

# M IR-TOF-MS 在多肽分析中的应用

于文佳, 何 坚, 王小如

(厦门大学现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 应用实验室研制成功的高分辨飞行时间质谱仪的分子离子反应器(Molecular ion reactor, M IR)接口来分析多肽结构和获得相关信息。实验结果表明:M IR 能够有效地破碎多肽, 得到准确的碎片信息, 是一种理想的多肽结构分析技术。

**关键词:** 质谱学; 多肽分析; 分子离子反应器(M IR); 飞行时间质谱仪(TOF-MS)

**中图分类号:** O 657. 63; Q 516 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2002)04-0200-06

由于碰撞诱导解离(CID)或碰撞活化解离(CAD)、后源裂解(PSD)等技术的应用, 生物质谱可将肽打碎, 并根据碎片离子之间的质量差进行氨基酸序列的推测, 这些方法为蛋白质的鉴定及结构测定提供了重要信息, 从而成为蛋白质结构分析的强有力手段。肽的断裂十分复杂, 给序列分析带来了一定的困难, 所以, 如何获得尽可能高质量的肽断裂信息就是一个十分关键的问题。肽的断裂受多种因素影响, 除了肽本身的氨基酸组成、荷电情况外, 仪器条件对断裂谱图的影响也不可忽视。

## 1 M IR 设计及工作原理

实验室研制成功的高分辨率电喷雾飞行时间质谱是以分子离子反应器(Molecular ion reactor, M IR)作为接口, 示于图 1。它是一个非常小的射频四极杆, 整根四极杆总长 25 mm, 每根四极杆由 11 段外径仅为 4 mm, 厚度为 2 mm 的不锈钢环串联而成, 环与环之间再用 0.1 mm 厚的绝缘薄膜隔开, 用贴片电阻和电容将这些环连接起来。工作时在四极杆上加射频电压( $V_{pp} = 70 \sim 250 \text{ V}$ ,  $f = 150 \sim 250 \text{ kHz}$ ), 同时在四极杆的两端加直流电压 50~200 V, 形成轴向静电场。

当 M IR 内的气压维持在 0.03~0.67 kPa 时, 使用高纯  $\text{N}_2$  作为背景气体。离子进入四极杆后, 分子离子(Parent)与碎片(Fragment)在射频场及轴向电场作用下绕轴作振荡运动并通过与背景气体的频繁碰撞去掉附着在离子上的溶液基团。一方面可以增加去溶的效果, 又可以实现碰撞冷却聚焦; 另一方面, 它可以工作在 Mathieu's 不稳定边界值(Instability threshold)附近, 相当一个四极滤质器, 因此还具有一定的离子筛选作用。

M IR<sup>[1]</sup>有两种工作模式: 第一种是利用非均匀射频场把离子约束在轴线附近振荡, 调节轴向电场电压把离子打碎; 第二种是选中某离子, 调节射频场的频率和峰值在该离子的 Mathieu's 不稳定边界值附近, 使该离子共振, 离子运动速度急剧增加, 碰撞加剧, 致使该离子破碎。第二种模式使 M IR 对质荷比小于母离子的子离子有歧视作用, 故有时两种模式共同使用, 能得到完整的碎片信息。本工作主要应用第一种模式来分析多肽的结构。

## 2 实验设备与条件

电喷雾高分辨率飞行时间质谱检测器: 自行

收稿日期: 2002-08-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(专项编号: H-29927002 和重点编号: 29245110)

作者简介: 于文佳(1977~), 男(汉族), 山东威海人, 硕士生, 生物质谱专业

E-mail: zhouxf@jingxian.xmu.edu.cn

研制, 半峰宽(FWHM)  $b_{1/2}$  约为 10 000, 测量准确度约  $10^{-5}$ ; 电喷雾离子源石英毛细管: 内径  $\varnothing$  50  $\mu\text{m}$ , 流速  $U$  为 0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 电压 4 200 V, 高

纯氮气作为反吹气体和 M IR 反应气, 其流速  $U$  为 0.3 L/min. M IR 射频频率 900 kHz, 射频电压(峰值) 85 V.

