

## Amino acid Thiohydantoin 誘導體의 質量分析 (第 II 報)

宋 庚 德

朝鮮大學校 師範大學 家政教育學科

### Mass Spectrometric Identification of Thiohydantoin Derived from Amino Acids (II)

Kyung-Duck Song

Department of Home Economics, Teachers College, Cho sun University

#### Abstract

The method of amino acid sequence determination from the C-terminal amino acid is proposed and mass spectrometric identification of thiohydantoin described previously.

In this paper was discussed the fragmentation of thiohydantoin-ring by deuterio substitution and model tripeptide have been degraded through three stages each, with interpretable results. The conditions employed in this method are mild enough for biological materials.

The main features of the method are the following.

1. Thiohydantoin were formed in a non-aqueous medium a mixture of acetic anhydride, acetic acid and ammonium thiocyanate.
2. Mass spectra of thiohydantoin derived from 20 amino acids were obtained with a mass spectrometer, JEOL model JMS-06 H.
3. Cleavage of peptidyl thiohydantoin was made with an acidic form of a cation-exchange resin. (Amberlite IR-120)
4. Separation of the cleaved thiohydantoin and the parent peptide less one amino acid moiety was made by chromatography on a Sephadex G-10 column.
5. The peptide fraction was concentrated by freeze-drying.
6. Thiohydantoin derivative of carboxyl terminal amino acid residue was introduced with a direct inlet probe in methanol solution.

#### 緒 論

第 1 報에서는 標準試料의 製造·確認 및 이들 誘導體의 質量分析 결과 解裂樣式에 대한 所見에 대하여 論하였다.

本稿에서는 이들 誘導體가 共通으로 가지고 있는 thiohydantoin 環이 어떠한 解裂樣式을 나타내는가를

檢討함과 동시에, model peptide 를 사용한 C 末端으로부터의 逐次分析結果에 대하여 報告하고자 한다.

解裂은 側鎖의 종류에 따라 差異가 있을 것을 예상하여 glycine, alanine, valine,  $\alpha$ -amino butyric acid 의 thiohydantoin 誘導體에 대하여 檢討하였다. 手段으로서의 重水素置換에 의한 解裂樣式의 變化 및 高分解能 質量分析器를 이용하였다.

**Table 1. Results of Carboxyl-Terminal Degradations with Peptides and Proteins of Known Structure.**

Peptide or Protein	Residues Identified as Carboxyl Terminal	Method
Oxidized phenylalanyl chain, bovine insulin a), g)	ala (1), lys (2)	
Tryptic peptide, residues 1-22 of the oxidized phenylalanine chain	arg (1) <sup>a)</sup> , glu (2) <sup>a)</sup> , gly (3) <sup>a)</sup> , cySO <sub>3</sub> H (4) <sup>a)</sup> , val (5) <sup>a)</sup> , leu (6) <sup>a)</sup>	消去法
Residues 1-16 of the oxidized phenyl alanine chain, g)	try (1), leu (2), ala (3), glu (4)	消去法
Oxidized glycyl chain, insulin, g)	asn (1), cySO <sub>3</sub> H (2), tyr (3)	
Bovine pancreatic ribonuclease A	val (1) <sup>b)</sup> , ser (2) <sup>b)</sup> , ala (3) <sup>b)</sup>	h) : TLC g) : 消去法
Sperm whale myoglobin, c)	gly (1)	
Hen's egg white lysozyme, d)	leu (1)	酵素法
Porcine glucagon	thr (1) <sup>e)</sup> , asn (2) <sup>e)</sup> , met (3) <sup>e)</sup>	消去法
E. coli aspartate transcarbamylase catalytic subunit f)	leu (1)	酵素法
E. coli aspartate transcarbamylase regulatory subunit f)	asn (1)	酵素法
Glutathione, i)	gly (1)	

