



УДК 547.96.02 + 543.51

## ИЗУЧЕНИЕ РАСПАДА МЕТАСТАБИЛЬНЫХ ИОНОВ В МАСС-СПЕКТРАХ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ И ИХ СМЕСЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ «МЕТАСТАБИЛЬНОЙ ДЕФОКУСИРОВКИ» И ПРЯМОГО АНАЛИЗА ДОЧЕРНИХ ИОНОВ (DADI) \*

*Разаков Р. Р., Асланов Х. А., Садыков А. С.,  
Розынов Б. В.*

*Отдел биоорганической химии Академии наук УзССР, Ташкент;  
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Методами «метастабильной дефокусировки» и прямого анализа дочерних ионов (DADI) изучен распад метастабильных ионов в масс-спектрах некоторых трипептидов и их смесей. Показано, что DADI-спектры молекулярных ионов однозначно характеризуют как природу, так и положение аминокислотных остатков в пептидной цепи. Индивидуальность картин DADI-спектров сохраняется и при изучении смесей пептидов. Использование методов DADI и «метастабильной дефокусировки» позволяет однозначно идентифицировать как реальные смеси пептидов, так и смеси, возникающие в условиях масс-спектрометрирования за счет элиминирования боковых цепей от различных аминокислотных остатков.

Изучение распада метастабильных ионов является основой для установления путей фрагментации различных классов органических соединений в условиях масс-спектрометрирования [1]. Существует много способов для проведения таких исследований, но наиболее широко используются два [2].

Первый способ, называемый методом «метастабильной дефокусировки» (metastable defocusing), осуществляется на приборах с двойной фокусировкой, в которых электростатический анализатор предшествует магнитному. Этим методом изучается распад метастабильных ионов в области между источником и электростатическим анализатором (первая свободная от полей область двухфокусного масс-спектрометра). Более правильно называть этот метод методом фокусировки продуктов распада метастабильных ионов. Процесс измерения состоит в следующем: при пониженном ускоряющем напряжении и фиксированной напряженности поля электростатического анализатора, изменяя ток магнита, выводят на коллектор изучаемый дочерний ион и затем, плавно повышая ускоряющее напряжение, последовательно подают на коллектор все родительские ионы, продуктом распада которых является дочерний ион.

Второй способ, называемый методом прямого анализа дочерних ионов (direct analysis of daughter ions, DADI) [2] или методом анализа масс ио-

\* Некоторые результаты этой работы были доложены в 1975 г. на Всесоюзном симпозиуме по химии белков и пептидов в Ташкенте.

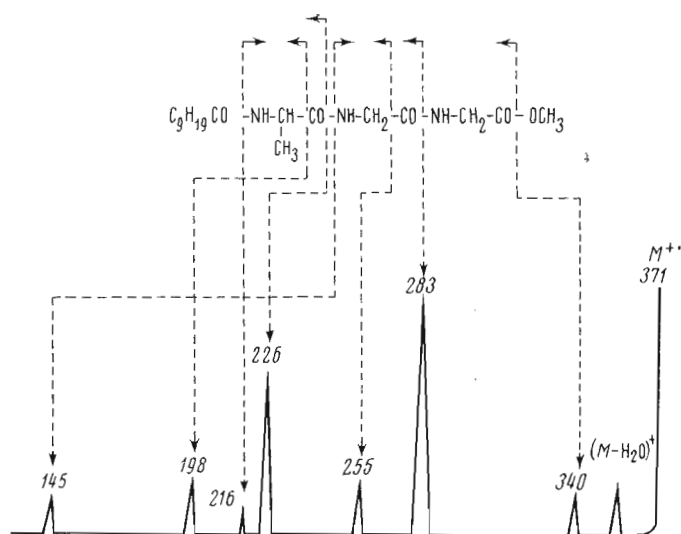


Рис. 1. DADI-спектр метилового эфира N-деканойлаланилглицилглицина (I)

