

## ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

В. Г. Манусаджян, Я. М. Варшавский

### Применение масс-спектрометрического метода к изучению производных аминокислот и коротких пептидов

#### 1. Изучение возможности идентификации аминокислот по характерным пикам в масс-спектрах эфиров их N-ацильных производных

Низкая упругость пара аминокислот, обусловленная наличием полярных  $\text{NH}_2$ - и  $\text{COOH}$ -групп, затрудняет непосредственное изучение и идентификацию этих соединений при помощи физических методов, требующих, чтобы исследуемое вещество находилось в газовой фазе. К таким методам относится, в частности, масс-спектрометрический метод. В ряде работ [1—6] было показано, что производные аминокислот обычно распадаются при масс-спектрометрическом исследовании и дают сравнительно сложные масс-спектры. Однако, как показывает анализ наблюдаемых спектров, распад молекул производных аминокислот может происходить с образованием осколков, масса которых однозначно характеризует исходную аминокислоту. При этом существенно, что пики, отвечающие этим осколкам, имеют достаточно высокую относительную интенсивность. Это открывает возможность идентификации и количественного определения аминокислот масс-спектрометрическим методом\*.

В настоящей работе изучена возможность идентификации некоторых аминокислот путем исследования характеристических пиков в масс-спектрах этиловых и амиловых эфиров N-ацильных производных этих аминокислот.

#### Экспериментальная часть

Были изучены этиловые и амиловые эфиры N-ацетилглицина, - $\alpha$ -аланина, - $\beta$ -аланина, -валина, -норвалина, -лейцина, -норлейцина и -пролина. Методика синтеза исследованных соединений описана в работах [7,8]\*\*.

Измерения проводились при помощи масс-спектрометра типа МИ-1305. Специально изготовленная система напуска представляла U-образную стеклянную трубку, присоединенную к вентилю Ду-3,

\* Выражаем благодарность М. В. Гурьеву и М. Я. Карпейскому за полезные советы и обсуждение результатов.

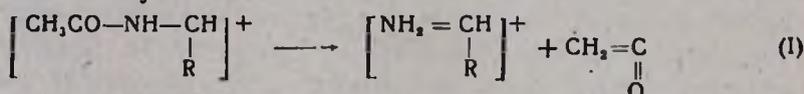
\*\* Выражаем благодарность С. Ф. Шляпникову и М. Я. Карпейскому за предоставление синтезированных ими производных аминокислот.

который крепился непосредственно к ионному источнику. Температура системы напуска поддерживалась равной 120°C. Вещество в количестве 1—2 мг вводили при помощи капиллярной пипетки в U-образную трубку, замораживали, после чего откачивали систему до 0,01 мм рт. ст. и трубку перепайвали. Эффект памяти устраняли нагреванием в течение одного-двух часов при 300°. Напряжение ионизации составляло 20 в. Для изомеров снимали дополнительно спектры при 40 и 70 в. Система напуска не позволяла точно дозировать количество исследуемых образцов и давала возможность получать только качественные данные. Спектры снимались по 3—5 раз.

### Результаты и их обсуждение

Характеристическими пиками, позволяющими идентифицировать исходную аминокислоту по масс-спектру исследуемого соединения  $\text{CH}_2\text{CONHCH(R)COOR}'$ , являются пики с  $m/e$ :  $M+1$ ,  $M$ ,  $M-\text{COOR}'$ ,  $M-(\text{COOR}'+\text{CH}_2\text{CO})$ .

