



ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕПТИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

II. N-МЕТИЛЗАМЕЩЕННЫЕ ЦИКЛОДЕПСИПЕПТИДЫ

Садовская В. Л., Меримсон В. Г., Розынов Б. В.

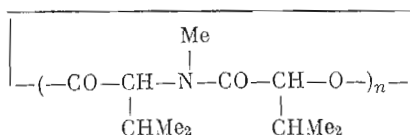
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

Изучены масс-спектры высокого разрешения циклических тетра-, гекса- и декадесипептидов регулярного строения, содержащих N-метильные группы, и исследованы метастабильные переходы с помощью метода энергетической дефокусировки ионного луча. Установлено, что основные пути распада молекулярных ионов этих соединений при электронном ударе связаны с образованием четырех первичных ионов: $[M - \text{CHMe}_2]^+$, $[M - (\text{COCH} = \text{CMe}_2)]^+$, $[M - \text{OCOS}(\text{CHMe}_2)\text{NMe}]^+$ и $[M - \text{COS}(\text{CHMe}_2) = \text{NMe}]^+$, а не ионов $[M - \text{CO}_2]^+$, [морфолин] $^+$ и [ациламинокетон] $^+$, как предполагалось ранее. Дальнейший распад образовавшихся ионов протекает путем последовательного элиминирования остатков окси- и аминокислот, что дает полное представление о строении исследуемых макроциклов.

Ранее [1—4] были детально изучены масс-спектры низкого разрешения различных циклодесипептидов. По масс-спектрам циклических ди-, тетра-, гекса-, окта- и додекадесипептидов регулярного строения были обнаружены три основных типа фрагментации: морфолиновый, ациламинокетонный и CO_2 -тип [3].

Масс-спектры были получены на масс-спектрометре МХ-1303, который не позволял определять значения массовых чисел ионов с точностью, большей ± 1 а. е. м. Не изучались и метастабильные переходы, подтверждающие обнаруженные типы фрагментации. Учитывая сказанное выше, представлялось интересным изучить механизмы распадов молекулярных ионов различных циклодесипептидов с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения и с применением метода непосредственного анализа дочерних ионов (НАДИ) [5].

Для выяснения механизмов фрагментации N-метилзамещенных циклодесипептидов с различным размером цикла нами были изучены особенности масс-спектрометрического поведения циклотетра-(I), циклогекса-(II) и циклодекадесипептида (III), построенных из остатков L-N-метилвалина и D-оксизовалериановой кислоты:



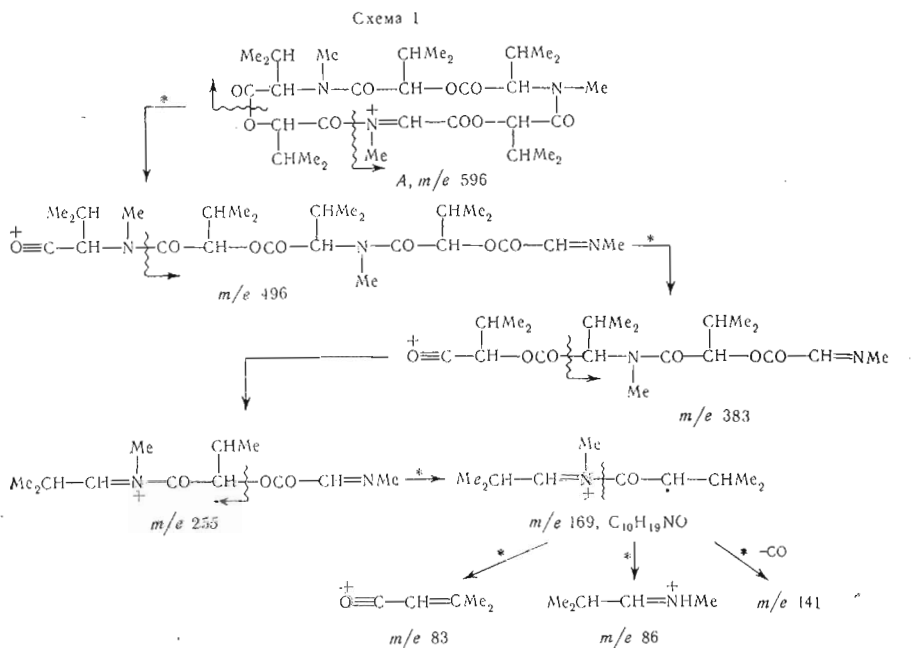
(I) $n = 2$, (II) $n = 3$, (III) $n = 5$

Исследование проводилось методом масс-спектрометрии высокого разрешения. Пути распада ионов были подтверждены наличием соответствующих пиков метастабильных ионов, которые определялись методом энергетической дефокусировки ионного луча в электростатическом анализаторе масс-спектрометра — НАДИ.

