



УДК 547.962.022:543.51

**АНАЛИЗ МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ N-ДАНСИЛПЕПТИДОВ
КОМБИНИРОВАНИЕМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ****Решетова О. С., Оноприенко В. В., Розынов В. В.,
Козьмин Ю. П.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Предложен метод определения первичной структуры олигопептидов путем их частичного кислотного гидролиза, превращения образующихся коротких пептидов в метиловые эфиры N-дансилпроизводных и анализа полученных смесей путем комбинирования обращенно-фазовой жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Приведены данные параметров удерживания и масс-спектров производных 21 аминокислоты и 74 коротких пептидов.

Для определения первичной структуры белков в настоящее время наиболее широко применяют два взаимодополняющих метода: автоматическое секвенирование по Эдману, включающее предварительное специфическое расщепление до олигопептидов, и анализ дезоксирибонуклеотидных последовательностей, кодирующих исследуемые белки. Оба метода имеют ряд недостатков, и разработка дополнительных простых и автоматизированных методов остается по-прежнему актуальной задачей белковой химии.

Масс-спектрометрия для этих целей может быть использована в нескольких вариантах. Так, масс-спектрометрия с ионизацией ускоренными атомами инертных газов (ФАВ) плодотворно используется сейчас при определении молекулярной массы олигопептидов [1–3], при контроле первичной структуры небольших белков (до 10 кДа), получаемых биотехнологическими методами [4, 5], и при контроле первичных последовательностей белков, определенных с помощью секвенирования генов [6, 7]. Анализ сложных смесей коротких пептидов, получаемых в результате ферментативного и/или неспецифического ограниченного кислотного гидролиза олигопептидов, осуществляют, комбинируя газовую хроматографию и масс-спектрометрию (ГЖХ-МС) [8–13]. Смесей больших по размеру пептидов иногда анализируют, термически разгоняя их в системе прямого ввода масс-спектрометра [14]. В последнее время для структурного анализа олигопептидов стали также применять комбинацию масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [15–21].

Успех масс-спектрометрического анализа пептидов в значительной степени определяется выбором их производных. При введении подходящих N-концевых защитных групп можно получить масс-спектры, в которых наибольшей интенсивностью обладают пики молекулярных ионов и ионов, определяющих аминокислотную последовательность. Удачными в этом отношении оказались, в частности, N-диметиламиноафталин-5-сульфонильные (дансильные) производные пептидов [22].

Дансильные производные аминокислот и пептидов широко применяются в белковой химии для идентификации N-концевых аминокислотных остатков, и методы их получения хорошо известны [23, 24]. Сильная флуоресценция и интенсивное поглощение в УФ-свете ($\lambda_{\text{макс}}$ 218, 251, 336 нм; ϵ 45 000, 15 000, 4500) делают дансильные производные очень удобными для детектирования оптическими методами. Описано разделе-

* Результаты данной работы частично были доложены на 9-й Международной масс-спектрометрической конференции в Вене в августе 1982 г.

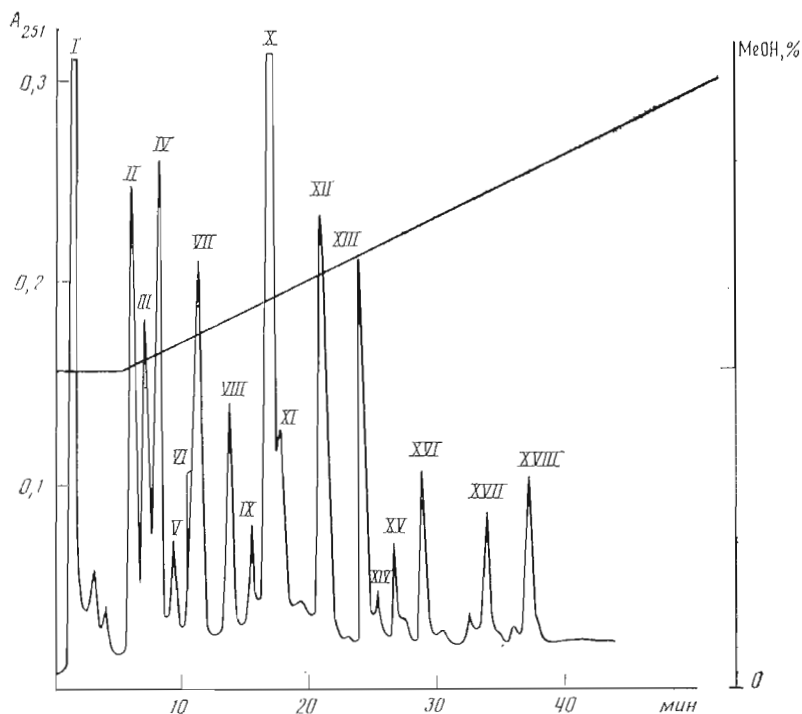


Рис. 1. ВЭЖХ модельной смеси метиловых эфиров N-дансилпептидов (ср. табл. 1): I – Dns-OH; II – Dns-NH₂ (1); III – Dns-Gly-Ser-OMe (2); IV – Dns-Ala-Ser-OMe (3); V – Dns-Gln-Glu(OMe)-OMe (7); VI – Dns-NHMe (8); VII – Dns-Gly-Asp(OMe)-OMe (9); VIII – Dns-Glu(OMe)-Glu(OMe)-OMe (15); IX – Dns-His-Ala-OMe (22); X – Dns-NMe₂ (24), Dns-Pro-Glu(OMe)-OMe (26); Dns-Gly-Met-OMe (25); XI – Dns-Ala-Val-OMe (29); XII – Dns-Gly-Leu-OMe (35), Dns-Gly-Phe-OMe (41), Dns-Leu-Tyr-OMe (26); XIII – Dns-Phe-Val-OMe (49), Dns-Leu-Val-OMe (48); XIV – (Dns-Cys-Gly-OMe)₂ (51); XV – Dns-Lys(Dns)-Ala-OMe (58); XVI – Dns-Phe-Phe-OMe (63); XVII – Dns-Orn(Dns)-Leu-OMe (73); XVIII – Dns-Leu-Tyr(Dns)-OMe (76)

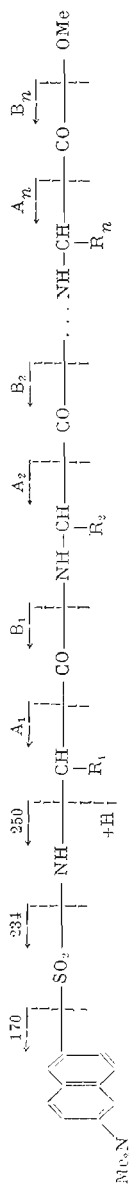
ние N-дансиламино кислот обращенно-фазовой ВЭЖХ в изократическом [25] и в градиентном режимах [26–28], однако до сих пор ВЭЖХ не использовалась для разделения смесей N-дансилпептидов. Настоящая работа посвящена анализу смесей дансильированных коротких пептидов.

Перед хроматографическим разделением карбоксильные группы дансилпептидов и обычно сопутствующих им в гидролизатах дансиламино кислот мы метилировали, для того чтобы избежать применения буферных растворов и тем самым упростить микропрепаративное выделение чистых веществ. Вследствие большого диапазона полярностей исследуемых соединений наиболее удобным оказалось градиентное элюирование смесями метанол – вода с повышением концентрации метанола от 50 до 100%. Хроматограмма модельной смеси дансильных производных 19 дипептидов и обычно сопутствующих им в реакционной смеси трех аминов Dns-NH₂ (1), Dns-NHMe (8), Dns-NMe₂ (24) представлена на рис. 1. В табл. 1 приведены времена удерживания и масс-спектры компонентов этой смеси и ряда других дансилпептидов. В табл. 2 представлены аналогичные данные для соответствующих производных аминокислот.

Как видно из рис. 1, некоторые соединения хроматографически не разделяются: например, пики X, XII, XIII содержат по два-три компонента. Вероятно, улучшения разделения можно было бы добиться, заменив метанол на другие растворители (ацетонитрил, тетрагидрофуран и т. д.) или применив тройные смеси [29]. Однако такой необходимости не было, поскольку анализ неразделенных фракций успешно проводился масс-спектрометрически.

