生物化学与生物物理进展 *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, 33(10): 942~947
www.pibb.ac.cn

PIBB

研究快报

多肽分子疏水性的电喷雾飞行时间质谱法快速测定 *

周跃明 [1)] 王伟萍 [1)] 梁华正 [1)] 张 燮 [1)] 陈焕文 [1, 2)**] 陈兰慧 [3)]

([1)]东华理工学院应用化学系，抚州 344000；[2)]吉林大学化学学院，长春 130021；
[3)]东北师范大学化学学院功能材料化学研究所，长春 130024)

摘要 疏水作用是决定生物分子的结构和性质的重要因素，特别是在蛋白质的折叠，药物分子与受体 (蛋白质、DNA 等) 的相互作用中起着关键作用. 分子疏水性的强弱决定于分子内非极性基团的含量. 在一定的实验条件下，电喷雾所获得的信号与多肽分子内非极性基团的面积呈现良好的相关性. 因此，采用电喷雾飞行时间质谱法，在数分钟之内快速测定了不同多肽之间的疏水性，所获得结果与色谱法结果一致.

关键词 疏水性，多肽，电喷雾，质谱，非极性面积
学科分类号 O65，Q5，Q6

疏水性是影响生物大分子构效关系、生物活性和药物活性的重要参数之一[1~7]，也是影响遗传和变异的关键因素[8]，甚至是疯牛病、老年性痴呆等许多蛋白质构象病的根本原因[9]. 多肽是一类具有重要生物功能的化合物，不仅充当了氨基酸和蛋白质之间的桥梁，也是蛋白质测序中能够测定的直接对象，还是许多正蓬勃发展的生物制药中的重要物系[10]. 因此，对多肽疏水性的快速测定对生命科学研究和药物开发均具有特别重要的意义.

对于生物分子而言，分子疏水性主要决定于分子中含有极性和非极性基团的相对含量. 目前常使用化合物在正辛醇和水两相间的分配系数的对数值(LogP)来度量其疏水性[11~19]，或通过亲 / 疏水作图法(hydropathy)描述[20]，但实际测量时操作繁琐、耗时费力，难以满足实际测定的需要. 为了克服这些实验方法效率低下的缺点，人们又试图仅从化合物的结构出发来预测其脂水分配系数，已有多种计算方法见诸报道[11~13]. 计算的方法对于普通的小分子有机化合物能给出较好的结果，具有重要的意义. 但是，目前预测一般有机化合物脂水分配系数的方法对于多肽尚不能给出满意的结果. Heiden 等[21]花费了大量精力来合成许多小肽，并测定其脂水分配系数值，通过构建训练集和化学计量学的办法得出经验模型，我国学者对此进行了详细比较和评述[9, 22]，认为此方法存在模型较为繁琐且通用性不好、实用性较差等欠缺. 最近 Hessa 等[23]用基因工程合成不同氨基酸序列的多肽，根据多肽插入内质网膜中的能力，用实验方法给出了 20 种氨基酸残基的疏水性数据，该方法仍然较为复杂且实用性欠佳.

本文首次提出了利用电喷雾飞行时间质谱法进行多肽疏水性测定的快速方法，并对疏水性不同的多种多肽进行了测定，所获得的结果与经典色谱法获得的结果一致. 由于电喷雾质谱法已经成为生命科学研究中不可或缺的工具，所以本方法具有普遍的适用性，同时具有测量速度快、适合大批量样品分析等特点.

1 材料与方法

实验所用主要仪器为电喷雾四极飞行时间质谱仪 (ESI-QTOF Ultima-MS) (Waters 公司). 实验中所用喷雾电压为+3 kV，多肽溶液的流速为 2 μl/min，其他条件采用仪器推荐工作条件. 所有操作参数在实验过程中保持不变.

*国家自然科学基金(20505003), 欧盟 Simon 基金 (HWC 2006)资助项目.
** 通讯联系人. Tel: 0794-8258703, E-mail: chw8868@gmail.com
收稿日期：2006-08-22，接受日期：2006-09-30

实验中所用多肽购自 Sigma 公司，全部为色谱纯，使用前没有进行其他处理. 准确称取各多肽 0.1 mmol，添加适量水将多肽溶解，然后将溶液和洗涤液全部转移到 100 ml 容量瓶中，定容后则为 1×10^{-3} mol/L 多肽溶液，可以在 5℃环境中避光短期保存. 使用时稀释成为 1×10^{-5} mol/L 工作溶液，现用现配. 实验所用水为二次去离子水.

