



# 质子化脯氨酸三肽的产物离子在电喷雾质谱中的碎裂机理

尤珠双<sup>①</sup>, 文永均<sup>②</sup>, 蒋可志<sup>①③</sup>, 潘远江<sup>①\*</sup>

① 浙江大学化学系, 杭州 310027;

② 成都凯捷医药科技发展有限公司, 成都 611330;

③ 杭州师范大学有机硅化学及材料技术重点实验室, 杭州 310012

\* 联系人, E-mail: panyuanjiang@zju.edu.cn

2011-12-16 收稿, 2012-01-31 接受

国家杰出青年科学基金(21025207)、国家自然科学基金(21025207, 20975092)和浙江省自然科学基金(Y4100020)资助

**摘要** 研究了脯氨酸三肽(甘氨酸脯氨酸甘氨酸、脯氨酸甘氨酸甘氨酸和脯氨酸脯氨酸甘氨酸)质子化离子的主要产物离子的解离机理. 量子化学计算表明,  $a_2$  离子的环状结构在能量上比其线性结构更加稳定, 三肽结构中的脯氨酸对  $b_2$  离子产生  $a_2$  离子的解离过程的反应势能分布有较大影响.  $a_2$  离子的裂解过程中发生了离子/中性复合物介导的分子内质子迁移反应, 推测质子桥连复合物为质子迁移反应的关键中间体. 此中间体对应于质谱图中  $a_2$  离子丢失一分子 CO 的碎片离子峰. 密度泛函理论模拟计算验证了  $b_2$  离子和  $a_2$  离子的裂解反应机理.

## 关键词

环状  $a_2$  离子  
离子/中性复合物  
质子桥连复合物  
分子内质子迁移  
理论计算

质谱技术已广泛应用于肽和蛋白质中氨基酸序列的分析研究中<sup>[1-4]</sup>. 软电离技术如电喷雾电离(ESI)<sup>[4-7]</sup>和基质辅助激光解吸电离(MALDI)<sup>[8,9]</sup>等经常用来获取完整的质子化肽的气相离子, 即准分子离子. 而串联质谱( $MS^n$ )技术则可以选择目标离子进行活化, 使之裂解成各种含有分子结构信息的碎片离子, 从而进一步获取化合物的结构信息. 结合量子化学计算和质谱技术, 可以很好地总结出质子化肽在质谱中的主要碎裂规律并推测碎片离子的结构<sup>[10-15]</sup>. 通常情况下, 质子化肽在低能量碰撞诱导解离(CID)条件下一般在酰胺键骨架上发生碎裂, 得到氮端的  $b$ , 碳端的  $y$  等大量富含序列信息的碎片离子. 在  $MS/MS$  中所得到的  $b_n, y_n$  离子又可进一步碎裂得到低一级的  $b_{n-1}, y_{n-1}$  离子,  $a_n$  离子, 以及内亚胺离子和其他一些碎片离子. 质子化多肽的  $MS^n$  谱图反映了产生这些碎片离子的各个途径之间相互竞争的结果. 在  $MS^n$  谱图的低质荷比范围, 通常可以观察到一类亚胺离子(通式为  $RCH=NH_2^+$ , R 为氨基酸侧链).

这些亚胺离子可以作为肽链中某些特定氨基酸的特征性离子<sup>[16]</sup>. 比如在质子化多肽的质谱图中若观察到  $m/z$  30 的离子( $CH_2=NH_2^+$ ), 则肽链中含有甘氨酸; 若观察到离子丰度较高的  $m/z$  70 的离子( $C_4H_8N^+$ )且该肽链中不含精氨酸, 则可以确定该肽链中含有脯氨酸<sup>[16,17]</sup>. 以往的研究<sup>[18-23]</sup>主要集中在肽链的初级碎裂上, 而产生最后观察到的低质荷比离子的碎裂反应却很少问津. 因此, 肽类甚至是小肽的碎裂规律研究尚有待完善.

Siu 课题组<sup>[24-26]</sup>在其研究中提出由  $a_2$  离子裂解产生亚胺离子的过程是通过一种亚胺离子/亚胺复合物为中间体进行的. 这种中间体被定义为质子桥连复合物(PBC), 是离子/中性复合物(INC)的一种特殊形式. INC<sup>[27-32]</sup>是气相单分子裂解反应中一类重要的中间体<sup>[33-39]</sup>, 由一个离子碎片和中性分子以静电力作用而非共价键结合构成. 在复合物体系中, 可以发生许多类型的反应, 诸如负氢迁移<sup>[35]</sup>、电子迁移<sup>[37]</sup>、酰基转移反应<sup>[38,39]</sup>等, 而这些反应在由共价键结合的

体系中是很难发生的. 在 PBC 中, 两部分中性分子通过一个质子连接而形成一个特殊的完整的体系. PBC 往往代表了两个 INC 互相转换的过渡态<sup>[28,39-41]</sup>. 根据文献中对 PBC 的报道(图 1), 两个 INC 之间的质子迁移取决于两部分分子的质子亲和势(PA). 当 B 的 PA 值比 A 高约  $50 \text{ kJ mol}^{-1}$  (约  $12 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) 时, INC\_A 中发生质子迁移产生 PBC 的过程是不可逆的<sup>[29]</sup>. 故我们推测当复合物体系中两部分分子的 PA 差值在合适的范围内时,  $a_2$  离子裂解的过程是其丢失 CO 后产生的 INC\_A 经过分子内质子迁移, 经由 PBC 产生了另外一个 INC\_B; 产物离子  $a_1$  来自 INC\_A 的直接分裂, 而内亚胺离子则来自 INC\_B 的裂解.

脯氨酸是组成蛋白质的 20 种常见氨基酸中唯一的亚氨基酸. 其结构中的吡咯环增强了结构的刚性约束而限制了 N-C $\alpha$ 键的旋转, 因此脯氨酸在蛋白质折叠过程中起到了非常重要的作用, 因为它是生理活性蛋白质如 HIV-1 衣壳病毒<sup>[42]</sup>形成三维结构的必须条件. 另外脯氨酸可以诱导蛋白质失活, 比如在胰淀素的关键位点插入一个脯氨酸可以严重抑制淀粉状朊的形成<sup>[43]</sup>. 脯氨酸的生物学功能引起了科学家们广泛的研究兴趣.

含脯氨酸的多肽和蛋白质的质谱研究同样引人关注, 脯氨酸的存在可能对肽链在串联质谱中的碎裂行为有着重大影响. 研究表明, 当脯氨酸处在三肽的碳端时, 产物质谱图中只观察到一种碳端酰胺键断裂形成的碎片离子; 相比之下, 当脯氨酸处在三肽的中间位置时, 可以得到  $b_2$ ,  $y_2$  两种离子互相竞争的产物离子质谱图<sup>[11]</sup>. 另外在一些蛋白质中, 脯氨酸诱导的反应过程可能是其最主要的一种解离方式<sup>[44]</sup>. 这些脯氨酸效应主要归因于脯氨酸特殊的结构和其本身具有的高气相碱度或质子亲和势<sup>[11,45]</sup>.

考虑到脯氨酸在肽链中的重要性, 本文对含脯氨酸三肽即甘氨酸脯氨酸甘氨酸(GPG), 脯氨酸甘氨酸甘氨酸(PGG)和脯氨酸脯氨酸甘氨酸(PPG)在电喷雾串联质谱中的碎裂行为进行了深入研究, 并应用密度泛函(DFT)方法的理论计算探讨了气相离子单分子碎裂可能的反应途径.

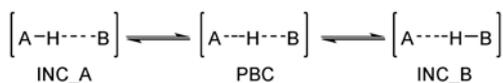


图 1 PBC 介导的一对 INC 间的互变过程

## 1 实验方法

(i) 质谱. 电喷雾电离(ESI)串联质谱实验在 Varian 500-MS 质谱仪(Palto Alto, CA)上操作, 仪器配备电喷雾电离源, 离子阱质量分析器, 数据通过 Varian MS Workstation 软件处理. 实验在正离子模式下完成. 样品溶解于含 0.1% 甲酸的甲醇溶液, 浓度约为  $1 \mu\text{g/mL}$ , 以  $6 \mu\text{L/min}$  的流速注入离子源内. 仪器参数如下, 喷雾室温度:  $50^\circ\text{C}$ ; 喷雾针电压:  $5000 \text{ V}$ ; 喷雾盾电压:  $600 \text{ V}$ ; 毛细管电压:  $75 \text{ V}$ ; 射频电压负载值:  $85\%$ ; 扫描模式: 标准; 干燥气温度:  $250^\circ\text{C}$ ; 氮气作为雾化气和干燥气, 分别设为  $15$  和  $35 \text{ psi}$  ( $1 \text{ psi} = 6.895 \times 10^5 \text{ Pa}$ ); 氦气作为碰撞气.