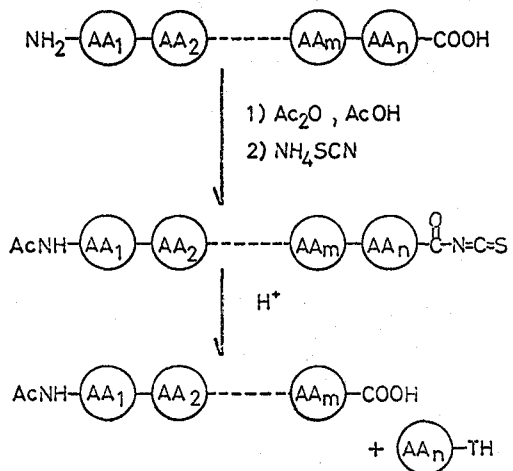
a) 1956 (1)    b) 1963 (2)    c) 1965 (3)    d) 1963 (4)    e) 1957 (5)    f) 1965 (6)    g) 1968 (7)  
h) 1971 (8)    i) 1930 (9)

C 末端으로부터 逐次分析에 의하여 알려져 있는 C 末端 殘基는 Table 1 과 같다. Thiohydantoin 法에 의한 逐次反應의 原理는 Fig. 1 에 나타낸 바와 같으며 C 末端 amino acid 에 形成되어져 있는 thiohydantoin 誘導體의 切斷은 緩和한 切斷條件으로 提案된 山下의 方法을 導入하여 amberlite IR-120 을 使用하였다. 樹脂에 의한 切斷反應은 Collins<sup>(10)</sup>에 의하여 提案된 이온 交換樹脂의 存在下에서 1-benzoyl-1, 2-dihydroquin-aldamide 가 1-benzoyl-1, 2-dihydroquinaldic acid 로 되어 選擇的으로 amide 結合이 切斷되는 反應을 이 용한 것이다.

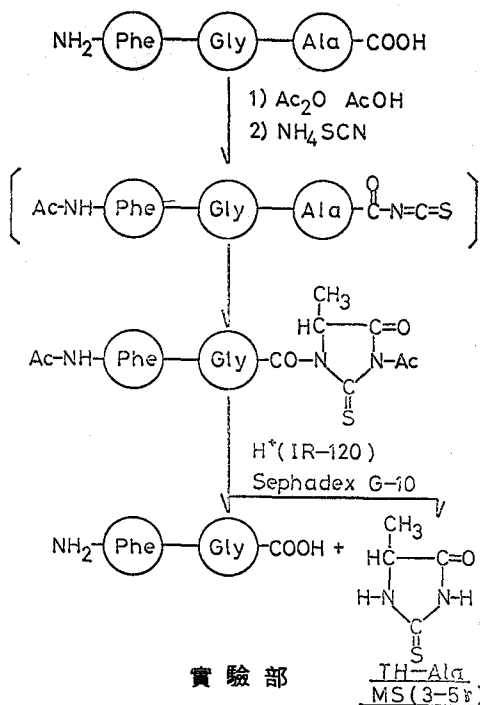
Model peptide 로서는 tripeptide 인 phenylalanyl glycylalanine 을 製造하여 使用하였으며 切斷된 thiohydantoin 誘導體를 分離할 경우에는 sephadex G-10 의 column 을 使用하였다. 溶離液을 濃縮하여 methanol 溶液으로 質量分析器에 직접 導入하여 얻어지는 mass spectrum 의 結果를 解析하여 標準試料와 比較 檢討하였다.