В масс-спектрах метиловых эфиров N-дансилпептидов (см. табл. 1) наряду с пиками молекулярных ионов присутствуют пики «аминных» (A_n^+)

Времена удерживания и основные ионы в масс-спектрах метиловых эфиров N-дансиллипептидов



Номер	Соединение	Время удерживания, мин *	<i>m/z</i> (относительная интенсивность, %) **						M ⁺
			A ₁ ⁺	B ₁ ⁺	A ₂ ⁺	B ₂ ⁺	A ₃ ⁺	B ₃ ⁺ B ₄ ⁺	
1	Dns-NH ₂	6,0							250 (100)
2	Dns-Gly-Ser-OMe	7,3	263 (3)		350 (3)				409 (39)
3	Dns-Ala-Ser-OMe	8,0	277 (11)		364 (2)				423 (32)
4	Dns-Tyr-Gly-OMe	8,1	369 (4,5)		426 (2)				485 (35)
5	Dns-Gly-Gly-OMe	8,3	263 (8,5)				453 (4) **		379 (36)
6	Dns-Gly-Gly-Pro-OMe	9,0	263 (7)		319 (4)		348 (4)		476 (24)
7	Dns-Gln-Glu(OMe)-OMe	9,4	334 (2)		477 (1,5)		504 (2) **		536 (8,5)
8	Dns-NHMe	10,7							264 (70)
9	Dns-Gly-Asp(OMe)-OMe	11,2	263 (3)		392 (3,5)		419 (10) **		451 (70)
10	Dns-Gly-Ala-OMe	11,2	263 (6)		334 (5)		361 (5) **		393 (100)
11	Dns-Gly-Pro-OMe	12,1	263 (8)		360 (6)		387 (28) **		419 (97)
12	Dns-Gly-Glu(OMe)-OMe	12,5	263 (8)		406 (3)		433 (24) **		465 (66)
13	Dns-Pro-Gly-OMe	12,7	303 (6,4)		360 (3,5)		388 (4)		419 (52)
14	Dns-Val-Ala-OMe	13,0	305 (29)		376 (2)		404 (2)		435 (31)
15	Dns-Glu(OMe)-Glu(OMe)-OMe	13,5	349 (6)		492 (4)		519 (28) **		551 (44)
16	Dns-Val-Asp(OMe)-OMe	13,8	305 (28)		434 (3)		462 (3)		493 (64)
17	Dns-Val-Ala-Ala-OMe	14,2	305 (32)		376 (2)		404 (3)		506 (26)
18	Dns-Glu(OMe)-Pro-OMe	14,6	349 (5,5)		446 (4)		473 (12) **		505 (52)
19	Dns-Glu(OMe)-Pro-Asp(OMe)-OMe	14,6	349 (5,5)		446 (2,5)		473 (6) **		634 (42)
20	Dns-Val-Glu(OMe)-OMe	14,9	303 (35)		448 (2)		475 (7) **		507 (45)
21	Dns-Pro-Asp(OMe)-OMe	15,5	303 (78)		432 (3,5)		460 (4)		491 (46)
22	Dns-His-Ala-OMe	15,5	343 (37)		414 (3)		442 (1,5)		473 (18)

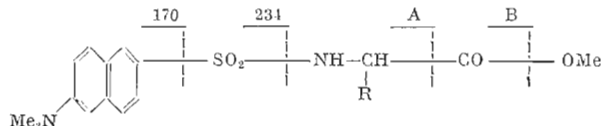
Номер	Соединение	Время удержива- ния, мин *	m/z (относительная интенсивность, %) **							M ⁺
			A ⁺ ₁	B ⁺ ₁	A ⁺ ₂	B ⁺ ₂	A ⁺ ₃	B ⁺ ₃ B ⁺ ₄		
23	Dns-Val-Tyr-OMe	16,0	305 (42)		468 (4)	495 (1) **			527 (90)	
24	Dns-NMe ₂	16,5	263 (3,5)		394 (3)	421 (6) **			278 (70)	
25	Dns-Gly-Met-OMe	16,5	303 (66)		446 (2,5)	474 (5)			453 (55)	
26	Dns-Pro-Glu (OMe)-OMe	16,5	305 (27)		448 (2)	476 (2)		546 (24) **	505 (30)	
27	Dns-Val-Glu (OMe)-Ala-OMe	16,5	263 (2,5)	291 (0,5)	376 (4,5)	404 (1)		461 (2)	578 (16)	
28	Dns-Gly-Ile-Gly-OMe	16,5	277 (23)		376 (4,5)	404 (1,5)			492 (21)	
29	Dns-Ala-Val-OMe	17,6	263 (7)		362 (3,5)	389 (3) **			435 (67)	
30	Dns-Gly-NVa-OMe	30	305 (43)		404 (6)	432 (3)		503 (1)	421 (100)	
31	Dns-Val-Val-Ala-OMe	19,5	307 (8)		406 (1,3)	434 (17)		505 (1)	534 (40)	
32	Dns-Thr-Val-Val-Ala-OMe	19,5	293 (2)	321 (1)	406 (3)	434 (1)		604 (2)	635 (30)	
33	Dns-Ser-Ile-OMe	19,5	263 (8)		449 (3,5)	476 (3) **			465 (55)	
34	Dns-Gly-Trp-OMe	19,8	263 (6)		376 (4)	403 (2,5) **			508 (30)	
35	Dns-Gly-Leu-OMe	20,8	319 (20)		482 (3)	509 (1,5) **			435 (100)	
36	Dns-Leu-Tyr-OMe	20,8	277 (15)	305 (1,5)	390 (4)	432 (1,5)			541 (60)	
37	Dns-Ala-Leu-OMe	21,2	305 (33)		404 (3)	434 (3)		533 (1)	463 (53)	
38	Dns-Val-Val-OMe	21,4	307 (8)	334 (0,5)	406 (7)	434 (3)			449 (52)	
39	Dns-Thr-Val-Val-OMe	21,4	353 (13)		516 (2)	437 (7,5) **			564 (27)	
40	Dns-Phe-Tyr-OMe	21,4	263 (9)		410 (4)	509 (30) **			575 (27)	
41	Dns-Gly-Phe-OMe	21,8	335 (5,5)	363 (1)	482 (2)	444 (7)			469 (100)	
42	Dns-Asp (OMe)-Phe-OMe	21,9	319 (65)		416 (6,5)	444 (7)		515 (2)	541 (45)	
43	Dns-Leu-Pro-Ala-OMe	22,2	319 (43)		416 (1,5)	444 (1,5)			546 (56)	
44	Dns-Leu-Pro-OMe	23,5	319 (43)		416 (1,5)	444 (1,5)			475 (35)	
45	Dns-Tyr-Gly-Leu-OMe	23,6	369 (5,5)		418 (8)	454 (4)		566 (2) **	598 (15)	
46	Dns-Leu-Val-Glu (OMe)-OMe	23,8	319 (48)		452 (8)	446 (5)		588 (8) **	620 (50)	
47	Dns-Phe-Val-Asp (OMe)-OMe	24,2	353 (20)		480 (4)	480 (4)		609 (6)	640 (44)	
48	Dns-Leu-Val-OMe	24,7	319 (28)		418 (2,5)	446 (1)			477 (35)	
49	Dns-Phe-Val-OMe	24,7	353 (23)		452 (3)	480 (2)			511 (64)	
50	Dns-Phe-Gly-Pro-OMe	25,0	353 (14)		410 (1)	438 (4)		534 (7) **	566 (28)	
51	(Dns-Cys-Gly-OMe) ₂	25,3	309 (2) **							
52	Dns-Leu-Val-Tyr-OMe	25,5	319 (33)		418 (8)	446 (5)			640 (20)	

Номер	Соединение	Время улавливания, мин *	<i>m/z</i> (относительная интенсивность, %) **							M ⁺
			A ₁ ⁺	B ₁ ⁺	A ₂ ⁺	B ₂ ⁺	A ₃ ⁺	B ₃ ⁺ B ₄ ⁺		
53	Dns-Leu-Tyr-OMe	25,7	319 (12,5)		505 (3)	533 (2)				564 (36)
54	Dns-Ser-Ile-Leu-OMe	26,1	283 (7)		406 (10)	434 (3)			547 (4)	578 (32)
55	Dns-Ala-Val-Leu-OMe	26,2	277 (38)	305 (3,5)	376 (14)	404 (7)		489 (1,5) **	517 (3,5)	548 (79)
56	Dns-Val-Ala-Ala-Phe-OMe	26,3	305 (43)		376 (13)	404 (27)		448 (1,5) **	475 (7)	
57	Dns-Tyr-Leu-OMe	26,7	392 (5)		505 (3)	533 (2)			622 (1)	653 (72)
58	Dns-Lys(Dns)-Ala-OMe	26,7	567 (2)		638 (4,5)	666 (1)				564 (35)
59	Dns-Pro-Phe-OMe	27,5	303 (40)		450 (2,5)	478 (1)				697 (22,5)
60	Dns-His-Leu-OMe	28,0	343 (68)		456 (6)	478 (1)				509 (31)
61	Dns-Pro-Phe-Asp(OMe)-OMe	28,0	303 (64)		450 (4)	478 (3)			607 (4)	515 (32)
62	Dns-Leu-Leu-OMe	28,1	319 (33)	347 (2,5)	432 (3)	460 (1)				638 (38)
63	Dns-Phe-Phe-OMe	28,7	353 (18)		500 (2)	528 (1,5)				491 (42)
64	Dns-Orn(Dns)-Pro-Gly-OMe	28,7	553 (2)	581 (1,5)	650 (2)	677 (4,5) **			734 (1,5) **	559 (52)
65	Dns-Orn(Dns)-Pro-OMe	29,2	553 (2)	581 (1)	650 (3)	677 (4,5) **				766 (16,5)
66	Dns-Ala-Leu-Ile-OMe	29,3	277 (48)		390 (12)	418 (8)				709 (73)
67	Dns-Leu-Leu-Val-Tyr-OMe	29,9	319 (32)		432 (18)	460 (23)				562 (32)
68	Dns-Orn(Dns)-Val-OMe	30,4	553 (1,5)		652 (1)	680 (0,5)				753 (30)
69	Dns-Leu-Orn(Dns)-OMe	31,7	319 (14)		693 (20) **	725 (1)				741 (14)
70	Dns-Leu-Lys(Dns)-OMe	32,3	319 (22)		707 (1,5) **	739 (4,2)				725 (51)
71	Dns-Leu-Leu-Val-OMe	32,5	319 (45)		432 (6)	460 (3,5)				789 (42)
72	Dns-Leu-Orn(Dns)-Pro-OMe	32,7	319 (7,5)		693 (5) **	694 (2)			559 (1,5)	590 (26)
73	Dns-Orn(Dns)-Leu-OMe	33,8	553 (1,5)		666 (3,5)	694 (2)				822 (15)
74	Dns-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-OMe	35,8	319 (27)		416 (7)	444 (22)		488 (3,5) **		725 (87)
75	Dns-Lys(Dns)-Val-Leu-OMe	36,6	567 (2)		666 (2)	694 (1)				772 (40)
76	Dns-Leu-Tyr(Dns)-OMe	39,6	319 (9)	347 (3)	743 (1,5)	743 (2,5)				838 (25)
77	Dns-Leu-Leu-Val-Tyr(Dns)-OMe	43,5	319 (20)		432 (2)	459 (5) **				774 (52)

