

氨基酸-稳定同位素稀释质谱法用于合成肽段准确含量分析

王雪颖^{1,2}, 秦伟捷², 钱小红², 张养军^{2*}

(1. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110015; 2. 蛋白质组学国家重点实验室, 北京蛋白质组研究中心, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 102206)

摘要: 建立了氨基酸同位素稀释液相色谱-串联质谱法准确测定合成肽段绝对含量的方法。实验中对合成肽段的纯度进行了表征, 色谱纯度表征结果为 99% 以上, 质谱纯度为 90% 以上。在肽段溶液中加入 ¹³C 标记的氨基酸后进行酸溶液水解时间的优化, 水解后的氨基酸直接经液相色谱分离和质谱检测, 结果表明肽段中的被测氨基酸在 150 °C、6 mol/L HCl 溶液水解 4 ~ 6 h 就可以达到水解平衡。每个肽段选择两个或两个以上的被测氨基酸, 测得随机选择的 5 种合成肽段的绝对含量为 62.07% ~ 88.18%, 测定结果的相对标准偏差小于 8%, 相对误差小于 5%, 均满足定量要求。除常用的被测氨基酸苯丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸外, 还考察了选择赖氨酸和精氨酸作为被测氨基酸的可行性, 实验结果表明增加精氨酸为被测氨基酸是可行的, 从而进一步增加了方法的普适性。该方法的建立避免了色谱法定量时氨基酸衍生化处理带来的副反应影响及操作繁琐等问题, 提高了肽段含量测定的准确度和精密度, 为肽段含量的准确测定提供了一种新的方法。

关键词: 液相色谱; 同位素稀释质谱法; 合成肽段; 氨基酸分析

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2012)03-0239-06

Accurate quantification of synthetic peptides by amino acid-stable isotope dilution mass spectrometry

WANG Xueying^{1,2}, QIN Weijie², QIAN Xiaohong², ZHANG Yangjun^{2*}

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015, China; 2. State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China)

Abstract: An approach for quantification of peptides by hydrolysis followed by reversed-phase liquid chromatography (RPLC)-stable isotope dilution mass spectrometry (MS) is presented. The purities of all the determined peptides were greater than 99% by using RPLC and over 90% detected by MS, indicating that the method was workable. The hydrolysis conditions optimized were 4–6 h with 6 mol/L HCl at 150 °C. Two or more amino acids were chosen to ensure the accuracy of the determined results. The content range of peptides was determined to be 62.07%–88.18% with the relative standard deviations less than 8% and relative errors less than 5%. Besides Phe, Val and Ile which were commonly used for the analysis of peptide contents, Arg as another amino acid for peptide quantification can be chosen to enhance the popularity of the method. In a word, application of this method for direct determination of peptide content can avoid the side effects in the derivatization of amino acids and the tedious operation in liquid chromatography. This will improve the precision and accuracy of the method and provide an alternative for peptide quantification.

Key words: liquid chromatography (LC); isotope dilution coupled to mass spectrometry; synthetic peptide; amino acid analysis

随着生命科学的发展和生物技术的进步, 蛋白质组学研究受到了越来越广泛的关注。目前, 蛋白质组学研究正从细胞、组织或体液中蛋白质的组成、

表达水平和修饰状态等定性和半定量分析逐渐过渡到对其蛋白质组含量的动态变化进行定量分析。在定量蛋白质组学研究中, 特别是对目标蛋白质组进

* 通讯联系人: 张养军, 博士, 研究方向为蛋白质组新方法新技术。E-mail: zhangyangjun6314@yahoo.com.cn.

