

β -环糊精催化磷酸化氨基酸水解反应的电喷雾电离质谱研究

曹书霞¹, 徐 军¹, 张建臣¹, 陈晓岚¹, 赵玉芬^{1,2,*}

(1. 郑州大学化学系化学生物重点实验室, 河南 郑州 450052;

2. 清华大学化学系生命有机磷化学与化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084)

摘要: 利用电喷雾离子阱质谱对 β -环糊精和 *N*-二异丙氧磷酰化氨基酸的相互作用进行了探讨。结果发现: β -环糊精能够催化 *N*-二异丙氧磷酰化氨基酸的水解反应, 并对 β -环糊精对 *N*-二异丙氧磷酰化氨基酸的水解反应机制进行了推测。而且还对 β -环糊精和 *N*-二异丙氧磷酰化氨基酸以及氨基酸形成的复合物进行了碰撞诱导裂解(CID)研究, 发现二者具有不同的裂解规律。

关键词: 质谱学; *N*-磷酸化氨基酸水解反应研究; 电喷雾质谱; β -环糊精

中图分类号: O 657. 63; O 629. 7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2004)02-84-04

Study of β -Cyclodextrin-catalyzed Hydrolysis of *N*-Phosphoryl Amino Acid by Electrospray Ionization Mass Spectrometry

CAO Shu-xia¹, XU Jun¹, ZHANG Jian-chen¹, CHEN Xiao-lan¹, ZHAO Yu-fen^{1,2,*}

(1. The Key Laboratory of Chemical Biology, Department of Chemistry,
Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;

2. The Key Laboratory for Bioorganic Phosphorus Chemistry and Chemical Biology,
Ministry of Education, Department of Chemistry School of Life Science and Engineering,
Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Aqueous solutions contained *N*-diisopropyloxyphosphoryl amino acids (DIPP-AA) and β -cyclodextrin (β -CD) were analyzed by use of electrospray ion trap mass spectrometry (ESI/MS) in conjunction with tandem mass spectrometry (MS/MS). The result showed that β -CD could catalyze hydrolysis reaction of DIPP-AA to free amino acid (AA). DIPP-AA could form β -CD/DIPP-AA complex with β -CD in the aqueous solution. The hydrolysis products were also observed to form the single charged 1:1 (β -CD/AA) complexes. They not only had some similar cleavage patterns, but also had their similar characteristic fragment ions. The catalyzed mechanism of hydrolysis reaction was assumed by the result.

Key words: mass spectrometry; study on hydrolysis reaction of *N*-phosphoryl amino acid; electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS); β -cyclodextrin

电喷雾质谱(ESI-MS)具有快速、灵敏等特点。近年来,具有“软电离”特点的电喷雾新技术广泛应用于生命科学领域。目前对生物酶-底物、DNA-药物、蛋白质-配体及生物大分子之间形成的复合物的化学计量、相对亲核能力及特异性的研究已成为生物质谱领域的研究热点^[1,2]。

环糊精(CD)是由葡萄糖通过1,4-糖苷键相连形成的一类筒状化合物,它可以通过范德华力、疏水相互作用、主客体分子间的匹配等作用方式与许多有机或无机分子形成包合物,从而成为许多化学工作者感兴趣的研究对象。由于CD所具有的一些特殊的结构因素,使其成为目前人工合成模拟酶研究中最好的模型之一。研究发现, β -CD以及修饰的 β -CD可以模拟许多酶对有机化合物进行催化水解、氧化还原以及转氨基作用等生化反应^[3~6]。 β -CD催化酯水解反应研究较多的为催化C(O)-O键以及P(O)-O键的水解,但对于 β -CD可催化P(O)-N键的水解未见文献报道。磷酸化氨基酸是一类具有较高生物活性的化合物,磷酸化氨基酸所体现出的生命进化的最小分子模型,对解释一些生命现象、了解酶的作用机制和探讨生命起源等具有重要意义。本工作拟利用电喷雾质谱研究 β -CD与N-二异丙氧磷酰化氨基酸(DIPP-AA)的作用,并对 β -CD催化DIPP-AA水解反应机制进行探讨;同时对 β -CD与反应物以及水解产物形成的主客体复合物进行碰撞诱导解离(CID)裂解研究,以发现不同类型的复合物的裂解特点。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

BRUKER Esquire-3000 电喷雾-离子阱多级质谱仪:德国布鲁克道尔顿仪器公司产品,检测范围至 m/z 6 000。进样泵: Cole-Palmer 74900 syringe pump, Cole-Palmer 仪器公司生产。

