierung eines  $\text{HNCO}$ -Moleküls aus dem Molekül-Ion annimmt. Die gebildeten Ionen der Masse 507 verlieren die einzelnen Aminosäurereste durch aufeinanderfolgende Abspaltungen von  $\text{R}-\text{CH}=\text{NH}$  und  $\text{CO}$ . Dabei kann die

Eliminierung von HNCO in diesem Fall an drei verschiedenen Stellen des Molekül-Ions erfolgen. So führt eine primäre Abspaltung von HNCO an der C-ständigen Peptidbindung des Phenylalanins zu folgenden Ionen:

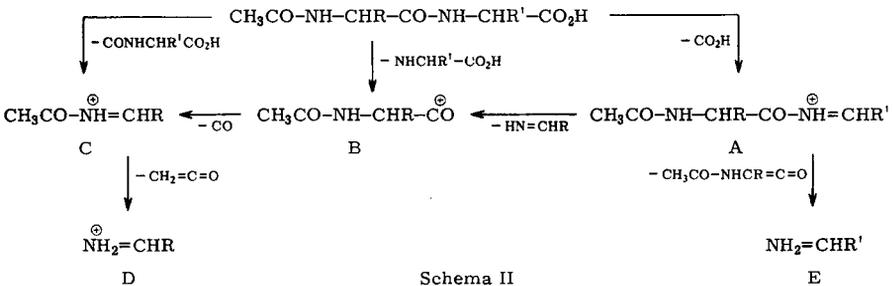


Wird an der C-ständigen Peptidbindung des Alanins HNCO abgespalten, so werden analog Ionen der Massen 507, 464, 436, 407, 379 und 260 gebildet; bei Abspaltung an der Peptidbindung des Glycins Ionen der Massen 507, 478, 450, 331, 303 und 260. Durch diesen schrittweisen Abbau der Aminosäurereste kann die Aminosäuresequenz bestimmt werden. Ein symmetrisches Cyclohexapeptid, wie das hier untersuchte Cyclo-(Gly-Ala-Phe)<sub>2</sub>, kann jedoch von seinem Isomeren, Cyclo-(Ala-Gly-Phe)<sub>2</sub>, an Hand des Massenspektrums nicht unterschieden werden.

#### DIPEPTIDE

Diese wurden zunächst mit Acetanhydrid in Eisessig in ihre *N*-Acetyl-Derivate umgewandelt.

Bei *N*-Acetyl-aminosäuren entsteht durch Abspaltung der Carboxylgruppe ein „Acetylamin“-Fragment-Ion, das seinerseits unter Eliminierung der Acetylgruppe als  $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$  in das „Amin“-Fragment-Ion der Aminosäure übergeht<sup>1)</sup>. Danach sind bei einem *N*-Acetyl-dipeptid folgende Ionen zu erwarten:

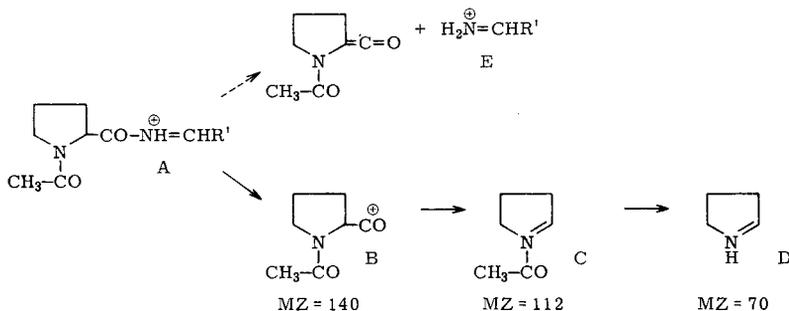


Ein Vergleich mit den in den Abbildungen 3–5 wiedergegebenen Massenspektren einiger *N*-Acetyl-dipeptide zeigt, daß die charakteristischen Peaks im allgemeinen durch Schema II gedeutet werden können. In jedem Fall kann die *N*-endständige Aminosäure durch ihr „Acetylamin“-Fragment-Ion leicht identifiziert werden.