(ii) 理论计算. 理论计算是在 Gaussian 03<sup>[46]</sup>程序采用密度泛函(DFT)方法在 B3LYP/6-31++G(d,p) 基组上进行的. 对于结构中普遍存在相对较弱的氢键的肽类及其产物离子的计算, 以往的研究表明采用 DFT 方法结合 B3LYP/6-31++G(d,p) 基组计算能得到更准确的优化<sup>[10-12,15,24-26,47-51]</sup>. 在结构优化的过程中, 不采取对称限制. 反应物、中间体和产物经结构优化至虚频消失时, 才确认为真正的极小值; 而过渡态结构优化完毕时存在唯一一个虚频及其恰当的振动矢量. 过渡态结构还需通过反应内坐标(IRC)计算来进一步确定. 所有结构的频率计算和零点能计算与结构优化都使用相同的方法和基组. 经优化的结构(表 S1)使用 Gauss View (Version 3.09) 软件显示(红色代表氧原子, 蓝色代表氮原子). 能量(表 S2)采用相对吉布斯自由能( $\Delta G_{298}^\circ$ ), 单位为  $\text{kcal mol}^{-1}$ ; 化学键长单位为  $\text{\AA}$ . 由于不能在同一篇文献中参考到所有本文涉及的化合物的质子亲和势值(PA), 我们计算了化合物质子化前后的焓值, 用相对焓值( $\Delta H_0^\circ$ ) (表 S3)来定量比较各化合物之间的 PA 值.

## 2 结果与讨论

三肽化合物 PPG, PGG 和 GPG 在 ESI 正离子模式下均可以产生高强度信号的质子化离子. 在多级质谱实验中, 各前体离子在实验部分描述的质谱条件下经碰撞活化解离, 均得到了相应的 CID 质谱图. 在低能量碰撞活化下, 各质子化三肽离子均裂解产生了各自相关的带有序列信息的碎片离子( $b_2$ ,  $a_2$ ,  $a_1$  等离子; 图 2 和 3), 研究<sup>[52-54]</sup>表明这些序列碎裂反应主要是由电荷诱导引起的. 而三肽中若含有脯氨酸,

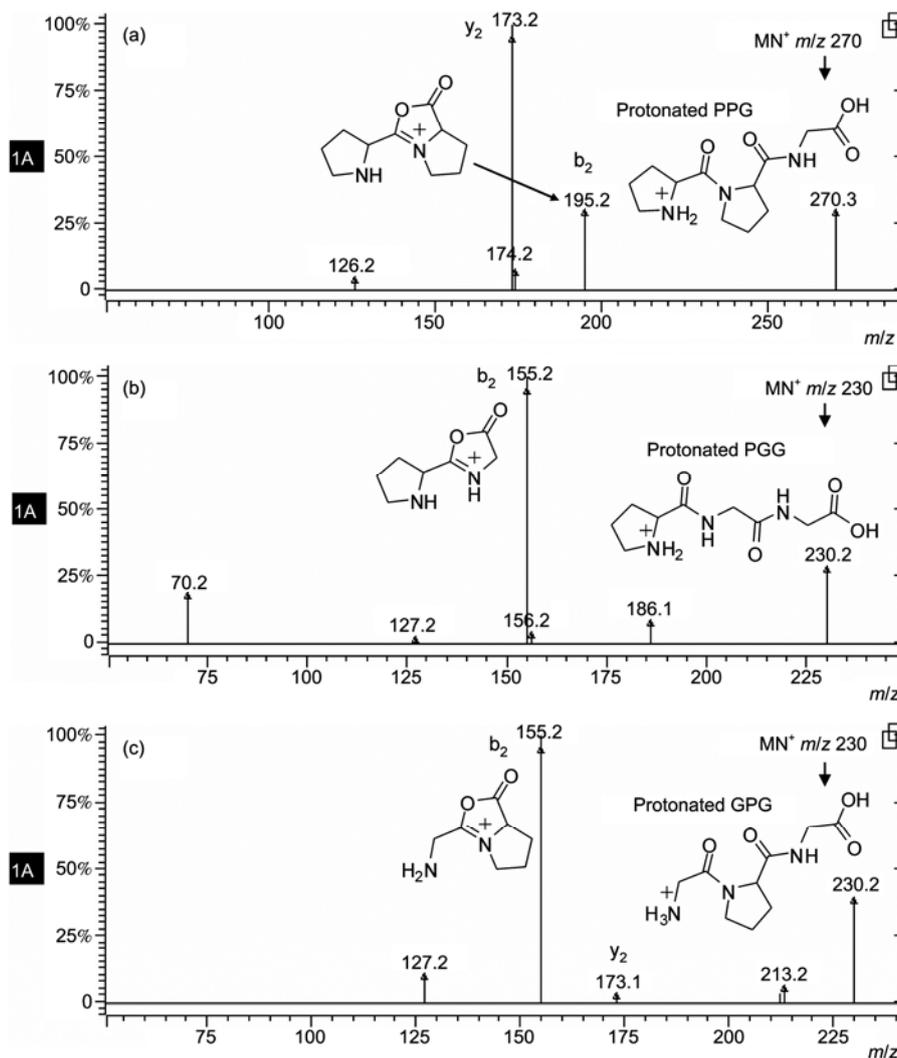


图 2 PPG (a), PGG (b), GPG (c)的质子化离子[M+H]<sup>+</sup>的CID质谱图

其脯氨酸的位置则会显著影响三肽在质谱中的裂解模式<sup>[11]</sup>. 本文主要关注碎片离子  $a_2$  的形成和进一步的碎裂反应. 采用的理论计算可以给出其中涉及的一些反应过渡态和中间体的可能存在形式, 并为所提出的机理提供理论依据.

### 2.1 $a_2$ 离子的结构

以往的研究表明序列离子中的  $b_2$  离子为恶唑酮环结构<sup>[55-57]</sup>, 且质子(正电荷)缔合在恶唑酮环的氮上. 缔合的质子可以弱化羰基氧上的 C-O 键, 当羰基两边的共价键断裂时丢失一分子 CO<sup>[51,56,57]</sup>, 生成线性结构的  $a_2$  离子<sup>[53]</sup>. 然而 Michael Siu 课题组<sup>[24-26]</sup>通过红外多光子解离(IR-MPD)实验和 DFT 理论计算证明

了线性结构的  $a_2$  离子中氮端的氨基氮可以分子内亲核进攻亚胺部分的碳原子而环化, 形成一种更稳定的环状结构, 比如三甘肽(GGG)碎裂产生环状结构的  $a_2$  离子是 N<sub>1</sub> 质子化的 4-咪唑啉酮结构. 本文中所研究的三肽均含有一个或两个脯氨酸, 为了考察这些含脯氨酸的三肽所产生的  $a_2$  离子的结构, 我们采用密度泛函理论 B3LYP/6-31++G(d,p)基组进行了模拟计算. 图 4 给出了三肽 PPG, PGG, GPG 的质子化离子生成的  $b_2$  离子裂解产生  $a_2$  离子的反应过程势能图.

