

## 质谱在生命有机磷化学中的一些应用

付 华      陈 益      赵玉芬\*

(清华大学生命科学与工程研究院化学系 生命有机磷化学教育部重点实验室 北京 100084)

**摘要** 讨论了质谱在生命有机磷化学中的应用,包括 *N*-磷酰氨基酸、肽、五配位磷化合物、核苷-氨基酸磷酰胺的质谱裂解途径,有机磷试剂辅助下氨基酸的自组装成肽产物和机理。

**关键词** 质谱, *N*-磷酰氨基酸, 肽, 五配位磷化合物, 核苷-氨基酸磷酰胺, 反应机理

## The Applications of Mass Spectrometry in Bioorganic Phosphorus Chemistry

FU Hua      CHEN Yi      ZHAO Yu-Fen\*

(Key Laboratory for Bioorganic Phosphorus Chemistry of Ministry of Education, Department of Chemistry, School of Life Sciences and Engineering, Tsinghua University, Beijing, 100084)

**Abstract** Mass spectrometry plays important roles in bioorganic chemistry for its fast determination, high sensitivity and direct analysis of mixtures. In this paper, some applications of mass spectrometry in bioorganic phosphorus chemistry are discussed including mass spectral fragmentation pathways of *N*-phosphoamino acids, peptides, pentacoordinated phosphorus compounds, amino acid phosphoramidates of nucleosides, the self-assembly products and the mechanism of amino acids into peptides mediated by organic phosphorus reagents.

**Keywords** mass spectrometry, *N*-phosphoamino acid, peptides, pentacoordinated phosphorus compounds, amino acid phosphoramidates of nucleosides, reaction mechanism

许多事实证明磷酯在生命中起着重要作用,例如基因的材料 DNA 和 RNA 是磷酸二酯, RNA 不仅是信息的载体,同时也具有催化作用。许多辅酶是磷酸酯和焦磷酸酯,生物的主要能量储存仓库 ATP 也是磷酸酯,许多新陈代谢的中间体是磷酸酯的缀合物,细胞膜的主要组成部分是磷脂双分子层,所以说磷酯及其酸酐在生物界中起着十分重要的作用。哈佛大学 Westheimer 教授阐述了大自然为什么选择了磷酯<sup>[1]</sup>。诺贝尔生物化学奖获得者 Todd 教授提出

“哪里有生命,哪里就有磷”的科学论断。对磷酯在生命现象中作用的揭示,除了一些生化分析方法外,最有威力的工具恐怕是一些现代物理、化学分析手段。质谱法以用量少、能对混合物直接检测等优点而在生化样品分析中起重要作用。电喷雾电离质谱仪和基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪的问世,使得质谱学和生物学的结合更加紧密,使极性小肽分子的分析成为可能,检测限也下降到了 fmol 级别,可测定分子量范围则高达 100,000 Da,同时也出现

\* E-mail: tp-dch@mail. tsinghua. edu. cn

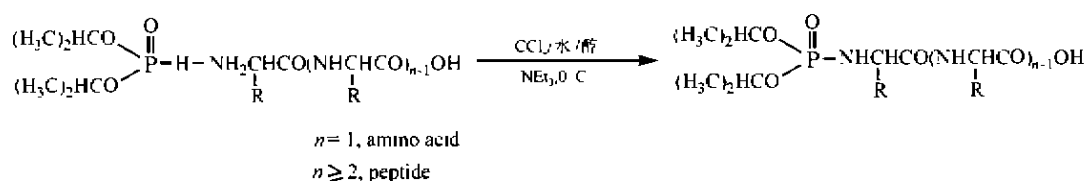
收稿日期: 2000-08-17, 修回日期: 2000-12-29, 定稿日期: 2001-02-24

(Received August 17, 2000. Revised December 29, 2000. Accepted February 24, 2001)

了许多基于这两质谱的蛋白测序方面的应用及研究方法.如,利用待测分子在电离及飞行过程中产生的亚稳离子,通过分析相邻同组类型峰的质量差,识别相应的氨基酸残基和用化学探针或酶解使蛋白或肽从N端或C端逐一降解下氨基酸残基形成相互间差一个氨基酸残基的结构,经质谱检测,由相邻峰的质量差可知相应的氨基酸残基.本文将系统介绍本室在利用质谱研究N-磷酰氨基酸和肽、五配位磷化合物、核苷N-磷酰氨基酸甲酯的质谱裂解规律及有机磷辅助下氨基酸自组装成肽产物和机理等方面所做的工作.

## 1 N-磷酰氨基酸、肽的质谱研究

N-磷酰氨基酸在水/醇体系中能发生一些仿生化反应<sup>[2-9]</sup>,如成肽反应<sup>[10-12]</sup>、成酯反应<sup>[13,14]</sup>、磷上酯交换反应<sup>[15-17]</sup>和磷上的N→O迁移;当体系中有核苷时,能同时得到肽和核苷酸.因此对N-磷酰氨基酸的质谱研究具有实际意义.N-磷酰氨基酸、肽的合成途径如下:



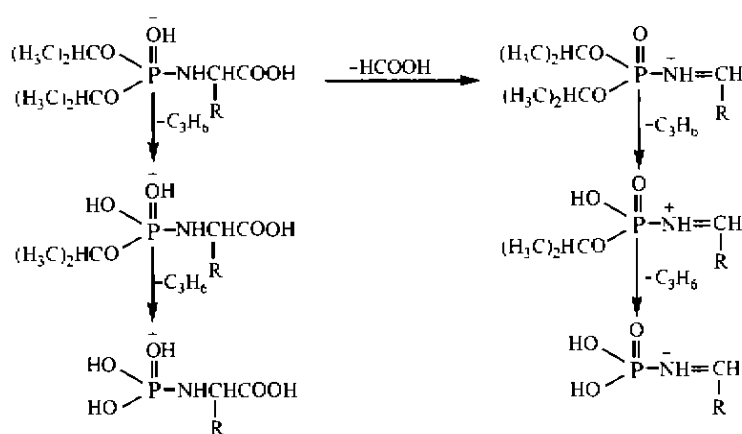
图式1 N-磷酰氨基酸、肽的合成

Scheme 1 Synthetic pathway of N-phosphoamino acids and peptides

### 1.1 N-磷酰氨基酸的正、负离子快原子轰击质谱研究

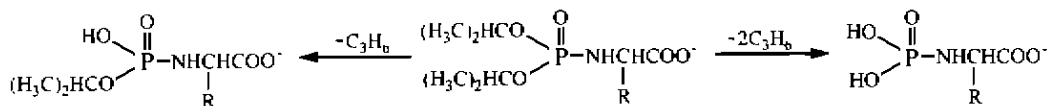
快原子轰击质谱法(fast atom bombardment mass spectrometry, FAB-MS)是20世纪80年代初发展起来的一种软电离技术,其过程是把样品溶解在基质如甘油、硫代甘油或硝基苯醇等中,然后点在FAB靶上.当高能的原离子或离子轰击样品时,样品蒸发和离解.N-磷酰氨基酸的正离子FAB-MS中准分子离子 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 丰度很高,同时伴随着两个连续丢失

丙烯的离子 $[\text{MH} - \text{C}_3\text{H}_6]^+$ , $[\text{MH} - 2\text{C}_3\text{H}_6]^+$ .另外能观察到准分子离子 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 丢失甲酸的离子 $[\text{MH} - \text{HCOOH}]^+$ 及两个连续丢失丙烯的离子 $[\text{MH} - \text{HCOOH} - \text{C}_3\text{H}_6]^+$ 和 $[\text{MH} - \text{HCOOH} - 2\text{C}_3\text{H}_6]^+$ ,其裂解途径如图2所示<sup>[18]</sup>.N-磷酰氨基酸的负离子FAB-MS裂解行为比较简单(见图3)<sup>[19]</sup>,常常只有准分子离子 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 和两个连续丢失丙烯的离子 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_3\text{H}_6]^-$ , $[\text{M} - \text{H} - 2\text{C}_3\text{H}_6]^-$ .



