含酪氨酸三肽自由基离子的形成、异构和解离反应机理研究

路时芳, 曹洁*, 贾贺园, 孙烁琪, 陈世裕*

北京理工大学化学与化工学院, 原子分子簇科学教育部重点实验室, 北京 100081

*通讯作者, E-mail: jcao@bit.edu.cn; shlchen@bit.edu.cn

收稿日期: 2020-05-20; 接受日期: 2020-06-22; 网络版发表日期: 2020-08-13

国家自然科学基金(编号: 21371025)资助项目

摘要 本文使用铜-配体-三肽组成的三元复合物 $[\text{Cu}(\text{L})\text{Peptide}]^{2+}$ (配体 $\text{L}=4'$ -氯-2,2':6',2''-三联吡啶, 缩写4Cl-tpy; Peptide=丙氨酸-酪氨酸-甘氨酸(AYG)或甘氨酸-酪氨酸-甘氨酸(GYG))通过碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)的方法, 成功制备了AYG和GYG两个系列自由基离子 $[\text{AYG}]^{+\bullet}$, $[\text{AYG}]^{\bullet+}$; $[\text{GYG}]^{+\bullet}$, $[\text{GYG}]^{\bullet+}$ 和 $[\text{GYG}]^{\bullet+}$ 。通过对比AYG不同位点自由基离子的CID谱图以及对比AYG和GYG两个系列自由基离子的CID谱图, 结合密度泛函理论(density functional theory, DFT)计算, 阐明AYG自由基离子的气相异构/解离反应机理, 并解释了AYG和GYG自由基离子不同解离行为的内在原因。研究表明, (1) $[\text{AYG}]^{+\bullet}$ 和 $[\text{AYG}]^{\bullet+}$ 的解离路径基本相同, 二者的主要裂解产物均为 $[\text{x}_2+\text{H}]^{+\bullet}$ 离子, 说明二者在解离之前已完全异构。(2) $[\text{A}^{\bullet}\text{YG}]^+$ 和 $[\text{G}^{\bullet}\text{YG}]^+$ 的解离路径相同, 二者均断裂酰胺C-N键, 产生 $[\text{b}_2-\text{H}]^{+\bullet}$ 碎片离子, 说明 $[\text{A}^{\bullet}\text{YG}]^+$ 不能异构为 $[\text{AYG}]^{+\bullet}$ 和 $[\text{AYG}]^{\bullet+}$ 。(3) DFT计算给出了AYG三个自由基离子的稳定性顺序 $[\text{A}^{\bullet}\text{YG}]^+ > [\text{AYG}]^{\bullet+} > [\text{AYG}]^{+\bullet}$ 和它们的异构/解离能垒。 $[\text{AYG}]^{+\bullet} \rightarrow [\text{AYG}]^{\bullet+}$ 的异构能垒(47.4 kcal/mol)低于 $[\text{AYG}]^{\bullet+}$ 的解离能垒(72.7 kcal/mol), 但高于 $[\text{AYG}]^{+\bullet}$ 的解离能垒(44.3 kcal/mol), 由此得到 $[\text{AYG}]^{+\bullet}$ 的气相裂解反应机理为 $[\text{AYG}]^{+\bullet} \rightarrow [\text{AYG}]^{\bullet+}$ 的异构过程, 再经历 $[\text{AYG}]^{\bullet+} \rightarrow [\text{x}_2+\text{H}]^{+\bullet}$ 的解离反应, 断裂 $[\text{AYG}]^{+\bullet}$ N端 $\text{C}_\alpha-\text{C}$ 键而产生 $[\text{x}_2+\text{H}]^{+\bullet}$ 碎片离子。(4) $[\text{GYG}]^{+\bullet}$ 与 $[\text{AYG}]^{+\bullet}$ 的气相裂解特征不同, $[\text{GYG}]^{+\bullet}$ 是断裂第二个N-C α 键(从N端氨基酸残基数起)产生 $[\text{z}_2-\text{H}]^{+\bullet}$ 碎片离子。

关键词 电喷雾串联质谱(ESI-MS/MS), 密度泛函理论计算, 三肽自由基离子, 气相异构和解离反应

1 引言

蛋白质是多肽链经过螺旋和折叠形成的具有一定功能的生物大分子, 它是生命活动的承担者, 研究蛋白质的组成、结构和功能对于深刻理解重要的生理病理现象和制定正确的医疗策略具有重要的意义。多肽自

由基离子在生物体系中参与了许多重要的生命活动, 是牛海绵状脑炎和阿尔兹海默症等疾病的关键中间体^[1~4], 其中的甘氨酸自由基离子和 α 自由基离子(自由基在氨基酸的 C_α 上)还分别参与III类核糖核苷酸还原酶(RNR)的催化过程和许多氧化反应^[5,6]。与质子化的多肽离子 $[\text{M}+\text{nH}]^{n+}$ 相比, 多肽自由基离子 $(\text{M}^{\bullet+})$ 同时

引用格式: Lu S, Cao J, Jia H, Sun S, Chen S. Formation, isomerization, and dissociation of tyrosine-containing tripeptide radical cations. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 1177-1186, doi: 10.1360/SSC-2020-0080

具有电荷和自由基两个反应中心, 反应活性更高, 既可以发生电荷诱导的解离反应, 又可以发生自由基诱导的解离反应, 可以产生更加丰富的碎片离子, 如电荷诱导的、断裂多肽骨架上酰胺C-N键产生b/y系列离子, 还有自由基诱导的、断裂多肽骨架上N-C α 键或C α -C键产生c/z或a/x离子, 或者断裂侧链的C α -C β 或C β -C γ 键丢失全部或部分侧链等(图1)^[7,8], 对确定蛋白质的结构更有利。此外, Peptide $^{\bullet+}$ 的解离过程涉及质子转移、电子转移、重排和异构等复杂过程^[9-12], 研究Peptide $^{\bullet+}$ 的气相裂解行为对设计具有特定功能的多肽分子具有重要意义。

