

氨基酸复合物的电喷雾质谱研究

曹书霞¹, 杨晓丽¹, 陈晓岚¹, 廖新成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: 采用电喷雾-离子阱质谱技术, 对水溶液中氨基酸的自身聚合以及和碱金属离子形成的复合物进行了研究。发现不同的氨基酸和不同的碱金属离子具有不同的聚合特点。

关键词: 电喷雾-质谱 (ESI-MS); 氨基酸复合物; 液相色谱-质谱

中图分类号: O657.63; Q517 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2004)03-0064-03

A Study on the Adducts of Amino Acids Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry

CAO Shu-xia¹, YANG Xiao-li¹, CHEN Xiao-lan¹, LIAO Xin-cheng¹, 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 Sciences and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The adducts of amino acids with alkaline metal ions in aqueous solutions were studied using electrospray ionization ion trap mass spectrometry (ESI-IT-MS). It has been found that different amino acids have different ability to form dimeric/trimeric adducts themselves or with alkaline metal ions.

Key words: Electrospray ionization ion trap mass spectrometry (ESI-IT-MS); Amino acid adduct; HPLC-MS

蛋白质是生命的重要物质基础, 研究蛋白质分子之间以及蛋白质和其它分子、离子之间相互作用的本质一直是生物学家感兴趣的课题。大多数细胞的功能都不是单个蛋白质而是蛋白质复合体也叫做多蛋白复合体来实现的。因此, 特异性蛋白质相互作用的识别是蛋白质组学的一个关键性组成, 因为它直接关系到生物反应中的蛋白质功能。但蛋白质结构的复杂性使得对蛋白质分子直接研究难度较大, 故常选用氨基酸或小肽作为模型化合物进行研究^[1]。电喷雾作为一种极“软”的电离技术, 样品分子在电喷雾电离时通常不发生裂解, 它能够在非常接近天然溶液状态的情况下将非常弱的复合物从液相转变为气相而进行测定, 能够非常真实地反映样品分子在溶液中的聚集状态。因此电喷雾质谱以其灵敏度高、快速、简便等特点在生物化学领域中有着广泛的应用^[2,3]。本文利用电喷雾离子阱质谱对水溶液中氨基酸分子之间以及和溶液中金属离子之间的相互作用进行了系统的研究。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Bruker ESQUIRE-3000 高效液相色谱-电喷雾-离子阱多极质谱仪, 检测范围至 m/z 6 000。进样泵: Cole-Parmer 74900 syringe pump (Cole-Parmer 仪器公司生产)。

氨基酸由华美生物制品有限公司分装 (日本进口), 所用试剂均为色谱纯, 水为纯水机 (美国 LABCONCO 公司) 生产的超纯水。

1.2 质谱条件

采用 ESI 离子源, 正离子检测模式, 喷雾电压为 4 000 V, 毛细管温度为 300 °C, 喷雾气 (N₂): 48.23 kPa; 干燥气 (N₂): 4 L/min, 进样速度 4 μ L/min。

收稿日期: 2003-05-28; 修回日期: 2004-04-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20175026)

