



Contribution de la LC-ESI-MS-MS à l'analyse de séquences d'oligomères de la 2,5-diméthylaniline

Lucien Kerhoas, Albert Kollmann, Francois Boyer, Paul Henri Ducrot, Claude Jolivalt, Christian Mougin, Jacques Einhorn

► To cite this version:

Lucien Kerhoas, Albert Kollmann, Francois Boyer, Paul Henri Ducrot, Claude Jolivalt, et al.. Contribution de la LC-ESI-MS-MS à l'analyse de séquences d'oligomères de la 2,5-diméthylaniline. 20èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, Sep 2003, Toulouse, France. 2003. hal-01600359

HAL Id: hal-01600359

<https://hal.science/hal-01600359>

Submitted on 19 Mar 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

CONTRIBUTION DE LA LC-ESI-MS-MS A L'ANALYSE DE SEQUENCES D'OLIGOMERES DE LA 2,5-DIMETHYLANILINE

L. Kerhoas¹, A. Kollmann¹, F.-D. Boyer¹, P.-H. Ducrot¹, C. Jolival², C. Mougin¹, J. Einhorn¹

1- Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, INRA, route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex, France.
2- ENSCP, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05, France.

INTRODUCTION

Les laccases fongiques sont des oxydases exocellulaires impliquées dans de nombreuses réactions de biotransformation de produits naturels (matériaux ligno-cellulosiques) ou xénobiotiques (pesticides, polluants industriels et domestiques...). De ce fait, elles présentent un grand intérêt sur le plan biotechnologique. Pour développer de telles applications comme pour réaliser les études structurales de ces enzymes, il est nécessaire de disposer de fortes quantités d'enzymes. L'induction par des agents chimiques est un moyen classique pour aboutir à cette hyperproduction. La 2,5-diméthylaniline est un inducteur utilisé depuis plusieurs décennies [1,2] mais son mode d'action est toujours inconnu. Cependant, il semble exister un lien entre sa métabolisation, caractérisée par une forte coloration rouge des cultures fongiques, et son pouvoir inducteur. Notre objectif était donc dans un premier temps d'identifier les produits de transformation de la 2,5-diméthylaniline. La structure de ces composés, obtenus après isolement du milieu de culture et fractionnement chromatographique, a été établie par IR, UV, RMN 13C, 1H et spectrométrie de masse. Les molécules identifiées comportent de 2 à 5 unités aromatiques (diméthylaniline, diméthylphényle, diméthyl-iminobenzoquinone ...) associées selon des enchaînements divers. La LC-ESI-MS-MS a permis d'établir sans ambiguïté la séquence des métabolites de plus haute masse.

MATERIEL ET METHODES

PREPARATION DES COMPOSES

Après addition de 2,5-diméthylaniline (5 g/L) au milieu de culture de *Trametes versicolor*, on laisse incuber pendant 5 jours à température ambiante et sous agitation. Après extraction par CH₂Cl₂ et évaporation à sec, le résidu est purifié successivement par chromatographie sur colonne de silice ouverte et par HPLC préparative (silice puis C18). Les différents composés colorés ont été caractérisés par RMN (1H et 13C), IR, UV visible et analysés par spectrométrie de masse.