2　结果与讨论

2.1　材料的选择

水是极性极强的分子，极性较强的分子或基团都可能与水分子形成很强的分子间作用力，从而获得更好的亲水性. 对于非极性分子或基团，它们具有较差的亲水性，较强的疏水性. 一般认为分子的疏水性的强度主要决定于分子非极性基团的数量和面积. 因此，为了考察不同多肽的疏水性，实验挑选了骨架结构一致的三肽作为实验对象，它们的分子结构如图 1 所示. 从图 1 可以看出，所选用的 6 个三肽都可以看成是 GGG 的天然氨基酸衍生物，除了分子质量 (M，见图 1) 大小不同之外，它们相互间的主要区别就在于取代基的大小和相对面积不同. 如果按照取代基的分子质量来排序，它们分别是—H，—CH_3，$CH(CH_3)_2$，—$CH_2CH(CH_3)_2$，—$CH_2C_6H_5$，—$CH_2C_6H_4OH$，即 GGG<GGA<GGV<GGL<GGF<GGY. 显然，如果按照这些基团的实际面积，它们也应该有类似的顺序. 由于 ESI 是软电离源，在正离子的模式下获得的离子主要是质子化的准分子离子，其中电荷主要分布在氨基上，如图 1 所示.

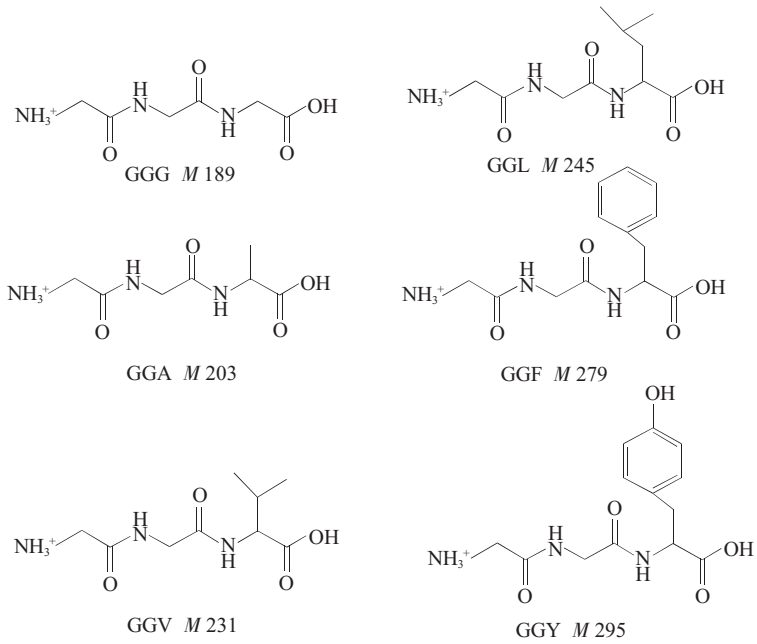

Fig. 1　Structures of six tripeptides used in this study

The peptides have varying non-polar character due to differences in their C-terminal residues. Note that the peptide backbone (the polar portion) is unchanged from one peptide to the next.

2.2　单组分体系

在选定的实验条件下，将配制好的 1×10^{-5} mol/L 多肽水溶液分别通入 ESI 电离源中，均获得了以质子化分子(相对丰度为 100%)为主要离子的质谱图. 实验发现，对于不同的多肽，虽然其质子化分子离子的相对丰度都一样，但是其信号的绝对强度有显著差异. 为了便于比较，将实验所获得的不同多肽的质谱图放置在图 2 中. 从图 2 中可以看出，多肽 GGF 所获得的峰高最大(2.93×10^6)，而多肽 GGG 的信号强度最小(8.128×10^5)，其他多肽的信号强度都在此二者之间. 如果比较这些多肽峰高和多肽取代基之间的关系，则发现除了 GGY 之外，多肽峰高的顺序和这些多肽取代基大小的顺序一致. 但是，这些取代基团的大小并不能够解释所有多肽峰高的顺序.