基金项目: 国家重大科学计划项目 (Nos. 2012CB910603, 2010CB912704)、国家重大科学仪器设备开发专项项目 (Nos. 2011YQ030139, 2011YQ06008408, 2011YQ09000504) 和国家自然科学基金项目 (Nos. 20735005, 20905077)。

收稿日期: 2012-01-23

行绝对定量研究时,一般采用同位素稀释结合选择反应监测质谱(MS)方法,并以同位素标记的合成肽段为标准物质绘制校正曲线来测定相应内源性蛋白质酶切肽段的物质的量,进而计算出被测内源性蛋白质的量^[1-2]。由此可见,合成肽段的准确定量是蛋白质准确定量的必要条件。另外,多肽定量在临床检验和诊断中也起着重要的作用^[3]。

现在常使用的合成肽段含量测定方法一是高效阳离子交换色谱结合柱后茚三酮衍生分光光度检测法,二是柱前衍生化反相高效液相色谱法,即将氨基酸在柱前转化为适合于反相色谱保留并能被灵敏检测的衍生物^[4-5]。其原因是大多数氨基酸缺少生色团,因此必须将其衍生、转化为具有紫外可见吸收或能产生荧光的物质,以便于检测。另外,由于这些结合衍生化反应的分析方法操作繁琐、准确度差,有时衍生试剂本身的不稳定性或其副产物也会干扰分析,因此同位素稀释质谱法直接测定水解后氨基酸的方法受到了更广泛的关注。该方法不需要衍生化反应,而是将蛋白质或肽段水解成氨基酸后,采用液相色谱结合质谱多反应监测技术直接测定水解后氨基酸的物质的量,进而根据化学计量关系计算得到被测肽段的含量^[6-8]。此方法的准确度和精密度均高于上述需要衍生化反应的色谱定量方法。

为此,本文以合成肽段为研究对象,首先采用色谱法和质谱法对肽段进行纯度表征,然后对肽段的酸溶液水解条件进行优化,建立起氨基酸同位素稀释质谱法测定合成肽段含量的方法。另外,文献中常以苯丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、脯氨酸为被测氨基酸,考虑到采用质谱方法对胰蛋白酶酶切肽段定量时,C端为精氨酸或赖氨酸,所以本实验尝试增加精氨酸和赖氨酸为被测氨基酸以增加方法的普适性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱-电喷雾三重四极杆离子阱质谱仪(HPLC-ESI-Qtrap4000,美国 AB SCIEX),其中高效液相色谱仪为 Agilent 1260 HPLC; RIGOL 3200 液相色谱仪(北京普源精电科技有限公司); 4800 Proteomics Analyzer 基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱仪(MALDI-TOF/TOF MS,美国 AB SCIEX)。合成肽段(上海吉尔生化公司); 苯丙氨酸(Phe)、精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)、缬氨酸(Val)、异亮氨酸(Ile)标准物质(纯度大于 99.2%),购于中国计量科学研究院; 苯丙氨酸同位素标记物、精氨酸

同位素标记物、异亮氨酸同位素标记物、缬氨酸同位素标记物、赖氨酸同位素标记物(纯度大于 98%),购于美国剑桥同位素实验室(CIL); 盐酸(分析纯,北京化学试剂公司产品); 全氟庚酸(纯度为 98%,美国 Sigma-Aldrich 公司); 乙腈、甲醇(色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司); 超纯水,经 Millipore 纯水系统纯化,电阻率达到 18.2 MΩ·cm。

1.2 色谱分离和质谱检测条件

1.2.1 合成肽段的纯度表征

1.2.1.1 色谱法表征 合成肽段纯度检测在 RIGOL 3200 液相色谱仪上进行。所用色谱柱为依利特 C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相: A 相为 0.1% (v/v) TFA 和 2% (v/v) ACN 水溶液, B 相为 0.1% (v/v) TFA 和 98% (v/v) ACN 水溶液。梯度: 0~30 min, 0~50% B; 30~32 min, 50% B~100% B; 32~50 min, 100% B。流速 0.5 mL/min。紫外检测波长 220 nm。上样量 5 μg。

1.2.1.2 质谱法表征 采用 MALDI-TOF/TOF MS 对样品进行分析。一级质谱数据采集使用正离子反射模式,扫描范围 m/z 700~3 500,激光能量设定为 3 200,每张谱图由 500 张亚质谱谱图累加而成。马心肌红蛋白胰蛋白酶酶切肽段混合物作为标准物对仪器进行外标校正,校正至误差 < 10 ppm。待测样品混合基质(α-氰基-4-羟基肉桂酸)溶液点靶分析。