作者简介: 曹书霞 (1968-), 女, 河南濮阳人, 讲师, 硕士; 赵玉芬, 联系人。

2 结果与讨论

2.1 结果

氨基酸在水溶液中的聚合及与金属离子的亲和情况见表 1。

表 1 在水溶液中氨基酸形成的不同类型正电荷离子的相对丰度值

Table 1 Various positive ions of amino acids formed in aqueous solutions

Ions	$[M+H]^+$	$[2M+H]^+$	$[3M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[2M+Na]^+$	$[3M+Na]^+$	$[M+K]^+$	$[2M+K]^+$	$[3M+K]^+$
Arg	40.9	62.9	100	7.51	7.06	8.42	0	0	0
His	70.2	100	33.5	0	55.8	49.6	0	91.9	32.2
Lys	100	74.8	31.3	28.9	32.3	13.8	4.1	55.8	14.4
Trp	20.3	100	0	20.7	34.2	0	3.2	0	0
Asp	30.9	100	42.9	0	15.4	6.55	0	66.8	65.0
Glu	85.7	100	36.4	4.8	45.6	27.4	2.3	62.4	85.4
Cys	0	0	0	0	34.8	6.00	0	100	44.3
Gln	73.1	100	16.3	30.9	64.7	54.8	8.1	76.1	39.1
Gly	0	0	0	0	12.2	19.5	0	46.8	100
Ile	50.2	100	0	14.5	25.6	9.95	0	0	95.6
Leu	43.3	60.1	0	15.0	16.8	19.7	0	0	100
Ser	16.5	55.7	0	9.90	94.8	11.8	1.2	100	89.9
Thr	10.0	29.5	0	16.7	37.7	16.0	0	18.6	100
Tyr	31.6	16.5	0	13.2	19.5	20.6	7.3	100	48.3
Val	0	0	0	0	0	13.8	0	10.2	100

* alkaline amino acid; ** acidic amino acid

2.2 讨论

由表 1 数据我们可以得出以下结论:

(1) 多数氨基酸在水溶液中易形成多聚离子 $[nM+H]^+$ 、 $[nM+Na]^+$ 、 $[nM+K]^+$ 等。例如: 精氨酸(Arg)的全质谱如图 1 所示。

(2) 碱性氨基酸在水溶液中以 $[nM+H]^+$ 系列为主, 例如: Arg、Lys、His; 中性氨基酸在水溶液中以 $[nM+K]^+$ 系列为主, 例如: Gly、Leu、Ser、Thr、Tyr、Val 等。Arg 的全质谱如图 1, Tyr 的全质谱如图 2 所示。

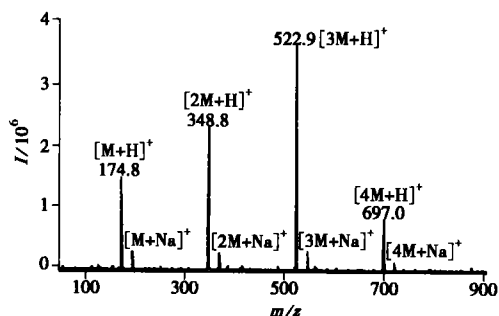


图 1 精氨酸(Arg)在水溶液中的质谱图

Fig. 1 Full mass spectrum of the aqueous solution of arginine

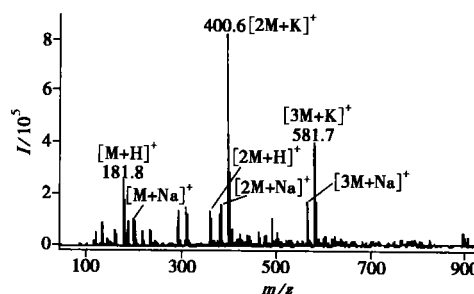


图 2 酪氨酸(Tyr)在水溶液中的质谱图

Fig. 2 Full mass spectrum of the aqueous solution of tyrosine

(3) 由表 1 中可以看到所有氨基酸的 $[M+K]^+$ 离子的丰度均小于 9%, 大多数氨基酸均具有较强的 $[2M+K]^+$ 和 $[3M+K]^+$ 离子。此现象说明单个分子的氨基酸不易和钾离子形成复合物, 而多分子的氨基酸在水溶液中易和钾离子形成复合物。另外在对 $[3M+K]^+$ 离子进行二级质谱碎裂时, 发现较低的能量就使 $[3M+K]^+$ 离子碎裂为 $[2M+K]^+$ 离子和 $[M+K]^+$ 离子, 而 $[2M+K]^+$ 离子的碎裂却需要较高的能量。由此说明对大多数的氨基酸, $[2M+K]^+$ 离子为一较强作用的复合物, 而 $[3M+K]^+$ 离子为一较弱作用的复合物。

