

以低浓度异甘草素为基质的 MALDI-TOF MS 用于小分子的检测研究

黄 良¹, 杨洪梅^{1,2}, 石 磊³, 刘淑莹^{1,2}

(1. 长春中医药大学, 吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117;

2. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心, 吉林 长春 130022;

3. 中国核工业建设集团公司, 核建清洁能源有限公司, 北京 100037)

摘要:以低浓度异甘草素 (ISL, 0.05 mmol/L) 为基质, 采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 对精氨酸、甘露醇和苏氨酸-亮氨酸二肽等小分子物质进行分析检测。实验结果表明, 以低浓度异甘草素作为 MALDI-TOF MS 分析小分子物质的有机基质, 所获得的斑点均匀性和重复性、耐盐能力、分辨率等均显著优于常用基质 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB)、2,4,6-三羟基苯乙酮 (THAP)。本实验可为有机基质在小分子分析中的应用开辟新的窗口。

关键词:异甘草素 (ISL); 基质; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS); 小分子物质

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2015)03-0243-06

doi: 10.7538/zpxb.2015.36.03.0243

Low Concentration of Isoliquirigenin as a Matrix for the Analysis of Small Molecules by MALDI-TOF MS

HUANG Liang¹, YANG Hong-mei^{1,2}, SHI Lei³, LIU Shu-ying^{1,2}

(1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Changchun Center of Mass Spectrometry, Changchun Institute of Applied Chemistry,

Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China;

3. China Nuclear Engineering Group Co. Ltd., Beijing 100037, China)

Abstract: Small molecules, including arginine, mannitol and dipeptide were analyzed by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) using a low concentration of isoliquirigenin (ISL, 0.05 mmol/L) as a matrix. In comparison with 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP), ISL exhibited outstanding matrix properties as follows: 1) higher homogeneity of crystallization thus allowing automatic data acquisition; 2) better spectral

收稿日期: 2014-05-07; **修回日期:** 2014-11-13

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (21305135、21175127) 资助

作者简介: 黄 良 (1989—), 女 (汉族), 江西人, 硕士研究生, 从事中药化学研究。E-mail: huangliang0827@163.com

通信作者: 杨洪梅 (1980—), 女 (汉族), 黑龙江人, 副研究员, 从事生物质谱研究。E-mail: yanghm0327@sina.cn

刘淑莹 (1943—), 女 (汉族), 黑龙江人, 研究员, 从事中药化学和有机质谱学研究。E-mail: liusy01@ccucm.edu.cn

quality in terms of resolution and signal to noise ratio (S/N); 3) better salt tolerance. The study has an important role in organic compounds as matrix for analyzing small molecules, and can open up a new prospect.

Key words: isoliquirigenin (ISL); matrix; matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS); small molecules

基质辅助激光解吸电离(MALDI)是一种软电离技术,其原理是用激光照射样品与基质形成共结晶薄膜,基质从激光中吸收能量后传递给样品分子,从而使样品分子电离^[1-2]。在飞行时间质量分析器(TOF)中,离子在电场作用下加速通过飞行管道,待测离子的质荷比(m/z)与离子的飞行时间成正比,因此可根据到达检测器的飞行时间来测定离子的质荷比^[3]。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)是由 MALDI 离子源和 TOF 两部分组成,它克服了生物大分子电离困难的问题,为研究生物大分子物质提供了一种简单的方法。在生物大分子的研究中,常用的基质有 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、2,4,6-三羟基苯乙酮(THAP)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)、芥子酸(SA)等^[4-6],这些基质在常用的激光波长(N_2 源, 337 nm)下都有很好的吸收,并且能够与样品分子形成均匀的微晶固体,从而获得比较理想的质谱图。由于基质离子峰干扰太强等原因,以上的有机基质不能用于小分子的 MALDI-MS 分析,这在一定程度上阻碍了 MALDI-MS 在小分子物质分析研究中的应用。因此,在过去的十几年里, MALDI-MS 主要应用于大聚合物、生物大分子和一些热不稳定、易碎、不挥发性的化合物,如蛋白质等的研究^[7-9]。近年来,研究者付出了很多努力去消除基质离子的干扰,如 Dong 等^[10]采用石墨烯作为基质分析小分子物质; Xu 等^[11-12]采用碳纳米管作为基质用于 MALDI-TOF MS 对小分子

