

甘露糖磷酰氨基酸缀合物的 ESI-MS 研究

孙 麒¹, 马 强¹, 何 立¹, 巨 勇^{1,2}, 赵玉芬¹

(1. 清华大学化学系生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084;

2. 兰州大学应用有机化学国家重点实验室, 兰州 730000)

摘要 一系列全乙酰保护甘露糖-1-磷酰氨基酸酯缀合物的 α 构型和 β 构型异构体的 ESI-MSⁿ 裂解规律研究表明, β 构型异构体会出现一系列特征的 m/z 433, 391, 371 的碎片离子, 且 $[M - CH_2 = CHCH_3 + Na]^+$ 碎片丰度较大. $[M - \text{糖基} + Na]^+$ 和 $[\text{糖基} + Na]^+$ 碎片相对丰度较小. α 构型分子反之. 同时对全乙酰保护的 $[\text{糖基} + Na]^+$ m/z 353 碎片离子进行三级碎裂, 其主要特征是消除 $CH_2 = C = O$ 和 AcOH 中性分子的碎片离子, 而且其它位羟基构型的差异对质谱中碎裂方式影响不大.

关键词 甘露糖磷酰氨基酸缀合物; 电喷雾质谱; 裂解规律

中图分类号 O62; O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)06-1070-05

糖磷酰肽是生物体内一类重要的免疫原决定簇^[1~3], 研究表明这一类化合物具有重要的生物活性. 在过去的十几年中, 科学家们已经发现了很多种生源的糖磷酰肽和糖磷酰蛋白^[1]. 例如 Guha-Niyogi 等^[4] 在利什曼虫的多种重要蛋白中发现甘露糖- α -1-*P*-丝氨酸残基; Haynes 等^[5] 研究发现原虫枯氏锥虫的抗原是木糖-1-*P*-*O*-丝氨酸或者苏氨酸. 化合物 Phosphoramidon 是从多种放射菌培养基的滤出液中分离得到的嗜热菌蛋白酶的一种专一高效的抑制剂^[6], 它的核心结构骨架是鼠李糖- α -1-*P*-亮氨酸-色氨酸. 近年来, 随着这类化合物活性报道的增多, 其化学合成方法的研究也逐渐增多^[7~9]. 为了深入研究这类化合物的结构与活性之间的关系, 我们合成了一系列糖磷酰肽类化合物的核心片段糖磷酰氨基酸^[8,9]. 本文采用电喷雾串联质谱(ESI-MS) 对此类化合物进行研究, 结果表明糖磷酰氨基酸缀合物具有特征的 ESI-MS 裂解规律, 这些规律对确定该类化合物的结构以及其代谢机理研究具有重要意义.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

D-葡萄糖、*D*-半乳糖和 *D*-甘露糖均购自北京化学试剂公司. 所有氨基酸(层析纯)购自北京百泰生物公司, 均为 *L* 型. 其它试剂均为分析纯. Bruker AM400 核磁共振仪, Bruker AC200P 核磁共振仪, Bruker Esquire-LC 离子阱质谱仪.

1.2 样品制备

按文献[8,9]方法合成的两组异端碳分别为 α 构型和 β 构型的 *N*-[*O*-异丙氧基-*O*-(2,3,4,6-四乙酰基)-*D*-甘露糖-1-磷酰]氨基酸甲酯(1a ~ 1f, 2a ~ 2f)、*N*-[*O*-异丙氧基-*O*-(2,3,4,6-四乙酰基)- β -*D*-半乳糖-1-磷酰]丙氨酸甲酯(3a)和 *N*-[*O*-异丙氧基-*O*-(2,3,4,6-四乙酰基)- β -*D*-葡萄糖-1-磷酰]丙氨酸甲酯(4a). 所有样品的结构均由 ¹H NMR, ¹³C NMR, ³¹P NMR, ESI-MS 和 HRMS 等方法确认. 合成路线及化合物的结构如 Scheme 1 所示.