图式2 N-磷酰氨基酸的正离子质谱裂解途径

Scheme 2 Positive ion FABMS fragmentation pathway of N-phosphoamino acids



图式 3 *N*-磷酸氨基酸的负离子质谱裂解途径

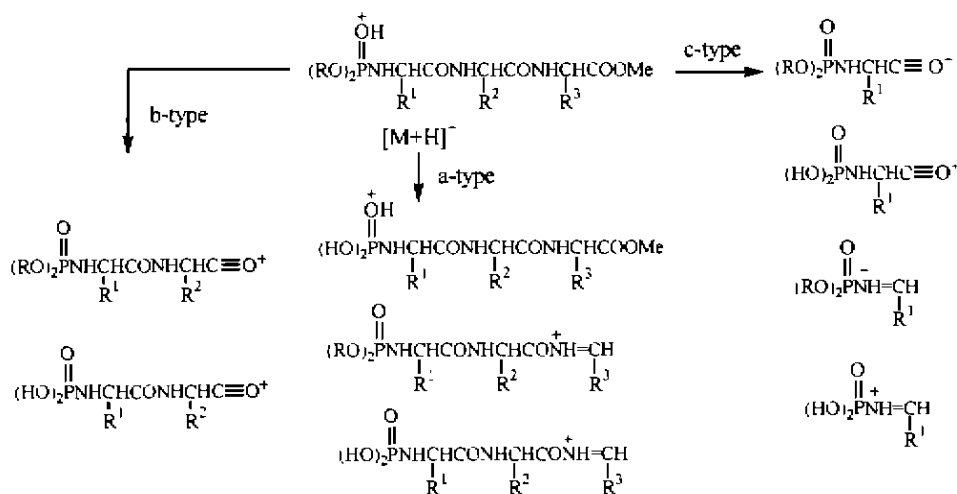
**Scheme 3** Negative ion FAB/MS fragmentation pathway of *N*-phosphoamino acids

在氨基酸的正离子快原子轰击质谱中,经常发现一些样品与基质加合离子和基质如甘油的簇离子,氨基酸的准分子离子丰度较低。当氨基酸 *N*-端磷酸化后,灵敏度可提高 1~2 个数量级,而且谱图大为简化,样品-基质加合离子和基质簇离子很少。

### 1.2 *N*-磷酰肽的快原子轰击质谱研究

这里以  $N$ -磷酰三肽的正离子快原子轰击质

谱为例(见图4)<sup>[20]</sup>,我们发现有三类碎片离子,即三肽、二肽和氨基酸信息的 *N*-磷酸化离子(a,b和c类).对于a类离子,除了准分子离子 $[M+H]^+$ 和它的两个连续丢失丙烯的离子 $[MH-C_3H_6]^+$ , $[MH-2C_3H_6]^+$ 外,还发现准分子离子 $[M+H]^+$ 失去甲酸甲酯的离子 $[MH-HCOOCH_3]^+$ 及其两个连续丢失丙烯的离子 $[MH-HCOOCH_3-C_3H_6]^+$ , $[MH-HCOOCH_3-2C_3H_6]^+$ .



图式4 *N*-磷酸肽的正离子质谱裂解途径

**Scheme 4** Positive ion FAB/MS fragmentation pathway of *N*-phosphopeptides

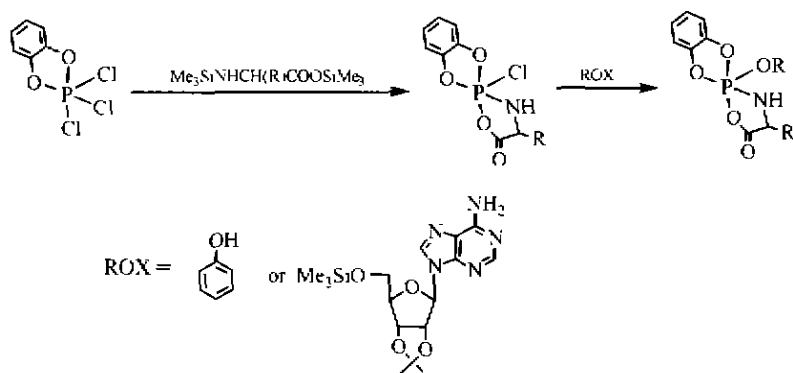
b类离子是肽的羧末端丢失一分子的氨基酸甲酯的碎片离子及其连续丢失两个丙烯的离子。c类离子是肽的羧末端丢失二肽甲酯的碎片离子及其连续丢失两个丙烯和一氧化碳的离子。因此,我们从这三种类型离子很容易推出三肽的氨基酸残基的序列。由于多肽的N-磷酸化制备方法比较简单、且经济,采用将多肽衍生化为N-磷酸肽并同快原子轰击质谱技术结合,可以方便的检测出一些小肽的氨基酸残基序列。

## 2 五配位磷化合物的质谱研究

我们研究小组研究发现,常温条件下性质非常稳定的氨基酸,一旦被 *N*-磷酸化后,能发生一些生物有机反应。机理研究表明,所有这些自组装成肽反应过程都经历了氨基酸五配位磷中间体,因此合成一些这类稳定的五配位磷化合物,并研究它们的谱学特性非常有意义。其合成途径如图 5 所示<sup>[21,22]</sup>。

### 2.1 氨基酸五配位磷化合物的质谱研究

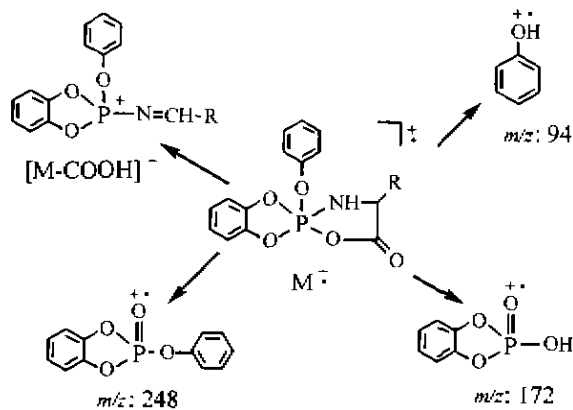
下面介绍用三种质谱方法——场解析质谱法、电子轰击质谱法和化学电离质谱法对氨基酸五配位磷化合物进行质谱研究,并采用 B/E 联动扫描技术探讨其质谱裂解规律<sup>[23]</sup>.



图式 5 氨基酸、氨基酸-核苷五配位磷化合物的合成途径

Scheme 5 Synthetic pathway of amino acid, amino acid-nucleoside pentacoordinated phosphorus compounds

2.1.1 场解析质谱(FDMS)研究 用进样器将氨基酸五配位磷化合物的二氯甲烷溶液涂在 FD 发射加热丝上,晾干后把 FD 进样杆送入离子源中,在高电场作用下,样品分子通过量子力学的“隧道效应”而电离.采用这种电离方式获得的质谱有很强的分子离子峰,常常是基峰,但是碎片信息少.在氨基酸五配位磷化合物的场解析质谱中,所有的分子离子峰均为基峰,并能看到一个丰度很高、质量数为 248 的特征碎片离子峰,分子离子峰的质量数与该质量数之差为对应的氨基酸残基质量数.同时能看到脱去一个羧基的离子  $[M - \text{COOH}]^+$ ,另外还观察到了环磷酸二酯离子  $m/z: 172$ .这类氨基酸五配位磷化合物的 FDMS 裂解规律如图 6 所示.