1.2.2 肽段含量测定的分析条件

1.2.2.1 氨基酸的色谱分离条件 氨基酸分离在 Agilent 1260 高效液相色谱仪上进行。该仪器配置自动进样器和 Agilent SB-Aq 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为含 0.8 mmol/L 全氟庚酸、0.05% (v/v) TFA 和 2% (v/v) ACN 的水溶液,流动相 B 为 98% (v/v) ACN 水溶液; 梯度洗脱条件: 0~2 min, 0~16% B; 2~7 min, 16% B; 7~14 min, 16% B~70% B; 14~20 min, 70% B; 20~22 min, 70% B~100% B; 22~30 min, 100% B; 流速: 0.5 mL/min。进样体积为 10 μL。

1.2.2.2 氨基酸的质谱检测条件 采用 QTRAP 4000 三重四极杆-离子阱质谱仪分析氨基酸时,选用电喷雾离子源(ESI),正离子多反应监测(MRM)模式。仪器参数设置如下:电喷雾电压: 3 500 V; 帘气: 10.00 L/min; 雾化气: 50.00 L/min; 辅助气: 60.00 L/min; 离子源温度: 600 °C; 所用气体均为氮气。每对离子对的处理时间为 100 ms,选择目标离子传输窗口为 0.7 Da。

1.3 肽段的酸水解反应

1.3.1 溶液的配制

分别将存放于冰箱的肽段固体粉末放置室温 30 min 后,各称量 1 mg,均加水配成 1 g/L 的备用液。将标准氨基酸置于烘箱中,于 105 °C 烘干 3 h,在干燥器中冷却 30 min 后称量,配制成 1 g/L 的母液。以肽段 VVDSLEGDFK(相对分子质量 1 107.5) 为例,由于肽段中被测氨基酸为 Val、Phe 和 Lys,因此分别按照以下步骤配制待测肽段溶液(溶液 1)、¹³C 标记的氨基酸溶液(溶液 2)、标准氨基酸溶液(溶液 3)。溶液 1: 取 1 g/L 的肽段母液 138.4 μL,加入 1 861.6 μL 水,终体积为 2.0 mL。溶液 2: 取 1 g/L 的 Val 母液 152.7 μL, Phe 母液 108.8 μL, Lys 母液 95.2 μL,加水 9 643.3 μL,终体积为 10.0 mL。溶液 3: 取 1 g/L 的 Val 母液 146.4 μL, Phe 母液 103.2 μL, Lys 母液 91.4 μL,加水 9 658.9 μL,终体积为 10.0 mL。

1.3.2 肽段酸水解时间的优化

在 2 mL 安瓿瓶中分别加入 80 μL 溶液 1 和 80 μL 溶液 2,于 40 °C 真空干燥后加入 300 μL 6 mol/L HCl 溶液,通氮除氧 1 min 后密封安瓿瓶。在 150 °C 的烘箱中分别水解 2、4、6、8、10 h 后,用氮气在室温下吹干,用 500 μL 1.2.2.1 节所述的流动相 A 液复溶,进行液相色谱分离和质谱多反应监测分析。每组水解实验加入未加被测肽段和¹³C 标记的氨基酸的空白实验对照。每个时间点肽段水解实验重复一次。

2 结果与讨论

2.1 合成肽段含量测定的分析流程

采用同位素稀释质谱法进行合成肽段分析的流程如图 1 所示,将¹³C 标记的氨基酸作为内标物加入到肽段水溶液中,经过酸溶液水解反应,将组成肽段的氨基酸释放出来并与内标物一起进行液相色谱分离和 MRM 质谱检测。¹³C 标记的氨基酸与肽段水解得到的同类氨基酸具有相同的化学性质,因而具有相同的液相色谱保留时间和相同的质谱离子化效率,但其质量数不同,可在质谱上获得不同 m/z 的信号。将两者的峰面积比值代入校正曲线,从而计算出肽段水解出来的氨基酸的量。最后再根据被测氨基酸与肽段的化学计量关系得到合成肽段的量。由于¹³C 标记的氨基酸的加入,校正了系统误差,提高了氨基酸分析方法的准确度和重现性。

