

基质与样品的相互作用对于傅立叶变换离子回旋共振质谱测定低分子量多肽的影响

陈君* 殷俊 高帅 许莉 肖宏展

(北京微量化学研究所,北京 100091)

摘要 通过比较两种极性差异较大的基质 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)和 2',6'-二羟基苯乙酮(DHAP)按不同比例混合时,Angiotensin II 的基质辅助激光解析电离-傅立叶变换离子回旋共振质谱(MALDI-FT/ICRMS)谱图的不同,并结合基质-Angiotensin II 在不同结晶方式下的共结晶和基质晶体的扫描电镜照片,发现基质为 10 $\mu\text{mol/L}$ DHB 和 15 $\mu\text{mol/L}$ DHAP 以体积比 4:1 组成的混合物时,基质结晶为致密的层状结构,而以薄层法与 Angiotensin II 生成的共结晶,Angiotensin II 在基质晶体上面形成分散的柱状小晶体,此时得到的 MALDI-FT/ICRMS 质谱图优于干滴法。

关键词 基质辅助激光解析电离;傅立叶变换离子回旋共振质谱;肽;薄层法;干滴法

1 引言

傅立叶变换离子回旋共振质谱(FT/ICRMS)是一种具有高质量分辨率的质谱技术^[1,2]。FT/ICRMS 的主要优点是分辨率在一个较宽的质荷比范围内极高,可以达到 $10^5 \sim 10^6$ ^[3]。在一定的频率范围内,只要在足够长的时间内进行采样,均可获得高分辨数据,获得高的质量准确性^[4~6]。

基质辅助激光解析电离技术(MALDI)是一种软电离技术,利用其对于肽类及蛋白样品的分析较为深入^[7],样品的前处理是该技术的关键步骤。常见的样品前处理技术主要包括 MALDI 靶上前处理和基质的选择。靶上前处理方法主要有:利用靶上修饰物与分析物的特异吸附作用,富集分析物^[8];通过浸洗步骤除盐,增加质谱灵敏度^[9]等。采用 MALDI 源对分析物进行电离时,基质的主要作用是分散分析物和传递激光能量。分析物均匀地分散于基质内,也被形象地称为固态溶液^[10]。形成这种固态溶液要求基质和分析物的极性具有一定的相似性^[10]。因此,选择合适的基质以及采用适当的基质样品共结晶,对于 MALDI 技术非常重要。对于肽类分析的基质为 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)^[11],也有文献报道利用 2',6'-二羟基苯乙酮(DHAP)和柠檬酸氢二铵(DAHC)的混合物作为基质,取得了更好的分析效果。MALDI-MS 检测多肽类化合物往往能够得到较多的碎片离子,而利用 DHAP/DAHC 的混合基质得到的碎片离子少很多^[12,13]。还有文献报道,以香豆素类化合物与 DHB 为混合基质,分析多糖和糖蛋白,效果较好^[14]。目前, MALDI 源的基质样品共结晶方式主要有干滴法、薄层法及三明治法。这 3 种方式本身无优劣之分,在对于具体基质和分析物时,要通过实验考察,以确定最佳的共结晶制备方式。

本研究选取了两种极性差异较大的多肽分析常用基质 DHB 和 DHAP^[10],通过考察配比混合基质 \ 样品制备方式、激发激光能量等实验条件对短链多肽 MALDI-FT/ICRMS 分析的影响,并结合基质与分析物共结晶的扫描电镜照片,分析基质组成和结晶方式对于化合物质谱行为的影响。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

920 傅立叶变换离子回旋共振质谱仪(7T 磁体,美国 Varian 公司);MALDI 激光源为 Orion air-cooled Nd:YAG(美国 New Wave Research 公司),其固定激发波长为 532,355 和 266 nm;S-3700N 扫描电镜和 E-4045 离子溅射仪(日本 Hitachi 公司)。

2,5-二羟基苯甲酸(2,5-Dihydroxybenzoic acid, DHB, TCI-EP, 东京化成工业株式会社);2',6'-二羟基苯乙酮(2',6'-Dihydroxyacetophenone, DHAP), Leu-Val 和 Angiotensin II (10 $\mu\text{mol/L}$, 美国 Sigma-Aldrich 公司);乙腈(色谱纯,美国 CNW 公司);实验用水经 Milli-Q Integral 3 A10 纯水系统制备。

