

FFI RAPPORT

ANALYSE AV NOEN UKJENTE MIDT- SPEKTRUM FORBINDELSER VED HJELP AV ELEKTROSPRAY-MASSESPEKTROMETRI

TØRNES John Aa, OPSTAD Aase M

FFI/RAPPORT-2001/01354

FFIBM/757/138

Godkjent
Kjeller 7 mars 2001



Bjørn A Johnsen
Forskningsjef

**ANALYSE AV NOEN UKJENTE MIDT-SPEKTRUM
FORBINDELSER VED HJELP AV
ELEKTROSPRAY-MASSESPEKTROMETRI**

TØRNES John Aa, OPSTAD Aase M

FFI/RAPPORT-2001/01354

FORSVARETS FORSKNINGSINSTITUTT
Norwegian Defence Research Establishment
Postboks 25, 2027 Kjeller, Norge


FORSVARETS FORSKNING SINSTITUTT (FFI)
Norwegian Defence Research Establishment

UNCLASSIFIED

P O BOX 25
NO-2027 KJELLER, NORWAY

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
(when data entered)

REPORT DOCUMENTATION PAGE

1) PUBL/REPORT NUMBER FFI/RAPPORT-2001/01354	2) SECURITY CLASSIFICATION UNCLASSIFIED	3) NUMBER OF PAGES 30
1a) PROJECT REFERENCE FFIBM/757/138	2a) DECLASSIFICATION/DOWNGRADING SCHEDULE -	
4) TITLE ANALYSE AV NOEN UKJENTE MIDT-SPEKTRUM FORBINDELSER VED HJELP AV ELEKTROSPRAY- MASSESPEKTROMETRI (ANALYSIS OG SOME UNKNOWN MID-SPECTRUM AGENTS BY ELECTROSPRAY-MASS SPECTROMETRY)		
5) NAMES OF AUTHOR(S) IN FULL (surname first) TØRNES John Aa, OPSTAD Aase M		
6) DISTRIBUTION STATEMENT Approved for public release. Distribution unlimited. (Offentlig tilgjengelig)		
7) INDEXING TERMS IN ENGLISH:		
a) <u>Mid-spectrum agents</u>	a) <u>Midt-spektrum forbindelser</u>	
b) <u>Identification</u>	b) <u>Identifikasjon</u>	
c) <u>Electrospray</u>	c) <u>Elektrospray</u>	
d) <u>Mass spectrometry</u>	d) <u>Massespektrometri</u>	
e) _____	e) _____	
IN NORWEGIAN:		
THESAURUS REFERENCE:		
8) ABSTRACT Two samples received during a previous interlaboratory training exercise on the identification of mid-spectrum agents have been re-analysed with the aim to evaluate the analytical instrumentation and procedures at Forsvarets forskningsinstitutt. By using electrospray mass spectrometry coupled to liquid chromatography, the two samples were shown to contain α -conotoxin MI and apamin respectively. Confirmed identification was achieved according to NATO identification criteria for mid-spectrum agents. Unambiguous identification was not reached due to lack of authentic reference materials. The analytical instrumentation and protocols were shown to be well suited for analysis of pure peptides in a simple matrix. More work should be done to test the procedures on environmental samples and samples containing a mixture of peptides.		
9) DATE 7 March 2001	AUTHORIZED BY This page only  Bjørn A. Johnsen	POSITION Director of Research

UNCLASSIFIED

ISBN 82-464-0494-0

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
(when data entered)

INNHold

	Side	
1	INNLEDNING	7
2	EKSPERIMENTELT	8
2.1	Kjemikalier	8
2.2	Reduktiv alkylering	8
2.3	Instrumentering	9
2.3.1	Væskkromatografi	9
2.3.2	Elektrospray-massespektrometri	9
2.3.3	Trypsinspalting	9
3	RESULTATER	10
3.1	Fjerning av partikler og pH-justering	10
3.2	Renhets- og molekylmassebestemmelse	10
3.3	Separasjon og fraksjonssamling	14
3.4	Bestemmelse av antall disulfidbroer	15
3.5	Enzymatisk spalting og bestemmelse av massekart	16
3.6	Bestemmelse av aminosyresekvens	22
4	KONKLUSJON	25
APPENDIKS		
A	IDENTIFIKASJONSKRITERIER FOR MIDT-SPEKTRUM FORBINDELSER	26
	Litteratur	28
	Fordelingsliste	29

ANALYSE AV NOEN UKJENTE MIDT-SPEKTRUM FORBINDELSER VED HJELP AV ELEKTROSPRAY-MASSESPEKTROMETRI

1 INNLEDNING

Det har de siste åra, og spesielt etter Golf-krigen, blitt fokusert på faren for at kjemiske og biologiske våpen skal bli brukt i en konfliktsituasjon. Utviklingen innen bioteknologi har gjort produksjon av militært signifikante mengder av toksiske forbindelser i "midt-spektrum" (mellom de klassisk kjemiske og biologiske stridsmidler) mulig. Slike stridsmidler fremstår derfor som en reell trussel. På grunn av Norges engasjement i FN-styrker og NATOs utrykningsstyrker er det nå også en reell mulighet for at norske soldater kan bli utsatt for angrep med slike våpen. Kjemisk analyse og identifikasjon av hvilke stridsmidler som er brukt mot norske soldater er en viktig del i arbeidet med å beskytte soldatene og å bestemme hvilke mottiltak (medisinske, beskyttelsesmessige og militære) som skal settes inn.

NATO AC/225 (LG/7-SIBCA) arrangerte en interlaboratorietest i februar 1999, der deltakerlandene utvetydig skulle identifisere to ukjente midt-spektrum forbindelser. Fem arbeidsdager (ikke nødvendigvis sammenhengende) var tilgjengelig, og alle analytiske metoder kunne brukes. Identifikasjonskriteriene for midt-spektrum forbindelser utarbeidet av NATO AC/225 (LG/7-SIBCA) er gjengitt i appendiks A.

Mange av de potensielle midt-spektrum stridsmidlene er peptider eller proteiner. Bruk av massespektrometri (MS) til analyse av peptider og proteiner har hatt en fantastisk økning i den senere tid på grunn av utvikling av elektrospRAY ionisering (ESI). ESI kan produsere flerladede ioner fra store biomolekyler og dermed gjøre det mulig å analysere dem med relativt billige massespektrometre med lite masseområde.

Under interlaboratorietesten i februar 1999 var ESI-enheten ved Forsvarets forskningsinstitutt (FFI) til reparasjon i Bremen. Prøvene ble derfor analysert ved hjelp av ESI-MS ved Universitetet i Tromsø og ved hjelp av aminosyreanalyse og N-terminal analyse ved Bioteknologiseret, Universitetet i Oslo. Resultatene fra disse analysene er utgitt i en separat rapport (1). Etter at MS instrumentet ved FFI igjen var operativt, ble prøvene analysert på nytt. Det ble nå også utført mer grundige analyser for å oppnå et høyere identifikasjonsnivå i henhold til kriteriene i appendiks A enn det som ble oppnådd ved de tidligere analysene (1). Analyseprotokollen som ble benyttet er basert på arbeid utført av Defence Research Establishment Suffield (DRES) og FFI i fellesskap (2) og består av følgende punkter:

1. Fjerning av partikler og pH-justering
2. Renhets- og molekyllmassebestemmelse
3. Separasjon og fraksjonssamling dersom prøva inneholder flere forbindelser
4. Bestemmelse av antall disulfidbroer
5. Enzymatisk spalting og bestemmelse av massekart
6. Bestemmelse av aminosyresekvenser

2 EKSPERIMENTELT

2.1 Kjemikalier

Acetonitril, ACN, HPLC Ultra Gradient grade, J T Baker
 Metanol, MeOH. Ultra Resi-analyzed, J T Baker
 Saltsyre, HCl, Titrtisol 1 mol/l, Merck
 Kalsiumklorid dihydrat, p a, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck
 Ammoniumbikarbonat, p a, NH_4HCO_3 , Sigma
 Tris-(hydroksymetyl)-aminometan, TRIS, puriss p a, Fluka
 Trifluoreddiksyre, TFA, 98 %, Merck
 Jodacetamid, Sigma
 DL-Dithiothreitol, DTT, Sigma
 L-cystein, Sigma
 Gramicidin S, Sigma
 β -casein, Sigma
 HPLC peptid standard mixture, SIGMA

HPLC peptid standard mixture, inneholder 0,125 mg Gly-Tyr og 0,5 mg av hver av forbindelsene Val-Tyr-Val, methionin enkepalin, leucin enkepalin og angiotensin II pr vial. Testløsning ble tillaget ved å løse innholdet av en ampulle i 100 ml ionebyttet destillert vann : acetonitril (95 : 5). Dette gir 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ av Gly-Tyr og 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ av hver av forbindelsene Val-Tyr-Val, methionin enkepalin, leucin enkepalin og angiotensin II.

2.2 Reduktiv alkylering

Reagenser for reduktiv alkylering:

- 45 mM (6,96 mg/ml) dithiothreitol i NH_4HCO_3 buffer (pH 8)
- 100 mM (18,5 mg/ml) jodacetamid i NH_4HCO_3 buffer (pH 8)
- 200 mM (24,2 mg/ml) L-cystein i NH_4HCO_3 buffer (pH 8)

Reduktiv alkylering ble utført etter følgende prosedyre:

1. Sjekk pH i prøva og juster eventuelt til ca pH 8
2. Tilsett 10 μl 45 mM dithiothreitol til 100 μl av prøva
3. Plasser på vannbad ved 90 °C i 10 min
4. Avkjøl på isbad i 5 min
5. Tilsett 10 μl 100 mM jodacetamid
6. La stå ved romtemperatur i 15 min
7. Tilsett 10 μl 200 mM L-cystein
8. La stå ved romtemperatur i 2 min
9. Analyser produktet vha ESI-MS

Det må benyttes reagensrør av plast til opparbeiding av peptidprøver fordi peptidene kan bindes sterkt til glass.

