

В. Г. Манусаджян и Я. М. Варшавский

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

III. Масс-спектрометрическое изучение аминокислот

В предыдущих сообщениях [1,2] приведены результаты изучения возможности идентификации аминокислот и определения первичной структуры коротких пептидов, т. е. порядка чередования аминокислотных остатков, на основании масс-спектрометрического изучения некоторых их летучих производных. В настоящей работе изучена возможность использования для этой цели аминокислот в качестве летучих производных ди- и трипептидов. Впервые на эту возможность указали Биман и другие [3, 4], которые изучили масс-спектры аминокислот, полученных из пептидов путем их восстановления LiAlH_4 . Анализ масс-спектров нескольких изученных этими авторами аминокислот показал, что в условиях масс-спектрометра происходит распад молекул этих соединений по связи α C—C с образованием стабильных характеристических ионов, пики которых позволяют судить о первичной структуре исходного пептида.

Целью настоящей работы являлось получение дополнительного экспериментального материала, который позволил бы выяснить, в какой мере распад молекул аминокислот по α C—C-связи и последующая стабилизация образующихся при этом характеристических ионов является общим свойством аминокислот.

С этой целью изучены масс-спектры пяти не исследованных ранее аминокислот, полученных восстановлением трех дипептидов и двух трипептидов.

Экспериментальная часть

Изучались аминокислоты, полученные восстановлением следующих ди- и трипептидов: глицил-глицина, глицил-D,L-аланина, глицил-D,L-серина, D,L-аланил-глицил-глицина и глицил-L-лейцил-D,L-валина.

Методика получения исследуемых соединений и их ИК-спектры описаны в работе [5]. Методика снятия масс-спектров описана в работах [1,2]. Температура системы напуска поддерживалась равной 150 или 180°C (см. рис. 1—5). Ионизирующее напряжение (33 или 70 в.) указано на масс-спектрах.

Результаты и их обсуждение

Полученные масс-спектры изображены на рисунках 1–5. Наиболее интенсивные пики приведены в таблице 1.

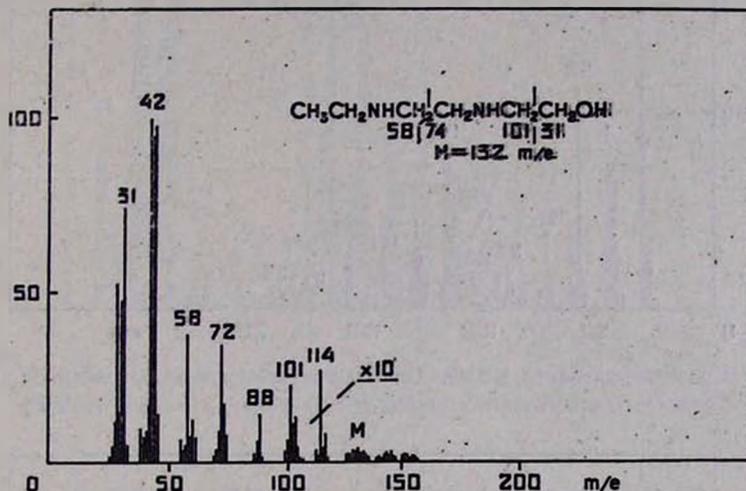
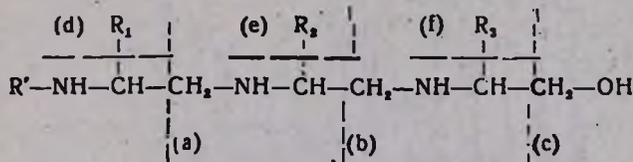


Рис. 1. Масс-спектр диаминоспирта, полученного восстановлением этилового эфира N-ацетил-глицил-глицина ($U_{II} = 70$ в; $t = 150^\circ$).