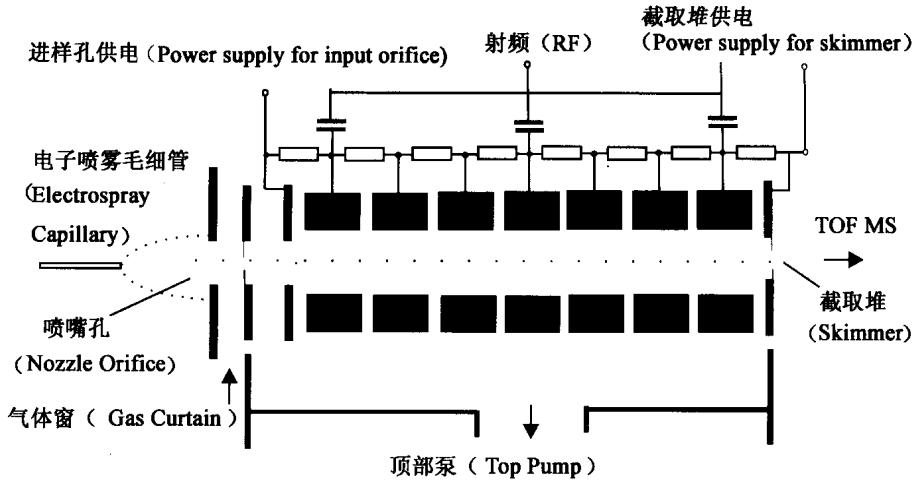


图 1 M IR 结构示意图

Fig 1 Schematic view of M IR

合成八肽: 上海吉尔生化有限公司提供; 抗菌素短杆菌肽 (Gram icidin S) (俄罗斯)。单种同位素相对分子量分别为 1 140 705.9 和 1 132 498.7 (还原态), 均配成 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  甲醇溶液。这两种多肽用于考察 M IR 的性能。

### 3 实验结果

应用 M IR 来破碎多肽, 改变 M IR 轴向电压  $U$  值, 两种多肽谱图变化示于图 2。图 2(1)、(2) 为八肽, 带有双电荷和单电荷峰, (1) 为  $U$  为 80 V 时的质谱图, 八肽的双电荷峰很强, 单电荷峰较弱; (2) 为  $U$  为 130 V 时的质谱图, 八肽的双电荷峰已找不到, 碎片峰较多, 而单电荷峰变化不十分明显。图 2(3)、(4) 为抗菌素短杆菌肽, 也带有双电荷和单电荷峰, (3) 为  $U$  为 80 V 时的质谱图, 双电荷峰很强, 单电荷峰较弱; (4) 为  $U$  为 140 V 时的质谱图, 可看到抗菌素短杆菌肽双电荷峰变得很弱, 碎片峰大量增加, 而单电荷峰变化不明显。从图 2 可看出两种多肽在  $U$  较低时, 双电荷峰最强, 单电荷峰较弱, 谱图碎片峰很少或很弱, 随  $U$  增大双电荷峰均被打碎, 谱图碎片峰很多且比较强。