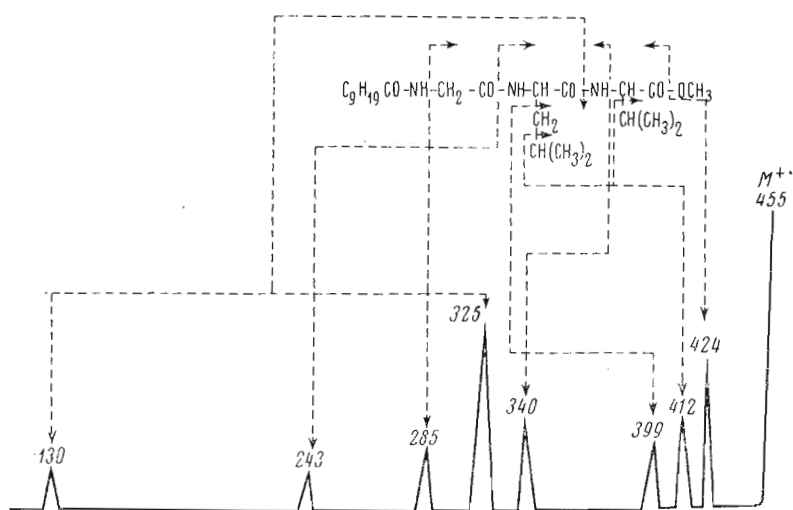


Рис. 2. DADI-спектр метилового эфира N-деканойлглициллейцилвалина (II)

нов с использованием спектроскопии кинетических энергий (mass-analyzed ion kinetic energy spectrometry, MIKES) [3], появился пять лет назад и осуществляется на приборах, в которых магнитный анализатор предшествует электростатическому. Этим способом изучается распад ионов в пространстве между магнитными и электростатическим секторами (вторая свободная от полей область двухфокусного масс-спектрометра). Методика работы: при постоянной напряженности поля электростатического анализатора и фиксированном ускоряющем напряжении, изменяя ток магнита, выводят на коллектор изучаемый родительский ион, а затем, плавно понижая напряженность поля электростатического сектора, подают на коллектор все дочерние ионы, образующиеся при его распаде.

В масс-спектрометрии пептидов наиболее широко использовался метод «метастабильной дефокусировки». Этим методом были установлены схемы фрагментации некоторых депсипептидов [4] и пептидов [5]. Он успешно использовался при анализе смесей ди- и трипептидов [6]. Метод прямого

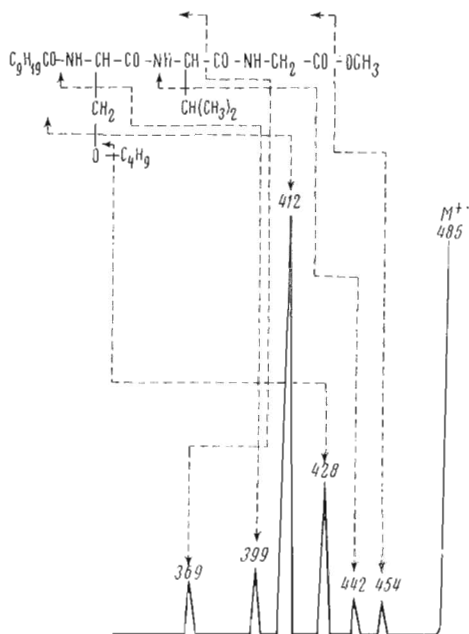


Рис. 3. DADI-спектр метилового эфира N-деcanoил-О-*tert*-бутилсерилвалил-глицина (III)

В качестве объектов исследования были выбраны метиловые эфиры N-деcanoилтрипептидов следующего строения:

- |   |       |
|---|-------|
| Dec- <i>L</i> -Ala-Gly-Gly-OMe                                | (I)   |
| Dec-Gly- <i>L</i> -Leu- <i>L</i> -Val-OMe                     | (II)  |
| Dec- <i>D</i> -Ser (OBu <sup>t</sup> )- <i>L</i> -Val-Gly-OMe | (III) |
| Dec- <i>D</i> -Phe- <i>L</i> -Leu-Gly-OMe                     | (IV)  |

