

# 气相中 2-甲氧基乙酸参与 9-芴甲氧羰基脱除反应的质谱研究

高校飞<sup>1</sup>, 姚泽华<sup>1</sup>, 董茂友<sup>1</sup>, 陈祥钊<sup>2</sup>

(1. 东华理工大学化学与材料学院, 江西省质谱科学与仪器重点实验室, 江西 南昌 330013;  
2. 赣南医学院, 心脑血管疾病防治教育部重点实验室, 江西 赣州 341000)

**摘要:**本研究主要探讨气相条件下, 乙酸(HAc)、3-甲氧基丙酸(MPA)和 2-甲氧基乙酸(MAA)在氨基酸保护基 9-芴甲氧羰基(Fmoc)脱除过程中的作用。采用自制的纳喷装置将反应溶液依次雾化进入质谱仪, 在线监测 3 种羧酸分别与不同氨基酸底物反应的关键离子, 探讨羧酸与底物结构对复合物形成及质谱解离模式的影响。结果表明, 对于同一氨基酸结合不同羧酸的复合物, 只有相对含量较高的 MAA 复合物发生了解离。这可能是因为 MAA 2 号位的甲氧基促进了 MAA 与 Fmoc 基团 9 号碳上 H 的复合, 降低了该 H 解离过渡态能垒, 从而有利于 MAA 与 Fmoc 保护的氨基酸( $X_i, X_i = G_i, A_i, V_i, L_i, M_i, F_i, P_i$ )形成的复合物 $[X_i + MAA - H]^-$ 阴离子中 Fmoc 的解离。对于 MAA 的不同氨基酸复合物而言, N 上没有 H 的  $P_i$  复合物阴离子 $[P_i + MAA - H]^-$ 解离的碎片是以 Fmoc 脱除产物为主, 其他氨基酸的 MAA 复合物则以丢失中性 MAA 碎片为主。可见, 羧酸结构和氨基酸底物结构对复合物分子的形成和复合物分子中 Fmoc 的解离有着重要影响, 该研究结果有助于理解气相中 Fmoc 解离的分子离子反应过程。

**关键词:** 9-芴甲氧羰基(Fmoc); 脱保护; 分子离子反应; 质谱

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2024)02-0246-10

doi: 10.7538/zpxb.2023.0071

## Mass Spectrometric Study on 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl Group Removal Assisted by 2-Methoxyacetic Acid in Gas Phase

GAO Xiao-fei<sup>1</sup>, YAO Ze-hua<sup>1</sup>, DONG Mao-you<sup>1</sup>, CHEN Xiang-zhao<sup>2</sup>

(1. Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, School of Chemistry and Materials Science, East China University of Technology, Nanchang 330013, China;  
2. Key Laboratory of Prevention and Treatment of Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases of Ministry of Education, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

**Abstract:** The detachment of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) from the amino group is widely performed in chemical synthesis reactions, involving peptides, nucleosides, polymers and some other organic compounds. Reported methods for Fmoc release mainly referred to traditional bases. Limited information about carboxylic acid-

participating Fmoc detachment has been documented. This study mainly investigated the role of acetic acid (HAc), 3-methoxypropionic acid (MPA), 2-methoxyacetic acid (MAA) in the process of Fmoc deprotection in gas phase. The home-made nano emitter was used to spray the mixed solution of the three carboxylic acids and different Fmoc protected amino acids, which flew into the inlet of mass spectrometer (MS), to monitor the key adduct ions derived from the reaction of carboxylic acids and protected amino acids, such as Gly, Ala, Val, Leu, Pro, Met and Phe. Furthermore, the effects of substrate structures on the formation of the adduct in MS and its dissociation in MS/MS were discussed. The results showed that the relative abundance of MAA adducts were significantly higher than that of HAc adducts and MPA adducts for the same Fmoc protected amino acid, and only MAA related adducts can dissociate into fragments with 20% collision energy (CE). This is due to the special structure of MAA, which has a methoxy group providing a lone pair of electrons to the acidic hydrogen at the second position of the carboxylic acid. Thus, the methoxy group weakly interacted with the H at the 9th position of Fmoc ring, promoting the formation of the adducts of MAA and Fmoc protected amino acid to decrease the energy barrier of the transition state for the 9th H release process. All the  $[X_f + \text{MAA} - \text{H}]^-$  adducts can generate two kinds of successor ions upon 20% CE, one is the Fmoc removal fragment, another is only MAA loss fragment. Interestingly,  $[P_f + \text{MAA} - \text{H}]^-$  mainly gave fragments of the Fmoc removal products, whereas the other six compounds with relatively low abundance ratio mostly produced fragments by neutral MAA loss. This difference of the fragmentation pathways may be owing to the structure of  $P_f$ , which has no H in nitrogen atom and suppresses the formation of intermolecular hydrogen bonding. Thus, the formation of intermolecular hydrogen bond between the MAA and  $P_f$  is preferred, which benefits  $[P_f + \text{MAA} - \text{H}]^-$  dissociation into Fmoc removal products. In summary, the structures of both carboxylic acids and amino acids play a vital role in formation of adducts and detachment of Fmoc group, and the research is helpful for the understanding in the mechanism of molecular ion reactions in gas phase.

**Key words:** 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc); deprotection; molecule/ion reaction; mass spectrometry

氨基保护基的脱除策略广泛应用于多步有机合成过程<sup>[1]</sup>,如功能材料的化学改性、糖化学合成、肽键构建等<sup>[1-3]</sup>。9-芴甲氧羰基(9-fluorenylmethyloxycarbonyl, Fmoc)作为常见的氨基保护基之一<sup>[4]</sup>,其脱除过程是多步有机合成过程的重要一环。传统 Fmoc 脱除相关的研究主要围绕有机二级胺,如哌啶、哌嗪、吗啉、环己亚胺、*N*-甲基吡咯烷酮等<sup>[5-14]</sup>。当反应体系中存在适当的碱时,Fmoc 能够顺利脱离,示于图 1。这是由于 Fmoc 的吸电子芴环体系使该基团 9 号碳上的孤氢呈酸性,当极性电子供体(弱碱或者中强碱,质子受体)靠近时,孤氢容易

受影响被剥离<sup>[14]</sup>,剥离之后形成的碳负离子中间体经  $\beta$  消除,释放二氧化碳和二苯并富烯(dibenzofulvene, DBF)<sup>[11]</sup>,得到氨基脱保护的产物,示于图 1a。