图式 6 氨基酸五配位磷化合物的 FDMS 裂解途径

Scheme 6 FDMS fragmentation pathway of amino acid pentacoordinated phosphorus compounds

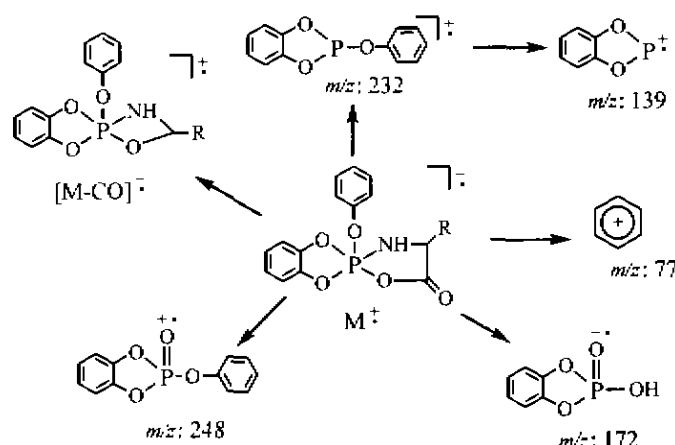
2.1.2 电子轰击质谱(EIMS)研究 将固体氨基酸五配位磷化合物样品直接装入小坩埚中,将小坩埚插入直接进样杆上,然后送入离子源中.样品气化可手动升温,也可采用程序升温.气化的样品分子在 70 eV 的电子轰击下电离.这种方法能得到大量的特

征碎片离子峰,但分子离子峰较弱.在氨基酸五配位磷化合物的电子轰击质谱中,所有分子离子峰都很弱,其丰度小于 10%,然而却出现大量的碎片离子峰.我们从质谱图可以看到分子离子失去一分子 CO 后的离子质量数.最强的峰为离子  $m/z: 248$ ,它是分子离子失去一个氨基酸残基后产生的.三配位环状亚磷酸三酯离子  $m/z: 232$  和二配位五元环磷离子  $m/z: 139$  这两个峰较强,对应的元素组成通过高分辨质谱确证.为了进一步确证这类氨基酸五配位磷化合物的 EIMS 裂解规律,我们采用了 B/E 连动扫描质谱技术.例如缬氨酸五配位磷化合物的分子离子  $m/z: 347$  产生了子离子  $m/z: 319, 248, 232, 172$  和 77.母离子  $m/z: 319$  能产生子离子  $m/z: 249$  和 232,母离子  $m/z: 232$  能产生子离子  $m/z: 139$ ,根据母离子所产生的子离子来确定碎裂规律,其 EIMS 质谱裂解途径如图 7 所示.

2.1.3 化学电离质谱(CIMS)研究 将氨基酸五配位磷化合物的二氯甲烷溶液涂在解析电子发射加热丝上,然后用进样杆把发射丝送入离子源中.将样品加热气化,当样品的气态分子与反应气离子如异丁烷发生碰撞时,质子发生迁移,样品分子捕获质子而使样品分子带上正电荷.采用这种电离方式,加热温度比电子轰击电离所需的温度要低一些.产生的准分子离子的丰度高,并有许多特征碎片峰.在氨基酸五配位磷化合物的化学电离质谱中,准分子离子  $[M + H]^+$  一般为基峰.我们发现了每个化合物对应的氨基酸质子化离子峰,很可能是由于化学电离中,反应气与样品分子碰撞时,氨基酸残基捕获三个质子后形成的,这种现象在质谱中比较少见.为了进一步确证离子之间的相互关系,我们还是采用了 B/E 连动扫描技术.例如缬氨酸五配位磷化合物母离子  $m/z: 348$  能产生子离子  $m/z: 249, 173, 118$  和 95.子

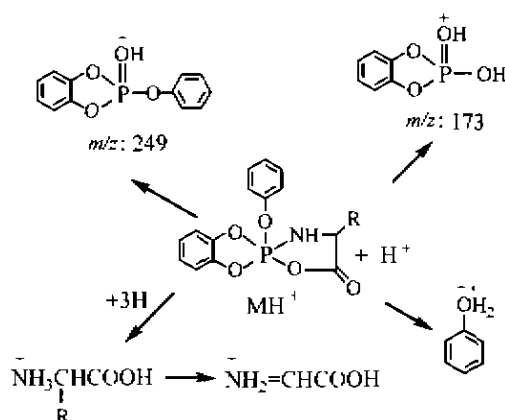
离子  $m/z:118$  的出现表明,氨基酸的质子化离子一定来自于准分子离子的碎裂. 所有这类化合物的

CIMS 裂解途径如图 8 所示.



图式 7 氨基酸五配位磷化合物的 EIMS 的可能裂解途径

Scheme 7 EIMS fragmentation pathway of amino acid pentacoordinated phosphorus compounds



图式 8 氨基酸五配位磷化合物的 CIMS 质谱裂解途径

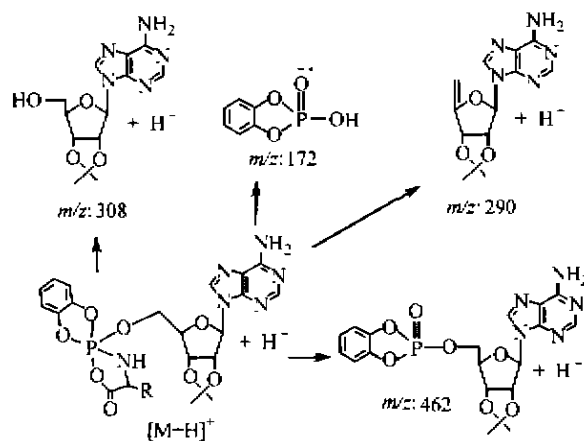
Scheme 8 CIMS fragmentation pathway of amino acid pentacoordinated phosphorus compounds

根据上述三种质谱法对氨基酸五配位磷化合物的质谱分析,可判断这类化合物碎裂时,P—N 键较 P—O 键容易断裂,这与氨基酸五配位磷化合物的结构特性一致. 在所有碎片离子中,脱去一个氨基酸残基最容易发生,而且有较多的含有五元环苯并二氧杂磷环离子,这与有机磷化学中分子的稳定性是一致的. 在场解析质谱和电子轰击质谱中,发现了大量的奇电子离子,然而在化学电离质谱中,却发现了大量的偶电子离子. 由于化学电离中,反应气—样品分子之间的气相反应,我们能观察到五配位磷化合物中氨基酸片段能捕获三个质子而形成氨基酸质子化离子. 这三种方法各有优点,它们能相互补充. FDMS 能给出很强的分子离子峰,而 EIMS 能提供大量的碎片离子, CIMS 兼而有之. 我们认为,对氨基酸五配

位磷化合物的质谱分析, CIMS 是最佳方法.

## 2.2 氨基酸—核苷五配位磷化合物的质谱研究

以氨基酰腺苷酸五配位磷化合物为例,介绍氨基酸—核苷五配位磷化合物的 FDMS 和 FABMS 质谱裂解规律<sup>[22]</sup>.