基质储备液配制:精确称取 DHB 和 DHAP,加入乙腈-水(1:1, V/V)溶液,分别配制浓度为 10 和 15 $\mu\text{mol/L}$ 的储备液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。混合基质溶液是将 DHB 和 DHAP 储备液分别按照体积比 1:1, 2:1, 1:2, 3:1, 1:3, 4:1 和 1:4 混合使用。

2.2 样品准备

2011-06-15 收稿;2011-11-10 接受

* E-mail: chenjun05@tsinghua.org.cn

2.2.1 MALDI-FT/ICRMS 样品制备 (1) 薄层法 在 MALDI 靶上分别点加 1 2 3 和 4 μL 的 DHB 或 DHAP, 以及各不同比例的混合基质溶液, 于空气中挥干后, 再分别点加 1 μL 二肽和多肽溶液, 于空气中挥干。(2) 干滴法 预先分别将 2.1 节中各基质溶液与 Angiotensin II 溶液按照体积比 1: 1 混合, 在 MALDI 靶上点样 2 μL , 以保证样品点包含的基质与分析物的绝对量与薄层法制得的样品点中相同。(3) 三明治法 在薄层法制样的基础上, 再点加相同体积的基质溶液。

2.2.2 电镜样品制备 将 1 μL 2.1 节中各基质溶液, 以及 2.2.1 中的各基质与待分析样品混合溶液点样于导电玻璃上, 空气中挥干。在基质溶液挥干后的痕迹上, 再次点加 1 μL Angiotensin II 溶液, 于空气中挥干, 然后再次点加 1 μL 基质溶液, 空气中挥干。分别得到纯基质晶体。分别采用干滴法、薄层法和三明治法制备晶体。置于离子溅射仪中, 10 mA, 喷金 30 s。

2.3 FT/ICRMS 参数设置

数据收集软件为 Omega (9.0 beta, Varian)。对于 Leu-Val 扫描范围为 m/z 150 ~ 300, 对于 Angiotensin II 扫描范围为 m/z 150 ~ 2000, 正离子模式检测, 扫描时间为 262.144 ms, 经两次采集, 得到 512 K 宽带瞬间时域。质谱质量轴通过 PEG400 进行校准。

3 结果与讨论

3.1 DHB 和 DHAP 作为基质用于 Leu-Val 的分析

按照薄层法, 分别以 DHB 和 DHAP 为基质, Leu-Val 的 MALDI-FT/ICRMS 谱图如图 1 所示。各主要离子的精确质量和分辨率分别为: 253.1635(50200); 275.1452(42400); 291.1191(42500)。

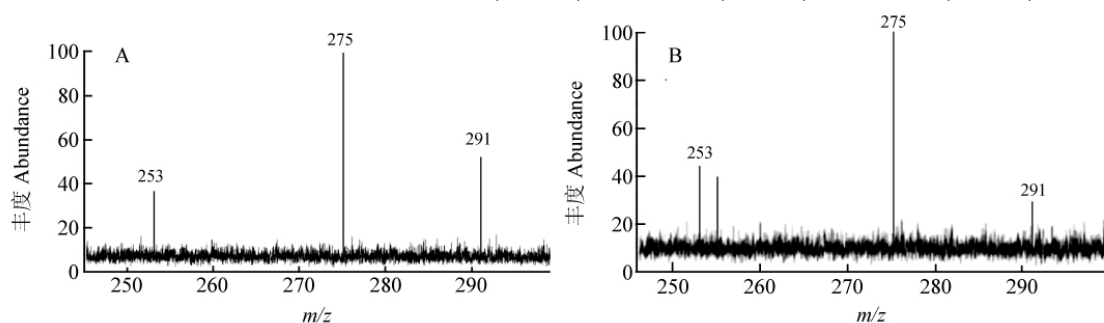


图 1 10 $\mu\text{mol/L}$ DHB (A) 和 15 $\mu\text{mol/L}$ DHAP (B) 各 1 μL 作为基质测定 Leu-Val 的质谱图