#### 3.1 抗菌素短杆菌肽的碎片峰分析

Gram icidin S 的氨基酸序列示于图 3。

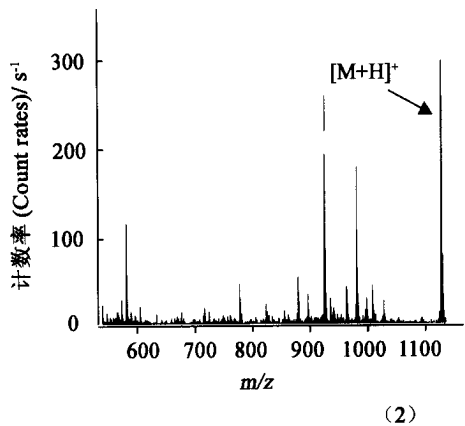
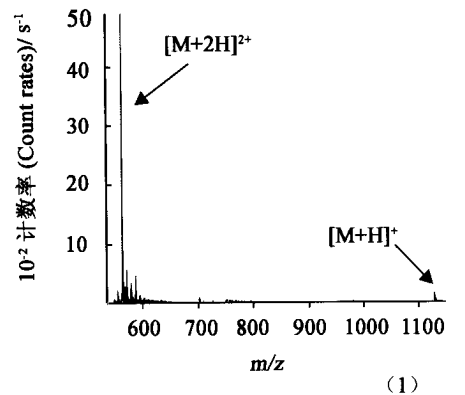
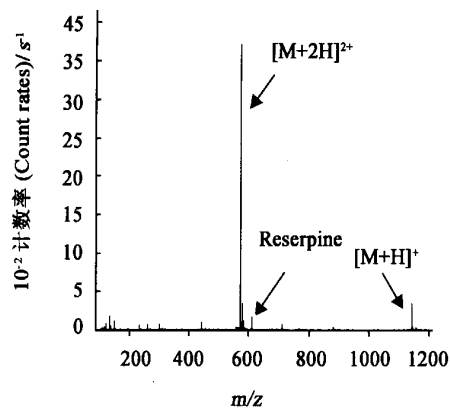
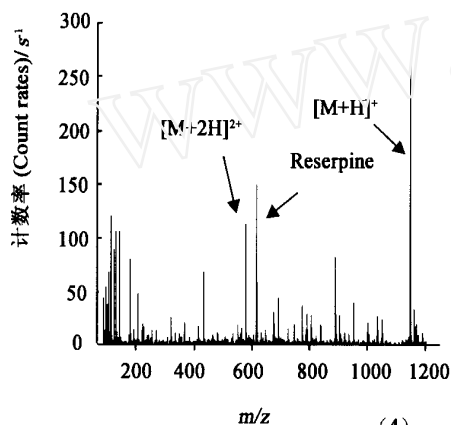


图 2 八肽和抗菌素短杆菌肽在  $U$  值不同时 TOFMS 谱图  
1——八肽,  $U = 80 \text{ V}$ ; 2——八肽,  $U = 130 \text{ V}$   
Fig 2 TOFMS spectra of octa-peptides and Gram icidin S at different  $U$   
1——octa-peptides,  $U = 80 \text{ V}$ ;  
2——octa-peptides,  $U = 130 \text{ V}$



(3)



(4)

续图 2 八肽和抗菌素短杆菌肽在 U 值不同时 TOFMS 谱图

3——抗菌素短杆菌肽,  $U = 80 \text{ V}$ ;

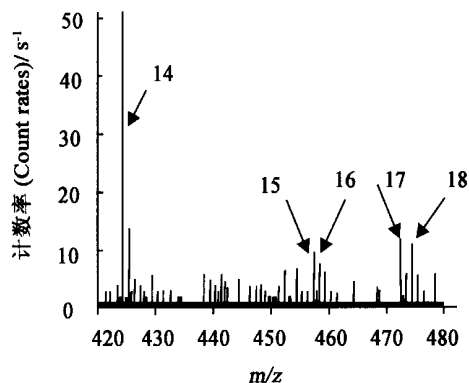
4——抗菌素短杆菌肽,  $U = 140 \text{ V}$

g 2 (continued) TOFMS spectra of octa-peptides and Gram icidin S at different U

3——Gram icidin S,  $U = 80 \text{ V}$ ;