从势能图中可以看到, 质子化三肽 PPG, PGG 和 GPG 的  $b_2$  离子, 其裂解反应的势能分布与前人研究的质子化三甘肽 GGG 的相似, 但能量却有所不同. 理论计算所得的结果和文献中所提出的相一致, 即

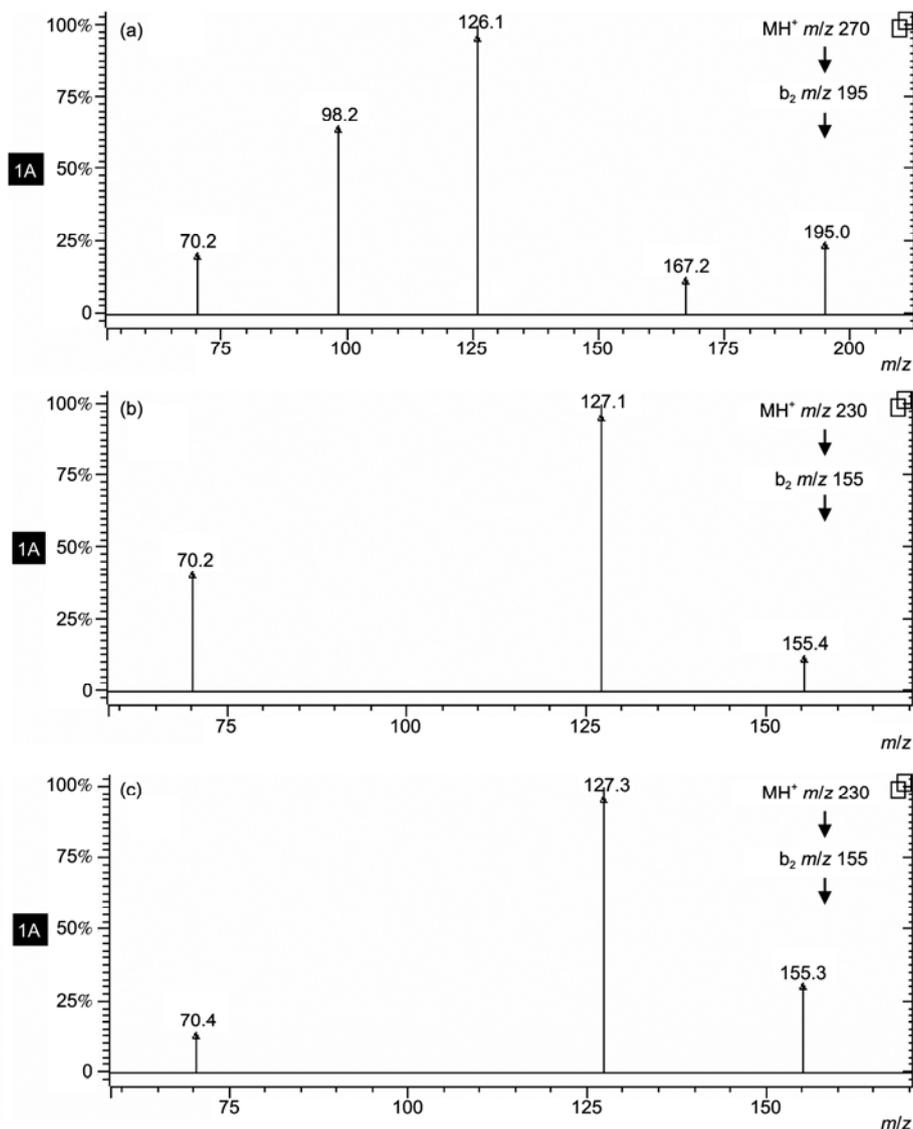


图3 PPG (a), PGG (b), GPG (c)的质子化离子裂解产生的  $b_2$  离子的 CID 质谱图

质子化三肽 PPG, PGG 和 GPG 的  $a_2$  离子的环状结构 ( $a_2''$ ) 比线性结构 ( $a_2'$ ) 在能量上更低, 分别低 9.61, 19.24 和 1.32 kcal mol<sup>-1</sup>, 而两者异构化过程的反应能垒分别仅为 4.25, 8.94 和 7.21 kcal mol<sup>-1</sup>. 这些计算结果表明此异构化过程不难进行, 且  $a_2$  离子的环状结构 ( $a_2''$ ) 均比线性结构 ( $a_2'$ ) 更稳定. 值得注意的是, 在异构化过程中, 表观正电荷中心从第二个酰胺基团的氮迁移到了第一个酰胺基团即氮端酰胺的氮上(图 5), 这是造成  $a_2$  离子两种结构的能量差异显著的主要原因.

在 PPG 和 GPG 中, 线性的  $a_2'$  离子的表观电荷中心在第二个脯氨酰的氮上, 其中吡咯环的诱导效应

给予了 H-N<sup>+</sup> 基团相当大的电荷稳定作用, 从而导致 PPG 和 GPG 的  $a_2'$  离子在能量上比 PGP 的大大降低. 相比之下, PGG 的  $a_2'$  离子在能量上相对较高的原因, 也是因其表观电荷中心所在的第二个酰胺键是甘氨酸而非脯氨酸, 甘氨酸对其上的 H-N<sup>+</sup> 基团影响很小, 且 H-N<sup>+</sup> 基团几乎没有受到氮端脯氨酸的吡咯环的影响. 这也是 PGG 的势能超曲面分布相对比 PPG 和 GPG 的高得多的原因. 表 1 比较了 3 种三肽的各离子和过渡态的相对自由能 ( $\Delta G_{298}^\circ$ ).

然而 PGG 的  $a_2''$  离子是个例外, 其能量比线性结构的  $a_2'$  离子低 19.24 kcal mol<sup>-1</sup>. 产生这种现象的原因是在线性结构的  $a_2'$  离子环化形成环状结构的  $a_2''$

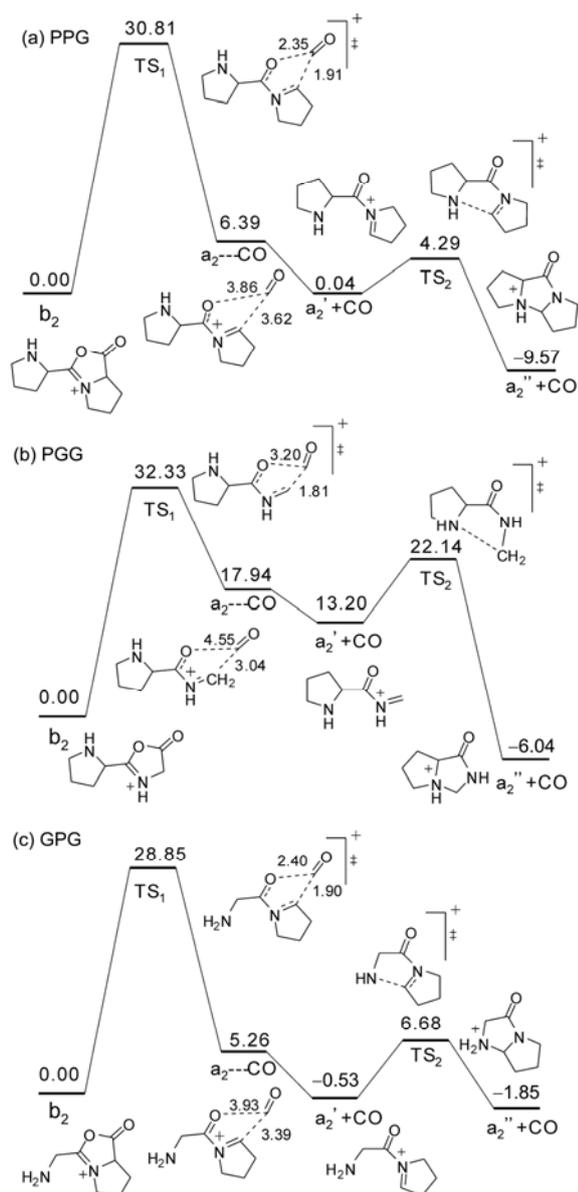


图4 三肽 PPG (a), PGG (b), GPG (c)的质子化离子生成的  $b_2$  离子裂解产生  $a_2$  离子的反应过程势能图

离子的过程中, 表现电荷中心从第二个甘酰胺基团的氮迁移到了氮端脯酰胺基团的氮上, 致使表现电荷中心处在了吡咯环上, 受到了吡咯环带来的电荷稳定作用, 从而导致 PGG 的  $a_2''$  离子能量大大降低. PPG 的  $a_2''$  离子也因表现电荷中心的转移而与  $a_2'$  离子在能量上有较大的差异( $9.61 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), 但比 PGG 中的差异小. GPG 中,  $a_2''$  离子只比  $a_2'$  离子低  $1.32 \text{ kcal mol}^{-1}$ , 原因是表现正电荷转移到了氮端的甘氨酸的氮上, 失去了原来的来自吡咯环的电荷稳