2.3 Instrumentering

2.3.1 Væskekromatografi

Høytrykks væskekromatografi (HPLC) ble benyttet for å separere forbindelsene i prøvene og for å føre prøvene inn i massespektrometeret. HPLC-systemet bestod av en Rheodyne 8125 injektor med 5 µl prøveloop og en Waters 600MS pumpe. Kolonna som ble brukt var fused silica (15 cm x 0,32 mm ID) pakket med Kromasil ODS (5 µm partikler) ved G&T Septech i Oslo. Mobilfasen ble levert fra pumpa med en hastighet på 0,25 ml/min og splittet før injektoren, slik at hastigheten gjennom kolonna var 5 µl/min. To mobilfaser ble tillaget:

A: Filtrert ionebyttet vann : Acetonitrile (95:5) tilsatt 0,01 % TFA

B: Filtrert ionebyttet vann : Acetonitrile (5:95) tilsatt 0,01 % TFA

Separasjonen ble utført med en mobilfasegradient fra 5 % B til 95 % B i løpet av 20 min og deretter økning til 99 % B etter total tid 25 min (program: SIGMA_test_mix_99).

Ytelsen til kolonna ble testet daglig ved å injisere en testløsning med HPLC peptid standard mixture.

2.3.2 Elektrospray-massespektrometri

Massespektrometeret som ble brukt var et Finnigan MAT95Q hybrid (BEQQ) massepektrometer med Finnigan ESI II elektrospray tilkopling i positiv modus. Spenningen på elektrospray nåla var 3,0 kV og ionene ble akselerert inn i massespektrometeret ved hjelp av ei spenning på 4,8 kV. Spenningene på kapillær, tube lens, skimmer og oktapol ble optimalisert daglig med bruk av Gramicidin S (0,01 mg/ml i MeOH:H₂O (1:1)). Typiske verdier er: kapillær -10V, tube lens 90 V, skimmer 1,0 V og oktapol -3,8 V. Temperaturen brukt på elektrospray kapillæret var 220 °C. Nitrogen 5.0 ved 5 bars trykk ble benyttet som sheat gass ved analysene. Scanområdet var fra m/z 100 til m/z 1050 med hastighet 2 sekunder pr dekad ved bruk av lavt masseområde (SRANGE). Ved bestemmelse av aminosyresekvenser ble det benyttet et scanområde fra m/z 100 til m/z 1600 med hastighet 2 sekunder pr dekad i stort masseområde (LRANGE). En DEC station 5000/125 med ICL versjon 10.6 ble benyttet for å kontrollere massespektrometeret, mens programvaren ICIS II versjon 8.03HB ble benyttet for all databehandling.

2.3.3 Trypsinspalting

Enzymatisk spalting av peptidene ble utført ved hjelp av immobilisert trypsin pakket i ei 2,1 mm x 30 mm kolonne (Porozyme Immobilized Trypsin Cartridge fra PerSeptive Biosystems). Trypsinkolonna var koplet inn i et HPLC-system bestående av en Rheodyne 7125 injektor med 20 µl prøveloop, en LDC/Milton Roy Consta Metric III isokratisk pumpe, en Merck LaChrom L-7360 kolonneovn og en Perkin Elmer 135C UV-detektor. En LDC/Milton Roy CI-10B integrator ble benyttet for å monitorere spaltingsproduktene.

Tre buffere ble tillaget:

A Kondisjoneringsbuffer

3,03 g TRIS ble løst i 300 ml ionebyttet vann, 0,71 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ble tilsatt og bufferen justert til pH 8 med 1 M HCl. Bufferen ble deretter fortynnet til 500 ml med ionebyttet vann og filtrert gjennom 0,22 μm filter (Millipore).

B Vaskebuffer

Kondisjoneringsbufferen (A) ble tilsatt acetonitril 1:1

C Spaltingsbuffer

50 mM NH_4HCO_3 : Acetonitrile (95 : 5) ble filtrert gjennom 0,22 μm filter og pH justert om nødvendig til pH 8 med HCl eller NaOH. 50 mM NH_4HCO_3 ble laget ved å løse 3,95 g NH_4HCO_3 i 1 liter ionebyttet vann.

Trypsinkolonna ble kondisjonert før første gangs bruk, og deretter hver kveld, med 20 kolonnevolum (ca 0,1 ml) vaskebuffer (500 $\mu\text{l}/\text{min}$).

Enzymatisk spaltning av peptidene ble gjort ved å injisere prøva ved 20-30 $\mu\text{l}/\text{min}$ spaltingsbuffer (C) og en kolonnetemperatur på 37 °C. Minst 10 kolonnevolum spaltingsbuffer ble pumpet gjennom kolonna før første injeksjon. Forløpet av spaltningen ble fulgt ved hjelp av UV-detektoren ved bølgelengde 210 nm.

Effektiviteten til trypsin kolonna ble sjekket ved å spalte 1 mg/ml β -casein løst i spaltingsbuffer (C) og deretter å analysere produktene ved hjelp av HPLC-ESI-MS.

3 RESULTATER

3.1 Fjerning av partikler og pH-justering

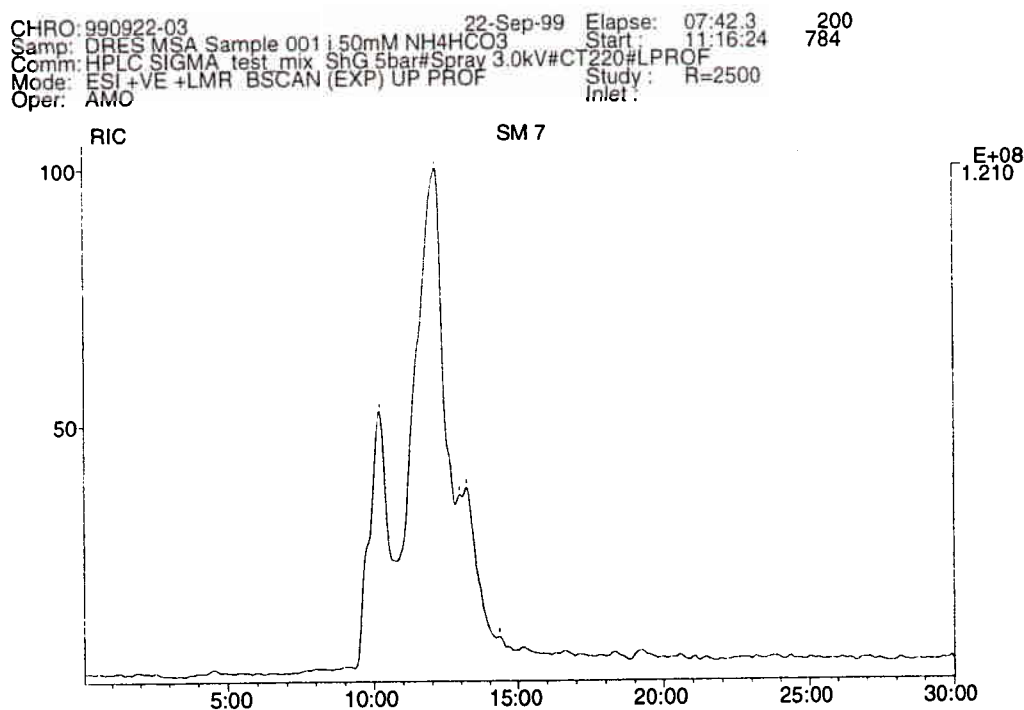
Prøvene ble mottatt fra DRES i Canada som rene frysetørrede forbindelser. Prøvene var merket DRES-MSA-001 og DRES-MSA-002. Det som var igjen av prøvene etter at de tidligere analysene var utført (1), dvs 100-200 μg av hver, ble løst i 200 μl 50 mM NH_4HCO_3 buffer. Denne bufferen ble valgt fordi den er lettløselig og kompatibel med MS-analyse og gir pH omkring 8. Denne pH er nødvendig for at reduktiv alkylering og enzymatisk spaltning ved hjelp av trypsin skal fungere. pH ble målt til ca 8 med pH-papir i begge prøvene slik at pH justering ikke var nødvendig. Det var heller ikke nødvendig å filtrere prøvene før analyse.

3.2 Renhets- og molekylmassebestemmelse

Ved hjelp av HPLC-ESI-MS med gradient eluering og et vidt scannområde på massespektrometeret, kan man finne ut om prøvene inneholder en blanding av flere komponenter, eller om den er relativt ren. Molekylmassen til de enkelte forbindelsene kan også bestemmes. Ved sammenligning med ulike databaser er det som oftest ikke behov for veldig

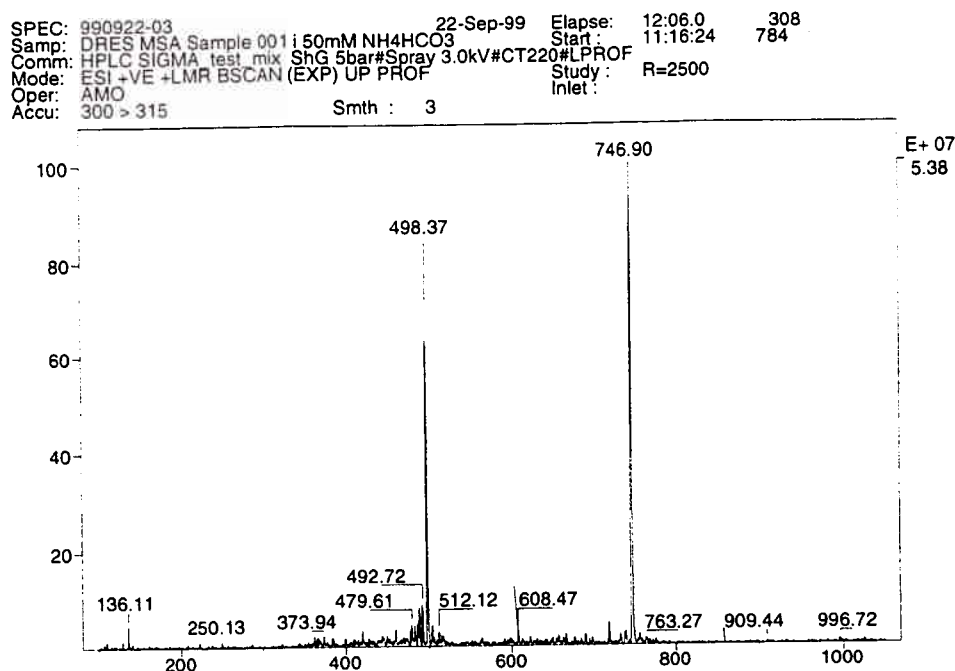
nøyaktig bestemmelse av molekylvektene. Bruk av et vidt scanområde under relativ lav oppløsning (f eks 2-3000) er oftest tilstrekkelig (massenøyaktigheten er avhengig av hvor god kalibreringen av instrumentet er). Dersom høyere massenøyaktighet er nødvendig, må prøva injiseres på nytt og scanområdet reduseres til et smalt område rundt den ønskede massen. Massekalibreringsløsning (polypropylenglykol) må også injiseres like før eller like etter prøva og resultatet massekorrigeres. Elektrisk scan gir best nøyaktighet og massenøyaktighet bedre enn 10 ppm (10 milliondeler av teoretisk masse) kan oppnås (3).