目前, 产生多肽自由基离子的方法主要有电子轰击电离(electron impact ionization, EI)^[13]、激光解吸/多光子电离(laser desorption/multiphoton ionization)^[14]、电子捕获解离(electron capture dissociation, ECD)^[15-17]、电子转移解离(electron transfer dissociation, ETD)^[18-20]和金属-配体-多肽三元复合物的CID^[21]以及修饰了化学基团^[22-26]或自由基引发剂^[27,28]多肽的CID等, 其中以金属-配体-多肽三元复合物的CID方法最为常见。这种方法一般可以得到两种类型的自由基离子: 荷基同位离子(自由基和电荷在同一个位置, 如 π 和S自由基离子)和荷基异位离子(自由基和电荷在不同原子上, 如 α 自由基离子)。通过金属-配体-多肽三元复合物的CID反应, 首先得到荷基同位离子, 该离子可进一步发生丢失侧链的碎裂反应, 断裂侧链C α -C β 键从而产生 α 自由基离子, 如多肽中的色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和甲硫氨酸(M)都可丢失其全部侧链产生 α 自由基离子^[7,9,10,29,30]。图2是以AYG三肽为例说明[AYG] $^{\bullet+}$ 的形成过程。Chu等^[10]曾通过[WGY] $^{\bullet+}$ 和[YGW] $^{\bullet+}$ 分别得到了[G $^{\bullet}$ GY] $^+$ 和[G $^{\bullet}$ GW] $^+$; Hopkinson等^[30]曾探讨过[MG] $^{\bullet+}$ 和[GM] $^{\bullet+}$ 的裂解机理, 成功地通过[GM] $^{\bullet+}$ 得到了[GG $^{\bullet}$] $^+$, 但是他们研究的这两种自由基离子([MG] $^{\bullet+}$ 和[GM] $^{\bullet+}$)的电荷和自由基都在S原子上, 目前还没有人探讨过当酪氨酸(Y)和甲硫氨酸(M)同时存在且M在C端、Y在中间(电荷和自由基都在Y上)时, 多肽自由基离子是否能产生C端 α 自由基离子。

近年来, 多肽自由基离子的工作主要集中在其解离机理研究。Siu等^[31]报道了三肽自由基离子[G $^{\bullet}$ GG] $^+$ 、[GG $^{\bullet}$ G] $^+$ 和[GGG $^{\bullet}$] $^+$, 探讨了自由基位点对解离的影响, 他们还探讨过N-C α 键断裂产生c/z离子的竞争反应^[32]; Chu等研究了N端氨基酸的碱性对三

图1 多肽自由基离子电荷诱导和自由基诱导的气相裂解反应(网络版彩图)

Figure 1 Charge- and radical-induced fragmentations of peptide radical cations (color online).

图2 π 和 α 多肽自由基离子的形成机制(网络版彩图)

Figure 2 Formation mechanisms of π and α radical cations of peptides (color online).

肽自由基离子[RYG] $^{\bullet+}$ 、[KYG] $^{\bullet+}$ 、[NYG] $^{\bullet+}$ 和[AYG] $^{\bullet+}$ 的裂解行为的影响, 还研究了二肽自由基离子[AY] $^{\bullet+}$ 的N端C α -C键的断裂机理^[33]。但是, [AYG] $^{\bullet+}$ 和[AYG] $^{\bullet+}$ 的异构/解离的竞争反应以及AYG系列自由基离子([GYG] $^{\bullet+}$ 、[G $^{\bullet}$ YG] $^+$ 和[GYG] $^{\bullet+}$)气相解离反应的对比研究尚未见报道, 研究以上内容对深入理解具有不同自由基位点三肽自由基离子的解离特点和解离机理具有重要的意义。

本工作采用电喷雾串联质谱(ESI-MS/MS)方法并结合密度泛函理论计算, 研究了[AYG] $^{\bullet+}$ 前驱体([AYM] $^{\bullet+}$ 和[AYW] $^{\bullet+}$)的气相反应机理; 探索三种具有不同自由基位点的AYG自由基离子([AYG] $^{\bullet+}$ 、

$[A^{\bullet}YG]^+$ 和 $[AYG^{\bullet}]^+$ 的气相稳定性及其异构/解离的竞争反应过程; 研究 $[AYG]^+$ 和 $[GYG]^+$ 的气相解离行为差异, 以深入探究自由基位点和多肽中氨基酸种类对多肽自由基离子异构/解离反应的影响, 并深入理解生物体系中自由基介导的复杂反应历程。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

Wang树脂(1.2 mmol/g, 100~200 mesh, 1% DVB)购自天津南开和成技术有限公司, Fmoc-L-色氨酸(Boc)、Fmoc-L-蛋氨酸、二氯甲烷、二异丙基碳二亚胺、4-二甲氨基吡啶、三异丙基硅烷、甲基叔丁基醚、甲醇和高氯酸铜均购自上海麦克林生化科技有限公司, *N*-苄氧羰基-甘氨酸、Fmoc-O-叔丁基-L-酪氨酸、Fmoc-L-丙氨酸、1-羟基苯并三唑、三氟乙酸和4'-氯-2,2':6',2''-三联吡啶均购自萨恩化学技术(上海)有限公司, *N,N*-二甲基甲酰胺购自北京化工厂, 二乙胺购自北京伊诺凯科技有限公司, 乙醇购自上海阿拉丁生化科技有限公司。

使用的仪器是Bruker离子阱质谱仪(Amazon Speed Dual Funnel, 德国)配有电喷雾离子源(ESI)及Data Analysis 5.1数据处理系统。

2.2 实验方法

2.2.1 $Cu(4Cl-tpy)(ClO_4)_2$ 的合成

$Cu(ClO_4)_2$ 和4'-氯-2,2':6',2''-三联吡啶(4Cl-tpy)分别用水和乙醇溶解后, 在130℃加热的情况下以摩尔比1.5:1混合反应, 用冷的 $CH_3CH_2OH:H_2O$ (1:1)重结晶2次后, 得到纯的 $Cu(4Cl-tpy)(ClO_4)_2$ 。此合成参考文献^[34]中的方法, 用 $Cu(ClO_4)_2$ 代替 $Cu(NO_3)_2$, 4Cl-tpy代替三联吡啶(terpy), $Cu(ClO_4)_2$ 和4Cl-tpy反应时的摩尔比由1:1改为1.5:1。

2.2.2 三肽的合成

参照参考文献^[35], 采用Fmoc固相合成法合成三肽, 脱保护试剂用二乙胺代替哌啶, 反应流程图参见图S1(网络版补充材料)。

2.2.3 $[Cu(4Cl-tpy)Peptide](ClO_4)_2$ 溶液的制备

称取1 mg三肽, 用1 mL水溶解; 再称取1 mg Cu

$(4Cl-tpy)(ClO_4)_2$, 用1 mL甲醇溶解, 然后将三肽溶液(1 mg/mL)和 $Cu(4Cl-tpy)(ClO_4)_2$ 溶液(1 mg/mL)按摩尔比5:1混合后, 用 $CH_3OH:H_2O=1:1$ 稀释20倍, 然后用注射泵将此混合溶液注入到ESI离子源中。