图式 9 氨基酰腺苷酸五配位磷化合物 FDMS 裂解途径

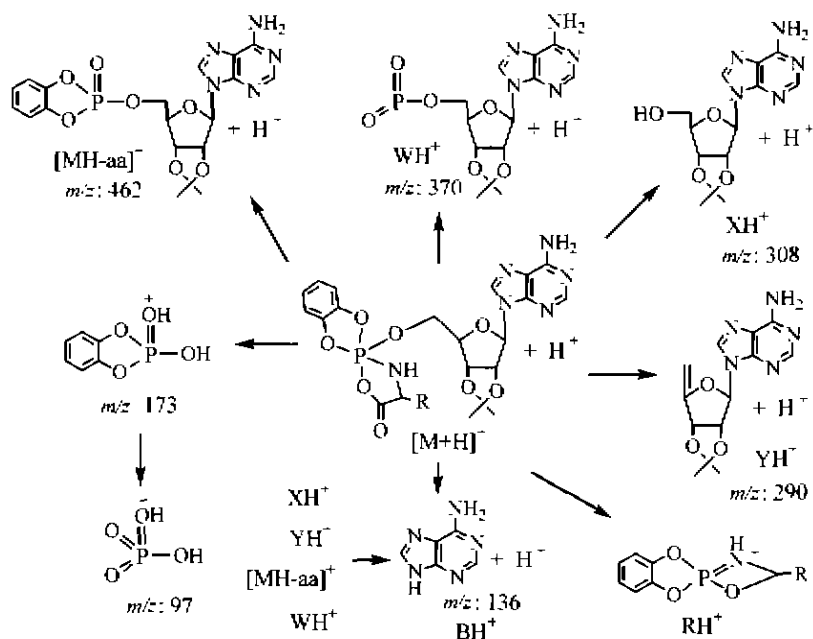
Scheme 9 FDMS fragmentation pathway of aminoacyl adenylate pentacoordinated phosphorus compounds

2.2.1 氨基酰腺苷酸五配位磷化合物的场解析质谱研究 在氨基酰腺苷酸五配位磷化合物的 FDMS 中,除了准分子离子  $[M+H]^+$  外,还有四种碎片离子  $m/z: 462, 308, 290$  和  $172$  (图 9), 这些离子均不含氨基酸信息. 这是由于在氨基酸五配位磷化合物中,混酐键 (P—O—OC) 和 P—N 键都比较容易断裂而形成四配位磷化合物. 质量数为 308 的离子  $XH^+$  的丰度较低,而质量数为 290 的离子  $YH^+$  都是基峰,表

明这种五配位磷中 P—O(5)—C(5) 的键的断裂更容易在 O(5)—C(5) 键上, 这与有机磷化合物的结构特性一致。

2.2.2 氨基酰腺苷酸五配位磷化合物的快原子轰击质谱研究 同场解析质谱相比, 快原子轰击质谱中有四种相同的离子  $[M+H]^+$ ,  $[MH-aa]^+$  ( $aa$  表

示氨基酸残基),  $XH^+$  和  $YH^+$ , 但也发现离子  $WH^+$   $m/z$ : 370 和  $BH^+$   $m/z$ : 136. 当准分子离子  $[M+H]^+$  失去 CO 和核苷分子后就形成离子  $RH^+$ , 氨基酰腺苷酸五配位磷化合物的快原子轰击质谱裂解途径如图 10 所示。



图式 10 氨基酰腺苷酸五配位磷化合物的 FAB/MS 裂解途径

Scheme 10 FAB/MS fragmentation pathway of aminoacyl adenylate pentacoordinated phosphorus compounds

### 3 核苷 N-磷酰氨基酸甲酯缀合物的电喷雾电离质谱 (ESIMS) 研究

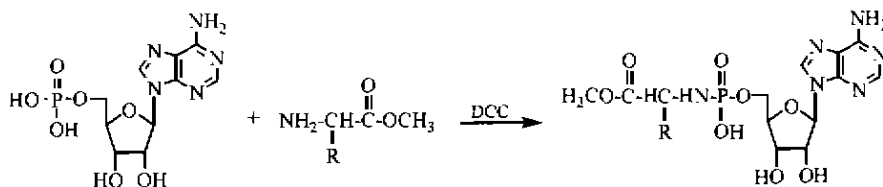
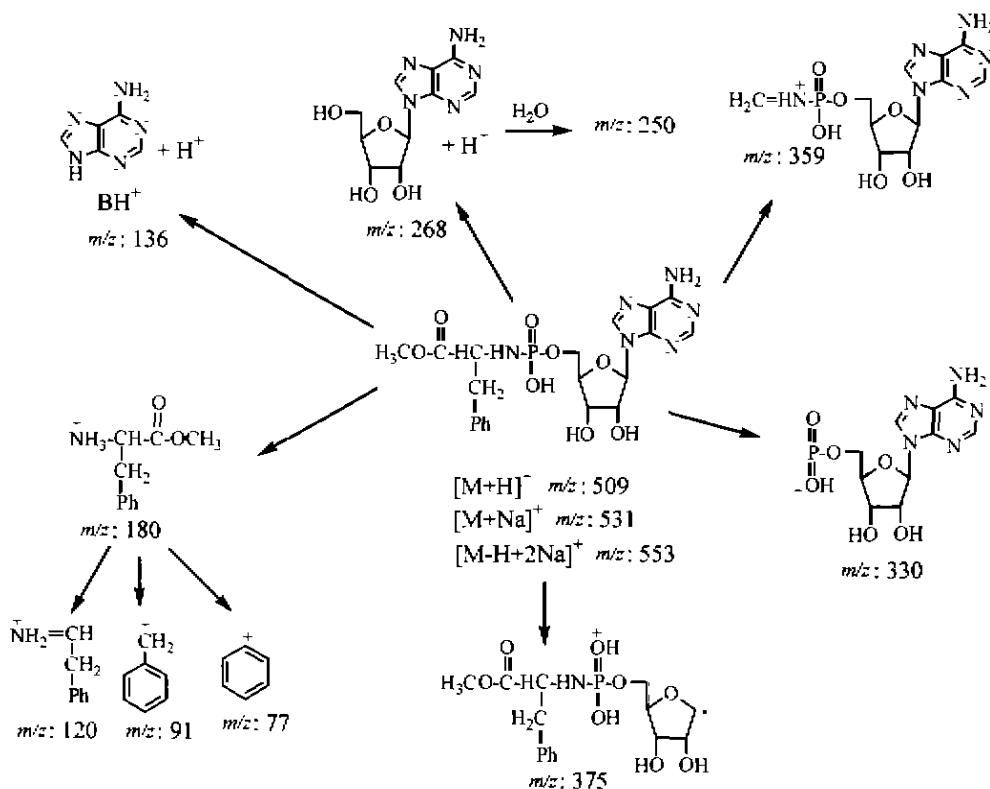
近些年来生物化学家和药物化学家们研究发现, 核苷 N-磷酰氨基酸酯可以作为抗病毒、抗肿瘤和抗 HIV 病毒的有效药物前体 (prodrugs). 利用核苷-磷酰氨基酸酯来作为前体药物, 一方面避免了核苷磷酸化对激酶的依赖性; 另一方面由于氨基酸酯的引入, 会产生如下作用<sup>[24-27]</sup>: (1) 可以作为药物的有效载体, 增加药物分子的脂溶性, 促进细胞体对药物的吸收; (2) 药物分子通过水解又释放出氨基酸, 从而在某种程度上缓解了药物对细胞的毒性; (3) 提高了药物的活性, 某些氨基酸本身就具有生物活性, 并且可以辅助药物的活性母体, 提高其生物活性. 因此, 合成并研究核苷 N-磷酰氨基酸酯结构特性具有重要意义。

电喷雾电离质谱法是一种软电离技术, 溶解在溶剂的样品通过毛细管喷入离子源而成为带多个电

荷的小液滴. 随着溶剂的不断挥发, 液滴不断减小, 库仑排斥力加剧而使液滴爆裂, 液体中的样品离子变成气态, 这种方法能使样品带多个电荷. 下面以腺苷 N-磷酰苯丙氨酸甲酯为例 (其合成途径如图 11 所示)<sup>[28]</sup>, 利用电喷雾电离质谱法及串联质谱技术, 研究它的电喷雾电离质谱裂解规律<sup>[29]</sup>.