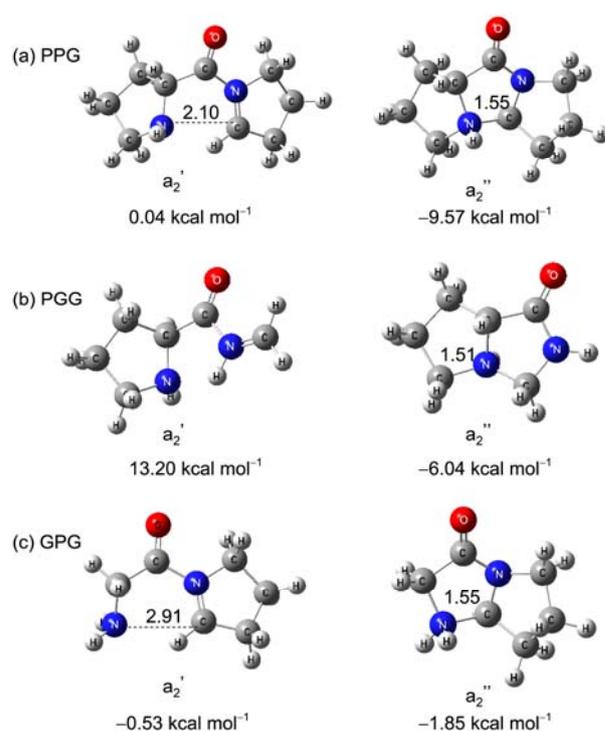


图5 质子化 PPG (a), PGG (b)和 GPG (c)的  $a_2$  离子两种形式离子( $a_2'$ , 线性结构;  $a_2''$ , 环状结构)的优化结构

定作用. 由此可以看出, 肽链中的脯氨酸对反应的势能曲线有一定的影响, 且影响力比丙氨酸<sup>[25]</sup>更大.

## 2.2 $a_2$ 离子的裂解

图 6 给出了三肽化合物 PPG, PGG 和 GPG 的  $a_2$  离子的 CID 质谱图. 总的来说, 所有的  $a_2$  离子在碰撞诱导解离质谱实验中均表现出相似的裂解规律, 产生了丰度较高的质荷比为  $m/z$  70 的碎片离子. 另外

表 1 质子化 GPG, PGG, PPG 和 *N*-苄基 GPG 产生的产物离子和过渡态的相对吉布斯自由能( $\Delta G_{298}^\circ$ ,  $\text{kcal mol}^{-1}$ )

	PPG	PGG	GPG	<i>N</i> -苄基 GPG
$b_2$	0.00	0.00	0.00	-
$TS_1$	30.81	32.33	28.85	-
$a_2'+CO$	0.04	13.20	-0.53	9.41
$TS_2+CO$	4.29	22.14	6.68	14.00
$a_2''+CO$	-9.57	-6.04	-1.85	0.00
$TS_3+CO$	17.05	28.52	25.67	28.48
INC_A+2CO	-20.61	-8.61	-	-4.16
PBC_TS+2CO	-21.74	-	-	-4.73
INC_B+2CO	-20.61	-	-9.64	-4.91

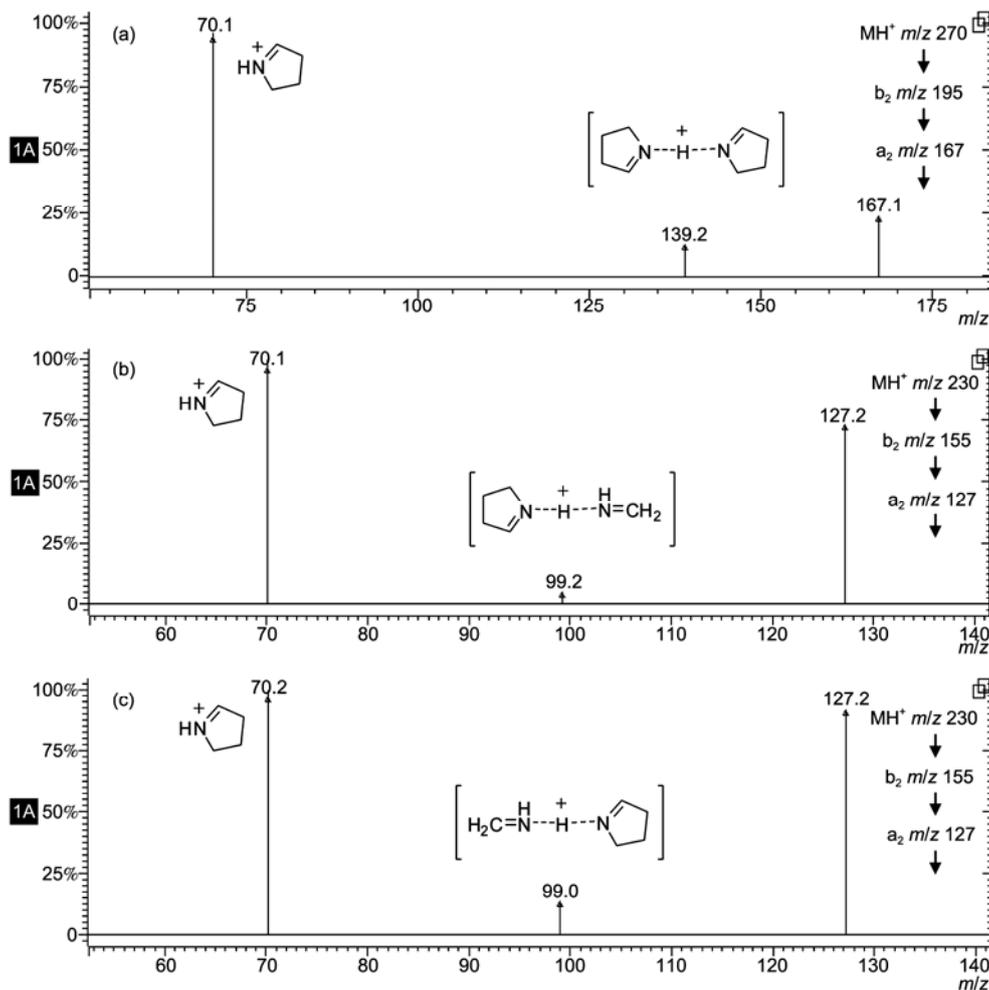


图6 质子化 PPG (a), PGG (b) 和 GPG (c)的  $a_2$  离子的 CID 质谱图

的离子丰度相对比较小的产物离子( $m/z$  99 和  $m/z$  139)由前体离子  $a_2$  丢失一分子 CO 得到, 推测为气相单分子裂解反应中一类重要的但却在产物离子质谱图中很少见的离子/中性复合物(INC)中间体.

$a_2$  离子碎裂产生  $a_1$  离子和内亚胺离子  $RCH=NH_2^+$  的反应就是通过上述的 INC 中间体介导的. 然而迄今为止, 对于这些 INC 裂解产生内亚胺离子  $RCH=NH_2^+$  的碰撞诱导解离过程的机理解释尚不明确. 我们推测在 INC 中, 发生了在离子部分和中性分子部分之间的质子迁移, 导致了质子桥连复合物中间体(PBC)的产生, 随后复合物异构化为另一个 INC. 这种假设的前提是上述所提及的中间体在低能量碰撞活化条件下存在足够长的时间允许复合物中两碎片之间发生一系列质子迁移反应, 而我们在质谱图中观察到了该复合物中间体的离子峰则证实这一假设.

碎片离子  $a_1$  和内亚胺离子  $RCH=NH_2^+$  则为这两个 INC 分别直接分裂的产物. 图 7 给出了所推测的  $a_2$  离子的裂解反应机理. 为了更准确地考察反应过程中的能量变化, 我们采用密度泛函理论 B3LYP/6-31++G(d,p) 基组进行了模拟计算, 并给出了符合实验结果的反应势能图(图 8).