Характеристические пики соответствуют ионам, которые содержат боковую и концевую группы. Например, для триаминоспирта характеристические осколки получают при рассеении по (a)-, (b)- и (c)-связям:



Другими важными фрагментами являются ионы, образующиеся в результате отрыва боковых групп R_1 , R_2 и R_3 . При этом получают характерные ионы с массовыми числами $M - R_1$, $M - R_2$, $M - R_3$, $R_1 + R' + 28$, $115 + R_2 + R_3$, $R_3 + 73$, $R_1 + R_2 + 70 + R'$, $R_1 + R_2 + R_3 + 112 + R'$ и 31. По данным Бимана [3,4], наиболее интенсивным высокомолекулярным пикам соответствуют ионы $[\text{R}'\text{NHCH}(\text{R}_1)]^+$, $[\text{R}'\text{NHCH}(\text{R}_1)\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{R}_2)]^+$. Остальные пики, образующиеся путем перегруппировки из первичного иона, разрыва N—C-связей и т. д., имеют относительно слабую интенсивность. В работе [4] были интерпретированы также пики $[M + 1]^+$ и $31[\text{CH}_2\text{OH}]^+$.

Полученные нами данные (см. рис. 1–5) показывают, что высокомолекулярные пики имеют среднюю и слабую относительную интенсивность. В масс-спектрах наблюдаются пики с массовым числом

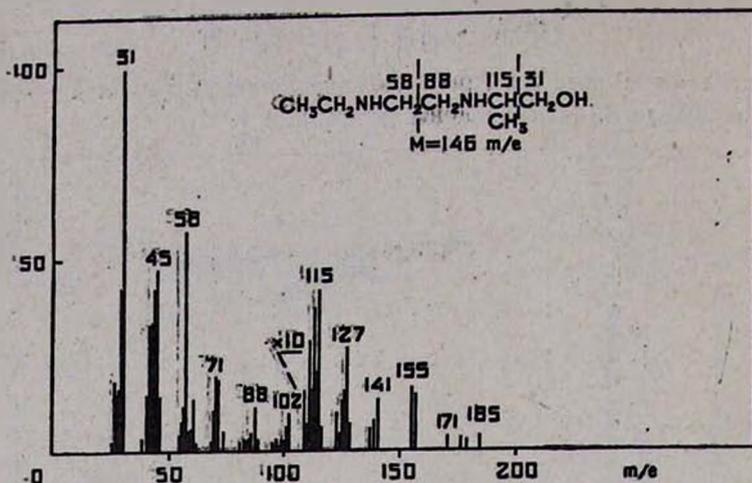


Рис. 2. Масс-спектр диаминоспирта, полученного восстановлением этилового эфира N-ацетил-глицил-D,L-аланина ($U_{\text{и}} = 33$ в; $t = 150^\circ$).

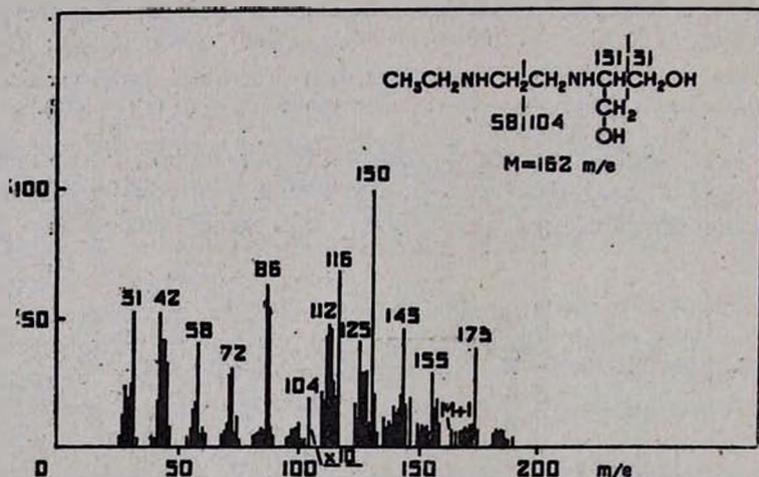


Рис. 3. Масс-спектр диаминоспирта, полученного восстановлением этилового эфира N-ацетил-глицил-D,L-серина ($U_{\text{и}} = 33$ в; $t = 150^\circ$).

больше $M + 1$. Общими пиками являются пики 30 и 31. Характеристические пики не всегда имеют высокую относительную интенсивность. Стабилизация ионов происходит за счет потери нескольких молекул водорода с образованием сопряженных связей. В результате внутренней перегруппировки легко образуются молекулы первичных аминов.

Диаминоспирт, полученный восстановлением N-ацетил-глицил-глицина (рис. 1). Спектр довольно простой. Характеристические пики хорошо проявлены. Интерпретация пиков приведена в таблице 1.