#### 3.1 腺苷 N-磷酰苯丙氨酸甲酯缀合物的正离子电喷雾电离质谱研究

在腺苷 N-磷酰苯丙氨酸甲酯缀合物的正离子电喷雾电离质谱中, 准分子离子  $[M+H]^+$  为基峰, 同时有两个  $Na^+$  的加合离子  $[M+Na]^+$   $m/z$ : 531,  $[M-H+2Na]^+$   $m/z$ : 553. 能观察到两对互补离子, 即质子化的腺嘌呤离子  $BH^+$   $m/z$ : 136 和准分子离子丢失腺嘌呤分子的离子  $[MH-B]^+$ , 质子化的苯丙氨酸甲酯离子  $m/z$ : 180 和准分子离子丢失苯丙氨酸甲酯分子的离子  $m/z$ : 330. 还观察到了苯丙氨酸的亚铵离子、苄基离子和苯基离子. 另外, 也发现了质子化腺苷离子、 $[MH-PhCOOCH_3]^+$  离子和许多复合  $Na^+$  的碎片离子。

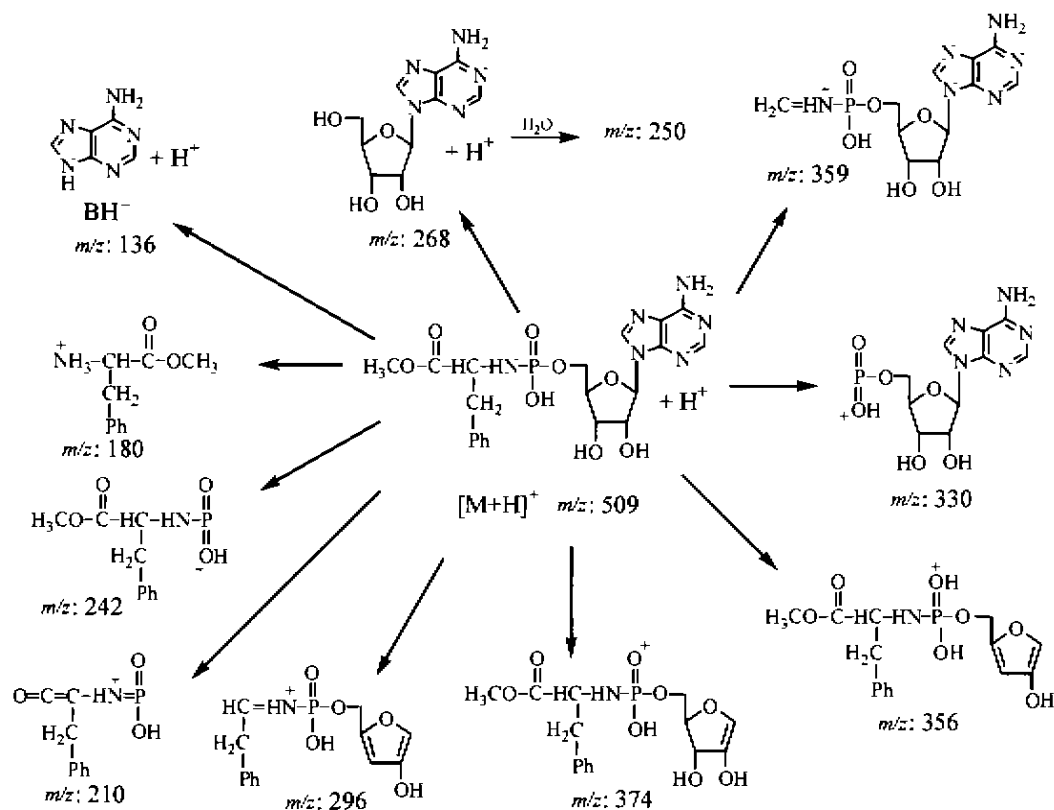
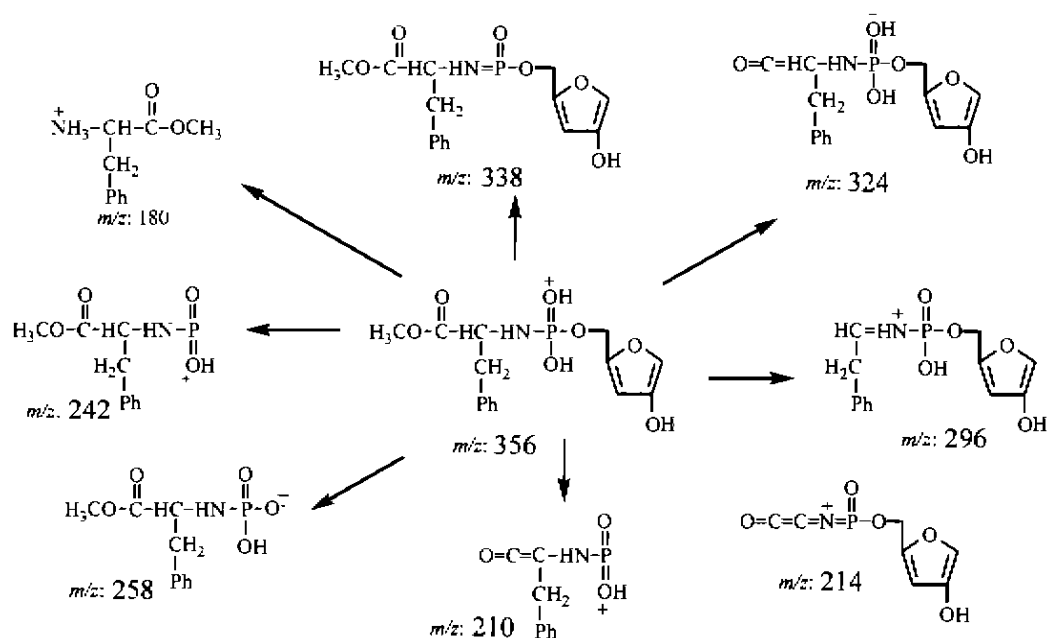
图式 11 腺苷 *N*-磷酰苯丙氨酸甲酯的合成途径Scheme 11 Synthetic pathway of adenosine *N*-phosphophenylalanine methyl ester图式 12 腺苷 *N*-磷酰苯丙氨酸甲酯的质谱碎裂途径Scheme 12 Positive ion ESIMS fragmentation pathway of adenosine *N*-phosphophenylalanine methyl ester

我们研究了准分子离子  $[M+H]^+$   $m/z$ : 509 的二级串联质谱, 如图 13 所示, 它能产生子离子  $m/z$ : 136, 180, 268, 330 和 359, 这些离子在一级质谱中已经观察到. 我们观察到了离子  $[MH-H_2O-B]^+$   $m/z$ : 356,  $[MH-HCOOCH_3-H_2O-B]^+$   $m/z$ : 296,  $[MH-A]^+$   $m/z$ : 242 和  $[MH-CH_3OH-A]^+$   $m/z$ : 210. 如图 14 所示, 母离子  $[MH-H_2O-B]^+$   $m/z$ : 356 的三级质谱产生子离子  $m/z$ : 180, 210, 242 和 296. 这些离子在准分子离子  $[M+H]^+$   $m/z$ : 509 的二级质谱中已经观察到. 另外, 还发现特征碎片离子  $[MH-2H_2O-B]^+$   $m/z$ : 338,  $[MH-CH_3OH-H_2O-B]^+$   $m/z$ : 324 和  $[MH-CH_3OH-PhCH_3-2H_2O-B]^+$   $m/z$ : 214, 这些结果表明, 电喷雾电离质谱及串联质谱技术对这类化合物的结构检测是非常有用的工具.