在 PPG(图 8(a))中,  $a_2''$  离子经碰撞活化, 其中间环 C-N 键断裂开环形成  $a_2'$  离子, 随后羰基两边的 C-C 键和 C-N 键键长增大, 过渡态  $TS_3$  结构显示了即将断裂的 C-C 键(2.12 Å)和 C-N 键(2.13 Å), 表明  $a_2'$  离子即将丢失 CO. 这一步是解离的关键性步骤, 过渡态  $TS_3$  在能量上仅比  $a_2''$  离子高 26.62 kcal mol<sup>-1</sup>.  $TS_3$  经反应内坐标(IRC)计算后的产物在能量上比  $a_2'$  离子低 15.38 kcal mol<sup>-1</sup>, 而其中的两个吡咯环旋转扭曲最终以氢键形式互相连接. 另外 CO 与其他部分的

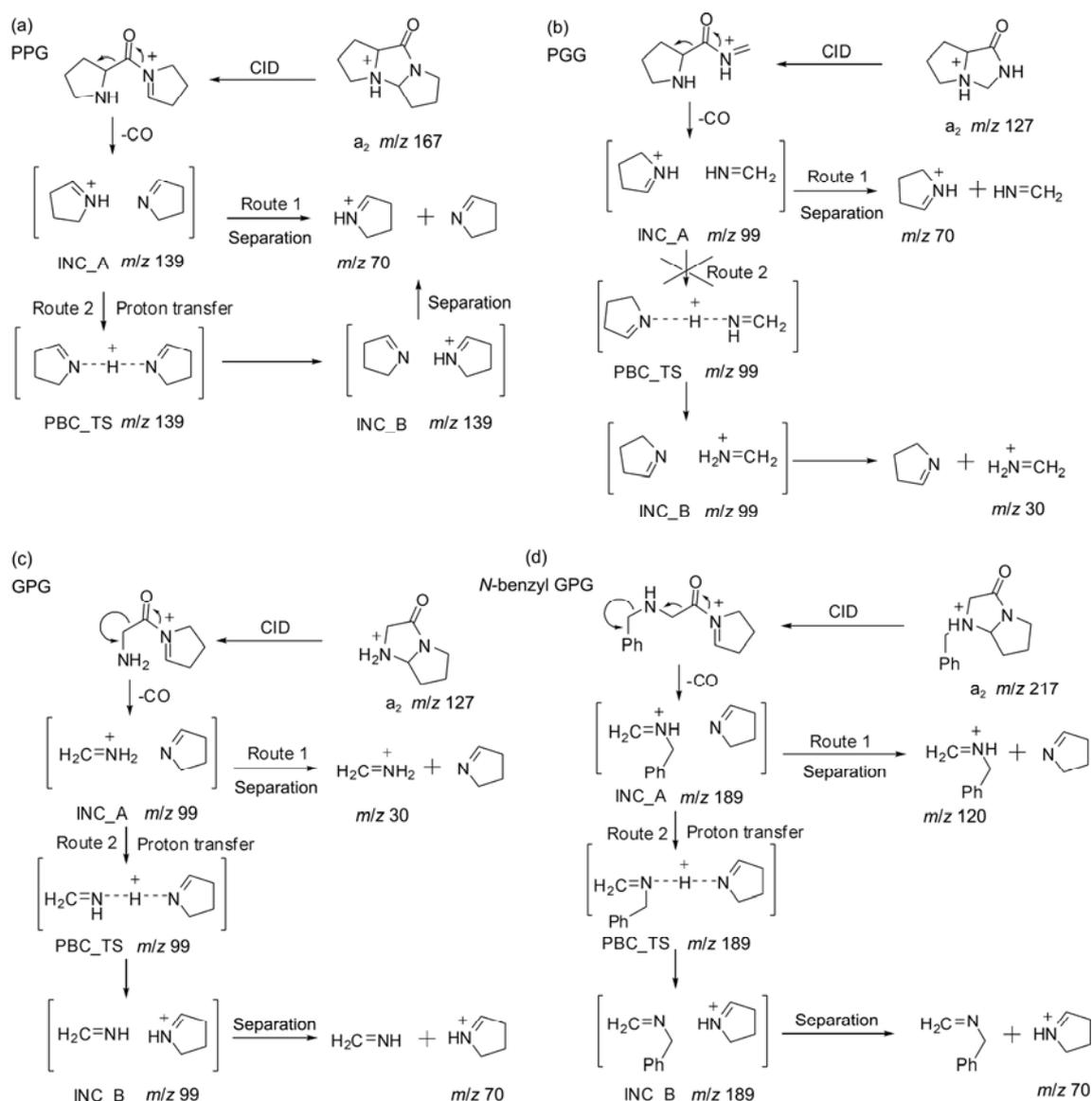


图 7 质子化的 PPG (a), PGG (b), GPG (c) 和 *N*-苄基 GPG (d) 的  $a_2$  离子的裂解机理

作用力非常弱, 很容易离去而放出  $5.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  的热量. 两个吡咯环形成的离子/中性复合物 INC\_A 中, 表观电荷中心在第一个脯氨酸的氮上, 键长为  $1.58 \text{ \AA}$  的  $\text{H}-\text{N}_2$  氢键连接了离子和中性分子部分. INC\_A 直接分裂形成了产物离子  $a_1$ . INC\_A 中氮端脯氨酸的吡咯氮上的氢经由 PBC\_TS 发生质子转移至第二个脯氨酸的吡咯氮上, 形成 INC\_B. 这一质子转移过程经 IRC 计算验证. 在 PPG 的反应势能分布图中我们发现 PBC\_TS 的经零点能校正的能量比 INC\_A 和 INC\_B 均仅低  $1.13 \text{ kcal mol}^{-1}$ . 这一现象表明质子在其中的迁移能垒不高, 两个 INC 之间的转换也比较容易进

行. 从图 9(a)~(c) 中列出的中间体的三维结构图中可以看到, PBC\_TS 中两中性分子之间的  $\text{N}_1-\text{H}-\text{N}_2$  的两个氢键键长都是  $1.29 \text{ \AA}$ , 说明 PBC\_TS 在结构上是对称的, 这是因为两中性部分分别来自 PPG 的第一个和第二个脯氨酸, 它们均为吡咯分子. 同样地, 两个 INC 具有相同的结构和能量. INC\_B 解离得到的环状内亚胺离子和 INC\_A 解离得到的  $a_1$  离子不能在质谱图中进行区别, 两者的质荷比均为  $m/z 70$ .

那么当三肽中第一个和第二个氨酰不同时  $a_1$  离子和内亚胺离子才能区分, 且能观察到  $a_2$  裂解过程中这种分子内质子迁移反应. 然而在 PGG 中, 并没