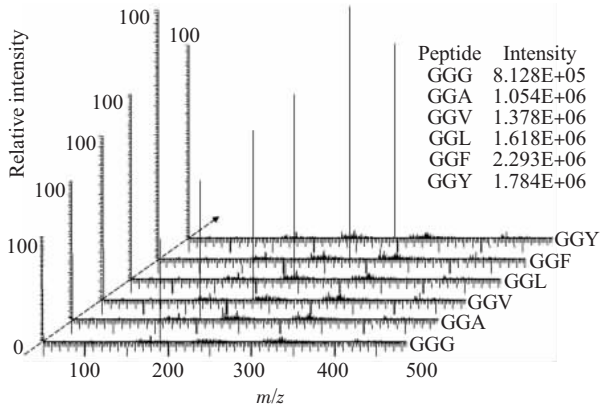

Fig. 2 ESI-TOF mass spectra collected using equivalent tripeptides in water solutions

The signal intensity shows difference between each individual tripeptide although they are predominated with 100% abundance in each mass spectrum.

深入分析这些实验数据后发现，前面 5 个三肽的 ESI 信号与取代基团的大小呈现出良好的相关性，而 GGY 出现了例外. 与 GGF 相比，GGY 在其苯环对位上用—OH 基团取代了原来的—H，这种取代后带来的差异造成了二者 ESI 信号上的显著差异. 仔细比较后发现，虽然—OH 取代—H 后基团的分子质量增加了，但是基团的疏水性下降了.

重新比较这 6 个三肽后发现，如果按照取代基团的疏水性来排序，前面 5 个多肽的顺序与其基团分子质量的顺序一致. 如果 GGY 的疏水性介于 GGF 和 GGL 之间的话，则能够顺利地解释图 1 中多肽的信号强度顺序. 由于多肽的疏水性决定于分子中非极性基团的面积，因此将前人[24]研究获得的这些三肽分子中非极性面积进行排序，其结果如图 3 所示. 从图 3 中可以看出，这些三肽分子中的非极性面积的顺序为 GGG<GGA<GGV<GGL<GGY<GGF，虽然与基团绝对分子质量大小的顺序不一致，但是却与 ESI 信号强度顺序完全一致.

为了探索 ESI 信号强度和相应三肽分子非极性面积之间的相关性，可将信号强度和非极性面积进行非线性拟合，结果表明多肽分子的 ESI 信号强度是其分子非极性面积的指数函数. 为了直观地表示，将 ESI 信号强度进行常用对数转换后进行线性拟合，则得到如图 4 所示的直线，其线性度为 r^2= 0.992. 很显然，图 4 清晰地表明多肽的 ESI 信号强度的常用对数值和其分子内非极性基团的面积之间存在良好的线性相关性. 因此，在一定的实验条件下，ESI 信号的强弱也直接反映了多肽分子疏水性的强弱. 诚然，ESI 是一个复杂的物理化学过程，其机理目前也还没有完善地阐明[25~27]. 多肽 ESI 信号与其分子疏水性之间的相关性虽然已经清晰地呈现出来，但是其相应的机理正在进一步深入研究.

实验还使用乙酸和氨水为调节剂考察了不同酸度下获得的 ESI 信号对此关系的吻合程度. 结果表明，在常见的酸度范围(pH 2～9)内，虽然酸性增强时信号的绝对强度有所增加，但是它们之间的相对关系没有明显差异. 如果将这些信号强度的对数值与多肽分子的非极性面积进行作图，其趋势与图 4 一致.

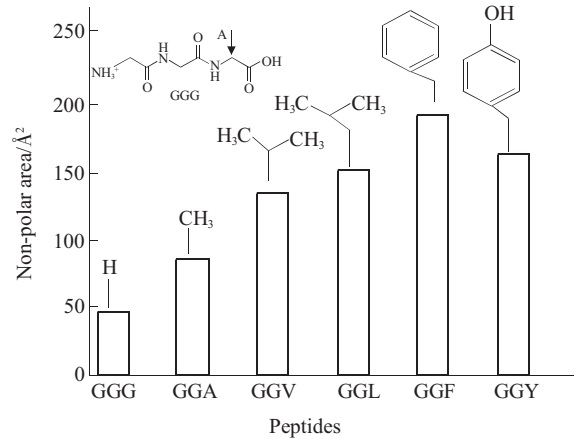

Fig. 3 Bar graph showing the non-polar surface areas of six similar tripeptides

The structure of G-G-G is shown and the structures of the other peptides can be obtained by inserting the appropriate side chain (shown above bars) at site A. Non-polar surface area increases as more carbon groups are added to the side chain, reaches a maximum at glycine-glycine-phenylalanine (G-G-F), and then decreases as a polar OH group is added to the phenyl ring to form glycine-glycine-tyrosine (G-G-Y).