2.2.4 质谱条件

电喷雾离子源; 正离子模式; 雾化气压力7.3 psi; 毛细管电压4500 V; End Plate Offset 500 V; 流速为150 μ L/h; 干燥气: N_2 ; 干燥气温度: 100 ℃; 干燥气流速: 4 L/min; 隔离宽度: 1 m/z ; Max Accu Time: 10 ms; 碰撞气: He; 激发电压: 0.25–0.43 V; 扫描范围: 50–3000 m/z 。

2.2.5 计算条件

本文中的所有计算是应用Gaussian 09程序, 采用密度泛函理论(DFT)方法^[36,37], 使用6-31+g(d, p)基组进行结构优化。所有结构都进行了频率校正, 所有过渡态都采用内部反映坐标(the intrinsic reaction coordinate, IRC)的方法^[38]进行确认。

3 结果与讨论

3.1 产生AYG自由基离子的前驱体研究

我们通过 $[Cu(4Cl-tpy)Peptide]^+$ 的CID反应, 成功制备了AYG的两种自由基离子 $[AYG]^{\bullet+}$ (由 $[Cu(4Cl-tpy)(AYG)]^{2+}$ 产生)(图S2)和 $[AYG^{\bullet}]^+$ (由 $[AYM]^+$ 产生)(图3(a)), 并探索 $[AYG^{\bullet+}]$ 的两种可能前驱体 $-[AYM]^+$ 和 $[AYW]^+$ 的气相碎裂机理(图4), 其中, $[AYM]^+$ 和 $[AYW]^+$ 分别由 $[Cu(4Cl-tpy)(AYM)]^{2+}$ 和 $[Cu(4Cl-tpy)(AYW)]^{2+}$ 产生。图3(a)是 $[AYM]^+$ 的CID谱图。 $[AYM]^+(m/z\ 383.05)$ 的主要解离产物是 $[x_2+H]^+(m/z\ 339.99)$ 和 $[AYG^{\bullet+}](m/z\ 309.01)$ 。此外, 还有少量的 $[b_2-H]^+(m/z\ 233.98)$ 、 $[y_1+2H]^+(m/z\ 150.00)$ 、 $[AYM-H_2O]^+(m/z\ 365.00)$ 、 $[x_2+H-H_2O]^+(m/z\ 322.02)$ 、 $[z_2-H]^+(m/z\ 294.93)$ 及其碎片离子 $[z_2-H-CO_2]^+(m/z\ 250.92)$ 。图3(b)是 $[AYW]^+$ 的CID谱图。 $[AYW]^+(m/z\ 438.11)$ 的主要解离路径是丢失一分子 CO_2 产生 $[AYW-CO_2]^+(m/z\ 394.11)$ 。此外, 还有 $[AYW-CO_2]^+$ 进一步丢失一分子中性自由基(116 Da)产生的 $[AYW-CO_2-116]^+(m/z\ 278.02)$ 以及 β 自由基诱导产生的 $[c_2+2H]^+(m/z\ 252.00)$ 碎片离子。

图3 (由[Cu(4Cl-tpy)(AYM)]²⁺产生[AYM]²⁺ (a)和(由[Cu(4Cl-tpy)(AYW)]²⁺产生[AYW]²⁺ (b)的CID谱图(网络版彩图)
Figure 3 CID spectra of [AYM]²⁺ (a) and [AYW]²⁺ (b) generated from [Cu(4Cl-tpy)(AYM)]²⁺ and [Cu(4Cl-tpy)(AYW)]²⁺, respectively (color online).

图4 [AYM]²⁺ (a)和[AYW]²⁺ (b)的气相裂解机理(网络版彩图)

Figure 4 Gas-phase fragmentation mechanisms of [AYM]²⁺ (a) and [AYW]²⁺ (b) (color online).

图4分别给出了[AYM]²⁺和[AYW]²⁺的气相裂解机理. Hopkinson等^[30]曾探讨过[MG]²⁺和[GM]²⁺的裂解机理, [GM]²⁺中甲硫氨酸残基(M)的 γ -H可以迁移到氨基

N原子上, 然后通过 γ 自由基诱导的C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ 键断裂产生[GG]²⁺, 而[MG]²⁺中甲硫氨酸残基(M)的 γ -H在氨基酸内的迁移受到阻碍, 因此, [MG]²⁺没有产生[G[•]G]²⁺. 根据[GM]²⁺产生[GG]²⁺的机理, 我们推测了[AYM]²⁺产生[AYG]²⁺的机理. 与[GM]²⁺不同的是, [AYM]²⁺是 π 自由基离子(即自由基和电荷都在酪氨酸(Y)的苯环上), 而[GM]²⁺的自由基和电荷都在甲硫氨酸残基(M)的S原子上. 图4(a)给出了[AYM]²⁺中甲硫氨酸残基(M)的C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ 键断裂产生[AYG]²⁺的机理, 质子从甲硫氨酸残基(M)的C $_{\gamma}$ 上迁移到第二个羰基(即酪氨酸残基的羰基)O原子上, 然后从第二个羰基(即酪氨酸残基的羰基)O原子上迁移到第一个羰基(即丙氨酸残基的羰基)O原子上, 最后迁移到氨基N原子上, γ 自由基诱导甲硫氨酸残基(M)的C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ 键断裂丢失CH₃SCH=CH₂ (74 Da)产生[AYG]²⁺产物离子.

与[AYM]²⁺裂解途径不同的是, [AYW]²⁺没有通过色氨酸残基(W)的C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ 键断裂产生[AYG]²⁺ (m/z 309.01), 而是通过羧基(-COOH)上的质子迁移到第二个羰基(即酪氨酸残基的羰基)O原子上产生羧基氧自由基离子, 此自由基离子诱导色氨酸残基(W)的C $_{\alpha}$ -C键断裂产生[AYW-CO₂]²⁺ (m/z 394.11)(图4(b)), 此机理与Chu等^[10]研究的[GGW]²⁺失去一分子CO₂的机理类似. 与甲硫氨酸(M)不同的是, 当色氨酸残基(W)在N端时, W可以先发生1,4质子迁移再通过C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ 键断裂产生 α 自由基离子^[29]. Siu等^[29]研究的[WGG]²⁺通过色氨酸残基(W)的侧链丢失产生了[G[•]GG]²⁺, 以及我们由[WYA]²⁺的CID反应成功制备[G[•]YA]²⁺离子都证实了这一点(图S3(a)). 需要说明的是, [WYA]²⁺、[AYM]²⁺和[AYW]²⁺的主要碎片离子可通过将上述三肽中的丙氨酸(A)置换成甘氨酸(G)进行验证, 相应置换产物([WYG]²⁺、[GYM]²⁺和[GYW]²⁺)的验证谱图参见图S3(b)和图S4(a, b).