* Условия хроматографии см. в «экспериментальной части».

** Д-н ряда соединений в графе соответствующего иона приведены данные для преимущественно образующегося из него перегруппированного иона: для (51) A₁⁺ = (Dns)N(CH₂CH₂SH)⁺, остальные перегруппировочные ионы ((B₂-H)⁺, (A₂-H)⁺, (B₃-H)⁺, (A₃+H)⁺, (B₃-H)⁺) отмечены для соответствующих соединений двумя звездочками.

Времена удерживания и основные пути фрагментации метиловых эфиров N-дансиламинокислот



Номер	Соединение	Время удерживания, мин	m/z (относительная интенсивность, %)		
			M ⁺	A ⁺	B ⁺
78	Dns-Asn-OMe	6,1	379 (28)	320 (1)	347 (13)
79	Dns-Gln-OMe	7,5	393 (39)		361 (50)
80	Dns-Ser-OMe	10,5	352 (72)	293 (3)	320 (1)
81	Dns-Gly-OMe	10,9	322 (82)	263 (5)	
82	Dns-Thr-OMe	11,7	366 (80)	307 (4)	
83	Dns-Asp(OMe)-OMe	12,2	394 (49)	335 (2)	363 (3)
84	Dns-Ala-OMe	12,2	336 (40)	277 (7)	
85	Dns-Glu(OMe)-OMe	14,0	408 (52)	349 (2)	376 (3)
86	Dns-Tyr-OMe	14,3	423 (100)	369 (5)	
87	Dns-Cys-OMe	14,8	368 (58)	309 (3)	337 (1,5)
88	Dns-Pro-OMe	17,7	362 (64)	303 (16)	
89	Dns-His-OMe	19,1	402 (44)	343 (13)	370 (4)
90	Dns-Met-OMe	19,5	396 (67)	337 (3,5)	365 (1)
91	Dns-Val-OMe	20,6	364 (68)	305 (7)	
92	Dns-Trp-OMe	22,0	451 (35)	392 (1,5)	
93	Dns-Ile-OMe	24,7	378 (60)	319 (6)	
94	Dns-Leu-OMe	25,0	378 (75)	319 (6)	
95	Dns-Phe-OMe	25,1	412 (100)	353 (5)	
96	Dns-Orn(Dns)-OMe	28,0	612 (29)	553 (0,5)	580 (1,5)
97	Dns-Lys(Dns)-OMe	29,4	626 (38)	567 (1)	594 (2)
98	(Dns-Cys-OMe) ₂	30,1	734 (7)		
99	Dns-Tyr(Dns)-OMe	37,2	661 (34)	602 (2)	

и «аминоацильных» (B_n^+) ионов, характеризующих N-концевую аминокислотную последовательность. Во всех спектрах присутствуют пики диметиламинонафтильного иона $[Me_2NC_{10}H_6]^+$ с m/z 170 и иона с m/z 171 $[Me_2NC_{10}H_7]^+$, часто обладающие максимальной интенсивностью, а также пики ионов с m/z 234 $[Me_2NC_{10}H_6SO_2]^+$, 235 $[Me_2NC_{10}H_6SO_2H]^+$ и 250 $[Me_2NC_{10}H_6SO_2NH_2]^+$.

В масс-спектрах пептидов, состоящих из остатков алифатических и некоторых ароматических аминокислот, например фенилаланина, а также диаминокислот вторым по интенсивности, а иногда даже наиболее интенсивным является пик молекулярного иона (см. табл. 1 и рис. 2). Пик аминного фрагмента A_1^+ обычно имеет высокую интенсивность, а пик иона B_1^+ — крайне низкую или вообще отсутствует. Интенсивности пиков других аминных A_n^+ и аминоацильных B_n^+ ионов сопоставимы. Ионы, отвечающие отрыву боковых цепей, и ионы, характеризующие C-концевую часть молекулы, практически не образуются.

Дансилпептиды, содержащие остатки других аминокислот, обнаруживают в общем ту же картину фрагментации, лишь немного усложненную некоторыми дополнительными распадами боковых цепей. Иногда ионы M^+ , A_n^+ , B_n^+ сопровождаются ионами с m/z на 64 а.е.м. меньшими; последние образуются в результате перегруппировочного процесса, связанного с элиминированием SO_2 от дансильного остатка [30].

Для пептидов с остатками аминокислотных кислот характерен отрыв метоксильных групп и/или метанола от молекулярного иона и ряда осколочных ионов. Это в большей степени характерно для пептидов, содержащих остаток глутаминовой кислоты. Так, для пептида Dns-Glu-Glu-OMe (15)* (табл. 3) ряд таких отрывов подтверждается метастабильными пиками.

* Здесь и далее в круглых скобках указаны номера соединений в табл. 1 и 2.

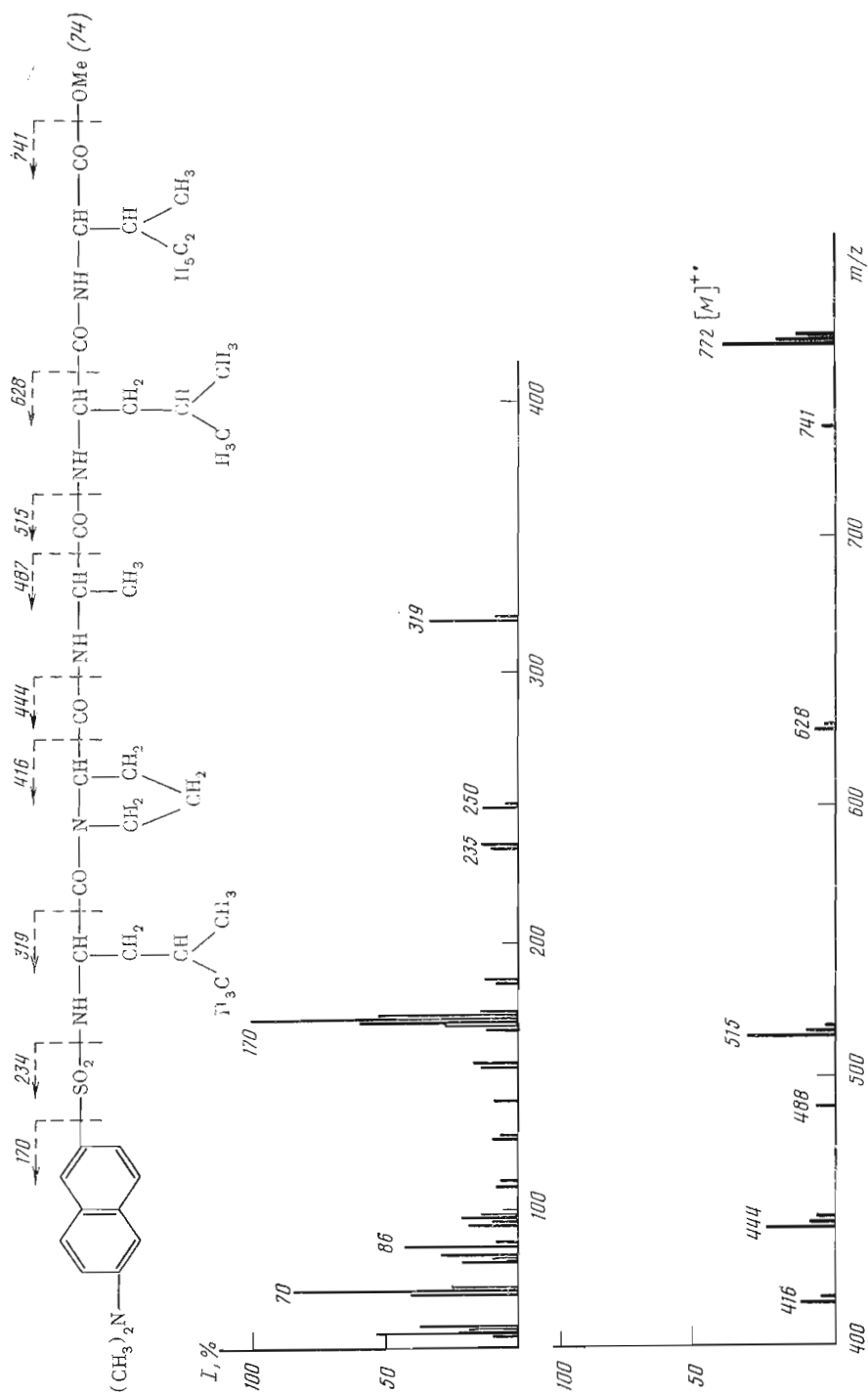
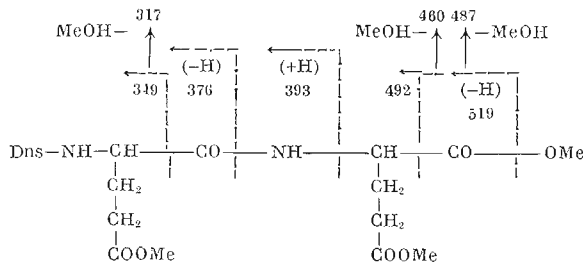