对大多数氨基酸的 $[nM+K]^+$ 离子的二级 MS-MS 谱研究显示, 除出现失去 NH_3 、 $HCOOH$ 、 M (氨

基酸分子)外,常常出现 $[(n-1)M + H_2O + K]^+$ 碎片离子,即失去一个氨基酸残基。例如 Asp、Glu、Leu、Ser、Thr、Val 等。Glu 的 $[2M + K]^+$ 离子的二级 MS-MS 谱如图 3 以及 MS-MS 主要峰的归属如图 4 所示。

通常情况下,在离子阱中,氨基酸易于发生脱水反应,在 $n:1$ 钾离子复合物解离时,也可能发生类似的反应,所产生的水分子仍然与钾离子配位。因此我们推断在钾离子复合物中氨基酸的 C 端极有可能与钾离子直接结合。

(4) 实验发现,氨基酸易和钾离子形成非共价键复合物,而和钠离子形成的 $[nM + Na]^+$ 离子丰度相对较小。我们利用原子吸收分析仪对所用纯水中 Na^+ 、 K^+ 的含量进行了测定,结果表明, Na^+ 的含量是 K^+ 含量的 100 倍以上。由此我们推断在同样的条件下,和钠离子相比氨基酸和钾离子易形成多聚复合物。

参考文献:

- [1] LEE V W M, LI H, LAU T C, *et al.* Relative silver(I) ion binding energies of amino acids: a determination by means of the kinetic method[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 1998, 9: 760 - 766.
- [2] ROBINSON C V, CHUNG E W, KRAGELAND B B, *et al.* Probing the nature of noncovalent interactions by mass spectrometry. A study of protein - CoA ligand binding and assembly[J]. J Am Chem Soc, 1996, 118(36): 8646 - 8653.
- [3] SMITH R D, LOO J A, HOLLER T P, *et al.* New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization[J]. Anal Chem, 1990, 62(9): 882 - 899.

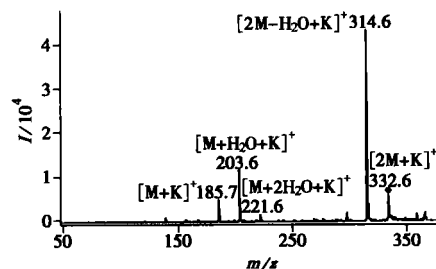


图 3 谷氨酸(Glu) $[2M + K]^+$ 离子的二级质谱图
Fig. 3 The MS-MS spectra of ion $[2M + K]^+$ of glutamic acid

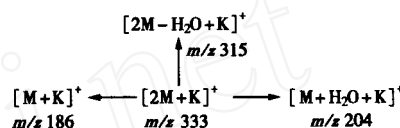


图 4 谷氨酸(Glu) $[2M + K]^+$ 离子 MS-MS 主要峰的归属

Fig. 4 The fragmentation of ion $[2M + K]^+$ of glutamic acid

Ref NO. 20040422

“仪器论坛”全面改版

互联网的互动性可以帮助身在不同地方的人就某个问题共同进行讨论交流。“仪器论坛”给分析测试工作者提供了一个网上交流讨论技术问题、结交业界同仁的平台。自开通以来,受到了大家的欢迎,很多人通过论坛,解决了工作中遇到的一些实际问题,并因此与网上的同行成为了好朋友。

近期,仪器信息网(www.instrument.com.cn)将仪器论坛进行了全面改版,在原有“色谱”、“光谱”、“质谱”、“核磁”、“电化学”、“热分析”、“显微镜”等几十个仪器子论坛的基础上,又新增了以下几个行业仪器子论坛:生化仪器,环境监测仪器,农药残留检测仪器,石油产品专用仪器,纺织产品专用仪器以及煤炭行业专用仪器。

另外,还针对用户比较集中的问题,新开辟了“样品处理”、“实验室管理(LIMS)”论坛。

欢迎大家前往讨论交流,网址为:bbs.instrument.com.cn

另外,“仪器论坛”也希望与更多的相关单位共同建设,并有多个子论坛在招聘版主,请愿意为业界同行贡献业余时间的专业人士与仪器信息网联系,联系电话:010-68432936, 68432939。

(仪器信息网 www.instrument.com.cn 供稿)

2004 - 4 - 22