3.2 AYG自由基离子的气相稳定结构

图5分别给出了AYG三种自由基离子([A[•]YG]⁺、[AYG]^{•+}和[AYG]²⁺)的气相最稳定结构(上边数字代表0 K时的焓变, 下边斜体数字代表298 K时的自由能变). 与GGG^[31]和GGW^[10]系列相同的是, AYG最稳定的自由基离子是[A[•]YG]⁺, 第一个羰基(即丙氨酸残基的羰基)O上的质子与第二个羰基(即酪氨酸残基的羰基)O形成较强的氢键([CO₁-H⁺...O₂C], 氢键键长~1.459 Å).

图 5 (a) $[A^*YG]^+$, (b) $[AYG^*]^+$ 和(c) $[AYG]^{++}$ 的气相稳定结构(color scheme: C=灰色; O=红色; N=蓝色; H=白色; 上边数字: 0 K时的焓变, 斜体数字: 298 K时的自由能). 所有能量(kcal/mol)是相对于 $[A^*YG]^+$ 的相对能量, 是由B3LYP/6-31++G(d,p)计算得到(网络版彩图)

Figure 5 Optimized geometries of the lowest-energy structures of (a) $[A^*YG]^+$, (b) $[AYG^*]^+$ and (c) $[AYG]^{++}$ (color scheme: C=grey; O=red; N=blue; H=white; the upper numbers: enthalpies at 0 K, the lower italicized numbers: free energies at 298 K). All energies (in kcal/mol) are relative energy to $[A^*YG]^+$ and are calculated at the B3LYP/6-31++G(d,p) levels (color online).

因为 $[A^*YG]^+$ 的自由基左右分别是强的给电子基团($-NH_2$)和强的吸电子基团($[-C(OH)NH]^+$), 强的“推拉效应”^[31]使得 $[A^*YG]^+$ 比另外两种自由基离子($[AYG^*]^+$ 和 $[AYG]^{++}$)更稳定。

$[AYG^*]^+$ 的电荷和自由基分别在第一个羰基(即丙氨酸残基的羰基)O上和甘氨酸的 C_α 上, 第一个羰基(即丙氨酸残基的羰基)O上的质子与第二个羰基(即酪氨酸残基的羰基)O形成一个强的氢键($[CO_1-H^+\cdots O_2C]$, 氢键键长 ~ 1.470 Å), 第一个氨基(即丙氨酸残基氨基)N与酪氨酸残基N上的H形成一个较弱的氢键($[N_1\cdots H^+-N_2C]$, 氢键键长 ~ 1.956 Å), 因为 $[AYG^*]^+$ 的C端酰胺键(1.356 Å)长于 $[A^*YG]^+$ 的C端酰胺键键长(1.332 Å), $[AYG^*]^+$ 的电荷很难离域到C端氨基酸残基上, 电荷与自由基处于分离的状态, 而且没有“推拉效应”, 所以其能量比 $[A^*YG]^+$ 高 15.4 kcal/mol. $[GGG^*]^+$ 与 $[AYG^*]^+$ 类似, 电荷和自由基也分别在第一个羰基(即甘氨酸残基的羰基)O上和甘氨酸的 C_α 上, 而 $[GGW^*]^+$ 电荷和自由基分别在色氨酸的羧基O上和色氨酸的 C_α 上, 这是因为色氨酸的质子亲和势(PA, 223.9 kcal/mol)^[39]高于甘氨酸和丙氨酸(甘氨酸和丙氨酸的PA值分别是 210.5 和 214.2 kcal/mol)^[39].

酪氨酸(Y)的存在对 $[A^*YG]^+$ 和 $[AYG^*]^+$ 两种 α 自由基离子的结构和稳定性没有太大影响, 但是当电荷和自由基都位于酪氨酸残基(Y)的苯环上时, $[AYG]^{++}$ 的能量比最稳定的自由基离子 $[A^*YG]^+$ 高 24.2 kcal/mol. 与 $[GGW]^{++}$ (电荷和自由基都位于色氨酸残基(W)的吡

啉环上)相比, $[GGW]^{++}$ 的能量比 $[G^*GW]^+$ 仅高 1.5 kcal/mol^[10], 这是因为色氨酸具有的大的共轭体系-吡啉环, 其离域能力比酪氨酸的芳香环强, 所以 $[GGW]^{++}$ 比 $[AYG]^{++}$ 要稳定得多。

3.3 AYG和GYG自由基离子气相裂解行为比较

图6是 $[AYG]^{++}$ 和 $[AYG^*]^+$, $[G^*YG]^+$ 、 $[GYG]^+$ 和 $[GYG^*]^+$ (分别由 $[Cu(4Cl-tpy)(AYG)]^{2+}$ 和 $[AYM]^+$, $[WYG]^+$ 、 $[Cu(4Cl-tpy)(GYG)]^{2+}$ 和 $[GYM]^+$ 产生)的CID谱图. $[AYG]^{++}$ 的主要解离产物是 $[x_2+H]^+(m/z 265.93)$, 此外, 还有少量的 $[c_2+2H]^+(m/z 251.84)$, 它们都是自由基诱导的裂解反应产物. 其中, $[x_2+H]^+$ 是 $[AYG]^{++}$ 的N端 $C_\alpha-C$ 键直接断裂产生的碎片离子, $[c_2+2H]^+$ 是 β 自由基诱导N- C_α 键断裂产生的碎片离子, 此结果和Chu等^[33]的结果相同. 有趣的是, 我们通过 $[AYM]^+$ 的CID反应得到了 $[AYG^*]^+$ 离子, $[AYG^*]^+$ 和 $[AYG]^{++}$ 的CID谱图基本一样(图6(a, b)), 其主要解离产物都是 $[x_2+H]^+(m/z 265.93)$, 说明 $[AYG^*]^+$ 和 $[AYG]^{++}$ 在解离之前已发生了异构反应. 而 $[A^*YG]^+$ 的主要解离路径是电荷诱导的第二个酰胺键的断裂, 相应的产物离子是 $[b_2-H]^+$ ^[33], 说明 $[A^*YG]^+$ 与另外两种离子是不可能发生异构的。

$[G^*YG]^+$ 的解离路径与 $[A^*YG]^+$ 相同^[33], 都是通过电荷诱导酰胺键的断裂产生 $[b_2-H]^+$ 离子($m/z 219.92$) (图6(c)). b/y离子的形成是一个竞争过程, 自由基离子的N端碎片和C端碎片PA值的相对大小决定最终产物^[10]. $[A^*YG]^+$ 和 $[G^*YG]^+$ 的产物离子只有 $[b_2-H]^+$ 却没有 y_1 离子, 其原因是 $[A^*YG]^+$ 和 $[G^*YG]^+$ 的N端碎片的PA值分别是 227.4 和 225.2 kcal/mol, C端碎片的PA值都是 197.5 kcal/mol (表1), 即N端碎片的PA值明显大于C端碎片. $[G^*YG]^+$ 与 $[GYG]^+$ 和 $[GYG^*]^+$ 相比, 解离产物明显不同, 说明 $[G^*YG]^+$ 与它们不能异构。