4——Gram icidin S,  $U = 140 \text{ V}$

该多肽为环状对称多肽。通过高分辨飞行时间质谱能够准确鉴别碎片峰, 给出准确分子量信



息。图 4 是部分碎片峰, 对应的具体分子量信息列于表 1。从表 1 中可看出 14~ 18 号峰与 19~ 23 号峰正好互补, 它们的和正好是 Gram icidin S 单一同位素分子量与两个  $\text{H}^+$  分子量的和。综合所有碎片信息, 没有找到该多肽破碎成三部分或更多碎片的情况, 每块碎片都能够找到对应的另一部分。从表 1 还可看出高分辨飞行时间质谱测量误差小于  $2 \times 10^{-6}$ 。根据碎片峰准确的分子量, 结合一定的算法, 能够准确给出该多肽的组成和氨基酸序列。

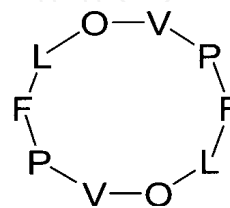


图 3 Gram icidin S 的氨基酸序列

Fig 3 Catena of amino acid in Gram icidin S

表 1 Gram icidin S 碎片峰的 TOFMS 测定结果

Table 1 Determination data of Gram icidin S in M IR by TOFMS

序号 (No.)	碎片 (Fragments)	$M/D$		
		单一同位素+H (Mono isom ass+ H)	剩余+H (Rest mass+ H)	测定值 (Detem ined)
14	PVOL	424 292 4	718 429 2	424 292 3
15	LFPV	457 281 5	685 440 1	457 281 4
16	FPVO	458 276 7	684 444 8	458 276 3
17	OLFP	472 292 4	670 429 2	472 292 4
18	VOLF	474 308 0	668 413 5	474 308 3
19	PVOLFP	668 413 5	474 308 0	668 413 5
20	VOLFPV	670 429 2	472 292 4	670 429 2
21	LFPVOL	684 444 8	458 276 7	684 444 6
22	OLFPVO	685 440 1	457 281 5	685 440 3
23	FPVOLF	718 429 2	424 292 4	718 429 5

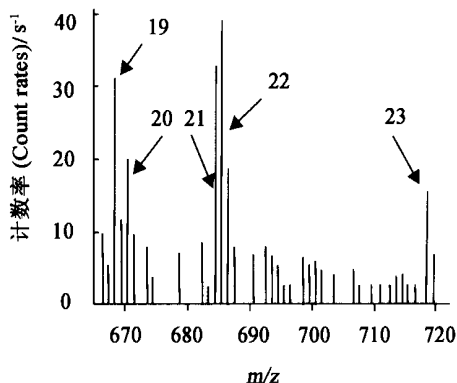
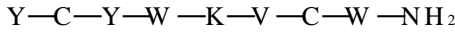


图 4 Gram icidin S 在 M IR 中破碎后部分 TOFMS 谱图

Fig 4 Part of TOFMS spectra of Gram icidin S in M IR

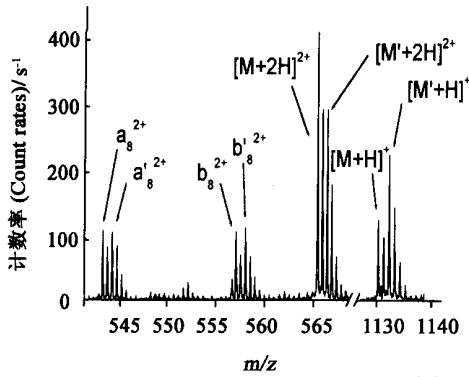
### 3.2 合成八肽的碎片峰分析

合成八肽的氨基酸序列为:

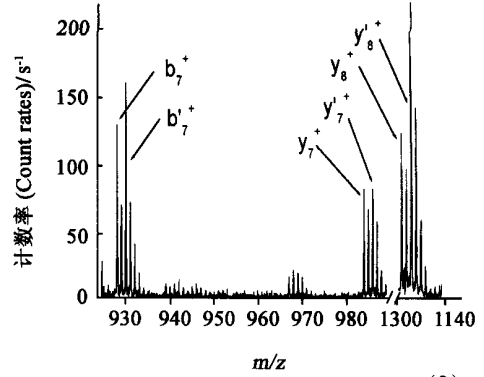


合成八肽中含有两个半胱氨酸, 在空气中很容易被氧化, 脱去 2 个 H, 形成二硫键。图 5 中  $a_{8^{2+}}$ 、 $b_{7^+}$ 、 $b_{8^{2+}}$ 、 $y_{7^+}$ 、 $y_{8^+}$  的峰为还原八肽的碎片峰,  $a_{8^{2+}}$ 、 $b_{7^+}$ 、 $b_{8^{2+}}$ 、 $y_{7^+}$ 、 $y_{8^+}$  为氧化态八肽的碎片峰。还原态与氧化态八肽共存导致两种状态含有半胱氨酸的碎片峰也共存, 这些碎片发生在多

肽的两端, 且质谱信号较强。图 6 为氧化态八肽的碎片峰, 其中 Y 离子模式的峰比 B 离子模式要多并且较强, A 离子模式很少, 这可能由于多肽中含有氮的基团靠近 C 端, 导致 Y 离子模式占大多数, 其它模式较少。从 Y 系列可以明显地看到它们相邻项的差值正好是该位置所含  $\alpha$ -氨基酸或  $\alpha$ -氨基酸及其保护基脱去一分子水的质量数。



(1)



(2)

图 5 还原态与氧化态共存时八肽在 M R 破碎后部分 TOFMS 谱图

Fig 5 Part of TOFMS spectra of oxidized and reduced octa-peptides in M R

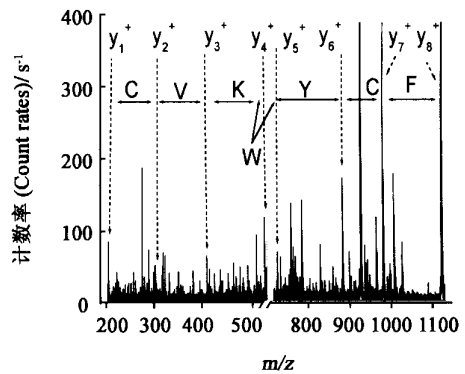
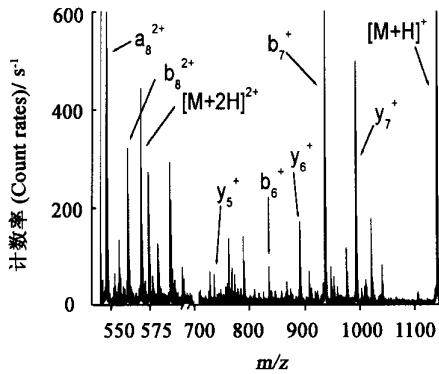


图 6 氧化态八肽在 M R 破碎后部分 TOFMS 谱图

Fig 6 Part of TOFMS spectra of oxidized octa-peptides in M R

### 3.3 U 值对多肽碎片形成的影响

图 7 (1) 中 M 为抗菌素短杆菌肽, M 为八肽, 其双电荷峰的信号强度为实际的十分之一。从图 7(1) 可看到八肽双电荷峰强度随着 U 的增加而剧烈下降, 在 100 V 时强度很低, 110 V 处与 100 V 相近, 可能由于此时八肽碎片离子与反应气体碰撞饱和, 当 U 在 130 V 时轴向电场

变强, 八肽双电荷峰强度几乎降为零。  $b_{8^{2+}}$  在 80 ~ 90 V 时信号最强, 原因在于八肽 C 端理论上为 -COOH, 实际合成为 -CONH<sub>2</sub>, 八肽易带双电荷, 并且靠近 C 端的含有 N 基团较多, 易带 H<sup>+</sup>, 若 H<sup>+</sup> 在 -CONH<sub>2</sub> 上发生 B 离子模式, 则很容易去掉 NH<sub>3</sub>, 故 U 不需要很大, 反应就会进行。当 U 很大, 离子碰撞加剧, 破裂的方式和部位



