

## DETERMINATION DE SEQUENCES D'ACIDES AMINES DANS DES OLIGOPEPTIDES PAR LA SPECTROMETRIE DE MASSE—IX

(A) ACYLATION AVEC DE NOUVEAUX RADICAUX MIXTES; (B)  
PEPTIDES CONTENANT DES ACIDES AMINES TRIFONCTIONNELS<sup>1,2</sup>

J. VAN HEIJENOORT\*, E. BRICAS\*, B. C. DAS†, E. LEDERER et  
W. A. WOLSTENHOLME‡

(Received 13 September 1966; accepted for publication 8 December 1966)

**Résumé.** Les spectres de masse de 22 dérivés de peptides synthétiques ont été étudiés. La N-acylation d'esters méthyliques de peptides par un mélange équimoléculaire d'acyles  $\omega$ -tridéutériés et non déutériés facilite la détermination des séquences d'acides aminés. Les spectres de masse de peptides contenant certains acides aminés trifonctionnels sont discutés, ainsi que le problème général du rapport entre la polarité de la liaison peptidique et la volatilité des dérivés peptidiques. L'étude des spectres de quelques paires isomères de peptides glutamiques et aspartiques montre que des liaisons  $\gamma$  et  $\beta$  dans ces peptides peuvent être reconnues par la spectrométrie de masse.

**Abstract.**—The mass spectra of 22 synthetic peptide derivatives were studied. The N-acylation of peptide methyl esters by an equimolecular mixture of  $\omega$ -trideuterated and nondeuterated decanoyl or acetyl groups makes the determination of the amino acid sequences easier. The mass spectra of peptides containing certain trifunctional amino acids are discussed, as well as the general aspects of the polarity of peptide bonds in relation to volatility. The study of a number of pairs of isomeric glutamyl and aspartyl peptides shows that  $\gamma$  and  $\beta$  linkages in these peptides can be recognized by mass spectrometry.

DIFFÉRENTES études de spectres de masse d'esters de peptides N-acylés<sup>3-7</sup> ont établi que l'un des principaux mécanismes de fragmentation de la chaîne peptidique

\* Institut de Biochimie, Faculté des Sciences, Orsay (Essonne), France.

† Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., Gif sur-Yvette (Essonne), France.

‡ Associated Electrical Industries, Scientific Apparatus Department, Manchester, Angleterre.

<sup>1</sup> VIII<sup>e</sup> communication, voir: W. A. Wolstenholme et L. C. Vining, *Tetrahedron Letters* n° 24, 2785 (1966). Une partie des résultats de ce mémoire a été communiquée au IV<sup>e</sup> Symposium International de l'IUPAC sur la Chimie des Substances Naturelles, à Stockholm, 26 Juin–2 Juillet 1966.

<sup>2</sup> Ce travail, ainsi que la publication IV (3) résument une partie de la Thèse de Doctorat d'Etat de J. van Heijenoort soutenue à la Faculté des Sciences de Paris-Orsay le 24 Juin 1966.

<sup>3</sup> E. Bricas, J. van Heijenoort, M. Barber, W. A. Wolstenholme, B. C. Das et E. Lederer, *Biochemistry* 4 2254 (1965).

<sup>4</sup> M. Barber, P. Jollès, E. Vilkas et E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 18, 469 (1965).

<sup>5</sup> M. Barber, W. A. Wolstenholme, M. Guinand, G. Michel, B. C. Das et E. Lederer, *Tetrahedron Letters* 1331 (1965).

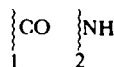
<sup>6</sup> G. Lanéelle, J. Asselineau, W. A. Wolstenholme et E. Lederer, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 2133 (1965).

<sup>7</sup> N. S. Wulfson, V. A. Puchkov, B. V. Rozinov, Yu. V. Denisov, V. N. Bochkarev, M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin, E. I. Vinogradova et M. Yu. Feigina, *Tetrahedron Letters* 2805 (1965).

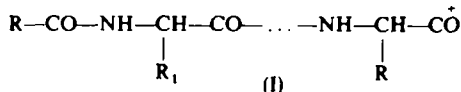
<sup>8</sup> F. Weygand, A. Prox, H. H. Fessel et Kwok Kun Sun, *Z. Naturforsch.* 20b, 1169 (1965).

<sup>9</sup> J. van Heijenoort, Thèse de Doctorat d'Etat, Faculté des Sciences de Paris-Orsay (1966).

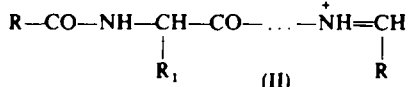
consiste en une rupture de la liaison peptidique suivant 1 ou 2:



Ainsi, dans les spectres de masse de tels dérivés peptidiques, on rencontre pour chaque liaison peptidique presque toujours un pic correspondant à un ion du type (I):



et souvent un pic correspondant à un ion du type (II):



L'identification de l'ensemble de ces pics permet de déterminer le plus souvent la séquence des acides aminés de la chaîne peptidique étudiée.<sup>4a</sup> Il est donc intéressant, tout au moins dans le cas de spectres obtenus à basse résolution, de pouvoir distinguer rapidement et sans ambiguïté ces pics de ceux qui correspondent, soit à d'autres pics de scissions de la chaîne peptidique, soit à des scissions dans les groupements de blocage et dans les chaînes latérales de résidus des acides aminés.<sup>8</sup>

Dans ces conditions, le recours à un marquage du groupement N-acyle est particulièrement indiqué.

Dans un mémoire précédent,<sup>3</sup> nous avons décrit la spectrométrie de masse d'esters méthyliques d'oligopeptides synthétiques N-acylés. Nous avons utilisé un mélange d'acides heptadéca- et octadécanoïques pour acyler les esters méthyliques des peptides. Ce "marquage" par un acyle mixte permet, en effet, de reconnaître tous les fragments contenant le radical acyle par la présence de doublets différant de 14 unités de masse. Ce marquage, tout en facilitant l'interprétation et la détermination des séquences, n'est cependant pas exempt d'inconvénients, car la différence de 14 unités de masse peut aussi être à la présence d'un mélange d'homologues dans la partie peptidique (ex. Val-et Ile-gramicidine A, B et C<sup>9</sup>).

C'est pourquoi nous avons cherché à améliorer le procédé d'acylation mixte: nous proposons maintenant d'utiliser un mélange équimoléculaire de deux acides gras, dont l'un est trideutéérié sur le méthyle terminal.