Анализ масс-спектров показал, что CO_2 -тип фрагментации не является основным типом распада молекулярных ионов этих соединений при электроном ударе [6]. Интенсивность ионов $[M - \text{CO}_2]^+$ в масс-спектрах соединений (I)–(III) крайне незначительна и определить точную массу этого иона удалось только для циклотетрадеписептида (I) (см. далее). Предположение, что низкая интенсивность этого иона обусловлена его дальнейшим быстрым распадом, не нашло подтверждения, так как исследование метастабильных переходов в масс-спектре соединения (II) показало, что ион $[M - \text{CO}_2]^+$ не является родительским ни для одного из основных фрагментов в спектре.

Ациламинокетенный тип распада также оказался нехарактерным. В масс-спектрах всех изученных соединений обнаружен процесс элиминирования из молекулярного иона заряженной молекулы морфолина с одним мигрировавшим к ней атомом водорода. В этом случае можно говорить о наличии морфолинового типа фрагментации, однако не в таком виде, как он был описан ранее; скорее всего образующийся морфолиновый ион имеет линейное строение. Таким образом, в масс-спектрах соединений (I)–(III) указанные выше три типа фрагментации [3] не являются доминирующими.

Образование главных характеристических ионов в масс-спектрах этих соединений протекает различными путями, среди которых наблюдаются четыре основных направления.



Первый путь распада заключается в последовательном элиминировании остатков окси- и аминокислоты из иона A (в масс-спектре циклогексадеписептида (II) m/e 596), образующегося в результате потери молекулярным ионом изопропильного радикала, причем раскрытие цикла протекает лишь на второй стадии, при выбросе из иона A остатка оксикислоты (схема 1, табл. 1). Конечным продуктом распада иона A является фрагмент