Fig. 1 Mass spectrometry of Leu-Val with 1 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) (A) and 15 $\mu\text{mol/L}$ 2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP) (B) as matrix

Leu-Val 的计算分子量为 230。 m/z 253 为 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 峰, m/z 275 为 $[\text{M} - \text{H} + 2\text{Na}]^+$ 峰, m/z 291 为 $[\text{M} - \text{H} + \text{Na} + \text{K}]^+$ 峰。 DHAP 为基质时, 与 DHB 为基质一样, m/z 275 峰作为基峰, m/z 291 峰降低 45.74%, m/z 253 峰强增强 17.89%。 这表明 DHAP 有抑制 Leu-Val 结合多个碱金属离子的能力。

当基质体积增加为 2 μL 时(图 2), DHB 组中, 基峰仍然为 m/z 275, 而 m/z 291 峰强下降 41.93%, 而 m/z 253.16 峰强上升 36.58%。 在 DHAP 组中, m/z 253 成为基峰, 而 m/z 291 低于检出限而未被检测到。 此结果更证实了 DHAP 有抑制 Leu-Val 与多个碱金属离子结合的能力。 当基质体积增加到 4 μL 时, DHB 组得到的谱图与 2 μL 无明显区别, 而 DHAP 组杂峰明显增加, 而准分子离子峰下降明显。

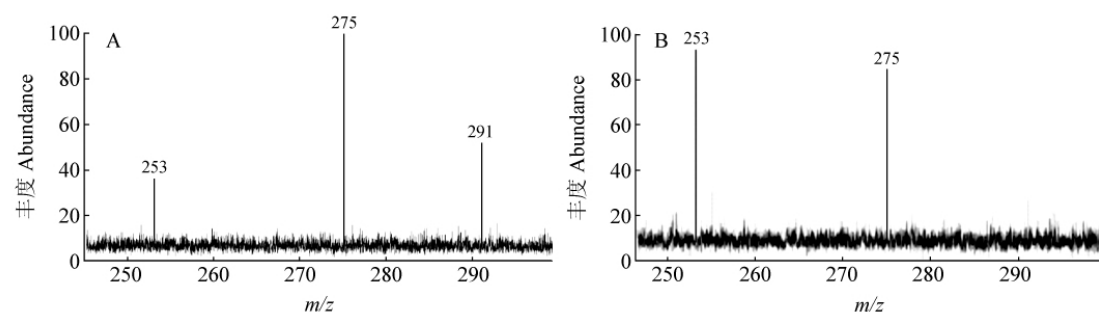


图 2 10 $\mu\text{mol/L}$ DHB (A) 和 15 $\mu\text{mol/L}$ DHAP (B) 各 2 μL 测定 Leu-Val 的质谱图

Fig. 2 Mass spectrometry of Leu-Val with 2 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ DHB (A) and 15 $\mu\text{mol/L}$ DHAP (B) as matrix

3.2 DHB 和 DHAP 作为基质用于 Angiotensin II 的分析

Angiotensin II 的氨基酸序列为 Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, 计算分子量为 1045.54。按照薄层法, 分别用 1 μL 的 DHB 和 DHAP 作为基质对 Angiotensin II 进行分析(图 3)。DHB 作基质时, 准分子离子峰簇主要有 m/z 1090 (1.34%)、 m/z 1068 (6.31%) 和 m/z 1046 (100%), 分别为 $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 主要碎片离子为 m/z 931、899、802、784 和 767, 分别为 $[\text{M}+\text{H}-\text{Asp}]^+$, $[\text{M}+\text{H}-\text{Phe}]^+$, $[\text{M}+\text{H}-\text{Phe}-\text{Pro}]^+$, $[\text{M}+\text{H}-\text{Asp}-\text{Phe}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{H}-\text{Asp}-\text{Phe}-\text{NH}_3]^+$ 。而 DHAP 作基质时, 碎片离子明显少于 DHB 时^[12], 且准分子离子峰处未出现 m/z 1090。