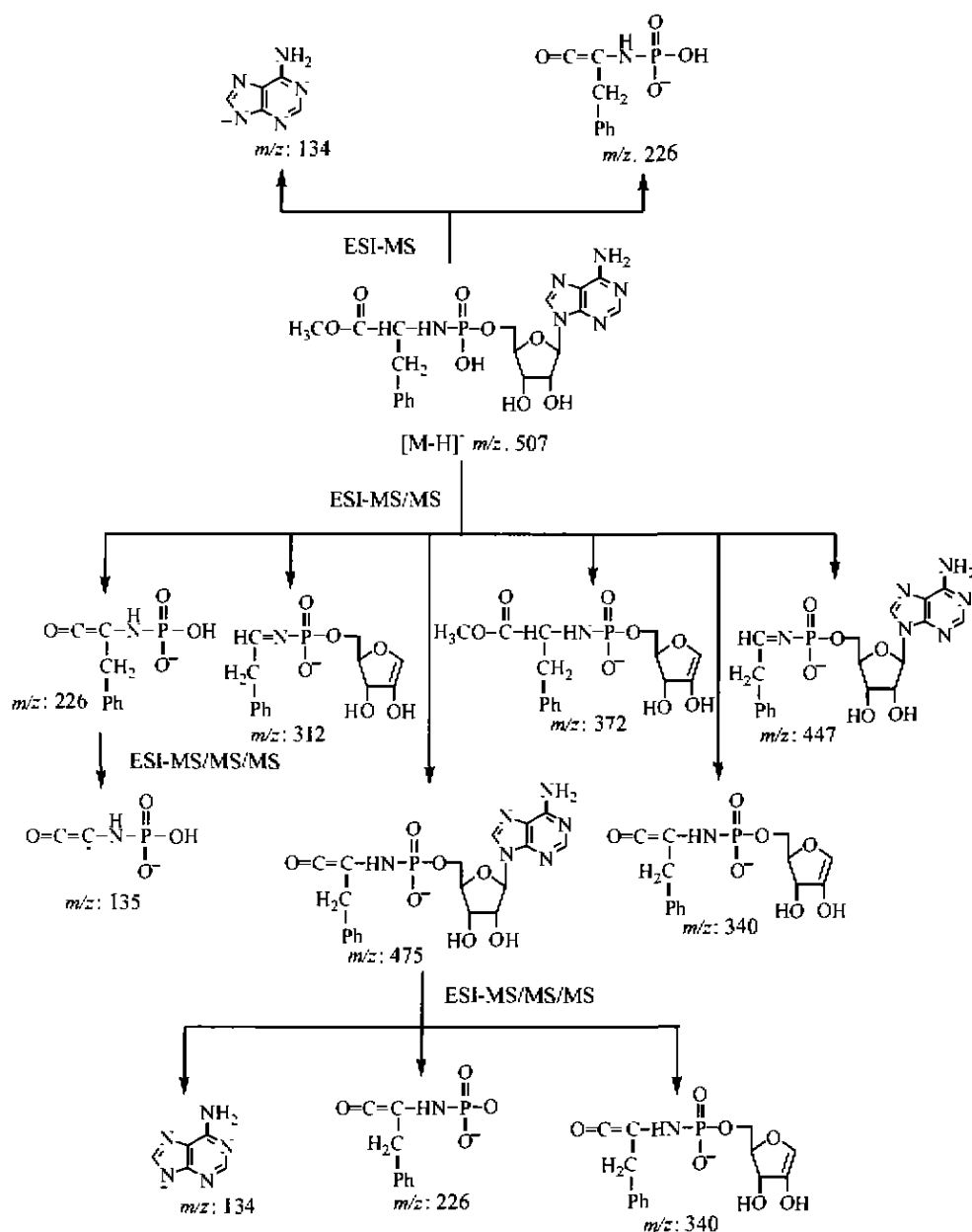
3.2 腺苷 *N*-磷酰苯丙氨酸甲酯缀合物的负离子电喷雾电离质谱研究

同腺苷 *N*-磷酰苯丙氨酸甲酯缀合物的正离子电喷雾电离质谱相比, 负离子电喷雾电离质谱碎片较少, 除了准分子离子  $[M-H]^-$  外, 只有如图 15 所示两个碎片离子 134 和 227.

同腺苷 *N*-磷酰苯丙氨酸甲酯缀合物的正离子电喷雾电离质谱相比, 负离子电喷雾电离质谱碎片较少, 除了准分子离子  $[M-H]^-$  外, 只有如图 15 所示两个碎片离子 134 和 227.

图式 13 准分子离子  $[M+H]^+$   $m/z$ :509 的二级串联质谱碎裂途径Scheme 13 ESI-MS/MS fragmentation pathway of the ion at  $m/z$ : 509图式 14 离子  $[M+H]^+$   $m/z$ :356 的三级串联质谱碎裂途径Scheme 14 ESI-MS/MS/MS fragmentation pathway of the ion at  $m/z$ : 356



图式 15 腺苷 *N*-磷酰苯丙氨酸甲酯的负离子电喷雾电离多级质谱裂解途径Scheme 15 Negative ion ESI-MS fragmentation pathway of adenosine *N*-phosphophenylalanine methyl ester

准分子离子  $[M-H]^-$   $m/z$ : 507 能产生子离子  $[M-H-CH_3OH]^-$   $m/z$ : 475,  $[M-H-HCOOCH_3]^-$   $m/z$ : 447,  $[M-H-B]^-$   $m/z$ : 372,  $[M-H-CH_3OH-B]^-$   $m/z$ : 340,  $[M-H-HCOOCH_3-B]^-$   $m/z$ : 312 和  $[M-H-CH_2-A]^-$   $m/z$ : 226. 所有这些离子都含有磷酰基. 离子  $[M-H-CH_3OH]^-$   $m/z$ : 475 产生子离子  $m/z$ : 340, 226 和 134, 这些离子在  $[M-H]^-$   $m/z$ : 507 的二级串联质谱中都已经观察到. 母离子  $m/z$ : 226 的三级串联质谱产生质量数为 135 的子离子.

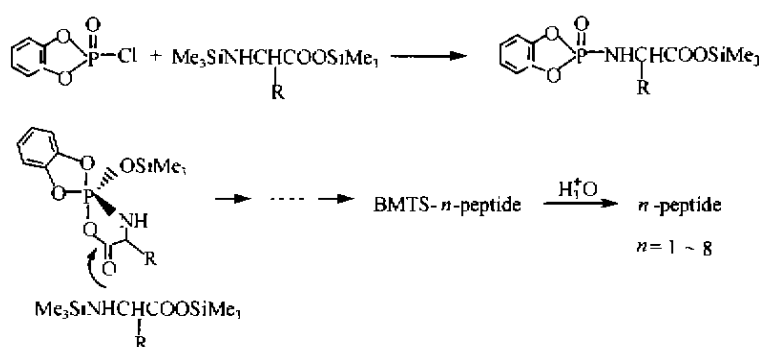
由此可见,在核苷 *N*-磷酰氨基酸甲酯缀合物

的电喷雾电离质谱中,能够发现丢失水、碱基、核苷、氨基酸甲酯、甲醇和氨基酸侧链. 在正离子质谱中,有大量的特征碎片离子,而且能观察到一些互补离子;在负离子质谱中,碎片离子较少,大部分离子都含有磷酰基.