**Fig. 1.**

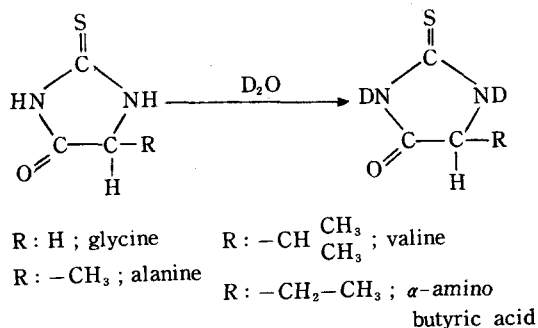
THIOHYDANTOIN METHOD



**Fig. 2.**  
**Modification of TH Method**



1. 重水素置換體의 mass spectrum 의 測定



**Fig. 3. Substitution with deuterio water**

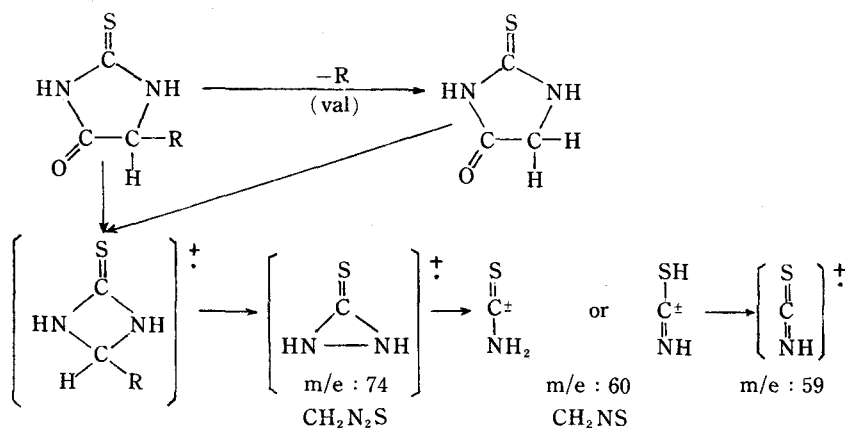
(1) 材料: TH-glycine, TH-alanine, TH-valine 은 第 1 報에서 製造한 것을 사용하였다.

5-ethyl-2-thiohydantoin 은 α-amino butyric acid 를 사용하여 常法에 따라 製造하였다.

DTH-glycine, DTH-alanine, DTH-valine, 5-ethyl DTH 는 元來의 重水로서 2回 再結晶하여 製造하였다.

(2) 機械: 質量分析器; JEOLCO JMS-06H, 高分解能 質量分析器; JEOLCO JMS-01SG-2

(3) 測定條件: 第 1 報와 同一



R: H (gly, val) m/e : 88

R: -CH<sub>3</sub> (ala) m/e : 102

C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>S

**Fig. 4. Fragmentation of thiohydantoin-ring**

Table 2. Identification of fragment peaks by deuterio substitution

Chart No.	glycine	m/e and relative %										
		116	117	118	88	89	90	59	60	61	62	ex. %
MT-1	TH-gly	100	5	5	17	4	6	18	24	—	—	
DMT-1	DTH-gly	9	37	100	5	13	31	92	42	24	38	54.7

Chart No.	alanine	m/e and relative %										
		130	131	132	102	103	104	59	60	61	62	ex. %
MT-2	TH-ala	100	8	7	21	—	4	18	27	7	—	
DMT-2	DTH-ala	7	41	100	4	16	40	17	61	33	43	66.8

Chart No.	valine	m/e and relative %										
		158	159	160	116	117	118	59	60	61	62	ex. %
MT-3	TH-val	64	8	4	100	9	6	10	20	—	—	
DMT-3	DTH-val	12	42	55	26	90	100	13	29	27	23	50.5

Chart No.	$\alpha$ -a b a	m/e and relative %										
		144	145	146	116	117	118	59	60	61	62	ex. %
MT-22	5 Et-TH	80	6	5	46	4	3	49	10	3	—	
DMT-22	5 Et-DTH	5	31	95	11	38	36	13	39	37	47	69.1

$\alpha$ -a b a :  $\alpha$ -amino butyric acid

□ : Percentage of molecular peak

2. Model tripeptide 의 逐次切斷反應

(1) 材料 : phenylalanyl glycyl alanine<sup>(11, 12, 13)</sup> 通常化學合成에 의하여 製造한.

樹脂 : sephadex G-10 (分離用)

amberlite IR-120 (切斷用 : 活性化)<sup>(14)</sup>

Column : 1.0 cm × 13 cm

溶解液 : 50% CH<sub>3</sub>COOH

(2) 實驗 : phenylalanyl glycyl alanine 6 mg (20  $\mu$  mole) 에 초산 0.1 ml, 無水초산 0.9 ml 및 NH<sub>4</sub>SCN 50 mg을 加하여 40°C 의 水浴上에서 4時間동안 攪拌하여 反應시켰다. 減壓濃縮後 물 2 ml 와 amberlite IR-120<sup>(8)</sup> 酸性樹脂 4g을 加하여 40°C 의 水浴上에서 3時間 정도 攪拌하여 다시 減壓濃縮시켰다. 殘渣에 50% 초산을 加하여 全量을 10 ml 로 하여 그 중 0.5 ml (1  $\mu$  mole) 를 取하여 1 ml/15 min 의 流速으로서 column chromatography 를 行했다. 各 fraction 은 1 ml 씩 18 fraction 까지 取하였다.