Диаминоспирт, полученный восстановлением N-ацетил-глицил-D,L-аланина (рис. 2). Молекулярный пик отсутствует. Характери-

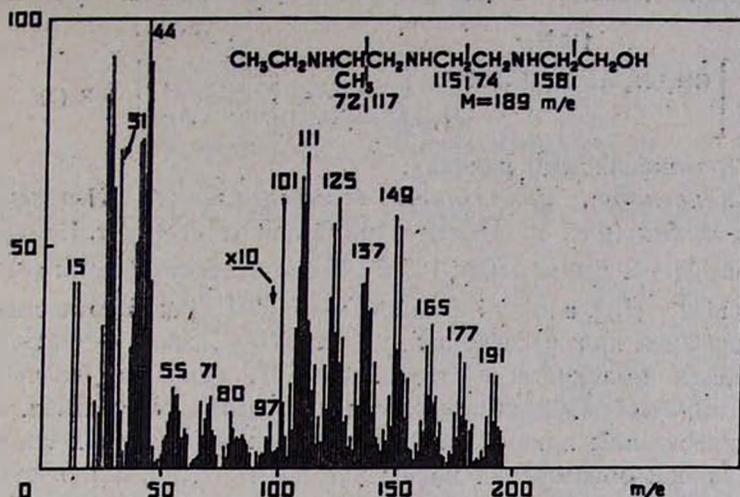


Рис. 4. Масс-спектр триаминоспирта, полученного восстановлением этилового эфира N-ацетил-D,L-аланил-глицил-глицина ($U_u = 70$ в; $t = 150^\circ$).

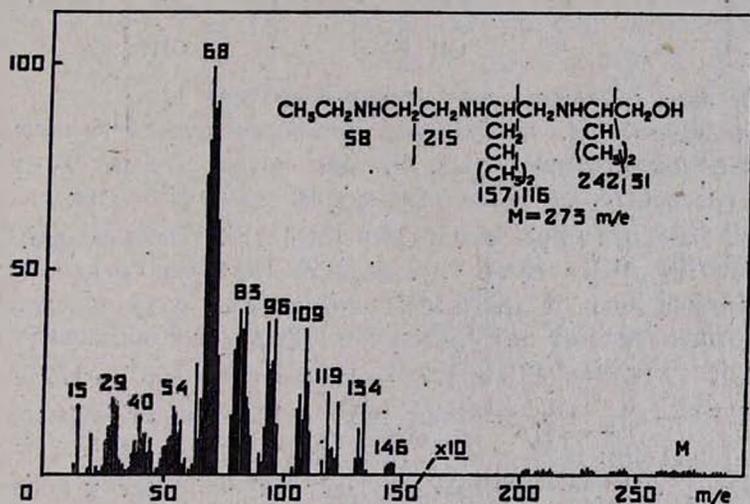
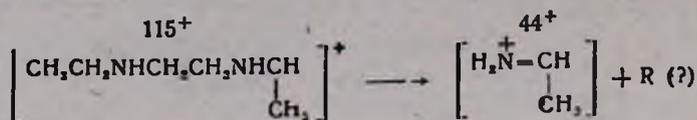


Рис. 5. Масс-спектр триаминоспирта, полученного восстановлением этилового эфира N-ацетил-глицил-L-лейцил-D,L-валина ($U_u = 70$ в; $t = 150^\circ$).

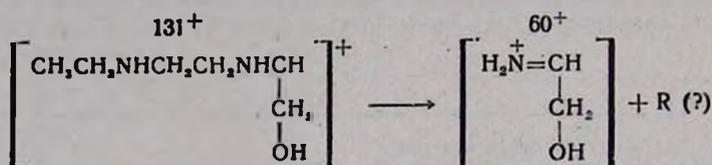
стические пики хорошо проявлены. Возможно, что пик 141^+ получается при отщеплении от $(M + 1)^+$ -иона трех молекул водорода. Из-за лабильности иминного водорода более вероятно образование сопряженных связей между азотом и третичным или вторичным углеродами. Пик 128^+ соответствует иону, образуемому при отщеплении от исходной молекулы одной молекулы воды. Возможный путь образования иона с m/e 44 следующий:



где R (?) отщепляемый радикал.