1.3 质谱条件

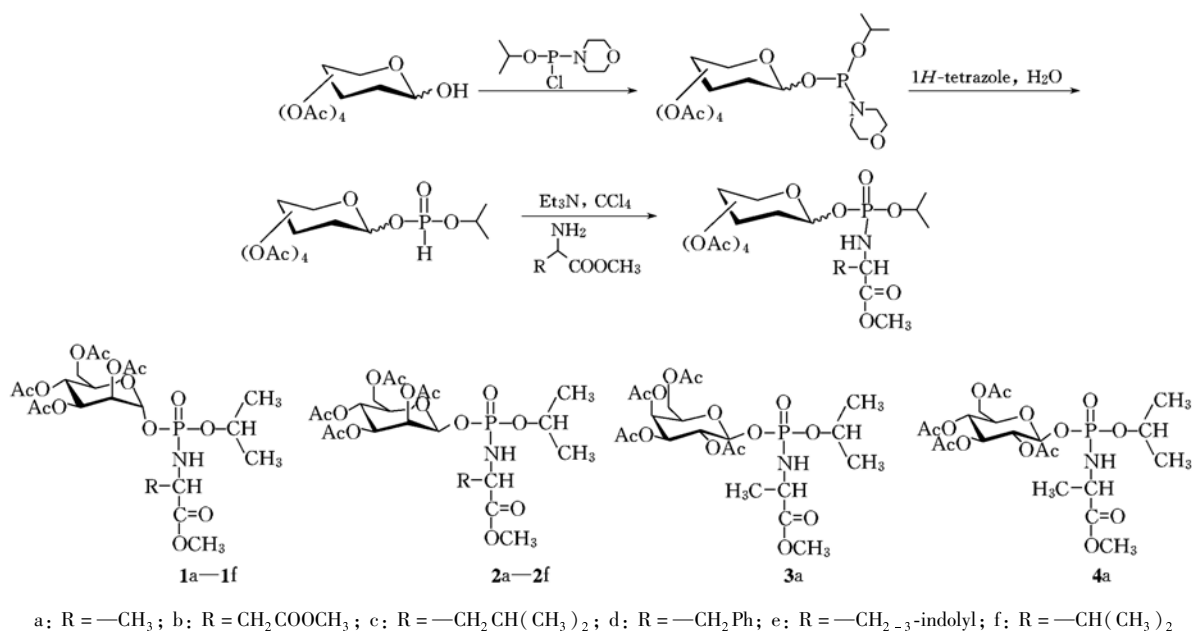
电喷雾多级质谱(ESI-MSⁿ) 分析在 Bruker Esquire-LC 离子阱质谱仪上进行. 样品溶于甲醇, 然后

收稿日期: 2005-05-24.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20172033, 20542004)和教育部博士学科点基金资助.

联系人简介: 巨 勇(1961 年出生), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事有机化学及化学生物学研究.

E-mail: juyong@mail.tsinghua.edu.cn



Scheme 1 The syntheses and structures of compounds 1—4

通过 Cole-Parmer 74900 注射泵打入电喷雾质谱仪进行分析. 喷雾器压力为 0.492 1 kg/cm², 干燥 N₂ 气流速为 4 L/min, 温度为 300 °C, 喷雾针电压为 4 kV, 平均扫描次数为 50 次一张图. 多级质谱中 He 气作为碰撞气体.

2 结果与讨论

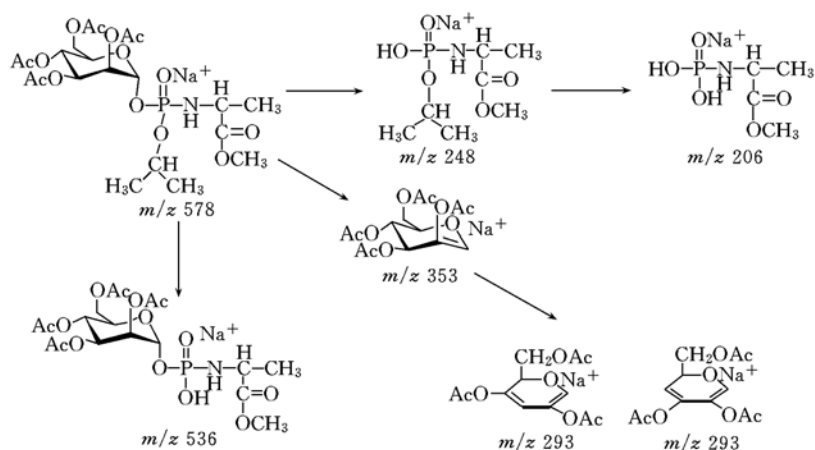
两组化合物 1a~1f 和 2a~2f 的正离子电喷雾质谱都有丰度最强的钠加合准分子离子峰 [M + Na]⁺, 而 [M + H]⁺ 和 [M + K]⁺ 峰的强度相对较弱. 以准分子离子峰 [M + Na]⁺ 为先导离子作二级电喷雾质谱 (ESI-MS²), 数据见表 1.