1.2 主要试剂

N-二异丙氧磷酰化天冬氨酸(DIPP-Asp)、N-二异丙氧磷酰化亮氨酸(DIPP-Leu)、N-二异丙氧磷酰化苯丙氨酸(DIPP-Phe)、N-二异丙氧磷酰化脯氨酸(DIPP-Pro)及N-二异丙氧磷酰化缬氨酸(DIPP-Val)均按照文献方法^[7]合成,产品经核磁共振、元素分析以及红外光谱法鉴定;L-氨基酸(L-Asp, L-Leu, L-Phe, L-Pro,

L-Val):华美生物制品有限公司分装(日本进口,纯度为99%); β -CD:购自美国Sigma公司(分子量1 134 Da,纯度 $\geq 99\%$);水为纯水机(购自美国Labconco公司)生产的超纯水。DIPP-AA测试液的浓度为0.2 mmol/L, DIPP-AA和 β -CD混和液的摩尔比为1:1,二者浓度均为0.2 mmol/L。

1.3 质谱条件

采用ESI离子源;喷雾电压4 000 V;毛细管温度300℃;喷雾气(N_2):48.23 kPa;干燥气(N_2)流速4 L/min;进样速度4 μ L/min。

2 结果与讨论

2.1 实验结果

对DIPP-Asp、DIPP-Leu、DIPP-Phe、DIPP-Pro及DIPP-Val分别与 β -CD的混合液的质谱进行了研究。表明不同的DIPP-AA具有相似的规律。对于DIPP-AA水溶液的ESI-MS测定显示,在质谱图中出现了 $[M+H]^+$ 以及 $[M+Na]^+$ 峰,另外由于ESI-MS的源内CID裂解的存在,在其质谱图中还出现了 $[M+H]^+$ 的少量碎片峰,例如在N-磷酸化苯丙氨酸(DIPP-Phe)的质谱图中(示于图1),除了在 m/z 330、 m/z 352出现 $[DIPP-Phe+H]^+$ 及 $[DIPP-Phe+Na]^+$ 峰外,在 m/z 288、 m/z 246、 m/z 200的碎片离子峰分别为 $[DIPP-Phe+H]^+$ 失去一分子丙烯、两分子丙烯以及继续失去一分子甲酸的碎片离子峰。

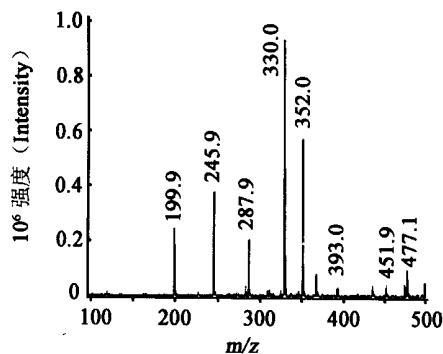


图1 N-二异丙氧磷酰化苯丙氨酸的ESI质谱图

Fig 1 Electrospray ionization mass spectrum of N-diisopropoxyphosphoryl phenylalanine

对五种DIPP-AA和 β -CD的混合液质谱测定结果显示, β -CD均可与DIPP-AA形成主客体复合物(β -CD/DIPP-AA),但同时也都出现了

氨基酸和 β -CD 所形成的主客体复合物(β -CD/ AA)的信号, 经过对混合液中复合物的质谱信号随时间变化的进一步考察发现, 复合物 β -CD/ D IPP-AA 的信号随着时间的延长逐渐减弱, 而复合物 β -CD/ AA 的信号在逐渐增强, 并且在此过程中, $[\text{D IPP-AA} + \beta\text{-CD}-42 + \text{H}]^+$ 峰在逐渐增大, 此峰随着时间的延长逐渐增大而后又逐渐减弱。D IPP-Phe 和 β -CD 混合液随时间变化的质谱图示于图 2。由图 2 可知, 其中 $[\beta\text{-CD}/\text{D IPP-Phe} + \text{K}]^+$ 峰出现在 m/z 1 502 处, $[\beta\text{-CD}/\text{Phe} + \text{H}]^+$ 峰出现在 m/z 1 300 处; m/z 1 157 处为 $[\beta\text{-CD} + \text{Na}]^+$ 峰, m/z 1 460 处为 $[\beta\text{-CD}/\text{D IPP-Phe} + \text{K}-42]^+$ 峰。

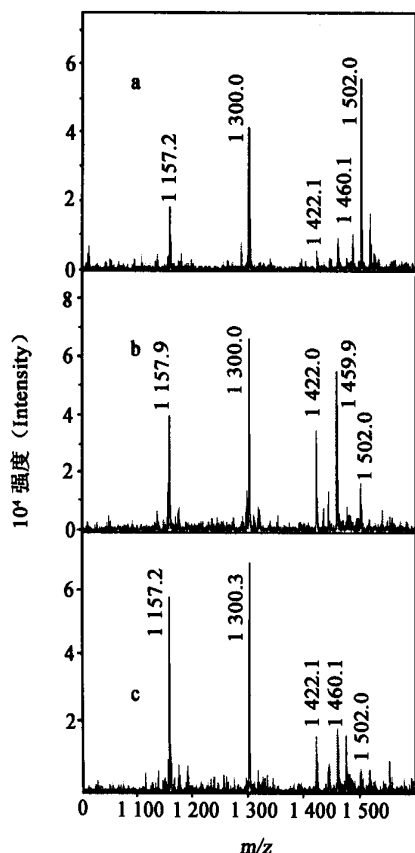


图 2 N-二异丙氧磷酰化氨基酸和 β -环糊精混合液随时间变化的质谱图

Fig 2 Mass spectra of the mixture of D IPP-AA and β -CD

a—混合后马上测定; b—常温放置 2 天后测定;
c—常温放置 4 天后测定

利用对 CD 裂解对主客体复合物 β -CD/ D IPP-AA , β -CD/ AA 的质谱进行了研究。结果

表明, 对于 β -CD/ D IPP-AA 类复合物, 其主要裂解方式为失去一分子 D IPP-AA, 生成 $[\beta\text{-CD} + \text{H}]^+$ 离子; 而 β -CD/ AA 复合物的 MS^2 质谱显示 β -CD/ AA 的裂解产物不仅会出现脱出一分子 AA 的 $[\beta\text{-CD} + \text{H}]^+$ 离子, 而且还出现了一系列 β -CD 的碎片离子, 例如 m/z 1 135, m/z 973, m/z 811, m/z 649, m/z 487, m/z 325 分别对应于 β -CD 以及依次脱除一个糖环 (162 Da) 的碎片离子。并且诱导复合物 β -CD/ D IPP-AA 裂解所需的能量远大于诱导复合物 β -CD/ AA 裂解所需的能量, 由此推测复合物 β -CD/ D IPP-AA 的形成应为氨基酸及其侧链插入到 β -CD 的空腔中。复合物 β -CD/ D IPP-Pro 以及复合物 β -CD/ Pro 的 MS^2 质谱图示于图 3。

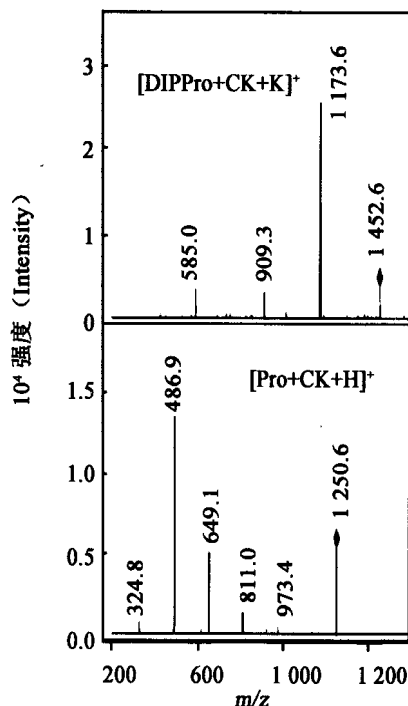


图 3 复合物 CD/ D IPP-AA 以及复合物 CD/ AA 的 MS^2 质谱图

Fig 3 MS^2 spectra of β -CD/ D IPP-AA complex and β -CD/ AA complex

2.2 讨论

众所周知, N-磷酰化氨基酸在水中会发生水解反应生成磷酸单酯、磷酸双酯以及磷酸, 其反应活性主要受酸度的影响。一般在酸性条件下易发生 $\text{P}(\text{O})-\text{N}$ 键的断裂; 在碱性条件下则易发生 $\text{P}(\text{O})-\text{O}$ 键的断裂; 在中性的条件下, 具有相对的稳定性。为了考察 β -CD 是否对 D IPP-AA

的水解具有催化作用, 本实验对比了 DIPP-AA 和 β -CD 的混合液以及 DIPP-AA 溶液的质谱图随时间变化的情况。结果发现, 混合液中 β -CD 与 DIPP-AA 形成主客体复合物 (β -CD/DIPP-AA) 较快地转化为 β -CD 和氨基酸形成的主客体复合物 (β -CD/AA), 而同样的空白实验考察发现 DIPP-AA 在水溶液中自身的水解速度则较慢。由于 β -CD 作为人工模拟酶催化羧酸酯的水解反应的研究已相当成熟^[8], 其机制为环糊精的氧负离子进攻酯平面的羰基, 并参与形成新酯基平面的一部分。可以推测, β -CD 对 *N*-二异丙

氧磷酸化氨基酸的水解反应与环糊精催化羧酸酯的水解反应有着相似的催化历程。

图 2 中, DIPP-AA 和 β -CD 的混合液随时间的质谱变化可知, 复合物 β -CD/DIPP-AA 的信号随着时间的延长逐渐减弱, 而复合物 β -CD/AA 的信号在逐渐增强, 并且此过程中, 复合物 $[DIPP-AA + \beta-CD-42 + K]^+$ 峰随着时间的延长逐渐增大然后又逐渐减弱, 由此推测复合物 $[DIPP-AA + \beta-CD-42]$ 可能为 β -CD 催化水解反应的中间体。 β -CD 催化 DIPP-AA 的水解反应机制示于图 4。

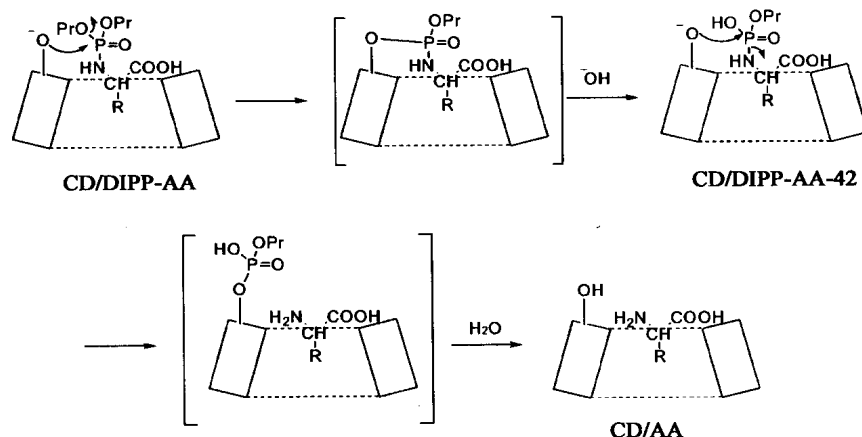


图 4 环糊精催化 *N*-磷酸化氨基酸水解的过程

Fig 4 Proposed mechanism for the hydrolysis of DIPP-AA in the presence of β -CD

3 结论

利用电喷雾离子阱多级质谱对 β -CD 和 DIPP-AA 以及氨基酸形成的复合物进行了 CD 裂解研究, 发现二者具有不同的裂解特点。 β -CD 可催化 DIPP-AA 的水解反应, 由此对 β -环糊精对 DIPP-AA 的水解反应机制进行了推测。有关环糊精催化 DIPP-AA 水解反应的动力学有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Ganem B, Li Y, Henion JD. Detection of Noncovalent Receptor-ligand Complexes by Mass Spectrometry [J]. J Am Chem Soc, 1991, 113: 6 294~ 6 296
- [2] 王红霞, 杨松成. 蛋白质非共价复合物的电喷雾研究进展[J]. 药科学, 2001, 36(4): 315~ 320
- [3] Breslow R, Desper J, Huang Y. A Selective Intramolecular Aldol Condensation Directed by a Bi-

functional Enzyme Mimic [J]. Tetrahedron Letters, 1996, 37(15): 2 541~ 2 544

- [4] 刘俊秋, 宁永刚, 时成波, 等. 硒代 β -环糊精模拟谷胱甘肽过氧化物酶的研究-6-位硒桥联 β -环糊精的合成、性质及表征[J]. 高等学校化学学报, 1998, 19(9): 1 446~ 1 448
- [5] 宋发军, 丁志刚, 黄文胜, 等. β -环糊精衍生物的金属配合物催化 RNA 的水解[J]. 分子催化, 2001, 15(2): 139~ 142
- [6] Sun W X, Liu J Q, Cui M, et al. Cyclodextrin-catalyzed Oxidation of Glutathione in Solution and in an Ion Trap [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1999, 13: 950~ 953
- [7] Ji G J, Xue C B, Zhao Y F, et al. Synthesis of *N*-(diisopropoxyphosphoryl) Amino Acids and Peptides [J]. Synthesis, 1988, 6: 444~ 448
- [8] 操 锋, 任 勇, 华维一, 等. 利用人工模拟酶环糊精催化羧酸酯水解反应的研究进展[J]. 有机化学, 2002, 11: 827~ 834