发生变化,  $b_8^{2+}$  信号降低。图 7(1) 中  $[M + H]^+$  在 110 V 之前变化不大, 原因在于 M 在溶液中含量很低, 转移到气相后  $[M + 2H]^{2+}$  占有决大部分,  $[M + 2H]^{2+}$  则很少, 并且  $[M + 2H]^{2+}$  的质量数大于  $[M + H]^+$ , 这样  $[M + 2H]^{2+}$  的碰撞频率与能量较低, 表现在 110 V 之前变化不大。对于图 7(1) 中的  $[M + H]^+$  在气相中含量较少, 质量最大, 当  $U$  一定时, 速度最低, 不易破碎。其它碎片峰在 100 V 左右强度达到最大。图 7(2) 中 M 为利血平 (Reserpine), M 为抗菌素短杆菌肽, 其双电荷峰的信号强度为实际的百分之

一。(1) 图与 (2) 图两种多肽的碎片峰随  $U$  变化情况很相似,  $[M + 2H]^{2+}$  随  $U$  增加而急剧减少, 在  $U$  为 100 V 左右时碎片峰基本上都最强。两图也有一些区别, 图 7(1) 碎片峰在  $U$  为 80 V 才明显出现, 在  $U$  为 140 V 较多碎片峰并没有减少很多。两种多肽结构不同是其主要原因, 一种是环状, 另一种是直链, 从图 7 上看出直链八肽比环状抗菌素短杆菌肽容易破碎, 原因可能是直链多肽比环状多肽碰撞截面大, 碰撞频率更高所致。

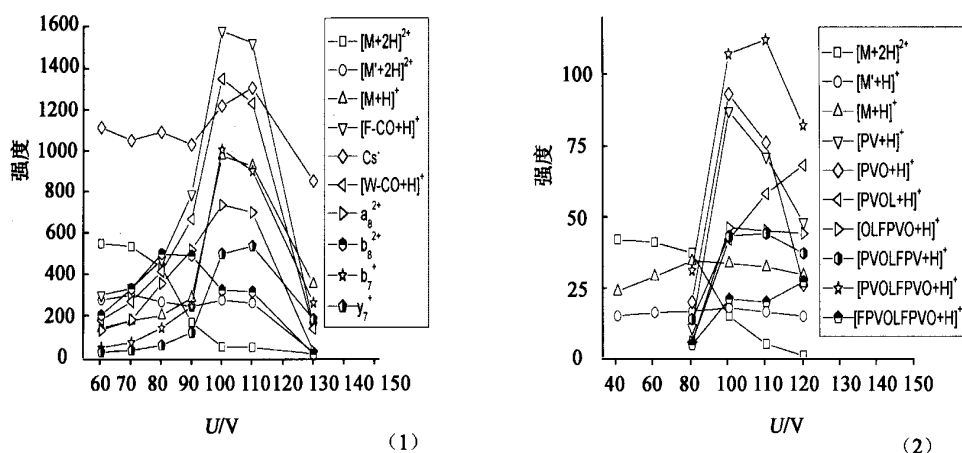


图 7 八肽 (1) 和抗菌素短杆菌肽 (2) 的碎片峰强度随  $U$  变化示意图

Fig 7 Intensity curves of fragments of octa-peptides(1) and Gramicidin S(2) at different  $U$

## 4 讨论

CD<sup>[2]</sup> 技术是通过碰撞将离子的平动能部分转变为其热力学能, 使稳定离子被活化后发生破裂反应。碰撞过程遵守能量和动量守恒定则: 决定能量转换大小的并不是在这个实验室坐标的能量  $E_{lab}$ , 而是在发生碰撞的离子与靶气的质心坐标的能量  $E_{cm}$ 。它们的关系如式 (1) 所示。

$$E_{cm} = E_{lab} \frac{m_g}{m_g + m_p} \quad (1)$$

(1) 式中,  $m_g$  和  $m_p$  分别是碰撞气和前体离子的质量。对于低能 CD, 碰撞气通常采用质量较大的气体 (如  $N_2$ , Ar) 才能有效地使离子活化。MR 在电喷雾离子转移区域中实现 CD, 采用高纯氮气为靶气, 工作压力在 0.03~0.67 kPa, 离子在 MR 中的运动受 MR 二维势阱的约束, 迫使离

子在轴线附近振荡, 且离子自由程较短, 经多次碰撞后能量转移较高, 故碎片离子较多。当增加  $E_{lab}$  也即在 MR 中增加  $U$  时, 转移到离子上的内能会增加, 有效的能量转换保证了产物离子的产率。对于质量较大或非常稳定的离子, 根据公式 (2), 进一步提高反应产率的途径是增加碰撞靶气的压力。在相同的碰撞能量下, 靶气压力升高将使发生碰撞的离子数量以及发生多次碰撞的可能性增加, 从而使产物离子尤其是活化能较高的反应的产物离子增加。MR 作为接口, 可在很高的压力区域中工作, 离子数众多和二维势阱的约束减少了离子的散射, 增加离子碰撞的频率。

$$I_f = I_p e^{-n_d \bar{\alpha}} \quad (2)$$

(2) 式中,  $I_f$  为产物离子的强度;  $I_p$  为进入碰

撞室的前体离子的强度,即在没有碰撞气时主束离子的强度; $n_D$ 为碰撞气的密度; $\delta$ 为碰撞截面; $L$ 为碰撞室的长度。

生物分子的分子量一般很大,当分子的分子量增加时,分子中的振子数( $S$ )也随之增加。数目巨大的振子会将内能分散到各自的振动能上,结果降低了碎片速率 $K(E)$ 。 $K(E)$ 和 $S$ 的关系如式(3):

$$K(E) = V [(E - E_0)S^{-1}] / E \quad (3)$$

(3)式中, $E$ 为离子能; $E_0$ 为反应的临界能量; $V$ 为频率因子。如果要增加转移能量和 $K(E)$ ,可以增加离子能 $E$ 、碰撞气体压力,以及选择大质量碰撞气体。由于振子分散能量及 $E$ 不够大的关系,两个多肽的单电荷离子峰强度变化不

大,而双电荷离子由于受力大约是单电荷的2倍,能够被打碎。MR属于低能CID,碎片是多次碰撞的结果,裂解主要沿着肽链骨架进行,常伴随着氢的转移,产生稳定的N端a、b、c型离子和/或C端系列x、y、z型离子,其中b、y系列离子最为常见,这些在两个多肽的破碎谱图中可以看到。

#### 参考文献:

- [1] Dodonov A, Kozlovsky V, Loboda A, et al. A New Technique for Determination of Selected Ions in Molecule Ion Reactor Coupled With Ortho-Time-of-Flight Mass Spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom [J]. 1997, 11: 1649~1656
- [2] 陈耀祖,涂亚平. 有机质谱原理及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 92~94

## Peptides Analysis of Molecule Ion Reactor Coupled With Time-of-Flight Mass Spectrometry

YU Wen-jia, HE Jian, WANG Xiao-ru

(The Key Laboratory of Analytical Science of MOE, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** A molecular ion reactor (MR) used as an atmospheric pressure ionization interface for a home-built high resolution time-of-flight mass spectrometer is applied to analysis of peptides structure. The experiments show MR can decompose peptides effectually and get accurate information of fragments of peptides. MR is an ideal technology for analysis of peptide structure.

**Key words:** mass spectrometry; peptides analysis; molecular ion reactor (MR); time-of-flight mass spectrometer (TOFMS)

#### 新书推荐

### 气相色谱-质谱联用的最新实践

(Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry  
(Chromatographic Science, Volume 86))

【编者】Niessen, W. M. A.。2001年Marcel Dekker, Inc 出版

【ISBN】0-8247-0473-8

【简介】详细阐述原理,GC/MS的仪器,以及在工业、环境、药物、临床、毒物、司法和食品中的应用。