Схема 2

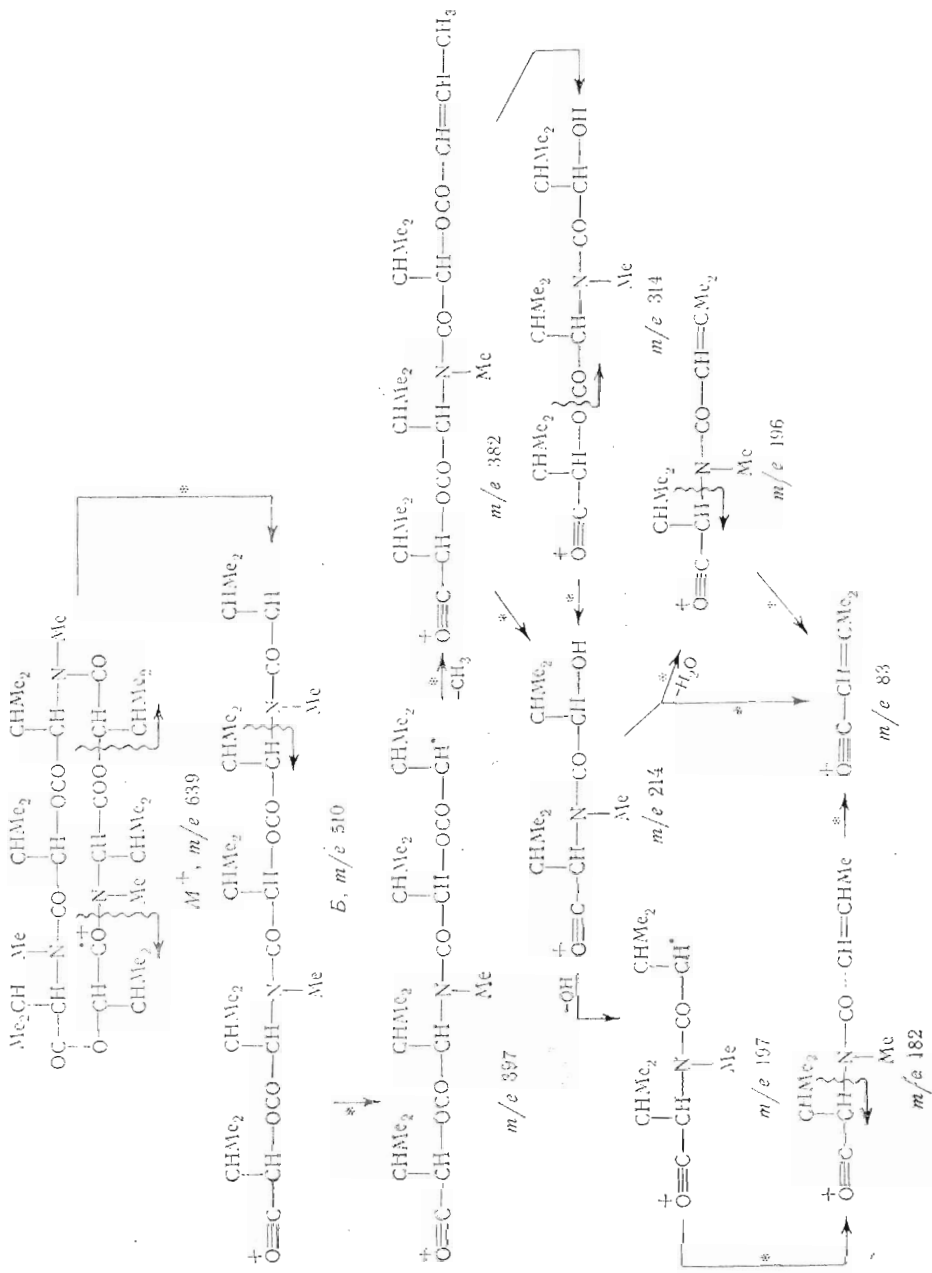


Таблица 1

Вероятные пути образования характеристических ионов (m/e) в масс-спектре циклогексадеципептида (II), подтвержденные с помощью «метастабильных пиков»
Звездочкой отмечены «метастабильные пики» максимальной интенсивности

Родительский	Дочерний	Родительский	Дочерний	Родительский	Дочерний
	154→83		325→297		443→425
	*169→83		510→297		538→425
	182→83		425→325		*556→425
	214→83		510→325		
	196→83		538→325		527→427
	154→86		*556→325		596→427
	169→86		538→543		*639→427
	169→141		483→383		*556→443
	*255→169		*496→383		639→443
	270→169		596→383		510→496
	282→169		510→396		*596→496
	*197→182		427→409		*527→510
	282→182		509→409		538→510
	*314→214		596→409		596→510
	325→214		639→409		639→510
	382→214				
	409→214				
	427→214				
	443→214				
	639→214				