Рис. 2. Масс-спектр Dns-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-OMe (74)

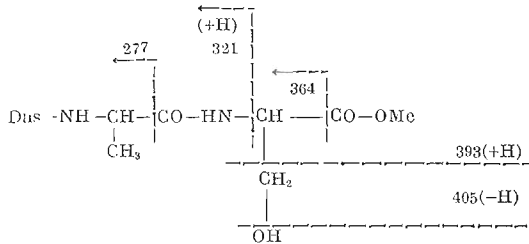
Масс-спектр Dns-Glu(OMe)-Glu(OMe)-OMe (15)



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
553	7	319	6
552	16,5	318	11
551 (M^{+})	45	317	40
521	6,5	252	8
520	15	250	5
519	28	235	13
492	4	234	10
488	6	203	6
487	10	186	10
460	4	172	15
456	2	171	90
455	5	170	100
423	3,5	169	20
393	3,5	168	32
376	6	155	25
349	6,5	154	27
348	6,5		

Таблица 4

Масс-спектр Dns-Ala-Ser-OMe (3)



m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
425	2	250	5
424	6	235	9
423 (M^{+})	32	234	14
407	4	203	3
406	7	186	8
405	22	172	10
393	5	171	70
364	2	170	100
341	2	169	11
321	3,5	168	19
277	11	155	11
276	5	154	12

Пептиды с остатками серина и треонина (например, соединения (2), (3), (32)) отщепляют элементы воды и боковую цепь (см. табл. 4).

Триптофансодержащие пептиды элиминируют боковую цепь, образуя ион с m/z 130, пик которого является максимальным в спектре (см. рис. 3).

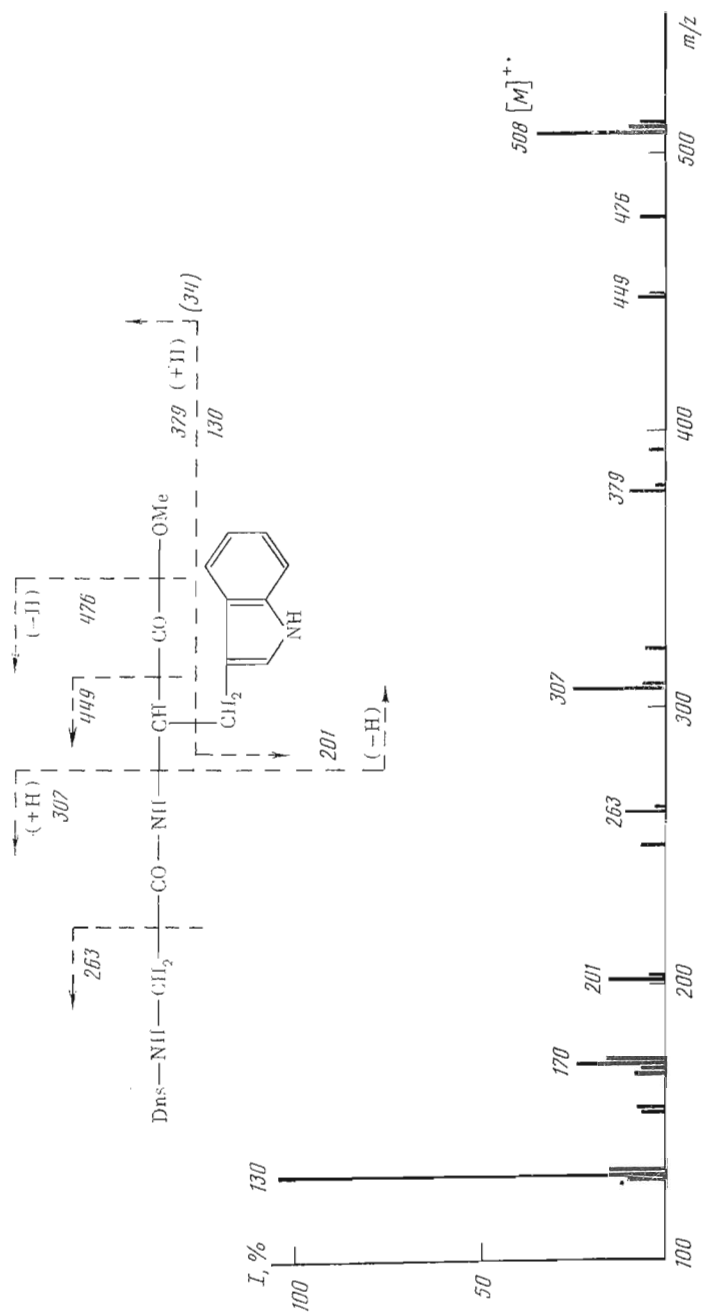


Рис. 3. Масс-спектр Dns-Gly-Trp-OMe (34)

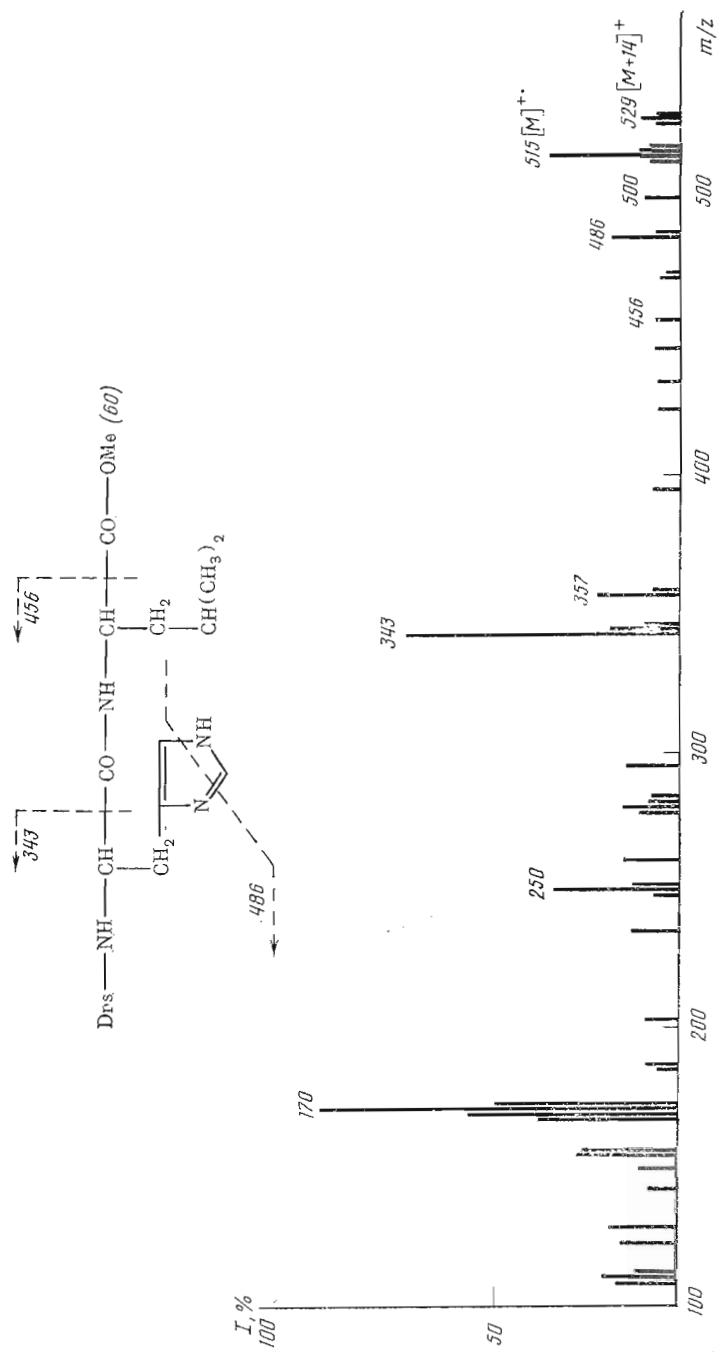


Рис. 4. Масс-спектр Dns-His-Leu-OMe (60)

В спектре пептида Dns-Cly-Trp-OMe (34) (рис. 3) присутствуют также интенсивные пики ионов с m/z 201 и 307, которые образуются в результате характерного для ароматических аминокислот разрыва NH—CH-связи [31].