2.2 合成肽段的纯度表征

采用固相合成法合成肽段后,通过反相高效液

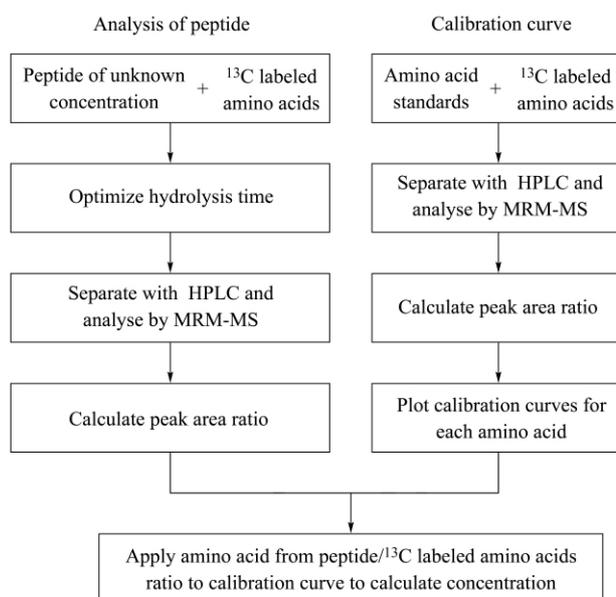


图 1 同位素稀释质谱法测定合成肽段的分析流程
Fig. 1 A scheme of the stable isotope dilution mass spectrometry method for peptide analysis

相色谱法对其进行纯化。肽段纯度是在氨基酸水平上进行肽段准确定量分析的关键因素之一,因此分别采用色谱法和质谱法对肽段纯度进行表征。本实验中采用具有紫外检测器的反相高效液相色谱法是因为它分辨率高,重复性好,在多肽的分离纯化和纯度表征中得到广泛应用。以肽段 AGYTAIVSHR 为例,其色谱纯度表征结果如图 2 所示;将色谱峰进行积分,并利用归一化法计算出肽段的纯度(见表 1)。实验结果表明被测肽段的色谱纯度均在 99% 以上,在色谱水平上排除了残肽对测定的影响。考虑到紫

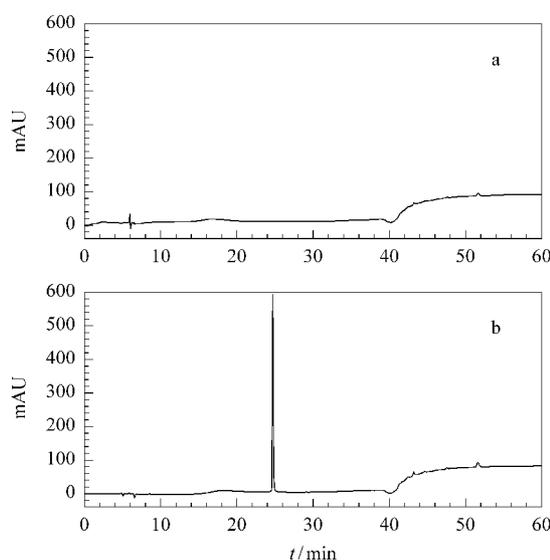


图 2 色谱法表征肽段 AGYTAIVSHR 纯度的色谱图
Fig. 2 Chromatograms of a peptide sample (AGYTAIVSHR) analyzed by HPLC
a. blank control; b. peptide sample.

外检测器灵敏度低和对无紫外吸收的杂质无法检测的问题,采用灵敏度高、分析速度快和样品量小的MALDI-TOF/TOF MS对肽段进一步表征。实验结果如图3所示,除了肽段的[M+H]⁺、[M+Na]⁺和[M+K]⁺的质谱峰外,还检测到未知杂质峰,但峰强度很小。依据质谱峰面积归一化初步计算,肽段质谱纯度均为90%以上(见表1)。两种表征方法都表明被测样品中非目标肽段的残留很少,可以在氨基酸水平上进行肽段含量定量。

表 1 色谱法和质谱法表征肽段纯度的结果
Table 1 Purity results of synthetic peptides determined using RPLC and MALDI-TOF/TOF MS

Number	Sequence	[M+H] ⁺	Purities by RPLC/%	Purities by MS/%
1	VVDSLEGDFK	1108.85	99.11	94.59
2	IVGFDLHLSK	1015.19	99.71	92.43
3	AGYTAIVSHR	1074.78	99.12	96.21
4	AFAAGVDLGR	976.75	99.12	92.91
5	VDDGNDLDAIR	1202.81	99.07	90.80