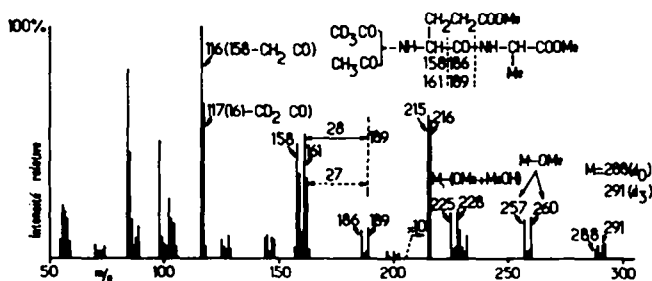
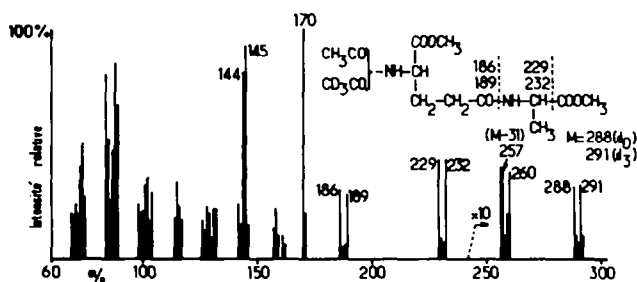
### 1. Réactifs acylants trideutéériés

Nous donnons, dans le présent mémoire, des exemples d'emploi de mélanges équimoléculaires du groupement  $\text{CH}_3\text{CO}- + \text{CD}_3\text{CO}-$ , ou  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}- + \text{CD}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$ .<sup>10</sup> Les spectres de masse des esters de peptides ainsi marqués

<sup>8</sup> Ce travail était déjà terminé lorsqu'ont paru deux publications constituant un développement intéressant dans ce domaine: celle de M. Senn et F. M. McLafferty [*Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 381 (1966)] d'une part, et celle de K. Biemann, C. Cone et B. R. Webster [*J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2597 (1966)] d'autre part, dans lesquelles sont discutées les possibilités de l'emploi de l'enregistrement rapide de spectres de masse à haute résolution et d'ordinateurs, pour l'automatisation de la détermination de la séquence des acides aminés de chaînes peptidiques.

<sup>9</sup> R. Sarges et B. Witkop, *Biochemistry* **4**, 2491 (1965).

<sup>10</sup> Le groupement décanoyle non deutérié que nous avons utilisé précédemment<sup>3</sup> a été employé également par A. A. Kiryushkin, Yu. A. Ovchinnikov, M. M. Shemyakin, V. N. Bokarev, B. V. Rozinov et N. S. Wulfson [*Tetrahedron Letters* **33** (1966)]; voir aussi: M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin, E. I. Vinogradova, A. I. Miroshnikov, Yu. B. Alakhov, V. M. Kipkin, Yu. B. Shvetsov, N. S. Wulfson, B. V. Rozinov, V. N. Bockharev et V. M. Burikov, *Nature, Lond.* **211**, 361 (1966).

FIG. 1. Spectre de masse de l'acétyl ( $d_0 + d_3$ )- $\alpha$ -Glu-Ala-OMeFIG. 2. Spectre de masse de l'acétyl ( $d_0 + d_3$ )- $\gamma$ -Glu-OMe

Le pic à  $m/e$  170 est dû probablement à la perte de  $\text{CH}_3\text{CONH}_2$  et  $\text{CD}_3\text{CONH}_2$  à partir des ions à  $m/e$  229 et 232, respectivement. Les deux pics à  $m/e$  144 et 145 sont probablement dus à la perte de  $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$  et  $\text{CD}_2=\text{C}=\text{O}$  à partir des ions à  $m/e$  186 et 189, respectivement.

présentent des doublets avec des pics différant de 3 unités de masse, permettant ainsi d'identifier aisément tous les pics correspondant aux fragments contenant le radical acyl (Fig. 1–8).

Les oligopeptides synthétiques que nous avons examinés en appliquant ce procédé, contiennent, entre autres, des résidus d'acides aminés trifonctionnels comme l'acide glutamique (Fig. 1–4), l'acide aspartique (Fig. 5 et 6), la sérine, le tryptophane (Fig. 7 et 8), la tyrosine (Fig. 9), la méthionine, la cystine, la lysine (Fig. 12) et l'histidine (Tableau 1, No. 16, 17).

## 2. Acides aminés trifonctionnels

Les fonctions polaires des chaînes latérales des acides aminés trifonctionnels peuvent contribuer à diminuer la volatilité d'un peptide au même titre que les fonctions terminales de la chaîne peptidique. Il faut donc dans certains cas bloquer convenablement ces fonctions.

Nous avons étudié, plus particulièrement, quelques peptides contenant la tyrosine

avec son hydroxyle phénolique libre ou méthylé, ainsi qu'une série de peptides comportant un ou plusieurs acides aminés dicarboxyliques.

(a) *Peptides contenant la tyrosine.* La méthylation de l'hydroxyle phénolique du résidu tyrosyle par le diazométhane est un moyen commode pour bloquer cette fonction et en diminuer la polarité. Deux exemples particulièrement nets prouvant la nécessité d'éliminer la polarité de l'OH-phénolique de la tyrosine, nous ont été fournis par le tripeptide Val—Gly—Tyr et par le térapeptide Ser—Tyr—Ser—Met. Dans le cas des esters méthyliques de ces peptides N-acylés (dérivés n° 12 et 14, Tableau 1), des spectres satisfaisants n'ont été obtenus qu'après méthylation de l'hydroxyle phénolique (Fig. 9) (dérivés n° 13 et 15, Tableau 1). (Voir aussi<sup>10</sup> et <sup>11</sup>).

Cependant, dans le cas de l'hexapeptide Val—Tyr—Val—His—Pro—Phe, même après méthylation de l'hydroxyle phénolique du résidu tyrosyle (dérivé n° 17, Tableau 1), nous n'avons obtenu qu'un spectre partiel. Dans ce cas, malgré l'absence de pic moléculaire, la séquence a pu être retrouvée grâce à la présence de pics du type (I) et (II) caractéristiques des trois résidus d'acides aminés N-terminaux, à celle d'un pic caractéristique du résidu de phénylalanine C-terminal et à celle d'un pic caractéristique de l'ion (H—Pro—PheOMe)<sup>+</sup>.