Для гистидинсодержащих пептидов (соединения (22) и (60)) наряду с ионами M^{+} характерно образование ионов $[M+14]^{+}$ (рис. 4), появление которых связано с метилированием имидазольного кольца [32]. Распад ионов M^{+} и $[M+14]^{+}$ протекает одинаково, и это позволяет узнавать в масс-спектре осколочные ионы, содержащие остаток гистидина по характерным парам ионов с разницей в 14 а.е.м. (например, пики ионов с m/z 500, 486 и 357, 343 в масс-спектре пептида (60) на рис. 4). Ионы с m/z 500, 485 отличаются на 29 а.е.м. от ионов $[M+14]^{+}$ и M^{+} соответственно. Измерение точной массы иона с m/z 486 показало, что его элементный состав отличается на группу $\text{CH}_2=\text{NH}$ от элементного состава иона M^{+} . Элиминирование такой группы возможно лишь из имидазольного кольца остатка гистидина.

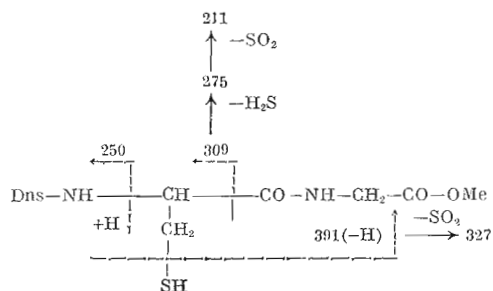
В масс-спектрах цистеинсодержащих пептидов превалируют пики ионов, образующихся в результате последовательного отщепления от молекулярного и осколочных ионов молекул H_2S и SO_2 (см. например, пики ионов с m/z 391, 327 и 275, 211 в табл. 5). Масс-спектр электронного удара пептида $(\text{Dns-Cys-Gly-OMe})_2$ (51) аналогичен масс-спектру пептида Dns-Cys-Gly-OMe (табл. 5).

Пептиды, содержащие остатки аргинина, являются исключением, так как они практически не дают масс-спектров электронного удара. Анализ таких пептидов возможен после превращения аргининовых остатков в орнитинового гидразиолизом [33].

Таким образом, приведенные данные показывают, что масс-спектры

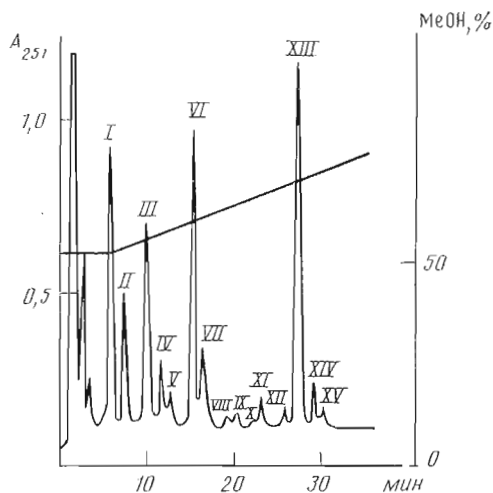
Таблица 5

Масс-спектр Dns-Cys-Gly-OMe



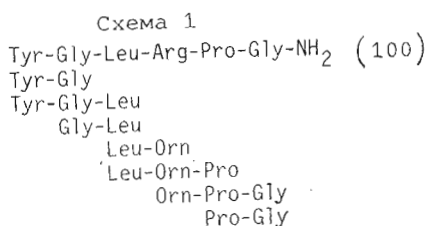
m/z	$I, \%$	m/z	$I, \%$
427	2	250	18
426	4	249	2,5
425 (M^{+})	15	239	4
393	6	236	3
392	13	235	9
391	51	234	7
374	2,5	212	7
361	2	211	35
360	1,5	210	8
359	2	203	7
327	5	202	4
309	2	195	4
308	1,5	186	9
296	1,5	171	36
277	2	170	100
276	5	169	16
275	20	168	32
261	4	155	16,5
251	4,5	154	23,5

Рис. 5. ВЭЖХ продуктов кислотного гидролиза пептида (100) после их дансильирования и метанолиза: I — Dns-NH₂ (1); II — Dns-Tyr-Gly-OMe (4); III — Dns-Gly-OMe (84); IV — Dns-Pro-Gly-OMe (13); V — Dns-Tyr-OMe (86); VI — Dns-NMe₂ (24); VII — Dns-Pro-OMe (88); VIII — Dns-Gly-Leu-OMe (35); X — Dns-Tyr-Gly-Leu-OMe (45); XI — Dns-Leu-OMe (94); XII — Dns-Orn(Dns)-Pro-Gly-OMe (64), Dns-Orn(Dns)-OMe (96); XIII — Dns-Orn(Dns)-Pro-OMe (65); XIV — Dns-Leu-Orn(Dns)-OMe (69); XV — Dns-Leu-Orn(Dns)-Pro-OMe (72)



метиловых эфиров N-дансилпептидов относительно просты и легко интерпретируемы. Для получения информативного спектра достаточно 1–2 нмоль вещества. Метод не позволяет различать по масс-спектрам пептиды, содержащие остатки изомерных аминокислот лейцина и изолейцина. Анализ таких пептидов, очевидно, необходимо сочетать с деградацией по Эдману.

С целью изучения практической применимости разрабатываемого метода анализировались смеси пептидов, образующихся при кратковременном кислотном гидролизе некоторых олигопептидов известного строения. Так, при гидролизе промежуточного продукта синтеза люлиберина — гексапептида Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (100) (6 п. HCl, 100° С, 45 мин), последующем гидразинолизе, дансильровании и этерификации была получена смесь производных, хроматографическое разделение которой показано на рис. 5. Для анализа было взято 100 мкг (150 нмоль) пептида. Хроматографические фракции были не вполне индивидуальными, по основным компонентам каждой фракции легко выявлялись при фракционном испарении смеси в системе прямого ввода образца при повышении температуры испарителя от 20 до 170° С. Обнаруженные пептиды (4), (13), (35), (45), (44), (49), (72) хорошо перекрывали последовательность изучаемого гексапептида (схема 1).



Среди продуктов кислотного гидролиза пептида (100) преобладали в основном ди- и трипептиды, во, естественно, присутствовали и аминокислоты.

Следует отметить, что высокая интенсивность пиков молекулярных ионов и амидных фрагментов A₁⁺ изучаемых производных пептидов дает возможность оценить состав исследуемых смесей без предварительного хроматографического разделения, пофракционно испаряя образец в системе прямого ввода. Это часто позволяет ускорить подбор условий гидролиза олигопептидов, а в некоторых наиболее простых случаях установить строение пептидов непосредственно в смеси. Иногда такой анализ позволяет выявить пики молекулярных ионов некоторых высокомолекулярных пептидов, которые из-за низкого содержания в смеси могут теряться при хроматографическом разделении. Так, из приведенных масс-спектров