与 $[AYG]^{++}$ 和 $[AYG^*]^+$ 的裂解行为不同的是, $[GYG]^{++}$ 主要通过N- C_α 键断裂和 CO_2 的进一步丢失分别产生 $[z_2-H]^+(m/z 220.90)$ 和 $[z_2-H-CO_2]^+(m/z 176.94)$ 碎片离子. 此外, 还产生少量 $[b_2-H]^+(m/z 220.01)$, $[GG^*G]^+(m/z 188.76)$ 和 $[GYG-H_2O]^+(m/z 277.11)$ 碎片离子(图6(d)). $[GYG^*]^+$ 的主要产物离子是 $b_2^+(m/z 220.89)$ 、 $[z_2-H]^+(m/z 220.89)$ (即在 $m/z 220.89$ 处的离子是 b_2^+ 和 $[z_2-H]^+$ 的混合物)和 $[GYG^*-H_2O-NH=CH_2]^+(m/z 247.93)$ 碎片离子. 此外, $[GYG^*]^+$

图 6 (a) 由 $[\text{Cu}(4\text{Cl-tpy})(\text{AYG})]^{2+}$ 产生 $[\text{AYG}]^{*+}$, (b) 由 $[\text{AYM}]^{*+}$ 产生 $[\text{AYG}]^{*+}$, (c) 由 $[\text{WYG}]^{*+}$ 产生 $[\text{G}^*\text{YG}]^+$, (d) 由 $[\text{Cu}(4\text{Cl-tpy})(\text{GYG})]^{2+}$ 产生 $[\text{GYG}]^{*+}$ 和 (e) 由 $[\text{GYM}]^{*+}$ 产生 $[\text{GYG}]^{*+}$ 的 CID 谱图 (网络版彩图)

Figure 6 CID spectra of (a) $[\text{AYG}]^{*+}$, (b) $[\text{AYG}]^{*+}$, (c) $[\text{G}^*\text{YG}]^+$, (d) $[\text{GYG}]^{*+}$ and (e) $[\text{GYG}]^{*+}$ generated from $[\text{Cu}(4\text{Cl-tpy})(\text{AYG})]^{2+}$, $[\text{AYM}]^{*+}$, $[\text{WYG}]^{*+}$, $[\text{Cu}(4\text{Cl-tpy})(\text{GYG})]^{2+}$ and $[\text{GYM}]^{*+}$, respectively (color online).

表 1 $[\text{A}^*\text{YG}]^+$ 和 $[\text{G}^*\text{YG}]^+$ 的 N 端和 C 端碎片的 PA 值比较 (所有的 PAs 是由 B3LYP/6-31++G(d,p) 计算得到)

Table 1 Proton affinities of N-terminal and C-terminal fragments from $[\text{A}^*\text{YG}]^+$ and $[\text{G}^*\text{YG}]^+$ (all PAs are calculated at the B3LYP/6-31++G(d,p) level)

中间体	碎片		PA (kcal/mol)
	不带电 (M)	$[\text{M} + \text{H}]^+$
N 端
	$[\text{b}_2 - \text{H}]^{*+}$	225.2 (R = H) 227.4 (R = CH_3)
	C 端	$[\text{y}_1 + 2\text{H}]^+$	197.5

还产生了少量 $[\text{GYG} - \text{H}_2\text{O}]^+$ (m/z 276.89), $[\text{GYG} - \text{H}_2\text{O} - \text{NH} - \text{C}^*\text{H}_2]^+$ (m/z 246.97) 和 $[\text{y}_2 - 106]^+$ (m/z 131.01). $[\text{GYG}]^{*+}$ 和 $[\text{GYG}]^{*+}$ 的解离产物不完全相同, 说明 $[\text{GYG}]^{*+}$ 和 $[\text{GYG}]^{*+}$ 可能在解离之前发生了部分异构. 因为 GYG 的结构对称, 其骨架裂解的产物离子可能具有相同的质荷比 (如 $[\text{z}_2 - \text{H}]^{*+}$ 和 b_2^+ 的 m/z 都是 221), 所以 $[\text{GYG}]^{*+}$ 、 $[\text{G}^*\text{YG}]^+$ 和 $[\text{GYG}]^{*+}$ 的主要碎片离子可分别通过 $[\text{GYA}]^{*+}$ 、 $[\text{G}^*\text{YA}]^+$ 和 m/z 220.89 处离子的四级串联质谱图证明 (图 S5(a~c)). 进一步观察 m/z 220.89 离子的 CID 反应可以看到分别失去一分子 NH_3 和一分子 CO_2 的反应 (图 S5(c)). 丢失 NH_3 的反应说明该离子是 N 端碎片离子 b_2^+ , 丢失 CO_2 则说明该离子是 C 端碎片离

子 $[z_2-H]^+$ 。所以, $[GYG]^+$ 位于 m/z 220.89处的离子是 b_2^+ 和 $[z_2-H]^+$ 的混合峰。具有不同自由基位点AYG和GYG自由基离子的主要碎片离子已在表S1(网络版补充材料)中总结。

我们通过DFT计算得到了AYG自由基离子的气相异构/解离能垒以及 $[GYG]^+$ N端 $C_\alpha-C$ 的解离能垒, 并以此为依据来解释 $[AYG]^+$ 和 $[GYG]^+$ 的不同气相裂解行为。

3.4 AYG和GYG自由基离子的理论计算

3.4.1 AYG自由基离子气相解离/异构反应机理的理论研究

图7(a)是AYG自由基离子的异构/解离反应势能图。 $[A^*YG]^+$ 到 $[AYG]^+$ 的异构需要 $[A^*YG]^+$ 的第一个羰基(即丙氨酸残基的羰基)O上的H迁移到丙氨酸残基的 C_α 上, 这个过程所需的能量为55.0 kcal/mol, $[A^*YG]^+$ 到 $[AYG]^+$ 的异构需要甘氨酸残基的 C_α 上的H迁移到丙氨酸残基的 C_α 上, 这个过程所需的能量为60.2 kcal/mol, 而 $[AYG]^+$ 到 $[AYG]^+$ 的异构需要 $[AYG]^+$ 的第一个羰基(即丙氨酸残基的羰基)O上的H迁移到甘氨酸残基的 C_α 上, 这个过程所需的能量为47.4 kcal/mol。通过比较这三个异构反应的活化能, 我们可以得出结论: $[A^*YG]^+$ 不能与另外两种自由基离子异构。此结论与我们的实验结果相符。