(b) *Peptides contenant des acides aminés dicarboxyliques.* Dans le cas de peptides renfermant des acides aminés dicarboxyliques, l'estérification par le diazométhane de dérivés N-acylés permet facilement le blocage des fonctions carboxyles libres; voir aussi.<sup>11</sup> Nous donnons ici les résultats obtenus avec une série de peptides contenant 1, 2 ou 4 résidus de ces acides aminés (Fig. 1–6) (dérivés n° 1 à 8 et 21, Tableau 1). Un spectre satisfaisant a été obtenu dans tous les cas, excepté celui du nonapeptide Leu—Ala—Glu—Ala—Phe—Pro—Leu—Glu—Phe (dérivé n° 21, Tableau 1),

TABLEAU 1. DÉRIVÉS PEPTIDIQUES ÉTUDIÉS

1	Acétyl(d <sub>0</sub> + d <sub>3</sub> )—α-Glu—Ala—OMe   OMe	Fig. 1
2	Acétyl(d <sub>0</sub> + d <sub>3</sub> )—γ-Glu—OMe   Ala—OMe	Fig. 2
3	Décanoyl(d <sub>0</sub> + d <sub>3</sub> )—α-Glu—Glu—OMe          OMe  OMe	Fig. 3
4	Décanoyl(d <sub>0</sub> + d <sub>3</sub> )—γ-Glu—OMe   Glu—OMe   OMe	Fig. 4
5	Décanoyl(d <sub>0</sub> + d <sub>3</sub> )—α-Glu—Glu—Glu—Glu—OEt                        OMe  OMe  OMe  OEt	

<sup>11</sup> N. S. Wulfson, V. N. Bochkarev, B. V. Rozinov, M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin et A. I. Miroshnikov, *Tetrahedron Letters* 39 (1966).

TABLEAU 1—*continued*

6	Décanoyl(d <sub>0</sub> + d <sub>3</sub> )—γ-Glu—OMe   Glu—OMe   Glu—OMe   Glu—OMe   OMe	
7	Décanoyl(d <sub>0</sub> + d <sub>3</sub> )—α-Asp—Phe—OMe   OMe	Fig. 5
8	Décanoyl(d <sub>0</sub> + d <sub>3</sub> )—β-Asp—OMe   Phe—OMe	Fig. 6
9	Décanoyl(d <sub>0</sub> + d <sub>3</sub> )—β-Alanyl—Try—OMe	Fig. 7
10	Décanoyl(d <sub>0</sub> + d <sub>3</sub> )—Gly—Pro—Try—Leu—OMe	Fig. 8
11	Décanoyl(d <sub>0</sub> + d <sub>3</sub> )—Ala—Val—Gly—Leu—OMe	
12	C <sub>17</sub> + C <sub>18</sub> oyl—Val—Gly—Tyr—OMe	
13	C <sub>17</sub> + C <sub>18</sub> oyl—Val—Gly—Tyr—OMe   OMe	Fig. 9
14	C <sub>17</sub> + C <sub>18</sub> oyl—Ser—Tyr—Ser—Met—OMe	
15	Stéaroyl—Ser—Tyr—Ser—Met—OMe   OMe	
16	C <sub>17</sub> + C <sub>18</sub> oyl—Val—Tyr—Val—His—Pro—Phe—OMe	
17	C <sub>17</sub> + C <sub>18</sub> oyl—Val—Tyr—Val—His—Pro—Phe—OMe   OMe	
18	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> OCO—Gly) <sub>2</sub> —Cystine-di OMe <sup>a</sup>	
19	HCO—alloile—Pro—Sar—MeVal—OMe <sup>b</sup>	Fig. 10
20	H· alloile—Pro—Sar—MeVal—OMe <sup>b</sup>	Fig. 11
21	C <sub>17</sub> + C <sub>18</sub> oyl—Leu—Ala—Glu—Ala—Phe—Pro—Leu—Glu—Phe—OMe                        OMe                OMe	
22	CH <sub>3</sub> CO—Ala—Ala—Lys—OMe <sup>c</sup>   COCH <sub>3</sub>	Fig. 12

Pour la préparation des dérivés 1 à 17 et 21-22, voir partie expérimentale.

\* Aimablement mis à notre disposition par le Professeur L. Zervas (Laboratoire de Chimie Organique, Université d'Athènes).

\* Aimablement mis à notre disposition par le Professeur H. Brockmann (Organisch-chemisches Institut der Universität Göttingen).

<sup>c</sup> Préparé par D. Bogdanovsky à partir du peptide offert aimablement par le Professeur K. Hoffmann (Biochemistry Department, University of Pittsburg).

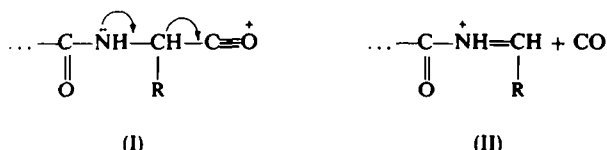
pour lequel seule la séquence des premiers acides aminés N-terminaux a pu être retrouvée.

Le dérivé de cystine examiné (No. 18) a donné un pic moléculaire à  $m/e$  650. On observe en outre une fragmentation entre les deux atomes de soufre avec transfert d'hydrogène (pics à  $m/e$  324 et 326).

### 3. Différences entre $\alpha$ -et $\omega$ -peptides

Etant donné l'existence de peptides naturels d'origine non protéique qui renferment une liaison  $\gamma$  ou  $\beta$  "peptidique", il paraît intéressant de pouvoir déceler de telles liaisons par spectrométrie de masse. Ainsi, nous avons examiné une série de couples d'isomères de glutamyl- et aspartyl-peptides comportant des liaisons  $\alpha$ ,  $\beta$ , ou  $\gamma$  (Fig. 1-6) (dérivés n° 1 et 2, 3 et 4, 5 et 6, 7 et 8, Tableau 1).

Les spectres de masse des dérivés comprenant des liaisons  $\omega$  se distinguent de ceux de leurs isomères à liaisons  $\alpha$ , surtout par l'absence de pics du type (II). Dans le cas d'une liaison  $\alpha$ -peptidique, il a pu être montré<sup>6,7</sup> que les ions du type (II) proviennent de l'ion du type (I) par élimination de CO selon le mécanisme:



Par contre, lorsque nous avons affaire à une liaison  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\omega$ , la présence de groupements méthylène empêche le déplacement de charge à partir de l'atome d'azote et l'élimination consécutive d'oxyde de carbone; ceci permet d'expliquer l'absence de pics du type (II) dans ce cas.