进行了分析。这些无机材料作为基质用于分析小分子物质与常用的 CHCA 和 THAP 等有机材料相比有很大的突破,但关于有机化合物中能够较理想的分析小分子物质的报道仍然较少。

异甘草素(4,2',4'-三羟基查耳酮, ISL)是一类具有查儿酮结构的黄酮类化合物,为黄色针状结晶,难溶于水,可溶于极性小的溶剂,如乙醚、氯仿等。ISL 主要存在于豆科植物甘草的根,鹰嘴豆(*Cicer arietinum* L.)的幼苗、豆芽,红芪(*Radix Hedysari*)、黄芪(*Rachx Astragali*)、滇黄精(*Polygonatum kingianum*)的根,串果藤(*Sinofranchetia chinensis*)、香殊兰(*Crinum bulbispermum*)的球茎中,具有抗肿瘤、抗氧化、镇咳祛痰、解痉、扩血管、脑保护等多种药理作用^[13-14],在 337 nm 有较强的吸收^[15]。ISL、DHB 和 THAP 的结构示于图 1。

本工作拟用低浓度的 ISL 和传统的 DHB、THAP 作为基质,采用 MALDI-TOF MS 分析精氨酸、甘露醇和苏氨酸-亮氨酸二肽等小分子物质,旨在为有机基质在小分子分析中的应用开辟新的窗口。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

MALDI-TOF MS 仪(Voyager DE-STR): 美国 AB Sciex 公司产品,配有 N_2 激光器,激光波长 337 nm; DHB、THAP、ISL、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)、棉籽糖: 美国 Sigma 公司产

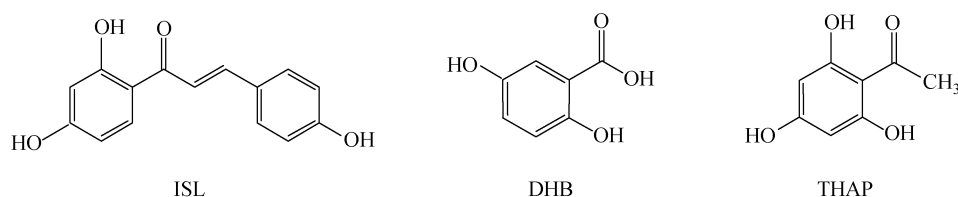


图 1 ISL、DHB 和 THAP 的结构图

Fig. 1 Structures of ISL, DHB and THAP

品;甘露醇、精氨酸、苏氨酸-亮氨酸二肽;北京化工厂产品;乙腈、甲醇:均为色谱纯,美国 Fisher 公司产品;实验用水(电阻率 18.2 MΩ/cm):由 Milli-Q 超纯水机制备,美国 Millipore 公司产品。

1.2 MALDI 基质溶液和样品的制备

1.2.1 基质溶液的制备 THAP 和 DHB 溶解在乙腈-水溶液中(1:1,V/V),浓度均为 0.5 mmol/L;ISL 溶解在甲醇中,其浓度为 0.05 mmol/L。在 MALDI 分析前,所有被分析物均用去离子水溶解和稀释。

1.2.2 样品的制备 参照文献[15],采用 dried-droplet 法制备样品。首先将 0.5 μL 的样品溶液点在不锈钢靶上,然后立即将 0.5 μL 的 ISL 基质溶液滴到样品上,于空气中干燥,结晶后进行质谱分析。

1.3 MALDI-TOF MS 条件

正离子反射模式,加速电压 20 kV,延迟时间 100 ns,激光频率 3 Hz。外标法进行校正,校正液包括棉籽糖(m/z 527.158 26)和 CHCA(m/z