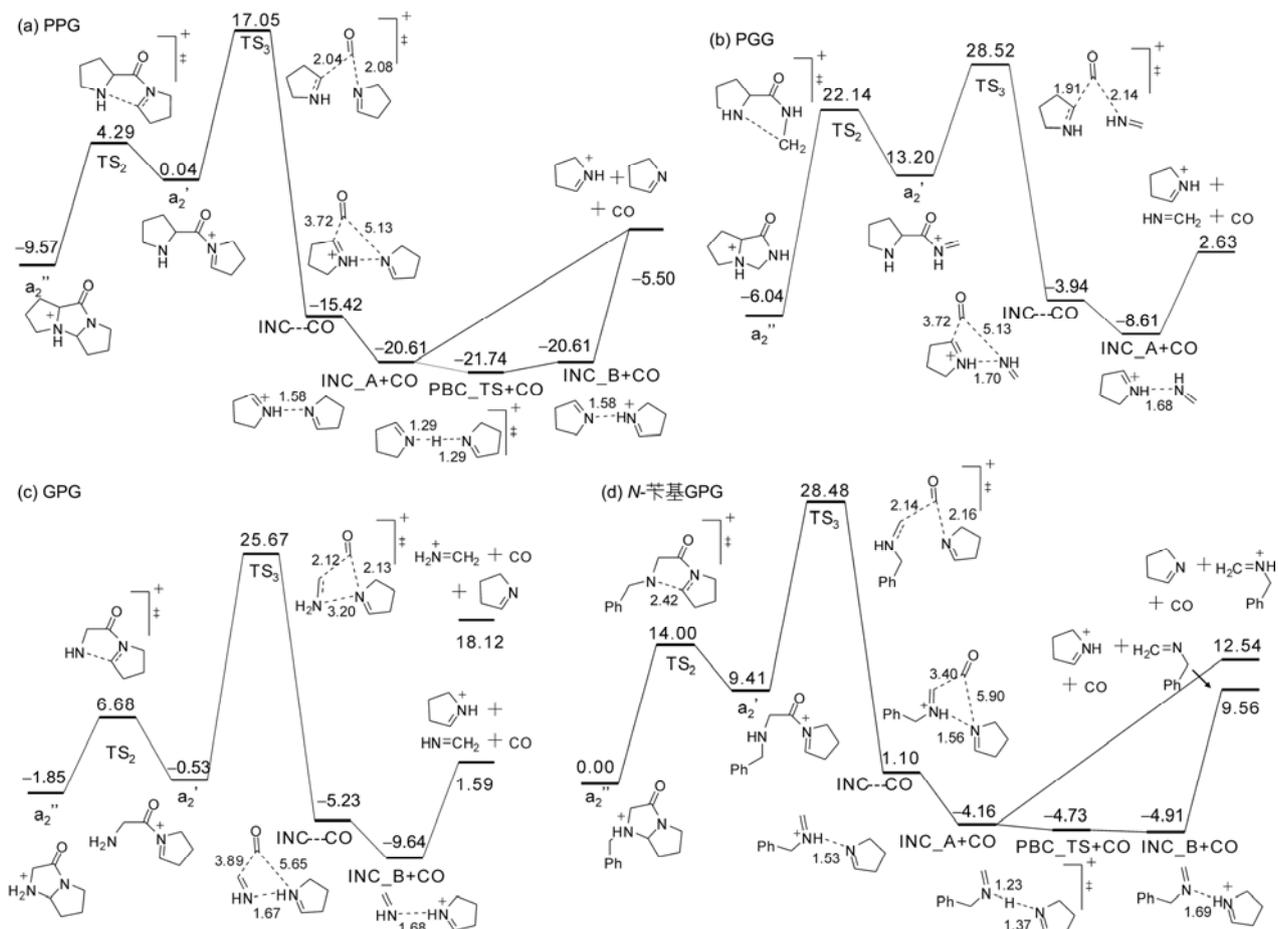


图8 质子化的PPG (a), PGG (b), GPG (c) 和 *N*-苄基 GPG (d) 的  $a_2$  离子裂解过程的反应势能图

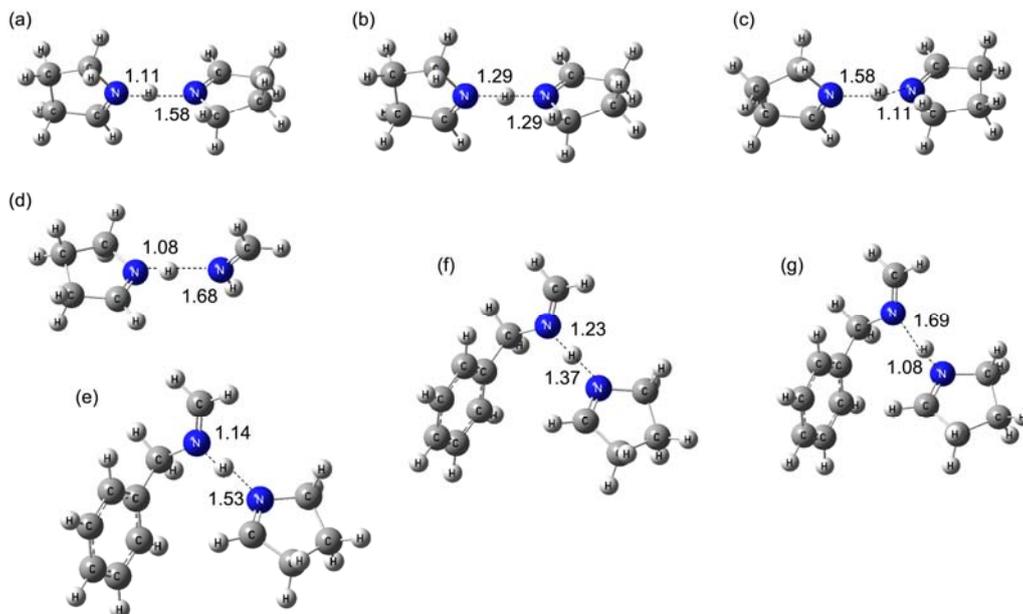


图9 PPG 中的 INC\_A (a), PBC\_TS (b) 和 INC\_B (c); PPG 中的 INC\_A 或 GPG 中的 INC\_B (d); *N*-苄基 GPG 中的 INC\_A (e), PBC\_TS (f) 和 INC\_B (g) 的优化结构

有发生分子内质子迁移反应,  $a_2$  裂解只得到一个产物离子  $a_1$ . PGG 的  $a_2'$  离子中质子在第一个脯氨酰的氮上, 故得到的 INC\_A 中质子首先在第一个脯氨酰的吡咯氮上. INC\_A 中桥连吡咯离子和中性亚甲基氨分子( $\text{CH}_2=\text{NH}$ )的氢键键长为 1.68 Å(图 9(d)). 接下来形成 INC\_B 的质子迁移是一个比较困难的过程, 这是因为 PGG 中第一个脯氨酰的吡咯分子的质子亲和势(PA)比第二个甘氨酰的亚甲基氨分子的 PA 大 16.65 kcal mol<sup>-1</sup>(依据表 S3 所列的相对焐值 $\Delta H_0^\circ$ ). 故 PGG 中没有质荷比为  $m/z$  30 的亚胺离子峰(图 7(b)).

而在 GPG 中, 第二个脯氨酰的吡咯分子的 PA 比第一个甘氨酰的亚甲基氨分子的 PA 大, 理论上应该可以观察到分子内质子迁移现象(图 7(c)), 表现在质谱图上应该有两个不同的产物离子, 分别为  $m/z$  30 和  $m/z$  70. 然而理论计算结果中(图 8(c)), 经 IRC 计算的 TS<sub>3</sub> 的产物只得到一个 INC 的优化结构, 即质子更倾向于缔合在第二个脯氨酰的吡咯氮上, 而不是原本的第一个甘氨酰的亚胺氮上. 另外, GPG 的产物质谱图中没有  $m/z$  30 的碎片离子峰, 因为这个质荷比范围超出了所用仪器的质荷比下限. 为了解决这个问题的限制, 我们合成了 GPG 的衍生物, *N*-苄基 GPG 来验证 GPG 中应该存在的分子内质子迁移反应. 图 7(d)给出了质子化 *N*-苄基 GPG 的  $a_2$  离子的裂解机理, 同时图 8(d)给出了采用密度泛函理论 B3LYP/6-31++G(d,p) 基组进行的模拟计算得到的反应势能分布图来支持这一推测的机理. 理论计算结果显示了 INC\_A, PBC\_TS 和 INC\_B 在分子理论模拟中存在的合理性. *N*-苄基 GPG 的 PBC\_TS 在能量上比 INC\_A 稍低, 却比 INC\_B 稍高, 反应在经零点能 ZPEs 校正的能量上分别为 0.57 和 0.18 kcal mol<sup>-1</sup>, 这说明 INC\_A 和 INC\_B 之间的转换非常快.

根据以上 *N*-苄基 GPG 体系的理论计算结果, 可以推测在之前的 GPG 体系中其 INC\_A 的相对能量上可能比 PBC\_TS 和 INC\_B 高很多, 因此在分子内质子迁移过程中 INC\_A 相对不稳定, 可迅速经由 PBC\_TS 转变为 INC\_B 而几乎很少直接分裂产生  $a_1$  离子, 故而计算的产物离子只有 INC\_B 一种形式. 这种碎裂途径和 Paizs 课题组<sup>[58,59]</sup>提出的  $a_1$ - $y_x$  途径比较相似, 即在质子化肽中其氮端第一个酰胺键的断裂解离遵循  $a_1$ - $y_x$  规律, 这个  $a_1$ - $y_x$  规律也和 Harrison 等人<sup>[60]</sup>的研究结果相一致. 在  $a_1$ - $y_x$  途径中,  $a_1$  离子和  $y_x$  离子的丰度比取决于这两个单元分子的相对质子亲和势, 且它们之间的关系可以用一个线性方程式<sup>[58,59]</sup>来估算:

$$\ln\left(\frac{a_1}{y_x}\right) \approx \left(\frac{\text{PA}_{\text{N-term}} - \text{PA}_{\text{C-term}}}{RT_{\text{eff}}}\right), \quad (1)$$

说明在生成  $a_1$  和  $y_x$  离子的反应过程中存在着质子竞争反应. 而在 PPG, GPG 和 *N*-苄基 GPG 体系中, 两个 INC 之间也许也存在着这样的质子竞争迁移, 复合物中的两部分分子的相对质子亲和势影响了产物离子  $a_1$  和内亚胺离子的离子丰度. 甘氨酸中亚胺的 PA 比脯氨酸中亚胺的 PA 小很多, 故也可以推测 GPG 中  $m/z$  30 的  $a_1$  离子在丰度上可能比  $m/z$  70 的亚胺离子小很多.