Bei einigen Dipeptiden treten jedoch Besonderheiten auf. Ist die C-endständige Aminosäure Glycin (Abb. 3c, 4a, 5b), so ist die Intensität des durch Abspaltung von

CO<sub>2</sub>H gebildeten Ions A gering. Das Ion CH<sub>2</sub>=N<sup>⊕</sup>H<sub>2</sub>, das aus dem C-endständigen Glycin entsteht, ist im Gegensatz zu den entsprechenden Ionen der übrigen Aminosäuren nicht durch einen induktiven Effekt stabilisiert. Das Molekül-Ion zerfällt daher vorwiegend unter Bildung des Ions C (Schema II). Der Glycinrest des Peptids geht dabei als neutrales Bruchstück für die Messung verloren und die Intensität des für Glycin typischen „Amin“-Fragment-Ions mit der Masse 30 ist gering. Dies erkennt man besonders gut an dem Massenspektrum von Ac-Phe-Gly-OH (Abb. 5b), weil bei den übrigen Peptiden die Masse 30 auch von Ionen belegt wird, die durch Zerfall von Leucin- und Isoleucinresten gebildet werden. Ist Glycin im Peptid dagegen N-endständig (Abb. 3a, 3b, 5a), so besitzen die für N-endständiges Glycin typischen Peaks bei 72 und 30 die erwartete Größe. Diese Ionen entstehen jetzt nicht mehr direkt aus dem Molekül-Ion, sondern vorwiegend durch die Reaktionsfolge M → A → B → C → D entsprechend Schema II. Analog verhalten sich höhere Peptide, die Glycin enthalten. Ist Glycin in solchen Peptiden nicht N-endständig, so macht es sich mehr durch eine „Lücke“ im Massenspektrum bemerkbar als durch charakteristische Peaks.

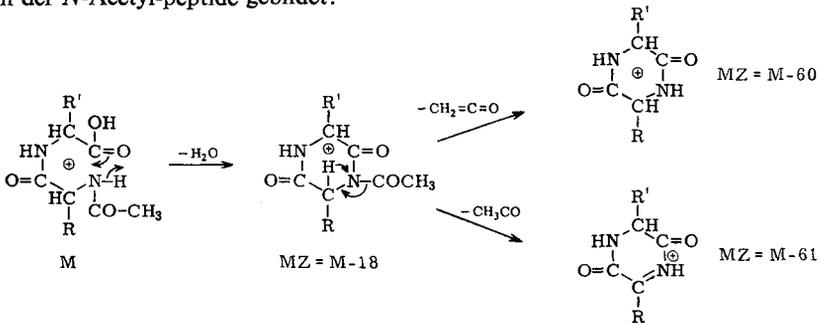
Eine Sonderstellung nehmen auch Prolin und Hydroxyprolin ein, bei denen stabile „Imin“-Fragment-Ionen der Massen 70 bzw. 86 mit großer Intensität auftreten<sup>1)</sup>. Bei Prolinpeptiden treten diese Ionen auch mit hoher Intensität auf. Der Prolinrest wird schwer als Keten-Bruchstück eliminiert, weil ein Molekül mit exocyclischer Doppelbindung entstehen müßte:



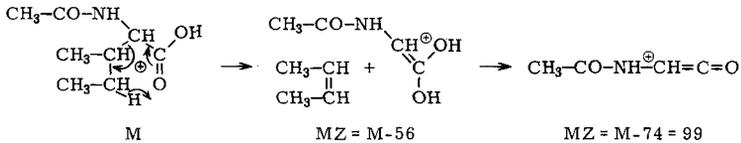
Ionen der Struktur A (vgl. Schema II) mit N-endständigem Prolin werden daher bevorzugt zu den Ionen B, C und D und nicht zum Ion E abgebaut. Das „Amin“-Fragment-Ion E der auf das Prolin folgenden Aminosäure tritt daher nur mit sehr geringer Intensität auf. Beispiele hierfür sind die Massenspektren von Ac-Pro-Leu-OH (Abb. 5c) und Ac-Pro-Ala-Gly-NH<sub>2</sub> (Abb. 7a).