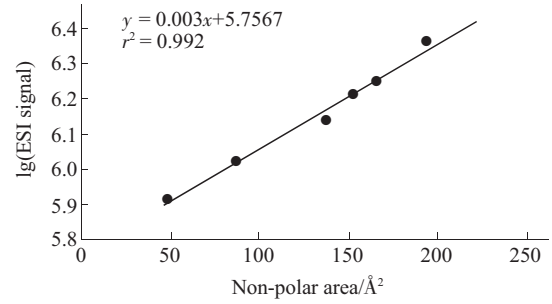

Fig. 4 ESI response as a function of non-polar area of the tripeptides in Figure 1

The good linearity between ESI response and the non-polar area of the tripeptides indicates that signal intensity obtained in ESI-TOF-MS represents the hydrophobicity of the tripeptides investigated.

生物分子疏水性的测定是有机物分子疏水性研究中最重要的内容. 目前，疏水性的产生及其与受体相互作用的本质仍然不是非常清楚，但普遍认为熵效应[1, 2, 28]是疏水性研究中不可以忽略的因素，即疏水作用在 25℃时是熵驱动的[17, 20, 29]. 生物分子疏水性的比较和测量仍然是一个难点，目前主要有 LogP 计算法和疏水场效应等计算方法[9, 22]和色谱测定法[24, 30~32]. 经过不断的更正和完善，基于结构参数的 LogP 计算方法已经获得了广泛的使用以及发展[11~13]，但是这些方法没有考虑熵效应，而且参数值强烈依赖于训练集，在使用中会遇到某些原子 / 片段类型没有定义而无法计算的情况. 近年来提出的疏水场理论[12, 33, 34]虽然考虑了熵效应，但是需要进行大量计算，理论的模型仍然缺乏物理基础，目前还难以广泛应用. 国内学者[9, 22]对这些方法的优缺点和实用性进行了详细评述. 色谱法是最经典的实验方法，虽然数据准确可靠，但是色谱分离需要较长的时间，仍然不能够满足现代生命科学研究和药物开发的实际需要. 本文提出的 ESI 质谱法比色谱法要快许多，而且获得的结果与前人采用色谱法[24, 30~33]获得的结果一致.

2.3 多组分体系

在实际应用中，经常需要使用到混合多组分体系. 为了考察多组分体系 ESI 信号与分子内非极性面积的关系，采用浓度等同 (1×10^{-5} mol/L) 的上述 6 种多肽混合水溶液在相同的条件下进行实验，获得的 ESI 质谱图如图 5 所示. 从图 5 可知，在实验条件下获得的 ESI 的信号强度与图 2 所示浓度基本一致，因此，在多组分体系中同时获得的这些多肽的 ESI 信号强度仍然能够准确地反映分子内非极性基团面积的大小.

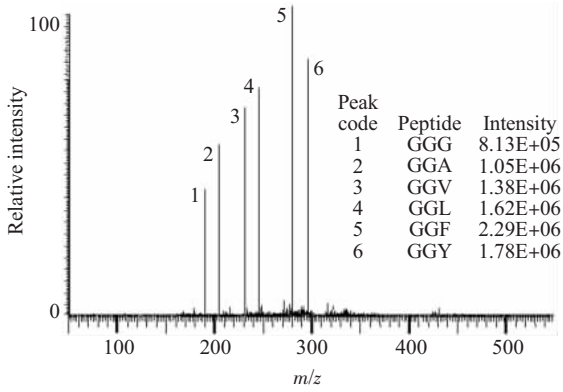

Fig. 5 ESI response of 6 tripeptides mixture

The relative intensities of the six tripeptides are identical to those obtained in Figure 2, indicating that this method could be used for dilute solutions with multiple solutes.