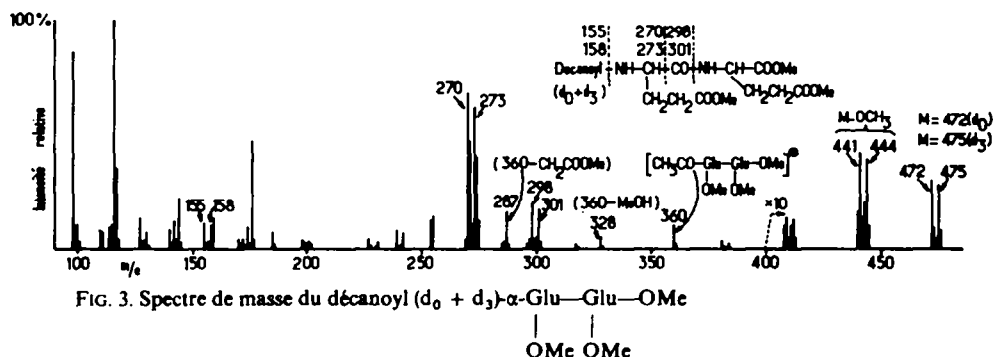
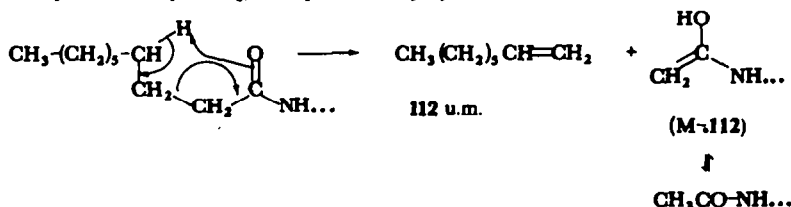


FIG. 3. Spectre de masse du décanoyl ( $d_0 + d_3$ )- $\alpha$ -Glu-Glu-OMe

Dans les spectres de masse de dipeptides N-acylés on observe souvent la perte d'une partie du groupe acyle. Avec les dérivés décanoyl cette perte correspond à 112 unités de masse (115 à partir de l'acyle  $\text{CD}_3$ ); ceci peut être expliqué comme suit:



Très souvent, les pics du type (II) sont accompagnés de pics situés une unité de masse plus haut correspondant à une scission de la chaîne peptidique avec migration d'un atome d'hydrogène.<sup>3,6</sup> Weygand et coll.<sup>6</sup> ont montré que ce type de pic était caractéristique uniquement d'une liaison  $\alpha$ -peptidique.

Ainsi, selon la présence ou l'absence de pics situés 28 et 27 unités de masse plus bas que celui du type (I), il paraît possible d'établir une distinction entre des liaisons  $\alpha$  d'une part, et  $\omega$  d'autre part. Nous avons retrouvé ces faits dans tous les cas examinés, y compris celui d'un dipeptide comprenant une  $\beta$ -alanine N-terminale (dérivé n° 9). (Fig. 7).

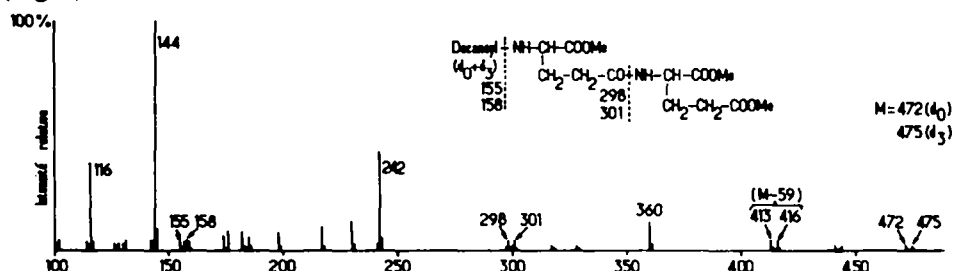


FIG. 4. Spectre de masse du décanoyl ( $d_0 + d_3$ )- $\gamma$ -Glu-OMe

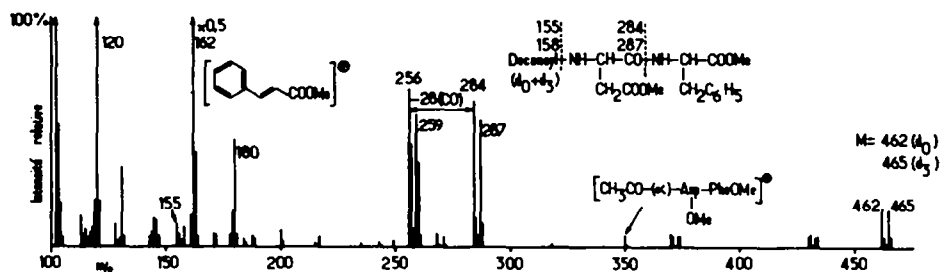
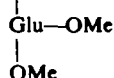


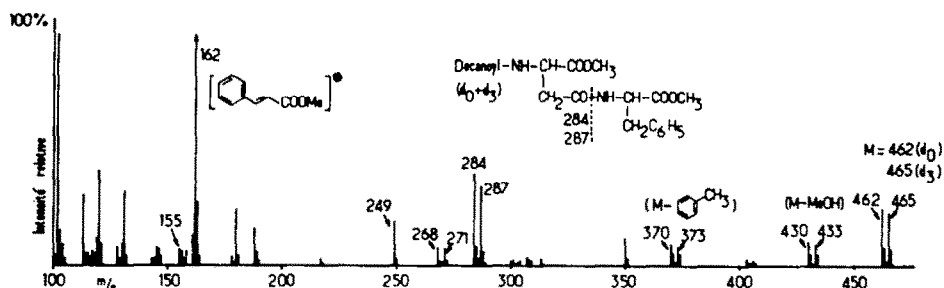
FIG. 5. Spectre de masse du décanoyl( $d_0 + d_3$ )- $\alpha$ -Asp-Phe-OMe



Le pic à  $m/e$  162 peut être dû à un ion cinnamate de méthyle formé à partir de l'unité de phénylalanine. (Voir: Structure du Mycoside  $C_{10}$ , peptidoglycolipide de *M. butyricum*, E. Vilkas, A. Rojas, B. C. Das, W. A. Wolstenholme et E. Lederer. *Tetrahedron* 22, 2809 (1966).

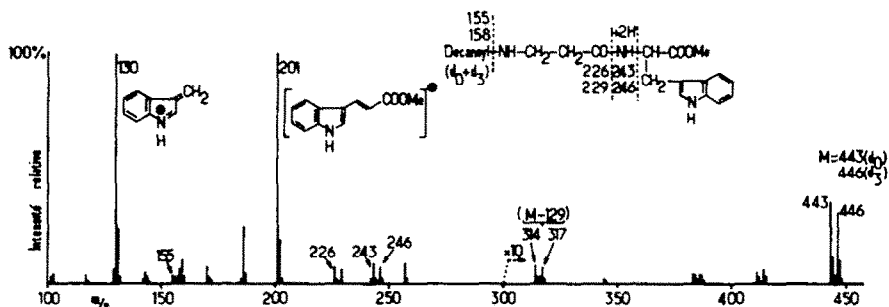
#### 4. Rapports entre structure et volatilité de dérivés peptidiques

Les résultats encore fragmentaires concernant les spectres de masse de dérivés peptidiques renfermant des résidus d'acides aminés trifonctionnels, permettent difficilement d'apprécier l'importance relative de la contribution de divers types de fonctions polaires à la non-volatilité de ces dérivés. Il est par conséquent difficile de fixer une limite au nombre de résidus d'acides aminés d'une chaîne peptidique, qui présenterait encore une volatilité suffisante pour donner un spectre interprétable.