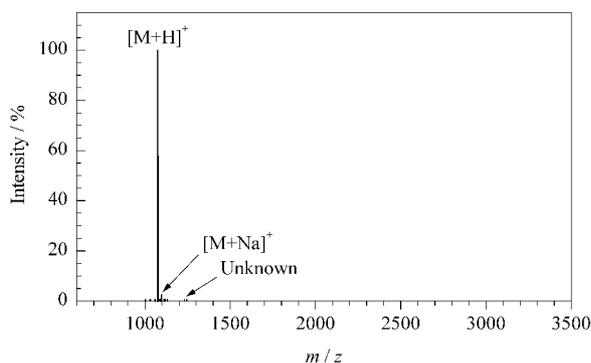


图 3 MALDI-TOF/TOF 质谱表征肽段 AGYTAIVSHR 纯度的质谱图
Fig. 3 MALDI-TOF/TOF MS spectrum of a synthetic peptide (AGYTAIVSHR)

2.3 质谱法测定氨基酸含量的条件优化

为了使被测氨基酸更准确地反映肽段的绝对量,对于被测氨基酸离子对的选择需要满足以下原则:1)离子对的特异性;2)选择信号强度高的子离子以保证方法的灵敏度^[9]。首先在ESI-QTrap MS上通过标准氨基酸和¹³C标记的氨基酸溶液进行预实验以优化实验条件。采用注射泵连续进样,在质谱调谐(tune)模式下,选择子离子扫描方式,比较在不同条件下得到的碎片离子及其信号强度,选择信号最强的碎片离子。实验结果表明Val、Phe和Ile的最强信号碎片离子的质量数都符合[M+H-46]⁺的规律,这些碎片离子是由于氨基酸碰撞裂解时中性丢失一个甲酸而得到的^[9],而Lys和Arg为碱性氨基酸,可能对氨基酸离子在碰撞诱导解离碎

裂过程中的行为产生影响,因而使质荷比符合[M+H-46]⁺规律的碎片离子信号强度很弱,但Lys和Arg产生的质荷比为84和70的碎片离子信号最强,可选为测定时的子离子。确定离子对后,在多反应监测扫描模式下,进一步优化仪器参数如碰撞能量(CE)、去簇电压(DP)、入口电压(EP)和碰撞池出口电压(CXP)。经上述优化后得到被测氨基酸MRM的离子对及质谱条件如表2所示。

表 2 选择的被测氨基酸离子对及优化得到的质谱参数
Table 2 Transitions used for MRM analysis and optimal parameters of mass spectrometer

Amino acid	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP/V	CE/V	EP/V	CXP/V
Val	118	72	35	17	10	10
¹³ C ₅ -Val	123	76	35	17	10	10
Phe	166	120	45	20	7	19
¹³ C ₉ -Phe	175	128	45	20	7	19
Ile	132	81	36	16	6	14
¹³ C ₆ -Ile	138	91	36	16	6	14
Arg	175	70	55	27	8	9
¹³ C ₆ -Arg	181	74	55	27	8	9
Lys	147	84	40	21	5	13
¹³ C ₆ -Lys	153	89	40	21	5	13

2.4 肽段水解时间的优化

肽段水解是否完全是肽段含量测定准确度的重要因素。影响水解反应的因素包括:温度、时间、水解溶剂及保护剂。由于浓盐酸易于挥发,容易从反应体系中去除,故在酸溶液水解反应中常选用浓盐酸为水解溶剂。传统的蛋白质或肽段酸溶液水解反应条件是:在真空条件下、110℃和6 mol/L HCl溶液水解20~24 h,此时大多数蛋白质或肽段都可以水解完全^[10];但此反应时间过长。为了缩短实验周期,可以将反应温度提高到150℃、6 mol/L HCl水解1~2 h^[6,7]。另外,Darragh等^[11]研究发现,大多数蛋白质或肽段在水解反应中释放出来的氨基酸会发生不同程度的损失,损失比较明显的两个氨基酸是半胱氨酸和丝氨酸。所以在水解过程中常加入一些氨基酸保护剂,如加入苯酚可以防止某些不稳定的氨基酸发生氧化反应^[10,12]。在本实验中,首先通过在安瓿瓶封口前向反应液中充入氮气去除氧气来减少氨基酸的氧化现象;再则,我们在肽段水解前加入待测氨基酸相应的¹³C标记的氨基酸,来消除由肽段上释放出来的氨基酸在150℃高温和6 mol/L HCl强酸环境下的损失问题;在参考文献[7,13]的基础上,考虑氨基酸的稳定性以及作为被测氨基酸的普适性,选择Val、Phe和Ile为被测氨基酸,并尝试增加Lys和Arg作为待测氨基酸。另外,为了减少引入保护剂而带来的基体干扰,在实验过程中未