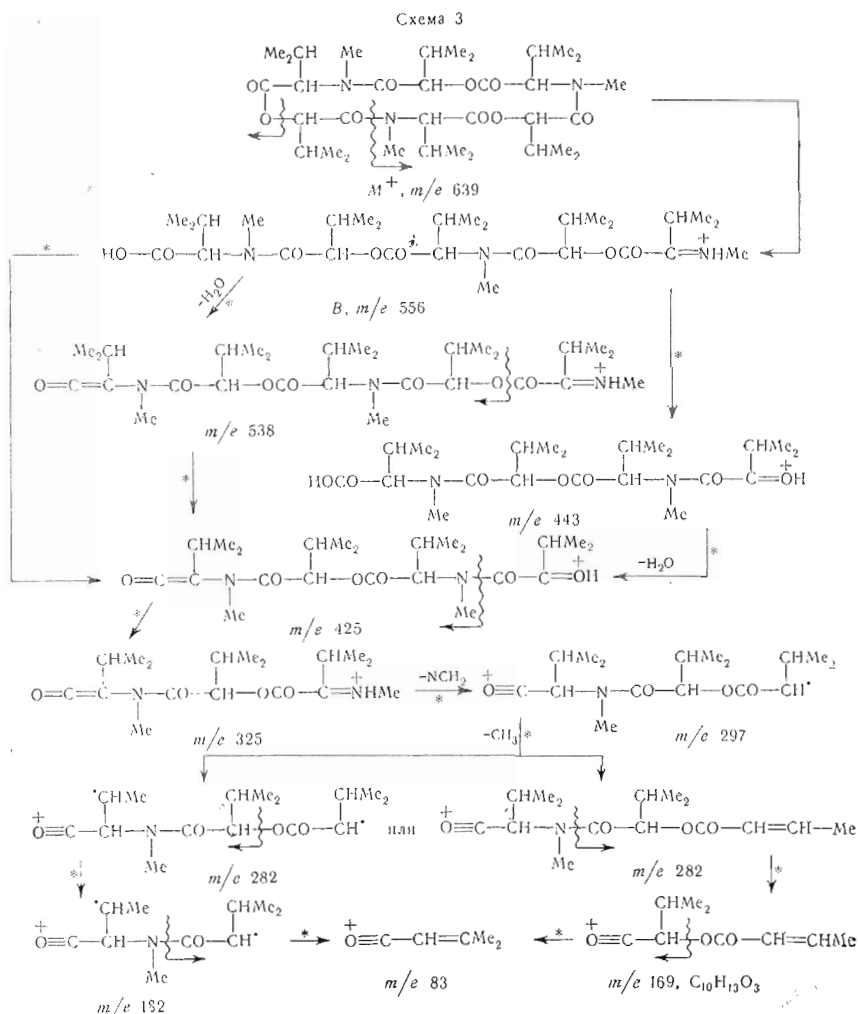
Таблица 2

Характеристические ионы, образующиеся при распаде циклотетрадеципептида (I), $C_{22}H_{38}N_2O_6$, M 426

m/e		Элементный состав	Относительная интенсивность, % от максимального пика
Вычисленное	Измеренное		
426,2728	426,2756	$C_{22}H_{38}N_2O_6$	9,2
411,2494	411,2470	$C_{21}H_{35}N_2O_6$	1,4
384,2259	384,2236	$C_{19}H_{32}N_2O_6$	2,1
383,2181	383,2172	$C_{19}H_{31}N_2O_6$	2,7
382,2830	382,2818	$C_{21}H_{38}N_2O_4$	0,3
343,2232	343,2247	$C_{17}H_{31}N_2O_5$	2,3
327,2283	327,2278	$C_{17}H_{31}N_2O_4$	8,7
325,2125	325,2106	$C_{17}H_{29}N_2O_4$	5,7
314,1967	314,2012	$C_{16}H_{27}NO_5$	1,3
297,1940	297,1941	$C_{16}H_{27}NO_4$	51,0
282,1704	282,1695	$C_{15}H_{24}NO_4$	100,0
214,1442	214,1446	$C_{11}H_{20}NO_3$	12,9
197,1415	197,1425	$C_{11}H_{19}NO_2$	22,9
196,1337	196,1351	$C_{11}H_{18}NO_2$	15,1
182,1180	182,1174	$C_{10}H_{16}NO_2$	33,5
169,1465	169,1467	$C_{10}H_{16}NO$	11,6
169,0864	169,0865	$C_9H_{13}O_3$	2,3
154,1231	154,1226	$C_9H_{16}NO$	10,2
142,0867	142,0872	$C_7H_{12}NO_2$	12,5
141,1517	141,1520	$C_9H_{19}N$	5,5
126,1282	126,1284	$C_8H_{16}N$	2,0
126,0918	126,0932	$C_7H_{12}NO$	4,0
86,0969	86,0960	$C_5H_{12}N$	90,7
83,0496	83,0499	C_5N_7O	28,7

с m/e 169, образующий при дальнейшей диссоциации ионы с m/e 83 и 86, характеризующие соответственно остатки окси- и аминокислоты депсипептида.

Второй путь распада начинается с образования липейного иона B (для соединения (II), m/e 510) в результате выброса из молекулярного иона



или иона *A* (табл. 1) остатка аминокислоты и атома кислорода, т. е. частицы $OSON(CHMe_2)NMe$. Ион *B* далее распадается, как указано на схеме 2, причем конечным продуктом распада является ион с $m/e\ 196$ — максимальный по интенсивности в спектре циклогексадеципептида (II) (табл. 3). Следует отметить, что данный вариант образования отдельных ионов не является единственным. Например, ион с $m/e\ 214$, содержащий остатки окси- и аминокислоты (по элементному составу это аналог морфолина плюс атом водорода) и являющийся предшественником ионов с $m/e\ 196$ и 197 , может образовываться различными путями (табл. 1), в том числе и непосредственно из M^+ , однако доминирует распад $m/e\ 314 \rightarrow m/e\ 214$. То же самое можно сказать и о ионе с $m/e\ 83$, в образовании которого главную роль играет распад $m/e\ 169 \rightarrow m/e\ 83$, и о других ионах, образующихся в результате многоступенчатых процессов распада.