Neben den Fragmenten, die das Schema II erfaßt, treten bei N-Acetyl-dipeptiden mit geringerer Intensität Ionen bei M-17, M-18, M-60 und M-61 auf. Die Massen dieser Ionen stimmen mit den Massen der N-Acetyl-dioxopiperazine bzw. der Dioxo-

piperazine überein. Sie treten auch in den Spektren acetylierter Tripeptide und höherer Peptide auf (siehe z. B. Abb. 7b), bei denen eine thermische Cyclisierung unwahrscheinlich ist. Vermutlich werden diese Ionen durch Elektronenstoß aus dem Molekül-Ion der *N*-Acetyl-peptide gebildet:



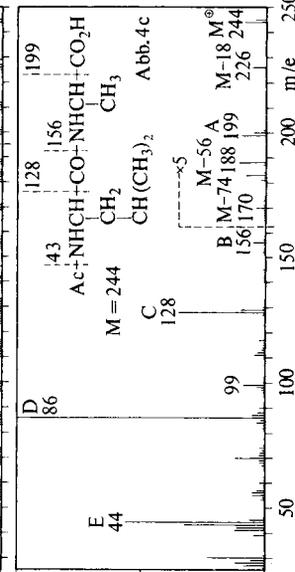
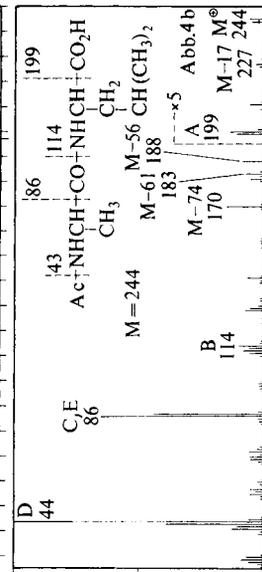
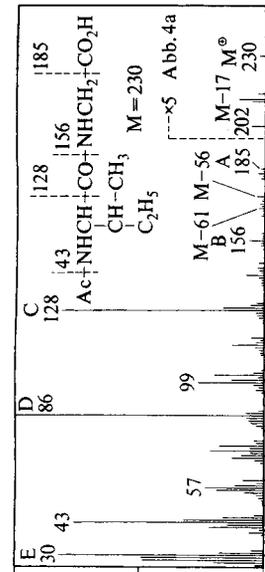
In den Massenspektren der *N*-Acetyl-aminosäuren beobachtet man Ionen, deren Entstehung durch die Aminosäureseitenkette bestimmt wird; so wird das Haupt-Ion im Spektrum des *N*-Acetyl-isoleucins mit der Masse 99 durch eine Umlagerung des Molekül-Ions gebildet, bei der unter Wanderung eines H-Atoms Buten abgespalten wird. Anschließend wird aus dem Ion Wasser abgespalten<sup>1)</sup>:



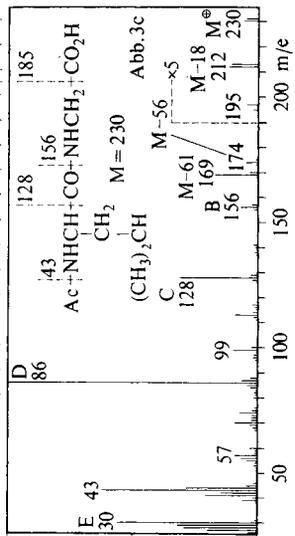
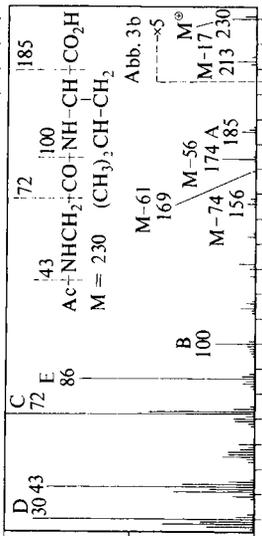
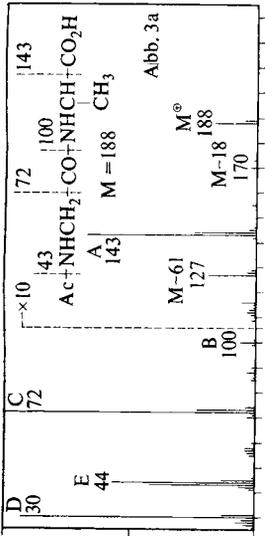
Das gleiche Ion der Masse 99 kann mit wesentlich geringerer Intensität auch aus *N*-Acetyl-leucin entstehen. Beide Isomere lassen sich daher gut unterscheiden.