Et HPLC-ESI-MS kromatogram av prøve DRES-MSA-001 tatt opp ved oppløsning 2500 og vidt scanområde (100-1050 u) er gitt i Figur 3.1.



Figur 3.1 HPLC-ESI-MS kromatogram av forbindelsen DRES-MSA-001

Figur 3.1 viser at prøve DRES-MSA-001 inneholder hovedsakelig en forbindelse. Årsaken til den dårlige toppformen er at kolonna ble overbelastet med den høye konsentrasjonen. Dette har imidlertid ingen betydning for beregning av molekylmasse. Massespekteret av forbindelsen i Figur 3.1 er vist i Figur 3.2.



Figur 3.2 ESI spektrum av forbindelsen DRES-MSA-001

Ved å ekspandere området rundt ionene, ble monoisotopisk molekylmasse beregnet manuelt til 1491,97 u ved hjelp av metoden beskrevet i (3). Det er også mulig å benytte ICIS II programmet "BIOMASS Calculation". Ved hjelp av dette programmet, ble molekylmassen bestemt til $(1492,4 \pm 0.7)$ u som vist i Figur 3.3. FFI og DRES har utviklet en søkbar database med midtspektrum forbindelser der molekylmasse (monoisotopisk og midlere), CAS nummer, molekylformel og aminosyresekvens er registrert (4). Ved å sammenlikne med denne databasen, ble forbindelsen foreløpig identifisert som α -conotoxin MI med teoretisk monoisotopisk molekylmasse 1492,558 u. Den målte molekylmassen samsvarer godt med den teoretiske, spesielt siden målingene var gjort under relativt lav oppløsning og uten massekorrigering. Siden det ikke er utført massekorrigering, er det tilfeldig at BIOMASS Calculation gir bedre samsvar en manuell beregning.

SPEC: 990922-03
 Com1: BIOMASS: 1492.4.0.7
 Mode: ESI +VE +LMR BSCAN (EXP) UP PROF
 Base: 747.4
 Norm: 746.9
 Peak: 200.00 mmu
 Accu: 300 > 320

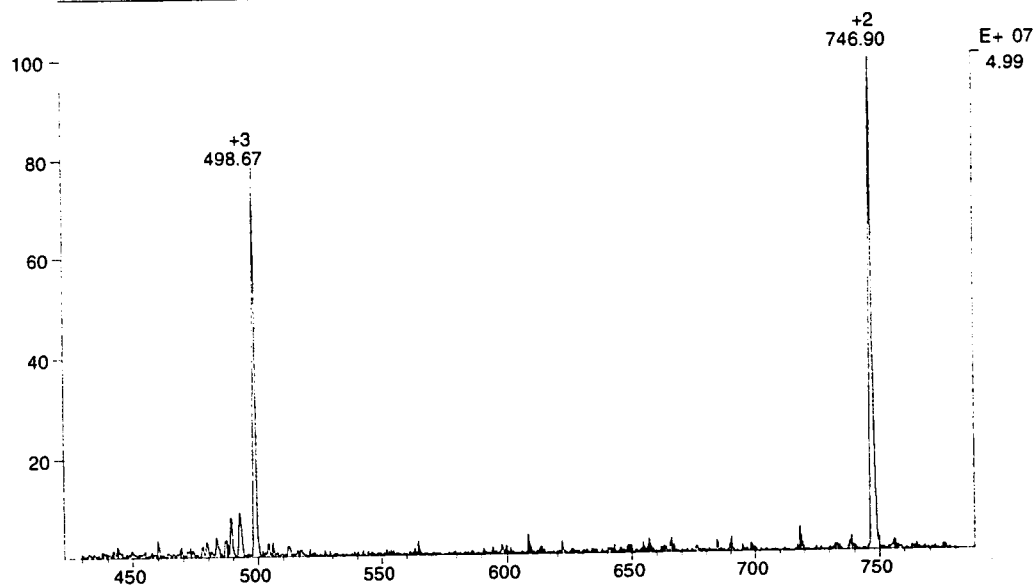
22-Sep-99

Elapse: 12:17.5
 Start : 11:16:24
 Study : R=2500
 Masses: 100 > 1050
 #peaks: 989

Inten : 4299583
 RIC : 112699191

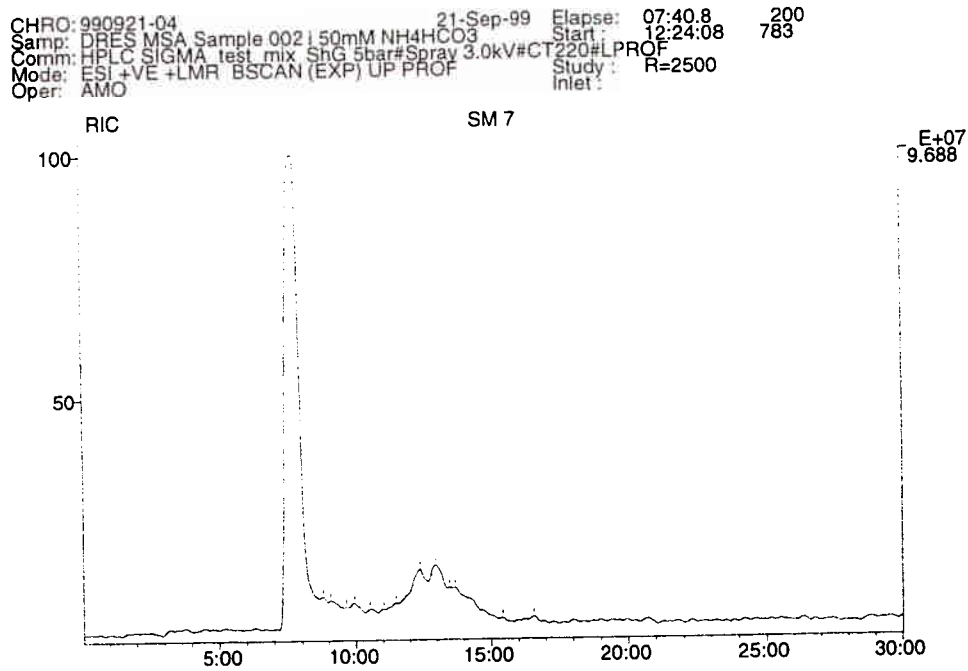
Smth : 3

325
784

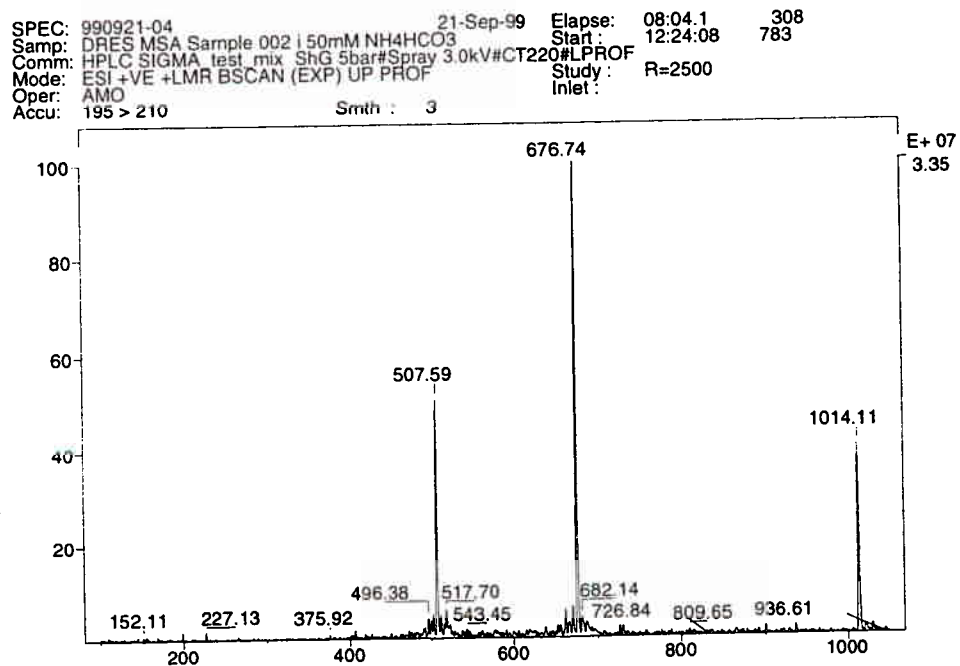


Figur 3.3 ESI spektrum av forbindelsen DRES-MSA-001 etter å ha benyttet BIOMASS Calculation programmet

HPLC-ESI-MS kromatogrammet av prøve DRES-MSA-002 er vist i Figur 3.4 og massespektrum av forbindelsen i Figur 3.5. På samme måte som ovenfor, ble monoisotopisk molekylmasse beregnet til 2025,22 u manuelt og $(2026,0 \pm 0,4)$ u ved hjelp av BIOMASS Calculation. Den forbindelsen i databasen som samsvarer best med dette er apamin med teoretisk monoisotopisk molekylmasse 2025,887.