对于 *N*-苄基 GPG 体系, 我们也得到了相关的重要实验数据来证明反应过程中中间体的存在. 如果反应中间体能在 *N*-苄基 GPG 的  $a_2$  离子碰撞活化解离过程中产生并存在, 那么它的质荷比应该为  $m/z$  189. 所幸的是, 我们在  $a_2$  离子的产物质谱(图 10)中观察到了一个明显的  $m/z$  189 的碎片离子峰. 另外两个质荷比不同的碎片离子即  $a_1$  离子( $m/z$  120)和内亚胺离子

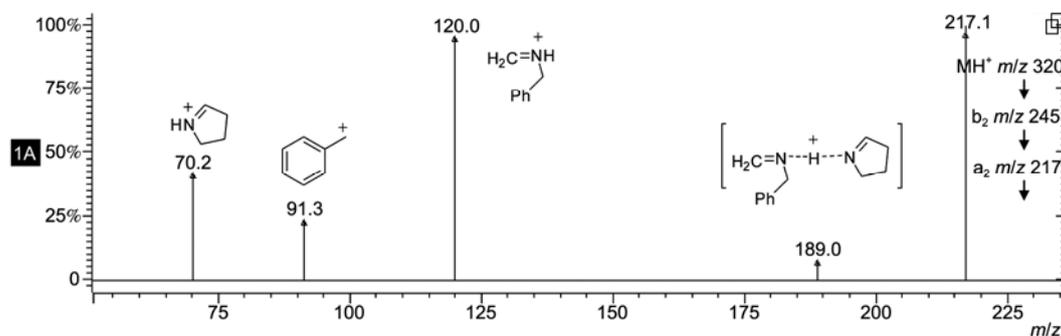


图 10 质子化的 *N*-苄基 GPG 的  $a_2$  离子的 CID 质谱图

( $m/z$  70)(图 10)的产生也证明了 *N*-苄基 GPG 的  $a_2$  离子的裂解过程存在着离子/中性复合物介导的分子内质子迁移反应. 然而在质谱图中我们发现, PA 值相对低  $2.84 \text{ kcal mol}^{-1}$  的  $a_1$  离子( $m/z$  120), 其离子丰度却比内亚胺离子( $m/z$  70)高, 这与之前我们所推测的及文献研究结果(式(1))不符. 产生这一现象的原因是, 部分  $m/z$  120 的  $a_1$  离子来自前体离子  $a_2$  离子中 OC-C 键的直接断裂, 并未经过中间体反应. *N*-苄基 GPG 的  $a_2$  离子的裂解反应研究可以证明质子化三肽的  $a_2$  离子的裂解过程中确实存在着离子/中性复合物介导的分子内质子迁移反应, 而质子桥连复合物为质子迁移的关键中间体, 表现在质谱图中为  $a_2$  离子丢失一分子 CO 的碎片离子峰. 这种裂解机理也可以用来解释其他质子化三肽或者小肽在电喷雾质谱中表现的相应的裂解行为.

### 3 结论

本文研究了质子化脯氨酸三肽(甘氨酸脯氨酸甘氨酸、脯氨酸甘氨酸甘氨酸和脯氨酸脯氨酸甘氨酸)

的主要产物离子在电喷雾质谱中的解离机理, 讨论了  $a_2$  离子的形成和裂解过程. 密度泛函理论计算表明  $a_2$  离子的环状结构在能量上比其线性结构更加稳定, 这与近年文献结果相一致. 三肽结构中的脯氨酸对  $b_2$  离子产生  $a_2$  离子的解离反应过程的反应势能分布有较大影响, 脯氨酸可以大大稳定离子结构使之能量降低. 在 GPG 和 PPG 的  $a_2$  离子的裂解过程中产生了  $a_1$  离子和内亚胺离子两种产物离子, 相比之下, PPG 的  $a_2$  离子只得到  $a_1$  离子. 其机理推测是 GPG 和 PPG 的  $a_2$  离子经碰撞活化丢失一分子 CO 后形成的离子中性复合物 INC\_A, 一方面可以直接分裂生成  $a_1$  离子, 另一方面也可以经由质子桥连复合物介导的分子内质子迁移形成 INC\_B, INC\_B 再裂解产生内亚胺离子  $\text{RCH}=\text{NH}_2^+$ , 而 PPG 中则不发生质子迁移因而没有内亚胺产物离子. 此复合物内的质子迁移反应取决于三肽氮端和中间的氨基酸中亚胺部分的质子亲和势.

### 参考文献

- 1 Aebersold R, Goodlett D R. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev*, 2001, 101: 269–295
- 2 Mann M, Hendrickson R C, Pandey A. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003, 422: 6928–6937
- 3 Savitski M M, Kjeldsen F, Nielsen M L, et al. Backbone carbonyl group basicities are related to gas-phase fragmentation of peptides and protein folding. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 1481–1484
- 4 Mueller M Q, Dreiocker F, Ihling C H, et al. Fragmentation behavior of a thiourea-based reagent for protein structure analysis by collision-induced dissociative chemical cross-linking. *J Mass Spectrom*, 2010, 45: 880–891
- 5 Fenn J B, Mann M, Meng C K, et al. Electrospray ionization for mass-spectrometry. *Science*, 1989, 246: 64–71
- 6 He W, Zheng O, Yu X. Fragmentation during nanoelectrospray ionization. *Anal Chem*, 2010, 82: 6534–6541
- 7 Chen S Y. Cloning and characterization of fragments related to proline synthesis and their effect on host cells. *Chin Sci Bull*, 1988, 33: 878
- 8 Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, 1988, 60: 2299–2301
- 9 Chiappetta G, NDiaye S, Demey E, et al. Dansyl-peptides matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric (MALDI-MS) and tandem mass spectrometric (MS/MS) features improve the liquid chromatography/MALDI-MS/MS analysis of the proteome. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24: 3021–3032
- 10 Rodriguez C F, Cunje A, Shoeib T, et al. Proton migration and tautomerism in protonated triglycine. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 3006–3012
- 11 Grewal R N, El Aribi H, Harrison A G, et al. Fragmentation of protonated tripeptides: The proline effect revisited. *J Phys Chem B*, 2004, 108: 4899–4908
- 12 Bythell B J, Csonka I P, Suhai S, et al. Gas-phase structure and fragmentation pathways of singly protonated peptides with *N*-terminal arginine. *J Phys Chem B*, 2010, 114: 15092–15105
- 13 Simon E S, Papoulias P G, Andrews P C. Gas-phase fragmentation characteristics of benzyl-aminated lysyl-containing tryptic peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2010, 21: 1624–1632
- 14 Sun F, Liu R, Zong W, et al. Unique approach to the mobile proton model: Influence of charge distribution on peptide fragmentation. *J Phys Chem B*, 2010, 114: 6350–6353