190.050 4)。获得的质谱图来源于 50 个激光点。

2 结果与讨论

2.1 重复性

作为一种适宜的基质,能与样品的混合物在样品靶上形成均匀的斑点是获得较好的点和点重现性的前提。在使用 dried-droplet 方法分析甘露醇时,样品与 DHB、THAP、ISL 基质形成的结晶层的形态学差异示于图 2。由图 2 可见,DHB 与样品在点的边缘形成了针状结晶,THAP 在样品的表面形成了网状结晶,而 ISL 与样品形成了均匀的表面,没有大的簇。以分析 0.2 g/L 精氨酸为例,ISL 为基质时所获得的 RSD 值不超过 10%,而 THAP 和 DHB 为基质时所获得的 RSD 值均远远大于 10%,这表明 ISL 能提供良好的点和点的重复性,可为进一步的定量研究奠定基础。实验中,从 30 个不同位置获得的离子峰的相对强度和平均标准偏差(RSD)示于图 3。

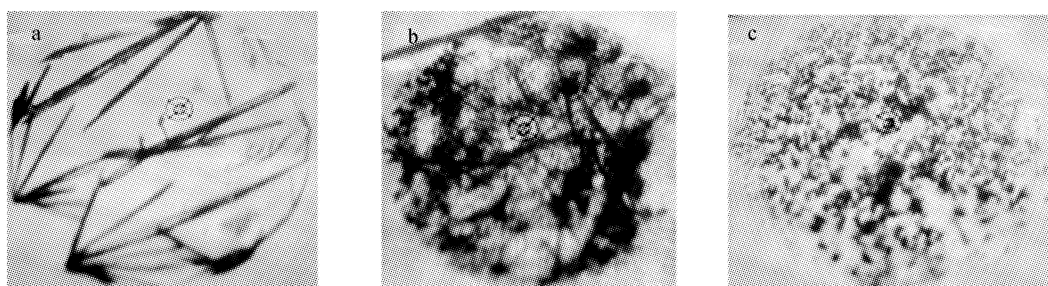
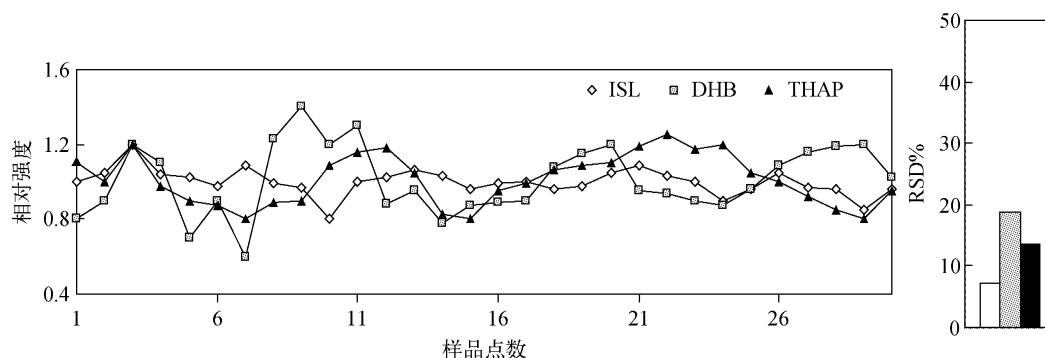


图 2 2 mmol/L 甘露醇与 DHB(a)、THAP(b)和 ISL(c)基质点样形成结晶后的照片

Fig. 2 Images of sample preparation using DHB (a), THAP (b) and ISL (c) as the matrices



注:右侧白色、灰色和黑色棒状图分别代表使用 ISL、DHB 和 THAP 为基质所获得的 RSD 值

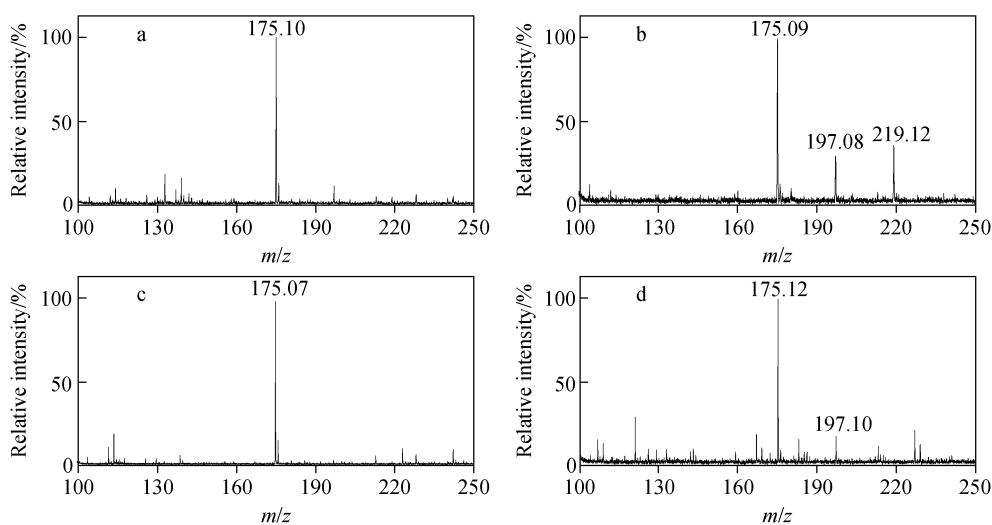
图 3 使用 ISL、DHB 和 THAP 为基质的 30 个不同激光照射点所获得的归一化的精氨酸 $[M+H]^+$ 离子强度

Fig. 3 Plot of normalized $[M+H]^+$ ion intensities yielded from 30 different positions on a sample of arginine with ISL in comparison to traditional DHB matrix and THAP matrix

2.2 耐盐和基体组分的能力

在低含量的盐类或基体组分存在的条件下,一般有机基质解吸/离子化的能力会大大降低,因此,有必要考察 ISL 作为基质的耐盐和基体组分的能力。在盐存在的条件下,以 0.05 mmol/L ISL 为基质的 0.2 g/L 精氨酸的 MALDI 质谱图示于图 4。其中,图 4a 和图 4b 分别为 1 mol/L 和 2 mol/L 氯化钠存在下,以 ISL 为基质的精氨酸的 MALDI 质谱图。由图可见,虽然在高浓度氯化钠的条件下,离子信号强度和 S/N 有所降

低,但在 2 mol/L 氯化钠存在下仍可以检测到精氨酸。图 4c 是以 ISL 为基质,1 mol/L 脲素存在下的精氨酸的 MALDI 质谱图,图中获得了较好的精氨酸离子信号。在 2 mol/L 脲素存在的条件下,尽管 S/N 明显降低,但仍可以检测到精氨酸,其质谱图示于图 4d。然而,当使用相同浓度的 DHB 和 THAP 为基质时,在 1 mol/L 氯化钠或脲素存在下观察不到样品信号。由以上结果可以推测,ISL 基质适用于高浓度盐或高浓度基体实际样品的分析。



注:a. 1 mol/L 氯化钠;b. 2 mol/L 氯化钠;c. 1 mol/L 脲素;d. 2 mol/L 脲素

图 4 盐存在下,以 0.05 mmol/L ISL 为基质的 0.2 g/L 精氨酸的 MALDI 质谱图

Fig. 4 MALDI mass spectra of 0.2 g/L arginine ($[M+H]^+$, 175 u) using 0.05 mmol/L ISL as matrix in the presence of saline material

2.3 低浓度的 ISL、DHB 和 THAP 作为基质分析小分子物质的结果比较

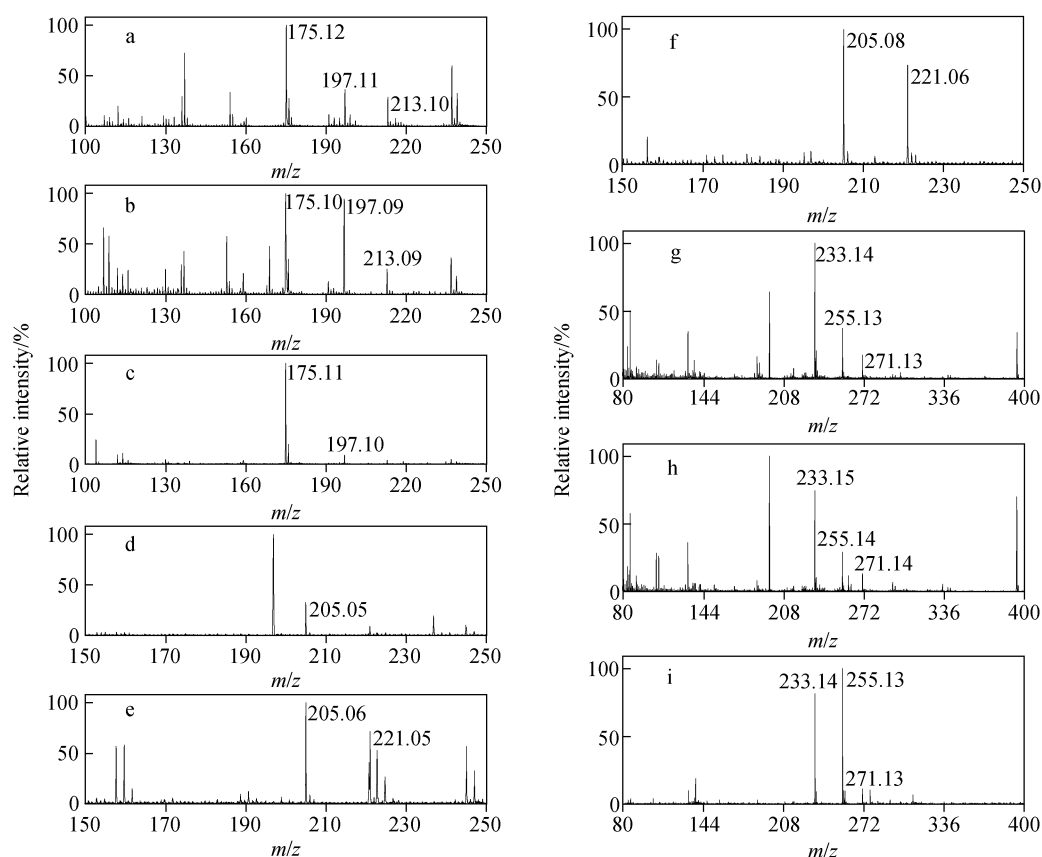
分别以 0.05 mmol/L ISL、0.5 mmol/L DHB 和 0.5 mmol/L THAP 为基质分析精氨酸、甘露醇和苏氨酸-亮氨酸二肽,结果示于图 5。对以这 3 种物质为基质所获得的分辨率进行了比较,结果列于表 1。通过比较发现:以

0.05 mmol/L 的 ISL 为基质分析小分子,可以获得无干扰的质谱图;而以 DHB 和 THAP 为基质时,干扰峰很多,对未知物而言,根本无法区分目标化合物;表 1 中的数据表明,以 ISL 为基质获得的分辨率高于以 DHB 和 THAP 为基质获得的分辨率。因此,低浓度的 ISL 更适合作为分析小分子的基质。

表 1 以 ISL、DHB 和 THAP 为基质分析精氨酸、甘露醇和苏氨酸-亮氨酸二肽所获得的分辨率

Table 1 Obtained resolution values for analysis of arginine, mannitol and Thr-Leu using ISL, DHB and THAP as matrices

物质	分辨率		
	ISL	DHB	THAP
精氨酸	980	903	622
甘露醇	2437	2059	2351
苏氨酸-亮氨酸二肽	2027	1107	1217



注: a. 精氨酸, DHB 基质; b. 精氨酸, THAP 基质; c. 精氨酸, ISL 基质; d. 甘露醇, DHB 基质;
e. 甘露醇, THAP 基质; f. 甘露醇, ISL 基质; g. 苏氨酸-亮氨酸二肽, DHB 基质;
h. 苏氨酸-亮氨酸二肽, THAP 基质; i. 苏氨酸-亮氨酸二肽, ISL 基质

图 5 使用 3 种不同基质分析 3 个物质所获得的 MALDI 质谱图

Fig. 5 MALDI mass spectra of 0.2 g/L arginine, 2 mmol/L mannitol, and 1 g/L Thr-Leu using DHB, THAP and ISL as matrices

3 结论

本工作采用低浓度的异甘草素 (ISL, 0.05 mmol/L) 作为 MALDI-TOF MS 分析小分子物质的基质, 对精氨酸、甘露醇和苏氨酸-亮氨酸二肽等小分子物质进行分析, 并与常用的有机基质 DHB 和 THAP 比较。结果表明, ISL 作为 MALDI-TOF MS 分析小分子物质的基质具有点与点的重复性好、耐盐性好、无基质干扰等优点, 这可为有机基质在小分子的 MALDI-TOF MS 分析中的应用开辟新的窗口。

参考文献:

[1] KARAS M, HILLENKAMP F. Laser desorption/ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons[J]. Analytical Chemis-

try, 1988, 60(20): 2 299-2 301.

- [2] TANAKA M, WAKI H, IDO Y, et al. Protein and polymer analyses up to m/z 10,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1988, 2(8): 151-153.
- [3] 刘淑莹, 宋凤瑞, 刘志强. 中药质谱分析[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [4] HARVEY D J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates[J]. Mass Spectrometry Reviews, 1999, 18(6): 349-451.
- [5] MELE A, MALPEZZI L. Noncovalent association phenomena of 2, 5-dihydroxybenzoic acid with cyclic and linear oligosaccharides. A matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric and X-ray crystallographic

- study[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2000, 11(3): 228-236.
- [6] MULDER R, ALLMAIER G. Molecular weight determination of ultra-high mass compounds on a standard matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer: PAMAM dendrimer generation 10 and immunoglobulin M [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20(24): 3 803-3 806.
- [7] FENSELAU C, DEMIREV P A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2001, 20(4): 157-171.
- [8] LAY J O. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2001, 20(4): 172-194.
- [9] TANG K, OPALSKY D, ABEL K, et al. Single nucleotide polymorphism analyses by MALDI-TOF MS[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 226(1): 37-54.
- [10] DONG X, CHENG J, LI J, et al. Graphene as a novel matrix for the analysis of small molecules by MALDI-TOF MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(14): 6 208-6 214.
- [11] XU S, LIY, ZOU H, et al. Carbon nanotubes as assisted matrix for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(22): 6 191-6 195.
- [12] ZHANG J, WANG H, GUO Y. Amino acids analysis by MALDI mass spectrometry using carbon nanotube as matrix[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2005, 23(2): 185-189.
- [13] 李德芳,王振华,罗锋,等. 异甘草素的药理作用研究[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(2): 362-364.
LI Defang, WANG Zhenhua, LUO Feng, et al. Pharmacological activities of isoliquiritigenin[J]. *Li Shi Zhen Medicine and Materia Medica Research*, 2010, 21(2): 362-364(in Chinese).
- [14] 孙建军,李长栋,荔志云. 异甘草素的脑保护作用研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(14): 2 791-2 793.
SUN Jianjun, LI Changdong, LI Zhiyun. Research advances of cerebral protection by isoliquiritigenin[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(14): 2 791-2 793(in Chinese).
- [15] YANG H, WANG J, SONG F, et al. Isoliquiritigenin (4, 2', 4'-trihydroxychalcone): A new MALDI matrix with outstanding properties for the analysis of neutral oligosaccharides[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 701(1): 45-51.