Figur 3.4 HPLC-ESI-MS kromatoram av forbindelsen DRES-MSA-002



Figur 3.5 ESI spektrum av forbindelsen DRES-MSA-002

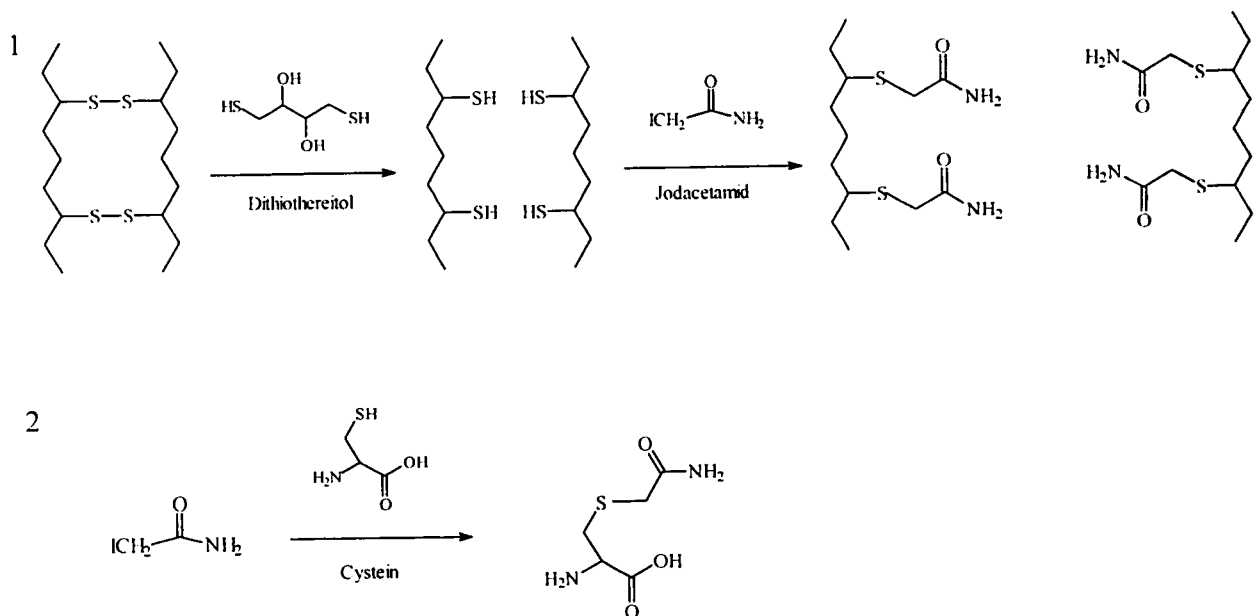
3.3 Separasjon og fraksjonssamling

Dersom HPLC-ESI-MS kromatogrammet viser at en prøve inneholder mange forbindelser, anbefales det at disse separeres og fraksjonssamles før videre analyser. Kromatogrammene av

DRES-MSA-001 og DRES-MSA-002 viser at prøvene hovedsakelig inneholdt en komponent. Fraksjonssamling var derfor ikke nødvendig.

3.4 Bestemmelse av antall disulfidbroer

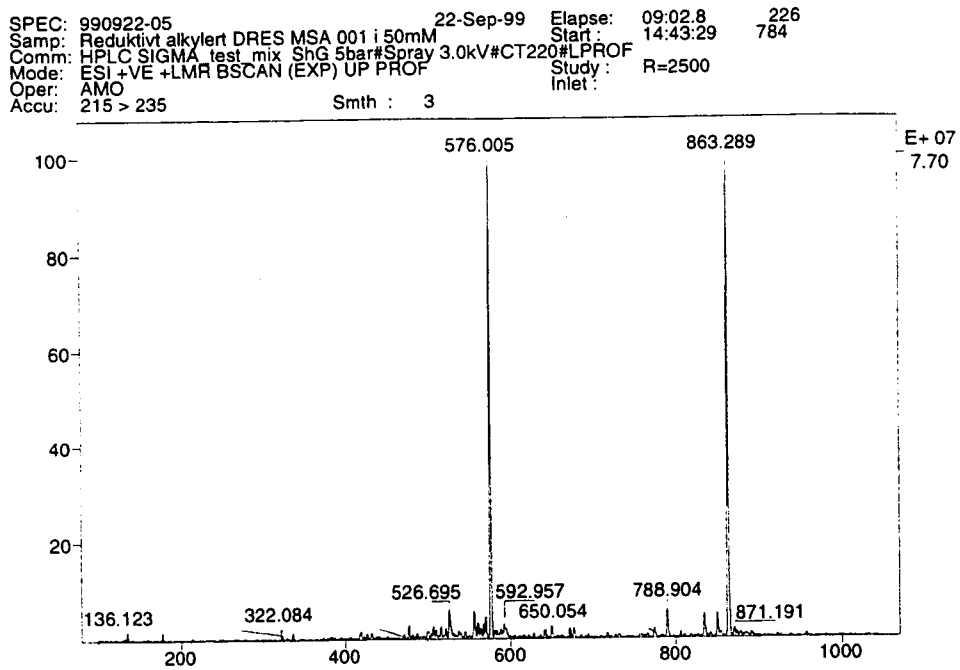
Dersom et peptid inneholder aminosyren cystein, kan det dannes en disulfidbro til cystein i samme peptid eller i et annet peptidmolekyl. Det kan derfor dannes både intramolekulære og intermolekulære disulfidbroer. Disse broene er en viktig faktor for å definere den romlige strukturen av peptidet, men kan hindre den enzymatiske spaltningen og må derfor brytes. Dette kan gjøres ved såkalt reduktiv alkylering som vist i Figur 3.6. Prosedyren er beskrevet i kapittel 2.2. Molekylmassen til peptidet vil øke med 116,1 u for hver disulfidbro, dvs 58,05 u for hver cystein. Ved å bestemme massen før og etter reduktiv alkylering, kan derfor antall broer bestemmes.



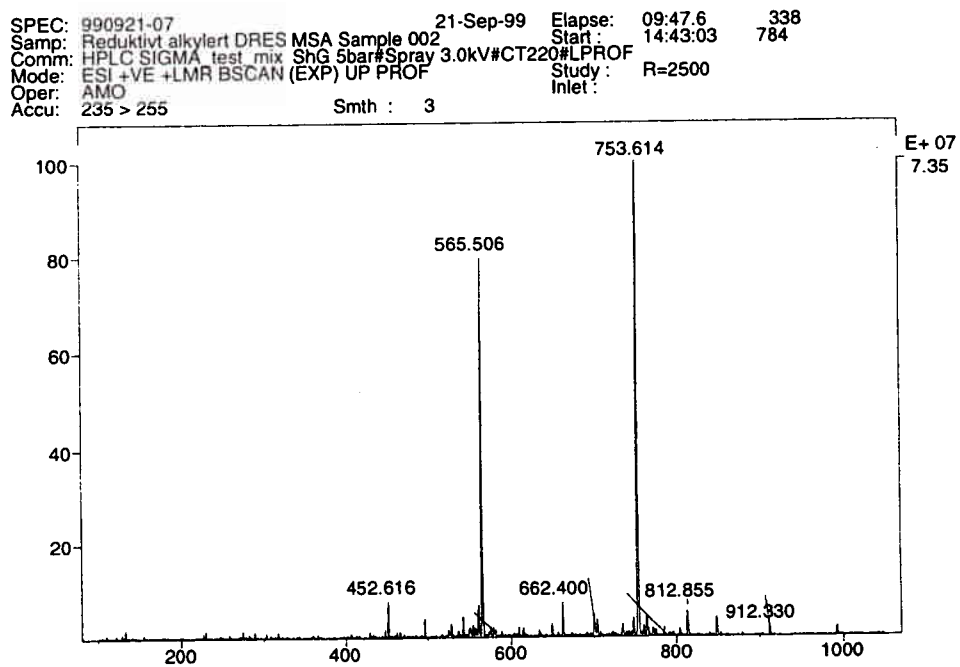
Figur 3.6 Skjematisk framstilling av reduktiv alkylering

Figur 3.7 viser ESI spektrum av prøva DRES-MSA-001 etter reduktiv alkylering. Manuell beregning gir nå en molekylmasse på 1723,76 u. Differansen er 231,8 u som tilsvarer to disulfidbroer. Dette stemmer med sekvensen til α -conotoxin MI som inneholder fire cystein og to disulfidbroer.

Tilsvarende, er molekylmassen for DRES-MSA-002 etter reduktiv alkylering beregnet til 2256,92 u (Figur 3.8). Dette er 231,7 u høyere enn før alkylering, noe som tyder på to disulfidbroer. Dette stemmer også overens med sekvensen for apamin som inneholder fire cystein.



Figur 3.7 ESI spektrum av reductivt alkylert DRES-MSA-001



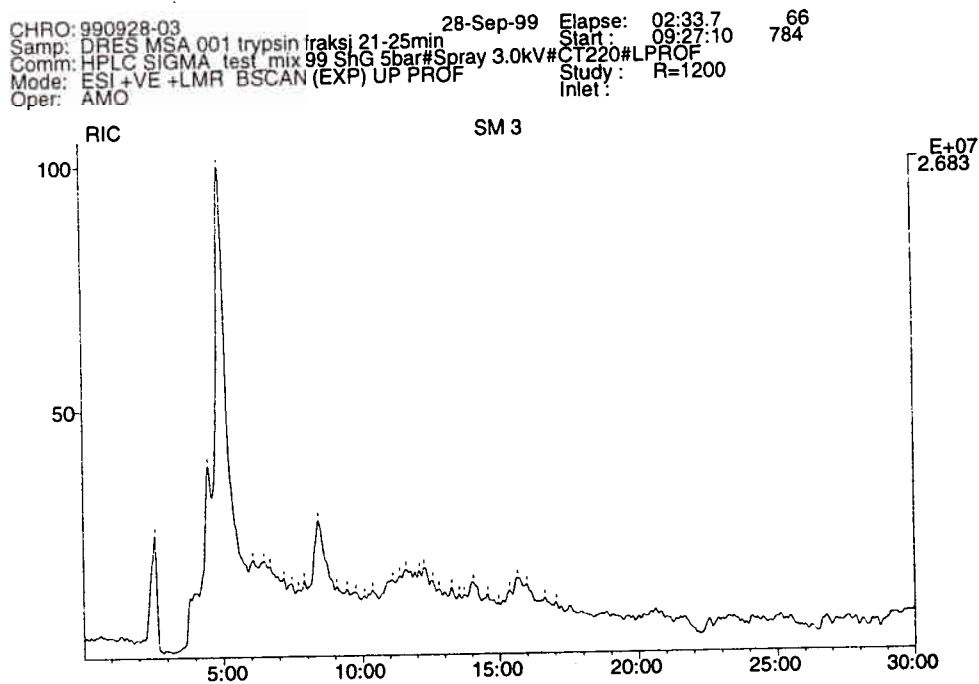
Figur 3.8 ESI spektrum av reductivt alkylert DRES-MSA-002