由 Fmoc 基团解离机理可知<sup>[11]</sup>,由于 9 号碳上的氢具有特殊的酸性,极易受极性电子供体的影响。前期关于水微液滴中 Fmoc 保护的脯氨酸(Fmoc-Pro-OH,  $P_f$ )上 Fmoc 解离的研究表明<sup>[15]</sup>, $[P_f - \text{H}]^-$ 能够结合 1 个二聚水分子形成复合物中间体 $[P_f + (\text{H}_2\text{O})_2 - \text{H}]^-$ ,该复合物 Fmoc 基团 9 号碳上的氢受二聚水分子的影响,其解离活化能降低,远低于 $[P_f - \text{H}]^-$

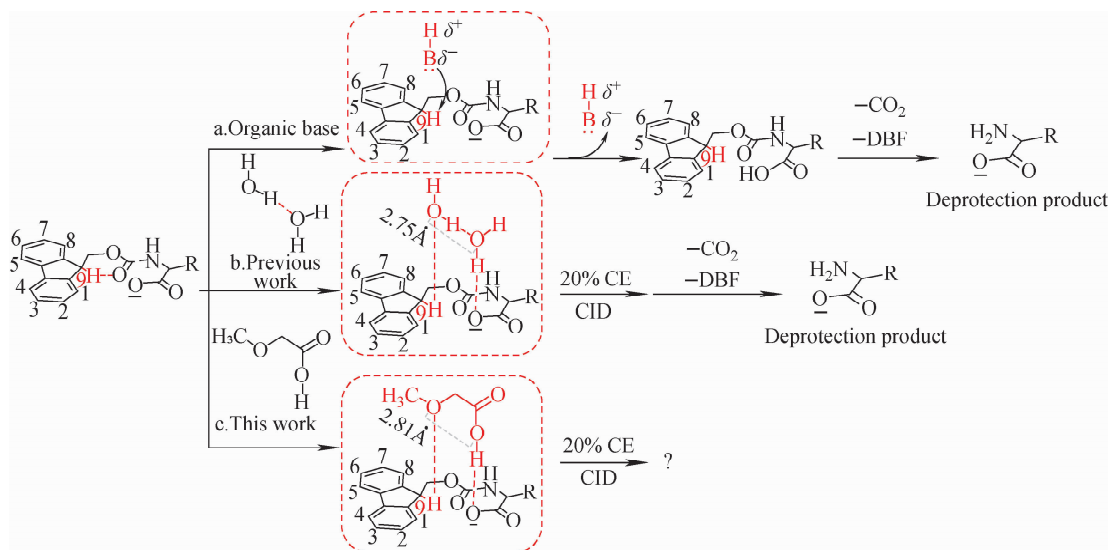


图 1 传统有机碱脱除 Fmoc 的反应及气相中极性电子供体辅助脱除 Fmoc 的反应

Fig. 1 Organic base induced Fmoc removal and gas-phased Fmoc removal mediated by polar electron donors

中 Fmoc 基团 9 号碳上的氢<sup>[15]</sup>, 因此,  $[P_f + (H_2O)_2 - H]^-$  中的 Fmoc 更容易发生解离。在  $[P_f + (H_2O)_2 - H]^-$  离子中, 二聚水分子中作为电子供体(质子受体)的 2 个氧原子可能通过氢键发挥重要作用, 其中 1 个 O 通过 O—H…O 氢键桥锚定  $[P_f - H]^-$  上的羧基, 促进分子离子复合物的形成; 另 1 个 O 作为质子受体靠近 Fmoc 基团苈基上 9 号位的孤氢, 削弱 9 号位 C—H 键, 促使 H 离去, 从而引发 Fmoc 基团的解离, 示于图 1b。根据水二聚体结构的特性, 推测同样含有 2 个 O 原子的羧酸类化合物在气相中也能够像二聚水分子那样辅助 Fmoc 保护的氨基酸上 Fmoc 基团的解离, 示于图 1c。

为了验证上述推测, 本工作将研究气相条件下, Fmoc 保护的甘氨酸( $G_f$ )、丙氨酸( $A_f$ )、缬氨酸( $V_f$ )、亮氨酸( $L_f$ )、甲硫氨酸( $M_f$ )、苯丙氨酸( $F_f$ )及脯氨酸( $P_f$ )分别与乙酸(HAc)、3-甲氧基丙酸(3-methoxypropionic acid, MPA)、2-甲氧基乙酸(2-methoxyacetic acid, MAA)反应的过程。采用自制的纳喷装置将 3 种羧酸分别与不同氨基酸底物混合的溶液依次雾化后进入质谱仪, 在线监测气相中 3 种羧酸分别与 7 种不同氨基酸相互作用的关键分子离子, 并探讨羧酸与氨基酸底物的结构对复合物的形成及质谱解离模式的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与装置

线性离子阱质谱仪(LTQ-MS): 美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品, 在 Xcalibur 程序上进行数据采集及分析; Model-1000 拉针仪: 美国 Sutter 仪器公司产品; 纳升电喷雾喷针: 使用拉针仪将高硼硅玻璃毛细管拉制而成。

### 1.2 主要材料与试剂

Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Phe-OH: 纯度  $\geq 98\%$ , 安耐吉化学试剂有限公司产品; 甲醇(HPLC 级): 安徽天地高纯溶剂有限公司产品; 高硼硅玻璃毛细管(1.2 mm  $\times$  0.9 mm): 世界精密仪器有限公司产品。

### 1.3 实验条件

自制纳升电喷雾离子源, 放电电压—2.0 kV, 离子传输管温度 180  $^{\circ}$ C, 毛细管电压—50.0 V, 透镜电压—150.0 V, 质量扫描范围  $m/z$  50~500。