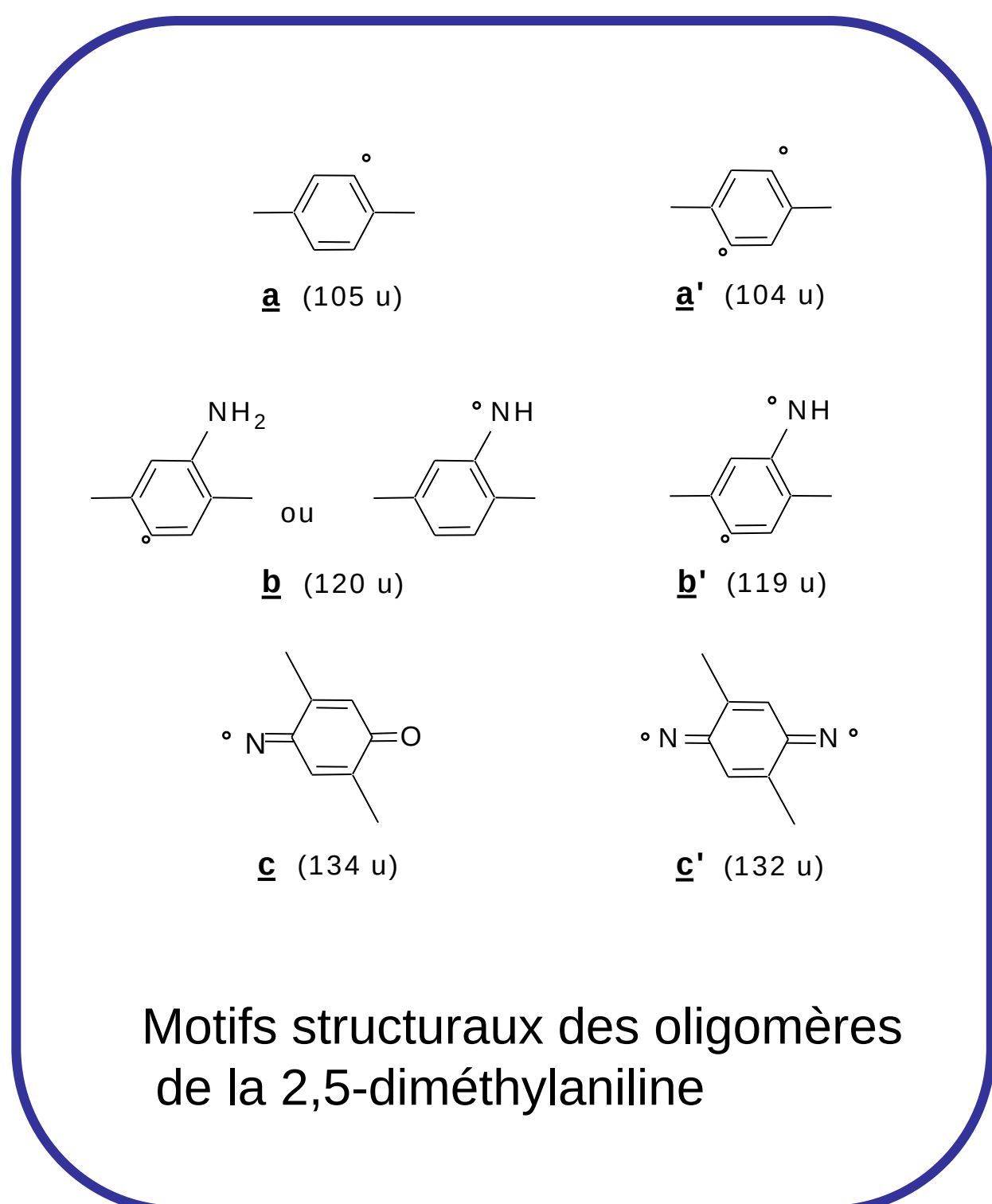
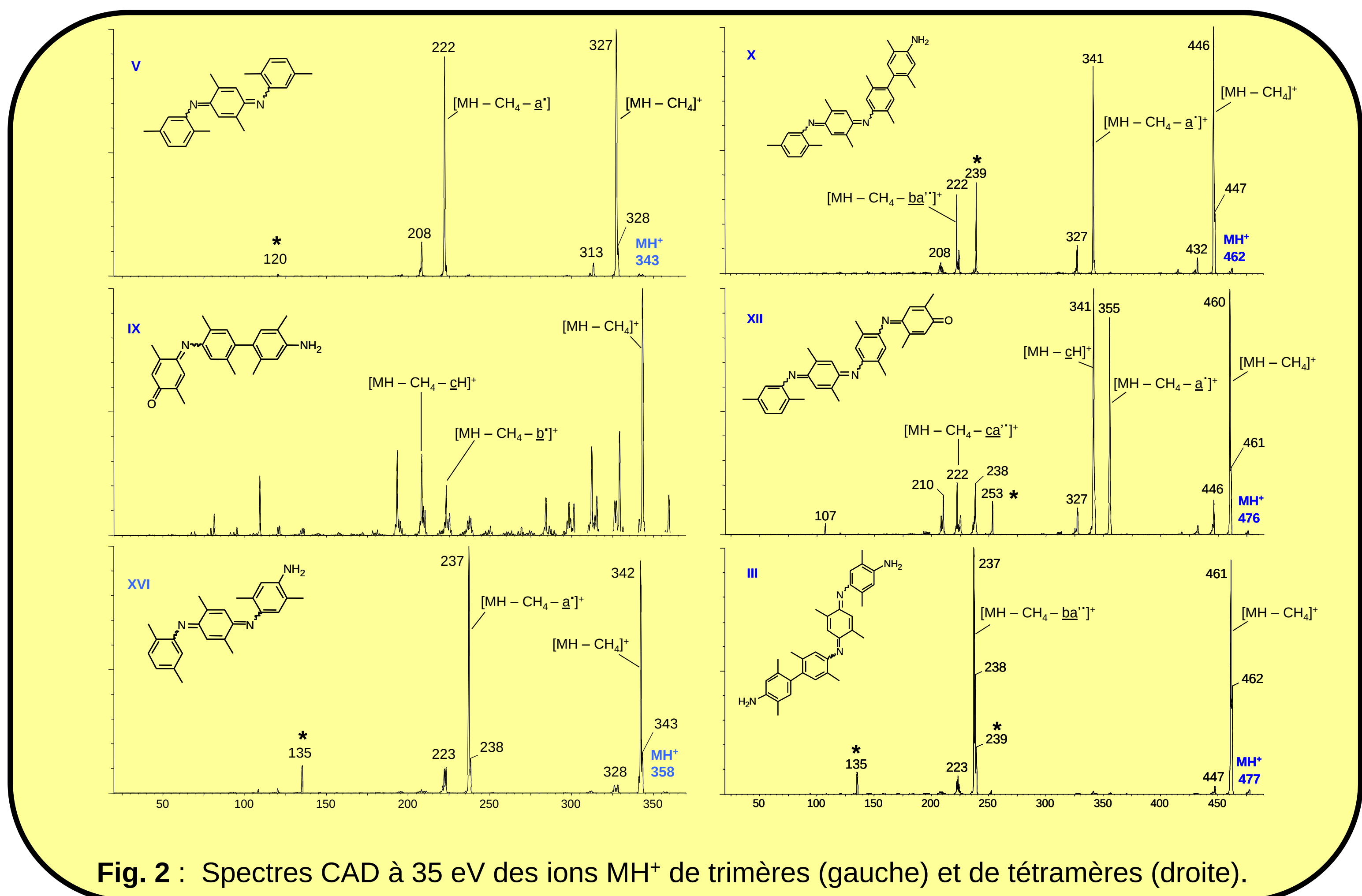