3.5 Enzymatisk spalting og bestemmelse av massekart

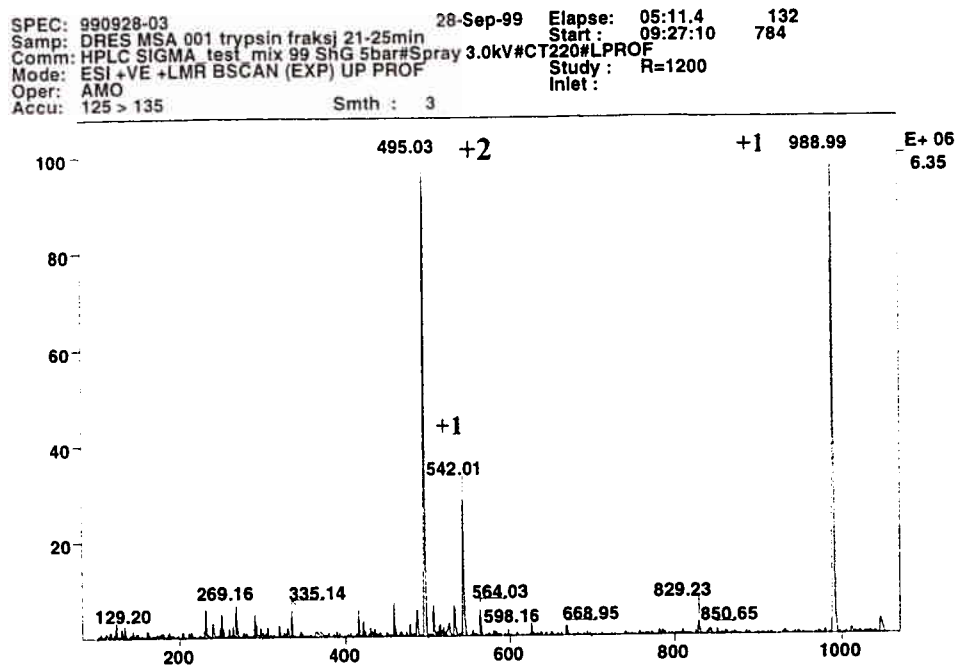
Etterhvert som størrelsen på peptidene øker, vil det bli vanskeligere å bestemme aminosyresekvensen ved hjelp av massespektrometri. Det er derfor vanlig å spalte peptidene i mindre deler ved hjelp av enzymer. Et mye brukt spaltingsenzym er trypsin som spalter

peptider selektivt på C-siden av aminosyrene arginin (R) og lysin (K). Ved å bestemme molekylmassene til de enkelte spaltingsproduktene, kan det lages et såkalt massekart som kan brukes til å søke i kommersielle protein/peptid databaser.

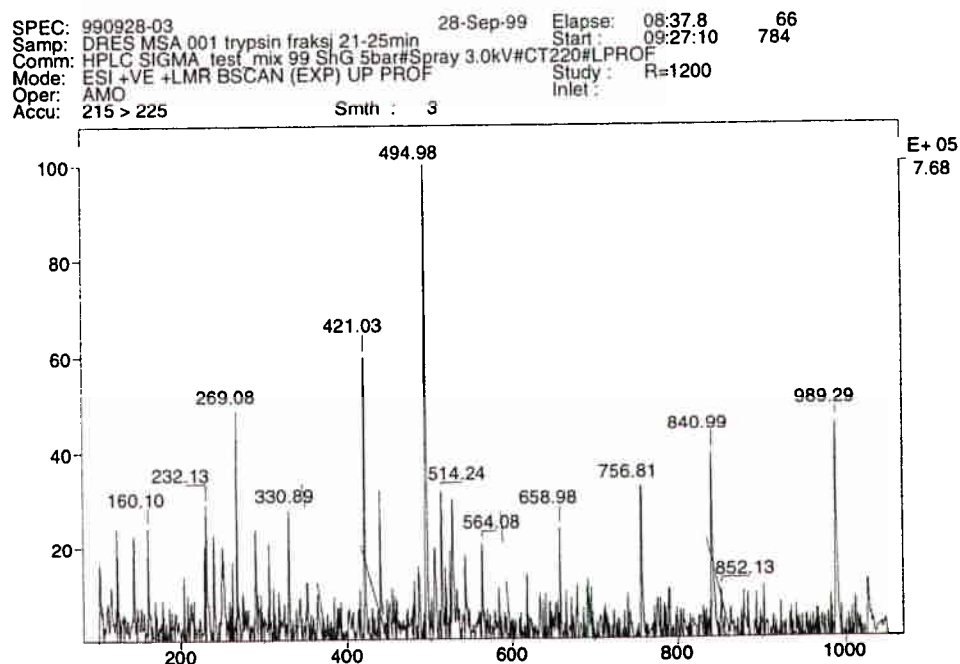
De reduktivt alkylerte prøvene ble enzymatisk spaltet ved å pumpe dem gjennom ei kolonne med immobilisert trypsin som beskrevet i kapittel 2.3.3. Eluatet fra trypsinkolonna ble samlet i fraksjoner på ca 4 min ved væskehastighet 20 µl/min. Forløpet ble monitorert med en UV-detektor ved 210 nm og den mest konsentrerte fraksjonen injisert på HPLC-ESI-MS. Totalionkromatogrammet (RIC) av en fraksjon fra prøve DRES-MSA-001 er vist i Figur 3.9. Minst to forbindelser kan observeres i kromatogrammet. ESI-massespektra fra toppene ved ca 5 min og 8,5 min er vist i henholdsvis Figur 3.10 og Figur 3.11. Det er her benyttet en masseoppløsning på R=1200.



Figur 3.9 Totalionkromatogram fra en fraksjon (21-25 min) etter trypsinspalting av reduktivt alkylert prøve DRES-MSA-001



Figur 3.10 ESI-massespektrum fra toppen ved ca 5 min fra kromatogrammet i Figur 3.9 (+1 angir enkeltladet og +2 dobbeltladet ion)



Figur 3.11 ESI-massespektrum fra toppen ved ca 8,5 min fra kromatogrammet i Figur 3.9

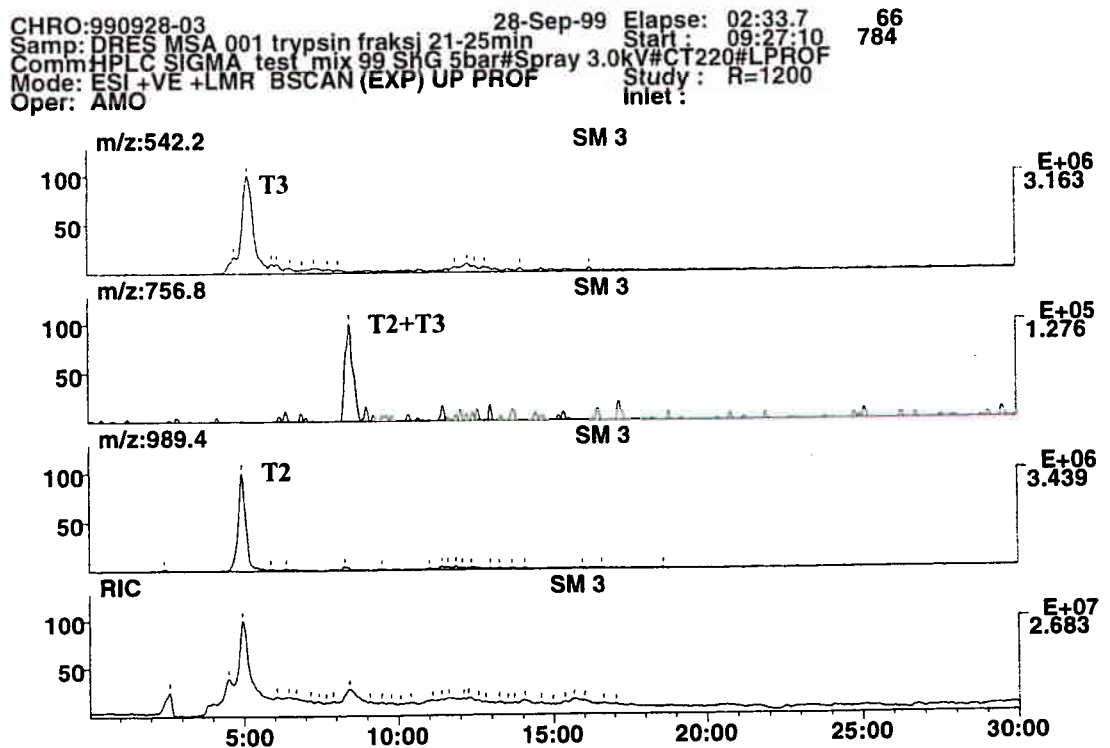
Figur 3.10 viser at toppen ved 5 min inneholder minst to forbindelser med kvasimolekylion ($[MH]^+$) henholdsvis 542 u og 989 u. Dette gir molekylmasser på henholdsvis 541 u og 988 u. Spekteret i Figur 3.11 viser så mange ioner at det er vanskelig å tolke umiddelbart. Man kan imidlertid ta utgangspunkt i at forbindelsen i DRES-MSA-001 allerede er foreløpig identifisert som α -conotoxin MI (med sekvens GRCCHPACGKNYSC-NH₂). Denne vil teoretisk kunne gi

trypsinfragmentene vist i Tabell 3.1. ICIS II programmet PEPM er benyttet til å beregne de teoretiske massene. Siden peptidet er reduktivt alkylert, må det legges til 57,04 u for hver cystein (C) i produktet i forhold til den teoretiske verdien. Dette er vist i de to siste kolonnene.