Третий путь фрагментации начинается с образования линейного иона *B* (для соединения (II), $m/e\ 556$), который возникает путем выброса из M^+ частицы $OSON=CMe_2$ (схема 3). Ион *B* далее, теряя остаток аминокислоты и воду, образует ион с $m/e\ 425$, который, элиминируя остаток оксикислоты и NCH_2 -группу, переходит в ион с $m/e\ 297$. Последний может также образовываться непосредственно из иона *B* ($m/e\ 510$, схема 2, табл. 1). Элиминирование метильного радикала из иона с $m/e\ 297$ приводит к фрагменту с $m/e\ 282$, который при потере остатка оксикислоты переходит в ион

Т а б л и ц а 3
Характеристические ионы, образующиеся при распаде
циклогексадепсипептида (II), C₃₃H₅₇N₃O₉, M 639

<i>m/e</i>		Элементный состав	Относительная интенсивность, % от максимального пика
Вычисленное	Измеренное		
639,3992	639,4089	C ₃₃ H ₅₇ N ₃ O ₉	5,0
597,3623	597,3463	C ₃₀ H ₅₁ N ₃ O ₉	1,6
596,3541	596,3551	C ₃₀ H ₅₀ N ₃ O ₉	5,6
556,3596	556,3631	C ₂₈ H ₅₀ N ₃ O ₈	14,8
538,3375	538,3480	C ₂₈ H ₄₈ N ₃ O ₇	14,6
527,3331	527,3324	C ₂₇ H ₄₇ N ₂ O ₈	1,6
510,3303	510,3409	C ₂₇ H ₄₆ N ₂ O ₇	3,6
509,3226	509,3256	C ₂₇ H ₄₅ N ₂ O ₇	2,3
496,3022	496,3023	C ₂₅ H ₄₂ N ₃ O ₇	1,7
495,3069	495,3080	C ₂₆ H ₄₃ N ₂ O ₇	1,2
483,2704	483,2720	C ₂₄ H ₃₉ N ₂ O ₈	9,1
443,2726	443,2735	C ₂₂ H ₃₉ N ₂ O ₇	1,6
427,2807	427,2798	C ₂₂ H ₃₉ N ₂ O ₉	4,4
425,2650	425,2628	C ₂₂ H ₃₇ N ₂ O ₆	3,7
409,2702	409,2667	C ₂₂ H ₃₇ N ₂ O ₅	5,6
397,2464	397,2450	C ₂₁ H ₃₅ NO ₆	2,1
396,2385	396,2412	C ₂₁ H ₃₄ NO ₆	3,1
383,2181	383,2157	C ₁₉ H ₃₁ N ₂ O ₆	3,9
382,2228	382,2211	C ₂₀ H ₃₂ NO ₆	2,0
343,2232	343,2222	C ₁₇ H ₃₁ N ₂ O ₅	2,3
325,2125	325,2145	C ₁₇ H ₂₉ N ₂ O ₄	10,3
314,1967	314,1959	C ₁₆ H ₂₈ NO ₅	2,2
297,1940	297,1944	C ₁₆ H ₂₇ NO ₄	19,4
296,1861	296,1865	C ₁₆ H ₂₆ NO ₄	15,3
282,1704	282,1708	C ₁₅ H ₂₄ NO ₄	17,8
255,1708	255,1697	C ₁₃ H ₂₃ N ₂ O ₃	1,0
214,1442	214,1432	C ₁₁ H ₂₀ NO ₃	10,6
197,1415	197,1402	C ₁₁ H ₁₉ NO ₂	28,9
196,1337	196,1336	C ₁₁ H ₁₈ NO ₂	99,6
182,1180	182,1189	C ₁₀ H ₁₆ NO ₂	17,1
169,1465	169,1467	C ₁₀ H ₁₆ NO	51,0
169,0864	169,0861	C ₉ H ₁₃ O ₃	1,9
154,1231	154,1234	C ₉ H ₁₆ NO	9,7
141,1517	141,1525	C ₈ H ₁₃ N	17,8
142,0867	142,0870	C ₇ H ₁₂ NO ₂	12,3
130,0867	130,0859	C ₆ H ₁₂ NO ₂	4,2
126,0918	126,0920	C ₇ H ₁₂ NO	4,6
98,0969	98,0970	C ₆ H ₁₂ NO	6,3
86,0968	86,0969	C ₅ H ₁₂ N	100,0
84,0813	84,0814	C ₃ H ₁₀ N	29,5
84,0574	84,0570	C ₅ H ₈ O	10,3
83,0734	83,0740	C ₅ H ₉ N	1,0
83,0496	83,0509	C ₅ H ₇ O	29,2

с *m/e* 182 или же при потере остатка аминокислоты образует ион с *m/e* 169 (строение и элементный состав этого иона отличны от иона с тем же значением *m/e*, представленном на схеме 1, см. табл. 3). Это позволяет предположить для иона с *m/e* 282 по крайней мере две различные структуры, зависящие от того, какая CN₂-группа элиминируется из иона с *m/e* 297 (схема 3).