各 fraction 에 대하여 薄間 chromatography 에 의한 紫外線 吸收 spectrum 陽性的 C 末端 alanine thiohydantoin 의 fraction 만을 濃縮하여 methanol 0.2 ml 에 溶解시켜 質量分析器에 導入하였다. Peptide 呈色

試藥인 BHC (tert-butyl hypochloride)<sup>(15)</sup> 陽性인 fraction 은 凍結乾燥에 의하여 濃縮하여 다음의 逐次反應에 계속 사용하였다.

새로운 C 末端으로서 나타나 있는 glycine 에 대하여 前述한 바와 동일한 操作의 반복에 의하여 切斷하여 最後의 phenylalanine 까지 逐次反應을 施行하였다.

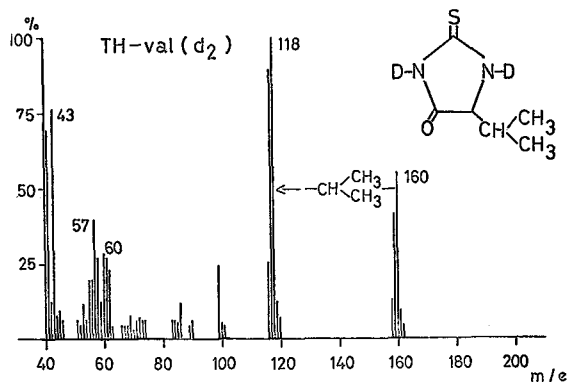
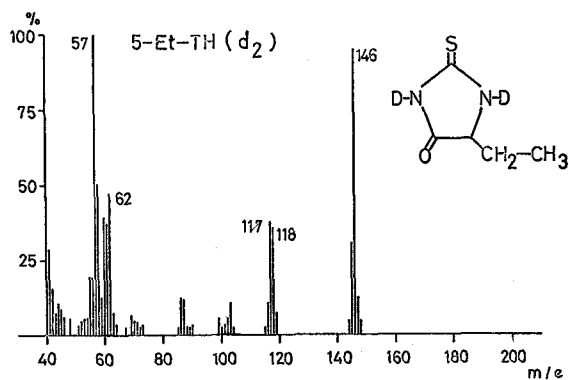
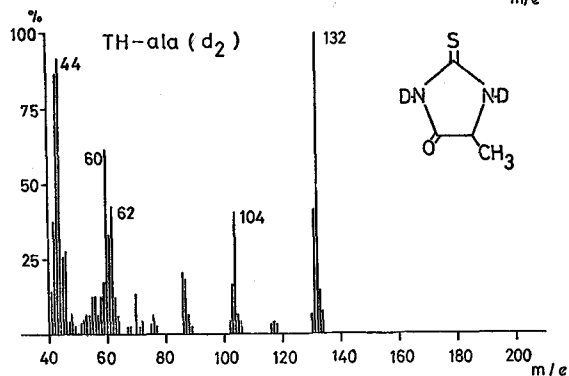
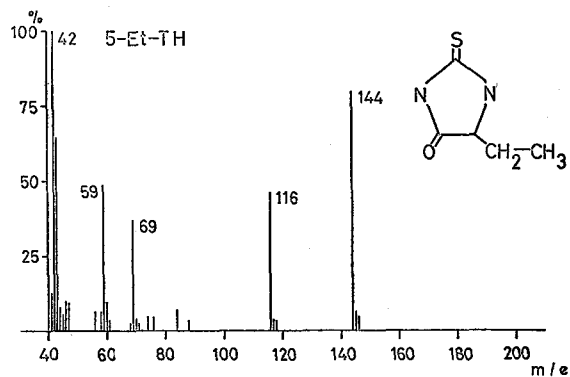
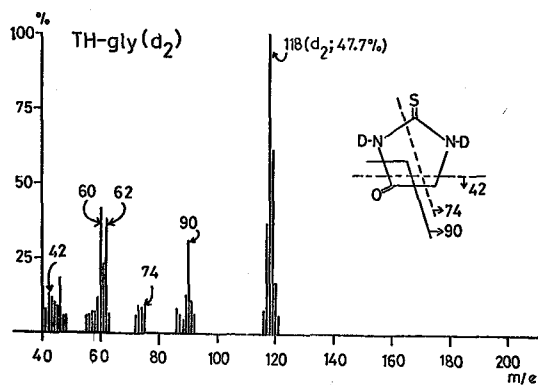
結 果

(1) 重水素 置換에 의하여 Fig. 3 과 같이 thiohydantoin 環의 imino 型의 水素가 重水素로서 置換되어진다고 推測되었다. 따라서 分子이온 peak 를 비롯해서 解裂에 따르는 各各의 fragment peak 에도 變化가 나타났다. 주된 變化는 Table 2 와 같다.