为了深入探讨 $[AYG]^+$ 和 $[AYG]^+$ CID谱图相同的原因, 我们又计算了 $[AYG]^+$ 和 $[AYG]^+$ 的解离能垒。 $[AYG]^+$ 产生 $[x_2+H]^+$ 产物离子涉及两个过程(图7(b)): 丙氨酸残基的 $C_\alpha-C$ 键断裂经过过渡态(TS6)产生分子离子复合物(COM 1), COM 1的自由基和电荷分别位于第一个羰基(即丙氨酸残基的羰基)C上和亚胺的N上, 亚胺N上的H与第一个羰基(即丙氨酸残基的羰基)O形成一个较强的氢键($[N_1-H^+\cdots O_1C]$, 氢键键长 ~ 1.716 Å), 此过程的能垒是34.7 kcal/mol; 然后, 苯环上的电子转移到第一个羰基(即丙氨酸残基的羰基)C上的同时, 亚胺N上的质子迁移到第一个羰基(即丙氨酸残基的羰基)C上形成分子离子复合物(COM 2), COM 2的电荷和自由基都在酪氨酸的苯环上, 酪氨酸的N上的H与亚胺的N形成一个较强的氢键($[N_2-H^+\cdots N_1C]$, 氢键键长 ~ 1.742 Å), 其进一步裂解产生 $[x_2+H]^+$ 和一分子中性的亚胺, 此过程的能垒是44.3 kcal/mol。

图7 (a) $[AYG]^+$ 、 $[A^*YG]^+$ 和 $[AYG]^+$ 的气相异构/解离机理总结图; (b) $[AYG]^+$ 的气相解离机理(上边数字: 0 K时的焓变; 斜体数字: 298 K时的自由能)。所有能量(kcal/mol)是相对于 $[A^*YG]^+$ 的相对能量。所有能量是由B3LYP/6-31++G(d,p)计算得到(网络版彩图)

Figure 7 (a) Summary of isomerization/dissociation mechanisms for $[AYG]^+$, $[A^*YG]^+$ and $[AYG]^+$; (b) dissociation mechanism of $[AYG]^+$ (the upper numbers: enthalpies at 0 K; the lower italicized numbers: free energies at 298 K). All energies (in kcal/mol) are relative energy to $[A^*YG]^+$ and are calculated at the B3LYP/6-31++G(d,p) levels (color online).

$[AYG]^+$ 可能有三种解离路径(图7(a)): (1) 丙氨酸 β 自由基(A_β^*)中间体路径; (2) 丙氨酸N自由基(A_N^*)中间体路径; (3) $[AYG]^+$ 异构成 $[AYG]^+$, 然后经历与 $[AYG]^+$ 相同的解离过程。路径(1): $[AYG]^+$ 中丙氨酸残基的 C_β 上的H经过过渡态(TS2 64.3 kcal/mol)迁移到甘氨酸残基的 C_α 上, 形成了 $[A_\beta^*YG]^+$ (35.4 kcal/mol), 其自由基和电荷分别在丙氨酸残基的 C_β 上和羰基O上, 第一个羰基(即丙氨酸残基的羰基)O上的H与

第二个羰基(即酪氨酸残基的羰基)O形成一个很强的氢键($[\text{CO}_1-\text{H}^+\cdots\text{O}_2\text{C}]$, 氢键键长 $\sim 1.344 \text{ \AA}$), 此路径的能垒为 64.3 kcal/mol ; 路径(2): $[\text{AYG}]^+$ 中丙氨酸残基的氨基N上的H经过过渡态(TS1 72.7 kcal/mol)迁移到甘氨酸残基的 C_α 上, 形成了 $[\text{A}_\text{N}\cdot\text{YG}]^+$ (43.8 kcal/mol), 其自由基和电荷分别在丙氨酸残基的氨基N上和羰基O上, 第一个羰基(即丙氨酸残基的羰基)O上的H与第二个羰基(即酪氨酸残基的羰基)O形成一个强的氢键($[\text{CO}_1-\text{H}^+\cdots\text{O}_2\text{C}]$, 氢键键长 $\sim 1.520 \text{ \AA}$), 此路径的能垒为 72.7 kcal/mol ; 路径(3): $[\text{AYG}]^+$ 异构为 $[\text{AYG}]^+$ 的过程, 能垒为 47.4 kcal/mol . 比较以上三种路径的能垒可知, $[\text{AYG}]^+$ 先异构为 $[\text{AYG}]^+$, 然后再经历 $[\text{AYG}]^+$ 解离并产生 $[\text{x}_2+\text{H}]^+$ 的过程为最低能量反应路径, 这也解释了 $[\text{AYG}]^+$ 和 $[\text{AYG}]^+$ CID谱图相同的原因所在。

3.4.2 AYG和GYG自由基离子不同气相解离行为的可能原因

很明显, $[\text{GYG}]^+$ 和 $[\text{GYG}]^+$ 的CID谱图是不完全相同的, 说明两个离子可能发生部分异构, 而 $[\text{AYG}]^+$ 是可以完全异构为 $[\text{AYG}]^+$ 进而产生 $[\text{x}_2+\text{H}]^+$ 产物离子. 因此, 本部分仅重点讨论 $[\text{GYG}]^+$ 和 $[\text{AYG}]^+$ 的气相解离反应特征. 图8分别给出了 $[\text{AYG}]^+$ 和 $[\text{GYG}]^+$ N端 $\text{C}_\alpha-\text{C}$ 键断裂过渡态. $[\text{AYG}]^+$ N端 $\text{C}_\alpha-\text{C}$ 键断裂过渡态(TS6)能量为 34.7 kcal/mol , 而 $[\text{GYG}]^+$ N端 $\text{C}_\alpha-\text{C}$ 键断裂过渡态(TS8)能量是 41.0 kcal/mol , 二者相差 6.3 kcal/mol , 因此, $[\text{AYG}]^+$ 是通过断裂N端 $\text{C}_\alpha-\text{C}$ 键产生 $[\text{x}_2+\text{H}]^+$ 碎片离子, 而 $[\text{GYG}]^+$ 不能产生 $[\text{x}_2+\text{H}]^+$.