Даминоспирт, полученный восстановлением N-ацетил-глицил-D,L-серина (рис. 3). Молекулярный ион отсутствует. Наблюдаются пики выше $M+1$. Двум пикам 125 и 143 соответствуют ионы $(M+1)^+$ — $-\text{H}_2\text{O}$ и $143^+ - \text{H}_2\text{O}$, а пику 130 ион $M^+ - \text{CH}_2\text{OH}$. Пик 116 отнесен к иону, образуемому при рассеении первой N—C-связи с последующим отщеплением молекулы водорода. Пик 87, вероятно, соответствует иону, который образуется при рассеении второй N—C-связи. Пики 71 и 72 тождественны пикам 71 и 72 в спектрах первых двух соединений.

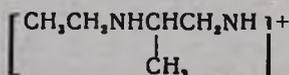
Механизм образования иона с m/e 60, вероятно, аналогичен механизму образования иона 44^+ в спектре аминоспирта глицил-D,L-аланина:



Интерпретация остальных пиков дана в таблице 1.

Триаминоспирт, полученный восстановлением N-ацетил-D,L-аланил-глицил-глицина (рис. 4). Масс-спектр очень сложный. Без эталонного спектра выяснение структуры исходной молекулы затруднительно. Имеются пики выше $190 (M+1)^+$. Парные пики 193 и 191, 179 и 177, 165 и 163 и т. д. до пика 109 можно отнести к ионам, отличающимся друг от друга в каждой паре на одну молекулу водорода, а отщепление от них CH_2 -группы приводит к образованию новой пары: $179^+ = 193^+ - \text{CH}_2$ и $177^+ = 191^+ - \text{CH}_2$; $165^+ = 179^+ - \text{CH}_2$ и $163^+ = 177^+ - \text{CH}_2$ и т. д. Ионы 165^+ и 163^+ могут образовываться следующим путем: $165^+ = M^+ - (2\text{H}_2 + \text{H}_2\text{O})$ и $163^+ = M^+ - (3\text{H}_2 + \text{H}_2\text{O})$.

Потеря CH_2 -группы каждым из них приведет к образованию следующей пары ионов: $151^+ = 165^+ - \text{CH}_2$ и $149^+ = 163^+ - \text{CH}_2$ и т. д. Пик 101 может соответствовать ион:



Интерпретация остальных пиков дана в таблице 1. Изучение зависимости интенсивности пиков от ионизирующего напряжения в интервале между 20 и 90 в. показывает, что интенсивность всех пиков в масс-спектре достигает максимума при напряжении 35—40 в. Относительная интенсивность изменяется незначительно.

Триаминоспирт, полученный восстановлением N-ацетил-глицил-L-лейцил-D,L-валина (рис. 5). Высокмолекулярные ионы не-

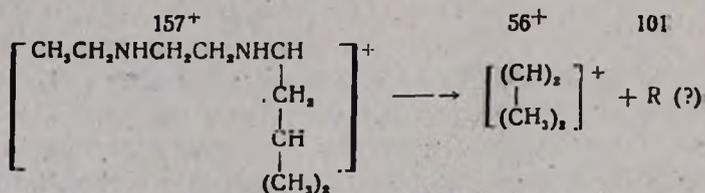
Таблица 1

Основные пики в масс-спектрах диаминоспиртов
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{R}_1)\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{R}_2)\text{CH}_2\text{OH}$
 и триаминспиртов
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{R}_1)\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{R}_2)\text{CH}_2\text{NH}(\text{R}_3)\text{CH}_2\text{OH}$