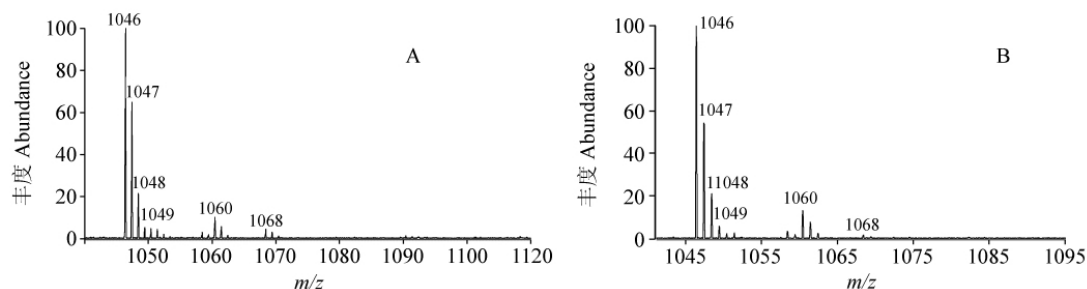


图 3 10 $\mu\text{mol/L}$ DHB (A) 和 15 $\mu\text{mol/L}$ DHAP (B) 各 1 μL 作为基质测定 angiotensin II 的质谱图

Fig. 3 Mass spectrometry of angiotensin II with 1 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ DHB (A) and 15 $\mu\text{mol/L}$ DHAP (B) as matrix

3.3 DHB 和 DHAP 混合作为基质用于 Angiotensin II 的分析

将 10 $\mu\text{mol/L}$ DHB 和 15 $\mu\text{mol/L}$ DHAP 按照体积比分别为 1:1、1:2、2:1、1:3、3:1、1:4 和 4:1 混合制成混合基质。由于 DHB 和 DHAP 的活性氢摩尔比为 3:2, 故二者的摩尔浓度比选择为 2:3, 以确保在任何体积比混合时, 使活性氢摩尔数相同。

样品结晶方式采用薄层法。比较 7 种不同配比混合基质条件下 MALDI-FT/ICRMS 谱图数据发现, 当体积比为 1:3 和 1:4 时, 分子离子峰强度下降明显。而体积比为 1:1、1:2、2:1 和 3:1 时, 谱图与纯 DHB 为基质时较为相似。而当 $V_{\text{DHB}}:V_{\text{DHAP}}=4:1$ 时, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰减弱 73.4%, 且 $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$ 峰未被测到。这表明 $V_{\text{DHB}}:V_{\text{DHAP}}=4:1$ 时, 能够将 DHB 对 Angiotensin II 的离子化能力和 DHAP 降低 Angiotensin II 与多个碱金属结合的能力相结合, 从而更好地提高灵敏度和选择性。基质体积为 1~2 μL 时, 谱图差异不大, 但当基质体积大于 3 μL 后, 谱图信号减弱明显。

3.4 不同样品制备方式的比较

干滴法、薄层法和三明治法在 MALDI-MS 实验中均有广泛运用^[15]。本研究比较了 $V_{\text{DHB}}:V_{\text{DHAP}}=4:1$ 时, 不同制备方式对 FT/ICRMS 响应的影响。干滴法点样量为 2 μL , 而薄层法基质点样量和样品点样量均为 1 μL 。结果表明, 样品制备方式对 Angiotensin II 的 MALDI-FT/ICRMS 响应的影响甚大。薄层法得到的谱图主要是准分子离子峰(图 4A), 而干滴法得到的准分子离子峰强度甚小(图 4B), 碎片离子的种类明显多于薄层法, 且有 m/z 453 这个在薄层法得到的谱图中未被检测到的离子。此结果显示, 薄层法对于 Angiotensin II 的检测更为适合。而造成这一现象的原因则可能是由于干滴法中, 基质与 Angiotensin II 作用较强, Angiotensin II 更多的被包埋在基质晶体之内, 而难以被激发成为气态离子, 而从基质中吸收的能量迫使 Angiotensin II 的化学键断裂, 形成较多的碎片离子。干滴法中得到了薄层法中未得到的碎片离子, 更证明了这两种方法导致的 Angiotensin II 在质谱中的裂解原理不同。三明治法是薄层法结晶的基础上, 再点加适量基质溶液, 再次结晶。Angiotensin II 在基质为 DHB-DHAP(4:1, V/V) 溶液, 基质点样体积为 1 $\mu\text{L} \times 2$, 样品体积为 1 μL 时, 激光能量从 30% 增加至 40%, 质谱图中均未发现样品碎片。