## 2 结果与讨论

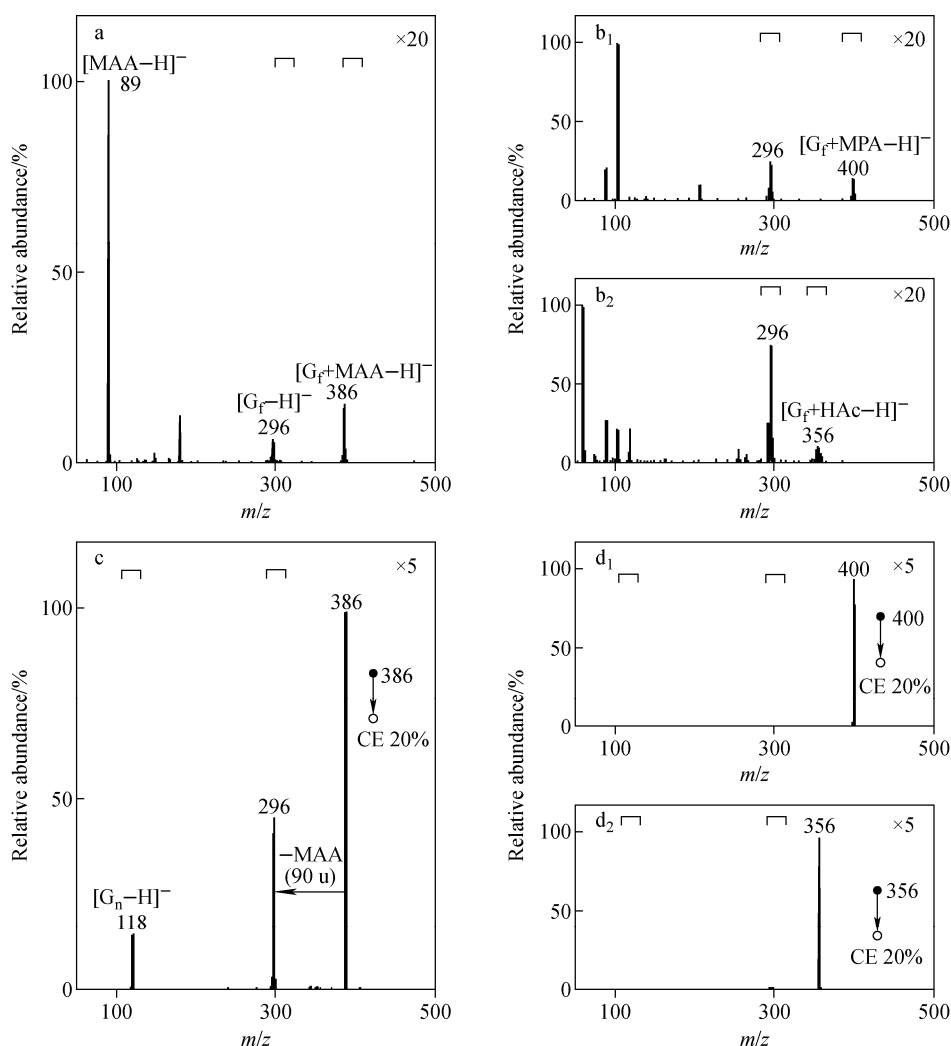
### 2.1 气相中 HAc、MPA、MAA 与 $G_f$ 反应的质谱研究

从 HAc、MPA、MAA 的分子结构上看, 三者均可提供 2 个氧原子(极性电子供体)。本实验以 Fmoc-Gly-OH( $G_f$ )为模型底物, 研究气相

中 HAc、MPA、MAA 对  $[G_f-H]^-$  中 Fmoc 解离的影响。首先,将含有  $1.0 \mu\text{mol/L}$   $G_f$  和  $10.0 \mu\text{mol/L}$  MAA 的甲醇溶液转移至喷针内,喷针固定在质谱口  $10 \text{ mm}$  处,喷针内放置  $0.1 \text{ mm}$  铂丝,并施加  $-2.0 \text{ kV}$  电压,使喷针尖端处产生微液滴进入质谱口<sup>[16]</sup>。采用质谱仪在线监测微液滴中的反应与产物<sup>[17-19]</sup>。在负离子模式下,得到的主要相关特征离子为  $m/z$  89、296、386,其中  $m/z$  89 是 2-甲氧基乙酸负离子  $[MAA-H]^-$ ,  $m/z$  296 为  $[G_f-H]^-$ ,  $m/z$  386 是 Fmoc-Gly-OH 与 MAA 形成的复合物离子  $[G_f+MAA-H]^-$ , 示于图 2a。同样,MPA 和

HAc 分别可以与  $[G_f-H]^-$  形成复合物离子  $[G_f+MPA-H]^-$  ( $m/z$  400) 和  $[G_f+HAc-H]^-$  ( $m/z$  356), 示于图 2b。

为进一步了解气相中  $[G_f+MAA-H]^-$  ( $m/z$  386)、 $[G_f+MPA-H]^-$  ( $m/z$  400) 和  $[G_f+HAc-H]^-$  ( $m/z$  356) 的解离情况,分别对其进行碰撞诱导解离 (collision-induced dissociation, CID) 实验。当 CID 能量为 20% 时,  $[G_f+MAA-H]^-$  ( $m/z$  386) 裂解的主要产物离子除  $[G_f-H]^-$  ( $m/z$  296) 外,还有 *N*-羧基甘氨酸离子  $[G_n-H]^-$  ( $m/z$  118, 其中  $m/z$  118 能够进一步解离丢失  $\text{CO}_2$  生成  $[Gly-H]^-$ )



注:反应溶液  $G_f$  为  $1.0 \mu\text{mol/L}$ , MAA、MPA、HAc 均为  $10.0 \mu\text{mol/L}$ ;溶剂为甲醇

图 2 常压下,  $G_f$  与 MAA(a)、MPA(b<sub>1</sub>)、HAc(b<sub>2</sub>) 混合溶液反应的一级质谱图, 以及  $m/z$  386(c)、400(d<sub>1</sub>)、356(d<sub>2</sub>) 离子的二级质谱图

Fig. 2 Mass spectra of reaction of  $G_f$  with MAA (a), MPA (b<sub>1</sub>), HAc (b<sub>2</sub>), and MS/MS spectra of ions of  $m/z$  386 (c), 400 (d<sub>1</sub>), 356 (d<sub>2</sub>)

( $m/z$  74)), 示于图 2c。[ $G_f - H$ ] $^-$  由 [ $G_f + MAA - H$ ] $^-$  丢失中性 MAA (90 u) 得到, [ $G_n - H$ ] $^-$  由 [ $G_f + MAA - H$ ] $^-$  丢失中性 MAA (90 u) 和 DBF (178 u) 得到。由此可见, MAA 与 [ $G_f - H$ ] $^-$  结合影响了  $G_f$  中 Fmoc 基团 9 号位的孤氢, 从而辅助 Fmoc 气相解离反应。此结果与最初的推测一致, 即 MAA 能够辅助 Fmoc 基团的解离。然而, 在同等碰撞能量下, 复合物 [ $G_f + MPA - H$ ] $^-$  ( $m/z$  400) 和 [ $G_f + HAc - H$ ] $^-$  ( $m/z$  356) 均未生成碎片离子, 示于图 2d。

从结构上分析, HAc 的羧基团主要与  $G_f$  的羧基通过分子间氢键促使两者形成复合物, 没有其他极性电子供体基团作用于 [ $G_f + HAc - H$ ] $^-$  中 Fmoc 基团 9 号碳上的酸性孤氢, 因此, HAc 不能像 MAA 那样辅助 Fmoc 基

团 9 号碳上的孤氢解离, 示于图 3。MPA 不仅有羧基可与  $G_f$  形成分子间氢键, 还有其他极性电子供体基团, 示于图 3b。然而, 在同等碰撞能量下, [ $G_f + MPA - H$ ] $^-$  没有生成碎片离子。因此推测, 极性电子供体基团的位置<sup>[20]</sup>对复合物中 Fmoc 解离至关重要。对辅助分子中 2 个氧原子之间的距离进行比较, 发现 MAA 羧基中 1 个氧原子与其 2 位氧原子之间的距离为 2.75 Å, 与文献中<sup>[15]</sup>二聚水辅助 Fmoc 解离的过渡态上 2 个氧原子之间的距离 (2.81 Å) 接近, 这一距离有利于 MAA 复合物的形成与二聚水分子复合物类似的桥连结构, 能够降低 Fmoc 基团 9 号碳上 H 解离过程的过渡态能垒<sup>[15]</sup>。MPA 中甲氧基的 O 原子在碳链的 3 号位, 与羧基中氧原子的距离为 4.81 Å, 不能形成与二聚水分子复合物类似的结构, 从而不能影

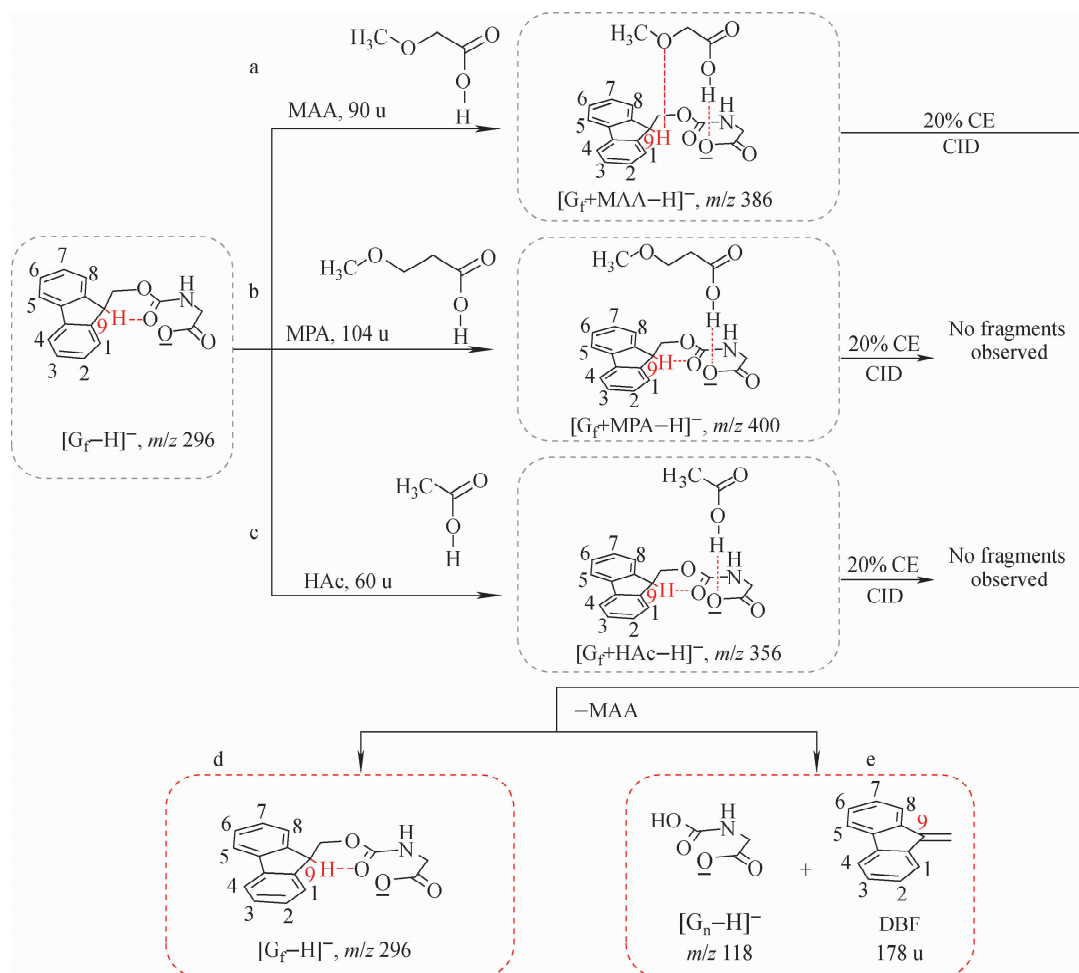


图 3 常压下  $G_f$  相关加合物离子的形成和裂解过程

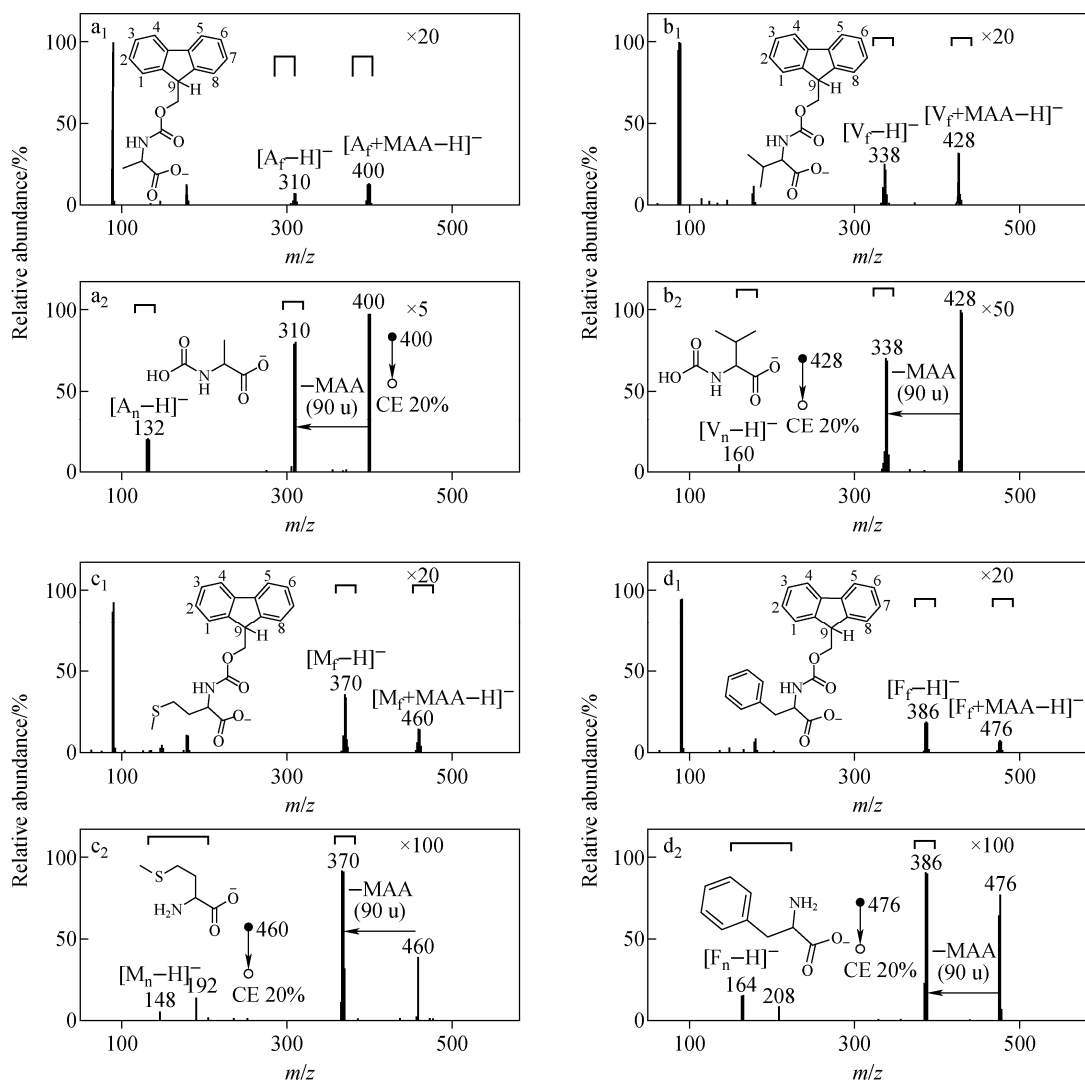
Fig. 3 Formation and fragmentation patterns for corresponding adduct ion of  $G_f$  under atmospheric pressure

响 Fmoc 基团 9 号碳上的 H。因此,为实现羧酸类似物辅助 Fmoc 基团解离,不仅需存在 2 个极性电子供体,且距离<sup>[20]</sup>须接近 2.81 Å。

## 2.2 气相中不同一级氨基酸底物分别在 MAA、MPA 和 HAc 作用下的解离研究

为研究 HAc、MPA 和 MAA 分别与  $G_f$  结合形成的复合物在串联质谱中呈现出来的结果是否同样适用于其他 Fmoc 保护的氨基酸分子,针对上述实验进行了底物拓展。拓展的底物包含 Fmoc-Ala-OH( $A_f$ )、Fmoc-Val-OH( $V_f$ )、Fmoc-Leu-OH( $L_f$ )、Fmoc-Met-OH( $M_f$ )、Fmoc-

Phe-OH( $F_f$ )和 Fmoc-Pro-OH( $P_f$ )6 种氨基酸,其中,Ala、Val、Leu、Met 和 Phe 为一级氨基酸(即  $G_f$ 、 $A_f$ 、 $V_f$ 、 $L_f$ 、 $M_f$ 、 $F_f$  化合物中 N 上有 H),Pro 为二级氨基酸(即  $P_f$  化合物中 N 上没有 H)。在负离子模式下, $A_f$  与 MAA 反应得到  $m/z$  310 $[A_f-H]^-$  和  $m/z$  400 $[A_f+MAA-H]^-$  离子,示于图 4a<sub>1</sub>。MPA 和 HAc 分别与 $[A_f-H]^-$ 形成复合物离子 $[A_f+MPA-H]^-$  ( $m/z$  414),示于附图 1a(请登录《质谱学报》网站 <https://zpxb.xml-journal.net> 下载,以下同)和 $[A_f+HAc-H]^-$  ( $m/z$  370)(附图 1b)。当 CID 能



注:  $A_f$ 、 $V_f$ 、 $M_f$ 、 $F_f$  浓度均为 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ; MAA、MPA、HAc 浓度均为 10.0  $\mu\text{mol/L}$ ; 溶剂为甲醇

图 4 常压下, MAA 分别与  $A_f$  (a<sub>1</sub>),  $V_f$  (b<sub>1</sub>),  $M_f$  (c<sub>1</sub>) 和  $F_f$  (d<sub>1</sub>) 混合溶液反应的一级质谱图, 以及  $m/z$  400 (a<sub>2</sub>), 428 (b<sub>2</sub>), 460 (c<sub>2</sub>), 476 (d<sub>2</sub>) 离子的二级质谱图

Fig. 4 Mass spectra of reaction of MAA with  $A_f$  (a<sub>1</sub>),  $V_f$  (b<sub>1</sub>),  $M_f$  (c<sub>1</sub>),  $F_f$  (d<sub>1</sub>), and MS/MS spectra of ions of  $m/z$  400 (a<sub>2</sub>), 428 (b<sub>2</sub>), 460 (c<sub>2</sub>), 476 (d<sub>2</sub>) under atmospheric pressure

量为 20% 时,  $m/z$  400 发生裂解得到碎片离子  $[A_f - H]^-$  ( $m/z$  310) 和  $N$ -羧基丙氨酸离子  $[A_n - H]^-$  ( $m/z$  132), 示于图 4a<sub>2</sub>, 而  $m/z$  414 (附图 1c) 和  $m/z$  370 (附图 1d) 未发现相应的碎片离子。V<sub>f</sub> 分别与 MAA、MPA 和 HAc 反应得到复合物离子  $[V_f + MAA - H]^-$  ( $m/z$  428, 图 4b<sub>1</sub>)、 $[V_f + MPA - H]^-$  ( $m/z$  442, 附图 2a) 和  $[V_f + HAc - H]^-$  ( $m/z$  398, 附图 2b)。这 3 种含 V<sub>f</sub> 复合物离子的解离规律与 G<sub>f</sub> 和 A<sub>f</sub> 一致, 即  $[V_f + MAA - H]^-$  能够发生 Fmoc 解离, 而  $[V_f + MPA - H]^-$  和  $[V_f + HAc - H]^-$  离子未发生解离, 离子解离路径示于附图 2e。

当底物为侧链基团更大的 Met、Phe、Leu 时, 生成的复合物离子  $[M_f + MAA - H]^-$  ( $m/z$  460, 图 4c<sub>1</sub>)、 $[F_f + MAA - H]^-$  ( $m/z$  476, 图 4d<sub>1</sub>) 和  $[L_f + MAA - H]^-$  ( $m/z$  442, 附图 3a) 均可发生解离, 其结果分别示于图 4c<sub>2</sub>、4d<sub>2</sub>, 附图 3b。以上 3 种 MAA 复合物离子解离产生的碎片有  $N$ -羧基氨基酸离子 ( $[M_n - H]^-$  ( $m/z$  192)、 $[F_n - H]^-$  ( $m/z$  208)、 $[L_n - H]^-$  ( $m/z$  174)) 和氨基酸负离子 ( $[M - H]^-$  ( $m/z$  148)、 $[F - H]^-$  ( $m/z$  164)、 $[L - H]^-$  ( $m/z$  130)), 均为复合物母离子脱 Fmoc 的产物。MPA 和 HAc 分别与 M<sub>f</sub>、F<sub>f</sub>、L<sub>f</sub> 形成的复合物离子 (附图 4a~4b、5a~5b、6a~6b) 均未发现 Fmoc 解离的碎片离子 (附图 4c、4d、5c、5d、6c、6d), 离子解离路径示于附图 4e、5e、6e。

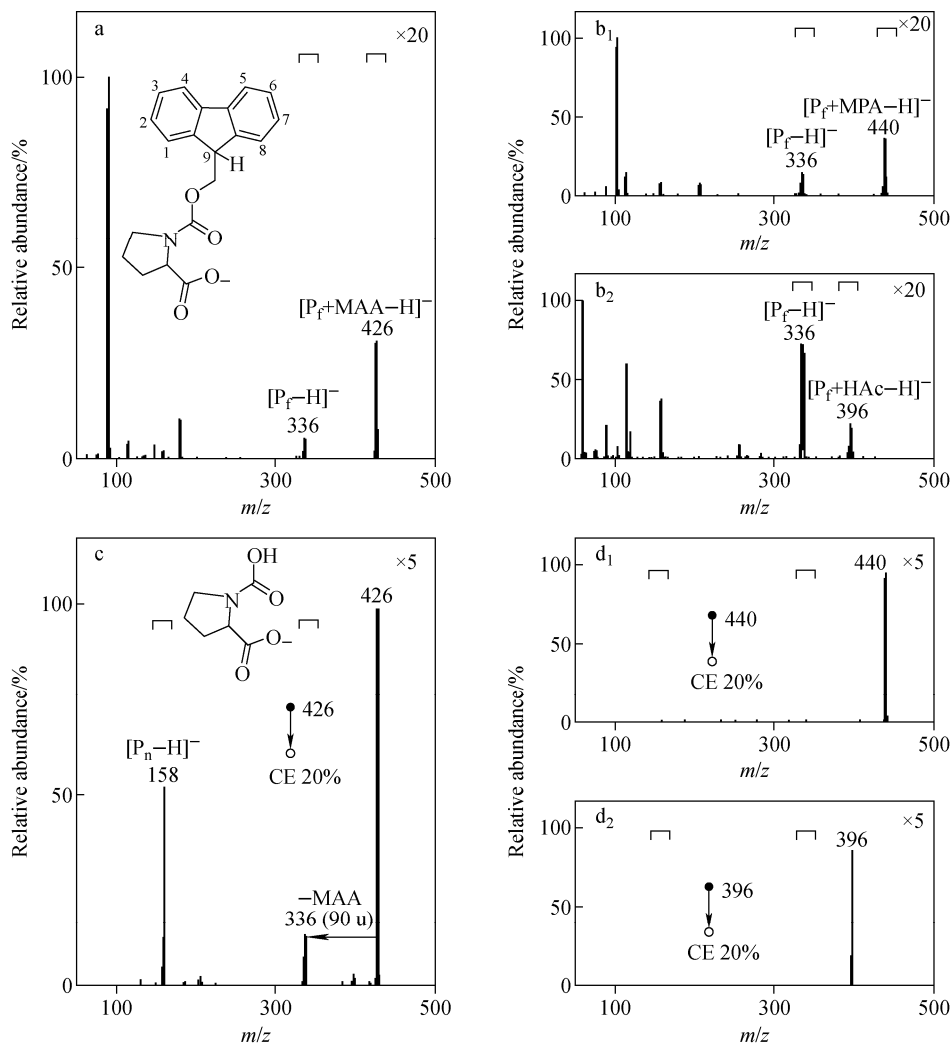
从 MAA 分别与 G<sub>f</sub>、A<sub>f</sub>、V<sub>f</sub>、L<sub>f</sub>、M<sub>f</sub>、F<sub>f</sub> 结合形成的复合物分子解离质谱结果可知, 6 种复合物离子均产生 Fmoc 解离碎片 (丢失 MAA + DBF 或 MAA + DBF + CO<sub>2</sub>), 以及 Fmoc 未解离 (仅丢失 MAA) 的离子  $[G_f - H]^-$  ( $m/z$  296, 图 2c)、 $[A_f - H]^-$  ( $m/z$  310, 图 4a<sub>2</sub>)、 $[V_f - H]^-$  ( $m/z$  338, 图 4b<sub>2</sub>)、 $[M_f - H]^-$  ( $m/z$  370, 图 4c<sub>2</sub>)、 $[F_f - H]^-$  ( $m/z$  386, 图 4d<sub>2</sub>) 和  $[L_f - H]^-$  ( $m/z$  352, 附图 3b)。因此推测, 复合物离子可能有 2 种结构形式, 一种是 MAA 与 X<sub>f</sub> (X<sub>f</sub>=G<sub>f</sub>、A<sub>f</sub>、V<sub>f</sub>、L<sub>f</sub>、M<sub>f</sub>、F<sub>f</sub>) 形成简单的复合物结构 (MAA 与 X<sub>f</sub> 分子间存在弱相互作用, 在碰撞诱导解离下极易丢失中性分子 MAA), 另一种是 MAA 甲氧基中的氧靠近 Fmoc 基团 9 号位 H, 降低了 H 解离时的过渡态能垒, 从而

辅助 Fmoc 解离。然而, 在  $[X_f + MAA - H]^-$  解离产物中, 未脱去 Fmoc 的碎片离子  $[X_f - H]^-$  相对丰度高于脱去 Fmoc 的碎片离子  $[X_f + MAA - Fmoc - H]^-$ , 由此推测,  $[X_f + MAA - H]^-$  中结构 1 的相对含量可能高于结构 2。另外, MPA 和 HAc 与上述氨基酸底物形成的复合物在同样条件下均未发现产生碎片离子, 进一步证明了羧酸化合物 2 号位的甲氧基对复合物中 Fmoc 基团 9 号位的 H 解离起着关键作用。

### 2.3 气相中 P<sub>f</sub> 分别在 MAA、MPA 和 HAc 作用下的解离研究

当底物氨基酸为 Pro 时, P<sub>f</sub> 分别与 MAA、MPA、HAc 形成复合物离子  $[P_f + MAA - H]^-$  ( $m/z$  426, 图 5a)、 $[P_f + MPA - H]^-$  ( $m/z$  440, 图 5b<sub>1</sub>)、 $[P_f + HAc - H]^-$  ( $m/z$  396, 图 5b<sub>2</sub>)。在 20% CID 能量下,  $[P_f + MAA - H]^-$  ( $m/z$  426) 能够发生解离, 产生  $N$ -羧基脯氨酸离子  $[P_n - H]^-$  ( $m/z$  158), 示于图 5c; 而  $[P_f + MPA - H]^-$  ( $m/z$  440) 和  $[P_f + HAc - H]^-$  ( $m/z$  396) 未产生碎片离子, 示于图 5d<sub>1</sub>~5d<sub>2</sub>; 这与前几种同类复合物的解离结果一致, 离子解离路径示于附图 7。与 G<sub>f</sub>、A<sub>f</sub>、V<sub>f</sub>、L<sub>f</sub>、M<sub>f</sub>、F<sub>f</sub> 一级氨基酸相比, P<sub>f</sub> 可能更容易与 MAA 形成复合物,  $[P_f + MAA - H]^-$  与  $[P_f - H]^-$  相对丰度的比值 (Pr<sub>3</sub>) 明显大于其他氨基酸复合物与原料相对丰度的比值 (图 3a、4a<sub>1</sub>、4b<sub>1</sub>、4c<sub>1</sub>、4d<sub>1</sub>、5a、附图 3a)。 $[P_f + MAA - H]^-$  的解离碎片主要是 Fmoc 解离的产物 ( $m/z$  158, 图 5c), 且其相对丰度明显大于 Fmoc 未解离的碎片离子 ( $m/z$  336)。

为了进一步理解复合物离子  $[X_f + MAA - H]^-$  (X<sub>f</sub>=G<sub>f</sub>、A<sub>f</sub>、V<sub>f</sub>、L<sub>f</sub>、M<sub>f</sub>、F<sub>f</sub>、P<sub>f</sub>) 中 Fmoc 的解离, 本实验对 7 种氨基酸中 Fmoc 解离相关参数进行对比。质谱中复合物相关负离子的相对丰度比值示于图 6。由图 6 可见,  $[X_f + MAA - H]^-$  与  $[X_f - H]^-$  相对丰度的比值 (Xr<sub>3</sub>) 大于  $[X_f + MPA - H]^-$  与  $[X_f - H]^-$  相对丰度的比值 (Xr<sub>2</sub>), 并远大于  $[X_f + HAc - H]^-$  与  $[X_f - H]^-$  相对丰度的比值 (Xr<sub>1</sub>)。这一结果表明, 与 MPA 和 HAc 相比, MAA 更容易与这些底物结合形成复合物中间体, 主要由于 MAA 羧基基团的 2 号位有良好的酸性 H (质子) 受体, 能够形成弱相互作用, 促进复合物的形成。



注:  $P_f$  为  $1.0 \mu\text{mol/L}$ ; MAA, MPA, HAc 均为  $10.0 \mu\text{mol/L}$ ; 溶剂为甲醇

图 5 常压下,  $P_f$  和 MAA(a)、MPA(b<sub>1</sub>)、HAc(b<sub>2</sub>) 混合溶液反应的一级质谱图, 以及  $m/z$  426(c)、440(d<sub>1</sub>)、396(d<sub>2</sub>) 离子的二级质谱图

Fig. 5 Mass spectra of reaction of  $P_f$  with MAA (a), MPA (b<sub>1</sub>), HAc (b<sub>2</sub>), and MS/MS spectra of ions of  $m/z$  426 (c), 440 (d<sub>1</sub>), 396 (d<sub>2</sub>) under atmospheric pressure

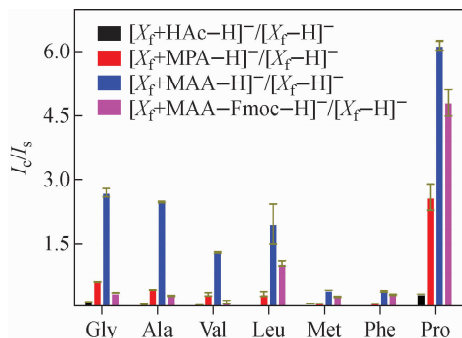


图 6 质谱中复合物相关负离子的相对丰度比值

Fig. 6 Relative abundance ratios of complex related negative ions in mass spectrometry

另外, 在  $G_f$ 、 $A_f$ 、 $V_f$ 、 $L_f$ 、 $M_f$ 、 $F_f$ 、 $P_f$  这些氨基酸的复合物中,  $[P_f + \text{MAA} - \text{H}]^-$  与  $[P_f - \text{H}]^-$  相对丰度的比值( $Pr_3$ )达 6.2, 而  $Gr_3$  (2.7)、 $Ar_3$  (2.5)、 $Vr_3$  (1.3)、 $Lr_3$  (2.0)、 $Mr_3$  (0.4)、 $Fr_3$  (0.4) 的值均小于 3。对  $P_f$  而言,  $[X_f + \text{MAA} - \text{Fmoc} - \text{H}]^-$  与  $[X_f - \text{H}]^-$  相对丰度比值( $Pr_4$ )为 4.8, 而  $G_f$ 、 $A_f$ 、 $V_f$ 、 $L_f$ 、 $M_f$ 、 $F_f$  这些一级氨基酸对应的  $Xr_4 \leq 1$ 。值得注意的是,  $[P_f + \text{MPA} - \text{H}]^-$  与  $[P_f - \text{H}]^-$  相对丰度的比值( $Pr_2$ )达 2.6, 与  $Gr_3$  (2.7)、 $Ar_3$  (2.5) 的数值接近, 这可能是因为  $P_f$  的 N 上没有 H, 抑制了分子内氢键的形成, 而促进了  $P_f$  与 MPA 形



成分子间氢键,即复合物的形成。在 20% 碰撞能量下,  $[P_f + \text{MPA} - \text{H}]^-$  未能生成碎片离子, 示于图 5d<sub>1</sub>, 而  $[G_f + \text{MAA} - \text{H}]^-$  和  $[A_f + \text{MAA} - \text{H}]^-$  生成了 Fmoc 解离的碎片。可见, 复合物离子相对丰度比值越高, 并不能说明复合物离子越容易解离产生 Fmoc 解离的产物, 起关键作用的是 MAA 结构中 2 号位的极性电子供体甲氧基。

综上所述, 复合物相对丰度比值的增高从羧酸结构和氨基酸底物结构 2 个方面得以提升。第一, 氨基酸底物分子上 N 多余的 H 被取代, 氨基酸的羧基不能与 N 形成分子内氢键, 有更高比例的羧基可以与 MAA 通过分子间氢键形成复合物。第二, 辅助羧酸分子 2 号位有极性电子供体, 可以与 Fmoc 氨基酸上 Fmoc 基团上的酸性氢相互作用, 促进复合物的形成。然而, 要想实现复合物离子在气相中发生解离产生 Fmoc 解离产物, MAA 参与辅助是必要条件。