Из трех перечисленных основных путей распада в случае циклотетрадепсипептида (I) реализуются лишь два, так как в его спектре присутствуют только ионы A (*m/e* 383) и B (*m/e* 343). Действительно, элементный состав иона A и ионов, образующихся в результате его распада в спектре соединения (I), идентичен иону с *m/e* 383 и образующимся из него фрагментам в спектре циклогексадепсипептида (II), причем пути распада иона с *m/e* 383 подтверждены «метастабильными пиками» (ср. табл. 2 и 3 и схему 1). Поэтому можно предположить, что ион A распадается далее аналогично иону с *m/e* 383 в спектре циклогексадепсипептида (II) (схема 1).

Таблица 4

Характеристические ионы, образующиеся при распаде циклодекадепептида (III), $C_{55}H_{95}N_5O_{15}$, M 1065
 Массы ионов с m/e 853, 835, 771, 722 и 640 измерены без применения системы обработки данных DS-30

m/e		Элементный состав	Относительная интенсивность, % от максимального пика
Вычисленное	Измеренное		
853,5530	853,5398	$C_{44}H_{77}N_4O_{12}$	2,7
835,5425	835,5306	$C_{44}H_{75}N_4O_{11}$	3,7
771,5112	771,5143	$C_{39}H_{71}N_4O_{11}$	8,5
722,4585	722,4588	$C_{38}H_{64}N_3O_{10}$	1,2
640,4171	640,4194	$C_{33}H_{58}N_3O_9$	4,0
622,4065	622,3996	$C_{33}H_{56}N_3O_8$	4,3
596,3546	596,3512	$C_{30}H_{51}N_3O_9$	0,5
556,3596	556,3556	$C_{28}H_{51}N_3O_8$	0,1
552,3283	552,3296	$C_{28}H_{46}N_3O_8$	1,7
538,3491	538,3516	$C_{28}H_{48}N_3O_7$	0,3
527,3331	527,3319	$C_{27}H_{47}N_2O_8$	0,8
510,3303	510,3349	$O_{27}H_{46}N_2C_7$	2,1
509,3226	509,3256	$C_{27}H_{45}N_2O_7$	3,1
496,3022	496,3064	$C_{25}H_{42}N_2O_7$	1,1
427,2807	427,2801	$C_{22}H_{39}N_2O_6$	2,5
409,2702	409,2649	$C_{22}H_{37}N_2O_5$	6,3
383,2181	383,2177	$C_{19}H_{31}N_2O_6$	2,2
382,2228	382,2224	$C_{20}H_{32}NO_6$	0,7
396,2385	396,2394	$C_{21}H_{34}NO_6$	0,8
339,1919	339,1921	$C_{17}H_{27}N_2O_3$	1,3
325,2125	325,2142	$C_{17}H_{29}N_2O_4$	1,7
314,1967	314,1971	$C_{16}H_{28}NO_5$	2,0
297,1912	297,1928	$C_{16}H_{27}NO_4$	6,9
296,1861	296,1861	$C_{16}H_{26}NO_4$	10,8
282,1704	282,1719	$C_{15}H_{24}NO_4$	6,9
255,1708	255,1702	$C_{13}H_{23}N_2O_3$	1,0
214,1442	214,1446	$C_{11}H_{21}NO_3$	10,0
197,1415	197,1391	$C_{11}H_{19}NO_2$	23,0
196,1337	196,1329	$C_{11}H_{18}NO_2$	100,0
182,1180	182,1181	$C_{10}H_{16}NO_2$	10,9
169,1465	169,1467	$C_{10}H_{16}NO$	43,2
169,0864	169,0868	$C_9H_{13}O_3$	2,0
141,1517	141,1522	$C_9H_{19}N$	11,1
141,0915	141,0922	$C_8H_{13}O_2$	0,4
142,0867	142,0867	$C_7H_{12}NO_2$	4,4
86,0969	86,0971	$C_5H_{12}N$	47,8
83,0496	83,0500	C_5H_7O	15,9
69,0340	69,0336	C_4H_5O	6,4

Что касается иона B , то он, элиминируя воду, переходит в ион с m/e 325, дальнейший распад которого протекает по схеме 3.

Тот факт, что распад, начинающийся с образования линейного иона B , не имеет места в случае циклотетрадепептида, подтверждается также и низкой интенсивностью иона с m/e 196, который в спектре циклогексадепептида (II) образуется из иона B и является максимальным по интенсивности (ср. табл. 2 и 3).