Как показывают полученные нами данные, пики  $M+1$  и  $M$  из-за слабой интенсивности и нестабильности не могут быть использованы для идентификации исследуемых соединений. Для анализа, следовательно, остаются два пика—один из них ( $M-\text{COOR}'$ )<sup>+</sup> соответствует осколку, образуемому при разрыве C—C-связи в  $\alpha$ -положении по отношению к NH-группе, а другой [ $M-(\text{COOR}'+\text{CH}_2\text{CO})$ ]<sup>+</sup> отвечает осколку, возникающему в результате перегруппировки первого осколка и отщепления молекулы кетена:



Полученные результаты приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Относительные интенсивности\* характерных пиков в масс-спектрах этиловых эфиров N-ациламиноаислот  $\text{CH}_2\text{CONHCH(R)COOC}_2\text{H}_5$

Этиловые эфиры	R	Пик $M-\text{COOC}_2\text{H}_5$		Пик $M-(\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5 + \text{C}_2\text{H}_5\text{O})$	
		$m/e$	отн. интенс.	$m/e$	отн. интенс.
Ац-глицина	—H	72	++	30	+++
Ац- $\alpha$ -аланина	—CH <sub>3</sub>	86	+++	44	+++
Ац-валина	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	114	+	72	++
Ац-норвалина	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	114	+	72	++
Ац-лейцина	—CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	128	+++	86	++
Ац-норлейцина	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	128	++	86	++
Ац-пролина	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> —	112	+++	70	++

\* Относительные интенсивности пиков условно обозначены +, ++, +++, что означает соответственно—слабые, средние и сильные интенсивности.

Таблица 2

Относительные интенсивности характерных пиков  
в масс-спектрах амиловых эфиров N-ациламинокислот  
 $\text{CH}_2\text{CONHCH(R)COOC}_5\text{H}_{11}$

Амиловые эфиры	R	Пик M—COOC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	
		m/e	относит. интенс.
Ац-глицина	—H	72	+++
Ац-α-аланина	—CH <sub>3</sub>	86	+++
Ац-β-аланина	—CH <sub>2</sub> —	86	++
Ац-валина	~CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	114	++
Ац-норвалина	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	114	++
Ац-лейцина	—CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	128	++ или +++
Ац-норлейцина	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	128	++ или +++
Ац-пролина	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> —	112	+++

Для амиловых эфиров приведены лишь высокомолекулярные характеристические пики, так как в низкомолекулярной области появляется большое число пиков, соответствующих, по-видимому, ионам, образующимся из амиловой группы.

Помимо пиков, приведенных в таблицах, наблюдаются также пики с m/e 99 (Ац-NHCHCO)<sup>+</sup>, 102 (NH<sub>2</sub>=CH—CO<sub>2</sub>C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)<sup>+</sup>, 145 (Ац-NHCH=C(OH)O—C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)<sup>+</sup>, появление которых отмечалось также в работе [1]. Во всех случаях наблюдались интенсивные нехарактеристические пики с m/e 43 и 30, отвечающие соответственно ионам (NH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>)<sup>+</sup> и (CH<sub>2</sub>CO)<sup>+</sup>. Ряд пиков средней и слабой интенсивности во всех масс-спектрах эфиров группируется в областях с m/e 40—44, 55—61, 70—73, 108—112, 127, а в спектрах амиловых эфиров с m/e 85—87, 150—152 и вокруг 102, 130, 144 пиков.

Из приведенных данных видно, что не у всех изученных соединений характеристические пики обладают достаточной интенсивностью в масс-спектрах, что затрудняет идентификацию соответствующих аминокислот. Например, в случае этилового эфира глицина пик с m/e 72 мало отличается по интенсивности от соседних пиков 71 и 73. Трудность идентификации глицина по пику 72 состоит также в том, что пик 72 достаточно высокой интенсивности обнаруживается в спектрах производных многих аминокислот и отличить их можно, только сравнивая относительные интенсивности. Хорошее совпадение с ожидаемой интенсивностью характерных пиков получилось для производных α-аланина, лейцина, пролина. Изомерное различие может быть установлено при исследовании осколков, образующихся при расщеплении боковой группы.