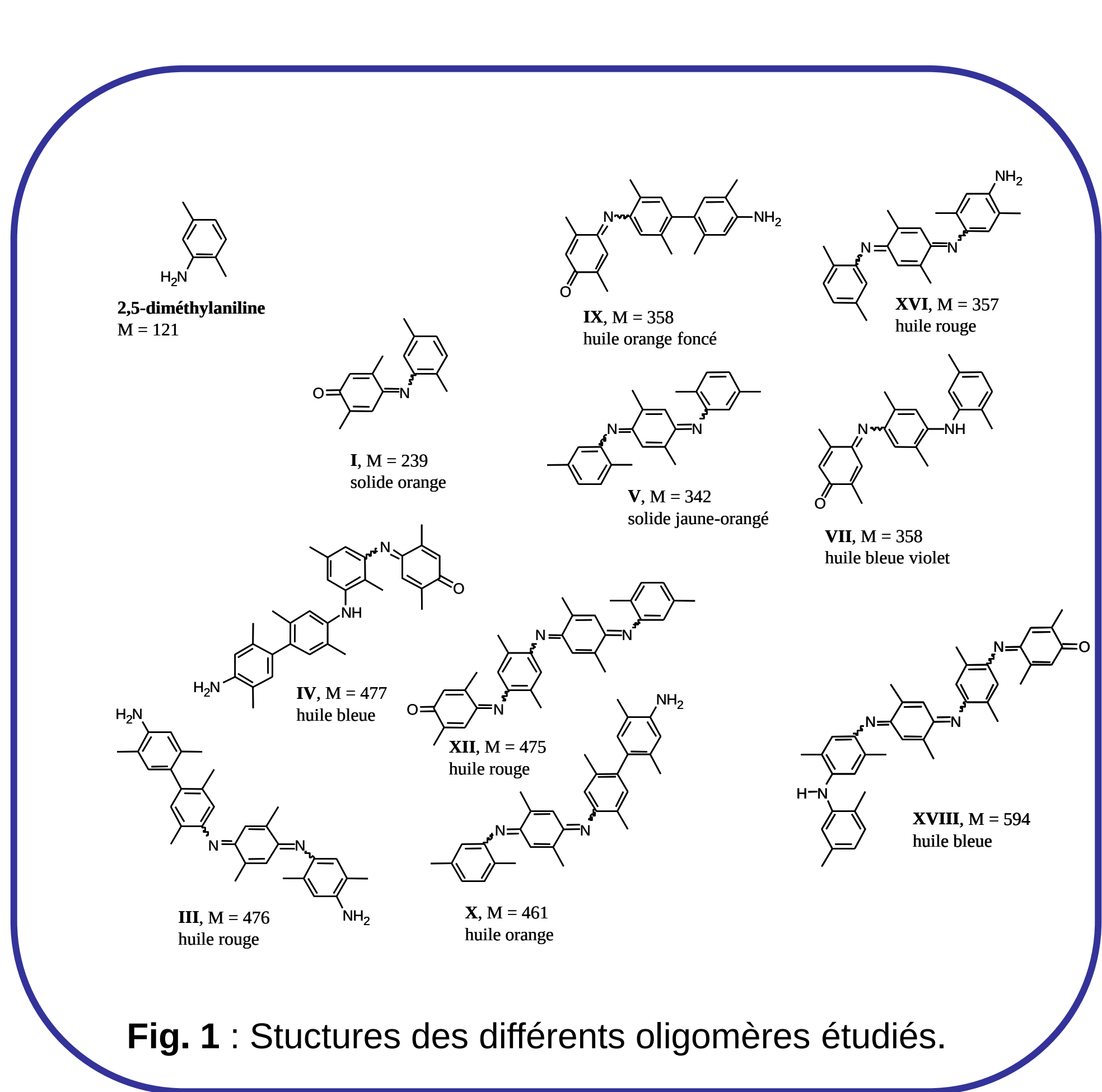
ANALYSES LC-ESI-MS ET LC-ESI-MS-MS