3.5 不同激发能量的比较

由于不同激发能量对于化合物的质谱裂解行为十分重要, 能量过高, 将导致碎片离子过多; 能量不足, 则导致灵敏度严重下降。本实验主要针对于 3.4 节的样品, 考察了激光能量分别为 15%、20%、25%、30% 和 35% 时, 对质谱响应的影响。当能量低于 25% 时, 两种制样方法均未能得到质谱响应。当激光能量为 25% 和 30% 时, 同种制样方式的谱图并未有明显区别。而当能量为 35% 时, 薄层法得到的谱图中碎片明显增多, 而分子离子峰强度下降显著; 干滴法得到的谱图中, m/z 453 和 437 显著增强, 其它碎片被基线噪音淹没, 同时分子离子峰强度下降十分明显。此结果也证明了 m/z 437 和 451 主要来源于 Angiotensin II 的裂解, 且是不同于薄层法的质谱裂解方式。

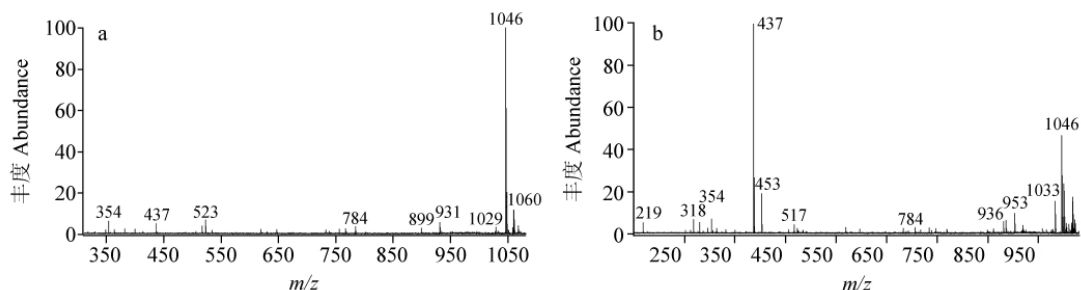


图 4 薄层法(A)和干滴法(B)测定 Angiotensin II 的质谱图

Fig. 4 Mass spectrometry of angiotensin II prepared by thin-layer (A) and dry-droplet method (B)

基质为 1 μL 的 10 $\mu\text{mol/L}$ DHB-15 $\mu\text{mol/L}$ DHAP(4: 1, V/V) 混合基质, 激光能量为 30%。The matrix is 1 μL mixture of 10 $\mu\text{mol/L}$ DHB-15 $\mu\text{mol/L}$ DHAP(4: 1, V/V), and the laser energy is 30%.

3.6 不同基质结晶和与样品共结晶的形态比较

利用扫描电镜, 观察基质混合后其结晶形态发生明显变化(图 5); 不同的制样方式得到的基质与 Angiotensin II 的共结晶形态也明显不同(图 6)。

从外形上看, DHAP 的结晶相对 DHB 小很多(图 5A, 5B)。当 DHB 和 DHAP 以体积比 2: 1 混合时, 结晶形态发生了较为明显的改变(图 5C); 当 DHB 和 DHAP 体积比为 4: 1 混合时(图 5D), 形成的结晶为较为致密的层状结构。干滴法得到的晶体(图 6A)比纯基质晶体(图 5D)更为致密。而以薄层法共结晶时, Angiotensin II 在基质晶体表面形成分散的柱状晶体(图 6B), 能够同时满足分散分析物和避免基质包埋分析物的要求, 因此其质谱行为优于干滴法。