Table 1 ESI-MS/MS spectral data of [M + Na]⁺ ions of compounds 1a—1f and 2a—2f

Comp.	[M + Na] ⁺ , m/z	Main fragment ions, m/z (%)
1a	578	578.0(31), 536.2(8), 353.1(68), 293.1(14), 251.0(14), 248.0(100), 206.0(14)
2a	578	578.0(42), 536.1(100), 391.0(73), 476.2(6), 433.1(6), 371.0(48), 353.0(44), 292.9(9), 250.9(10), 247.9(48), 205.9(12)
1b	636	636.0(39), 594.2(6), 353.0(8), 305.9(100), 263.1(7), 183.9(14)
2b	636	636.2(38), 594.1(72), 534.2(4), 433.1(5), 391.0(100), 371.1(22), 353.1(10), 306.0(42), 263.9(18), 183.8(13)
1c	620	620.0(37), 578.1(8), 353.1(30), 290.1(100), 251.1(5), 248.1(13), 202.1(9)
2c	620	621.0(24), 578.1(64), 432.8(5), 390.8(100), 370.8(93), 352.8(19), 289.8(36), 247.8(22), 201.7(11)
1d	654	654.0(62), 612.2(5), 353.0(19), 324.0(100), 281.9(11), 250.9(5), 235.9(7), 201.9(23)
2d	654	655.2(29), 612.2(53), 552.1(3), 432.8(7), 390.8(100), 370.8(54), 352.9(12), 323.8(20), 281.7(19), 235.7(8), 201.8(14)
1e	693	693.2(41), 651.2(5), 363.0(100), 353.0(4), 321.0(15), 274.9(9), 240.9(47)
2e	693	694.2(28), 651.2(65), 591.1(3), 432.8(7), 390.8(100), 370.8(43), 362.9(24), 320.8(34), 274.7(28), 240.8(36)
1f	606	606.2(18), 564.1(9), 352.9(46), 292.9(9), 275.9(100), 250.9(8), 233.9(13), 187.9(9)
2f	606	606.0(27), 564.0(66), 504.1(4), 433.0(5), 391.1(80), 371.1(100), 353.2(19), 311.2(7), 276.1(21), 251.1(8), 234.1(13), 188.1(9)

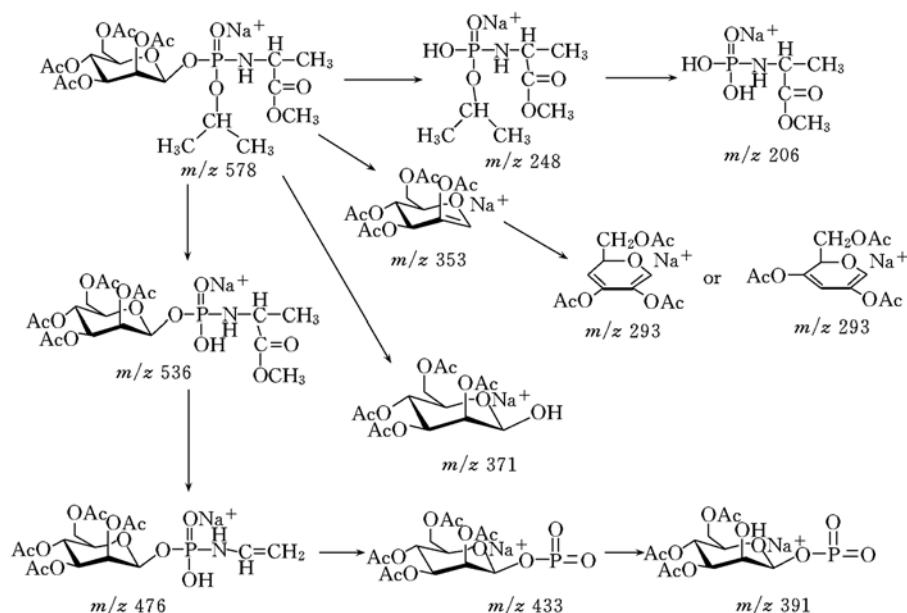
以 *N*-[*O*-异丙氧基-*O*-(2,3,4,6-四乙酰基)-*D*-甘露糖-1-磷酰]丙氨酸甲酯 (1a, 2a) 为例, α 构型分子 (1a) 的准分子离子峰 [M + Na]⁺ 主要的裂解碎片有 [M - 糖基 + Na]⁺ (*m/z* 248) 和 [糖基 + Na]⁺ (*m/z* 353), 是糖基异端碳上 C—O 键断裂产生的. 可能的裂解规律如 Scheme 2 所示.