Как видно из рис. 1, для молекулярного иона пептида (I) наиболее характерен распад, приводящий к образованию аминокислотных фрагментов с  $m/e$  340, 283, 226 и альдиминных ионов с  $m/e$  255, 198. В спектре присутствуют также пики С-концевых фрагментов [5] с  $m/e$  145 и 216. Распад молекулярного иона пептида (II) (рис. 2) протекает также по аминокислотному типу, однако в DADI-спектре отсутствует пик аминокислотного иона, отвечающий разрыву CO—NH-связи между N-концевым и следующим за ним остатком, а присутствует только пик иона с  $m/e$  243. Пики альдиминных фрагментов отсутствуют. Разрыв C<sup>α</sup>—N-связей приводит к ионам с  $m/e$  340 и 285. Наличие в молекуле пептида (II) остатков валина и лейцина, имеющих достаточно объемистые алкильные заместители в боковой цепи, приводит к появлению в его DADI-спектре пиков ионов с  $m/e$  412 и 399, которые отвечают элиминированию изопропильного радикала от остатков валина или лейцина и молекулы изобутилена от остатка лейцина. В DADI-спектре пептида (III) аминокислотный тип фрагментации представлен крайне слабо. Присутствуют только аминокислотный ион с  $m/e$  454 и альдиминный фрагмент с  $m/e$  369 (рис. 3). Наиболее интенсивные пики в спектре связаны с появлением ионов, которые образуются в результате отрыва боковых цепей от остатков валина и особенно серина ( $m/e$  399, 412 и 428). Молекулярный ион пептида (IV) распадается главным образом по аминокислотному типу фрагментации. В его DADI-спектре (рис. 4) присутствуют пики трех возможных аминокислотных ионов с  $m/e$  302, 415, 472 и трех возможных альдиминных фрагментов с  $m/e$  274, 387, 444.

анализа дочерних ионов (DADI) в последнее время был использован для анализа аминокислотной последовательности в трипептидах, построенных из остатков аланина, валина и лейцина [7]. Авторы исследовали только аминокислотный тип фрагментации [8], т. е. методом DADI находили в масс-спектрах связь между аминокислотами [CH<sub>3</sub>CO—(NH—CHR—CO)<sub>n</sub>—NH—CHR—C≡O<sup>+</sup>] и альдиминными [CH<sub>3</sub>CO—(NH—CHR—CO)<sub>n</sub>—NH=CHR<sup>+</sup>] фрагментами (где  $n = 0, 1, 2$ ) [7], из которых первые, теряя CO-группу, превращаются во вторые, а вторые, элиминируя группировку NH=CHR, превращаются в первые. Распад молекулярных ионов этих пептидов специально не исследовался.

Представлялось интересным провести анализ структуры пептидов только на основе дочерних ионов, образующихся при распаде их молекулярных ионов.

В качестве объектов исследования были выбраны метиловые эфиры N-деcanoилтрипептидов следующего строения:

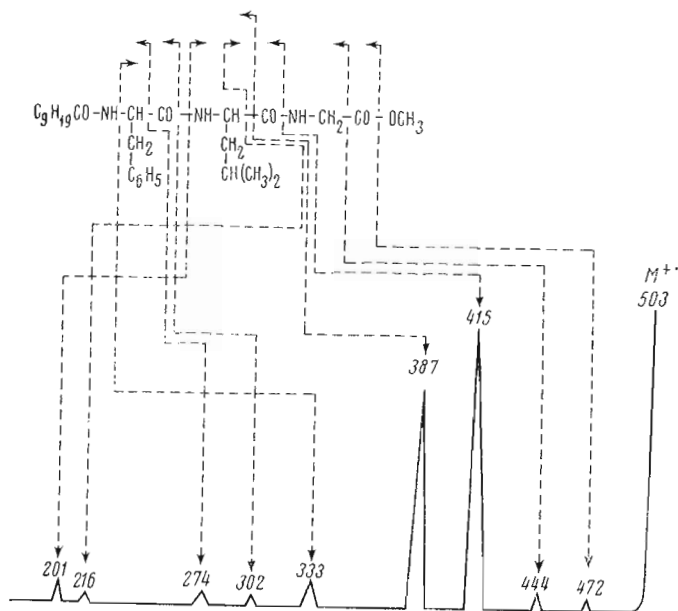


Рис. 4. DADI-спектр метилового эфира N-декапоилфенилаланиллейцилглицина (IV)

Кроме этих пиков в спектре наблюдается пик иона с  $m/e$  333, образование которого, как и в случае пептида (II), связано с элиминированием остатка  $C_9H_{19}CONH$ , пик фрагмента с  $m/e$  201 и характерный только для DADI-спектра пептида (IV) пик иона с  $m/e$  216.

Таким образом, рассмотрение DADI-спектров пептидов (I) — (IV) показывает, что наличие сложных алкильных заместителей в боковой цепи исследуемого трипептида приводит к тому, что стабилизация молекулярных ионов таких соединений осуществляется главным образом за счет элиминирования боковых цепей (рис. 3). Наличие бензильного заместителя делает предпочтительным распад молекулярного иона по аминокислотному типу, что наиболее четко выражено в DADI-спектре пептида (IV) (рис. 4). Наиболее интенсивными в спектрах пептидов (I), (II) и (IV) (рис. 1, 2, 4) являются пики аминокислотных фрагментов, построенных из двух аминокислотных остатков N-концевой части пептидной цепи (соответственно ионы с  $m/e$  283, 325 и 415). В DADI-спектре пептида (III) пика такого иона не наблюдается.

Полученные результаты показывают, что способность молекулярного иона того или иного пептида распадаться по аминокислотному типу фрагментации в значительной степени определяется характером его боковых цепей и последовательностью аминокислотных остатков в молекуле. Предпочтительное элиминирование боковых цепей с миграцией водородных атомов к заряженному пептидному фрагменту может вносить существенные трудности при расшифровке масс-спектров низкого и высокого разрешения, так как такая фрагментация приводит к появлению в масс-спектрах пиков, отвечающих «молекулярным» ионам пептидов, отличающихся от исходного тем, что в них аминокислотный остаток, способный элиминировать боковую цепь, заменен на остаток глицина. Например, в DADI-спектре молекулярного иона пептида (II) присутствует пик кажущегося «молекулярного» иона Dec-Gly-Gly-Val-OMe с  $m/e$  399, а в спектре соединения (III) — пик с тем же значением массового числа, отвечающий «молекулярному» иону Dec-Gly-Val-Gly-OMe.

Убедиться в том, что рассматриваемые пики не принадлежат примесным пептидам, позволяет исследование распада соответствующих мета-

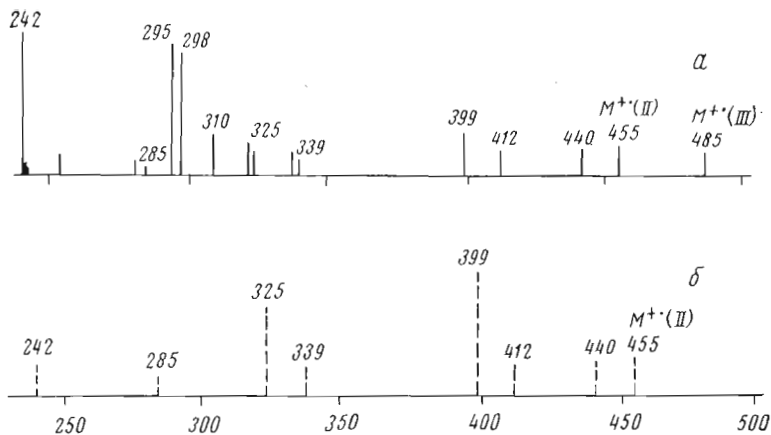


Рис. 5. Масс-спектры смеси пептидов (II,  $M^+455$ ) и (III,  $M^+485$ ) (а) и пептида (II), полученные при анализе смеси методом DADI (б)