Produkt nr	Sekvens	Molekylmasse (monoisot) MH ⁺ (m/z)	Molekylmasse alkylert MH ⁺ (m/z)	Molekylmasse alkylert, dobbelt- ladet (M+2H) ²⁺ (m/z)
T1	GR	232,14		
T2	CCHPACGK	818,31	989,4	495,2
T3	NYSC	485,18	542,2	271,6
T1+T2	GRCCHPACGK	1031,43	1202,5	601,8
T2+T3	CCHPACGK NYSC	1284,47	1512,6	756,8

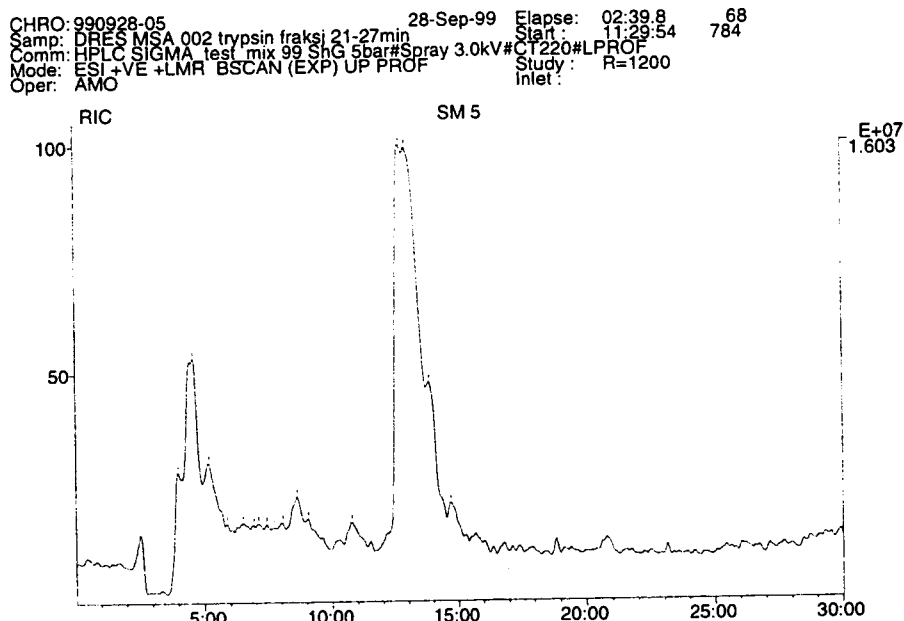
Tabell 3.1 Teoretiske produkter fra tryptinspalting av prøve DRES-MSA-001 og ved hvilke masser de vil observeres i massespekteret

Ved å plote massekromatogram for disse produktene kan vi sjekke om de er til stede i prøva. Noen massekromatogram er vist i Figur 3.12. Denne figuren viser at tryptinfragmentene T2, T3 og T2+T3 kan observeres i prøva. Dette bekrefter identiteten av α -conotoxin MI i prøva og "confirmed" identifikasjon er oppnådd i henhold til identifikasjonskriteriene (appendiks A).

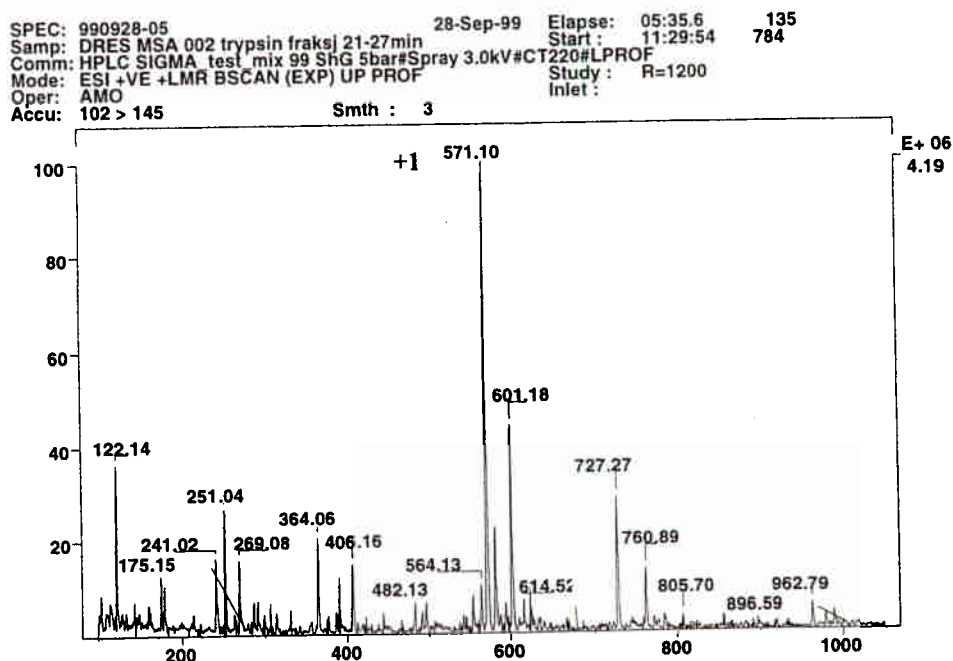


Figur 3.12 Noen massekromatogram fra en fraksjon (21-25 min) etter tryptinspalting av reduktivt alkylert prøve DRES-MSA-001

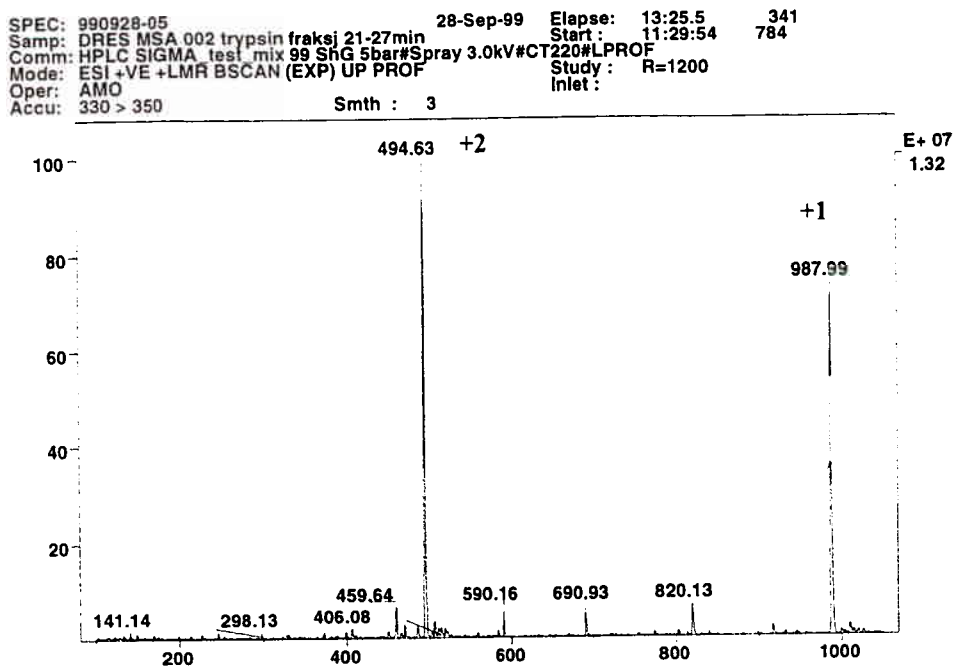
På samme måte som ovenfor, ble det foretatt trypsinspalting av reduktivt alkylert prøve DRES-MSA-002. Totalionkromatogrammet av en fraksjon fra denne prøva er vist i Figur 3.13. Her kan to topper observeres, der hver topp sannsynligvis består av flere komponenter. ESI-massespektra fra toppene ved ca 5 min og 13 min er vist i henholdsvis Figur 3.14 og Figur 3.15 (masseoppløsning $R=1200$).



Figur 3.13 Totalionkromatogram fra en fraksjon (21-27 min) etter trypsinspalting av reduktivt alkylert prøve DRES-MSA-002



Figur 3.14 ESI-massespektrum fra toppen ved ca 5 min fra kromatogrammet i Figur 3.13 (+1 angir enkeltladet ion)



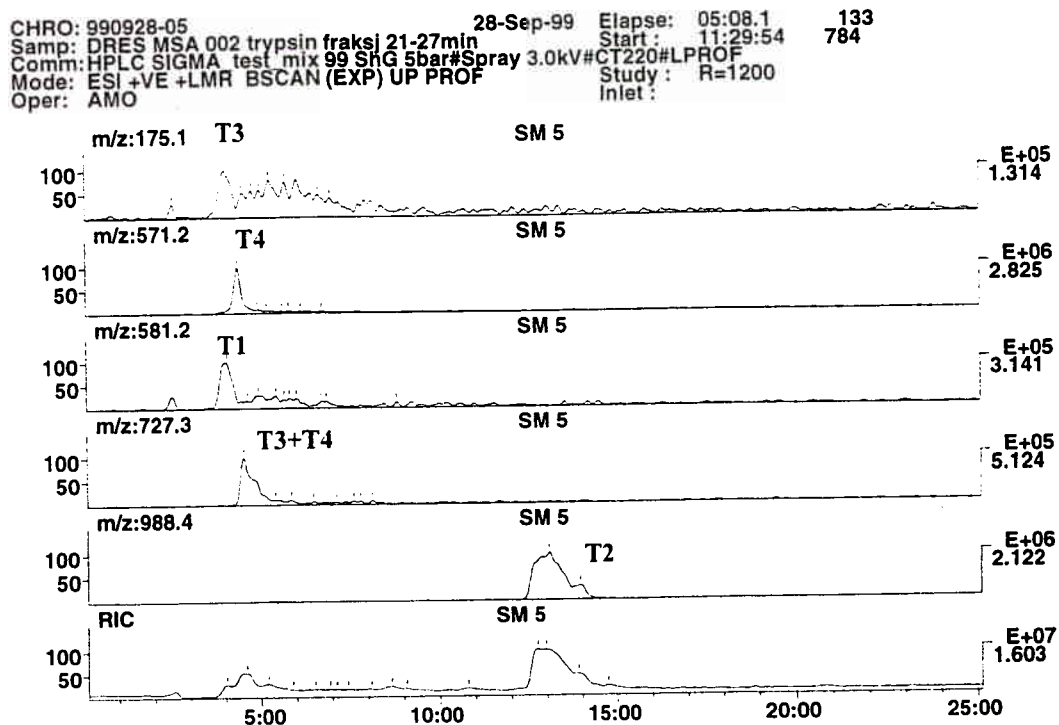
Figur 3.15 ESI-massespektrum fra toppen ved ca 13 min fra kromatogrammet i Figur 3.13 (+1 angir enkeltladet og +2 dobbeltladet ion)

Et produkt med molekylmasse 987 u (kvasimolekylion 988 u) er tydelig i Figur 3.15 og blant annet et produkt med molekylmasse 570 u (kvasimolekylion 571 u) i Figur 3.14. Ved å ta utgangspunkt i at forbindelsen allerede er foreløpig identifisert som apamin med sekvens CNCKAPETALCARRCQQH-NH₂, kan teoretiske spaltingsprodukter beregnes (Tabell 3.2).