Пики 59 и 61 встречаются в спектрах всех этиловых эфиров. Возможно, они принадлежат ионам (CH<sub>2</sub>COOH)<sup>+</sup> и [CH<sub>2</sub>CH(OH)]<sup>+</sup>.

Последний ион легко отщепляет молекулу воды, превращаясь в ион  $(\text{CH}_2\text{COH})^+$  с  $m/e$  43.

Другими общими являются пики, соответствующие ионам  $[\text{M}-(\text{R}+\text{H}_2\text{O})]^+$ ,  $[\text{M}-(\text{R}+2\text{H}_2\text{O})]^+$ ,  $[\text{M}-(\text{R}+\text{OH})]^+$ ,  $[\text{M}-(\text{R}+2\text{OH})]^+$ . Поскольку при масс-спектрометрическом анализе легко образуется ион  $[\text{M}+1]^+$ , то не исключено, что последние два иона могут получаться непосредственно из этого иона путем отщепления от него молекул воды:  $[(\text{M}+1)-(\text{R}+\text{H}_2\text{O})]^+ = [(\text{M}-(\text{R}+\text{OH}))]^+$  и  $[(\text{M}+1)-(\text{R}+\text{H}_2\text{O}+\text{OH})]^+ = [\text{M}-(\text{R}+2\text{HO})]^+$ .

В спектрах амиловых эфиров эти пики также имеют место, но их массы соответственно больше на 42 ( $\text{C}_2\text{H}_6$ )  $m/e$ .

Из приведенных данных видно, что при анализе смесей аминокислотных производных возможно наложение пиков 72 глицина и валина и пиков 86 аланина и лейцина. На рисунке 1 в качестве примера приведен типичный масс-спектр этилового эфира N-ацетилаланина.

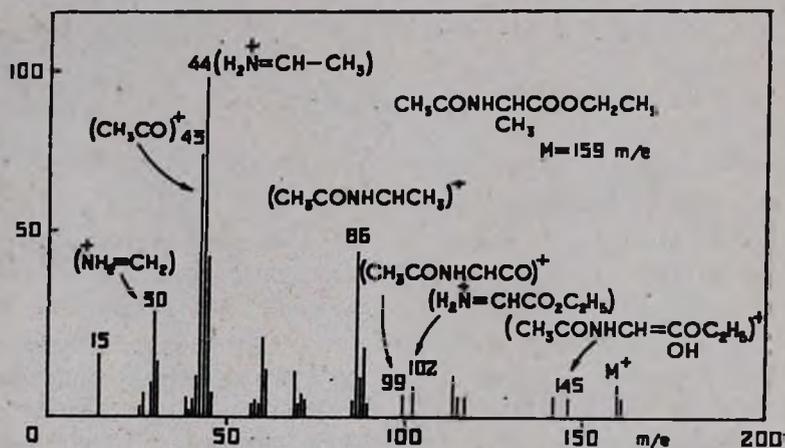


Рис. 1. Масс-спектр этилового эфира N-ацетил-аланина.

После начала этой работы в печати появилась статья Андерсона и других [6], в которой сообщается о масс-спектрометрическом исследовании некоторых из изученных нами соединений. Данные, полученные нами, в основном совпадают с результатами, приведенными в работе [6], однако вывод авторов этой работы о возможности однозначной идентификации аминокислот по характеристическим пикам в масс-спектрах их производных едва ли можно считать в настоящее время достаточно обоснованным. Для такого вывода, очевидно, необходимы дополнительные исследования с целью выбора условий, обеспечивающих получение возможно более высокой относительной интенсивности характеристических пиков, а также изучение масс-спектров других производных аминокислот, которые могут оказаться значительно более подходящими для решения поставленной задачи.

## В ы в о д ы

1. Изучена возможность масс-спектрометрической идентификации аминокислот (глицина, аланина, лейцина, норлейцина, валина, норвалина, пролина) в виде этиловых и амиловых эфиров их N-ацильных производных.