стабильных ионов в их масс-спектрах. Используя метод DADI для анализа распада пептидов (II) и (III) при электронном ударе, удается легко установить, что ионы с  $m/e$  399 являются продуктами распада их молекулярных ионов, а не принадлежат примесным соединениям. В случае смеси пептидов (II) и (III), масс-спектр которой представлен на рис. 5а, доказательство того, что пик иона с  $m/e$  399 не принадлежит молекулярным ионам примесных пептидов, проводится следующим образом. Используя оба указанных выше метода изучения распада метастабильных ионов, показывают отсутствие связи между ионами с  $m/e$  455 и 485. Методом «метастабильной дефокусировки» устанавливают зависимость между ионом с  $m/e$  399 и ионами с  $m/e$  455 и 485. Такая зависимость означает, что рассматриваемый ион является фрагментным, а не принадлежит соответствующим примесям. Исследование распада ионов с  $m/e$  399 методом DADI показывает, что существуют два типа таких ионов с различной последовательностью аминокислотных остатков в пептидной цепи. Как видно из рис. 6, DADI-спектры этих ионов, образующихся при электронном ударе из пептидов (II) и (III), различны, хотя элементный состав одинаков ( $C_{20}H_{37}O_5N_3$ ), что отражает различие первичной структуры ионов. Изучение методом DADI связи между ионом с  $m/e$  455 и другими ионами в масс-спектре смеси пептидов (II) и (III) позволило построить условный масс-спектр пептида (II) (рис. 5б).

Таким образом, проведенное исследование показывает, что изучение процессов распада метастабильных ионов в масс-спектрах коротких пептидов позволяет анализировать структуру их боковых цепей, качественно оценить прочность различных связей в молекулярных и фрагментных ионах этих соединений и установить аминокислотную последовательность как индивидуальных пептидов, так и пептидов, находящихся в смеси. Причем часто для определения аминокислотной последовательности в коротких пептидах достаточно исследовать распад только их метастабильных молекулярных ионов.

Спектры получены на приборе Varian-MAT 311 с системой обработки данных MS-100 при энергии ионизирующих электронов 70 эВ, величине ускоряющего напряжения 3 кВ, температуре испарения образца 150—180°, температуре ионизационной камеры 200°. В спектрах DADI массу каждого дочернего иона вычисляли по формуле