Следует отметить особо еще один способ раскрытия цикла при электронном ударе, наблюдаемый в спектрах всех трех изученных макроциклов и в особенности характерный для циклодекадепептида (III), — это элиминирование из M^+ остатка аминокислоты в виде группы $COC(CHMe_2)=NMe$ (112 а. е. м.) или остатка оксикислоты в виде $COC(CHMe_2)=O$ (99 а. е. м.). Образующийся при этом линейный ион G отщепляет последовательно остатки окси- и аминокислоты и молекулу воды. Этот тип фрагментации в спектре соединения (I) приводит к следующей цепи распадов:

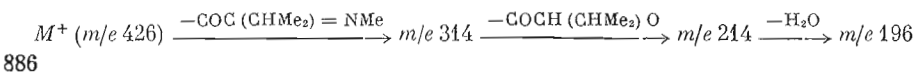


Схема 4

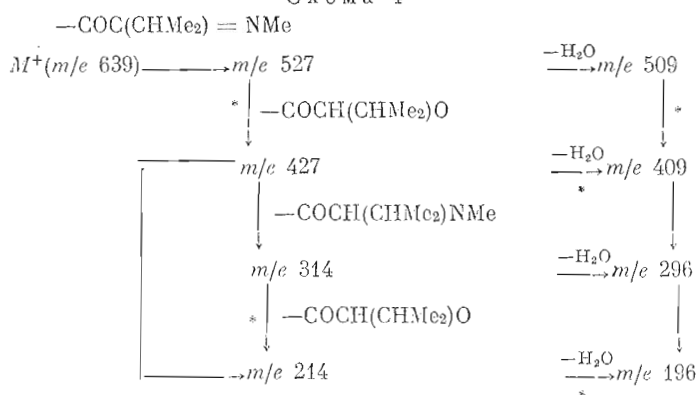
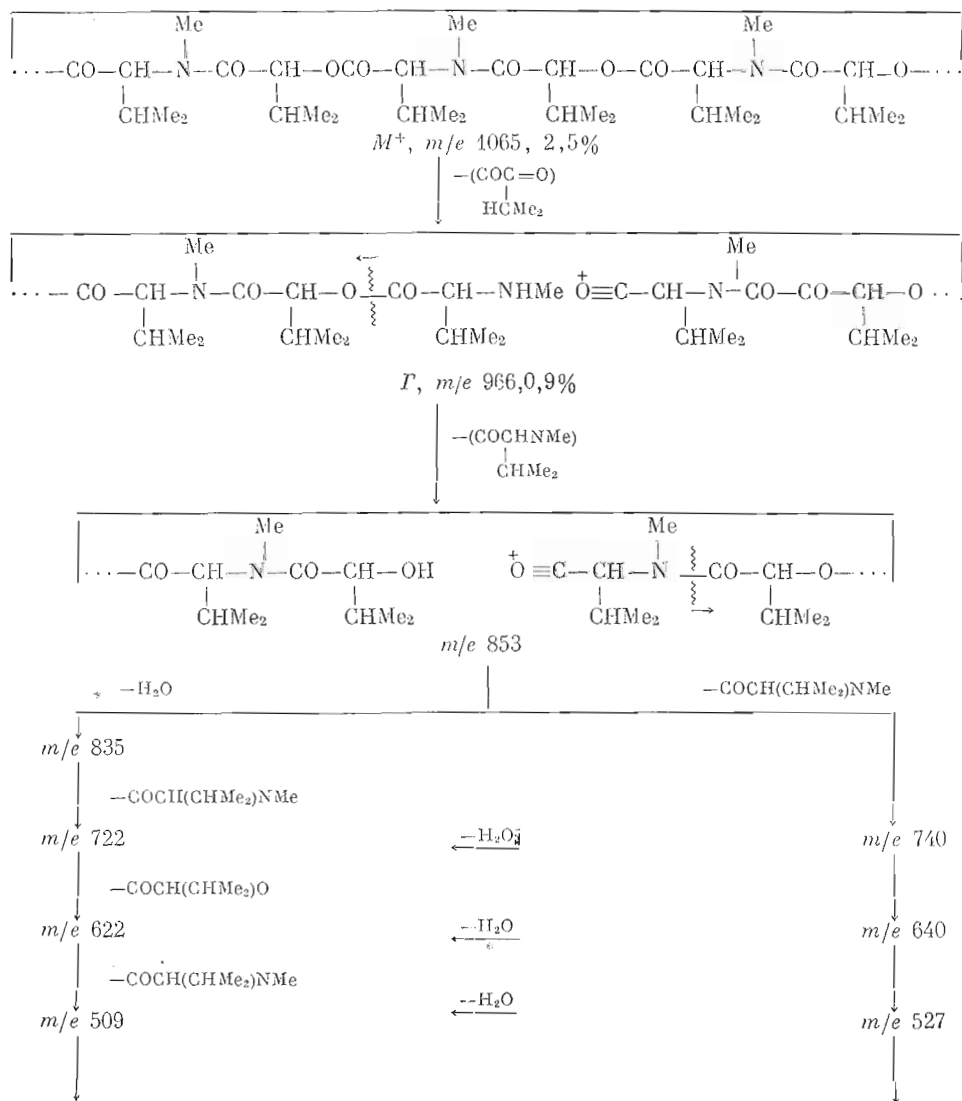