4 结论

本文采用ESI-MS/MS方法结合DFT量化计算的方法, 得到了具有不同位点AYG自由基离子($[\text{AYG}]^+$ 、 $[\text{A}\cdot\text{YG}]^+$ 和 $[\text{AYG}]^+$)的气相稳定性及其气相异构/解离反应机理. 通过对比AYG不同位点自由基离子的CID谱图得知, $[\text{AYG}]^+$ 和 $[\text{AYG}]^+$ 的解离路径基本相同, 二者的主要裂解产物均为 $[\text{x}_2+\text{H}]^+$ 离子, 说明二者在解离之前已完全异构; $[\text{A}\cdot\text{YG}]^+$ 和 $[\text{G}\cdot\text{YG}]^+$ 的解离路径相同,

图8 $[\text{AYG}]^+$ (a)和 $[\text{GYG}]^+$ (b)中N端 $\text{C}_\alpha-\text{C}$ 键断裂的过渡态(C=灰色; O=红色; N=蓝色; H=白色; 上边数字: 0 K时的焐变; 斜体数字: 298 K 时的自由能). 所有能量(kcal/mol)是相对于 $[\text{A}\cdot\text{YG}]^+$ 的相对能量. 所有能量是由B3LYP/6-31++G(d,p)计算得到(网络版彩图)

Figure 8 The transition states of N-terminal $\text{C}_\alpha-\text{C}$ bond cleavage for $[\text{AYG}]^+$ (a) and $[\text{GYG}]^+$ (b). All energies (in kcal/mol) are relative energy to $[\text{A}\cdot\text{YG}]^+$ and are calculated at the B3LYP/6-31++G(d,p) levels (color online).

二者均断裂酰胺 $\text{C}-\text{N}$ 键, 产生 $[\text{b}_2-\text{H}]^+$ 碎片离子, 说明 $[\text{A}\cdot\text{YG}]^+$ 不能异构为 $[\text{AYG}]^+$ 和 $[\text{AYG}]^+$. 此结果得到量化计算的证实: (1) AYG三种自由基离子的异构/解离能垒分别是: $[\text{AYG}]^+ \rightarrow [\text{AYG}]^+$ 的异构能垒(47.4 kcal/mol)低于 $[\text{AYG}]^+$ 的解离能垒(72.7 kcal/mol), 但高于 $[\text{AYG}]^+$ 的解离能垒(44.3 kcal/mol). 所以, $[\text{AYG}]^+$ 的气相裂解反应要经历两个过程, 即 $[\text{AYG}]^+$ 先异构为 $[\text{AYG}]^+$, 再发生与 $[\text{AYG}]^+$ 相同的解离反应, 断裂N端 $\text{C}_\alpha-\text{C}$ 键产生 $[\text{x}_2+\text{H}]^+$ 碎片离子. (2) $[\text{A}\cdot\text{YG}]^+$ 不能异构为 $[\text{AYG}]^+$ 和 $[\text{AYG}]^+$, 因为 $[\text{A}\cdot\text{YG}]^+$ 的异构能垒($[\text{A}\cdot\text{YG}]^+ \rightarrow [\text{AYG}]^+$, 55.0 kcal/mol); $[\text{A}\cdot\text{YG}]^+ \rightarrow [\text{AYG}]^+$, 60.2 kcal/mol)要比其解离能垒($[\text{A}\cdot\text{YG}]^+ \rightarrow [\text{b}_2-\text{H}]^+$, 33.8 kcal/mol)高很多. 所以, $[\text{A}\cdot\text{YG}]^+$ 将直接发生电荷诱导的断裂第二个酰胺键(从N端氨基酸残基数起)反应而产生 $[\text{b}_2-\text{H}]^+$ 碎片离子. 通过对比AYG和GYG两个系列自由基离子的CID谱图可知, GYG与AYG自由基离子具有截然不同的气相解离特征. $[\text{GYG}]^+$ 和 $[\text{GYG}]^+$ 的气相裂解产物不完全相同, 说明 $[\text{GYG}]^+$ 和 $[\text{GYG}]^+$ 在解离前可能发生部分异构. $[\text{AYG}]^+$ 和 $[\text{GYG}]^+$ 的气相碎裂产物不同, 前者断裂N端 $\text{C}_\alpha-\text{C}$ 键产生 $[\text{x}_2+\text{H}]^+$ 碎片离子, 而后者断裂第二个 $\text{N}-\text{C}_\alpha$ (从N端氨基酸残基数起)键产生 $[\text{z}_2-\text{H}]^+$ 碎片离子.

致谢 感谢布鲁克(北京)科技有限公司的仪器支持.

补充材料

本文的补充材料见网络版<http://chemcn.scichina.com>. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