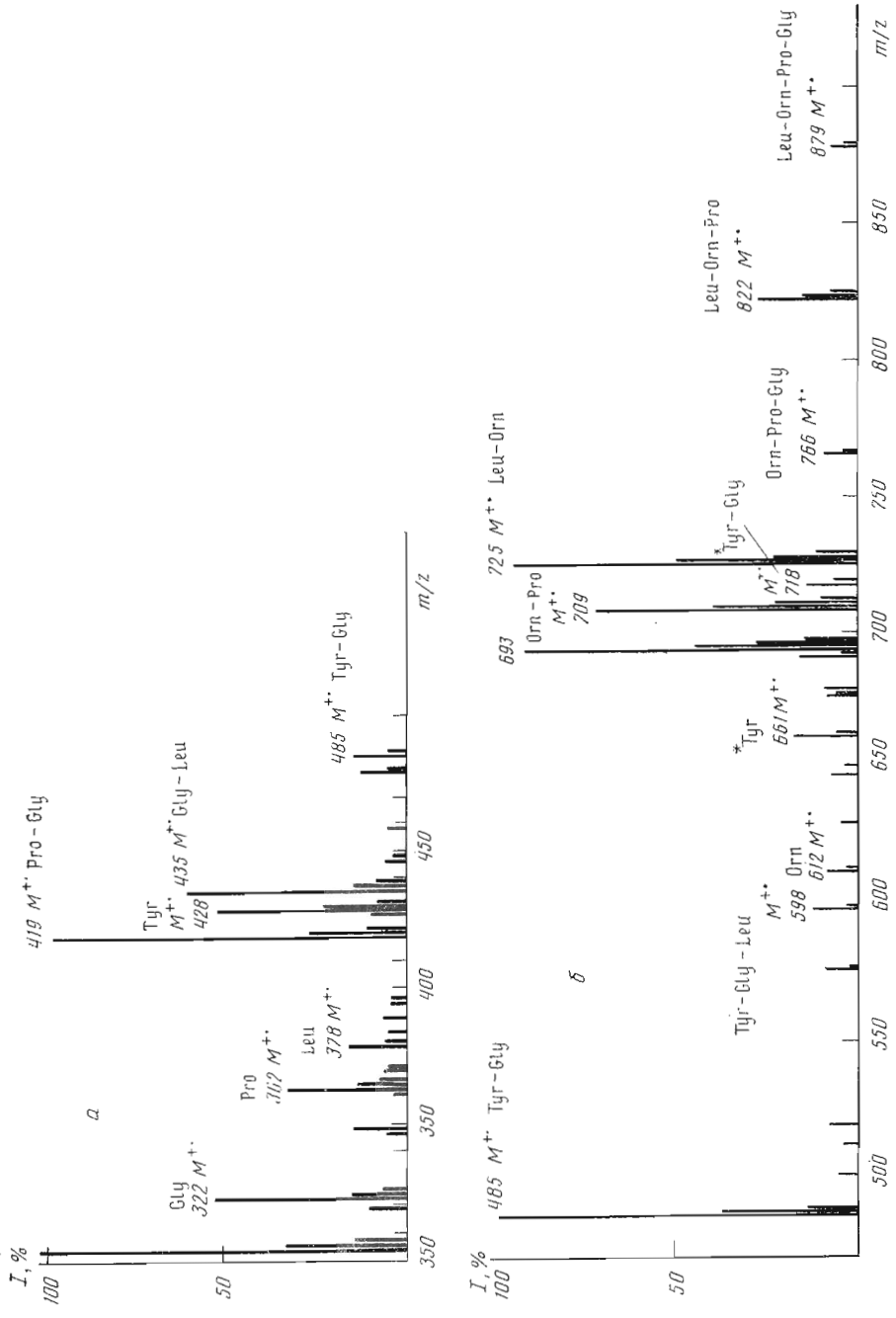


Рис. 6. Масс-спектры смеси метиловых эфиров N-дансипептидов, продуктов кислотного гидролиза пептида (100), при температуре испарения 100 (а) и 170°С (б). Звездочкой отмечены остатки тирозина, содержащий две Dns-группы

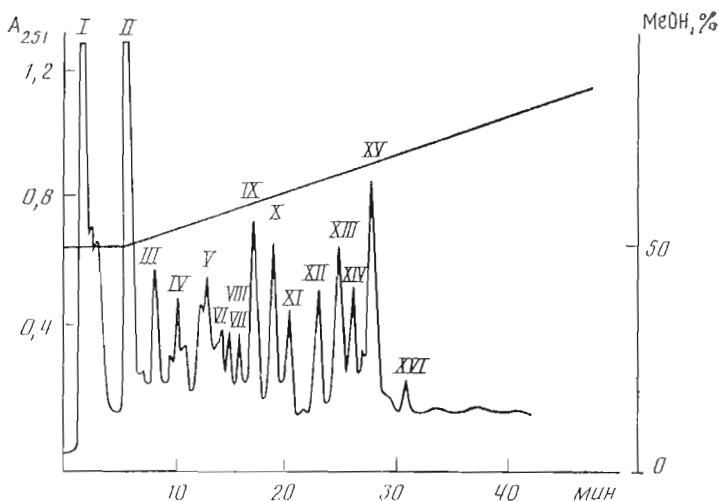
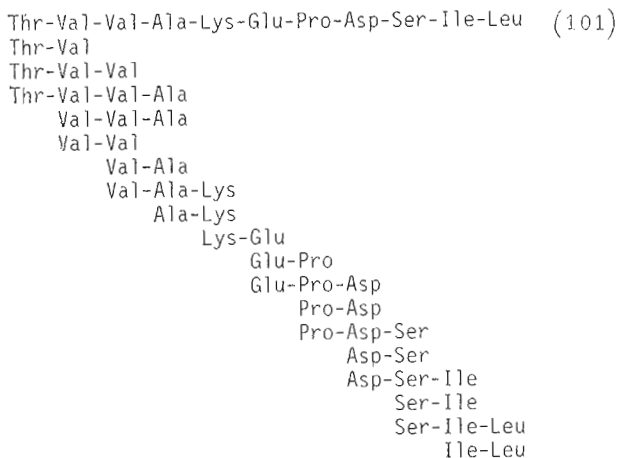


Рис. 7. ВЭЖХ продуктов ограниченного кислотного гидролиза пептида (101) после их дансирования и метанолиза: I – Dns-OH; II – Dns-NH₂ (1); III – Dns-Ser-OMe (80); IV – Dns-NHMe (8), Dns-Thr-OMe (82), Dns-Asp(OMe)-OMe (83); V – Dns-Ala-OMe (84), Dns-Glu(OMe)-OMe (85); VI – Dns-Glu(OMe)-Pro-OMe (18), Dns-Glu(OMe)-Pro-Asp(OMe)-OMe (19); VII – Dns-Pro-Asp(OMe)-OMe (21), Dns-Val-Ala-OMe (14); VIII – Dns-NMe₂ (24), Dns-Thr-Val-OMe, Dns-Asp(OMe)-Ser-OMe, Dns-Pro-Asp(OMe)-Ser-OMe; IX – Dns-Pro-OMe (88), Dns-Asp(OMe)-Ser-Ile-OMe; X – Dns-Ser-Ile-OMe, Dns-Val-Val-Ala-OMe (17), Dns-Val-OMe (91), Dns-Thr-Val-Val-Ala-OMe (32); XI – Dns-Val-Val-OMe (38), Dns-Thr-Val-Val-OMe (39); XII – Dns-Leu-OMe (32); XIII – Dns-Ile-Leu-OMe, Dns-Ser-Ile-Leu-OMe (54); XIV – Dns-Lys(Dns)-Glu(OMe)-(OMe); XV – Dns₂Lys-OMe (97), Dns-Ala-Lys(Dns)-OMe; XVI – Dns-Val-Ala-Lys(Dns)-OMe

смеси метиловых эфиров N-дансилпептидов гидролизата пептида (100), полученных при температурах испарения 100 и 170° С (рис. 6), видно, что в смеси присутствует тетрапептид Dns-Leu-Orn(Dns)-Pro-Gly-OMe, M⁺ с m/z 879, которого не обнаружили в хроматографических фракциях.

Хроматограмма смеси метиловых эфиров N-дансилпептидов, образующихся в результате кислотного гидролиза пептида (101) из цитоплазматической аспаратаминотрансферазы сердца свиньи (6 н. HCl, 100° С, 70 мин), представлена на рис. 7. Пептиды, обнаруженные в хроматографических фракциях, дают полное представление о его структуре (схема 2).

Схема 2



Анализ коротких пептидов, содержащихся в 17 хроматографических фракциях (рис. 8), полученных при разделении кислотного гидролизата ангиотензиногена (102) (6 н. HCl, 100° С, 75 мин, 75 пмоль), позволяет