Entsprechende Ionen werden auch bei acetylierten Leucin- und Isoleucin-peptiden gefunden. Bei *N*-endständigem Leucin zeigen alle einen Peak von ca. 10% relativer Intensität bei  $\text{MZ} = 99$  (Abb. 3c, 4c, 6a). Im Massenspektrum von Ac-Ileu-Gly-OH (Abb. 4a) ist dieser Peak im Vergleich zu Ac-Leu-Gly-OH (Abb. 3c) deutlich erhöht. Die Unterschiede zwischen den Isomeren sind jedoch bei weitem nicht so groß wie bei den *N*-Acetyl-leucinen. Gleiches gilt für Peptide, die Leucin oder Isoleucin in der Mitte der Peptidkette enthalten. Eine Entscheidung, ob ein Peptid Leucin oder Isoleucin enthält, ist daher an Hand des Massenspektrums schwer zu treffen. Die geschilderten Unterschiede sind besser ausgeprägt, wenn Leucin oder Isoleucin im Peptid C-endständig vorliegen. Offensichtlich wird die Umlagerung durch eine freie Carboxylgruppe begünstigt. So sind diese Ionen charakteristisch für *N*-Acetyl-isoleucin, beim *N*-Acetyl-isoleucinmethylester werden sie jedoch nicht beobachtet<sup>9)</sup>.

<sup>9)</sup> C. O. ANDERSON, R. RYHAGE und E. STENHAGEN, Ark. Kemi **19**, 417 (1962).

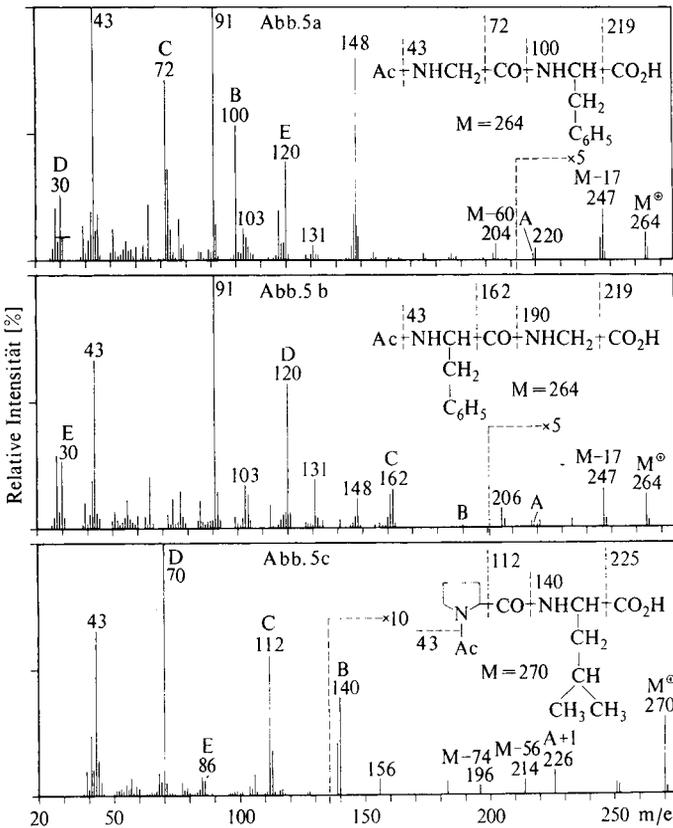


Abbildungen 4 a - c Massenspektren von Ac-Ileu-Gly-OH (Abb. 4a), Ac-Ala-Leu-OH (Abb. 4b) und Ac-Leu-Ala-OH (Abb. 4c)



Abbildungen 3 a - c Massenspektren von Ac-Gly-Ala-OH (Abb. 3a), Ac-Gly-Leu-OH (Abb. 3b) und Ac-Leu-Gly-OH (Abb. 3c)

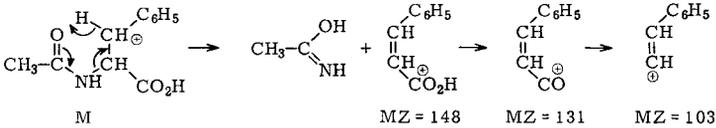
Bei C-endständigen Leucinen findet man diese Ionen bei M-56 (Eliminierung der Seitenkette) und M-74 (zusätzliche Abspaltung von Wasser). Diese Peaks sind bei Ac-Ala-Leu-OH (Abb. 4b) deutlich größer als bei Ac-Leu-Ala-OH (Abb. 4c). Bei C-endständigem Isoleucin ist der Peak bei M-74 charakteristisch größer als bei C-endständigem Leucin, so daß man in diesem Fall die Isomeren unterscheiden kann. Auch Valin kann seine Seitenkette als Propen eliminieren. C-endständiges Valin liefert daher einen ähnlich intensiven Peak bei der gleichen MZ wie C-endständiges Isoleucin. Eine Unterscheidung ist jedoch möglich mit Hilfe des Molekül-Ions und des durch Abspaltung der CO<sub>2</sub>H-Gruppe entstehenden Ions A.