Les études de spectrométrie de masse ont été réalisées à l'aide d'un instrument triple quadripolaire Quattro LC (Micromass, UK) muni d'une source ESI « Z-spray » et couplé à une chaîne HPLC (Alliance 2695, Waters) dotée d'un passeur automatique d'échantillons et d'un détecteur UV/visible. La séparation chromatographique était effectuée sur colonne Uptisphere C₁₈ (150 x 2 mm, 5 µm, Interchrom) selon un gradient d'élution (A : acétonitrile/eau 95/5 (v/v) 0,2% ac. acét, B : eau/acétonitrile 95/5 (v/v) 0,2% ac. acét) et un débit de 200 µL/min. La détection UV (300 nm) et l'analyse ESI-MS sont réalisées en série sur l'effluent total. Les enregistrements ESI-MS ont été effectués en mode positif et en balayage continu sur la gamme de 225 à 750 Th à raison d'un scan par seconde avec les réglages source suivants : V_{cap} 3,5 kV, cône 40 V, extracteur 2 V, RF_{ions} 0,2 V, T source 120°C, gaz de désolvatation 500 L/h (N₂, 400°C) et de nébulisation 100 L/h (N₂). Les expériences MS-MS ont été réalisées en présence d'argon (1,5.10⁻³ torr) avec une énergie de collision de 20 à 50 eV.