加入氨基酸保护剂。

由于不同性质的氨基酸所形成肽段的酰胺键强弱不同,如带有脂肪族残基的氨基酸(Ile-Ile、Val-Val和Ile-Val等)形成的酰胺键不易断裂^[14],故在水解反应中,特别选择Ile和Val为被测氨基酸以验证水解反应是否进行完全。而且为了减小由于酰胺键强弱不同而引起水解效率不同带来的误差,每个肽段选择两个或两个以上的处于肽段不同位置的被测氨基酸,以此保证肽段水解完全和含量测定的可靠性。本实验还着重考察了水解时间对肽段水解程度的影响。通过色谱分离和质谱MRM模式检测,比较不同时间点肽段水解的被测氨基酸与¹³C标记的氨基酸峰面积的比值来优化水解时间。肽段加入¹³C标记的氨基酸后,在150℃ 6 mol/L HCl溶液中进行水解反应。如图4a和4b所示,肽段水解曲线在水解时间2~6 h内呈缓慢上升趋势,在6 h时,被测氨基酸与¹³C标记氨基酸的峰面积比值基本达到最大;水解6~10 h内,曲线变化平缓或呈下降趋势,表明被测氨基酸浓度降低,原因可能是氨基酸在高温强酸性环境中发生进一步的化学变化而损失。实验结果显示两个被测肽段在水解6 h时达到水解完全。另外,如图4c所示,肽段IVGFDLHSK的水解时间曲线在4 h达到最大值;4~10 h曲线变化平缓,说明肽段上氨基酸的释放和溶液中氨基酸的损失达到一种平衡状态,此时认为肽段水解完全。综上所述,最后确定合成肽段在150℃、6 mol/L HCl溶液水解条件下的最佳水解时间为4~6 h。

2.5 方法的精密度和准确度

以肽段IVGFDLHSK为例,取其水解液,在1.2.2节所述的仪器条件下,重复实验3次,被测肽段水解氨基酸Val、Phe、Ile和Lys与¹³C标记的氨基酸峰面积比值的相对标准偏差(RSD)为7.90%、2.84%、1.21%、4.12%均小于8%。

将质控样品(取60 μL溶液2 80 μL溶液3 加入1.2.2.1节中流动相A液使终体积为500 μL)配制一系列浓度的溶液,进行液相色谱-质谱检测,并绘制工作曲线。然后以标准氨基酸作为被测样品,并将其与¹³C标记的氨基酸配成待测样品,将测定的比值代入标准曲线,得到测量值。根据相对误差(%)=(绝对误差/理论值)×100%的算式,被测氨基酸Val、Phe、Ile和Lys的相对误差分别为0.59%、3.44%、-0.119%和3.507%,均小于5%。结果表明该方法的精密度和准确度均满足定量的要求。