Abbildungen 5 a - c Massenspektren von Ac-Gly-Phe-OH (Abb. 5a), Ac-Phe-Gly-OH (Abb. 5b) und Ac-Pro-Leu-OH (Abb. 5c)

Bei *N*-Acetyl-phenylalanin und *N*-Acetyl-tyrosin beobachtet man hohe Peaks bei MZ 91 und 107. Diese Ionen entstehen durch Abspaltung der Seitenketten<sup>1)</sup>. Die

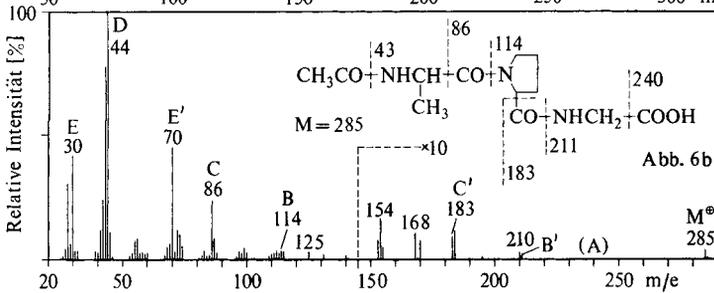
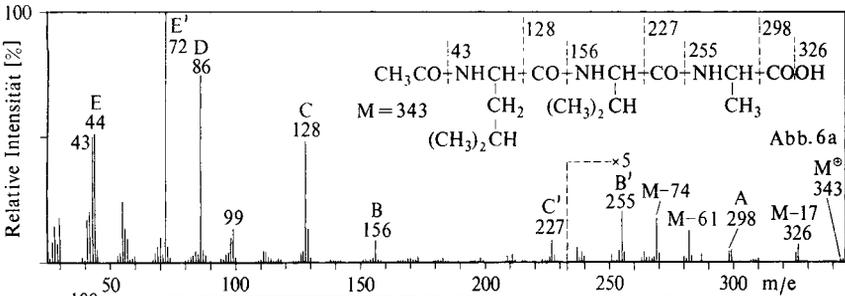
Bildung der „Seitenketten“-Fragment-Ionen ist hier begünstigt, da die Benzylseitenketten stabile Ionen mit Tropyliumstruktur bilden können<sup>10</sup>. Diese Ionen sind auch für Peptide des Phenylalanins und Tyrosins typisch. *N*-Acetyl-phenylalanin spaltet außerdem leicht Acetamid ab; die entstandenen Ionen der Massen 148, 131 und 103 leiten sich von der Zimtsäure ab:



Diese Eigenart des Phenylalanins bleibt auch in seinen Peptiden erhalten (Abb. 2, 5a, 5b). Wie bei Isoleucin sind aber auch bei Phenylalanin die charakteristischen Peaks nur dann stark, wenn Phenylalanin C-endständig vorliegt.

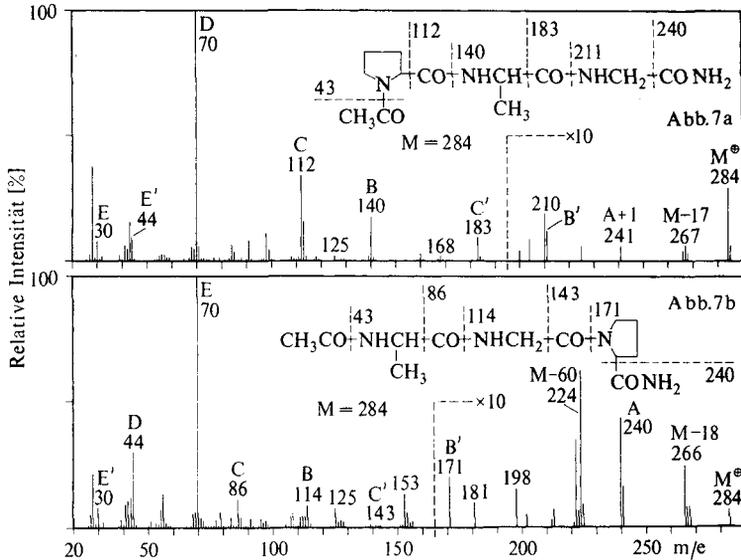
TRIPEPTIDE

Abbildung 6a gibt als Beispiel für ein Tripeptid das Massenspektrum von Ac-Leu-Val-Ala-OH wieder. Dieses Spektrum läßt sich in Analogie zu dem für Dipeptide entwickelten Schema II deuten. So sind die Ionen B, C und D (156, 128 und 86)



Abbildungen 6a - b Massenspektren von Ac-Leu-Val-Ala-OH (Abb. 6a) und Ac-Ala-Pro-Gly-OH (Abb. 6b)

<sup>10</sup> P. N. RYLANDER, S. MEYERSON und H. M. GRUBB, J. Amer. chem. Soc. 79, 842 (1957).