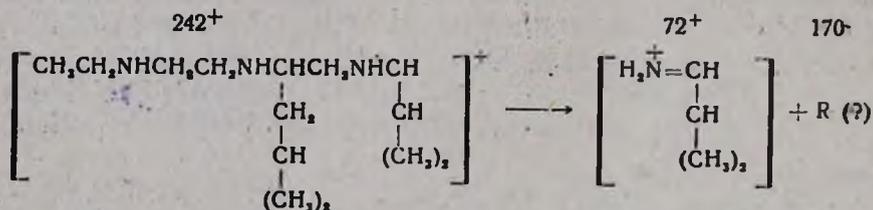
Аминоспирт, полученный восста- новлением	Основные пики в единицах m/e и предполагаемые ионы
Ди-глицил-глицина $M = \text{C}_6\text{H}_{16}\text{ON}_2$ $R_{1,2} = -\text{H}$	133 (?); 133, 132 ($M+1$) ⁺ , (M) ⁺ , 114 ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2$) ⁺ ; 103 ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{ON}_2$) ⁺ ; 101 ($\text{C}_5\text{H}_{13}\text{N}_2$) ⁺ ; 88 ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{ON}$) ⁺ ; 72 ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}$) ⁺ ; 58 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$) ⁺ ; 45 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$) ⁺ ; 44 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$) ⁺ ; 43 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$) ⁺ ; 42 ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}$) ⁺ ; 31 (CH_3O) ⁺ ; 30 (CH_4N) ⁺ ; 29 (C_2H_5) ⁺ ; 27 (C_2H_3) ⁺
Ди-глицил-D,L-ала- нина $M = \text{C}_7\text{H}_{18}\text{ON}_2$ $R_1 = -\text{H}$ $R_2 = -\text{CH}_3$	141 ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{ON}_2$) ⁺ ; 139 ($\text{C}_7\text{H}_{13}\text{ON}_2$) ⁺ ; 137 ($\text{C}_7\text{H}_9\text{ON}_2$) ⁺ ; 128 ($\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_2$) ⁺ ; 127 ($\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_2$) ⁺ ; 126 ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2$) ⁺ ; 115 ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_2$) ⁺ ; 113 ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_2$) ⁺ ; 111 ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_2$) ⁺ ; 109 ($\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_2$) ⁺ ; 102 ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{ON}$) ⁺ ; 101 ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_2$) ⁺ ; 74 ($\text{C}_4\text{H}_9\text{ON}$) ⁺ ; 72 ($\text{C}_4\text{H}_9\text{N}$) ⁺ ; 71 ($\text{C}_4\text{H}_7\text{N}$) ⁺ ; 70 ($\text{C}_4\text{H}_7\text{N}$) ⁺ ; 61 (?); 59 ($\text{C}_2\text{H}_7\text{O}$) ⁺ ; 58 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$) ⁺ ; 45 ($\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$) ⁺ ; 44 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$) ⁺ ; 43 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$) ⁺ ; 42 ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}$) ⁺ ; 41 (C_2H_5) ⁺ ; 31 (CH_3O) ⁺ ; 30 (CH_4N) ⁺ ; 29 (C_2H_5) ⁺ ; 27 (C_2H_3) ⁺
Ди-глицил-D,L-серина $M = \text{C}_7\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_2$ $R_1 = -\text{H}$ $R_2 = -\text{CH}_2\text{OH}$	163 (?); 163 ($\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_2$) ⁺ ; 157 ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_2$) ⁺ ; 155 ($\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_2$) ⁺ ; 143 ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{ON}_2$) ⁺ ; 131 ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{ON}_2$) ⁺ ; 130 ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{ON}_2$) ⁺ ; 125 ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_2$) ⁺ ; 116 ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}$) ⁺ ; 115 ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{ON}_2$) ⁺ ; 113 ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_2$) ⁺ (?); 112 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2$) ⁺ ; 104 ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}$) ⁺ ; 87 ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_2$) ⁺ ; 86 ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2$) ⁺ , ($\text{C}_4\text{H}_8\text{ON}$) ⁺ ; 72 ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}$) ⁺ , ($\text{C}_3\text{H}_8\text{ON}$) ⁺ ; 71 ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}$) ⁺ ; 58 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$) ⁺ ; 42 ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}$) ⁺ ; 31 (CH_3O) ⁺ ; 30 (CH_4N) ⁺
Ди-D,L-аланил-гли- цил-глицина $M = \text{C}_9\text{H}_{23}\text{ON}_2$ $R_1 = -\text{CH}_3$ $R_{2,3} = -\text{H}$	190 (?); 190, 189 ($M+1$) ⁺ , (M) ⁺ ; 179, 177 ($\text{C}_8\text{H}_{21}\text{ON}_2$) ⁺ , ($\text{C}_6\text{H}_{23}\text{ON}_2$) ⁺ (?); 165 ($\text{C}_7\text{H}_{23}\text{ON}_2$) ⁺ ; 163 ($\text{C}_7\text{H}_{21}\text{ON}_2$) ⁺ ; 151, 149 ($\text{C}_6\text{H}_{21}\text{ON}_2$) ⁺ , ($\text{C}_6\text{H}_{19}\text{ON}_2$) ⁺ ; 137 ($\text{C}_5\text{H}_{19}\text{ON}_2$) ⁺ (?), ($\text{C}_7\text{H}_9\text{ON}_2$) ⁺ (?), ($\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_2$) ⁺ (?); 136 ($\text{C}_7\text{H}_9\text{ON}_2$) ⁺ , ($\text{C}_7\text{H}_{16}\text{N}_2$) ⁺ (?), 135 ($\text{C}_7\text{H}_7\text{ON}_2$) ⁺ , ($\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_2$) ⁺ (?); 125 ($\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_2$) ⁺ ; 123 ($\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_2$) ⁺ ; 111 ($\text{C}_4\text{H}_8\text{ON}$) ⁺ ; 109 ($\text{C}_4\text{H}_8\text{ON}$) ⁺ ; 101 ($\text{C}_5\text{H}_{13}\text{N}_2$) ⁺ , ($\text{C}_4\text{H}_6\text{ON}$) ⁺ (?); 97 ($\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_2$) ⁺ ; 88, 86 ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{ON}$) ⁺ , ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}$) ⁺ ; 80 ($\text{C}_5\text{H}_8\text{N}$) ⁺ ; 71 ($\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2$) ⁺ , ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}$) ⁺ ; 55 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$) ⁺ ; 45 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$) ⁺ ; 44 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$) ⁺ ; 43 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$) ⁺ (?); 42 ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}$) ⁺ ; 31 (CH_3O) ⁺ ; 30 (CH_4N) ⁺ ; 29 (C_2H_5) ⁺ ; 27 (C_2H_3) ⁺ ; 15 (CH_3) ⁺