Схема 5



Далее схема полностью совпадает со схемой 4.

В спектре циклогексадепептида (II) этот путь фрагментации реализуется в следующей последовательности распадов (схема 4). Значительная часть процессов распада подтверждена наличием пиков метастабильных ионов, а элементный состав ионов (табл. 3) также полностью коррелирует со схемой 4.

Сказанное выше дает возможность предположить, что рассмотренный путь фрагментации является наиболее общим для всех изученных соединений и особенно ярко выражен в случае циклического декадепептида (III) (табл. 4, схема 5), в спектре которого отчетливо проявляется последовательная деградация молекулярного иона с образованием ионов, соответствующих по элементному составу окта- (m/e 853), гекса- (m/e 640), тетрадепептиду (m/e 427) и морфолину (m/e 214) плюс атом водорода. Характерной особенностью этих ионов является то, что все они сопровождаются ионами, образующимися в результате выброса молекулы воды, что во многих случаях подтверждается наличием метастабильных переходов.

Масс-спектры высокого разрешения были получены на приборе MS-902 (Англия) с компьютерной системой обработки данных DS-30. Вещества вводились непосредственно в ионный источник при температуре ионизационной камеры 200—350° и энергии ионизации 70 эВ.

Авторы выражают большую благодарность В. А. Валовому и Н. С. Куликову (Государственный институт азотной промышленности) за определение метастабильных переходов на масс-спектрометре JMS-OIUC (Япония), а также А. В. Евстратову (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР) за любезно предоставленные коллекционные образцы депептидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Розынов Б. В. (1966) Масс-спектрометрическое исследование некоторых природных и синтетических депептидов, канд. дисс., Москва.
2. Бочкарев В. Н., Пучков В. А., Вульфсон Н. С., Шемякин М. М., Овчинников Ю. А., Кирюшкин А. А., Иванов В. Т., Виноградова Е. И., Алданова Н. А. (1965) Химия природн. соедин., 1, 52—58.
3. Wulfson N. S., Puchkov V. A., Rosinov B. V., Zyakoon A. M., Shemyakin M. M., Ovchinnikov Yu. A., Kiryushkin A. A., Ivanov V. T. (1965) Tetrahedron Lett., 2793—2804.
4. Розынов Б. В., Буриков В. М., Богданова И. А., Кирюшкин А. А. (1969) Ж. общ. химии, 39, 891—905.
5. Maurer K. H., Brunnee C., Kappus G., Habfast K., Schröder U., Schulze P. Ninteenth Annual Conference on Mass Spectrometry, ASTM Committee E — 14, Atlanta, Ga., May 1971.
6. Compennolle F., Vanderhaeghe H., Janssen G. (1972). Org. Mass Spectrom., 6, 151—166.

Поступила в редакцию
26.XII.1974

THE STUDY OF PEPTIDE COMPOUNDS BY HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY. II. N-METHYLSUBSTITUTED CYCLODEPSIPEPTIDES

SADOVSKAYA V. L., MERIMSON V. G., ROSINOV B. V.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

High resolution mass spectra were obtained for a series of N-methylsubstituted cyclopeptideptides, whereby metastable transitions were studied. The principal fragmentation pathways of molecular ions lead to four ions, i. e. $[M-(COCH=CMe_2)]^+$, $[M-CHMe_2]^+$, $[M-OCOCH(CHMe)_2NMe]^+$, and $[M-COC(CHMe)_2=NMe]^+$. The analysis of fragments that arise by successive elimination of amino and hydroxy acid residues from the above ions makes it possible to determine the structure of a parent macrocycle.