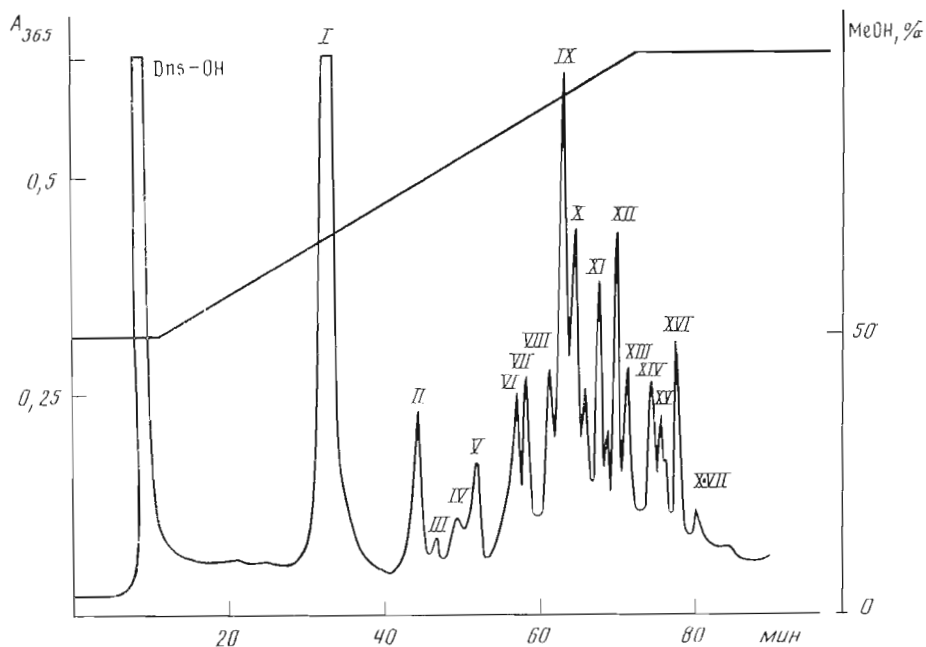
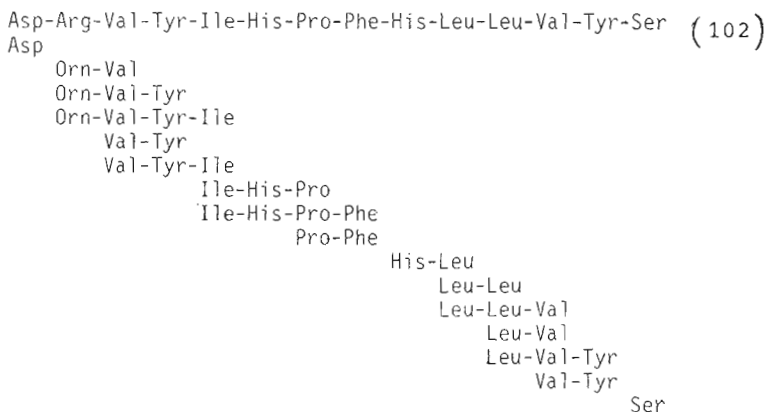


Рис. 8. ВЭЖХ смеси метиловых эфиров N-дансильпептидов, продуктов ограниченного кислотного гидролиза ангиотензиногена (102): I — Dns-NH₂ (1); II — Dns-Ser-OMe (80); V — Dns-Asp(OMe)-OMe (83); VI — Dns-NHMe (8); VII — Dns-Pro-OMe (88); VIII — Dns-Val-OMe (91); IX — Dns-Leu-OMe (94), Dns-Phe-OMe (95), Dns-Leu-Val-OMe (48), Dns-Ile-His-Pro-OMe; X — Dns-Leu-Leu-OMe (62), Dns-Pro-Phe-OMe (59), Dns-His-Leu-OMe (60); XI — Dns-Leu-Leu-Val-OMe (71), Dns-Orn(Dns)-Val-OMe (68), Dns-Ile-His-Pro-Phe-OMe; XII — Dns-Val-Tyr(Dns)-OMe; XIV, XV — Dns-Leu-Val-Tyr-OMe, Dns-Val-Tyr-Ile-OMe; XVI, XVII — Dns-Orn(Dns)-Val-Tyr-OMe, Dns-Orn(Dns)-Val-Tyr-Ile-OMe

однозначно определить большую часть его аминокислотной последовательности (схема 3).

Схема 3



Следует отметить, что пептиды, содержащие гистидин, обычно выделяются из смеси в очень незначительных количествах. При хроматографическом разделении продуктов ограниченного кислотного гидролиза мелиттина (103) (6 н. HCl, 100° C, 75 мин, 130 нмоль) аналогичная картина наблюдается и для триптофансодержащих пептидов (рис. 9, пики VIII и IX). Это можно объяснить общезвестной деструкцией триптофана в кислых условиях [34]. Кроме того, в масс-спектрах хроматографических фракций и неразделенной смеси не удалось обнаружить пептидов, содержащих одновременно остатки лизина и орнитина (см. схему 4). Видимо, это объясняется либо низкой летучестью этих соединений

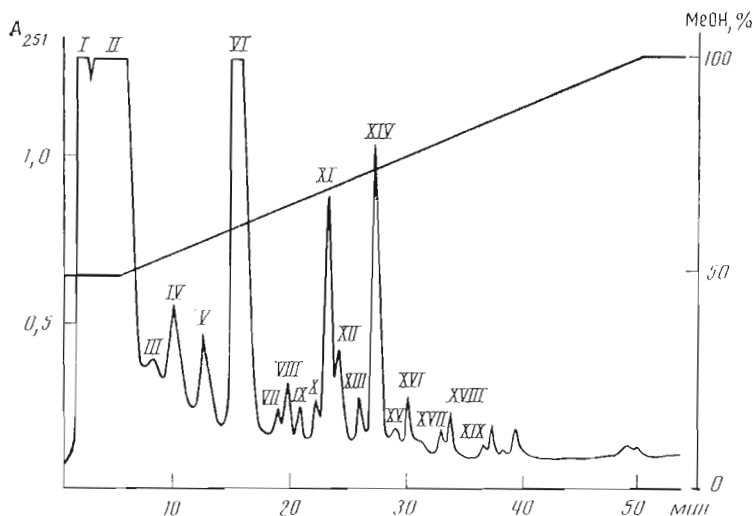


Рис. 9. ВЭЖХ смеси метиловых эфиров N-дансилпептидов, продуктов ограниченного кислотного гидролиза мелиттина (103): I — Dns-OH; II — Dns-NH₂ (1); III — Dns-Gly-Ala-OMe (10), Dns-Thr-Gly-OMe, Dns-Thr-Thr-Gly-OMe; IV — Dns-NHMe (8); V — Dns-Glu(OMe)-Glu(OMe)-OMe (15), Dns-Leu-Thr-OMe, Dns-Gly-Ile-OMe; VI — Dns-NMe₂ (24), Dns-Gly-Ile-Gly-OMe (28), Dns-Ile-Gly-Ala-OMe, Dns-Gly-Leu-Pro-OMe, Dns-Ala-Val-OMe (29); VII — Dns-Ile-Ser-OMe; VIII — Dns-Ala-Leu-OMe (37), Dns-Ser-Trp-OMe; IX — Dns-Leu-Pro-Ala-OMe (43), Dns-Trp-Ile-OMe; X — Dns-Leu-Ile-Ser-OMe, Dns-Leu-Pro-OMe (44); XI — Dns-Val-Leu-OMe; XII — Dns-Ala-Val-Leu-OMe (55); XIII — Dns-Leu-Ile-OMe, Dns-Thr-Gly-Leu-OMe, Dns-Leu-Thr-Thr-OMe, Dns-Orn(Dns)-Glu(OMe)-OMe; XIV — Dns-Lys(Dns)-Val-OMe, Dns-Ala-Leu-Ile-OMe (64); XV — Dns-Leu-Lys(Dns)-OMe (70); XVI — Dns-Gly-Ile-Gly-Ala-Val-OMe, Dns-Leu-Pro-Ala-Leu-OMe, Dns-Pro-Ala-Leu-Ile-OMe; XVII — Dns-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-OMe (74), Dns-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-OMe; XVIII — Dns-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-OMe, Dns-Leu-Lys(Dns)-Val-OMe, Dns-Lys(Dns)-Val-Leu-OMe (75), Dns-Val-Leu-Lys(Dns)-OMe; XIX — Dns-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-OMe, Dns-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-OMe

с тремя дансильными группами, либо легкостью расщепления связей Lys-Arg и Arg-Lys в условиях гидразинолиза и последующего кислотного гидролиза. Участки белка, построенные из остатков алифатических аминокислот, анализируются достаточно легко. Трудности связаны главным образом с поведением отдельных аминокислот в условиях кислотного гидролиза и могут быть преодолены применением ферментативного гидролиза.

Разработанный метод пригоден и для определения первичной структуры пептидов, содержащих С-концевые амидные группы. Так, анализ продуктов тринитического гидролиза двух линейных тетрадекапептидов из яда шершня *Vespa orientalis* HR-I и HR-II позволил выделить два С-концевых амидных фрагмента Val-Leu-NH₂ и Leu-Leu-NH₂, дансильные производные которых дают масс-спектры с пиками высокой интенсивности молекулярных ионов и аминных фрагментов A₁⁺ [35].