### 3 结论

本文探讨了在气相条件下 3 种不同的极性电子供体(不同取代羧酸化合物 HA<sub>c</sub>, MPA, MAA)对 7 种不同氨基酸上 Fmoc 解离的影响。结果表明, 3 种不同的极性电子供体均能与 G<sub>f</sub>、A<sub>f</sub>、V<sub>f</sub>、L<sub>f</sub>、M<sub>f</sub>、F<sub>f</sub>、P<sub>f</sub> 这 7 种底物结合生成复合物。由于 MAA 结构的特殊性(2 号位有极性电子供体基团), 使 MAA 复合物的相对比值明显高于含 HA<sub>c</sub> 和 MPA 的复合物。且在同等碰撞能量下,  $[X_f + \text{MAA} - \text{H}]^-$  ( $X_f = G_f, A_f, V_f, L_f, M_f, F_f, P_f$ ) 更容易发生解离。其中,  $[P_f + \text{MAA} - \text{H}]^-$  的解离产物  $[P_f + \text{MAA} - \text{Fmoc} - \text{H}]^-$  和  $[P_f - \text{H}]^-$  的相对比值最高, 且  $[P_f + \text{MAA} - \text{H}]^-$  解离的碎片以 Fmoc 脱除产物为主, 其他氨基酸的 MAA 复合物则是以丢失中性 MAA 碎片为主。因此, 羧酸结构和氨基酸底物结构对复合物分子的形成和 Fmoc 解离有着重要影响, 这一结果有助于理解气相中 Fmoc 解离的分子离子反应过程。

### 参考文献:

[1] ISIDRO-LLOBET A, ÁLVAREZ M, ALBERICIO F. Amino acid-protecting groups[J]. Chem

Rev, 2009, 109(6): 2 455-2 504.

- [2] RANA M S, XU L, CAI J, VEDARETHINAM V, TANG Y, GUO Q, HUANG H, SHEN N, DI W, DING H, HUANG L, QIAN K. Zirconia hybrid nanoshells for nutrient and toxin detection[J]. Small, 2020, 16(46): 2 003 902.
- [3] SUN S, LIU W, YANG J, WANG H, QIAN K. Nanoparticle-assisted cation adduction and fragmentation of small metabolites[J]. Angew Chem Int Ed, 2021, 60(20): 11 310-11 317.
- [4] CARPINO L A, HAN G Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group[J]. J Org Chem, 1972, 37(22): 3 404-3 409.
- [5] ATHERTON E, LOGAN C J, SHEPPARD R C. Peptide synthesis. Part 2. Procedures for solid-phase synthesis using N $\alpha$ -fluorenylmethoxycarbonylamino-acids on polyamide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide[J]. Cheminform, 1981, 12(20): 538-546.
- [6] di GIOIA M L, COSTANZO P, de NINO A, MAIUOLO L, NARDI M, OLIVITO F, PROCOPIO A. Simple and efficient Fmoc removal in ionic liquid[J]. RSC Adv, 2017, 7(58): 36 482-36 491.
- [7] MARTELLI G, CANTELM I P, PALLADINO C, MATTELLONE A, CORBISIERO D, FANTONI T, TOLOMELLI A, MACIS M, RICCI A, CABRI W, FERRAZZANO L. Replacing piperidine in solid phase peptide synthesis: effective Fmoc removal by alternative bases[J]. Green Chem, 2021, 23(20): 8 096-8 107.
- [8] ATHERTON E, FOX H, HARKISS D, LOGAN C J, SHEPPARD R C, WILLIAMS B J. A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylamino-acids[J]. J Chem Soc, Chem Commun, 1978(13): 537-539.
- [9] LIEBE B, KUNZ H. Solid-phase synthesis of a tumor-associated sialyl-TN antigen glycopeptide with a partial sequence of the "Tandem Repeat" of the MUC-1 mucin[J]. Angew Chem Int Ed, 1997, 36(6): 618-621.
- [10] RALHAN K, KRISHNAKUMAR V G, GUPTA S. Piperazine and DBU: a safer alternative for rapid and efficient Fmoc deprotection in solid phase peptide synthesis[J]. RSC Adv, 2015,

- 5(126): 104 417-104 425.
- [11] PERSONNE H, SIRIWARDENA T N, JAVOR S, REYMOND J L. Dipropylamine for 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) feprotection with reduced aspartimide formation in solid-phase peptide synthesis[J]. ACS Omega, 2023, 8(5): 5 050-5 056.
- [12] YANG Y, HANSEN L. Optimized Fmoc-removal strategy to suppress the traceless and conventional diketopiperazine formation in solid-phase peptide synthesis[J]. ACS Omega, 2022, 7(14): 12 015-12 020.
- [13] FIELDS G B. Methods for removing the Fmoc group[J]. Peptide Synthesis Protocols, 1995: 17-27.
- [14] LUNA O F, GOMEZ J, C R DENAS C, ALBERICIO F, MARSHALL S H, GUZM N F. Deprotection reagents in Fmoc solid phase peptide synthesis: moving away from piperidine? [J]. Molecules, 2016, 21(11): 2-12.
- [15] GAO X F, CHENG J C, YE C L, XIAO S, QIU Z M, ZHANG X. Water promoted 9-fluorenylmethoxycarbonyl detachment from amino acids in charged microdroplets[J]. Org Biomol Chem, 2022, 20(35): 7 001-7 005.
- [16] 余翀天,郭寅龙. 高灵敏度纳喷雾正交飞行时间质谱法[J]. 化学学报, 2002, 60(11): 2 029-2 034.
- YU Chongtian, GUO Yinlong. High sensitivity nanoelectrospray ionization orthogonal injection time-of-flight mass spectrometry[J]. Acta Chim Sinica, 2002, 60(11): 2 029-2 034(in Chinese).
- [17] 魏娟娟,孙江晖,尹伊颜,那娜,欧阳津. 基于电喷雾质谱的反应监测研究进展[J]. 质谱学报, 2021, 42(5): 755-771.
- WEI Juanjuan, SUN Jianghui, YIN Yiyan, NA Na, OUYANG Jin. Recent developments on reaction monitoring by electrospray ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2021, 42(5): 755-771(in Chinese).
- [18] 刘吉林,于凯,张洪,姜杰. 质谱离子源技术用于电化学反应机理研究的进展[J]. 化学学报, 2020, 78(6): 504-515.
- LIU Jilin, YU Kai, ZHANG Hong, JIANG Jie. Progress in the study of electrochemical reaction by mass spectrometric ionization sources[J]. Acta Chim Sinica, 2020, 78(6): 504-515(in Chinese).
- [19] 尹欣驰,江游,楚士颖,翁国锋,方向,潘远江. 气相中铜催化的脱羧碘化反应[J]. 化学学报, 2018, 76(6): 436-439.
- YIN Xinch, JIANG You, CHU Shiyng, WENG Guofeng, FANG Xiang, PAN Yuanjiang. Copper-catalyzed decarboxylative idination reaction in the gas phase[J]. Acta Chim Sinica, 2018, 76(6): 436-439(in Chinese).
- [20] 燕菲. 有机酸对大气团簇成因影响的理论研究[D]. 北京:北京化工大学,2022.
- (收稿日期:2023-06-16;修回日期:2023-07-27)