#### 4 利用正离子 FAB/MS 研究有机磷试剂辅助氨基酸自组装成肽产物及其机理

由生物小分子组装成生物大分子是生命起源漫长历程中的一个重要环节,活性有机小分子自组装成生物小分子、再到生物大分子可能是生命起源中的一个化学进化.我们研究小组为了阐述磷对 $\alpha$ -氨基酸的选择性,建立了一个化学模型,即将 $N,O$ -二(三甲基硅基)- $\alpha$ -氨基酸与 $O,O'$ -亚苯基磷酰氯反应,发现首先形成如图16所示的含有

五元环五配位磷酰-氨基酸中间体,然后进一步组装成一系列的寡聚多肽.然而 $\beta$ -氨基酸的三甲基硅基衍生物在 $O,O'$ -亚苯基磷酰氯辅助下却不能自组装成肽,这就从机理上揭示了在多肽的前生物合成中,是磷选择了 $\alpha$ -氨基酸<sup>[30]</sup>.而FABMS在探讨有机磷试剂辅助氨基酸自组装成肽产物及其机理过程起着十分重要作用<sup>[30]</sup>.



图式 16  $N,O$ -二(三甲基硅基)- $\alpha$ -氨基酸在 $O,O'$ -亚苯基磷酰氯辅助下组装成肽机理

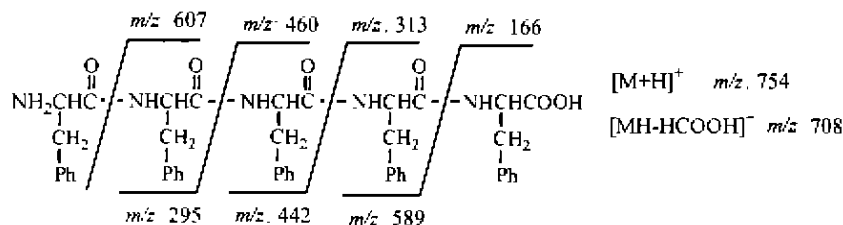
Scheme 16 The possible self-assembly mechanism of  $N,O$ -bis(trimethylsilyl)- $\alpha$ -amino acids into peptides mediated by  $O$ -phenylene phosphorochloridate

#### 4.1 自组装成肽产物的正离子 FABMS 分析

以 $N,O$ -二(三甲基硅基)苯丙氨酸在 $O,O'$ -亚苯基磷酰氯辅助下组装成肽产物为例.当 $N,O$ -二(三甲基硅基)苯丙氨酸与 $O,O'$ -亚苯基磷酰氯反应 24 h 后,反应产物用酸水解,然后直接进行正离子 FABMS 检测,从质谱图中发现了一系列质量数相差 147 即一个苯丙氨酸残基的质谱峰,它们是 166, 313, 460 和 754,其丰度逐渐递减,初步推测它们可能是苯丙氨酸寡聚的二~五肽质子化离子.对这些离子分别进行高分辨质谱检测,得到其元素组成分别为  $C_9H_{12}O_2N$ ,  $C_{18}H_{21}O_3N_2$ ,  $C_{27}H_{30}O_4N_3$ ,  $C_{36}H_{39}O_5N_4$  和  $C_{45}H_{48}O_6N_5$ .采用 FABMS 亚稳离子质谱

技术对每个离子进行检测.例如母离子  $m/z$ : 313 的 B/E 连动扫描质谱图中有质量数 295, 267, 166 和 120, 它们分别对应于  $[MH - H_2O]^+$ ,  $[MH - HCOOH]^+$ , 质子化的苯丙氨酸及其亚铵离子.由此可以推测该母离子  $m/z$ : 313 为二肽  $Phe_2$  的准分子离子.从母离子  $m/z$ : 754 的亚稳离子质谱能观察如图 17 所示的子离子,从这些子离子可以推测母离子  $m/z$ : 754 是五肽  $Phe_5$  的准分子离子.其它离子均可采用同样方法确定其序列.

由此可见,通过正离子 FABMS,高分辨和亚稳离子质谱技术确定了 $N,O$ -二(三甲基硅基)苯丙氨酸在 $O,O'$ -亚苯基磷酰氯辅助下能组装成一系列寡肽.

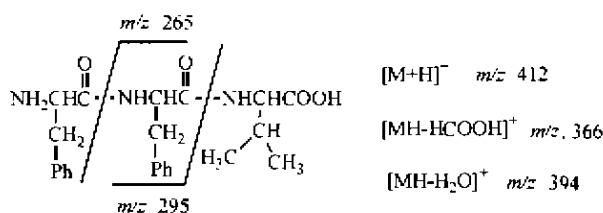


图式 17 母离子  $m/z$ : 754 的亚稳离子质谱归属

Scheme 17 Metastable ion mass spectral assignment of the ion at  $m/z$ : 754

## 4.2 自组装成肽反应的机理研究

利用正离子 FABMS 对 *N,O*-二(三甲基硅基)苯丙氨酸在 *O,O'*-亚苯基磷酰氯辅助下组装成肽反应进行跟踪,即当 *O,O'*-亚苯基磷酰氯加入 *N,O*-二(三甲基硅基)苯丙氨酸溶液后,每隔一段时间取出少量的产物进行正离子 FABMS 检测.跟踪发现,随着反应时间的延长,不仅肽链的长度增加,而且每种肽的含量也随着增加(在质谱图中反映的是肽的准分子离子的丰度增强).例如,当反应 24 h 时,最长的肽的长度仅为五肽,三肽的质谱丰度相对于苯丙氨酸质子化离子的丰度为 10%;而反应 72 h 后,最长的肽的长度达到八肽,三肽的质谱丰度为 46%,这说明有机磷辅助下 *N,O*-二(三甲基硅基)氨基酸自组装成肽是逐步延长的.为了验证 *N,O*-二(三甲基硅基)氨基酸在 *O,O'*-亚苯基磷酰氯辅助下自组装成肽反应机理,我们作了如下实验:等摩尔 *O,O'*-亚苯基磷酰氯中与 *N,O*-二(三甲基硅基)苯丙氨酸反应形成苯丙氨酸五配位磷化合物后,再加入 *N,O*-二(三甲基硅基)缬氨酸,再反应 48 h,通过正离子 FAB-MS 检测,发现了一系列质量数为  $(166 + 147n + 99)$  ( $n = 0 \sim 4$ ) 质谱峰,即 265、412、559、706 和 853.采用亚稳离子质谱技术确定这些峰对应的肽序列为 PheVal, PhePheVal, PhePhePheVal, PhePhePhePheVal 和 PhePhePhePhePheVal.例如母离子  $m/z$ : 412 的亚稳离子质谱产生子离子  $m/z$ : 394, 366, 295 和 265, 它们的质谱归属如图 18 所示.