Produkt nr	Sekvens	Molekylmasse (monoisot) MH ⁺ (m/z)	Molekylmasse alkylert MH ⁺ (m/z)	Molekylmasse alkylert, dobbelt- ladet (M+2H) ²⁺ (m/z)
T1	CNCK	467,17	581,2	291,1
T2	APETALCAR	931,47	988,5	494,7
T3	R	175,12		
T4	CQQH	514,22	571,2	286,1
T1+T2	CNCKAPETALCAR	1379,62	1550,6	775,8
T2+T3	APETALCARR	1087,57	1144,6	572,8
T3+T4	RCQQH	670,32	727,3	364,1

Tabell 3.2 Teoretiske produkter fra trypsinspalting av prøve DRES-MSA-002 og ved hvilke masser de vil observeres i massespekteret

Ved å plote massekromatogram for disse produktene kan vi sjekke om de er til stede i prøva. Noen massekromatogram er vist i Figur 3.16. Kromatogrammene viser at trypsinfragmentene T1, T2, T3, T4, T1+T2 (ikke vist) og T3+T4 kan observeres i prøva. Dette bekrefter identiteten av apamin i prøva og "confirmed" identifikasjon er oppnådd i henhold til identifikasjonskriteriene (appendiks A).

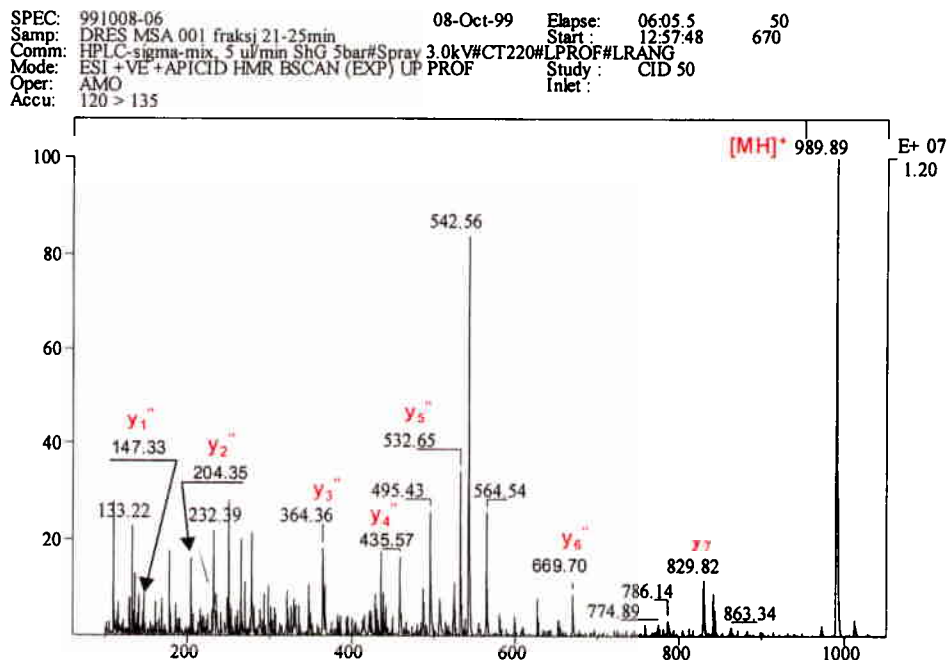


Figur 3.16 Noen massekromatogram fra en fraksjon (21-27 min) etter tryptinspalting av reduktivt alkylert prøve DRES-MSA-002

3.6 Bestemmelse av aminosyresekvens

For å oppnå utvetydig identifikasjon i henhold til NATOs identifikasjonskriterier (appendiks A), kreves blant annet at aminosyresekvensen stemmer overens med en autentisk referansestandard. Sekvensdata for prøve og standard må dessuten være samlet inn under identiske eksperimentelle betingelser. Aminosyresekvenser av tryptinfragmentene kan blant annet bestemmes ved hjelp av elektropray massespektrometri ved såkalt kollisjonsindusert fragmentering (CID). På vårt massespektrometer skjer dette inne i elektropray ionekilden (skimmer CID eller in-source CID) ved å øke spenningene på kapillær og tube lens. Ved hjelp av denne teknikken kan man få sekvensinformasjon fra de fleste fragmentene som dannes ved tryptinspalting. I denne rapporten er det vist noen eksempler på sekvensering av peptidfragmentene som framkom ved tryptinspalting av de reduktivt alkylerte prøvene.

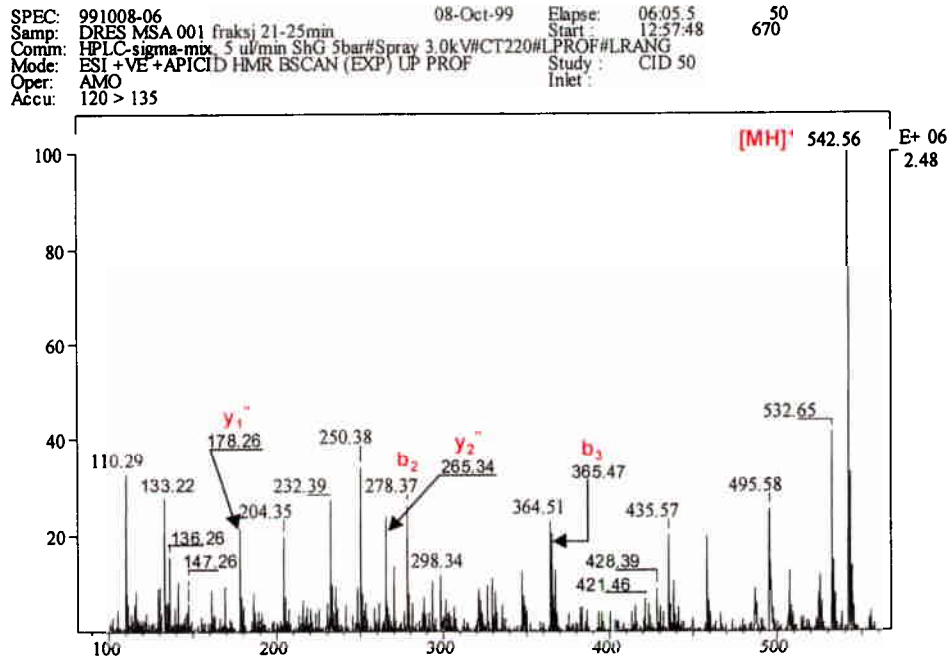
De samme fraksjonene fra tryptinkolonna som ble analysert for å bestemme massekart (kapittel 3.5), ble injisert under ESI-betingelser som fremmer fragmentering. En relativt lav masseoppløsning ble brukt ($R=1200$). CID massespekteret av tryptinproduktet T2 fra prøve DRES-MSA-001 er vist i Figur 3.17. Massene ligger ca 0,5 u over teoretisk verdi fordi det ble benyttet et vidt masseområde (LRANGE) fra 100 til 1600 u. Massekalibreringen i dette området var noe dårligere enn i det lave området (SRANGE).



Figur 3.17 CID massespektrum av trypsinproduktet T2 fra reduktivt alkylert prøve DRES-MSA-001 (fraksjon 21-25 min). Intensiteten til massene opp til 950 u er forstørret fire ganger. Spenningene på kapillær og tube lens er økt med 50 V i forhold til utgangsverdiene

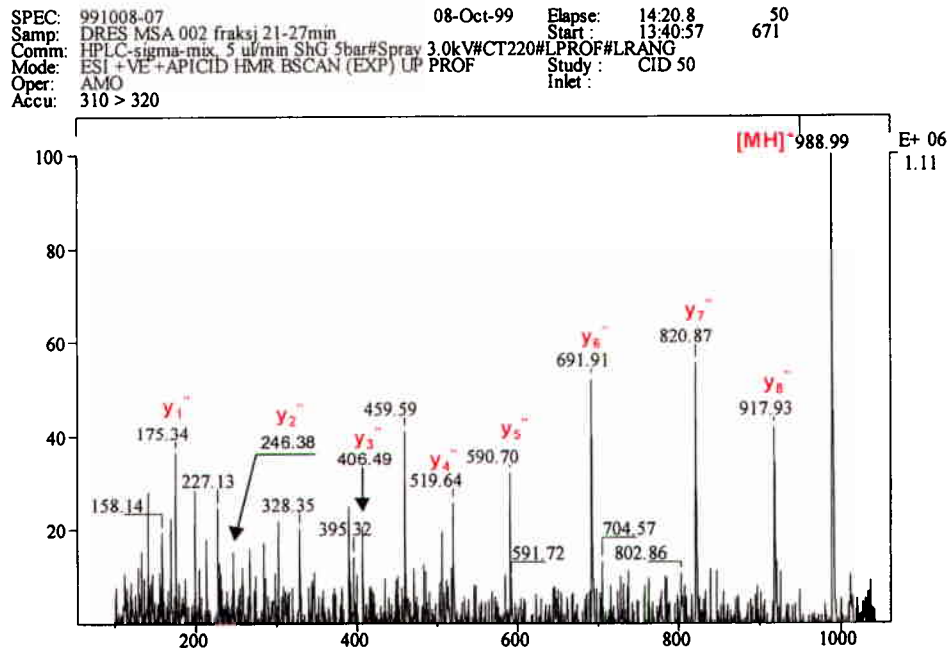
Figur 3.17 viser at alle y'' -serie ionene (y_7'' til y_1'') fra T2 ble observert i CID massespekteret. y'' -serie ioner framkommer ved suksessiv avspalting av en og en aminosyre fra N-terminalen, mens ladningen blir sittende på den resterende delen. Ved å se på avstanden mellom y'' -ionene, ble sekvensen til T2 (CCHPACGK) verifisert. Siden prøva var reduktivt alkylert, må det legges til 57,04 u for hver cystein (C) i forhold til den teoretiske verdien.