RESULTATS

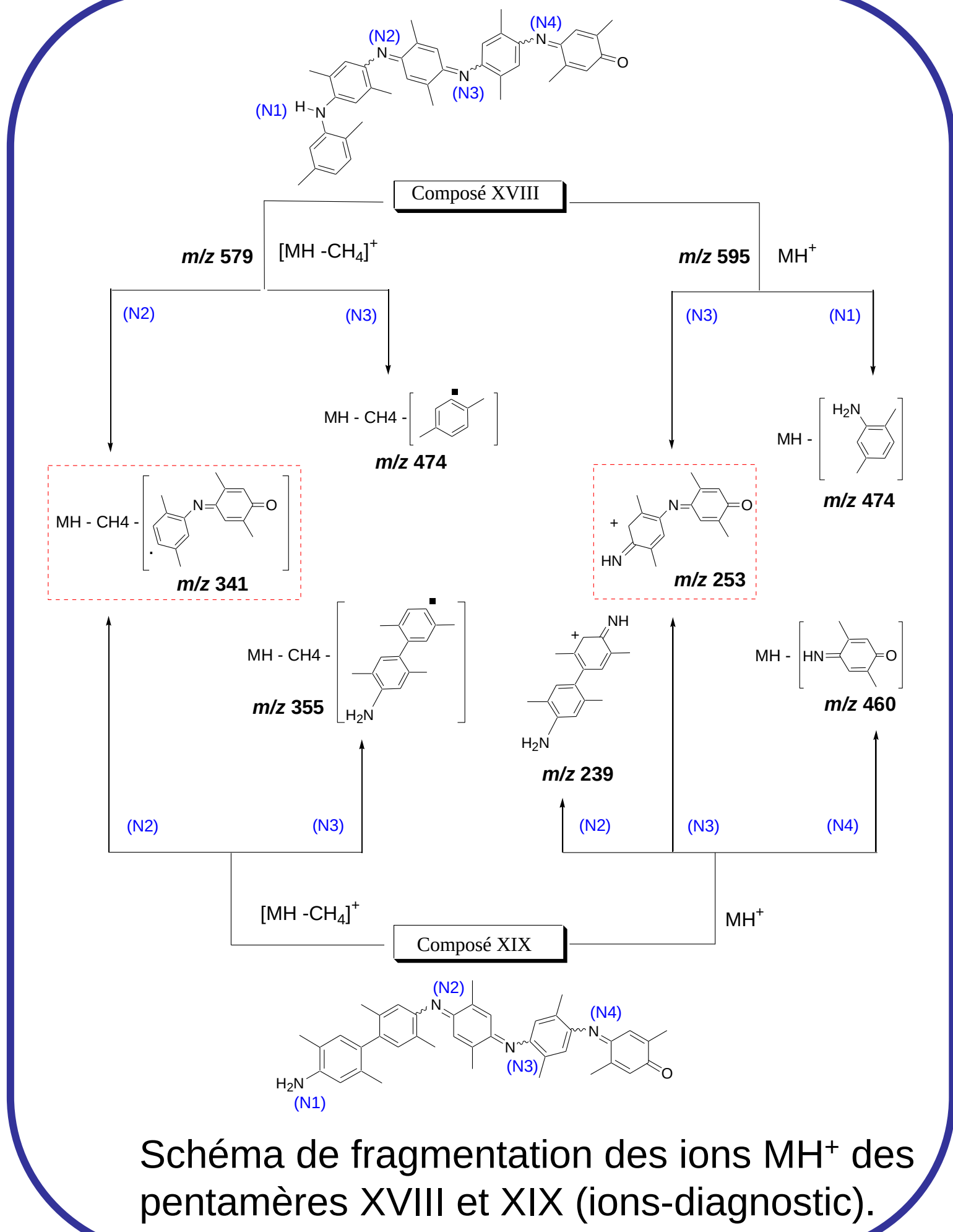
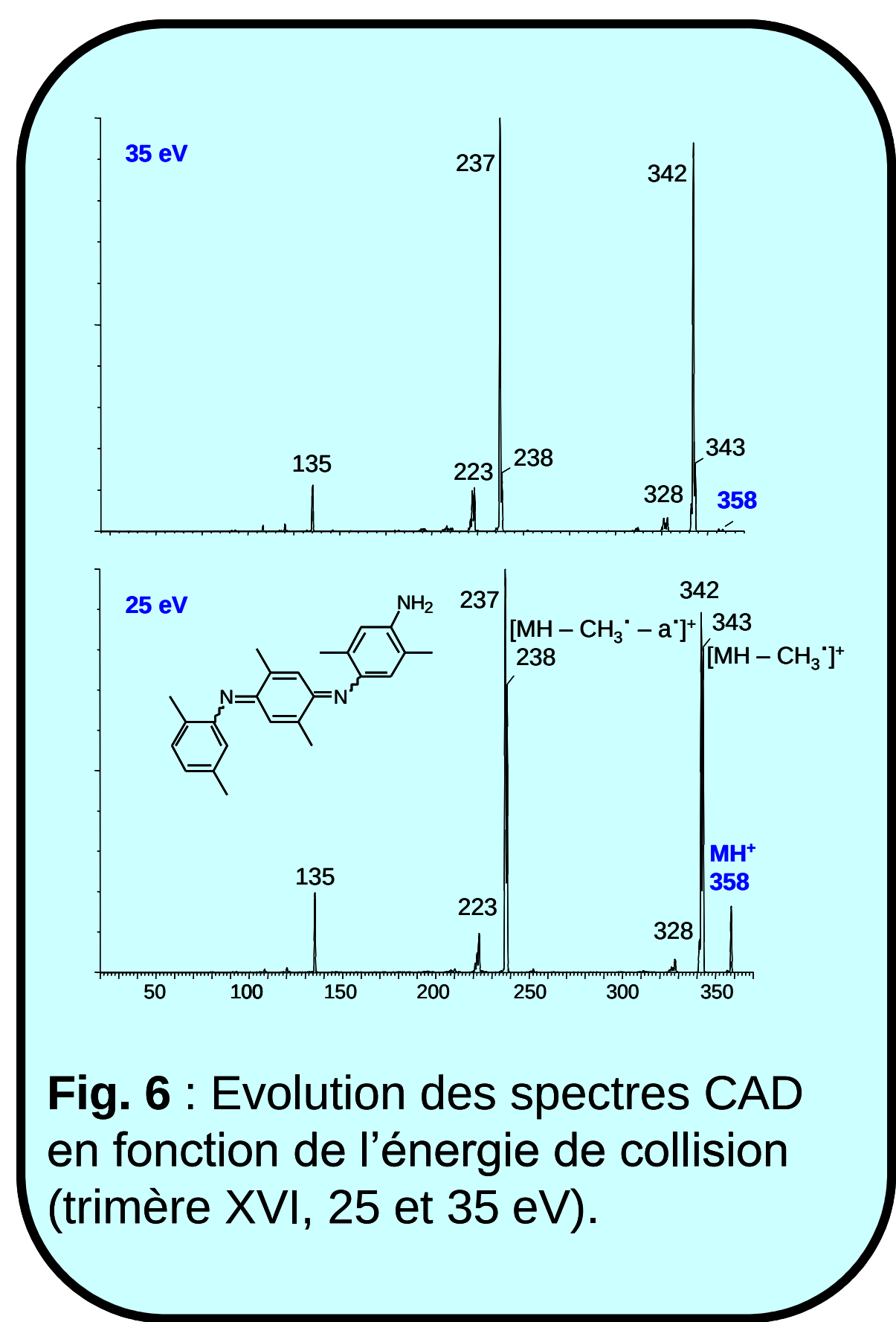