参考文献

- 1 Radi R. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 550–559
- 2 Opazo C, Huang X, Cherny RA, Moir RD, Roher AE, White AR, Cappai R, Masters CL, Tanzi RE, Inestrosa NC, Bush AI. *J Biol Chem*, 2002, 277: 40302–40308
- 3 Lai CK, Tang WK, Siu C-, Chu IK. *Chem Eur J*, 2020, 26: 331–335
- 4 Lambeth TR, Riggs DL, Talbert LE, Tang J, Coburn E, Kang AS, Noll J, Augello C, Ford BD, Julian RR. *ACS Cent Sci*, 2019, 5: 1387–1395
- 5 Stubbe JA. *Chem Commun*, 2003, 9: 2511–2513
- 6 Hawkins CL, Davies MJ. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1504: 196–219
- 7 Mu X, Song T, Siu CK, Chu IK. *Chem Rec*, 2018, 18: 20–44
- 8 Mu X, Tang WK, Dong N, Li M, Siu CK, Chu IK. *Int J Mass Spectrometry*, 2019, 435: 333–341
- 9 Mu X, Lau JKC, Lai CK, Siu KWM, Hopkinson AC, Chu IK. *Phys Chem Chem Phys*, 2017, 19: 16923–16933
- 10 Ng DCM, Song T, Siu SO, Siu CK, Laskin J, Chu IK. *J Phys Chem B*, 2010, 114: 2270–2280
- 11 Lai CK, Mu X, Hao Q, Hopkinson AC, Chu IK. *Phys Chem Chem Phys*, 2014, 16: 24235–24243
- 12 Piatkivskiy A, Lau JKC, Berden G, Oomens J, Hopkinson AC, Siu KM, Ryzhov V. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*, 2019, 25: 112–121
- 13 Biemann K, McCloskey JA. *J Am Chem Soc*, 1962, 84: 3192–3193
- 14 Weinkauff R, Schanen P, Metsala A, Schlag EW, Bürgle M, Kessler H. *J Phys Chem*, 1996, 100: 18567–18585
- 15 Zubarev RA, Horn DM, Fridriksson EK, Kelleher NL, Kruger NA, Lewis MA, Carpenter BK, McLafferty FW. *Anal Chem*, 2000, 72: 563–573
- 16 Zubarev RA. *Curr Opin Biotech*, 2004, 15: 12–16
- 17 Straus RN, Jockusch RA. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017, 28: 358–369
- 18 Syka JEP, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 9528–9533
- 19 Han H, Xia Y, McLuckey SA. *J Proteome Res*, 2007, 6: 3062–3069
- 20 Kempkes LJM, Martens J, Berden G, Oomens J. *J Phys Chem Lett*, 2018, 9: 6404–6411
- 21 Barlow CK, McFadyen WD, O'Hair RAJ. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 6109–6115
- 22 Wee S, Mortimer A, Moran D, Wright A, Barlow CK, O'Hair RAJ, Radom L, Easton CJ. *Chem Commun*, 2006, 40: 4233–4235
- 23 Hao G, Gross SS. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2006, 17: 1725–1730
- 24 Ryzhov V, Lam AKY, O'Hair RAJ. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20: 985–995
- 25 Knudsen ER, Julian RR. *Int J Mass Spectrometry*, 2010, 294: 83–87
- 26 Talbert LE, Zhang X, Hendricks N, Alizadeh A, Julian RR. *Int J Mass Spectrometry*, 2019, 441: 25–31
- 27 Hodyss R, Cox HA, Beauchamp JL. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 12436–12437
- 28 Lee J, Kim Y, Kim WY, Oh HB. *Phys Chem Chem Phys*, 2020, 22: 5057–5069
- 29 Bagheri-Majidi E, Ke Y, Orlova G, Chu IK, Hopkinson AC, Siu KWM. *J Phys Chem B*, 2004, 108: 11170–11181
- 30 Lau JKC, Lo S, Zhao J, Siu KWM, Hopkinson AC. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2013, 24: 543–553
- 31 Chu IK, Zhao J, Xu M, Siu SO, Hopkinson AC, Siu KWM. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 7862–7872
- 32 Siu C, Ke Y, Orlova G, Hopkinson A, Michaelsiu K. *J Am Soc Mass Spectrometry*, 2008, 19: 1799–1807
- 33 Mu X, Song T, Xu M, Lai CK, Siu CK, Laskin J, Chu IK. *J Phys Chem B*, 2014, 118: 4273–4281
- 34 Henke W, Kremer S, Reinen D. *Inorg Chem*, 1983, 22: 2858–2863
- 35 Chan WC, White PD. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press, 2000
- 36 Lee C, Yang W, Parr RG. *Phys Rev B*, 1988, 37: 785–789
- 37 Zhao Y, Truhlar DG. *J Chem Phys*, 2006, 125: 194101
- 38 Gonzalez C, Schlegel HB. *J Chem Phys*, 1989, 90: 2154–2161
- 39 Harrison AG. *Mass Spectrom Rev*, 1997, 16: 201–217

Formation, isomerization, and dissociation of tyrosine-containing tripeptide radical cations

Shifang Lu, Jie Cao^{*}, Heyuan Jia, Shuoqi Sun, Shilv Chen^{*}

Key Laboratory of Cluster Science (Beijing Institute of Technology), Ministry of Education, School of Chemistry and Chemical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

^{*}Corresponding authors (email: jcao@bit.edu.cn; shlchen@bit.edu.cn)

Abstract: Two series of tripeptide radical cations ($[\text{AYG}]^{\bullet+}$, $[\text{AYG}^{\bullet}]^+$; $[\text{GYG}]^{\bullet+}$, $[\text{G}^{\bullet}\text{YG}]^+$ and $[\text{GYG}^{\bullet}]^+$) were successfully prepared *via* multistage collision-induced dissociation (CID) of a ternary complex of copper-ligand-tripeptide $[\text{Cu}(\text{L})\text{Peptide}]^{2+}$ (L=4'-chloro-2,2':6',2''terpyridine (4Cl-tpy); Peptide=alanyl-tyrosyl-glycine (AYG) or glycyl-tyrosyl-glycine (GYG) tripeptide). The gas-phase isomerization and dissociation mechanism of isomeric AYG radical ions, and the different dissociation behaviors between AYG and GYG radical ions, have been obtained by observing their gas-phase dissociation reactions combined with density functional theory (DFT) calculation. Studies have revealed that: (1) $[\text{AYG}^{\bullet}]^+$ and $[\text{AYG}]^{\bullet+}$ produced almost identical CID spectra (their main product ions are $[\text{x}_2+\text{H}]^{\bullet+}$ ions), suggesting that interconversion occurs prior to dissociation. (2) The dissociation paths of $[\text{A}^{\bullet}\text{YG}]^+$ and $[\text{G}^{\bullet}\text{YG}]^+$ are the same (both of which produces $[\text{b}_2-\text{H}]^{\bullet+}$ fragment ions by cleavage of amide C–N bond, indicating that $[\text{A}^{\bullet}\text{YG}]^+$ cannot isomerize to $[\text{AYG}^{\bullet}]^+$ and $[\text{AYG}]^{\bullet+}$. DFT calculation gives the gas-phase stability order of these three peptide radical ions ($[\text{A}^{\bullet}\text{YG}]^+ > [\text{AYG}^{\bullet}]^+ > [\text{AYG}]^{\bullet+}$) and their isomerization/dissociation energy barriers. Isomerization energy barrier (47.4 kcal/mol) of $[\text{AYG}^{\bullet}]^+ \rightarrow [\text{AYG}]^{\bullet+}$ is lower than dissociation energy barrier (72.7 kcal/mol) of $[\text{AYG}^{\bullet}]^+$, but higher than that (44.3 kcal/mol) of $[\text{AYG}]^{\bullet+}$, thereby the gas-phase dissociation mechanism of $[\text{AYG}^{\bullet}]^+$ undergoes a two-step reaction: the first step is the isomerization process of $[\text{AYG}^{\bullet}]^+ \rightarrow [\text{AYG}]^{\bullet+}$, and the second step is the dissociation reaction of $[\text{AYG}]^{\bullet+} \rightarrow [\text{x}_2+\text{H}]^{\bullet+}$, which produces $[\text{x}_2+\text{H}]^{\bullet+}$ fragment ions by cleavage of N-terminal C_α –C bond in $[\text{AYG}]^{\bullet+}$. (4) The gas-phase dissociation characteristics of $[\text{GYG}]^{\bullet+}$ and $[\text{AYG}]^{\bullet+}$ are dramatically different. $[\text{GYG}]^{\bullet+}$ mainly produces $[\text{z}_2-\text{H}]^{\bullet+}$ by cleavage of the second N– C_α bond (counting from the N-terminal amino acid residue).

Keywords: electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS), density functional theory (DFT), tripeptide radical ions, gas-phase isomerization and dissociation

doi: [10.1360/SSC-2020-0080](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0080)