$$m_2 = m_1 \frac{E_1}{E_0},$$

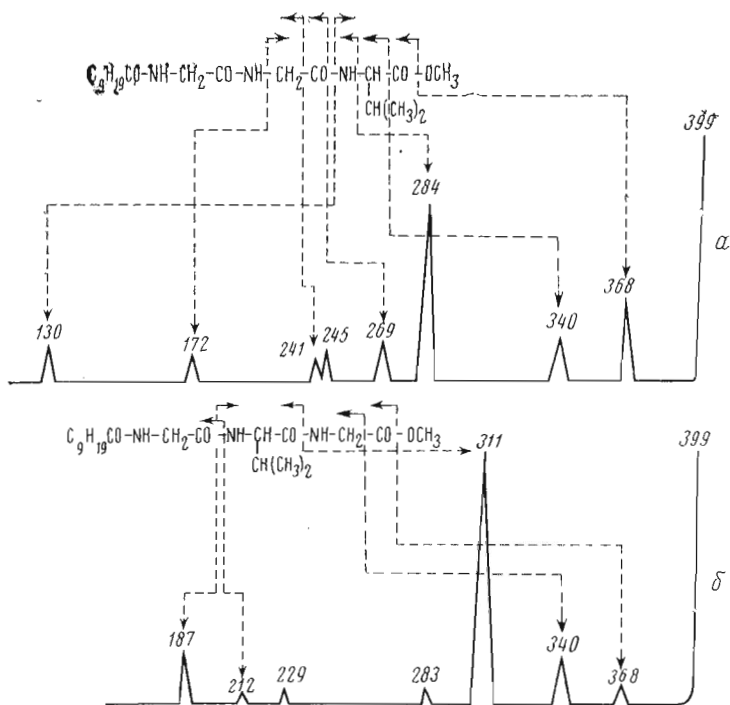


Рис. 6. DADI-спектры ионов с  $m/e$  399, образующихся при электронном ударе из пептидов (II) (а) и (III) (б)

где  $m_2$  — масса дочернего иона;  $m_1$  — масса материнского иона;  $E_1$  — напряжение энергоанализатора, при котором зарегистрирована  $m_2$ ;  $E_0$  — исходное значение напряжения энергоанализатора, при котором регистрируется  $m_1$ .

В спектрах «метастабильной дефокусировки» массу каждого материнского иона находили по уравнению

$$m_1 = m_2 \frac{V_1}{V_0},$$

где  $V_1$  — ускоряющее напряжение, при котором зарегистрирована  $m_1$ ;  $V_0$  — исходное значение ускоряющего напряжения, при котором регистрируется  $m_2$ . Величины  $E_0$ ,  $E_1$ ,  $V_0$  и  $V_1$  измерялись цифровым вольтметром.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cooks R. G., Beynon J. H., Caprioly R. M., Lester G. R. (1973) *Metastable Ions*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, London, New York.
2. Smith D. H., Djerassi C., Maurer K. H., Rapp U. (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, 96, 3482—3486.
3. Terwilliger D. T., Beynon J. H., Cooks R. G. (1974) *Int. J. Mass. Spectrom. and Ion Phys.*, 14, 15—27.
4. Садовская В. Л., Меримсон В. Г., Розынов Б. В. (1975) *Биоорг. химия*, 1, 880—888.
5. Розынов Б. В., Садовская В. Л., Меримсон В. Г., Овчинников Ю. А. (1975) *Биоорг. химия*, 1, 494—505.
6. Wipf H. K., Irvihg P., McCamish M., Venkataraghavan R., McLafferty F. W. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, 95, 3369—3375.
7. Schluogger U. P., Hirter P., Felten von H. (1976) *Helv. chim. acta*, 59, 406—415.
8. Shemyakin M. M., Ovchinnikov Yu. A., Vinogradova E. I., Kiryushkin A. A., Feigina M. Yu., Aldanova N. A., Alakhov Yu. B., Lipkin V. M., Rosinov B. V., Kazaryan S. A. (1970) *FEBS Lett.*, 7, 8—12.

Поступила в редакцию  
27.IX.1976

MASS SPECTRAL STUDY OF PEPTIDES AND PEPTIDE MIXTURES  
USING DADI AND METASTABLE DEFOCUSING METHODS

RAZAKOV R. R., ASLANOV Kh. A., SADYKOV A. S., ROSYNOV B. V.

*Department of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent;  
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

In order to examine the possibility of application in peptide structural studies of the metastable defocusing and direct analysis of daughter ions (DADI) techniques, which allow complete analysis of metastable ion degradation, the DADI and defocusing spectra have been recorded for a number of model peptides and their equimolar mixtures.

It was shown that a molecular ion of each peptide is decomposed to a series of daughter ions giving very specific pattern of DADI spectrum in which both nature and the position of the amino acid residue are clearly reflected. The individuality of DADI spectrum for each peptide is preserved in equimolar peptide mixtures. However, DADI spectra of daughter ions of the same structure but arising from different precursors are different. A genetic relation between the parent and daughter ions, which was found basing on DADI spectra, was confirmed in some cases by the metastable defocusing techniques. Thus, the analysis of metastable ion decomposition by DADI and metastable defocusing methods allows unambiguous identification of the peptide mixtures.

---