Аминоспирт, полученный восстановлением	Основные пики в единицах m/e и предполагаемые ионы
Ац-глицил-L-лейцил- -D,L-валина $M = C_{15}H_{25}ON_3$ $R_1 = -H$ $R_2 = -CH_2CH(CH_3)_2$ $R_3 = -CH(CH_3)_2$	146 (?); 147 (C ₉ H ₁₁ N ₂) ⁺ (?); 146 (C ₉ H ₁₀ N ₂) ⁺ , (C ₁₀ H ₁₂ N) ⁺ ; 134 (C ₉ H ₁₁ N) ⁺ , (C ₉ H ₁₀ N ₂) ⁺ (?); 132 (C ₉ H ₁₀ N) ⁺ , (C ₉ H ₉ N ₂) ⁺ (?); 123 (C ₇ H ₁₁ N ₂) ⁺ , (C ₉ H ₁₃ N) ⁺ ; 119 (C ₇ H ₉ N ₂) ⁺ , (C ₉ H ₉ N) ⁺ ; 109 (C ₈ O ₂ ON) ⁺ , (C ₇ H ₁₁ N) ⁺ , (C ₈ H ₉ N ₂) ⁺ ; 107 (C ₈ H ₉ ON) ⁺ ; (C ₇ H ₉ N) ⁺ , (C ₈ H ₇ N ₂) ⁺ ; 96 (C ₅ H ₉ ON) ⁺ , (C ₆ H ₁₀ N) ⁺ , (C ₅ H ₉ N ₂) ⁺ ; 93 (C ₅ H ₅ N ₂) ⁺ , (C ₆ H ₇ N) ⁺ ; 83 (C ₅ H ₇ O) ⁺ , (C ₆ H ₇ N ₂) ⁺ , (C ₅ H ₉ N) ⁺ ; 81 (C ₆ H ₇ N) (?); 70 (C ₆ H ₉ N) ⁺ , (C ₅ H ₁₀) ⁺ ; 68 (C ₆ H ₉ N) ⁺ ; 57 (C ₄ H ₉) ⁺ , (C ₅ H ₉ O) ⁺ ; 55, 54 (C ₄ H ₇) ⁺ , (C ₄ H ₉) ⁺ ; 45 (C ₄ H ₇ N) ⁺ ; 44 (C ₄ H ₉ N) ⁺ ; 43 (C ₃ H ₇) ⁺ ; 40 (C ₂ H ₅ N) ⁺ (?), (C ₃ H ₇) ⁺ ; 31 (CH ₃ O) ⁺ ; 30 (CH ₃ N) ⁺ ; 29 (C ₂ H ₅) ⁺ ; 20 (?); 15 (CH ₃) ⁺