2.6 合成肽段的含量测定

2.6.1 标准曲线的制作

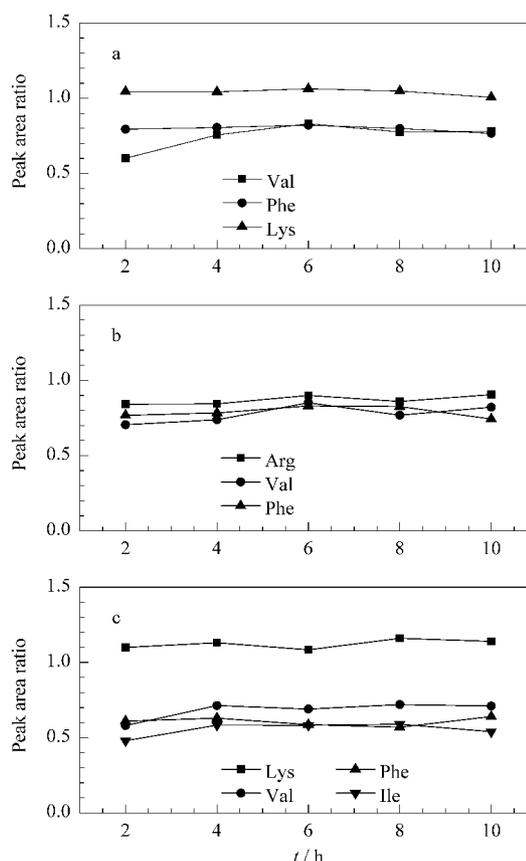


图4 水解时间对肽段水解程度的影响

Fig. 4 Effects of hydrolysis time on the hydrolysis rate of peptides

Peptides: a. VVDSLEGDFK; b. AFAAGVDFGR; c. IVGFDLHSK.

分别取1.3.1节所述的标准氨基酸溶液60、80、100、120、140、160、180 μL,加入160 μL的¹³C标记的氨基酸溶液(溶液2),最后加入1.2.2.1节中流动相A液使终体积为1 mL,混匀后,进行液相色谱-质谱检测。再以标准氨基酸与¹³C标记的氨基酸的浓度比值为横坐标,两者的信号强度比值为纵坐标,绘制标准曲线。被测氨基酸的线性方程和相关系数见表3。结果表明被测氨基酸在3.75~12.5 pmol/μL内,其峰面积比与浓度比呈良好的线性。

2.6.2 计算被测肽段的含量

以肽段IVGFDLHSK为例,在被测肽段溶液(溶液1)加入¹³C标记的氨基酸溶液(溶液2)在150℃和6 mol/L HCl溶液中水解4~6 h,室温下用氮气吹干后再用500 μL的1.2.2.1节所述的流动相A液复溶后,采用0.25 μm水系滤膜过滤后进行液相色谱分离和质谱分析(见图5)。将肽段上水解的氨基酸与¹³C标记的氨基酸峰面积的比值代入线性方程,得出肽段的含量(见表3)。肽段1和2以赖氨酸为被测氨基酸,测定肽段的含量高于其他被测氨基酸20%,其原因可能是肽段在合成过程中的残留

表 3 合成肽段被测氨基酸的线性方程、相关系数和肽段含量测定结果

Table 3 Linear equations, relative coefficients (r^2) of amino acids and contents of synthetic peptides

Number	Peptide sequence	Amino acid	Linear equation	r^2	Content of peptide / %	Mean content / %	Relative average deviation / %
1	VVDSLEGDFK	Val	$y = 1.103x + 0.065$	0.991	69.36	71.84	3.45 ($n = 2$)
		Phe	$y = 0.997x + 0.044$	0.999	74.32		
		Lys	$y = 1.072x + 0.032$	0.996	93.10		
2	IVGFDLHSK	Val	$y = 1.071x + 0.020$	0.990	64.27	62.07	2.36 ($n = 3$)
		Phe	$y = 0.834x + 0.097$	0.993	61.10		
		Ile	$y = 0.841x + 0.062$	0.994	60.86		
		Lys	$y = 0.982x + 0.278$	0.991	86.62		
3	AGYTAIVSHR	Val	$y = 1.072x + 0.006$	0.994	81.54	83.04	1.69 ($n = 3$)
		Ile	$y = 0.908x + 0.007$	0.997	85.14		
		Arg	$y = 1.332x + 0.012$	0.995	82.44		
4	AFAAGVDLGR	Val	$y = 1.161x + 0.032$	0.999	64.17	66.98	5.20 ($n = 3$)
		Phe	$y = 1.000x + 0.068$	0.994	72.20		
		Arg	$y = 1.292x + 0.036$	0.992	64.55		
5	VDDGNLDLAIR	Val	$y = 1.072x + 0.006$	0.994	89.93	88.18	1.51 ($n = 3$)
		Ile	$y = 0.908x + 0.007$	0.997	88.44		
		Arg	$y = 1.332x + 0.012$	0.995	86.19		

y : peak area ratio (amino acids from peptide/ ^{13}C labeled amino acids); x : concentration ratio.