而 β 构型分子 (2a) 的准分子离子峰 [M + Na]⁺ *m/z* 578 的二级谱中, [M - 糖基 + Na]⁺ *m/z* 248 和



Scheme 2 The proposed fragmentation pathways of ion $[M + Na]^+$ at m/z 578 of compound 1a

$[\text{糖基} + \text{Na}]^+$ m/z 353 丰度都明显降低, 这说明异端碳上 C—O 键的断裂不是 β 构型分子主要的碎裂方式. β 构型分子裂解碎片中相对丰度最强的是 $[M - 42 + Na]^+$ m/z 536 碎片离子, 它是母离子失去 $\text{CH}_2 = \text{CHCH}_3$ 中性分子形成的. 在 α 构型分子中, 这个碎片离子的相对丰度很小, 这说明 β 构型分子异端碳上 C—O 键的稳定性大于 α 构型分子的相应 C—O 键的稳定性, 不容易断裂. β 构型分子的 ESI-MS² 谱还出现 3 个特征碎片 m/z 433, 391, 371. 其中 m/z 433, 391 分别为母分子失去氨基酸残基和异丙氧残基产生的碎片离子, 而且 m/z 433 的丰度远远小于 m/z 391 的丰度, 说明 m/z 433 碎片离子失去了一个碎片分子后, 能够得到更加稳定的 m/z 391 碎片离子, 推测应该是糖基 2 位上的乙酰基上失去一个 $\text{CH}_2 = \text{C} = \text{O}$ 中性分子. 碎片离子 m/z 371 是由糖磷酸胺缀合物失去糖上磷酸部分产生的糖与钠加合的碎片离子. 可能的裂解途径见 Scheme 3.



Scheme 3 The proposed fragmentation pathways of ion $[M + Na]^+$ at m/z 578 of compound 2a

综合两组化合物 1a ~ 1f 和 2a ~ 2f 的 ESI-MS 数据可以发现, α 构型分子和 β 构型分子裂解规律最大的差异在于不同构型异端碳上 C—O 键的断裂. β 构型分子 C—O 键较稳定, 出现特征的 m/z 433, 391, 371 碎片, 同时 $[M - \text{CH}_2 = \text{CHCH}_3 + \text{Na}]^+$ 碎片相对丰度很大, 而 $[M - \text{糖基} + \text{Na}]^+$ 和 $[\text{糖基} + \text{Na}]^+$ 碎片丰度相对较小; 而 α 构型分子的 C—O 键较易断裂, 裂解碎片中没有 m/z 433, 391, 371; $[M - \text{CH}_2 = \text{CHCH}_3 + \text{Na}]^+$ 碎片相对丰度很小, 而 $[M - \text{糖基} + \text{Na}]^+$ 和 $[\text{糖基} + \text{Na}]^+$ 碎片相对丰度较大. 推测其裂解规律的形成可能是由于糖基的乙酰基保护基团与异端碳上不同构型的磷酸酯取代基的相互作用所致.

为了进一步研究出现不同裂解规律的原因, 分别对 *N*-[*O*-异丙氧基-*O*-(2,3,4,6-四乙酰基)- β -*D*-甘露糖-1-磷酰]丙氨酸甲酯(2a)的半乳糖和葡萄糖类似物: *N*-[*O*-异丙氧基-*O*-(2,3,4,6-四乙酰基)- β -*D*-半乳糖-1-磷酰]丙氨酸甲酯(3a)和 *N*-[*O*-异丙氧基-*O*-(2,3,4,6-四乙酰基)- β -*D*-葡萄糖-1-磷酰]丙氨酸甲酯(4a)的 $[M + Na]^+$ (m/z 578 峰)进行二级质谱研究, 主要裂解碎片见表 2. 有趣的是, 对于乙酰保护的葡萄糖与半乳糖, 其 β 构型的磷酰化产物(3a, 4a)与 α 构型的甘露糖的磷酰化产物(1a)具有类似的 ESI-MS² 裂解规律. 其结果可能与甘露糖磷酰氨基酸缀合物中甘露糖的 2 位羟基的构型影响有关.

Table 2 ESI-MS/MS spectral data of $[M + Na]^+$ m/z 578 of compounds 1a—4a

Comp.	Main fragment ions of $[M + Na]^+$ m/z 578 ions [m/z (%)]
1a	578.0(42), 536.1(100), 391.0(73), 476.2(6), 433.1(6), 371.0(48), 353.0(44), 292.9(9), 250.9(10), 247.9(48), 205.9(12)
2a	578.0(31), 536.2(8), 353.1(68), 293.1(14), 251.0(14), 248.0(100), 206.0(14)
3a	578.2(48), 536.1(4), 353.1(14), 250.9(3), 248.0(100), 206.0(9)
4a	578.1(17), 536.1(3), 353.1(61), 293.0(7), 251.0(8), 248.0(100), 206.0(9)

同时对糖基部分进行三级碎裂, 图 1 是对化合物 1a 的 $[\text{糖基} + Na]^+$ m/z 353 碎片的三级碎裂质谱图. 主要的裂解途径是消除 AcOH 和 $CH_2=C=O$ 中性分子. 其可能的裂解途径如 Scheme 4 所示.

对全乙酰保护的半乳糖和葡萄糖的磷酰氨基酸酯缀合物 3a 和 4a 的 $[\text{糖基} + Na]^+$ m/z 353 碎片进行三级碎裂, 得到类似的裂解特征. 它们仅在碎片离子强度上有细微的变化, 说明糖上羟基的构型差异对糖基部分的碎裂影响不大.

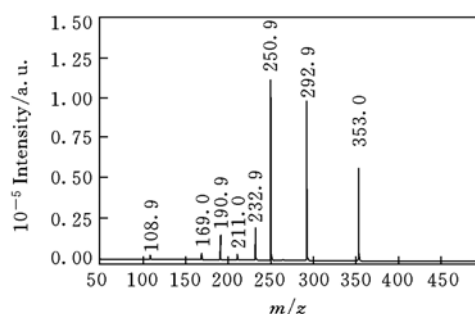
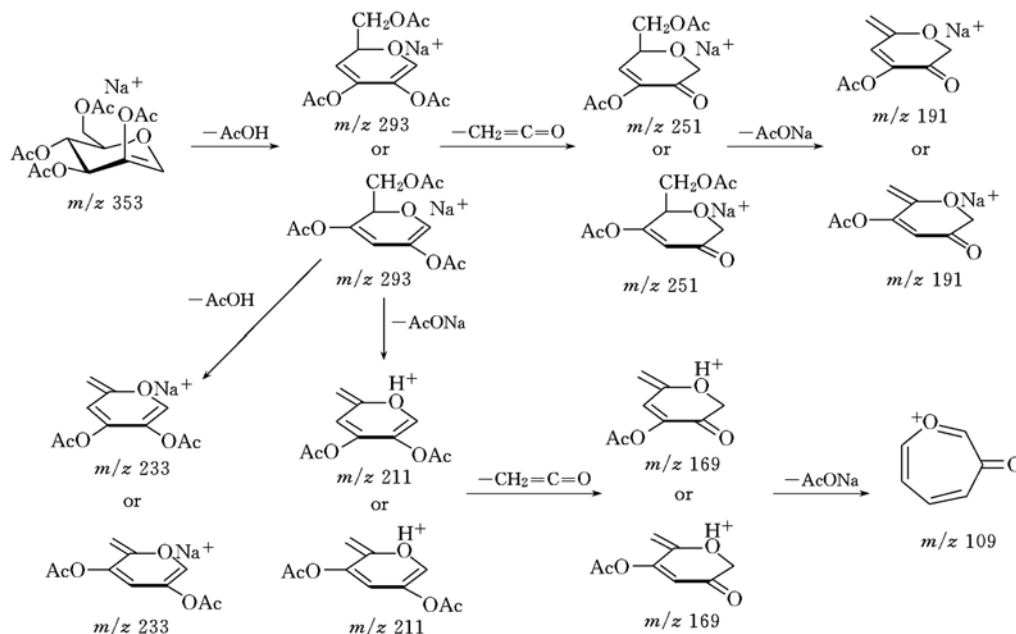


Fig. 1 Positive ion ESI-MS/MS spectrum of the ion $[\text{sugar} + Na]^+$ at m/z 353 of compound 1a



Scheme 4 The fragmentation pathways of ion $[\text{sugar} + Na]^+$ at m/z 353 of compound 1a

3 结 论

研究发现, 全乙酰保护甘露糖 1-磷酰氨基酸酯缀合物的 α 构型和 β 构型异构体的电喷雾质谱 (ESI-MS) 具有特征的裂解规律: β 构型分子会出现一系列特征的 m/z 433, 391, 371 碎片离子, 而且 $[M - CH_2=CHCH_3 + Na]^+$ 碎片的相对丰度较大, $[M - \text{糖基} + Na]^+$ 和 $[\text{糖基} + Na]^+$ 碎片相对丰度较

小. α 构型分子反之. 裂解规律的形成可能在于不同构型异端碳上 C—O 键断裂的难易程度的差异. 这些规律对确定该类化合物的结构以及进一步代谢机理研究具有重要意义.

参 考 文 献

- [1] Haynes P. A. . Glycobiology[J], 1998, **8**(1): 1—5
- [2] Taylor C. M. . Tetrahedron[J], 1998, **54**: 11317—11362
- [3] Spiro R. G. . Glycobiology[J], 2002, **12**(4): 43R—56R
- [4] Guha-Niyogi A. , Sullivan D. R. , Turco S. J. . Glycobiology[J], 2001, **11**(4): 45R—59R
- [5] Haynes P. A. , Ferguson M. A. J. , Cross G. A. M. . Glycobiology[J], 1996, **6**: 869—878
- [6] Suda H. , Aoyagi T. , Takeuchi T. *et al.* . J. Antibiot. [J], 1973, **26**: 621—623
- [7] Elsayed G. A. , Boons G. J. . Syn. Lett. [J], 2003, **9**: 1373—1375
- [8] Sun Q. , Xiao Q. , Ju Y. *et al.* . Chin. Chem. Lett. [J], 2003, **14**(7): 685—688
- [9] Xiao Q. , Sun J. , Ju Y. *et al.* . Synthesis[J], 2003, (1): 107—112

Studies on ESI-MS of Mannosyl-1-phosphoramidates

SUN Qi¹, MA Qiang¹, HE Li¹, JU Yong^{1,2*}, ZHAO Yu-Fen¹

(1. *The Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry, Ministry of Education, Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China;*

2. *National Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*)

Abstract Phosphoglycoproteins are a kind of compounds that have many important biological functions. In order to study the relationship between the structure and the biological functions of these compounds, some core structures (glycosyl-1-phosphoramides) of these compounds were synthesized. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was used to study the fragmentation characteristics of various types of acetyl protecting mannosyl-1-phosphoramidates. The results show that there are very different characteristics between α - and β -anomeric isomers. The ESI-MS² spectra of the quasi-molecular ion $[M + Na]^+$ of β -anomeric isomers show characteristic fragment ions at m/z 433, 391 and 371; and the relative abundance of fragment ion $[M - CH_2 = CHCH_3 + Na]^+$ peak is much higher than that of α -anomeric isomers. That this characteristic fragmentation should be due to the interaction of the phosphoramidate group at the anomeric carbon and the acetyl protecting groups of the hydroxyl groups, especially the acetyl protecting group at C2. Meanwhile, the ESI-MS³ spectrum of fragment ion $[sugar + Na]^+$ m/z 353 of different isomers of acetyl protecting glycosyl-1-phosphoramidates shows the same fragmentation pattern including the loss of molecules of $CH_2 = C = O$ and AcOH and is not effected by the other position configuration.

Keywords Mannosyl-1-phosphoramidate; ESI-MS; Fragmentation pattern

(Ed. : H, J, Z)