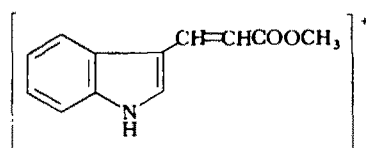
FIG. 6. Spectre de masse du décanoyl( $d_0 + d_3$ )- $\beta$ -Asp-OMe

Phe-OMe.

La perte de méthanol (32 unités de masse) à partir de l'ion moléculaire est plus prononcée dans ce cas que dans le cas du dérivé  $\alpha$  (Fig. 5), conduisant aux pics à  $m/e$  430 et 433; il y a ensuite perte d'ester cinnamique amenant la formation des ions à  $m/e$  268 et 271. Le clivage de la chaîne acyle donne les pics à  $m/e$  350.

FIG. 7. Spectre de masse du décanoyl( $d_0 + d_3$ )- $\beta$ -Alanyl-Try-OMe

Un pic intense à  $m/e$  201 est peut-être dû à l'ion  $a$  formé à partir du tryptophane. L'origine d'un petit pic à  $M-129$  et d'un pic intense à  $m/e$  130 est expliquée ci dessous (voir légende de Fig. 8).

 $a \quad m/e \ 201$ 

Dans le cas de peptides courts (2 à 5 résidus d'acides aminés), la présence des fonctions polaires non masquées est sans doute le facteur déterminant qui limite la volatilité.

Cependant, lorsque le nombre de résidus d'acides aminés augmente (6 à 9 résidus), l'effet de la polarité des liaisons peptidiques devient prépondérant et prédomine sur l'ensemble des autres effets de polarité résiduelle persistant après le blocage de toutes les fonctions polaires. Ces conclusions sont illustrées dans les exemples suivants:

(a) La comparaison des résultats obtenus avec le pentaester d'un tétraglutamyl-peptide N-acylé (dérivé n° 5, Tableau 1), puis avec le triester méthylique du nonapeptide Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe (dérivé n° 21, Tableau 1),



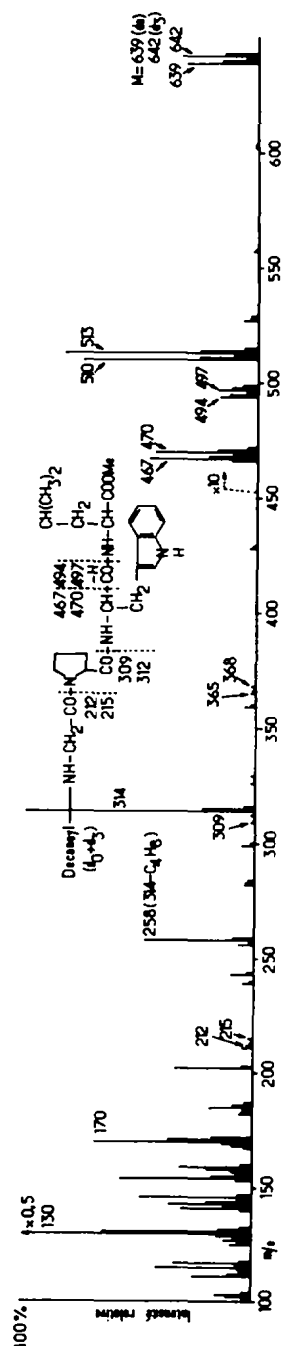
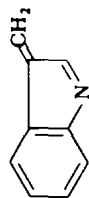
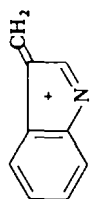


FIG. 8. Spectre de masse du décanoyl( $d_0 + d_3$ )-Gly-Pro-Try-Leu-OMe.

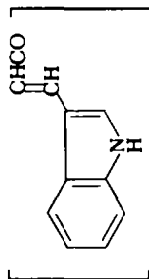
Il convient de remarquer l'existence de pics à  $m/e$  510 et 513; ils se forment par la perte de 129 unités de masse à partir des ions moléculaires; des mesures de masse montrent que ceci est dû à la perte de  $C_9H_7N$  (b). Cette fragmentation, ainsi que le pic intense à  $m/e$  130 (ion c), indiquent la présence d'une unité de tryptophane dans le peptide. La perte de  $-LeuOCH_3(+H)$  terminal à partir de  $m/e$  510 et 513 peut ensuite conduire aux fragments à  $m/e$  365 et 368. Deux autres pics à  $m/e$  314 et 170 sont probablement dus aux ions d et e respectivement.



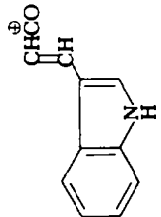
b  $C_9H_7N$  (129 u.m.)



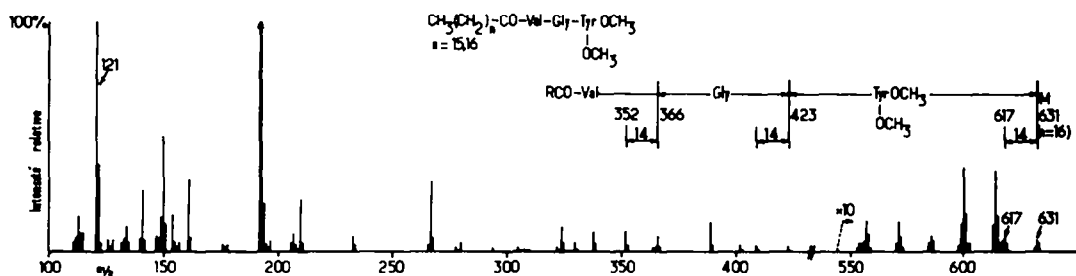
c  $m/e$  130



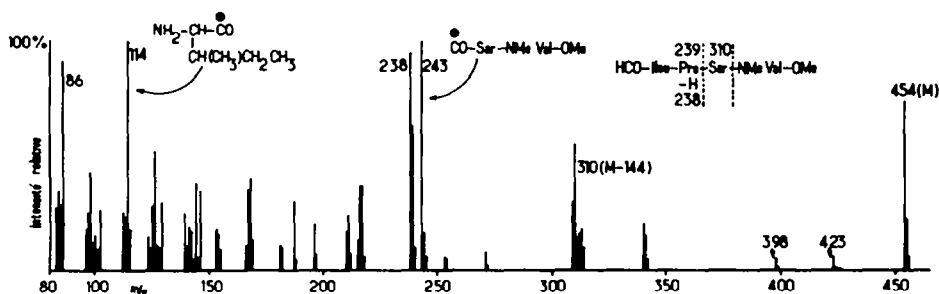
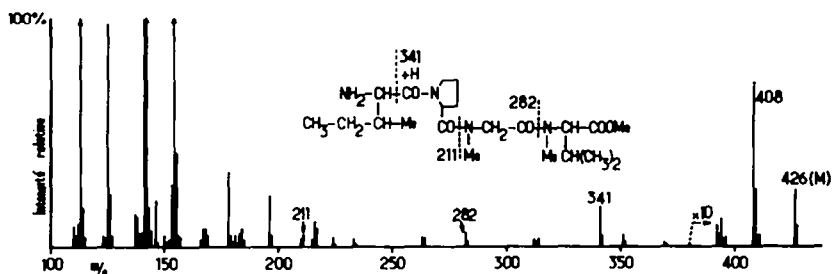
d  $m/e$  314



