

# MALDI-TOF MS 基质 HCCA 与含巯基生命物质加成反应的质谱研究

李 静<sup>1,2</sup>, 任其龙<sup>1,2</sup>, 潘远江<sup>3</sup>

(1. 浙江大学化学工程与生物工程学院, 生物质化工教育部重点实验室, 浙江 杭州 310027;  
2. 浙江大学衢州研究院, 浙江 衢州 324000; 3. 浙江大学化学系, 浙江 杭州 310027)

**摘要:**采用基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和电喷雾质谱(ESI-MS)研究含巯基的生命物质(氨基酸、肽及蛋白质)与 MALDI 常用基质  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)之间的加成反应,并分别考察了其在酸性、弱酸性和碱性条件下的反应情况。结果表明,在碱性条件下,含巯基的生命物质易与 HCCA 发生加成反应,使待测物在质谱图中产生 189.0 u 的质量数迁移。此外,使用高分辨质谱分析加成产物,并通过串联质谱分析进一步确认其为共价结合产物。此研究为确定 MALDI 基质与含巯基的生命物质之间的加成反应提供了依据,以期减少质谱中基质对含有巯基化合物测试的干扰,为基质的选择提供参考。

**关键词:**基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF MS);电喷雾质谱(ESI-MS); $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA);分析物-基质加合产物;含巯基生命物质;碎裂机理

中图分类号:O657.63 文献标志码:A 文章编号:1004-2997(2022)02-0133-09

doi:10.7538/zpzb.2021.0064

## Mass Spectrometric Studies on the Addition Reaction of HCCA and Sulfhydryl-Containing Living Substance in MALDI-TOF MS Analysis

LI Jing<sup>1,2</sup>, REN Qi-long<sup>1,2</sup>, PAN Yuan-jiang<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Biomass Chemical Engineering of Ministry of Education, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;  
2. Institute of Zhejiang University-Quzhou, Quzhou 324000, China;  
3. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

**Abstract:** The addition reactions between the common matrix  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (HCCA) in matrix assisted laser desorption (MALDI) and the sulfhydryl-contained compounds were investigated using matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and electrospray mass spectrometry (ESI-MS), and the corresponding reactivity was also compared in the acid, weak acid and alkaline conditions, respectively. The results showed that the sulfhydryl-contained compounds could much easily undergo addition reaction with HCCA under alkaline

conditions, resulting in a mass shift of 189.0 u in the mass spectrum. In addition, the identity of the reaction product was supported by high resolution mass spectrometry analysis, and was further identified as covalent bonding products by tandem MS analysis. This work provides a proof for the addition reaction between MALDI matrix and sulfhydryl-contained compounds, so as to reduce the interference of the matrix in the MALDI-TOF MS analysis of the relevant compounds, and to provide a reference for the selection of matrix.

**Key words:** matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS); electrospray mass spectrometry (ESI-MS);  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA); analyte-matrix adduct; sulfhydryl-containing living substance; fragmentation mechanism

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 具有灵敏度高、检测限低、盐类容忍度高、制样简便等优势<sup>[1]</sup>, 广泛应用于蛋白质、DNA、磷脂、聚合物、药物及其代谢物等多种类型化合物的分析中<sup>[2-4]</sup>。基质在 MALDI-TOF MS 分析过程中发挥着至关重要的作用, 其吸收激光能量气化后将样品分子带人气相, 并将能量和质子转移给样品分子, 使样品分子离子化。随着 MALDI 应用的增加, 基质的发展和选择在优化该技术方面尤其重要<sup>[5-6]</sup>。MALDI 基质通常是具有低蒸汽压的弱有机酸, 其中  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸 (HCCA) 是应用最广泛的基质之一, 其结构简单, 质子化后的质谱信息不会对待测物的解析产生干扰, 可以用于检测多种化合物。但是, 在有些情况下, 基质与待测物发生反应, 生成的新物质给待测物的检测和解析造成困扰<sup>[7-10]</sup>。因此, MALDI 基质与待测物之间的反应研究是非常重要的。

电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 具有溶剂适用性广、电离效率高、所需样品量少、质量范围宽等特点, 是生物大分子分析领域不可或缺的工具<sup>[11]</sup>。通常, 一级质谱只能得到生物样本的分子质量信息, 无法获得结构信息, 可通过串联质谱技术获取。碰撞诱导裂解 (CID) 技术通过引入碰撞气体至碰撞室与母离子碰撞, 使母离子裂解产生碎片, 从而获得结构信息<sup>[12]</sup>。ESI-MS 与 CID 技术的结合不仅可以分析大量不同种类的化合物, 而且在有机和生物化合物的结构解析方面发挥着不可替代的作用。

半胱氨酸侧链上的巯基是构成蛋白质的氨基酸残基中最活泼的基团, 以自由的一SH、离子化的硫醇或氧化的一S—S—形式存在<sup>[13]</sup>。这使得半胱氨酸成为最活泼的天然氨基酸, 是肽和蛋白质发挥功能的关键单元。半胱氨酸具有固定细胞色素中血红素的功能, 参与一系列翻译后修饰、形成二硫键, 在很多金属蛋白中可以起到结合金属离子、抗氧化等作用<sup>[14-15]</sup>。由于参与多种生理过程, 半胱氨酸及其残基一直是生物和生物化学领域重要的研究对象。

本工作拟以含有巯基的氨基酸、肽、蛋白质作为研究对象, 采用 MALDI-TOF MS 中常用基质 HCCA 与研究对象发生反应。通过 ESI-MS 结合 CID 技术分析 HCCA 与含巯基的氨基酸、肽及蛋白质反应产物的结构, 并研究此类化合物产生的加成反应机理。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与装置

LCQ 质谱仪: 美国 Thermo Fisher 公司产品, 配有电喷雾离子源; Autoflex III 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪 (配有基质辅助激光解吸离子源)、microTOF QII (Q-TOF) 高分辨质谱仪 (配有电喷雾离子源); 德国布鲁克仪器有限公司产品; Milli-Q 超纯水纯化系统: 美国 Millipore 公司产品。

### 1.2 材料与试剂

本研究所用分析物和 MALDI 基质的结构式示于图 1。猪胰岛素 ( $A_3$ ): 美国 Sigma 公司产品; 半胱氨酸、 $\alpha$ -氰基-4-甲氧基肉桂酸 (M)、

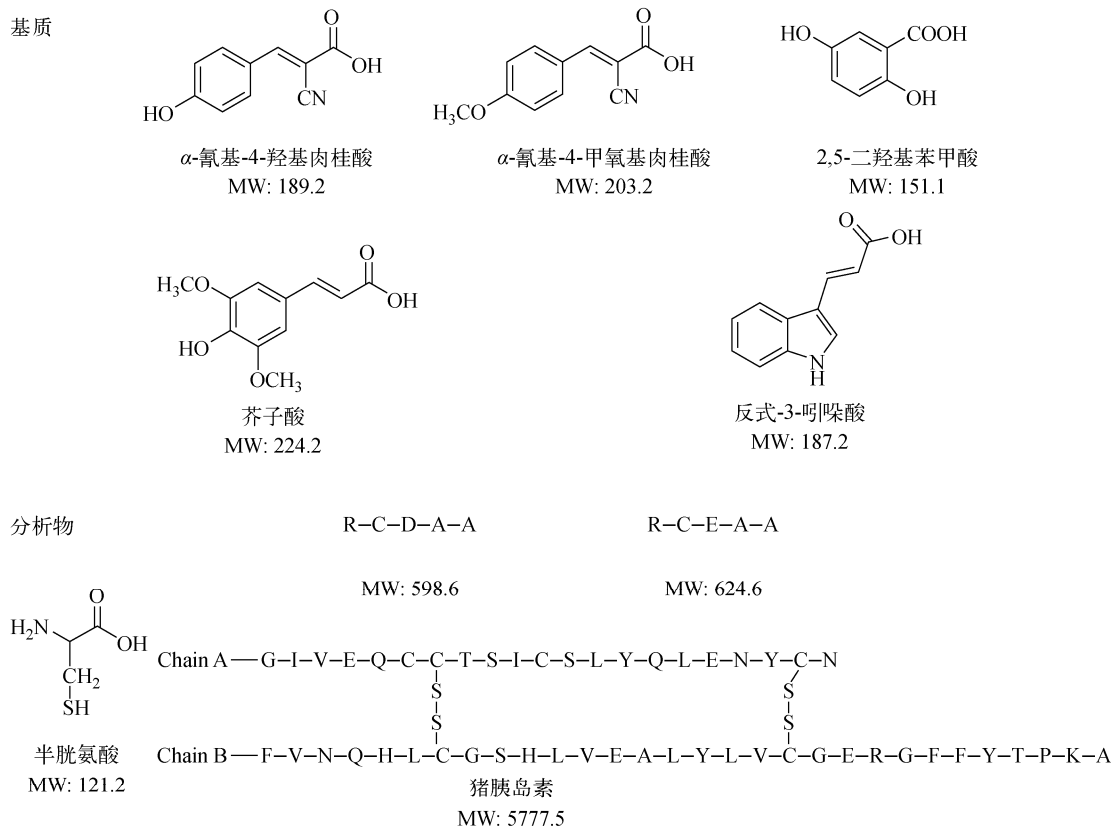


图 1 基质以及分析物的结构和分析物序列

Fig. 1 Structures of the matrices and HCCA derivatives, and amino acid sequence of analytes

五肽 RCDAA( $A_1$ )、五肽 RCEAA( $A_2$ )、二硫苏糖醇(DTT);北京百灵威科技有限公司产品; $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸、2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、反式-3-吲哚酸(IAA)、芥子酸(SA);德国 Bruker Daltonics 公司产品;甲醇(色谱纯);德国 Merck 公司产品;实验用水:由 Milli-Q 纯水系统制备。

### 1.3 实验条件

**1.3.1 MALDI 基质与分析物反应条件** 半胱氨酸、 $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  与 MALDI 基质 DHB、IAA、SA、HCCA 及 HCCA 衍生物 M 的孵化条件:酸性(pH 3.0)、弱酸性(pH 6.0)、碱性(pH 9.0);分析物与基质的反应摩尔比为 1:500; $A_3$  二硫键还原试剂为二硫苏糖醇(DTT);分析物与基质反应温度为室温。

**1.3.2 质谱条件** LCQ 质谱仪:电喷雾离子源,正、负离子模式采样;检测电压 4.5 kV;氮气压力 2.5 MPa;样品流速 5  $\mu$ L/min;离子传输管温度 250  $^{\circ}$ C;碰撞气体为高纯氩气;二级质谱碰撞能量 20%;一级质谱质量采集范

围  $m/z$  100~1 000;二级质谱质量采集范围  $m/z$  100~1 000;数据采集处理:取 50 次扫描平均值。

MALDI-TOF MS 质谱仪:基质辅助激光解吸离子源,正离子模式采样;氮激光波长 355 nm;进样靶板 SCOUT MTP 96;激光能量范围 30%~70%;激光累计次数 1 500;离子加速电压 1 kV;一级质谱质量采集范围  $m/z$  100~8 000;采用 BSA 胰蛋白酶酶切产物进行质量校正。

Q-TOF 高分辨质谱仪:电喷雾离子源,正离子模式采样;样品流速 180  $\mu$ L/h;进样泵进样;氮气流速 4 L/min,氮气流速压力  $0.4 \times 10^5$  Pa;离子源温度 180  $^{\circ}$ C;检测电压 3.5 kV;采用三氟乙酸钠聚合物进行高分辨质量校正。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MALDI-TOF MS 结果分析

**2.1.1 半胱氨酸与基质加合物的鉴定** 选择半胱氨酸(C)作为模型化合物,研究其与

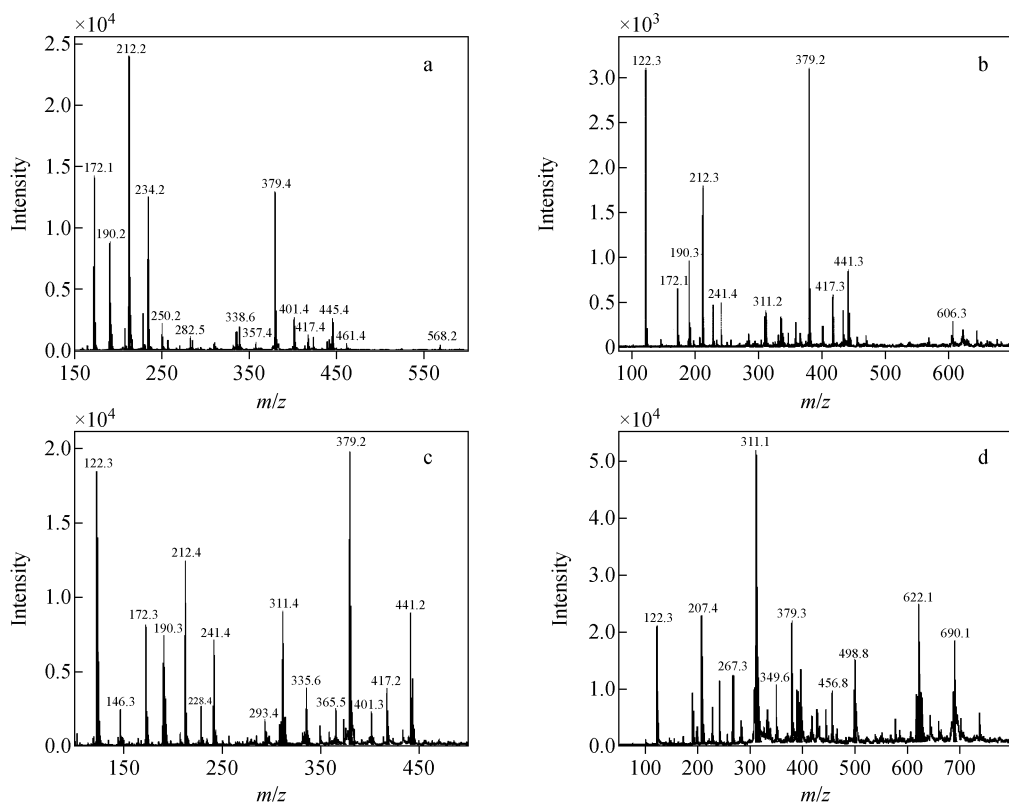
MALDI 基质的加成反应。基质 HCCA 的 MALDI-TOF 质谱图示于图 2a, 离子峰  $m/z$  172.1、190.2、212.2、379.4 和 568.2 分别为  $[\text{HCCA}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{HCCA}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{HCCA}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{2HCCA}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{3HCCA}+\text{H}]^+$ 。在酸性条件(pH 3.0)下, HCCA 与半胱氨酸反应产物的质谱图示于图 2b, 基峰  $m/z$  122.3 为准分子离子峰  $[\text{C}+\text{H}]^+$ , 半胱氨酸与 HCCA 加成产物的准分子离子峰  $m/z$  311.2 为  $[\text{C}+\text{HCCA}+\text{H}]^+$ , 相对强度较弱。在弱酸性条件(pH 6.0)下, 半胱氨酸与 HCCA 加成产物的准分子离子峰  $m/z$  311.4  $[\text{C}+\text{HCCA}+\text{H}]^+$  相对强度明显增强, 示于图 2c。在碱性条件(pH 9.0)下, 加成产物的准分子离子峰  $m/z$  311.1  $[\text{C}+\text{HCCA}+\text{H}]^+$  相对强度最大, 成为图 2d 中的基峰。以上结果表明, 半胱氨酸与 HCCA 的加成反应受 pH 值的影响, 碱性条件下此反应最完全。HCCA 基质适合半胱氨酸的检测, 但二者反应产物的离子峰对质谱图的

解析造成干扰。

本研究同时考察了半胱氨酸与 MALDI 其他常用基质 DHB、SA、IAA 的反应, 分别示于图 3~5。在图 3a 中,  $m/z$  137.3、155.1、177.3、193.4 和 273.1 分别为  $[\text{DHB}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{DHB}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{DHB}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{DHB}+\text{K}]^+$  和  $[\text{2DHB}-\text{2H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 。半胱氨酸与 DHB 在酸性、弱酸性和碱性条件下反应所得的质谱图分别示于图 3b~3d, 图中基峰均为  $[\text{C}+\text{H}]^+$   $m/z$  122.2, 没有观察到  $[\text{C}+\text{DHB}+\text{H}]^+$  的出现。

基质 SA 的 MALDI-TOF 质谱图示于图 4a, 其与半胱氨酸在酸性、弱酸性、碱性条件下反应所得的质谱图分别示于图 4b~4d。  $m/z$  207.1、225.1 分别为  $[\text{SA}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  和  $[\text{SA}+\text{H}]^+$ , 质谱图中均未观察到  $[\text{C}+\text{H}]^+$  和  $[\text{C}+\text{SA}+\text{H}]^+$  的出现。

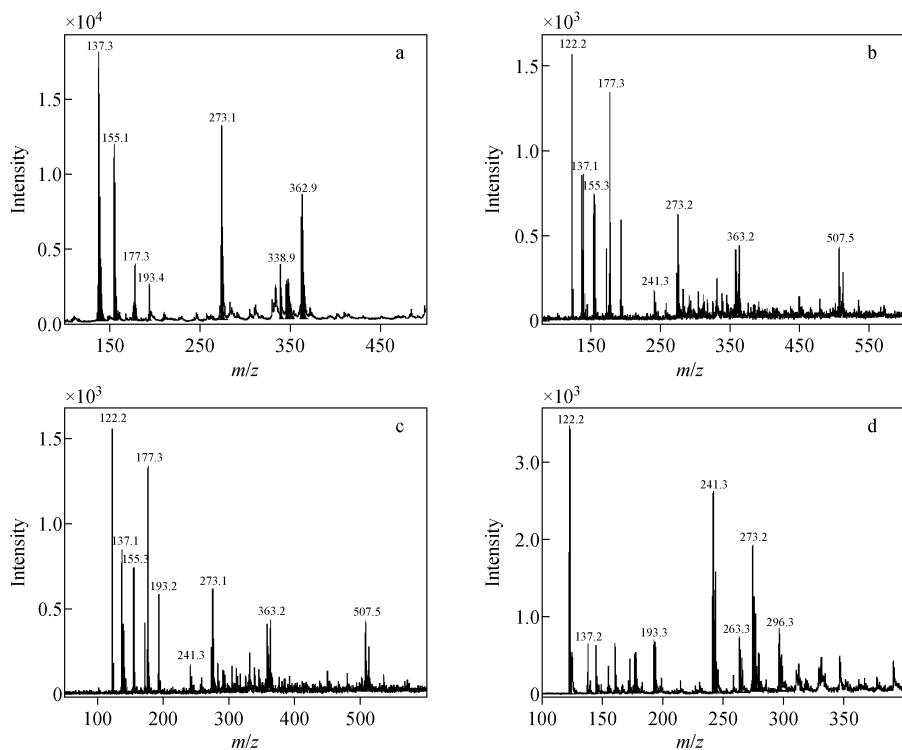
在图 5a 中,  $m/z$  142.3、170.4、188.4、210.4、226.3、283.1、329.1、375.1、397.2 和 584.0 分别为  $[\text{IAA}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{IAA}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 、



注: a. 50%乙腈; b. pH 3.0; c. pH 6.0; d. pH 9.0

图 2 HCCA(a)和 HCCA-C 加合物(b,c,d)的 MALDI-TOF 质谱图

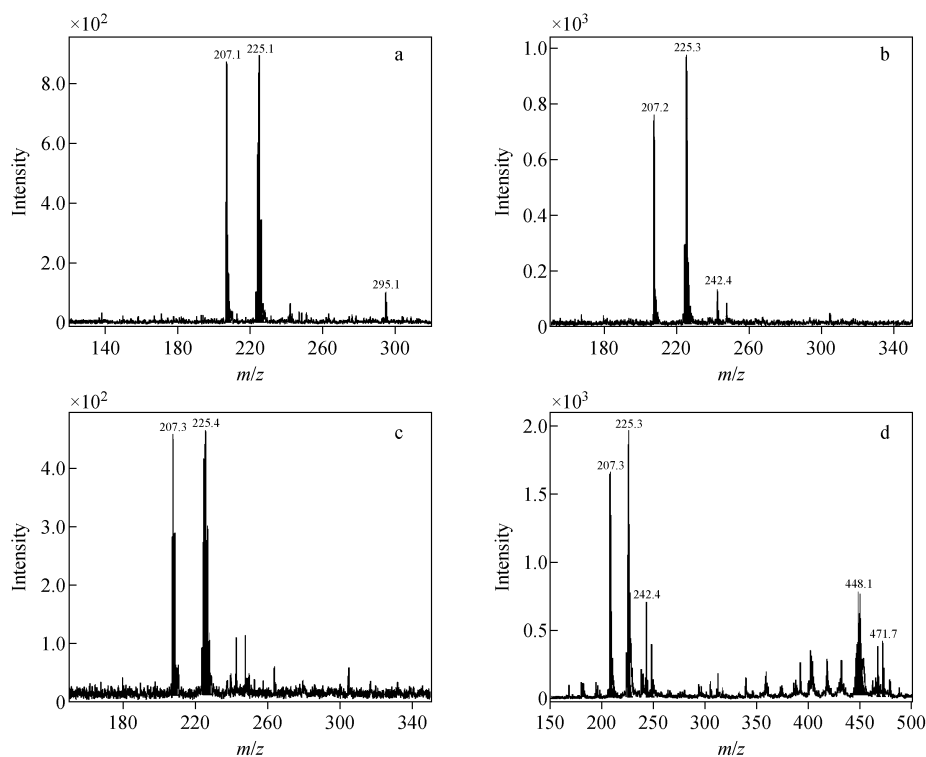
Fig. 2 MALDI-TOF mass spectra of the HCCA (a) and HCCA-cysteine adducts (b, c, d)



注: a. 50%乙腈; b. pH 3.0; c. pH 6.0; d. pH 9.0

图3 DHB(a)和DHB-C加合物(b,c,d)的MALDI-TOF质谱图

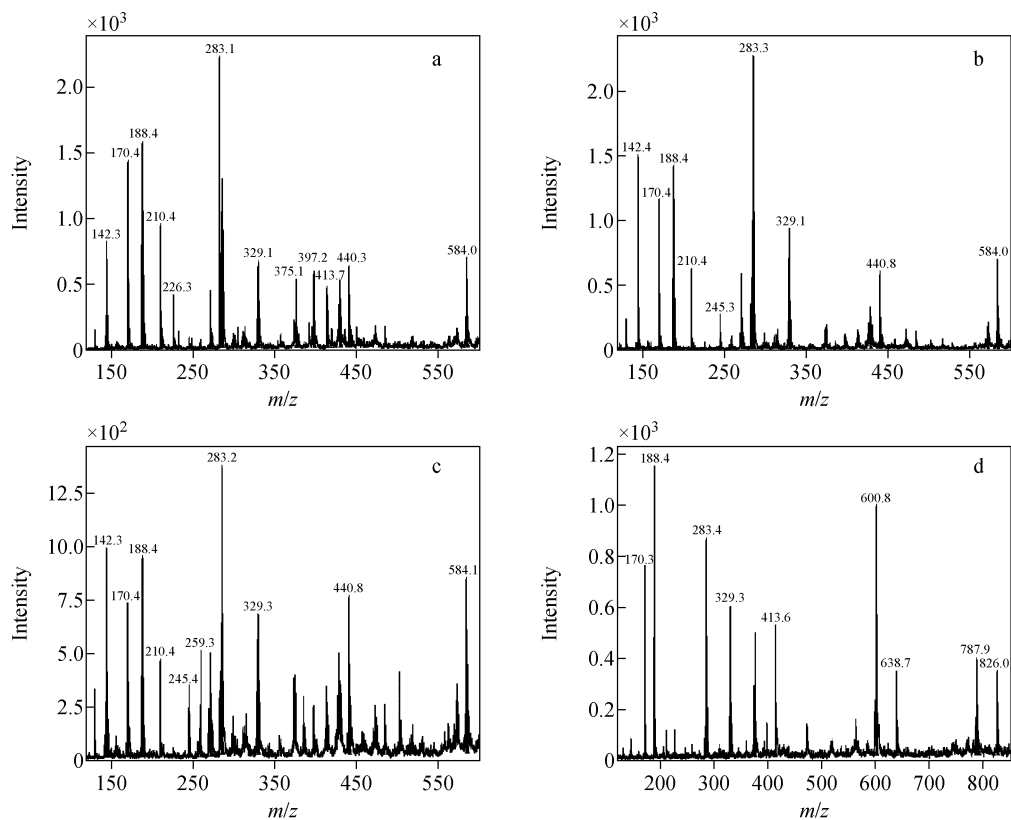
Fig. 3 MALDI-TOF mass spectra of the DHB (a) and DHB-cysteine adducts (b, c, d)



注: a. 50%乙腈; b. pH 3.0; c. pH 6.0; d. pH 9.0

图4 SA(a)和SA-C加合物(b,c,d)的MALDI-TOF质谱图

Fig. 4 MALDI-TOF mass spectra of the SA (a) and SA-cysteine adducts (b, c, d)



注: a. 50%乙腈; b. pH 3.0; c. pH 6.0; d. pH 9.0

图5 IAA(a)和IAA-C加合物(b,c,d)的MALDI-TOF质谱图

Fig. 5 MALDI-TOF mass spectra of the IAA (a) and IAA-cysteine adducts (b, c, d)

$[IAA + H]^+$ 、 $[IAA + Na]^+$ 、 $[IAA + K]^+$ 、 $[2IAA - 2H_2O - 2CO_2 + H]^+$ 、 $[2IAA - CO_2 - H_2O + H]^+$ 、 $[2IAA + H]^+$ 、 $[2IAA + Na]^+$  和  $[3IAA + Na]^+$ 。在不同 pH 值条件下, IAA 与半胱氨酸反应所得的质谱图中均未检测到  $[C + H]^+$  和  $[C + IAA + H]^+$ 。

以上结果表明, 基质 DHB、SA、IAA 在酸性、弱酸性、碱性条件下均不与半胱氨酸发生加成反应, 且 SA 和 IAA 无法使含巯基的氨基酸、肽和蛋白质等生命物质电离从而被检测。

**2.1.2 HCCA 与 DTT 还原  $A_3$  加成产物的鉴定** 二硫键还原后  $A_3$  与 HCCA 反应产物的 MALDI-TOF 质谱图示于图 6。 $m/z$  2 381.1 为  $[chain A + H]^+$ ,  $m/z$  3 399.1 为  $[chain B + H]^+$ 。 $m/z$  2 570.6、2 759.3、3 588.2 分别为  $[chain A + HCCA + H]^+$ 、 $[chain A + 2HCCA + H]^+$ 、 $[chain B + HCCA + H]^+$ , 分别产生 1 个 189.1 u、2 个 189.1 u 和 1 个 189.1 u 质量数的迁移。结果表明, 多肽结构中巯基与 HCCA 发生加成反应。

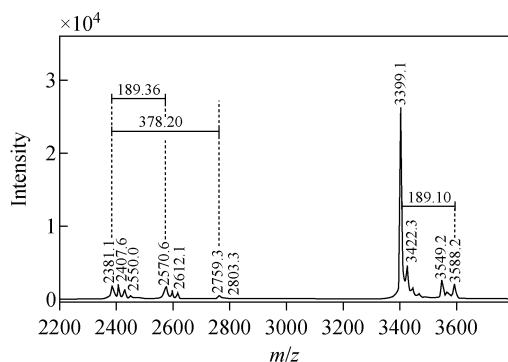


图6 碱性条件下, DTT 还原

猪胰岛素与 HCCA 反应产物的 MALDI-TOF 质谱图  
Fig. 6 MALDI-TOF mass spectrum of reaction product of reduced insulin from porcine pancreas and HCCA under alkaline condition

## 2.2 ESI-MS 结果分析

**2.2.1 半胱氨酸与 HCCA 反应产物的高分辨质谱鉴定** 碱性条件下, 半胱氨酸与 HCCA 反应产物的正离子模式高分辨质谱图示于图 7,

准分子离子峰  $m/z$  122.026 6 为  $[C+H]^+$ 。通过分析  $m/z$  311.070 6 的元素组成(误差  $3.3 \times 10^{-6}$ ), 可以确认其为加成产物的准分子离子峰  $[C+HCCA+H]^+$ , 列于表 1。高分辨质谱结果证实了 MALDI-TOF 质谱结果, 半胱氨酸与 HCCA 确实发生了加成反应, HCCA 的质量数迁移了 189.0 u(1 分子半胱氨酸)。

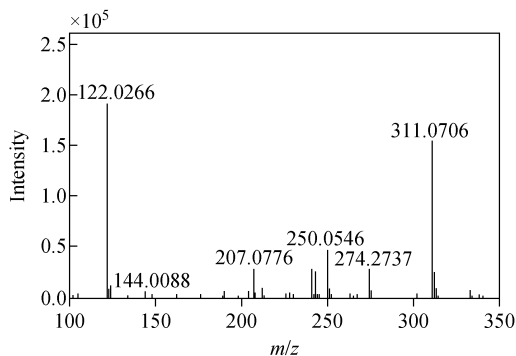


图 7 碱性条件下, 半胱氨酸

与 HCCA 反应产物正离子模式高分辨质谱图

Fig. 7 Accurate mass spectrum of cysteine-HCCA mixture under alkaline condition in positive ion mode

表 1 半胱氨酸与 HCCA 反应产物元素分析  
( $m/z$  311.070 6)

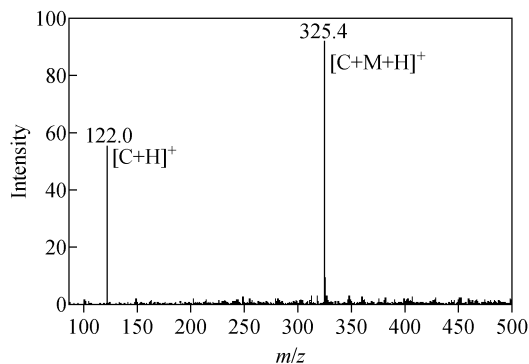
Table 1 Elemental composition of cysteine and HCCA reaction product at  $m/z$  311.070 6

参数 Parameter	数值 Value
测量值( $m/z$ )	311.0706
分子式	$C_{13}H_{15}N_2O_5S$
得分	100
质荷比( $m/z$ )	311.0696
误差 <sup>a</sup> /mu	-1
误差 <sup>b</sup> / $\times 10^{-6}$	-3.3
mSigma	5.8
rdb	7.5
e <sup>-</sup> Conf	even
N-Rule	ok

注: a. [半胱氨酸与 HCCA 的反应产物离子峰( $m/z$  实验测定值 -  $m/z$  计算值)]  $\times 1\ 000$ ; b. [半胱氨酸与 HCCA 的反应产物离子峰( $m/z$  实验测定值 -  $m/z$  计算值)] / (半胱氨酸与 HCCA 的反应产物离子峰  $m/z$  计算值)

2.2.2 M 与半胱氨酸、 $A_1$ 、 $A_2$  反应产物的鉴定 本实验考察了 HCCA 衍生物  $\alpha$ -氰基-4-甲

氧基肉桂酸与半胱氨酸的反应, 示于图 8,  $m/z$  122.0、325.4 分别对应  $[C+H]^+$ 、 $[C+M+H]^+$ 。五肽 RCDA 和 RCEAA 与 M 的反应产物去质子化质谱峰分别为  $m/z$  736.1 [ $A_1+M-H$ ]<sup>-</sup> 和 750.3 [ $A_2+M-H$ ]<sup>-</sup>。由于  $A_1$  和  $A_2$  中存在天冬氨酸和谷氨酸, 这 2 个加合产物离子峰均为负离子模式检测。



注:  $m/z$  325.4 对应的是半胱氨酸与 M 的加合产物

图 8 正离子模式下, 半胱氨酸与 M 的加合产物电喷雾质谱图 (pH 9.0)

Fig. 8 ESI mass spectrum of cysteine and M adduct under alkaline condition in positive ion mode

### 2.3 半胱氨酸与 HCCA 加成产物的质谱碎裂研究

本研究所有质子化和去质子化的分析物-基质加成产物的碎片离子列于表 2。前期研究中, 在分析物与基质所得产物的 MS/MS 质谱图中, 主要为分析物与基质加合物的信号峰, 表明基质与分析物的反应产物以非共价键结合的形式存在<sup>[16-17]</sup>。本研究中, 在质子化或去质子

表 2 CID 质谱图中质子化和去质子化加成产物碎片离子

Table 2 Fragment ions of protonated and deprotonated adducts in CID mass spectra

质子化和去质子化加成产物 Protonated and deprotonated addition product ( $m/z$ )	碎片离子 Fragment ion ( $m/z$ )		
311.1(C&HCCA)	294.0	276.0	226.1
325.4(C&M)	308.4	290.1	-
736.1(M&A <sub>1</sub> )	692.3	622.4	533.2
750.3(M&A <sub>2</sub> )	706.1	547.3	386.3

化的分析物与基质加成产物的 MS/MS 质谱图中, 基质、分析物的信号峰均未出现或以很低丰度的形式出现, 碎片峰都是全新的离子峰, 说明基质与分析物发生了加成反应, 以共价化合物的形式存在。以半胱氨酸与 HCCA 质子化加成产物(表 2 中 C&HCCA)的 MS/MS 质谱图为例, 对裂解机理进行研究, 示于图 9。母离子为  $m/z$  311.1, 产生碎片离子  $m/z$  294.0、276.0、226.1。在线路 1 中, 加成产物的羰基氧原子捕获 1 个质子, 形成离子 a( $m/z$  311.1), 然后丢失 1 分子  $H_2O$  和  $-C_3HNO$ , 形成碎片离

子 b( $m/z$  226.1)。在线路 2 中, 加成产物的氨基捕获 1 个质子, 形成离子 c( $m/z$  311.1), 然后丢失 1 分子氨, 形成离子 d( $m/z$  294.0), 离子 d 发生电荷迁移, 形成离子 e( $m/z$  294.0), 最后丢失 1 分子  $H_2O$ , 形成离子 f( $m/z$  276.0)。

对碎片离子和碎裂途径的研究不仅能为反应产物的结构确定提供参考, 还可以根据基质与分析物加成产物的 MS/MS 质谱图中基质与分析物信号峰均未出现或丰度很低确定  $\alpha, \beta$  不饱和基质与含巯基的氨基酸、肽和蛋白是通过共价键结合的。

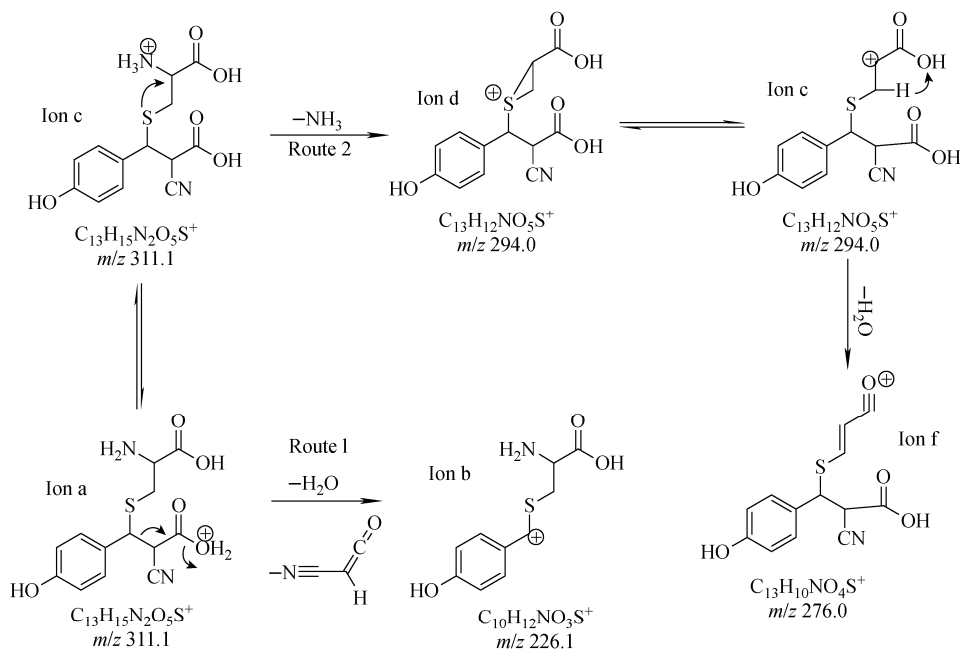


图 9 质子化半胱氨酸与 HCCA 加成产物可能的碎裂机理

Fig. 9 Proposed fragmentation mechanisms of the protonated cysteine and HCCA adduct

### 3 结论

本工作采用 MALDI-TOF MS 和 ESI-MS 研究含巯基的生命物质(氨基酸、肽及蛋白质)与 MALDI 常用基质  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸在酸性、弱酸性、碱性条件下的加成反应。结果发现, 碱性条件下极易发生含巯基生命物质与 HCCA 的加成反应, 质谱图中会出现  $189.1n$  u ( $n$  表示巯基的数目)的质量数迁移。HCCA 与半胱氨酸的加成产物得到了高分辨质谱的确认。此外, 使用串联质谱技术对此加成产物进行碰撞诱导裂解研究, 通过 MS/MS 结果推测出碎裂机理, 确认此加成产物为共价键结合。

在此基础上开展了 HCCA 衍生物  $\alpha$ -氰基-4-甲氧基肉桂酸与含巯基生命物质加成反应的拓展研究。此研究加深了 MALDI 基质与含巯基生命物质之间加成反应的理解, 对含有巯基分析物的质谱测试和分析具有借鉴意义, 同时为基质的选择提供了参考。

### 参考文献:

- [1] KARAS M, BACHMANN D, BAHR U, HILLENKAMP F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds[J]. International Journal of Spectrometry and Ion

- Processes, 1987, 78(24): 53-68.
- [2] LI J, YUE L, LI C, PAN Y J, YANG L R. Enantioselectivity and catalysis improvements of pseudomonas cepacia lipase with Tyr and Asp modification[J]. Catalysis Science & Technology, 2015, 5(5): 2 681-2 687.
- [3] CHAURAND P, NORRIS J L, CORNETT D S, MOBLEY J A, CAPRIOLO R M. New development in profiling and imaging of proteins from tissue sections by MALDI mass spectrometry[J]. Journal of Proteome Research, 2006, 11(5): 2 889-2 900.
- [4] FENSELAU C, DEMIREV P A. Characterization of intact microorganism by MALDI spectrometry[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2001, 4(20): 157-171.
- [5] FINKE B, MANK M, DANIEL H, STAHL B. Offline coupling of low-pressure anion-exchange chromatography with MALDI-MS to determine the elution order of human milk oligosaccharides [J]. Analytical Biochemistry, 2000, 284(2): 256-265.
- [6] LOU X W, de WAAL B F M, van DONGEN J L J, VEKEMANS J A J M, MEIJER E W. A pit-fall of using 2-[(2E)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile as a matrix in MALDI TOF MS: chemical adduction of matrix to analyte amino groups[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2010, 45(10): 1 195-1 202.
- [7] KERR T J, GANT-BRANUM R L, MCLEAN J A. Multiplexed analysis of peptide functionality using lanthanide-based structural shift reagents [J]. International Journal of Spectrometry and Ion Processes, 2011, 307(1/2/3): 28-32.
- [8] KELLER B O, LI L. Discerning matrix-cluster peaks in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectra of dilute peptide mixtures[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2000, 11(1): 88-93.
- [9] KIM J S, KIM J Y, KIM H J. Suppression of matrix clusters and enhancement of peptide signals in MALDI-TOF mass spectrometry using nitrilotriacetic acid[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(22): 7 483-7 488.
- [10] SMIRNOV I P, ZHU X, TAYLOR T, HUANG Y, ROSS P, PAPAYANOPOULOS I A, MARTIN S A, PAPPIN D J, BEAVIS R C, CHAIT B T. Suppression of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix clusters and reduction of chemical noise in MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(10): 2 958-2 965.
- [11] CHAI Y F, JIANG K Z, PAN Y J. Hydride transfer reactions via ion-neutral complex: fragmentation of protonated *N*-benzylpiperidines and protonated *N*-benzylpiperazines in mass spectrometry[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2010, 45(5): 496-503.
- [12] GUO M Z, GUO C, PAN Y J. Competitive formation of b(2) and c(2)-H<sub>2</sub>O ions from b(3) ions containing Asp residue during tandem mass spectrometry: the influence of neighboring Arg [J]. Amino Acids, 2014, 46(8): 1 939-1 946.
- [13] TERADA M, TANAKA H, SORIMACHI K. Enantioselective direct aldol-type reaction of azlactone via protonation of vinyl ethers by a chiral brønsted acid catalyst[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(10): 3 430-3 431.
- [14] MUNDLE S O C, KLUGER R. Decarboxylation via addition of water to a carboxyl group: acid catalysis of pyrrole-2-carboxylic acid[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(33): 11 674-11 675.
- [15] NAM K, VERDINE G L, KARPLUS M. Analysis of an anomalous mutant of mutm DNA glycosylase leads to new insights into the catalytic mechanism[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(51): 18 208-18 209.
- [16] YANG H M, LIU N, QIU X Y, LIU S Y. A new method for analysis of disulfide-containing proteins by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 20: 2 284-2 293.
- [17] YANG H M, WAN D B, SONG F R, LIU Z Q, LIU S Y.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, sinapinic acid, and ferulic acid as matrices and alkylating agents for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of cysteine-containing peptides[J]. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 2013, 27(12): 1 410-1 412.

(收稿日期:2021-04-22;修回日期:2021-06-25)