(2) TH-alanine 과 TH-valine 에 대하여 高分解能 質量分析器에 의한 測定結果는 Table 3 과 같다.

(3) Phenylalanyl glycyl alanine 의 逐次切斷反應의 結果, 各 段階마다 分離되어진 thiohydantoin amino acid 의 薄間 chromatography 는 다음 Fig. 5 와 같다.

또 이들의 methanol 溶液을 직접 導入法에 의하여 測定한 質量分析結果는 fraction (1), (2), (3) 이 나타내는 mass spectrum 과 같다.



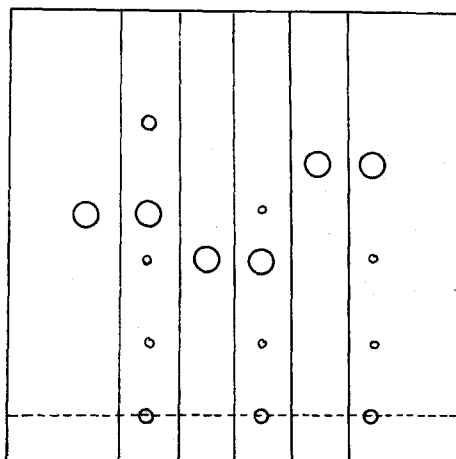
The Mass Spectra of Deutero Thiohydantoin (glycine, alanine, valine,  $\alpha$  amino butyric acid) and thiohydantoin ( $\alpha$ -amino butyric acid)

Table 3. High mass spectrometry of TH-alanine, TH-valine

		TH-alanine							
OBSD.	CALCD.	ERROR.	Cl <sub>2</sub>	Cl <sub>3</sub>	H	N	O	S	
59.9909	.9907	+ 0.1	1	0	2	1	0	1	CH <sub>2</sub> NS
60.9984	.9986	- 0.1	1	0	3	1	0	1	CH <sub>3</sub> NS
61.9882	.9826	+ 5.5	1	0	2	0	1	1	CH <sub>2</sub> OS
86.0081	.0064	+ 1.7	3	0	4	1	0	1	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> NS
102.0263	.0251	+ 1.1	3	0	6	2	0	1	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> S
115.9995	.0044	- 4.8	3	0	4	2	1	1	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> H <sub>2</sub> OS
130.0188	.0200	- 1.2	4	0	6	2	1	1	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> OS

TH-valine

OBSD.	CALCD.	ERROR.	Cl <sub>2</sub>	Cl <sub>3</sub>	H	N	OSS		
56.0092	.0136	- 4.3	2	0	2	1	1	0	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> NO
57.0170	.0214	- 4.3	2	0	3	1	1	0	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NO
59.9911	.9907	+ 0.3	1	0	2	1	0	1	CH <sub>2</sub> NS
60.9986	.9986	+ 0.0	1	0	3	1	0	1	CH <sub>3</sub> NS
73.9996	.0064	- 6.8	2	0	4	1	0	1	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NS
	.9938	+ 5.7	1	0	2	2	0	1	CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub> S
86.0073	.0064	+ 0.8	3	0	4	1	0	1	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> NS
98.9767	.9778	- 1.1	3	0	1	1	1	1	C <sub>3</sub> HNOS
116.0045	.0044	+ 0.0	3	0	4	2	1	1	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> OS
158.0506	.0513	- 0.7	6	0	10	2	1	1	C <sub>6</sub> HON <sub>2</sub> OS



A : TH-alanine (1) : fraction (1)  
 B : TH-glycine (2) : fraction (2)  
 P : TH-phenylalanine (3) : fraction (3)

Solvent system :

butyl acetate : n-heptane : formic acid =  
 5 : 4 : 1

Spot : U. V. positive

Fig. 5. TLC of sequential degradation products of phenylalanyl glycyl alanine from the C-terminus.