e  $m/e$  170

FIG. 9. Spectre de masse de  $C_{17} + C_{18}$  oyl-Val-Gly-Tyr-OMe

Le pic intense à  $m/e$  121 indique la présence de l'unité de O-méthyl tyrosine.

FIG. 10. Spectre de masse de HCO-*allo*-Ile-Pro-Sar-MeVal-OMe.FIG. 11. Spectre de masse de H-*allo*-Ile-Pro-Sar-MeVal-OMe.

montre que la polarité des fonctions esters est négligeable devant celle des liaisons peptidiques. En effet, un spectre parfaitement interprétable a été obtenu dans le cas du pentaester, tandis que le triester a donné un spectre médiocre;

(b) L'importance de la polarité de la liaison peptidique est mise en évidence par le fait que l'ester méthylique du térapeptide *allo*-Ile-Pro-Sar-MeVal *non acylé* donne un spectre parfaitement interprétable, bien que la fonction amine N-terminale ne soit pas masquée (Fig. 11). En effet, l'absence de liaisons  $-\text{CO}-\text{NH}-$  remplacées par des liaisons  $-\text{CO}-\text{N} \begin{smallmatrix} \text{C} \\ \diagup \end{smallmatrix}$  peut expliquer la volatilité de ce peptide;

(c) De même la fortuitine, peptidolipide naturel,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18-20}-\text{CO}-\text{Val}-\text{MeLeu}-\text{Val}-\text{Val}-\text{MeLeu}-\text{Thr}(\text{OAc})-\text{Thr}(\text{OAc})-\text{Ala}-\text{Pro}-\text{OMe}$ , a donné

un spectre parfait.<sup>4a</sup> On peut penser que la présence de trois liaisons  $\text{—CO—N} \begin{smallmatrix} \text{C} \\ \diagup \\ \text{C} \end{smallmatrix}$  est à l'origine de la volatilité suffisante de ce nonapeptide;

(d) Par contre, la volatilité de l'octapeptide Ala—Val—Gly—Leu—Ala—Val—Gly—Leu estérifié et N-acylé, s'est révélée assez faible, malgré l'absence de résidus d'acides aminés trifonctionnels. Un spectre satisfaisant de cet octapeptide n'a pu être obtenu<sup>3</sup> qu'après chauffage à 320° dans la chambre d'ionisation du spectromètre. De ce fait, on peut considérer que cet octapeptide n'est pas loin de constituer un cas limite dans l'état actuel des techniques employées. La liaison hydrogène des groupements  $\text{—CO—NH—}$  paraît ainsi le principal "coupable" empêchant—pour le moment—l'extension de la spectrométrie de masse à des peptides plus longs.

Nous espérons apporter prochainement des précisions supplémentaires sur l'importance de la polarité de la liaison peptidique par l'étude des spectres de masse de dérivés peptidiques dépourvus d'hydrogène sur l'azote.

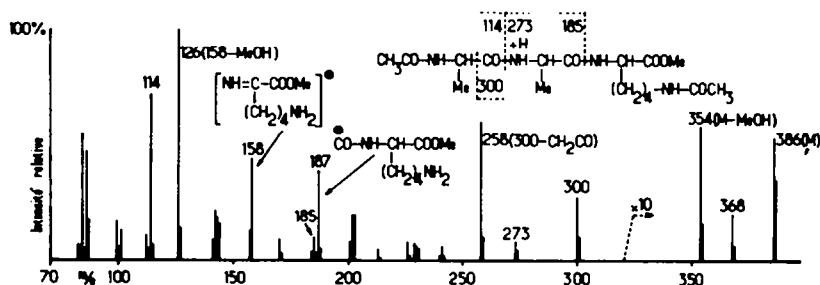


FIG. 12. Spectre de masse de  $\text{CH}_3\text{CO—Ala—Ala—Lys—OMe}$   
 $\text{COCH}_3$

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

Avec la collaboration de A. Costopanagiotis\*, F. Cuiban†, D. Mercier‡ et G. Stelakatos§

### 1. Préparation de l'acide Décanoïque-10-d<sub>3</sub>

L'introduction du groupement méthyle tridéutérié ( $\text{CD}_3$ -) est obtenue par la réaction de Kolbe entre le semi-ester éthylique de l'acide décanedioïque (acide sébacique) et l'acide acétique tridéutérié, selon Toubiana;<sup>12</sup> dans 180 ml d'éthanol absolu on dissout 1.08 g de sodium; on ajoute 18 g de semi-ester éthylique de l'acide décanedioïque<sup>13</sup> (0.128 mole), puis 1 g d'acide acétique déutéié  $\text{CD}_3\text{COOD}$ <sup>14</sup> (0.0156 mole). Le mélange est versé dans un appareil à cathode de mercure, l'anode tournante est en platine. Le courant continu fourni par un redresseur est réglé par un rhéostat à 2.5 A. L'appareil est refroidi par circulation d'eau. Quand le débit du courant devient nul, la réaction est arrêtée. Le mélange réactionnel est versé dans 500 ml d'eau et extrait avec 3 fois 250 ml d'éther. La fraction étherée lavée à l'eau est séchée sur sulfate de sodium, puis évaporée à sec. L'huile obtenue est distillée sous 15 mm Hg. La fraction passant en-dessous de 160° est gardée. On obtient ainsi 5 g de produit; on rectifie à nouveau et on garde la fraction passant

Adresses actuelles:

\* Deutsches Wollforschungsinstitut, Aachen.

† Institut de recherches chimico-pharmaceutiques, Bucarest.

‡ Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette.

§ Laboratoire de Chimie Organique de l'Université d'Athènes.

<sup>12</sup> R. Toubiana. *Ann Chim.* 7, 567 (1962).