Trypsinfragmentene T2 og T3 fra prøve DRES-MSA-001 har tilnærmet samme retensjonstid på HPLC (Figur 3.12). CID ionene fra fragmentet T3 overlapper derfor med ionene fra T2. CID ionene fra T3 er vist i Figur 3.18. Denne figuren viser det samme massespekteret som i Figur 3.17, bortsett fra at kun masseområdet fra 100 u til 550 u er vist. Figur 3.18 viser at sekvensionene y_2'' og y_1'' kan observeres sammen med ionene b_3 og b_2 . b -serie sekvensioner framkommer ved suksessiv avspalting av en og en aminosyre fra C-terminalen, mens ladningen blir sittende på den resterende delen. Selv om ikke alle sekvensionene i en serie ble observert for T3, bekrefter allikevel de observerte ionene den antatte sekvensen (NYSC).



Figur 3.18 CID massespektrum av trypsinproduktet T3 fra reduktivt alkylert prøve DRES-MSA-001 (fraksjon 21-25 min). Spenningene på kapillær og tube lens er økt med 50 V i forhold til utgangsverdiene

På samme måte som ovenfor, ble CID massespektra av trypsinfragmentene fra prøve DRES-MSA-002 tatt opp. Også her ligger massene ca 0,5 u over teoretisk verdi. Figur 3.19 viser CID massespekteret av trypsinproduktet T2 fra prøve DRES-MSA-002.



Figur 3.19 CID massespektrum av trypsinproduktet T2 fra reduktivt alkylert prøve DRES-MSA-002 (fraksjon 21-27 min). Intensiteten til massene opp til 950 u er forstørret to ganger. Spenningene på kapillær og tube lens er økt med 50 V i forhold til utgangsverdiene

Figur 3.19 viser at alle y'' -serie ionene (y_8'' til y_{11}'') fra T2 ble observert i CID massespekteret. Ved å se på avstanden mellom y'' -ionene, ble sekvensen til T2 (APETALCAR) verifisert. Siden prøva var reduktivt alkylert, må det også her legges til 57,04 u for hver cystein (C) i forhold til den teoretiske verdien.

Som det går fram av de foregående figurene, er det ikke alltid de mest intense ionene i massespekteret som gir en serie sekvensjoner. Det kan derfor være vanskelig å bestemme aminosyresekvensen til en helt ukjent forbindelse ved hjelp av ESI-MS. Teknikken er imidlertid meget nyttig for å bekrefte en mulig sekvens som er antatt på bakgrunn av andre målinger (molekylmasse, antall disulfidbroer, etc).

4 KONKLUSJON

Ved hjelp av HPLC-ESI-MS og analyseprotokollen som er utarbeidet av FFI i samarbeid med DRES i Canada, ble to ukjente peptider identifisert. Protokollen viste seg å fungere godt for disse prøvene som bestod av rene stoffer. Det vil være ønskelig å teste ut protokollen også for prøver som inneholder en blanding av flere peptider og for mer forurensede miljøprøver. Et arbeid er allerede utført for å utvikle en metode for opparbeidelse av vannprøver basert på fast-fase ekstraksjon (5).

Fire dager ble brukt til analysene. Ved å sammenholde resultatene med NATOs identifikasjonskriterier (appendiks A), ble "confirmed" identifikasjon oppnådd. Ved at aminosyresekvensene for prøvene ble bestemt, var vi også på god vei mot utvetydig ("unambiguous") identifikasjon. Det som manglet for å nå dette målet, var at autentiske referanseforbindelser måtte vært analysert under identiske analysebetingelser og gitt sammenfallende resultater. Grunnen til at dette ikke ble utført, var mangel på referanseforbindelser. De kromatografiske analysene måtte også vært utført med to ulike analysebetingelser og gitt sammenfallende resultater.

APPENDIKS

A IDENTIFIKASJONSKRITERIER FOR MIDT-SPEKTRUM FORBINDELSER

8.5.3 Identification Criteria for Mid-Spectrum Agents

8.5.3.1 Three levels of identification have been defined as follows to indicate the increasing level of certainty associated with each.

8.5.3.2 **PROVISIONAL IDENTIFICATION:** A mid-spectrum agent may be considered provisionally identified when one of the following criteria has been met:

- I The chromatographic retention data acquired for the mid-spectrum agent under two different experimental conditions matches that of known mid-spectrum data; or
- II The molecular mass of the mid-spectrum agent, determined by MS, matches that of known mid-spectrum agent data; or
- III A specific immunological assay registers a positive response.

8.5.3.3 **CONFIRMED IDENTIFICATION:** The identification of a mid-spectrum agent is confirmed when any two of the three criteria for provisional identification have been met or:

- I In the case of proteinaceous mid-spectrum agents, the molecular mass and corresponding mass map of the enzymatic digestion products (with a minimum of three products) matches that of known mid-spectrum agent data.

8.5.3.4 **UNAMBIGUOUS IDENTIFICATION:** Unambiguous identification provides the highest level of certainty required for the development of strategic and political positions. The identification of a mid-spectrum agent is **unambiguous** when the following conditions have been met:

For non-proteinaceous mid-spectrum agents:

- I The chromatographic retention data acquired for the mid-spectrum agent and spectra acquired using two different spectrometric techniques (MS, NMR or IR) match that for an authentic reference standard acquired under identical experimental conditions. If the molecular ion is not present in the mass spectrum, techniques such as chemical ionisation or electrospray mass spectrometry must be carried out to confirm the molecular mass.

For proteinaceous mid-spectrum agents:

- I The chromatographic retention data acquired for the mid-spectrum agent under two different experimental conditions matches that of an authentic reference standard acquired under identical experimental conditions or a specific immunological assay registers a positive response; and
- II The molecular mass and corresponding mass map of the enzymatic digestion products (with a minimum of three products) matches that for an authentic reference standard acquired under identical experimental conditions; and
- III Sequence data for the mid-spectrum agent matches that for an authentic reference standard acquired under identical experimental conditions.

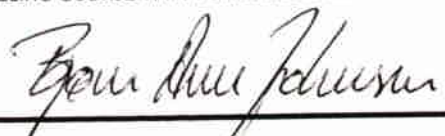
Litteratur

- (1) Tørnes J Aa (1999): Analysis of samples for a training exercise with mid-spectrum agents in February 1999, FFI/RAPPORT-99/04652, Forsvarets forskningsinstitutt, Ugradert
- (2) Hancock J R, Provost L R, D'Agostino P A, Tørnes J Aa (1998): A Method for the Sample Handling and Analysis of Bio-active Peptides, SR 699, Defence Research Establishment Suffield
- (3) Tørnes J Aa (1998): Nøyaktig molekylmassebestemmelse av peptider ved hjelp av elektropray-massespektrometri, FFI/RAPPORT-98/01735, Forsvarets forskningsinstitutt, Ugradert
- (4) Tørnes J Aa (1998): A computer searchable database of mid-spectrum agents of interest to SIBCA, FFI/RAPPORT-98/03006, Forsvarets forskningsinstitutt, Begrenset
- (5) Opstad Aa M, Tørnes J Aa (2001): Analysis of MID-spectrum agents in aqueous samples by using bradykinin as a test compound, FFI/RAPPORT-2001/00642, Forsvarets forskningsinstitutt, Ugradert

FORDELINGSLISTE

FFIBM

Dato: 7 mars 2001

RAPPORTTYPE (KRYSS AV)		RAPPORT NR.	REFERANSE	RAPPORTENS DATO	
<input checked="" type="checkbox"/> RAPP	<input type="checkbox"/> NOTAT	<input type="checkbox"/> RR	2001/01354	FFIBM/757/138	7 mars 2001
RAPPORTENS BESKYTTELSESGRAD			ANTALL EKS UTSTEDT	ANTALL SIDER	
UGRADERT			60	30	
RAPPORTENS TITTEL			FORFATTER(E)		
ANALYSE AV NOEN UKJENTE MIDT-SPEKTRUM FORBINDELSER VED HJELP AV ELEKTROSPRAY-MASSESPEKTROMETRI			TØRNES John Aa, OPSTAD Aase M		
FORDELING GODKJENT AV FORSKNINGSSJEF:			FORDELING GODKJENT AV AVDELINGSSJEF:		
					

EKSTERN FORDELING

INTERN FORDELING

ANTALL	EKS NR	TIL	ANTALL	EKS NR	TIL
			14		FFI-Bibl
1		FABCS	1		Adm direktor/stabssjef
1		v/Maj Per Ballangrud	1		FFIE
1		v/Kapt Åge Rolland	1		FFISYS
			3		FFIBM
1		FO/HST	1		FFIN
1		v/Maj Arne Helling			
			1		Leif Haldor Bjerkeseth, FFIBM
1		FO/LST/BFI	1		Odd Busmundrud, FFIBM
1		v/Oblt Helge Fjellbirkeland	1		Alexander F Christensen, FFIBM
			1		Monica Endregard, FFIBM
1		KNM T/HAS	1		Else Marie Fykse, FFIBM
1		v/OK Arne Søyland	1		Hans Christian Gran, FFIBM
			1		Fatima Hussain, FFIBM
1		HFK	1		Bjørn Arne Johnsen, FFIBM
1		v/Kapt Baard O Nilsen	1		Jaran Strand Olsen, FFIBM
			1		Aase Mari Opstad, FFIBM
1		LFK	1		Bjørn Pedersen, FFIBM
1		v/Kapt Vebjørn Hanssen	1		Gunnar Skogan, FFIBM
			4		John Aasulf Tørnes, FFIBM
1		SFK			
1		v/Lt Geir Sætre			FFI-veven
1		VETINSP			
1		Universitetet i Oslo			
		Kjemisk Institutt			
		Boks 1033 Blindern			
		0315 OSLO			
1		v/Prof Tyge Greibrokk			
1		v/l Aman Elsa Lundanes			
1		v/Thomas Bjellaas			

FFI-K1

Retningslinjer for fordeling og forsendelse er gitt i Oraklet, Bind I, Bestemmelser om publikasjoner for Forsvarets forskningsinstitutt, pkt 2 og 5. Benytt ny side om nødvendig.

EKSTERN FORDELING

INTERN FORDELING

ANTALL	EKS NR	TIL	ANTALL	EKS NR	TIL
1		Totalförsvarets forskningsinstitut Avd for NBC-skydd Cementvägen 20 SE-901 82 UMEÅ SVERIGE			
1		v/Martin Nygren			
1		v/Sten-Åke Fredriksson			
		www.ffi.no			