2. Показано, что в масс-спектрах всех изученных соединений присутствуют интенсивные пики, однозначно соответствующие исходным аминокислотам. Однако в ряде случаев относительная интенсивность этих пиков недостаточна для безошибочного отнесения исследуемого соединения к производному определенной аминокислоты.

Институт радиационной и физико-химической  
биологии АН СССР

Поступило 12 I 1964

## Վ. Գ. Մանուկաշյան և Յա. Մ. Վարդավաթյան

## ՄԱՍ-ՍՊԵԿՏՐՈՄԵՏՐԻԿ ՄԵԹՈԴԻ ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ ԱՄԻՆԱԹՅՈՒՆԵՐԻ ԵՎ ԿԱՐՋ ՊԵՊՏԻԴՆԵՐԻ ԱԾԱՆՑՑԱԼՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ՀԱՍԱՐ

1: Ամինաթթուները երանց էսթերների N-ացիլածացյալների մաս-սպեկտրների բերոշ պիկերով իդենտիֆիկացնելու ճնարավորության ուսումնասիրությունը

## Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ամինաթթուների և կարճ պեպտիդների անմիջական ուսումնասիրութունը և իդենտիֆիկացումը ֆիզիկական մեթոդներով, որոնք պահանջում են, որ հետազոտվող նյութը լինի զազալին ֆազալում (մասնավորապես մաս-սպեկտրոմետրիկ մեթոդով), դժվարացնում է այն հանգամանքը, որ ամինաթթուները և կարճ պեպտիդները ունեն գոլորշիների շատ ցածր առածգականութուն: Ներկա աշխատանքի նպատակն էր ամինաթթուների էսթերների N-ացիլածանցյալների մաս-սպեկտրների ուսումնասիրութունը այդ ամինաթթուները մաս-սպեկտրների բնորոշ պիկերով իդենտիֆիկացնելու հնարավորութունը պարզելու համար:

Ուսումնասիրված են հետևյալ ամինաթթուների ացետիլածանցյալների էթիլէսթերները. գլիցին,  $\alpha$ -ալանին, վալին, նորվալին, լեյցին, նորլեյցին, պրոլին, ինչպես նաև N-ացետիլացված հետևյալ ամինաթթուների ամիլէսթերները. գլիցին,  $\alpha$ -ալանին,  $\beta$ -ալանին, վալին, նորվալին, լեյցին, նորլեյցին, պրոլին:

Ցույց է տրված, որ ըլոր ուսումնասիրված միացութունների մաս-սպեկտրներում կան ինտենսիվ պիկեր, որոնք միանիշ կերպով համապատասխանում են ելանյութ հանդիսացող ամինաթթուներին: Սակայն, այդ պիկերի հարաբերական ինտենսիվութունը որոշ դեպքերում բավարար չէ հետազոտվող միացութւան ճշգրիտ իդենտիֆիկացման համար:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. C.-O. Andersson, Acta Chem. Scand. 12, 1353 (1958).
2. C.-O. Andersson, R. Ryhage, S. Stållberg-Stenhagen, E. Stenhagen, Arkiv. f6i-Kemi 19, 405 (1962).

3. K. Blemann, J. Seibl, F. Gapp, Biochem. Biophys. Res. Comm. **1**, 307 (1959).
4. K. Blemann, J. Seibl, F. Gapp, J. Am. Chem. Soc. **83**, 3795 (1961).
5. K. Heys, H. F. Grätzmacher, Z. Naturforsch. **16**, 293 (1961).
6. С.-О. Andersson, R. Ryhage, E. Stenhagen, Arkiv för Kemi **19**, 417 (1962).
7. В. Г. Манусаджян, Г. С. Саркисян, Н. П. Бажулина, Я. М. Варшавский, ДАН АрмССР **38** (в печати).
8. С. В. Шляпников, М. Я. Карпейский, Е. Ф. Литвин, Биохимия **28**, 664 (1963).