устойчивы. Два характерных иона 157⁺ и 242⁺, вероятно, диссоциируют на низкомолекулярные ионы:



и



Соответствующие метастабильные ионы (56⁺)²: 157⁺ = 19,98⁺ и (72⁺)²: 242⁺ = 21,42⁺ наблюдаются в масс-спектрах. Ион 146⁺ может образовываться двумя путями: 146⁺ = 186⁺ - (4H₂ + CH₃OH) и 146⁺ = 157⁺ - 9H. Ион 123⁺ может образовываться следующим путем: 123⁺ = 157⁺ - (2H₂ + C₂H₆).

В ы в о д ы

1. Получены масс-спектры трех ди- и двух триаминоспиртов.
2. Проведена пробная интерпретация наиболее интенсивных пиков.

3. Характеристические пики в масс-спектрах диаминоспиртов обладают относительно высокой интенсивностью, что позволяет определять порядок чередования аминокислотных остатков в исходном дипептиде по масс-спектру аминоспирта.

В случае триаминоспиртов такая возможность для изученных соединений затруднена. Определение первичной структуры исходных трипептидов на основании масс-спектров триаминоспиртов может быть осуществлено при условии предварительного эталонирования.

Институт радиационной и физико-химической биологии
АН СССР

Поступило 12 I 1964

Վ. Գ. Մանուսաջյան և Յա. Մ. Վարսաձակի

ՄԱՍ-ՍՊԵԿՏՐՈՄԵՏՐԻԿ ՄԵԹՈԴԻ ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ ԱՄԻՆԱԹՅՈՒՆԵՐԻ ԵՎ ԿԱՐՋ ՊԵՊՏԻԴՆԵՐԻ ԱԾԱՆՑՅԱԼՆԵՐԻ ՈՒՄՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ՀԱՄԱՐ

III: Ամինասպիրտների մաս-սպեկտրների ուսումնասիրությունը

Ա մ փ ո փ ու մ

Ներկա հոդվածում ուսումնասիրվում է N-ացետիլ դի- և տրիպեպտիդներիում ամինաթթվային մնացորդների հերթականությունը որոշելու հնարավորությունը այդ միացությունների լիթիումի ալլումահիդրիդով վերականգնման և ստացվող ամինասպիրտների մաս-սպեկտրոմետրիկ անալիզի միջոցով:

Ուսումնասիրվել են երեք դիամինա- և երկու տրիամինասպիրտներ, որոնք ստացվել են հետևյալ պեպտիդների N-ացետիլ-ածանցյալներից. գլիցիլ-գլիցին, գլիցիլ-D,L-ալանին, գլիցիլ-D,L-սերին, D,L-ալանիլ-գլիցիլ-գլիցին, գլիցիլ-L-լեյցիլ-D,L-վալին: Մաս-սպեկտրների նկարահանման իոնացման լարվածությունն էր 20—70 վ., ջերմաստիճանը 120—150°C:

Ցույց է տրված, որ ուսումնասիրված դիամինների մաս-սպեկտրների բնորոշ պիկերը ունեն բավականին բարձր ինտենսիվություն և հնարավորություն են տալիս որոշելու ամինաթթվային մնացորդների հերթականությունը դիպեպտիդներում:

Ուսումնասիրված տրիամինասպիրտների մաս-սպեկտրները ունեն բարդ տեսք, իսկ բնորոշ պիկերը ավելի թույլ են արտահայտված: Այդ հանգամանքը դժվարացնում է ելանյութ հանդիսացող միացության իդենտիֆիկացումը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. В. Г. Манусаджян, Я. М. Варшавский, Изв. АН АрмССР, ХН 17, 137 (1964).
2. В. Г. Манусаджян, А. М. Зякун, А. В. Чувалин, Я. М. Варшавский, Изв. АН АрмССР, ХН 17, 143 (1964).
3. K. Biemann, F. Gapp, J. Seibl, J. Am. Chem. Soc. 81, 2274 (1959).
4. K. Biemann, W. Vetter, Bioch. Bioph. Res. Comm. 3, 578 (1960).
5. В. Г. Манусаджян, Я. М. Варшавский, ДАН АрмССР 38 (в печати).