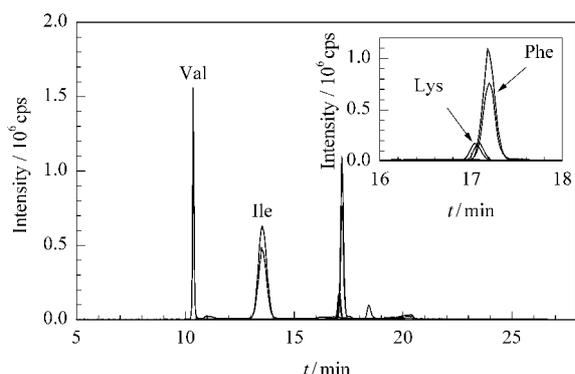


图 5 肽段 IVGFDLHSK 中被测氨基酸 Ile、Val、Phe 和 Lys 与 ^{13}C 标记的氨基酸的提取 MRM 色谱图

Fig. 5 Extracted MRM chromatograms of amino acids including Ile, Val, Phe and Lys from IVG-FDLHSK and ^{13}C labeled amino acids

氨基酸所致 因此舍弃赖氨酸的测定结果。同一肽段不同位置上的被测氨基酸测定结果的精密性用相对平均偏差表示,范围为 1.51%~5.20%,同时也说明了肽段 3、4 和 5 中的精氨酸可以作为肽段被测氨基酸。最终通过计算得到合成肽段的绝对含量范围为 62.07%~88.18%。测定含量低是因通过纯化和冷冻干燥获得的合成肽段肽中残留的水分、溶剂和盐分所致。

3 结论

本研究采用色谱法和质谱法对肽段纯度进行了表征,并在 150 °C, 6 mol/L HCl 水解 4~6 h 达到氨基酸释放和降解平衡的最佳水解条件下,通过在水解溶液中添加 ^{13}C 标记的氨基酸校正了系统误差。

采用不需要衍生化的同位素稀释多反应监测质谱法测定了合成肽段的绝对含量,该方法的精密性和准确度均满足定量要求。另外,除文献报道中常选用的被测氨基酸苯丙氨酸、缬氨酸和异亮氨酸外,本实验结果表明增加精氨酸为被测氨基酸可以满足定量要求,从而可以增加方法的普适性。

参考文献:

- [1] Kuzyk M A, Smith D, Yang J C, et al. Mol Cell Proteomics, 2009, 8(8): 1860
- [2] Keshishian H, Addona T, Burgess M, et al. Mol Cell Proteomics, 2009, 8(10): 2339
- [3] Rogatsky E, Balent B, Goswami G, et al. Clin Chem, 2006, 52(5): 872
- [4] Song Y T, Funatsu T, Tsunoda M. Amino Acids, DOI: 10.1007/s00726-011-0914-2
- [5] Yu H, Mou S F. Chinese Journal of Analytical Chemistry (于泓, 牟世芬. 分析化学), 2005, 33(3): 398
- [6] Woolfit A R, Solano M I, Williams T L, et al. Anal Chem, 2009, 81(10): 3979
- [7] Munoz A, Kral R, Schimmel H. Anal Biochem, 2011, 408(1): 124
- [8] Wu L Q, Wang J. Chemical Analysis and Meterage (武利庆, 王晶. 化学分析计量), 2007, 16(2): 20
- [9] Qu J, Wang Y M, Luo G A, et al. Anal Chem, 2002, 74(9): 2034
- [10] Fountoulakis M, Lahm H W. J Chromatogr A, 1998, 826(2): 109
- [11] Darragh A J, Garrick D J, Moughan P J, et al. Anal Biochem, 1996, 236(2): 199
- [12] Rombouts I, Lamberts L, Celus I, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216(29): 5557
- [13] Wu L Q, Wang J, Zhang L, et al. Journal of Instrumental Analysis (武利庆, 王晶, 张玲, 等. 分析测试学报), 2008, 27(11): 21
- [14] Ozols J. Methods Enzymol, 1990, 182: 587