实验还发现，如果显著增加某一个多肽的浓度，比如将 GGG 或 GGY 的浓度增加到 0.01 mol/L，即使将获得的 GGG 或 GGY 的信号强度除以 1 000 倍，仍然难以获得理想的顺序. 这可能与高浓度下 ESI 信号响应不成线性有关系. 因此，对于多组分体系而言，ESI 响应信号与其分子内非极性面积保持良好线性相关性时所对应的不同组分的浓度范围，以及混合体系中不同组分浓度极差范围还有待于通过系统的实验研究来进行确定.

3 结 论

疏水作用是决定生物分子结构和性质的重要因素，特别是在蛋白质折叠，药物分子与受体(蛋白质、DNA 等)的相互作用中扮演着重要的角色. 多肽是一类具有重要生物功能的化合物，不仅充当了氨基酸和蛋白质之间的桥梁，也是蛋白质测序中能够测定的直接对象，还是许多正蓬勃发展的生物制药中的重要物系. 采用电喷雾飞行时间质谱法，可以在数分钟之内快速测定不同多肽之间的疏水性，所获得结果与色谱法结果一致. 本方法不需要建立模型和大量的理论计算，测量速度快，可望对疏水性进行定量描述.

参 考 文 献

1 Dill K A. The meaning of hydrophobicity. Science, 1990, **250** (4978): 297～297

2 Privalov P L, Gill S J, Murphy K P. The meaning of hydrophobicity - response. Science, 1990, **250** (4978): 298～299

3 Lesk A M. Hydrophobicity - getting into hot water. Biophysical Chemistry, 2003, **105** (2～3): 179～182

4 Trovato A, Hoang T X, Banavar J R, *et al*. What determines the structures of native folds of proteins?. Journal of Physics-Condensed Matter, 2005, **17** (18): S1515～S1522

5 Phoenix D A, Harris F, Daman O A, *et al*. The prediction of amphiphilic alpha-helices. Current Protein & Peptide Science, 2002, **3** (2): 201～221

6 Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. Biopolymers, 2000, **55** (1): 4～30

7 Tanford C. How protein chemists learned about the hydrophobic factor. Protein Science, 1997, **6** (6): 1358～1366

8 马 飞, 武耀廷, 许晓风. 遗传密码子和氨基酸若干物理化学特性的相关性研究. 安徽农业大学学报, 2003, **30** (4): 439～445
Ma F, Wu Y T, Xu X F. Journal of Anhui Agricultural University, 2003, **30** (4): 439～445

9 王克夷. 疏水作用和蛋白质. 生命的化学, 1999, **19** (5): 233～235
Wang K Y. Chemistry of Life, 1999, **19** (5): 233～235

10 Mahato R I, Narang A S, Thoma L, *et al*. Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs. Critical Reviews in

Therapeutic Drug Carrier Systems, 2003, **20** (2～3): 153～214

11 Kraft A, Howarth N M, Evans R, *et al*. Determination of liposome-water partition coefficients of pharmaceutical drugs using a simple laboratory titrator. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2005, **230**: U2743～U2744

12 Du Q S, Li D P, He W Z, *et al*. Heuristic molecular lipophilicity potential (HMLP): Lipophilicity and hydrophilicity of amino acid side chains. Journal of Computational Chemistry, 2006, **27** (6): 685～692

13 Berthod A, Carda-Broch S. Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. Journal of Chromatography A, 2004, **1037** (1～2): 3～14

14 Debolt S E, Kollman P A. Investigation of structure, dynamics, and solvation in 1-Octanol and its water-saturated solution - molecular-dynamics and free-energy perturbation studies. Journal of the American Chemical Society, 1995, **117** (19): 5316～5340

15 Essex J W, Reynolds C A, Richards W G. Theoretical determination of partition-coefficients. Journal of the American Chemical Society, 1992, **114** (10): 3634～3639

16 Dunne L A. Fan-deltas and braid deltas - Varieties of coarse-grained deltas - discussion. Geological Society of America Bulletin, 1998, **100** (8): 1308

17 Bennaim A. The Role of hydrogen-bonds in protein folding and protein association. Journal of Physical Chemistry, 1991, **95** (3): 1437～1444