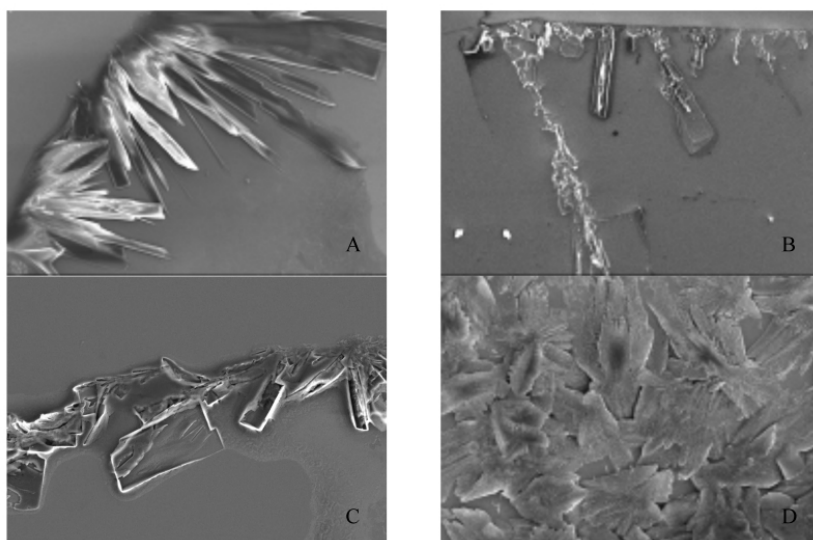


图 5 4 种不同组成基质结晶的扫描电镜照片

Fig. 5 Scanning electron microscope picture of 4 kinds of matrix

A. DHB; B. DHAP; C. 10 $\mu\text{mol/L}$ DHB-15 $\mu\text{mol/L}$ DHAP(2: 1, V/V); D. 10 $\mu\text{mol/L}$ DHB-15 $\mu\text{mol/L}$ DHAP(4: 1, V/V).

从电镜照片可见, 三明治法所得到的晶体结构与干滴法所得晶体十分相似, 但又比干滴法所得晶体颗粒大(图 6C)。这一结果提示, 在该实验条件下, 采用三明治法 Angiotensin II 无法得到质谱响应的可能原因是基质的过度包埋, 使得分析物难以解析成为离子。

4 结 论

研究结果表明, DHAP 有抑制 Leu-Val 和 Angiotensin II 与碱金属离子结合的能力。当 DHAP 含量适当时, 谱图中准分子离子峰中结合碱金属峰强含量较低, 且碎片离子较少。而当 DHAP 含量较高时, 其抑制结合碱金属的能力导致分析物离子化效果不佳, 从而引起灵敏度下降。10 $\mu\text{mol/L}$ DHB 和 15 $\mu\text{mol/L}$ DHAP 以体积比 4: 1 混合时, 基质结晶为致密的层状结构, 而以薄层法与 Angiotensin II 共结晶, Angiotensin II 在基质晶体上面形成分散的柱状小晶体, 此时得到的 MALDI-FT/ICRMS 质谱图最佳。

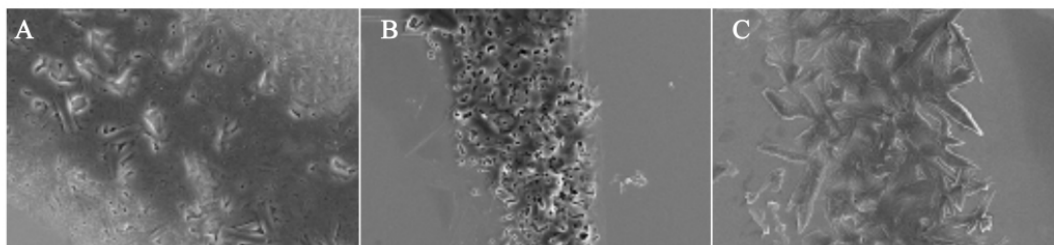


图6 不同制备方式的基质与 Angiotensin II 共结晶扫描电镜照片

Fig.6 Scanning electron microscope picture of matrix-analyte crystal by different preparation methods