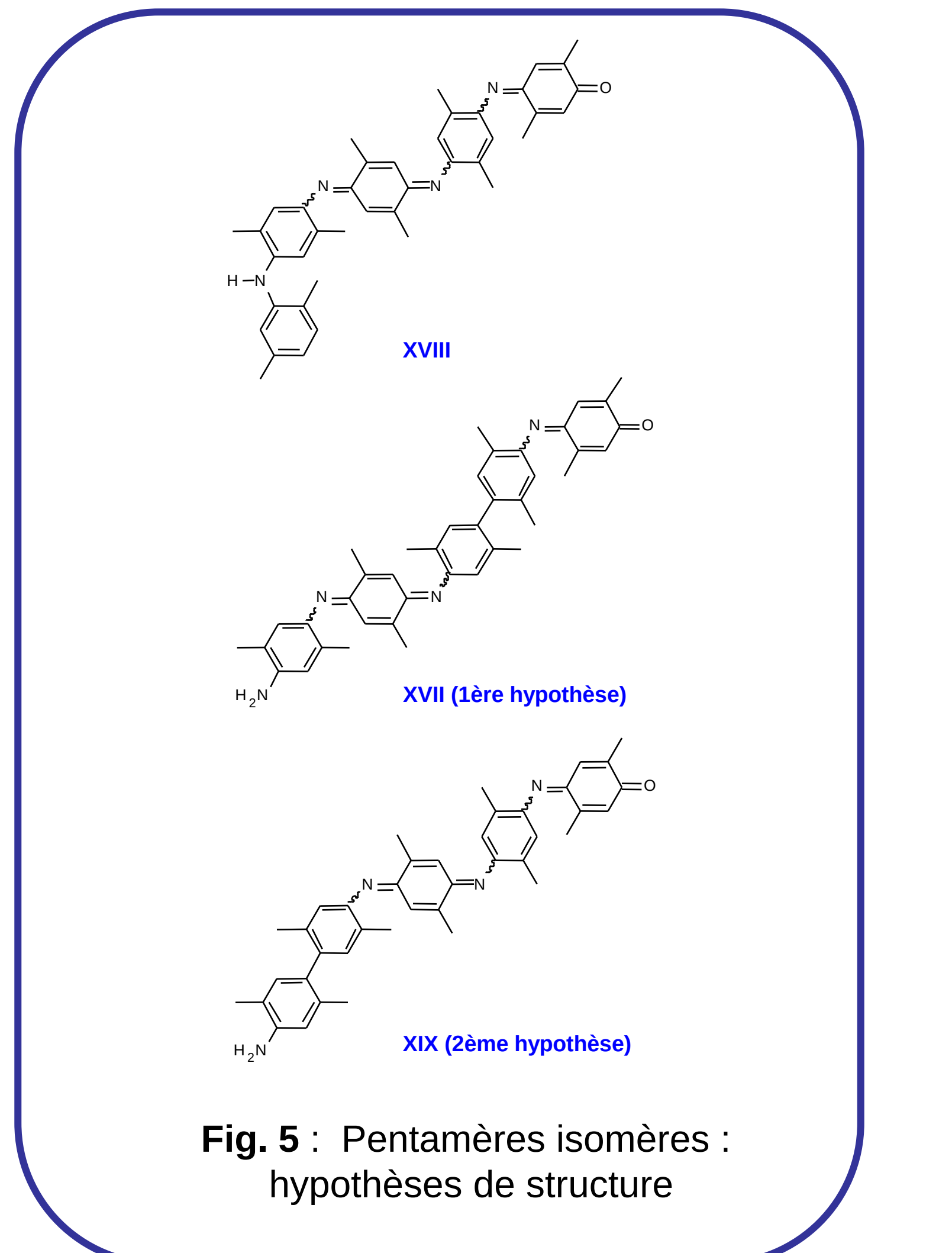
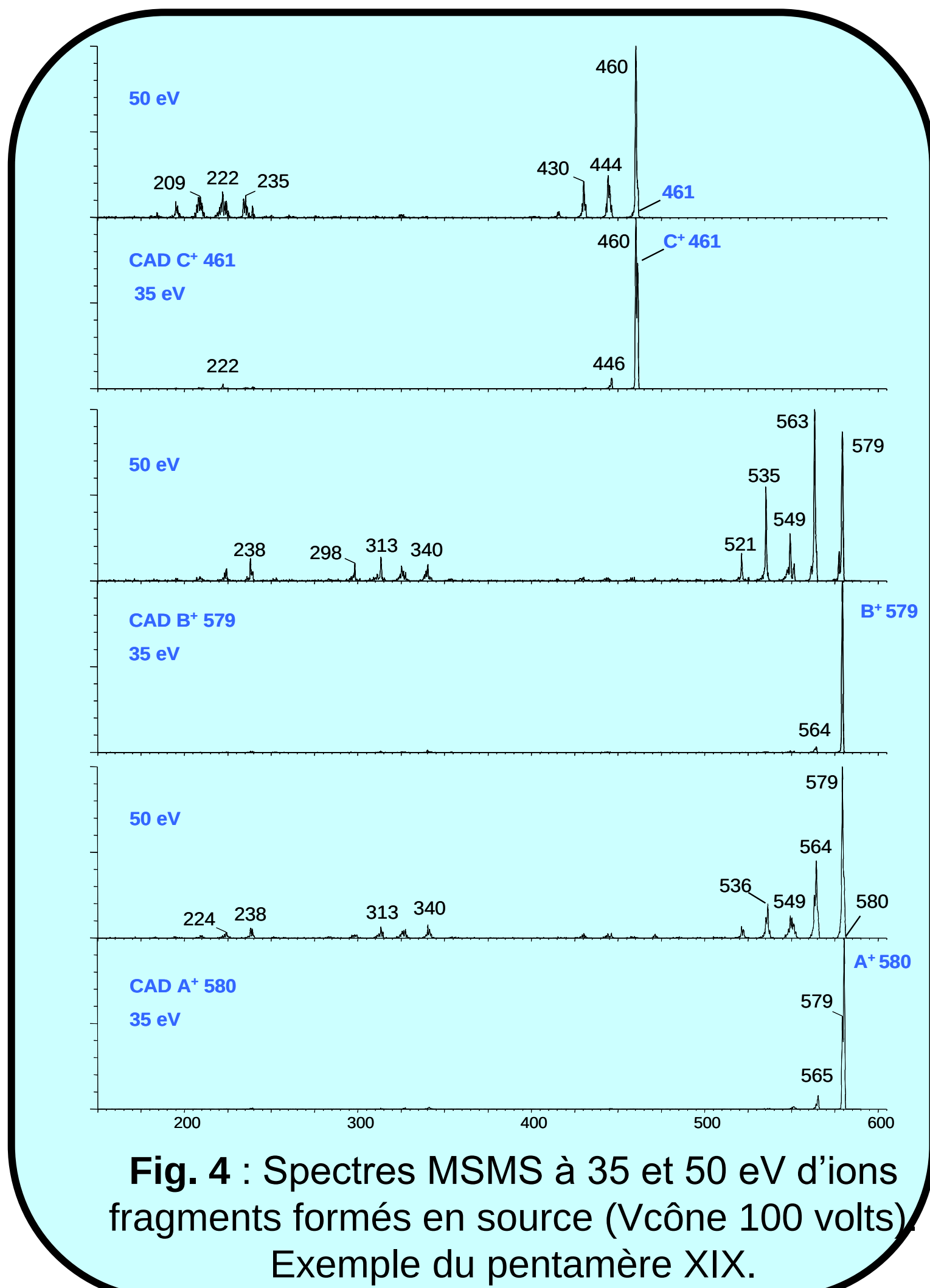