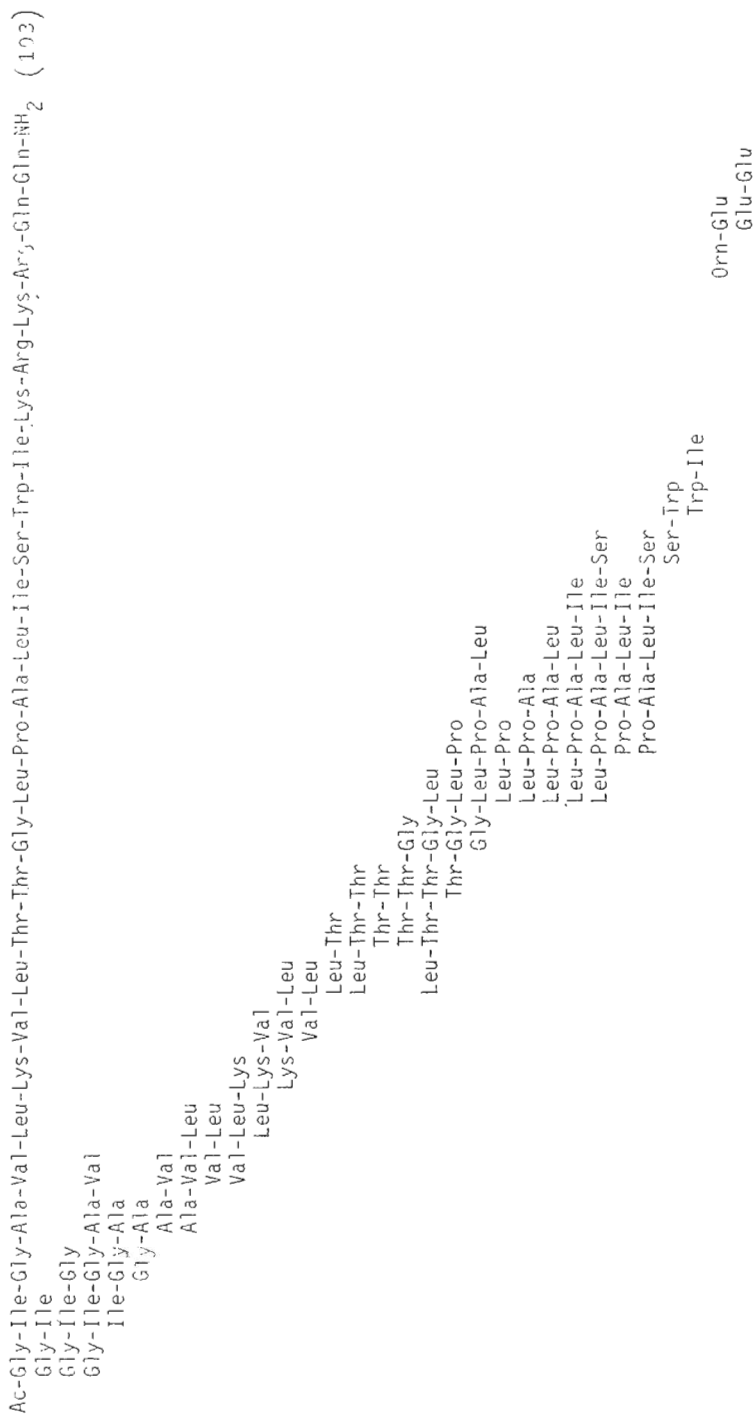
Таким образом, предлагаемый метод анализа первичной структуры олигопептидов путем их частичного кислотного гидролиза и последующего анализа полученных коротких пептидов в виде метиловых эфиров N-дансилпроизводных комбинированием ВЭЖХ и масс-спектрометрии с ионизацией электронным ударом представляет собой полезное дополнение к существующим методам анализа.

Экспериментальная часть

Масс-спектры электронного удара получены на приборе LKB 9000 (Швеция) при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и температуре ионизационной камеры 250° С, точное измерение масс — на приборе СН-5 (Varian, ФРГ) при разрешающей способности 10 000.

ВЭЖХ проводилась при градиенте концентрации метанола в воде (от 50% MeOH до 100%) при скорости подачи элюента 1,5 мл/мин на хрома-

Схема 4



гормафе Pye Unicam LC-3 на колонке Lichrosorb RP-18 (10 мкм, 4,6×250 мм) (рис. 1, 5, 7, 9) и на хроматографe Du Pont на колонке Lichrosorb RP-13, Altex (10 мкм, 4,6×250 мм) (рис. 8).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bateman A., Dell A., Morris H. R. J. Appl. Biochem.*, 1985, v. 7, № 2, p. 126-132.
2. *Williams D. H., Bradley C. V., Santikarn S., Bojesen G. Biochem. J.*, 1982, v. 207, № 1, p. 105-117.
3. *Rose M. E., Prescott M. C., Wilby A. H., Galpin I. J. Biomed. Mass Spectrom.*, 1984, v. 11, № 1, p. 10-23.
4. *Morris H. R., Panico M., Taylor G. W. Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1983, v. 117, № 1, p. 299-305.
5. *Seki S., Kambara H., Nacki H. Org. Mass Spectrom.*, 1985, v. 20, № 1, p. 18-24.
6. *Gibson B. W., Biemann K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1984, v. 81, № 7, p. 1956-1960.
7. *Tokao T., Hitouji T., Shimonishi Y., Tanabe T., Inouye S., Inouye M. J. Biol. Chem.*, 1984, v. 259, № 10, p. 6105-6109.
8. *Hertiky W. C., Royal N. J., Biemann K., Putney S. D., Shimmel P. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 11, p. 6531-6535.
9. Дас Б., Ледепер Э. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков. М.: Мир, 1974, с. 189-235.
10. *Kelley J. A., Nau H., Förster H.-J., Biemann K. Biomed. Mass Spectrom.*, 1975, v. 2, № 6, p. 313-325.
11. *Siefert W. E., McKoo R. E., Jr., Beckner C. F., Caprioli R. M. Anal. Biochem.*, 1978, v. 88, № 1, p. 149-161.
12. *Morris H. R. Nature*, 1980, v. 286, № 5772, p. 447-452.
13. Розынов Б. В. Масс-спектрометрия в биоорганической химии (применение в анализе аминокислот, пептидов и белков). Итоги науки и техники. Сер. «Органическая химия». Изд. ВИНТИ, 1978, т. 2, с. 177.
14. *Morris H. R., Williams D. H. Biochem. J.*, 1974, v. 141, № 3, p. 701-713.
15. *Taylor G. W., Morris H. R. Handbook of psychopharmacology. N. Y.: Plenum Publ. Corpor.*, 1982, v. 15, p. 271-297.
16. *Baranowski R., Westenfelder C., Currie B. L. Anal. Biochem.*, 1982, v. 121, № 1, p. 97-102.
17. *Games D. E., Lant M. S., Westwood S. A., Cocksedge M. J., Evans N., Williamson J., Woodhall B. J. Biomed. Mass Spectrom.*, 1982, v. 9, № 5, p. 215-234.
18. First Workshop on Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, Montreux, October 22-23, 1981/Ed. Frei R. W. (Amsterdam). *J. Chromatogr.*, 1982, v. 251, № 2, p. 91-225.
19. *Games D. E. Adv. Chromatography*, 1983, v. 21, p. 1-39.
20. *Kim H. J., Pilosof D., Dyckes D. E., Vestal M. L. J. Amer. Chem. Soc.*, 1984, v. 106, № 24, p. 7304-7309.
21. *Yu T. J., Schwartz H. A., Cohen S. A., Vouros P., Karger B. L. J. Chromatogr.*, 1985, v. 301, № 2, p. 425-440.
22. *Day R. A., Falter H., Lehman J. P., Hamilton R. E. J. Org. Chem.*, 1973, v. 38, № 4, p. 782-788.
23. *Gray W. R. Methods Enzymol.*, 1972, v. 25, p. 121-138.
24. *Neadle D. J., Pollitt R. J. Biochem. J.*, 1965, v. 97, № 2, p. 607-608.
25. *Kuo Ting Hsu, Currie B. L. J. Chromatogr.*, 1978, v. 166, № 2, p. 555-561.
26. *Olson D. C., Schmidt P. J., Slavin W. Chromatogr. News Letter*, 1979, v. 7, p. 22-25.
27. *Wiedweier V. T., Porterfield S. P., Hendrich C. E. J. Chromatogr.*, 1982, v. 231, № 2, p. 410-417.
28. *Levina N. B., Nazimov I. V. J. Chromatogr.*, 1984, v. 286, p. 207-216.
29. *Hearn M. T. W., Grego B., Hancock W. S. J. Chromatogr.*, 1979, v. 185, p. 429-444.
30. *Kinstle T. H., Oliver W. R. Org. Mass Spectrom.*, 1972, v. 6, № 7, p. 699-714.
31. *Shemyakin M. M., Ovchinnikov Yu. A., Kiryushkin A. A. Mass spectrometry: technique and applications/Ed. Milne G. W. A., N. Y.: Wiley*, 1971, p. 289-325.
32. *Pjuender P. Liebigs J. Ann. Chem.*, 1967, v. 707, p. 209-216.
33. *Morris H. R., Dickinson R. J., Williams D. H. Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1973, v. 51, № 1, p. 247-255.
34. Дэвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976, с. 31-45.
35. Мирошников А. И., Снежкова Л. Г., Назимов И. В., Решетова О. С., Розынов Б. В. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1467-1477.

Поступила в редакцию 23.VII.1986

ANALYSIS OF N-DANSYL PEPTIDE METHYL ESTERS BY MEANS HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY

RESHETOVA O. S., ONOPRIENKO V. V., ROZYNOV B. V., KOZMIN Yu. P.

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

For amino acid sequence determination of polypeptides we found it feasible to use partial acid hydrolysis, to convert the resulting shorter peptides into N-dansyl peptide methyl esters and to analyse the resulting mixtures by means of reversed-phase HPLC and mass spectrometry. Retention times and relative abundances of molecular ions as well as of fragment ions are given for derivatives of common amino acids and of a number of peptides.