A. 干滴法; B. 薄层法; C. 三明治法。A. Dry-droplet method; B. Thinlayer method; C. Sandwich method

References

- 1 WANG Wei , CAI Wen-Sheng , Shao Xue-Guang. *Prog. Chem.* , **2005** , 17(2) : 336 ~ 341
王伟 蔡文生 邵学广. 化学进展 , **2005** , 17(2) : 336 ~ 341
- 2 HU Qiu-Ling , LIU Ying-Rong , LIU Ze-Long , TIAN Song-Bai , XU Zhen-Hong. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2010** , 38(4) : 564 ~ 568
胡秋玲, 刘颖荣, 刘泽龙, 田松柏, 徐振洪. 分析化学 , **2010** , 38(4) : 564 ~ 568
- 3 Marshall A G , Hendrickson C L , Jackson G S. *Mass Spectrom. Rev.* , **1998** , 17(1) : 1 ~ 35
- 4 Goodlett D R , Bruce J E , Anderson G A , Rist B , Pasa-Tolic L , Fiehn O , Smith R D , Aebersold R. *Anal. Chem.* , **2000** , 72(6) : 1112 ~ 1118
- 5 Bruce J E , Anderson G A , Brands M D , Pasa-Tolic L , Smith R D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* , **2000** , 11(5) : 416 ~ 421
- 6 ZENG Jia-Wei , JIA Wei , YING Wan-Tao , QIAN Xiao-Hong. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2010** , 38(9) : 1238 ~ 1242
曾家伟, 贾伟, 应万涛, 钱小红. 分析化学 , **2010** , 38(9) : 1238 ~ 1242
- 7 Sun L L , Zhao Q , Zhu G J , Zhou Y , Wang T T , Shan Y C , Yang K G , Liang Z , Zhang L H , Zhang Y K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* , **2011** , 25: 1257 ~ 1265
- 8 Chen C T , Chen Y C. *Anal. Chem.* , **2005** , 77(18) : 5912 ~ 5919
- 9 Zaluzec E J , Gage D A , Allison J , Watson J T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* , **1994** , 5(4) : 230 ~ 237
- 10 Andrew J H , William J. E , Robert J T , Kevin G O. *Anal. Chem.* , **2004** , 76 (17) : 5157 ~ 5164
- 11 Baldwin M A , Medzihradsky K F , Lock C M , Fisher B , Settineri T A , Burlingame A L. *Anal. Chem.* , **2001** , 73(8) : 1707 ~ 1720
- 12 Gorman J J , Ferguson B L , Nguyen T B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* , **1996** , 10: 529 ~ 536
- 13 Medzihradsky K F , Campbell J M , Baldwin M A , Falick A M , Juhasz P , Vestal M L , Burlingame A L. *Anal. Chem.* , **2000** , 72 (3) : 552 ~ 558
- 14 ZHANG Zhen-Ying , DENG Hui-Min , DENG Qin-Ying. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2008** , 36(10) : 1419 ~ 1422
张珍英, 邓慧敏, 邓芹英. 分析化学 , **2008** , 36(10) : 1419 ~ 1422
- 15 ZHAO Zhen-Wen , XIONG Lei , WANG Zhen-Peng , XIN Bin , HU Wei-Hua , XIONG Shao-Xiang. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2007** , 35(7) : 1025 ~ 1028
赵镇文 熊蕾 王振鹏 辛斌 胡伟华 熊少祥. 分析化学 , **2007** , 35(7) : 1025 ~ 1028

Effect of Interaction of Matrix and Analyte on Detection of Low Molecular Weight Peptide by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Fourier Transform/Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry

CHEN Jun* , YIN Jun , GAO Shuai , XU Li , XIAO Hong-Zhan
(Beijing Institute of Microchemistry , Beijing 100091 , China)

Abstract Because of the suppression of 2'- β -dihydroxyacetophenone (DHAP) to the combination of peptide with alkali metal ion and the advanced ability of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) to ionize peptide in MALDI-MS , it is illustrated in this work that the best MALDI-FT/ICRMS is obtained when matrix is composed of 10 μ mol/L DHB and 15 μ mol/L DHAP. The scanning electron microscope pictures of matrix with different