- 15 Bythell B J, Suhai S, Somogyi A, et al. Proton-driven amide bond-cleavage pathways of gas-phase peptide ions lacking mobile protons. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 14057–14065
- 16 Falick A M, Hines W M, Medzihradszky K F, et al. Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1993, 4: 882–893
- 17 Papayannopoulos I A. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrom Rev*, 1995, 14: 49–73
- 18 Biemann K, Martin S. Mass spectrometric determination of the amino acid sequence of peptides and proteins. *Mass Spectrom Rev*, 1987, 6: 1–76
- 19 O'Hair R A J. The role of nucleophile-electrophile interactions in the unimolecular and bimolecular gas-phase ion chemistry of peptides and related systems. *J Mass Spectrom*, 2000, 35: 1377–1381
- 20 Schlosser A, Lehmann W D. Five-membered ring formation in unimolecular reactions of peptides—A key structural element controlling low-energy collision-induced dissociation of peptides. *J Mass Spectrom*, 2000, 35: 1382–1390
- 21 Polce M J, Ren D, Wesdemiotis C. Dissociation of the peptide bond in protonated peptides. *J Mass Spectrom*, 2000, 35: 1391–1398
- 22 Wysocki V H, Tsaprailis G, Smith L L, et al. Mobile and localized protons a framework for understanding peptide dissociation. *J Mass Spectrom*, 2000, 35: 1399–1406
- 23 Paizs B, Suhai S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom Rev*, 2005, 24: 508–548
- 24 El Aribi H, Rodriguez C F, Almeida D R P, et al. Elucidation of fragmentation mechanisms of protonated peptide ions and their products: A case study on glycylglycylglycine using density functional theory and threshold collision-induced dissociation. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 9229–9236
- 25 El Aribi H, Orlova G, Rodriguez C F, et al. Fragmentation mechanisms of product ions from protonated tripeptides. *J Phys Chem B*, 2004, 108: 18743–18749
- 26 Verkerk U H, Siu C K, Steill J D, et al.  $a_2$  ion derived from triglycine: An  $N_1$ -protonated 4-imidazolidinone. *J Phys Chem Lett*, 2010, 1: 868–872
- 27 Morton T H. Gas phase analogues of solvolysis reactions. *Tetrahedron*, 1982, 38: 3195–3243
- 28 McAdoo D. Ion-neutral complexes in unimolecular decompositions. *J Mass Spectrom Rev*, 1988, 7: 363–393
- 29 Bowen R D. Ion-neutral complexes. *Acc Chem Res*, 1991, 24: 364–371
- 30 Morton T H. The reorientation criterion and positive ion-neutral complexes. *Org Mass Spectrom*, 1992, 27: 353–368
- 31 Longevialle P. Ion-neutral complexes in the unimolecular reactivity of organic cations in the gas phase. *Mass Spectrom Rev*, 1992, 11: 157–192
- 32 McAdoo D J, Morton T H. Gas-phase analogues of cage effects. *Acc Chem Res*, 1993, 26: 295–302
- 33 Liu P, Hu N, Pan Y, et al. Ion-neutral complexes resulting from dissociative protonation: Fragmentation of  $\alpha$ -furanylmethyl benzyl ethers and 4-*N,N*-dimethylbenzyl benzyl ethers. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2010, 21: 626–634
- 34 Tu Y P, He L, Fitch W, et al. Solvation in electrospray mass spectrometry: Effects on the reaction kinetics of fragmentation mediated by ion-neutral complexes. *J Org Chem*, 2005, 70: 5111–5118
- 35 Chai Y, Jiang K, Pan Y. Hydride transfer reactions via ion-neutral complex: Fragmentation of protonated *N*-benzylpiperidines and protonated *N*-benzylpiperazines in mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2010, 45: 496–503
- 36 Guo C, Wan J, Hu N, et al. An experimental and computational investigation on the fragmentation behavior of enamines in electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2010, 45: 1291–1298
- 37 Hu N, Tu Y P, Jiang K, et al. Intramolecular charge transfer in the gas phase: Fragmentation of protonated sulfonamides in mass spectrometry. *J Org Chem*, 2010, 75: 4244–4250
- 38 Tu Y P, Huang Y, Atsriku C, et al. Intramolecular transacylation: Fragmentation of protonated molecules via ion-neutral complexes in mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23: 1970–1976
- 39 Crestoni M E, Fornarini S, Lentini M, et al. Hydride-transfer reactions in the gas phase. 2. Anchimeric assistance in the H-transfer from 1,1-dimethylcyclopentane to alkyl cations. *J Phys Chem*, 1996, 100: 8285–8294
- 40 Harrison A G. Hydrogen interchange prior to the fragmentation of protonated molecules. *Org Mass Spectrom*, 1987, 22: 637–641
- 41 Tu Y P. Fragmentation of conjugated amides at the C–C(O) bond in electrospray mass spectrometry: A proton-bound dimeric intermediate identified by the kinetic method. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18: 1345–1351
- 42 Gitti R K, Lee B M, Walker J, et al. Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science*, 1996, 273: 231–235
- 43 Moriarty D F, Raleigh D P. Effects of sequential proline substitutions on amyloid formation by human amylin<sub>20–29</sub>. *Biochemistry*, 1999, 38: 1811–1818

- 44 Loo J A, Edmonds C G, Smith R D. Tandem mass spectrometry of very large molecules. 2. Dissociation of multiply charged proline-containing proteins from electrospray ionization. *Anal Chem*, 1993, 65: 425–438
- 45 Harrison A G. The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides. *Mass Spectrom Rev*, 1997, 16: 201–217
- 46 Frisch M J, Trucks G W, Schlegel H B, et al. Gaussian 03, Revision B.01. Pittsburgh PA: Gaussian Inc., 2003
- 47 Dunbar R C, Hopkinson A C, Oomens J, et al. Conformation switching in gas-phase complexes of histidine with alkaline earth ions. *J Phys Chem B*, 2009, 113: 10403–10408
- 48 Siu C K, Guo Y, Saminathan I S, et al. Optimization of parameters used in algorithms of ion-mobility calculation for conformational analyses. *J Phys Chem B*, 2010, 114: 1204–1212
- 49 Ke Y, Zhao J, Verkerk U H, et al. Histidine, lysine, and arginine radical cations: Isomer control via the choice of auxiliary ligand (L) in the dissociation of  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L})(\text{amino acid})]^{2+}$  complexes. *J Phys Chem B*, 2007, 111: 14318–14328
- 50 Siu C K, Ke Y, Orlova G, et al. Dissociation of the N–C $_{\alpha}$  bond and competitive formation of the  $[\text{zn-H}]^{+}$  and  $[\text{cn}+2\text{H}]^{+}$  product ions in radical peptide ions containing tyrosine and tryptophan: The influence of proton affinities on product formation. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008, 19: 1799–1807
- 51 Paizs B, Szlavik Z, Lendvay G, et al. Formation of  $\text{a}_2^{+}$  ions of protonated peptides: An *ab initio* study. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 14: 746–755
- 52 Johnson R S, Martin S A, Bienmann K. Collision induced fragmentation of  $\text{MH}^{+}$  ions of peptides. Side chain specific fragmentation ions. *Int J Mass Spectrom*, 1988, 86: 137–154
- 53 McCormack A L, Somogyi A, Dongre A R, et al. Fragmentation of protonated peptides: Surface-induced dissociation in conjunction with a quantum mechanical approach. *Anal Chem*, 1993, 65: 2859–2872
- 54 Cox K A, Gaskell S J, Morris M, et al. Role of the site of protonation in the low-energy decompositions of gas-phase peptide ions. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1996, 7: 522–531
- 55 Rodriguez C F, Shoeib T, Chu I K, et al. Comparison between protonation, lithiation, and argentination of 5-oxazolones: A study of a key intermediate in gas-phase peptide sequencing. *J Phys Chem A*, 2000, 104: 5335–5342
- 56 Yalcin T, Khouw C, Csizmadia I G, et al. Why are B ions stable species in peptide spectra? *J Am Soc Mass Spectrom*, 1995, 6: 1165–1174
- 57 Yalcin T, Csizmadia I G, Peterson M R, et al. The structure and fragmentation of  $\text{B}_n$  ( $n > 3$ ) ions in peptide spectra. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1996, 7: 233–242
- 58 Paizs B, Suhai S. Theoretical study of the main fragmentation pathways for protonated glycylglycine. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001, 15: 651–663
- 59 Paizs B, Schnolzer M, Warnken U, et al. Cleavage of the amide bond of protonated dipeptides. *Phys Chem Chem Phys*, 2004, 6: 2691–2699
- 60 Harrison A G, Young A B, Schnolzer M, et al. Formation of iminium ions by fragmentation of  $\text{a}_2$  ions. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18: 1635–1640

## 补充材料

表 S1 所有涉及到的化合物及离子结构的笛卡尔坐标、内能、焓、吉布斯自由能、零点校正能和虚频频率数据

表 S2 质子化 GPG, PGG 和 PPG 产生的产物离子和过渡态的相对内能( $\Delta E_0$ )、相对总能量( $\Delta E$ )、相对焓值( $\Delta H^\circ_{298}$ )和相对吉布斯自由能 ( $\Delta G^\circ_{298}$ ) ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )

表 S3 DFT-B3LYP/6-31++G(d,p)计算的相关分子及其质子化离子的焓值( $H^\circ$ )和相对焓值( $\Delta H^\circ_0$ )

本文的以上补充材料见网络版 [csb.scichina.com](http://csb.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.