<sup>13</sup> S. Swann, R. Oehler et R. J. Buaswell, *Org. Synth. Coll. Vol. II*, 276 (1943).

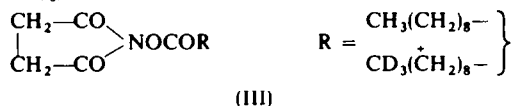
<sup>14</sup> Provenance "CIBA", pureté isotopique 99% D.

à 105–120° sous 10 mm Hg (3 g). La chromatographie en phase gazeuse sur colonne de Célite imprégnée de 10% de silicone QF 1, puis sur colonne à 30% de SE 30, montre deux constituants principaux en quantité égale. Les spectres de masse de ces deux fractions permettent d'identifier la seconde substance comme l'ester éthylique de l'acide tridéutéro-décanoïque (M 203). On sépare la totalité de l'ester par chromatographie préparative sur une colonne à 30% de SE 30 de diamètre 10 mm et longueur 180 cm (appareil Chromagas CGI Profit, Paris). L'ester obtenu est saponifié dans une solution de soude à 10%, à reflux. Après extraction, on obtient 0.9 g d'acide décanoïque-10-d<sub>3</sub>. Rendement: 37% par rapport à l'acide acétique utilisé.

Le spectre de masse de l'ester méthylique préparé à partir de l'acide ainsi obtenu a montré la présence de 85% de produit tridéutéié.

## II. Préparation du Réactif Acylant

A une solution de 100 mg de l'acide décanoïque-10-d<sub>3</sub> (85% tridéutéié) dans 1.5 ml de diméthoxyéthane distillé, on ajoute 70 mg d'acide décanoïque, 115 mg d'hydroxysuccinimide,<sup>15</sup> et après refroidissement à 0°, 227 mg de dicyclohexylcarbodiimide. Après une nuit à 0° et addition de quelques gouttes d'acide acétique, on essore la dicyclohexylurée et après évaporation du solvant, on obtient 188 mg du réactif acylant (III) (Rendement: 70%).



## III. Acylation de Peptides par le Réactif Acylant

### 1. Acylation de peptides libres

(a) Acides  $\alpha$ -L-glutamyl-L-glutamique et  $\gamma$ -L-glutamyl-L-glutamique. Chacun de ces isomères a été synthétisé dans notre laboratoire par B. Godot, selon la méthode de Sachs et Brand.<sup>16</sup>

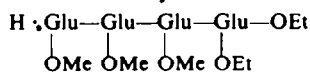
L'isomère  $\alpha$  a été obtenu après hydrogénation catalytique du N-benzoyloxy-carbonyl-( $\gamma$ -benzyl-L-glutamyl)-L-glutamate de dibenzyle ( $[\alpha]_D^{20} + 18.1$ ,  $c = 1.35$ , HCl 0.5 N; litt.  $[\alpha]_D + 18.2^\circ$ ). Par chromatographie sur couche mince de gel de silice dans le solvant A (n-butanol-acide acétique-eau 50:10:40) et par électrophorèse sur papier Whatman n° 1, sous tension de 500 volts, dans le tampon de pyridine-acide acétique-eau de pH 4, ce peptide se révèle comme une substance homogène qui se distingue nettement du témoin  $\gamma$ -glutamyl-glutamique.

27.6 mg (0.1M) de l'acide  $\alpha$ -glutamyl-glutamique ainsi obtenu sont dissous dans 1 ml d'eau tiède. On y ajoute 0.05 ml (0.3mM) de triéthylamine dans 2 ml de diméthoxyéthane et 26.9 mg (0.1mM) du réactif d'acylation (III) dissous dans 2 ml de diméthoxyéthane. Après 16 h on acidifie le mélange réactionnel et on ajoute 20 ml d'eau. L'émulsion ainsi obtenue est extraite par l'acétate d'éthyle. Après évaporation du solvant le N-acyl-peptide obtenu est dissous dans 1 ml de méthanol anhydre, puis estérifié par une solution de diazométhane dans l'éther. Par évaporation des solvants on obtient le N-décanoyl( $\gamma$ -méthyl-L-glutamyl)-glutamate de diméthyle, F. 106–107°,  $R_f$  0.95, après chromatographie sur couche mince de gel de silice dans le solvant A (révélation à l'iode).

La même méthode a été appliquée pour l'acylation et l'estérification de l'acide  $\gamma$ -glutamyl-glutamique.

### 2. Acylation de peptides estérifiés

(a) Tri( $\gamma$ -méthyl-L-glutamyl)-L-glutamate de diéthyle:



Ce pentaester du  $\alpha$ -glutamyl-térapeptide a été obtenu par hydrogénation catalytique du dérivé N-benzoyloxycarbonyl correspondant synthétisé par Cuiban et coll.<sup>17</sup> (F. 152–153°,  $[\alpha]_D^{25} + 22.4^\circ$ ).

Analyse du N-benzoyloxycarbonyl-tri( $\gamma$ -méthyl-L-glutamyl)-L-glutamate de diéthyle:

$\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{15}$			
Calc. %	C 54.82	H 6.57	N 7.28
Trouvé	54.82	6.60	7.45

<sup>15</sup> G. W. Anderson, J. E. Zimmerman et F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1839 (1964).

<sup>16</sup> H. Sachs et E. Brand, *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4608 (1953).

<sup>17</sup> F. Cuiban, V. Badea et V. Pescaru, *Revue Roumaine de Chimie* (sous presse).

L'acylation de ce tétrapeptide ester par le réactif acylant (III) a été effectuée dans le diméthoxyéthane d'une manière analogue à celle utilisée dans le cas du peptide libre. La solution d'acétate d'éthyle obtenue après l'extraction du mélange réactionnel est lavée avec HCl 0.5N,  $\text{NaHCO}_3$  N et très abondamment avec de l'eau, puis séchée sur  $\text{MgSO}_4$ . Après évaporation du solvant, le résidu est trituré copieusement avec de l'éther de pétrole et ensuite dissous dans du méthanol. Le produit cristallise à froid: F. 176°. Par chromatographie sur couche mince de gel de silice dans le solvant  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (92:8), on révèle à la morine<sup>18</sup> une seule tache.