图式 18 母离子  $m/z$ : 412 的亚稳离子质谱归属

Scheme 18 Metastable ion mass spectral assignment of the ion at  $m/z$ : 412

从上述结果可以提出如图 16 所示的自组装成肽机理.*O,O'*-亚苯基磷酰氯中与 *N,O*-二(三甲基硅基)苯丙氨酸反应形成苯丙氨酸五配位磷化合物后,再加入 *N,O*-二(三甲基硅基)缬氨酸,*N,O*-二(三甲基硅基)缬氨酸的亚氨基再亲核进攻苯丙氨酸五配位磷化合物混酐键  $PO-CO$  的羰基而形成酰胺键,在形成二肽 PheVal 的三甲基硅基衍生物同时,离去一分子的磷酸酯.这个二肽一定是 N

末端为 Phe,而 C 末端为 Val.下一次这个二肽衍生物中苯丙氨酸残基的亚氨基亲核进攻苯丙氨酸五配位磷化合物的混酐键  $PO-CO$  的羰基,形成三肽衍生物,这样重复进行即可得到系列多肽  $Phe_nVal$ .这一实例也有力证明了图 16 所示自组装成肽机理的正确性.

随着生命有机磷化学研究领域的不断深入和质谱技术的进一步发展,两者之间的关系将会更加密切.质谱在未来对该领域的研究可能会更多地集中在生物大分子如蛋白质、核酸、糖及它们的缀合物、生物复杂体系的分析和生物有机反应的跟踪等方面.鉴于质谱法特有的优势,我们相信,质谱将会更加深入地应用到生物化学、有机化学等领域中,同时由于这些领域的需要,一些新的质谱技术将会不断地涌现出来.

## References

- 1 Westheimer, F. H. *Science*, **1997**, 235, 1173.
- 2 Zhao, Y. - F.; Cao, P. - S. *J. Biol. Phys.*, **1994**, 20, 283.
- 3 Zhao, Y. - F.; Cao, P. - S. *Chemical Evolution: Physics of the Origin and Evolution of Life*, Kluwer Academic Publisher, **1996**, 279.
- 4 Li, Y. - M.; Yin, Y. - W.; Li, Y. - C.; Tan, B.; Chen, Y.; Zhao, Y. - F. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **1993**, 76, 363.
- 5 Ju, Y.; Zhao, Y. - F.; Sha, Y. - W.; Tan, B.; Zhao, Y. - F. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **1995**, 101, 117.
- 6 Tsubako, M.; Fujita, N. A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1980**, 53, 1968.
- 7 Tsubako, M.; Ohashi, S.; Nara, N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, 56, 1372.
- 8 Tsubako, M.; Nakajima, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1985**, 58, 3092.
- 9 Chung, N. M.; Lohmann, R.; Oregel, L. E. *Tetrahedron*, **1971**, 27, 1205.
- 10 Zhang, B. - Z.; Zhang, G. - T.; Zhao, Y. - F., *Acta of Chinese University of Science and Technology*, **1994**, 24, 496 (in Chinese).
- 11 Li, Y. - M.; Zhang, D. - Q.; Zhang, H. - W.; Ji, G. - J.; Zhao, Y. - F. *Bioorg. Chem.*, **1992**, 20, 285.
- 12 Li, Y. - M.; Yin, Y. - W.; Zhao, Y. - F. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1992**, 39, 375.
- 13 Ma, X. - B.; Zhao, Y. - F. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **1992**, 66, 107.
- 14 Li, Y. - M.; Ma, X. - B.; Zhao, Y. - F., *Chin. J. Biochem.*, **1992**, 8, 434 (in Chinese).
- 15 Tan, B.; Zhao, Y. - F., *Chin. J. Org. Chem.*, **1995**, 15, 30 (in Chinese).
- 16 Li, Y. - C.; Tan, B.; Zhao, Y. - F. *Heteroat. Chem.*, **1993**, 4, 415.
- 17 Yan, Q. - J.; Yin, Y. - W.; Wang, Q.; Zhao, Y. - F. *Chin.*

- Chem. Lett.* **1995**, 267.
- 18 Chai, W. - G.; Yan, L.; Wang, G. - H.; Liang, X. - Y.; Zhao, Y. - F.; Ji, G. - J. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1987**, 14, 331.
  - 19 Yin, Y. - W.; Ma, - Y.; Zhao, Y. - F.; Xin, B.; Wang, G. - H. *Org. Mass Spectrom.*, **1994**, 29, 201.
  - 20 Ma, X. - B.; Zhao, Y. - F. *Biol. Mass Spectrom.*, **1991**, 20, 498.
  - 21 Fu, H.; Tu, G. - Z.; Li, Z. - L.; Zhao, Y. - F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 2021.
  - 22 Fu, H.; Zhao, Y. - F.; Xiao, H. - Z.; Wang, J. - Z. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999**, 13, 1477.
  - 23 Fu, H.; Li, Z. - L.; Zhao, Y. - F.; Guo, D. - B.; Xiao, H. - Z.; Wang, J. - Z.; Wu, Y. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1997**, 11, 1825.
  - 24 Wagner, C. R.; McIntee, E. J.; Schinazi, R. F.; Abraham, T. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5, 1819.
  - 25 Abraham, T. W.; Wagner, C. R. *Nucleosides Nucleotides*, **1994**, 13, 1891.
  - 26 McGuigan, C.; Cahard, D.; Sheeka, H. M.; DeClercq, E.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 1748.
  - 27 Balzarini, J.; Egberink, H.; Hartman, K.; Cahard, D.; Vahlenkamp, T.; Thormar, H.; DeClercq, E.; McGuigan, C. *Mol. Pharmacol.*, **1996**, 50, 1207.
  - 28 Abraham, T. W.; Kalman, T. I.; McIntee, E. J.; Wagner, C. R. *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 4569.
  - 29 Fu, H.; Xu, L.; Lv, Q.; Wang, J. - Z.; Xiao, H. - Z.; Zhao, Y. - F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, in press.
  - 30 Fu, H.; Li, Z. - L.; Zhao, Y. - F.; Tu, G. - Z. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 291.
  - 31 Fu, H.; Li, Z. - L.; Zhao, Y. - F.; Xiao, H. - Z.; Wang, J. - Z. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12, 94.

(Ed. XIE Hu - Qin)

(DONG Hua - Zhen)



**付 华** 1966年11月15日生于湖北省江陵市。1989年毕业于武汉大学分析测试科学系,获学士学位;1989~1998年在北京微量化学研究所工作,1998年获清华大学化学博士学位。1999年1月到清华大学化学系工作,任副教授;现在美国俄亥俄州立大学化学系做博士后研究,其博士论文获2000年度中国优秀博士论文、北京市优秀科技论文一等奖和北京化学会优秀论文一等奖。主要研究领域是有机磷化学、有机合成和波谱分析。已在国内外发表学术论文40余篇。



**陈 益** 1959年7月26日生于重庆。1982年毕业于西南师范大学化学系获学士学位。1982~1985年在四川外语学校教书;1985~1989年在西南师范大学化学系教分析化学;1989~至今在清华大学化学系工作,主要从事磷酸化氨基酸和小肽的研究和FAB-MS以及LC-MS的质谱分析研究工作。在国际和国内核心刊物上发表学术论文近20篇,1997年获国家教委科技进步三等奖。



**赵玉芬** 1948年12月11日生于河南淇县。1971年毕业于台湾新竹清华大学化学系,1975年毕业于美国纽约州立大学石溪分校获博士学位,并在原校及纽约大学做博士后。1989年任清华大学教授。1991年当选为中国科学院院士。主要研究有机磷化学,发现了磷酸氨基酸能同时生成核酸及蛋白,又能生成LB-膜及脂质体。提出了磷酸氨基酸是生命进化的最小系统。发现了磷酸化氨基酸的饱和溶液可以切割RNA及DNA;切割机理与生物化学中水解磷酸二酯键一致。并发明了合成抗癌药三尖杉酯碱母核的新方法。共发表论文250篇,其中SCI收录120篇。