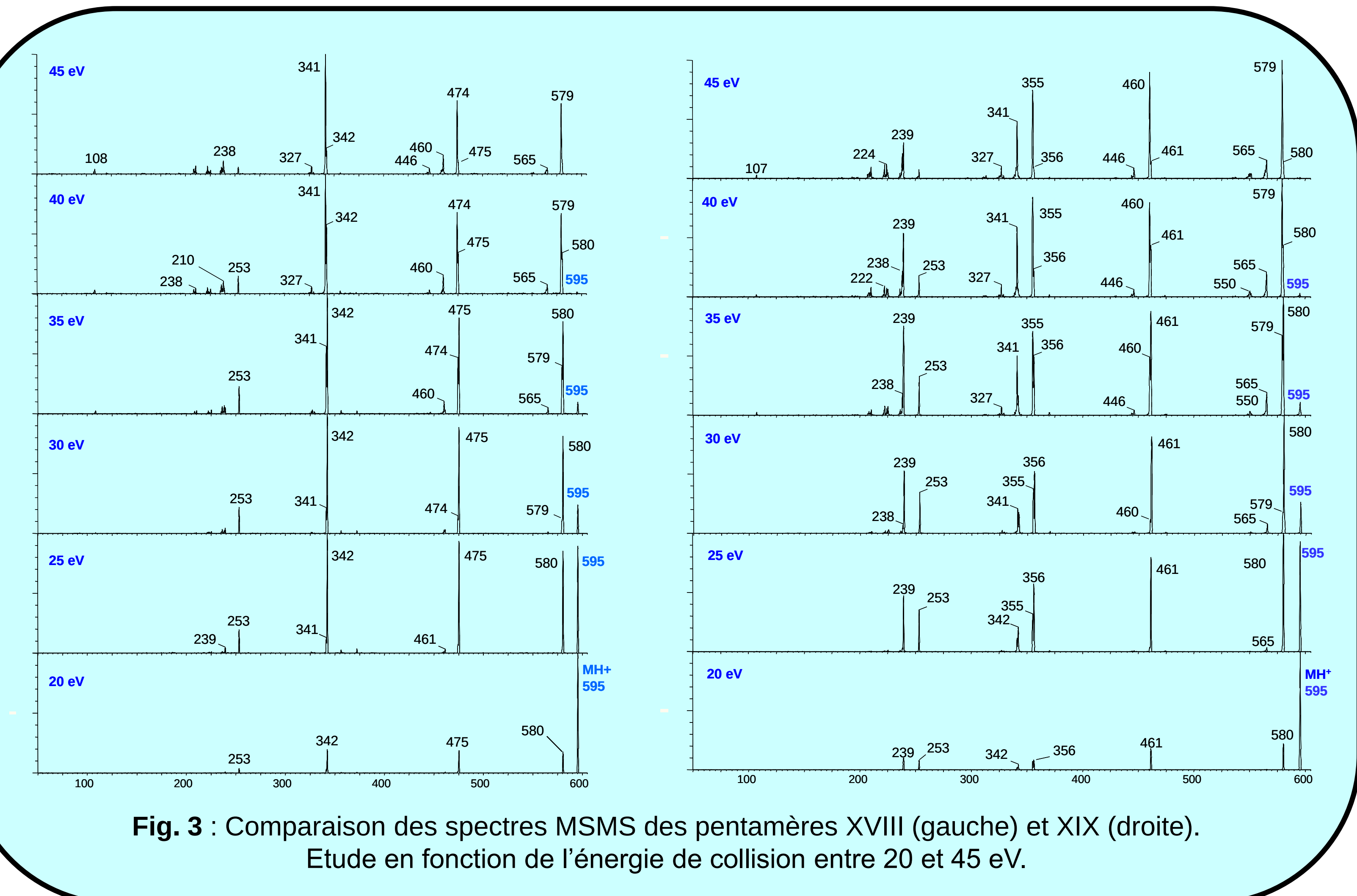
ANALYSE DES TRIMERES ET TETRAMERES