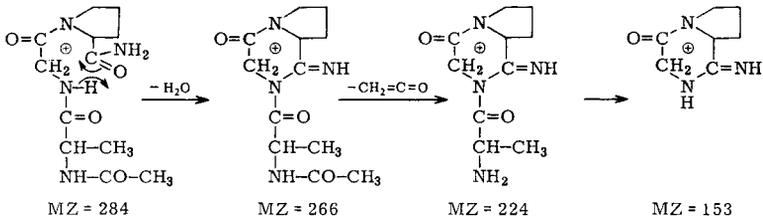
Abbildungen 7 a - b Massenspektren von  
Ac-Pro-Ala-Gly-NH<sub>2</sub> (Abb. 7a) und Ac-Ala-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> (Abb. 7b)

typisch für N-endständiges Leucin; die Ionen E und E' (44 bzw. 72) stellen die „Amin“-Fragmente der beiden übrigen Aminosäuren dar. Das Ion C' (227) entsteht analog dem Ion C durch Spaltung des Molekül-Ions am  $\alpha$ -C-Atom des Valylrestes, während das Ion B' (255) wie das Ion B durch Bruch der C-ständigen Peptidbindung des Valins gebildet wird. Das durch Abspaltung von COOH aus dem C-endständigen Alanin entstehende Ion A (298) tritt ebenfalls auf, zusätzlich noch ein Ion der Masse 299, das wahrscheinlich durch CO<sub>2</sub>-Abspaltung entsteht. Die Ionen M-56 und M-74 mit den Massen 287 bzw. 269 sind wieder typisch für Leucinpeptide.

Der Abbau des Molekül-Ions dieser einfachen N-Acetyl-peptide entspricht dem Zerfall des Ions, das durch Eliminierung von HNCO aus dem Molekül-Ion cyclischer Peptide gebildet wird. Man erhält jedoch übersichtlichere Massenspektren als bei cyclischen Peptiden, weil die N-Acetyl-peptide ein offenkettiges Molekül-Ion bilden, dessen Zerfall schematisch mit der Abspaltung der C-endständigen Carboxylgruppe beginnt und schließlich zum „Acetylamin“-Ion der N-endständigen Aminosäure führt. Die *Aminosäuresequenz* eines einfachen Acetylpeptids läßt sich daher leicht aus seinem Massenspektrum ablesen: beginnend mit dem „Acetylamin“-Ion, ermittelt man die Massendifferenzen zwischen den charakteristischen Peaks und ordnet diese Massendifferenzen den einzelnen Aminosäureresten zu.

Die Struktur läßt sich nicht so einfach aus dem Massenspektrum ablesen, wenn Prolin in die Peptidkette eingebaut ist. Die Abbildungen 6b, 7a und 7b zeigen die

Massenspektren dreier *N*-Acetyl-tripeptide aus Glycin, Alanin und Prolin, in denen der Prolinrest die drei möglichen Stellungen (mittelständig, *N*-endständig und *C*-endständig) einnimmt. Der mittelständige Prolinrest im Ac-Ala-Pro-Gly-OH scheint auf den ersten Blick das Massenspektrum wenig zu beeinflussen, da die Ionen B, C, C', D, E und E' normale Intensität besitzen und das Fehlen eines Ions A durch den *C*-endständigen Glycinrest erklärt werden kann. Es fehlt jedoch auch ein Ion B', das durch Spaltung der *C*-endständigen Peptidbindung des Prolins entstehen und eine gut meßbare Intensität besitzen könnte. Stattdessen beobachtet man Peaks bei 210, 168 und 154. Diese Massen lassen sich erklären, wenn man eine Bildung von Ionen mit Dioxopiperazinstruktur annimmt. So erklärt die Bildung von *N*-Acetyl-Ala-Pro-anhydrid den Peak bei 210. Ein Ion dieser Struktur wird leicht die Acetylgruppe als Keten eliminieren und in das Ion der Masse 168 übergehen. Der Ringschluß in anderer Richtung, zum Pro-Gly-anhydrid, führt zum Ion der Masse 154. Ionen der Masse 210 und 168 treten auch bei Ac-Pro-Ala-Gly-NH<sub>2</sub> auf. Ein Ion mit der Struktur des Pro-Gly-anhydrids kann naturgemäß von dieser Verbindung nicht gebildet werden. Auffällig sind Ionen dieser Art im Massenspektrum des Ac-Ala-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> mit *C*-endständigem Prolin. Die Peaks bei 266, 224 und 153 lassen sich durch folgenden Abbau des Molekül-Ions erklären:



#### PENTAPEPTID

Abbildung 8 zeigt das Massenspektrum eines *N*-Acetyl-pentapeptids. Die hohen Peaks bei 70, 112 und 140 zeigen einen *N*-endständigen Prolinrest an. Typisch für Prolin ist auch der Peak bei 98 ( $m/e$  70 + CO), während die Ionen der Masse 43 von der Acetylgruppe gebildet werden. Auffallend hohe Peaks treten bei 30, 68, 72, 84 und 86 auf. Die MZ 30 entspricht den für Glycin typischen „Amin“-Fragment-Ionen. Die MZ 72 wird durch die „Amin“-Fragment-Ionen des Valins belegt. Ionen der Masse 86 werden sowohl von den beiden Leucinen als auch von Hydroxyprolin gebildet. Das „Amin“-Fragment-Ion des Hydroxyprolins spaltet leicht H<sub>2</sub>O ab, so daß auch ein Ion der Masse 68 gebildet wird. Aus dem Spektrum kann man daher schließen, daß das untersuchte Peptid einen *N*-endständigen Prolinrest besitzt und außerdem die Aminosäuren Glycin, Valin, Hydroxyprolin und u. U. noch Leucin oder Isoleucin enthält.

Der Molekülpeak des *N*-Acetyl-pentapeptids bei 539 ( $\sim 0.01$  relative Prozent) kann nicht mit Sicherheit identifiziert werden. Dagegen fällt ein Peak bei 494 sofort auf. Dieses Ion entsteht durch Abspaltung von  $\text{CO}_2\text{H}$  aus dem Molekül-Ion. Aus der Masse dieses Ions ergibt sich die Zusammensetzung des Peptids zu Ac-Pro- (Gly, Val, Hypro<sub>2</sub>) oder Ac-Pro-(Gly, Val, Leu, Hypro).

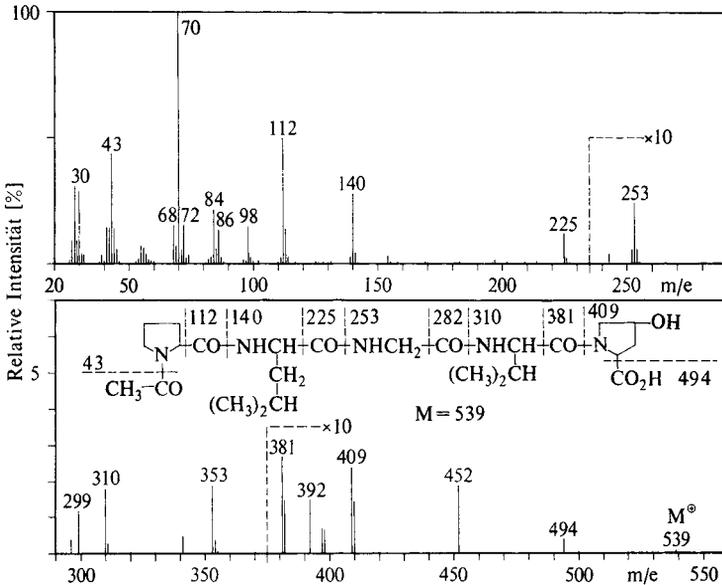


Abbildung 8. Massenspektrum von Ac-Pro-Leu-Gly-Val-Hypro-OH

Zur Bestimmung der *Aminosäuresequenz* ermittelt man die Massendifferenzen zwischen den stärkeren Peaks und versucht, sie den einzelnen Aminosäureresten zuzuordnen. Man findet zwischen dem Peak des Acetylprolylrestes (140) und dem nächsten stärkeren Peak (225) eine Differenz von 85 ME und zum übernächsten Peak eine Differenz von 113 (= 85 + 28) ME. Diese beiden Peaks zeigen, daß auf das N-endständige Prolin Leucin oder Hydroxyprolin folgt. Hydroxyprolin müßte wegen der leichten Wasserabspaltung zusätzlich zwei um 18 ME kleinere Peaks unterhalb der Massen 225 und 253 geben. Da diese Peaks nicht auftreten, handelt es sich um Leucin. Zwischen dem Ion des Acetyl-prolyl-leucyl-Restmoleküls und dem nächsten Ion mit der Masse 299 besteht eine Differenz von 46 ME. Diese Differenz läßt sich keiner Aminosäure zuordnen; außerdem fehlt ein Peak bei  $299 + 28 = 327$ . Das fragliche Ion wird daher nicht durch eine einfache Spaltung des Peptids gebildet. Dagegen läßt sich die Differenz von 57 ME zum nächsten Ion mit der Masse 310 durch einen

Glycylrest erklären. Für Glycin als nächste Aminosäure spricht auch das Fehlen eines Peaks bei 282 („Glycin-Lücke“ des Massenspektrums). Damit ergibt sich die Teilstruktur Ac-Pro-Leu-Gly. Die Differenz von 43 bzw. 71 ME vom Peak bei 310 zu den beiden nächsten (353, 381) würde für Alanin als vierte Aminosäure im Peptid sprechen. Dafür ist jedoch die Intensität des „Amin“-Fragment-Ions des Alanins mit der Masse 44 zu gering. Der größte Teil des Peaks bei 44 stammt, ebenso wie die Ionen der Massen 28 und 32, von Luftresten in der Ionenquelle. Dagegen spricht die Differenz von 71 und 99 ME zu den Peaks bei 381 und 409 für Valin als die auf Glycin folgende Aminosäure. Für die fehlenden 85 ME bis zum Ion der Masse 494 bleibt dann nur noch Hydroxyprolin übrig, so daß sich als Struktur des Peptids *Ac-Pro-Leu-Gly-Val-Hypro-OH* ergibt. Die Peaks bei 299, 353, 392 und 452 lassen sich nicht eindeutig zuordnen; sie müssen durch ähnliche Umlagerungen entstehen, wie sie bei den Prolin enthaltenden Tripeptiden diskutiert worden sind.

Massenspektren von acetylierten Peptiden, die mehr als 5 Aminosäuren enthalten, sind noch nicht untersucht worden, da der normale Meßbereich nur bis zur Masse 500 reichte. Wir hoffen jedoch, die Messungen nach einem Umbau des Massenspektrometers auf höhere Peptide ausdehnen zu können.

Herrn Prof. Dr. H. BROCKMANN sind wir für die Überlassung einer Probe von Cyclo-(Gly-Ala-Phe)<sub>2</sub> zu Dank verpflichtet. Dem BUNDESMINISTER FÜR WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG danken wir für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die *Dipeptide* wurden aus Carbobenzoxyaminosäuren und Aminosäurebenzylestern mit Hilfe von Chlorameisensäureäthylester in Essigester nach dem gemischten Anhydrid-Verfahren hergestellt. Die *Tripeptide* wurden aus Carbobenzoxyaminosäuren und Aminosäure-*p*-nitrophenylestern nach dem gemischten Anhydrid-Verfahren und Umsetzen der entstandenen Dipeptid-*p*-nitrophenylester mit Aminosäurebenzylestern synthetisiert. *H-Pro-Leu-Gly-Val-Hypro-OH* wurde aus Cbo-Pro-Leu-OH und H-Gly-Val-Hypro-benzylester nach dem gemischten Anhydrid-Verfahren in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dargestellt. — Die Entfernung der Schutzgruppen erfolgte in allen Fällen durch katalytische Hydrierung mit Pd. — Acetyliert wurden die Peptide in Eisessig mit Acetanhydrid.

Die *Massenspektren* wurden mit einem ATLAS-CH<sub>4</sub>-Massenspektrometer unter Verwendung einer Vakuumschleuse und der Ionenquelle TO4 aufgenommen. Die Elektronenenergie betrug 70 eV. Zur Messung der Ionenströme wurde ein normaler FARADAY-Auffänger oder ein SEV-Auffänger verwendet. Die Aufnahmetechnik war die gleiche wie bei den *N*-Acetylaminosäuren<sup>1)</sup>.