

УДК 547.327:543.51

**А. И. Грень, А. В. Мазепа, И. М. Ракипов**Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины,  
отдел молекулярной структуры.

86, Люстдорфская дорога, 65080, Одесса, 65080, Украина

**ФРАГМЕНТАЦИЯ RGD-ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ, СОДЕРЖАЩИХ  
ФРАГМЕНТ ПИПЕРАЗИНА, В УСЛОВИЯХ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ  
ББА**

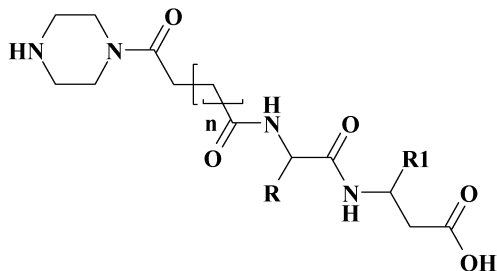
Методом масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами в режиме положительных и отрицательных ионов изучена фрагментация ряда RGD-пептидомиметиков, содержащих фрагмент пиперазина. Установлены основные направления распада и аналитические признаки исследуемых соединений.

Ключевые слова: RGD-пептидомиметики, масс-спектрометрия ББА, механизм фрагментации.

RGD-пептидомиметики [1, 2] являются перспективными антагонистами фибриногеновых рецепторов и обладают антиагрегационной активностью. В установлении структуры и идентификации подобных соединений весьма эффективным является метод масс-спектрометрии. Однако эти вещества характеризуются низкой летучестью и термической неустойчивостью, что затрудняет анализ их масс-спектров электронного удара [3]. В связи с этим нами использован метод масс-спектрометрии бомбардировки быстрыми атомами (ББА), который позволяет анализировать такого рода образцы без их испарения путем десорбции с поверхности раствора протонированных и депротонированных молекул. При этом наблюдаемые в спектре пики характеризуются значительной интенсивностью [4–6]. Основные направления фрагментации четно-электронных катионов и анионов пептидов в масс-спектрометрах ББА обусловлены разрывами пептидных или соседних с ними связей, что приводит к соответствующим последовательным сериям ионов [7–8]. Целью данной работы является исследование основных направлений распада RGD-пептидомиметиков, содержащих фрагмент пиперазина и установление основных аналитических признаков этих соединений в условиях масс-спектрометрии ББА.

**Материалы и методы исследования**

Исследуемые соединения синтезированы в отделе «Медицинской химии» ФХИ им. А. В. Богатского НАН Украины группой сотрудников под руководством академика Андронати С. А. Их чистота контролировалась методами тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии.



где  $n=1$ ,  $R=H$ ,  $R1=H$  (I),  $CH_3$  (II),  $C_6H_5$  (III), 5-бензо-[1,3]-диоксолил (IV);  
 $R=CH_3$ ,  $R1-C_6H_5$  (V);  
 где  $n=2$ ,  $R=H$ ,  $R1=3-MeO-C_6H_5$  (VI).

Для получения масс-спектров ББА использовались растворы исследуемых соединений в 3-нитробензиловом спирте (фирма Merck) с концентрацией 0,01М. Масс-спектры, спектры ионов-продуктов (В/Е-связанное сканирование) регистрировались на масс-спектрометре VG 7070 (VG Analytical, Великобритания). Десорбция ионов с поверхности жидкой фазы осуществлялась пучком атомов аргона с энергией 8 кэВ.

### Результаты исследования и их анализ

В масс-спектрах гидрохлоридов соединений I–VI, наблюдаются интенсивные пики ионов протонированных молекул, подтверждающие их предполагаемый состав. Последующая фрагментация молекулярных ионов индуцируется зарядом, который может локализоваться на различных участках молекул. Поскольку носителем заряда в протонированных частицах выступает протон, то можно ожидать, что фрагментация в значительной мере будет обусловлена местами его локализации [9] и устойчивостью образующихся продуктов распада. Массовые числа и относительные интенсивности пиков протонированных молекул и образующихся в результате фрагментации основных осколочных ионов приведены в таблице 1.

Таблица 1

Массовые числа  $m/z$  и величины относительной интенсивности (%) пиков протонированных молекул и основных осколочных ионов соединений I–VI

Соединение	$[M+H]^+$	b	y	$b_1$	z	$b_2$	$y_2$	c	$c_2$
I	315 (100)	229 (23)	87 (13)	169 (95)	–	226 (5)	90 (15)	246 (6)	–
II	329 (100)	243 (19)	87 (13)	169 (100)	–	226 (6)	104 (6)	260 (2)	–
III	391 (100)	305 (27)	87 (49)	169 (74)	149 (16)	226 (5)	166 (10)	322 (9)	–
IV	435 (100)	349 (4)	87 (23)	169 (76)	193 (24)	226 (5)	208 (8)	366 (3)	243 (5)
V	405 (100)	319 (9)	87 (10)	169 (100)	149 (6)	240 (10)	166 (6)	336 (5)	–
VI	435 (100)	349 (2)	87 (11)	183 (71)	179 (50)	240 (8)	194 (8)	366 (1)	257 (7)

Направления фрагментации соединения **I** можно представить следующей схемой:

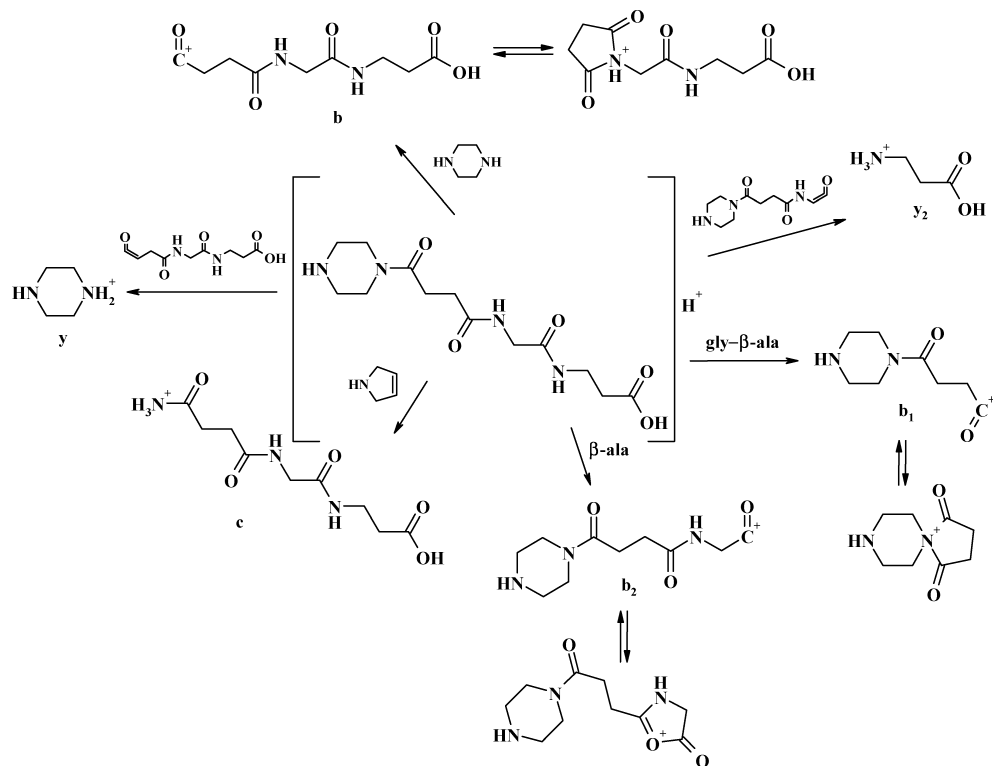


Схема 1

Образование ацильных ионов **b**-типа является следствием простого разрыва амидной связи, который сопровождается отщеплением термодинамически устойчивых нейтральных молекул. Как видно из таблицы 1, наибольшей интенсивностью обладают пики ионов **b<sub>1</sub>**, что позволяет предположить преимущественную локализацию протона на амидном фрагменте, образованном глицином и остатком янтарной кислоты.

Образование ионов **y** и **y<sub>2</sub>** так же происходит в результате диссоциации амидных связей, однако в этом случае она сопровождается миграцией атома водорода от метиленовой группы к соседнему амидному атому азота и элиминированием соответствующих нейтральных молекул кетенов.

Раскрытие пиперазинового цикла и отщепление нейтральной молекулы 2,5-дигидро-1Н-пиррола с одновременным протеканием перегруппировки двух атомов водорода, приводит к образованию ионов **c**.

Введение метильной группы в β-положение аланина не приводит к изменению направлений фрагментации. В масс-спектре соединения **II** наблюдаются пики осколочных ионов, аналогичные описанным выше.

В масс-спектрах соединений III–VI, содержащих ароматические заместители в β-положении аланина, кроме рассмотренных выше осколочных ионов наблюдаются ионы z (схема 2), что объясняется возможностью стабилизации катионного центра за счет его делокализации по сопряженной π-электронной системе с образованием тропилиевой структуры.

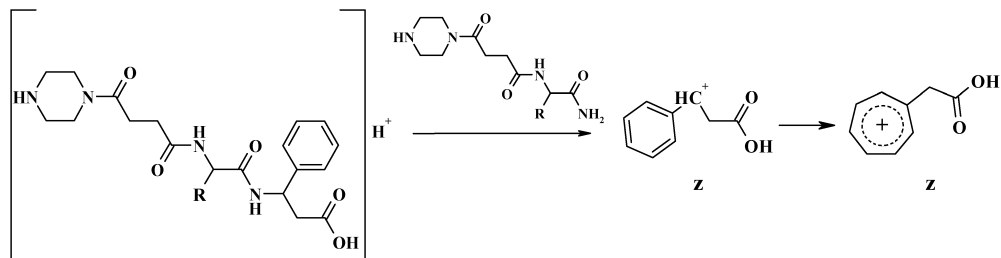


Схема 2

Присутствие алкоксильных заместителей в ароматическом цикле β-аланина (соединения IV и VI) способствует возникновению дополнительного направления фрагментации, приводящего к образованию ионов c<sub>2</sub> (схема 3). Можно предположить, что донорные свойства атомов кислорода облегчают диссоциацию C–N связи с перегруппировкой атома водорода из α-положения β-аланина к положительно заряженному атому азота, в результате чего отщепляется 3-бензо-[1,3]-диоксолил-5-акриловая кислота и образуются соответствующие фрагменты.

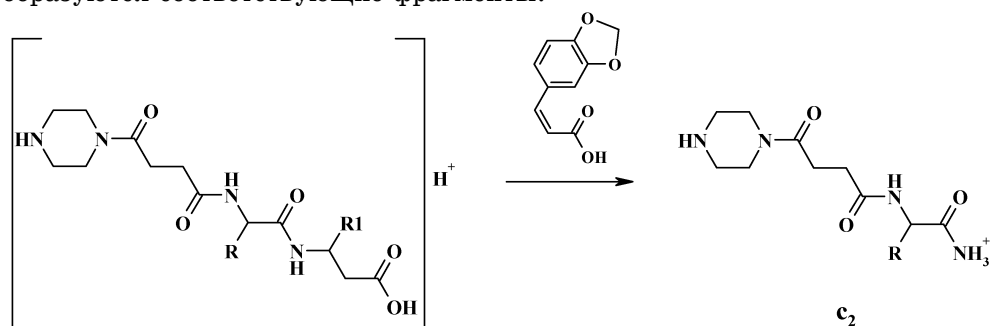


Схема 3

Замена остатка янтарной кислоты на глутаровую соединении VI, не изменяет основных направлений фрагментации. В масс-спектре этого соединения наблюдаются аналогичные осколочные ионы.

В масс-спектрах отрицательных ионов гидрохлоридов рассматриваемых соединений наблюдаются интенсивные пики депротонированных молекул [M–H]<sup>–</sup>, а так же пики аддуктных ионов [M+Cl]<sup>–</sup>. Массовые числа и величины относительной интенсивности молекулярных, аддуктных и основных осколочных ионов представлены в таблице 2.

Таблица 2

Массовые числа  $m/z$  и величины относительной интенсивности (%) пиков депротонированных молекул, аддуктов и основных осколочных ионов соединений I-VI

Соединение	[M-H] <sup>-</sup>	b	c	[M+Cl] <sup>-</sup>
I	313 (100)	227 (57)	245 (55)	349 (54)
II	327 (100)	241 (59)	259 (24)	363 (49)
III	389 (100)	303 (57)	321 (42)	425 (28)
IV	433 (100)	347 (18)	365 (18)	269 (33)
V	403 (100)	317 (10)	335 (77)	439 (37)
VI	433 (100)	347 (2)	365 (10)	469 (21)

Присутствие в масс-спектрах интенсивных пиков аддуктных [M+Cl]<sup>-</sup> ионов служит дополнительным подтверждением молекулярной массы исследуемого соединения. При этом, как видно из таблицы, основными осколочными ионами депротонированных молекул являются ионы **b** и **c**, масса которых на 2 и 1 а.е.м. меньше соответствующих ионов в спектрах положительных ионов.

Таким образом, приведенные данные позволяют сделать вывод о том, что основные направления фрагментации рассмотренных RGD-псевдопептидов в условиях масс-спектрометрии ББА обусловлены разрывом амидных связей индуцируемым локализованным на них протоном. Наряду с этим, реализация отдельных направлений фрагментации обусловлена исключительно устойчивостью образующихся фрагментов.

Основными аналитическими признаками изученных соединений являются интенсивный пик молекулярного иона и пики ионов **b<sub>1</sub>**, средней относительной интенсивности пик иона **z** в случае соединения **VI** и его отсутствие в спектрах соединений **I**, **II**, а также средней и низкой интенсивности пики ионов **b** в спектрах соединений **I-III** и **IV-VI** соответственно.

## Литература

1. *Andronati S. A. Peptidomimetics — antagonists fibrinogen receptors: molecular design, structures, properties and therapeutic applications / S. A. Andronati, T. L. Karaseva, A. A. Krysko // Current medicinal chemistry. — 2004. — V. 11. — P. 1183–1211.*
2. *Андронати С. А. Синтетические ингибиторы агрегации тромбоцитов — антагонисты фибриногеновых рецепторов / С. А. Андронати, А. А. Крысько // Вісник фармакології та фармації. — 2008. — № 1. — С. 17–27.*
3. *Фрагментация RGD-пептидомиметиков, производных аминокислот и аминокислот в условиях масс-спектрометрии бомбардировки быстрыми атомами / А. И. Грень, А. В. Мазепа, И. М. Ракипов [и др.] // Масс-спектрометрия. — 2007. — № 4. — С. 267–274.*

4. *Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry* / M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler // *Nature*. — 1981. — V. 293. — P. 270–275.
5. *Fast-atom-bombardment mass spectrometry. A new technique for determination of molecular weights and amino acid sequences of peptides* / D. H. Williams, C. V. Bradly, S. Santikarn, G. Bojesen // *Biochem. J.* — 1982. — V. 201. — P. 105–117.
6. *Fenselau C. Chemical aspects of fast atom bombardment* / C. Fenselau, R. J. Cotter // *Chem. Rev.* — 1987. — V. 87. — P. 501–512.
7. *Лебедев Альберт Тарасович. Масс-спектрометрия в органической химии* / А. Т. Лебедев. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. — 493 с., ил. — (Методы в химии). — ISBN 5-94774-052-4.
8. *Harrison A.G. Sequence-specific fragmentation of deprotonated peptides containing H or Alkyl side chains* / A. G. Harrison // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2001. — V. 12. — P. 1–13.
9. *Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: evidence for the mobile proton model* / A. R. Dongre, J. L. Jones, A. Somogyi, V. H. Wysocki // *J. Am. Chem. Soc.* — 1996. — V. 118. — P. 8365–8374.

**А. І. Грень, О. В. Мазепа, І. М. Ракіпов**

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України,  
відділ молекулярної структури,  
86, Люстдорфська дорога, Одеса, 65080, Україна

### **ФРАГМЕНТАЦІЯ RGD-ПЕПТИДОМІМЕТИКІВ, ЯКІ МІСТЯТЬ ФРАГМЕНТ ПІПЕРАЗІНУ, В УМОВАХ МАС-СПЕКТРОМЕТРІЇ БПА**

#### **Резюме**

Методом мас-спектрометрії з бомбардуванням прискореними атомами в режимі позитивних та негативних іонів вивчена фрагментація ряду RGD-пептидоміметиків, які містять фрагмент піперазіну. Встановлені основні напрямки розпаду та аналітичні ознаки досліджуваних сполук.

**Ключові слова:** RGD-пептидоміметики, мас-спектрометрія БПА, механізм фрагментації.

**A. I. Gren, A. V. Mazepa, I. M. Rakipov**

A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine,  
Department of Molecular Structure,  
86, Lustdorfskaya Doroga, Odessa, 65080, Ukraine

### **FRAGMENTATION OF RGD-PEPTIDOMIMETICS CONTAINING PIPERAZINE FRAGMENT IN FAB MASS SPECTROMETRY CONDITIONS**

#### **Summary**

Fragmentation of series RGD-peptidomimetics containing piperazine fragment was studied by positive and negative mode of fast atom bombardment mass spectrometry. Main decay pathways and analytical characters of analyzed compounds were determined.

**Key words:** RGD-peptidomimetics, FAB mass spectrometry, fragmentation mechanism.