Les structures trimères et tétramères ont été en grande partie élucidées par les données de la RMN et en tenant compte des masses moléculaires mesurées en LC-ESI-MS. L'examen des décompositions obtenues à partir des molécules protonées (CAD des ions MH⁺) en LC-ESI-MS-MS indique la formation d'espèces moléculaires [MH - CH₃]⁺, [MH - CH₄]⁺ ainsi que des ions-fragments à nombre impair d'électrons résultant de l'élimination de « résidus externes » mono- et/ou bicycliques. On note aussi la présence d'espèces complémentaires de type cationique (ions * fig. 2). L'interprétation de ces spectres a permis d'appréhender des structures plus complexes.



ETUDE DES PENTAMERES : DIFFERENCIATION DE STRUCTURES ISOMERES

L'étude approfondie, en fonction de l'énergie de collision, des spectres CAD des ions MH⁺ de pentamères isomères (M = 594) a permis de confirmer la structure du composé XVIII et surtout d'établir la structure de XIX non distinct de XVII par RMN. Ces nouvelles données permettent en même temps d'étendre la compréhension des mécanismes mis en jeu. Elles conduisent aussi de ce fait à des règles d'application de la LC-ESI-MS-MS à l'analyse des oligomères issus de la métabolisation de la 2,5-diméthylaniline.



INTERPRETATION DES MECANISMES ET APPLICATION A L'ANALYSE

Les spectres CAD enregistrés à 35 eV pour les trimères et tétramères, ou à 45 eV pour les pentamères (fig. 2 et 3), font apparaître de manière prépondérante les ions [MH - CH₄]⁺. Ils contiennent aussi des ions-fragments issus « formellement » des précédents par suite d'une élimination de radical. Ces ions provenant d'une protonation initiale sur un atome d'azote d'imino-benzoquinone sont révélateurs de motifs structuraux constitutifs. C'est cette présentation qui est retenue pour faciliter les interprétations analytiques. Les spectres réalisés à plus basse énergie (20-25 eV) indiquent une production préférentielle d'espèces décalées de + 1 uma et associées formellement aux ions [MH - CH₃]⁺.

CONCLUSION

La spectrométrie de masse est très complémentaire de la RMN pour l'analyse structurale des oligomères issus du traitement enzymatique de la 2,5-diméthylaniline. La LC-ESI-MS-MS s'avère particulièrement performante pour la distinction et l'attribution de structures isomères relativement complexes. La présentation mécanistique indiquée, bien que très pratique au plan analytique, est concurrencée par une alternative dans laquelle les ions-diagnostic à nombre impair d'électrons déjà mentionnés recevraient une autre interprétation (cf. ions [MH - Aniline]⁺). Celle-ci serait plus en accord avec les expériences de type MS3 de la figure 4.

REFERENCES

- [1] G. FAHRAEUS, V. TULLANDER, H. LJUNGGREN, Physiologia Plantarum, (1958), 11, 631-643.
- [2] C. MOUGIN, A. KOLLMANN, C. JOLIVALT, Biotechnology Letters, (2002), 24, 139-142.