考 察

(1) Glycine thiohydantoin 誘導體의 경우 重水素置換에 의하여 1, 3 位の imino 型의 水素가 重水素로 置換되어져 2 mass 가 增加한 m/e=118 에 分子이온 peak 가 나타나 있다. 또 fragment peak 에도 변화가 나타

나 thiohydantoin 環의 carbonyl 基의 離脫에 의한 m/e = 88 이 90 에 m/e=59, 60 이 60, 61, 62 로 變化되었다.

(2) Alanine thiohydantoin 誘導體에서도 m/e=130 의 分子이온 peak 가 132 로 變하는 것을 비롯하여 側鎖에 methyl 基가 結合한 環의 carbonyl 基가 離脫하여 m/e=102 의 fragment peak 가 104 에 나타나 있다.

(3) Valine thiohydantoin 誘導體의 경우 m/e=158 의 分子이온 peak 가 160 에 나타나 있다. 또한 isopropyl 基가 離脫하여 m/e=116 과 118 이 base peak 로 나타나 있다.

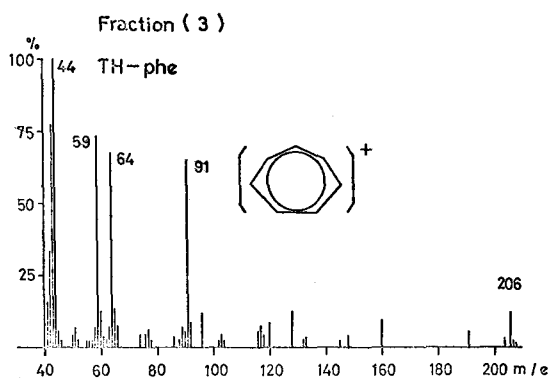
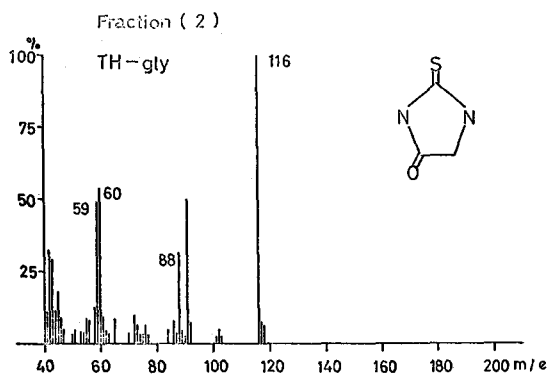
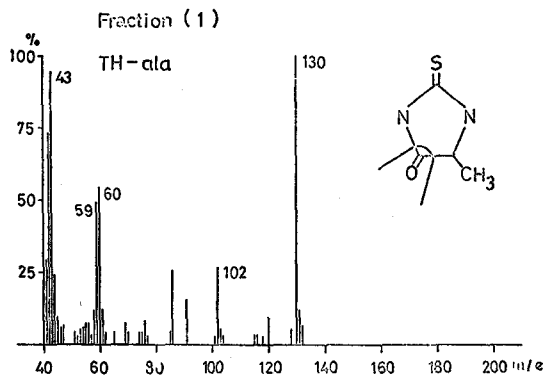
(4) 5-ethyl-2-thiohydantoin 誘導體의 경우 m/e=144 의 分子이온 peak 가 m/e=146 에 나타나 있으며 環의 解裂은 ethyl 基가 離脫한 후는 TH-glycine 과 同一하다.

(5) 高分解能의 質量分析器에 의해 thiohydantoin 環의 解裂時 共通의으로 나타나는 m/e=59, 60 의 peak 는 分子式으로부터 CHNS 와 CH<sub>2</sub>NS 임이 確認되었다.

이상의 結果로부터 Fig. 4 에 나타낸 바와 같은 解裂 機構가 確認되었다.

側鎖 R 가 methyl 基일 경우를 제외하고 먼저 側鎖가 떨어져 나간 다음 thiohydantoin 環 自體의 carbonyl 基가 離脫되어 순간적으로 四員環을 만들므로 glycine 과 valine 의 경우 m/e=88, alanine 의 경우는 m/e=102 에 fragment peak 가 나타나 있다. 다음 thiohydantoin 環의 5 位에 相當하는 炭素가 離脫하여 m/e=74 의 三員環이 되며, 계속하여 어느 쪽인가의 窒素가 離脫하여 m/e=60 또는 59 의 fragment peak 가 보여 진다.