Analyse du N-décanoyl(d<sub>0</sub> + d<sub>3</sub>)-tri(γ-méthylglutamyl)-L-glutamate de diéthyle:

$\text{C}_{37}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_{14}$	$\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_{14}$		
Calc. %	C 56.47	H 7.95	N 7.12
Trouvé	56.11	7.93	7.21

(b) Par le même procédé ont été acylés: le tri-γ-(α-méthyl-L-glutamyl)-L-glutamate de diméthyle obtenu par hydrogénation catalytique du dérivé N-benzyloxycarbonyl correspondant, aimablement fourni par le Dr. Kajtar (Institute of Organic Chemistry, L. Eötvös University, Budapest); le glycyl-L-prolyl-L-tryptophyl-L-leucinate de méthyle qui a été aimablement mis à notre disposition par le Professeur G. W. Kenner (Department of Organic Chemistry, University of Liverpool), ainsi que le L-alanyl-L-valyl-glycyl-L-leucinate de méthyle synthétisé dans notre laboratoire et le β-alanyl-tryptophanate de méthyle qui nous a été aimablement envoyé par le Dr. J. S. Morley (ICI Pharmaceutical Ltd., Alderley Park, Angleterre) sous forme de dérivé t-butyloxycarbonyl.

De même un procédé analogue à celui décrit pour le cas de peptides libres a été utilisé pour l'acylation et l'estérification de deux dipeptides esters: l'α-L-aspartyl-L-phénylalaninate de méthyle, aimablement fourni par le Dr. J. S. Morley et le β-L-aspartyl-L-phénylalaninate de méthyle, synthétisé par G. Stelakatos à partir du N-benzyloxycarbonyl-L-aspartate de α-benzyle et le phénylalaninate de méthyle et hydrogénation catalytique du produit obtenu.

#### IV. Acétylation de Peptides par un Mélange Équimoléculaire d'Anhydride Acétique et d'Anhydride Acétique Hexadeutéié

##### 1. α-L-glutamyl-D-alaninate de diéthyle

Le chlorhydrate d'α-benzyl-L-glutamyl-D-alaninate de benzyle,<sup>19</sup> homogène par chromatographie sur papier et sur couche mince de gel de silice, dissous dans de la pyridine, a été acétylé par un mélange équimoléculaire d'anhydride acétique et d'anhydride acétique hexadeutéié.<sup>20</sup> Après une heure d'agitation, le mélange réactionnel est évaporé à sec. Le résidu obtenu est hydrogéné en présence de Pd/C à 10% et après élimination du catalyseur, la N-acétyl-α-L-glutamyl-D-alanine est estérifiée par le diazométhane.

##### 2. γ-L-glutamyl-D-alaninate de diméthyle

Le même procédé a été utilisé pour acétyler le p-toluènesulfonate du α-benzyl-glutamyl-D-alaninate de benzyle synthétisé dans notre laboratoire par P. Lefrancier. Après hydrogénation catalytique du dérivé acétylé on prépare le diester méthylique par l'action du diazométhane.

#### V. Acylation par un Mélange Équimoléculaire des Acides Heptadéca- et Octadécanoïques

Ce procédé que nous avons décrit dans un mémoire précédent<sup>3</sup> a été utilisé ici pour acyler le valyl-glycyl-tyrosinate de méthyl préparé dans notre laboratoire par hydrogénation catalytique du dérivé N-benzyloxycarbonyl correspondant, lui-même synthétisé par couplage du N-benzyloxycarbonyl valinate de paranitrophényle avec le glycyl-tyrosinate de méthyle: p.f. 98–102 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 2.8° (c = 2, méthanol), homogène par chromatographie sur papier et sur couche mince de silice après révélation au nitroso-1-naphtol-2 et à la morine.

Analyse du N-benzyloxycarbonyl-L-valyl-glycyl-L-tyrosinate de méthyle:

$\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$			
Calc. %	C 61.84	H 6.44	N 8.66
Trouvé	61.45	6.30	8.41

<sup>18</sup> P. Schellenberg, *Angew. Chem.* **74**, 118 (1962).

<sup>19</sup> P. Lefrancier et E. Bricas, *Bull. Soc. Chim.*, 3668 (1965).

<sup>20</sup> Provenance: YEDA, Rehovoth, Israël; pureté isotopique 98.3%.

Le N-heptadéca- et octadécanoylpeptide ester a été recristallisé dans un mélange acétate d'éthyle-éther de pétrole; F. 147–148°; il est homogène par chromatographie sur papier et couche mince de gel de silice, après révélation à la morine et au nitroso-1 naphthol-2.

#### Analyse

$$\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{N}_3\text{O}_6 + \text{C}_{35}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_6$$

Calc. %	C 67.83	H 9.57	N 6.88
Trouvé	67.82	9.41	7.0

L'ester méthylique de ce tripeptide N-heptadéca- et octadécanoyl a été par la suite traité par un excès de diazométhane dans l'éther. Le produit chromatographiquement pur est obtenu par séparation sur plaque de gel de silice: réaction négative au nitroso-1 naphthol-2, positive à la morine. Le produit recristallisé dans le méthanol fond à 153°.

#### Analyse<sup>21</sup>

$$\text{C}_{35}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_6 + \text{C}_{36}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_6$$

Calc. %	C 68.23	H 9.68	N 6.62
Trouvé	67.71	9.71	6.86

Le même procédé a été utilisé pour acyler le valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalaninate de méthyle, ainsi que l'ester méthylique du térapeptide séryl-tyrosyl-séryl-méthioninate de méthyle, aimablement mis à notre disposition par le Dr. W. Rittel du Laboratoire de Recherches de la Ciba (Bâle).

Ces peptides esters N-acylés ont été par la suite traités par le diazométhane pour donner le dérivé O-méthylé sur l'hydroxyle phénolique.

#### VI. Purification des Esters des Peptides N-acylés

La purification de petites quantités d'esters méthyliques des différents peptides N-acylés destinés à la spectrométrie de masse a été effectuée, dans un certain nombre de cas, par chromatographie préparative sur plaque de gel de silice de 20 × 20 cm dans un mélange de solvants appropriés, prélèvement de la bande de silice correspondante et extraction du produit par un solvant adéquat.

#### VII. Spectrométrie de Masse

Tous les spectres de masse ont été déterminés dans un spectromètre de masse A.E.I. MS9 à 70 eV. La substance est placée à l'extrémité en céramique du système d'introduction directe, lequel est alors introduit par l'intermédiaire d'un sas dans la source d'ions, puis chauffé à une température appropriée.

**Remerciements**—Nous remercions très vivement tous les collègues qui nous ont envoyé généreusement des échantillons de dérivés peptidiques: H. Brockmann (Göttingen), K. Hofmann (Pittsburgh), Kajtar (Budapest), G. W. Kenner (Liverpool), J. S. Morley (ICI, Alderley Park), W. Rittel (Ciba, Bâle, L. Zervas (Athènes).

Nous remercions également le Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, pour une subvention ayant permis l'achat d'isotopes.

<sup>21</sup> Les analyses élémentaires ont été effectuées par le Service de Microanalyse du C.N.R.S. (Directeur R. Lévy), à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette.