

Abb. 1. EPR-Spektrum verschiedener Fichtennadeln in der  $g = 2.005$ -Region. Die Proben wurden im Oktober und November 1984 entnommen. Die Signale werden mit einem Varian-E-Line-Spektrometer verbunden mit einem Bruker-Datensystem ER 140 durch Akkumulation von 50 Scans unter Verwendung eines FF-Locks gewonnen (5 mW Mikrowellenenergie; Modulation 1 G). Spektrum a): Baum 17 (S 0); Spektrum b): Baum 15 (S 3).

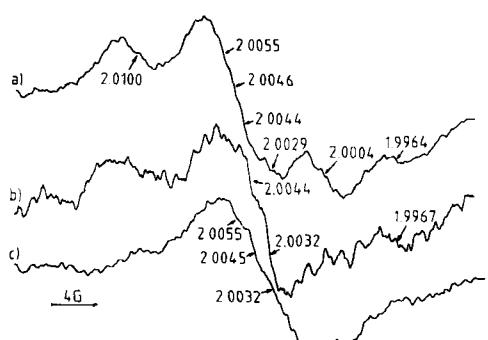


Abb. 2. EPR-Spektren verschiedener Fichtennadeln in der  $g = 2.005$ -Region (experimentelle Bedingungen wie in Abb. 1). Spektrum a): Baum ST (S 0); Spektrum b): Baum 16 (S 3); Spektrum c): Baum ST nach Einwirkung von  $\text{NO}_x$ . Die Konzentration von  $\text{NO}_x$  wurde bei diesem orientierenden Versuch so groß gewählt, um durch kurze Reaktionszeiten Alterungsprozesse zu unterdrücken.

Im wesentlichen besteht das Spektrum b) von Abbildung 1 nur noch aus einer Komponente bei  $g = 2.0035$ , die in a) völlig fehlt. Unterschiede des Standorts scheinen für die EPR-Signale der Nadeln ungeschädigter Bäume von untergeordneter Bedeutung zu sein, da jeweils die Spektren a) in den Abbildungen 1 und 2 praktisch gleich sind. Bei Nadeln geschädigter Bäume werden jedoch Unterschiede gefunden, die eine Differenzierung nach objektiven Kriterien und damit auch eine Früherkennung von Schäden ermöglichen könnten. So ist z. B. im Spektrum b) der Abbildung 2 deutlich noch das Signal bei  $g = 2.0044$  zu erkennen, obwohl die Komponente bei  $g = 2.0032$  die Hauptabsorption ist.

Werden Fichtennadeln ungeschädigter Bäume etwa 2 h unter Lichteinwirkung einer Atmosphäre, die  $10^{-4}$  mol/L  $\text{NO}_x$  enthält, ausgesetzt, so ändert sich das EPR-Spektrum maßgeblich (vgl. Spektrum c) in Abb. 2). Das Signal bei  $g = 2.0100$  ist praktisch vollständig verschwunden, und die  $g = 2.0055$ -Komponente hat an Intensität verloren, während die Absorptionen bei  $g < 2.0032$  an Bedeutung gewonnen haben; Spektrum c) ist also Spektrum b) ähnlicher als Spektrum a), das unmittelbar vor der Behandlung mit  $\text{NO}_x$  registriert wurde. Bei gleichzeitiger Einwirkung von  $\text{NO}_x$  und  $\text{SO}_2$  werden vergleichbare Spektren erhalten.

Die Befunde bedeuten nicht, daß nur  $\text{NO}_x$  und  $\text{SO}_2$  die Elektronentransportkette schädigen. Wahrscheinlich können auch andere Schadstoffe wie Ozon, Photooxidantien etc. ähnlich wirken. Untersuchungen von Fichtennadeln

aus Reinluftgebieten sollten weiteren Aufschluß geben. Einwirkung wäßriger Säuren, z. B. Schwefliger Säure ( $\text{pH} = 1$ ), führt auch nach Stunden zu keiner Veränderung des EPR-Signals, so daß die Schädigung der Nadeln offenbar bevorzugt über die Gasphase stattfindet.

Die EPR-Spektren, die wir von Fichtennadeln ungeschädigter Bäume registriert haben, entsprechen weitgehend den Signalen, die an isolierten Chloroplasten gefunden wurden und als „Signal II slow“ bezeichnet wurden<sup>[3]</sup>. Während die Chloroplasten-Signale stark vom Präparationsverfahren abhängen, werden bei der Untersuchung ganzer gesunder Fichtennadeln nur geringe Unterschiede bei den einzelnen Proben beobachtet. Jahreszeitliche Schwankungen dieser Signale sind nicht bekannt. Was die Zuordnung des Signals II (S II) innerhalb des pflanzlichen Photosyntheseprozesses angeht, so kann heute davon ausgegangen werden, daß es in engem Zusammenhang mit den Wasserspaltungsreaktionen des Photosystems 2 steht<sup>[3]</sup>. Wesentlich weniger ist über die chemische Struktur der für S II verantwortlichen Radikale bekannt. Während einige Autoren eine Beteiligung mehrerer Spezies annehmen<sup>[4]</sup>, neigen andere zu einheitlichen Redox-Systemen vom Typ der Plastosemichinone<sup>[5]</sup>, wobei die Struktur von S II auf nicht aufgelöste Hyperfeinstruktur zurückgeführt wird. Wir können uns dieser Ansicht nicht anschließen, weil die Differenzspektren (hell-dunkel) einen Anstieg der Signale bei  $g = 2.0055$  und  $g = 2.0046$  bei Belichtung anzeigen. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, daß  $\text{NO}_x$  und  $\text{SO}_2$ , die verschiedenen paramagnetischen Spezies, die für S II verantwortlich sind, unterschiedlich beeinflussen. Bei massiven Schädigungen, die nicht ausschließlich auf  $\text{NO}_x$  und  $\text{SO}_2$  zurückgeführt werden müssen, wird praktisch nur noch „ein“ Signal mit  $g = 2.0035$  beobachtet. Ähnliche Absorptionen wurden im Zusammenhang mit dem Photosystem 2 beschrieben<sup>[6]</sup>.

Eingegangen am 21. Dezember 1984,  
in veränderter Fassung am 1. März 1985 [Z 1118]

- [1] Vgl. z. B.: H. K. Lichtenhaller, C. Buschmann in C. Sybesma: *Advances in Photosynthesis Research*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Den Haag 1984; *Allg. Forstz.* 39 (1984) 12, zit. Lit.
  - [2] W. Schöpfer, J. Hradetzky, *Mitt. Forstl. Versuchs- und Forschungsanstalt Baden-Württemberg* 107 (1984) 31.
  - [3] A. J. Hoff, *Phys. Rep.* 54 (1979) 75, zit. Lit.
  - [4] N. N. Nishi, A. J. Hoff, J. Schmidt, J. H. Van der Waals, *Chem. Phys. Lett.* 58 (1978) 164.
  - [5] P. J. O'Malley, G. T. Babcock, *Biochim. Biophys. Acta* 765 (1984) 370; P. J. O'Malley, G. T. Babcock, R. Prince, *ibid.* 766 (1984) 283.
  - [6] F. K. Fong: *Light Reaction Path of Photosynthesis*, Springer, Berlin 1982.

## **Sequenzierung von kleinen Peptiden durch FAB-Massenspektrometrie – Informationserhöhung durch Derivatisierung**

Von Dieter Renner und Gerhard Spiteller\*

1981 erkannten Barber et al.<sup>[1]</sup>, daß stark polare Verbindungen wie Peptide, die sich wegen ihrer Nichtflüchtigkeit nicht durch Elektronenstoß-Massenspektrometrie untersuchen lassen, bei „Beschuß mit schnellen Atomen“ (fast atom bombardment, „FAB“) ionisiert werden. Die so erhaltenen FAB-Massenspektren zeigen bei Registrierung positiver bzw. negativer Ionen im wesentlichen die Massen von Ionen, die durch Protonierung bzw. Deprotonierung

[\*] Prof. Dr. G. Spiteller, Dipl.-Chem. D. Renner  
Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität  
Postfach 30 08, D-8580 Bayreuth

des Moleküls entstanden sind. Da man in den Spektren auch Bruchstücke findet, hat es nicht an Versuchen gefehlt, diese mit der Struktur zu korrelieren. An Modellpeptiden bekannter Struktur ließen sich solche Korrelationen durchführen, teilweise vor allem deshalb, weil man sich aus den Bruchstücken diejenigen heraussuchen konnte, die mit der Struktur in Beziehung zu setzen waren, und weil man zusätzlich vorhandene Ionen großzügig übersah. Ohne weitere Informationen war daher eine Strukturaufklärung durch Interpretation des FAB-Spektrums eines underivatisierten Peptides nur in Sonderfällen möglich<sup>[2-4]</sup>.

Bei Versuchen, die FAB-Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung kleinerer Peptide einzusetzen, mußten wir Peptidgemische ohne chromophore Gruppen durch HPLC trennen. Zur besseren Detektion derivatisierten wir die Peptide mit Dansylchlorid (Dns-Cl)<sup>[5]</sup>.

Im Gegensatz zu den FAB-Spektren<sup>[6]</sup> der underivatisierten Peptide, in denen die Ladung der Bruchstücke sowohl auf der C- als auch auf der N-terminalen Seite des Moleküls lokalisiert ist (Abb. 1), zeigen die Spektren der Dansyl-Derivate intensive und strukturspezifische Spaltstücke,

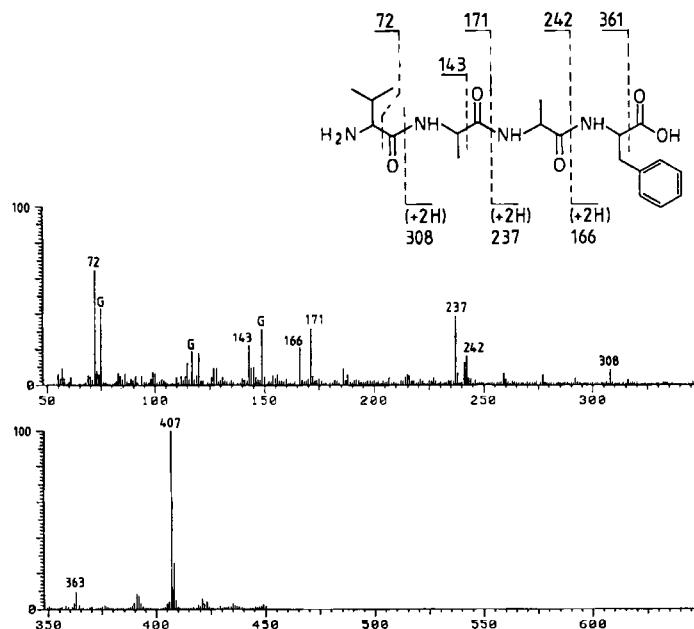


Abb. 1. FAB-Massenspektrum positiver Ionen von Val-Ala-Ala-Phe;  $m/z$  407 =  $[MH]^+$ ; die mit „G“ gekennzeichneten Signale stammen von der Matrixsubstanz (Glycerin).

die alle das derivatierte Aminoende des Moleküls betreffen und durch Spaltung an Peptidbindungen hervorgegangen sind (Abb. 2). Die Abbaureaktionen sind aus den Formeln erkennbar.

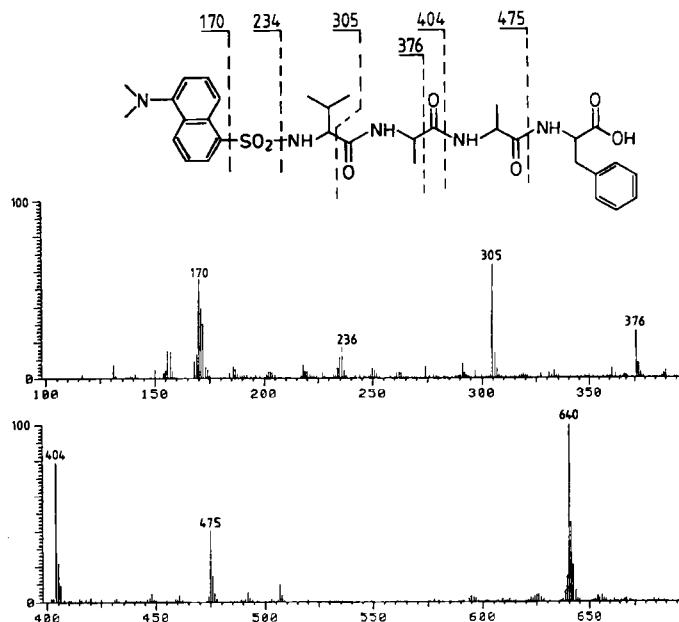


Abb. 2. FAB-Spektrum positiver Ionen von Dns-Val-Ala-Ala-Phe;  $m/z$  640 =  $[MH]^+$ .

Offensichtlich bewirkt die Einführung eines elektronenreichen und stabilen aromatischen Systems außer einer bevorzugten Ionisation auch eine erhöhte Neigung zur Bruchstückbildung. Die Derivatisierung von Peptiden bietet also nicht nur Vorteile für die Detektion bei Reinigungsschritten, sondern auch für eine sich anschließende massenspektrometrische Analyse, vor allem deshalb, weil strukturspezifische Spaltprodukte beim underivatisierten Peptid oft kaum erkennbar sind und somit eine Sequenzbestimmung nicht gelingt; dagegen läßt sich die Aminosäuresequenz bei den derivatisierten Peptiden eindeutig ableiten.

Wir setzten nun Peptide mit einem bromhaltigen aromatischen Sulfonylchlorid um, weil durch die beiden Isotope  $^{79}Br$  und  $^{81}Br$  eine eindeutige Markierung der Spaltstücke möglich ist. Die Markierung mit 2-Brom-5-(dimethylamino)-

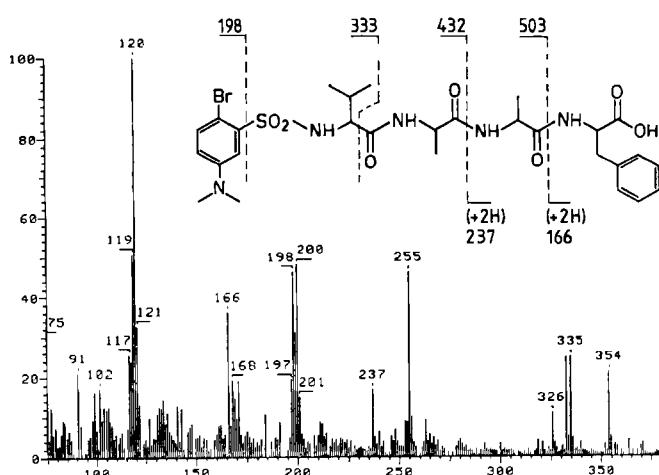
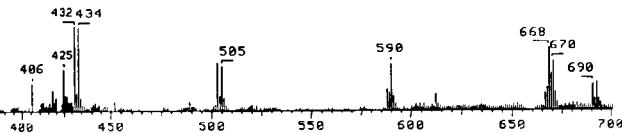


Abb. 3. FAB-Spektrum positiver Ionen von Bdbs-Val-Ala-Ala-Phe;  $m/z$  668 =  $[MH]^+$ ,  $m/z$  690 =  $[MNa]^+$ . Bromfreie Bruchstücke:  $m/z$  120, 255, 354, 425, 590.



no)benzolsulfonsäurechlorid (Bdbs-Cl)<sup>[5]</sup> ist günstig für Peptide aus maximal zehn Aminosäuren; bei größeren Peptiden wird das Isotopenmuster von Brom durch den hohen Gehalt an <sup>13</sup>C zu stark überlagert. In diesen Fällen sind Dansyl-Derivate vorzuziehen. Die bromhaltigen Verbindungen werden, wie bereits Sethi et al.<sup>[7]</sup> fanden, bei der Aufnahme der Spektren entbromiert, das heißt das Bromatom wird durch ein Wasserstoffatom ersetzt. Dadurch tritt eine weitere Reihe von Bruchstücken auf, deren Massen um 78 bzw. 80 ME kleiner sind als die der bromhaltigen (Abb. 3).

Bei Peptiden, deren Aminosäuren in den Seitenketten noch funktionelle Gruppen enthalten, ist die Auswertung der Spektren erschwert. In jedem der untersuchten Fälle erhielten wir aber durch die Derivatisierungen aussagekräftigere Spektren als von den freien Peptiden.

Eingegangen am 14. Januar,  
in veränderter Fassung am 4. Februar 1985 [Z 1133]

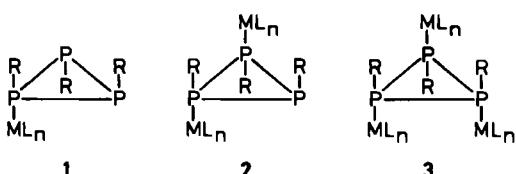
- [1] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1981, 325.
- [2] D. H. Williams, C. V. Bradley, S. Santikarn, G. Bojesen, *Biochem. J.* 201 (1982) 105.
- [3] M. E. Rose, M. C. Prescott, A. H. Wilby, I. J. Galbin, *Biomed. Mass Spectrom.* 11 (1984) 10.
- [4] K. B. Tomer, F. W. Crow, M. L. Gross, K. D. Kopple, *Anal. Chem.* 56 (1984) 880.
- [5] Arbeitsvorschrift für die Derivatisierung mit Dns-Cl oder Bdbs-Cl: 1 µmol Peptid wird in 60 µL 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> gelöst. Nach Zugabe von Dns-Cl oder Bdbs-Cl (Molverhältnis 1:3) in 50 mM Lösung in Aceton wird der Ansatz 1.5 h bei 40°C inkubiert. Anschließend wird nach Abdestillieren des Acetons mit 10proz. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> angesäuert. Das derivatisierte Peptid wird durch RP-HPLC isoliert; die Fraktionen werden mehrmals gesammelt, vereinigt und gefriergetrocknet. Zur FAB-massenspektrometrischen Untersuchung wird der Rückstand in wenig Methanol gelöst.
- [6] Finnigan MAT 8500 Massenspektrometer mit modifizierter Ionenquelle für FAB-MS; Xenon-Kanone von ION TECH LTD., Teddington (UK), Matrixsubstanz: Glycerin; in den FAB-Spektren wurde der Glycerinuntergrund subtrahiert.
- [7] S. K. Sethi, C. C. Nelson, J. A. McCloskey, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1977.

### Ein neuer Typ von Cyclotriphosphoran-Komplexen: Synthese und Struktur von [Ni<sub>2</sub>(µ-P<sub>3</sub>iPr<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CO)<sub>4</sub>]<sup>\*\*</sup>

Von Marianne Baudler\*, Franz Salzer, Josef Hahn und  
Eberhard Därr

Professor Günther Wilke zum 60. Geburtstag gewidmet

Komplexe mit Triorganocyclotriphosphoran-Liganden (PR)<sub>3</sub> sind bisher aus der Reihe 1<sup>[1]</sup>, 2<sup>[1]</sup> und 3<sup>[2]</sup> bekannt. Wir haben nun den ersten Zweikernkomplex des Typs

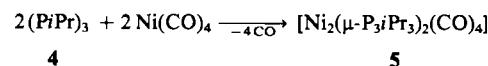


[\*] Prof. Dr. M. Baudler, Dr. F. Salzer, Dr. J. Hahn, Dr. E. Därr  
Institut für Anorganische Chemie der Universität  
Greinstraße 6, D-5000 Köln 41

[\*\*] Beiträge zur Chemie des Phosphors, 153. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. - 152. Mitteilung: M. Baudler, B. Makowka, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, im Druck.

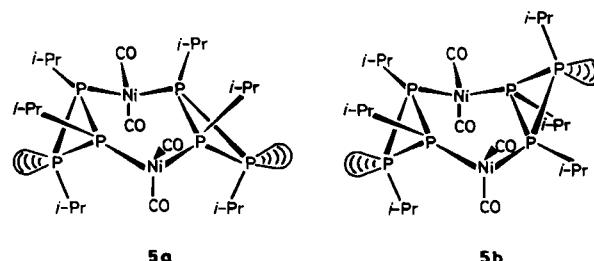
[L<sub>n</sub>M(µ-P<sub>3</sub>R<sub>3</sub>)<sub>2</sub>ML<sub>n</sub>] synthetisiert, in dem die P<sub>3</sub>-Ringe als Vierelektronenliganden mit den ML<sub>n</sub>-Resten zu einem sechsgliedrigen P<sub>4</sub>M<sub>2</sub>-Metallacyclus verknüpft sind.

Bei der Reaktion von Triisopropylcyclotriphosphan 4<sup>[3]</sup> mit Ni(CO)<sub>4</sub> (n-Pantan, 10°C → Raumtemperatur) entsteht Bis(µ-triisopropylcyclotriphosphan)-bis(dicarbonylnickel) 5 in praktisch quantitativer Ausbeute. Die Bildung von 5



verläuft über den Einkernkomplex [Ni(P<sub>3</sub>iPr<sub>3</sub>)(CO)<sub>3</sub>], der zu Beginn der Reaktion <sup>31</sup>P-NMR-spektroskopisch nachweisbar ist; mit fortschreitender Umsetzung treten weitere, nicht näher charakterisierte Zwischenprodukte auf.

5 entsteht als Gemisch der Isomere 5a und 5b, die sich in der Anordnung der Phosphor-Dreiringe zueinander unterscheiden. Während 5a als hellbeiger Feststoff (Zers. bei ca. 100°C) ausfällt (Isomerenreinheit > 99%), kann 5b im Filtrat (Isomerenengemisch ca. 1:1) durch schrittweise Kristallisation von 5a bei -30 bis -100°C auf ca. 90% angereichert werden. 5a lagert sich in Lösung (Tetrahydrofuran (THF), Benzol, n-Pantan) oberhalb von 0°C bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes (ca. 1:1) in 5b um.



Die Zusammensetzung der nur wenig luft- und feuchtigkeitsempfindlichen Verbindung 5 ist durch Elementaranalyse und kryoskopische Molekulargewichtsbestimmung gesichert. Im Massenspektrum (20 eV, 50°C) tritt kein Signal des Molekülions auf; charakteristische Fragmente sind M<sup>+</sup> - 2 CO, M<sup>+</sup> - 3 CO und M<sup>+</sup> - Ni(CO)<sub>4</sub>. Das IR-Spektrum von 5a (n-Pantan) zeigt zwei CO-Banden bei 2018 (s) und 1971 (m) cm<sup>-1</sup>.

Konstitutionsbeweisend für 5a,b sind die NMR-Daten<sup>[4]</sup>. Im <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-NMR-Spektrum beobachtet man für beide Isomere ein AA'A''A'''MM'-System in dem für koordinierte Cyclotriphosphane charakteristischen Hochfeldbereich<sup>[1]</sup>. Die Koordinationsverschiebung<sup>[5]</sup> ist für alle P-Atome von 4 positiv (Tieffeldverschiebung), aber für die P<sub>A</sub>-Kerne (5a:  $\Delta = 55.5$ ; 5b:  $\Delta = 55.1$ ) bedeutend größer als für die P<sub>M</sub>-Kerne (5a:  $\Delta = 11.3$ ; 5b:  $\Delta = 16.2$ ). Demnach ist das Cyclotriphosphoran 4 in 5a,b als zweizähniger Brückenzwischenligand gebunden<sup>[6]</sup>. Die Konfigurationen von 5a,b ergeben sich aus den <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H,<sup>31</sup>P}-NMR-Spektren: Für die CO-Liganden beobachtet man bei 5a zwei Singulets (Intensitätsverhältnis 1:1), bei 5b dagegen nur ein Signal, das auch bis -120°C keine Aufspaltung zeigt. Bei beiden Isomeren sollte der P<sub>4</sub>Ni<sub>2</sub>-Ring in der Wannenform vorliegen und im Fall von 5b in Lösung durch rasche Pseudorotation im Mittel die NMR-spektroskopisch beobachtete C<sub>2h</sub>-Symmetrie erreichen.

Die Bildung von 5a,b ist gegenüber derjenigen des entsprechenden Einkernkomplexes mit P<sub>2</sub>Ni-Dreiringgerüst energetisch eindeutig bevorzugt.