The mass Spectra of Fraction (1), (2), (3)



이들은 重水素置換에 의하여 各各  $m/e=90$  과  $104$ ,  $m/e=76$ ,  $m/e=62$ ,  $61$ ,  $60$  등으로 변하여 나타나는 것임을 알았다.

(6) C 末端 amino acid 의 溶離條件의 檢討는 豫備試驗에서 sephadex G-25<sup>(7)</sup> 보다 sephadex G-10 이 優秀하였으며 1 ml/15 min 에서 충분히 分離됨을 알 수 있었다.

(7) Phenylalanyl glycy alanine 의 逐次切斷反應에 의하여 分離되어진 各各의 thiohydantoin amino acid 는 薄間 chromatography 上에는 複數의 spot 가 보여 지지만 相對的인 量에 따라 質量分析의 chart 에서는

a) fraction(1)에서는  $m/c=130$  과  $102$  로 부터 alanine 의 thiohydantoin 誘導體임이 確認되었다.

b) fraction(2)에서는  $m/e=116$  과  $88$  로부터 glycine 의 thiohydantoin 誘導體임을 알 수 있었다.

c) fraction(3)에서는  $m/e=206$  의 分子이온 peak 와 tropylium 이온에 由來하는  $m/e=91$  의 特徵的인 peak 로부터 phenylalanine 의 thiohydantoin 誘導體임이 確認되었다.

이와 같은 結果로부터 元來의 peptide 는 phenylalanyl glycy alanine 이었음을 알 수 있었으며, 實驗에 사용한 tripeptide 의 amino acid 配列과 一致함이 確認되었다.

結 論

(1) 母核인 thiohydantoin 環의 解裂은 重水置換과 高分解能 質量分析器를 이용한 檢討에 의하여 側鎖와의 關係를 포함한 環自體의 解裂樣式이 確實해졌다.

(2) Phenylalanyl glycy alanine 의 C 末端으로부터의 逐次切斷反應에 의하여 얻어진 各 fraction 에 대하여 行한 mass spectrum 의 結果, 三段階까지 逐次確認이 가능했다.

이와 같은 사실로부터 peptide C 末端으로부터의 逐次分析에 있어서 質量分析의 應用이 有效함을 알 수 있었다.

謝 意

本實驗을 指導하여 주신 日本國 東北大學 農學部 教授 辻村 克良 博士, 同 助教授 目黒 熙 博士, 同 助手 鈴木 建夫 博士에게 深甚한 謝意를 表한다.

文 獻

- (1) F. Sanger ; in Currents in Biological Research  
D. E. Green, Ed. New York, N. Y., Interscience,  
434 (1956)
- (2) Smyth, D. G., Stein, W. H., Moore. S. ; J. Biol.  
Chem., 238, 227 (1963)
- (3) Edmundson, A. B.; Nature, 205, 883 (1965)
- (4) Canfield R. E.; J. Biol. Chem., 238, 2698 (19  
63)
- (5) Bromer, W. W., L. G. Behrens, O. K.; J. Am.  
Chem. Soc., 79, 2807 (1957)
- (6) Weber, K.; Nature, 218, 1116 (1968)
- (7) George R. Stark ; Biochemistry, 7, 2, 1796 (19  
68)
- (8) Saburo Yamashita ; Biochem. Biophys. Acta,  
229, 301 (1971)
- (9) Nicolet, B. H.; J. Biol. Chem., 88, 389 (1930)
- (10) Collins, R. F. ; Chem. Ind., London, 736 (1957)
- (11) 加藤哲夫, 青柳東彦, 脇道典, 光安舒夫, 泉尾信夫 ;  
蛋白質 核酸 酵素 16, 1, 56 (1971)
- (12) 泉尾信夫 ; 蛋白質 核酸 酵素, 9, 7, 598 (1964)
- (13) 泉尾信夫 ; 蛋白質 核酸 酵素, 9, 11, 928 (1964)
- (14) 吉野論吉, 藤本昌利 ; Ion 交換法, 21 (1957)
- (15) Teeter, H. M., and Bell, E. W.; Organic synthesis,  
4, 125 (1963)