18 Jorgensen W L, Briggs J M, Contreras M L. Relative partition-coefficients for organic solutes from fluid simulations. Journal of Physical Chemistry, 1990, **94** (4): 1683～1686

19 Abraham D J, Kellogg G E, In K H. 3D-QSAR in Drug Design: Theory, Methods and Applications. Leiden: ESCOM, 1993. 506～522

20 Lehninger A L, Nelson D L, Cox M M. Principles of biochemistry. New York: Worth Publishers, 1993. 81～108

21 Heiden W, Moeckel G, Brickmann J. A new approach to analysis and display of local lipophilicity/hydrophilicity mapped on molecular surfaces. J Comput-Aided Design, 1993(7): 503～514

22 王 亭, 周家驹. 疏水作用及其研究进展. 化学通报(网络版), 1999, **24** (13): 1～8
Wang T, Zhou J J. Chemistry Online, 1999, **24** (13): 1～8

23 Hessa T, Kim H, Bihlmaier K. Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. Nature, 2005, **433** (27): 377～381

24 Fauchere J L, Pliska V. Hydrophobic parameters-PI of amino-acid side-chains from the partitioning of N-acetyl-amino-acid amides. Eur J Med Chem, 1983, **18** (4): 369～375

25 Kitchell J A, Clark D L, Gombos A M. Biologica selectivity of extinction: a link between background and mass extinction. Annales de Paleontologie, 1986, **7** (1): 3～23

26 Constantopoulos T L, Jackson G S, Enke C G. Challenges in achieving a fundamental model for ESI. Analytica Chimica Acta, 2000, **406** (1): 37～52

27 Hendrickson C L, Emmett M R. Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Annual Review of Physical Chemistry, 1999, **50**: 517～536

28 Ben N A. Hydrophobic Interaction. New York: Plenum Press, 1980

29 Nicholls A, Sharp K A, Honig B. Protein folding and association - insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. Proteins-Structure Function and Genetics, 1991, **11** (4): 281～296

30 Meek J L, Rossetti Z L. Factors affecting retention and resolution of peptides in high-performance liquid-chromatography. J Chromatogr, 1981, **211** (1): 15～28

31 Guo D C, Mant C T, Taneja A K, *et al*. Prediction of peptide retention times in reversed-phase high-performance liquid-chromatography .1. determination of retention coefficients of amino-acid-residues of model synthetic peptides. Journal of Chromatography, 1986, **359**: 499～517

32 Guo D C, Mant C T, Taneja A K, *et al*. Prediction of peptide retention times in reversed-phase high-performance liquid-chromatography .2. correlation of observed and predicted peptide retention times and factors influencing the retention times of peptides. Journal of Chromatography, 1986, **359**: 519～532

33 Gaillard P, Carrupt P A, Testa B, *et al*. Molecular lipophilicity potential, a tool in 3d Qsar——method and applications. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 1994, **8** (2): 83～96

34 Heiden W, Moeckel G, Brickmann J. A new approach to analysis and display of local lipophilicity hydrophilicity mapped on molecular-surfaces. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 1993, **7** (5): 503～514

Measurement of Hydrophobicity of Peptides in Electrospray Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*

ZHOU Yue-Ming[1)], WANG Wei-Ping[1)], LIANG Hua-Zheng[1)],
ZHANG Xie[1)], CHEN Huan-Wen[1,2)**], CHEN Lan-Hui[3)]

([1)]*Department of Applied Chemistry, East China Institute of Technology, Fuzhou* 344000, China;
[2)]*College of Chemistry, Jilin University, Changchun* 130021, China;
[3)]*Institute of Functional Materials of Chemistry, Faculty of Chemistry, Northeasten Normal University, Changchun* 130024, China)

Abstract Hydrophobicity is the association of non-polar groups or molecules in an aqueous environment which arises from the tendency of water to exclude non-polar molecules. Hydrophobic interaction is one of the most important non-bonded interactions which determine protein folding and ligand-receptor binding. To date, hydrophobicity usually has to be evaluated by means of calculation of LogP, because it is a tedious procedure to experimentally measure the hydrophobicity of molecules using techniques reported previously. As a matter of fact, the nature of hydrophobicity in chemistry refers to the physical property of a molecule that is repelled by water, which is clearly associated with the non-polar area in the molecules. The later can be correlated to signal intensity of the molecules in electrospray ionization mass spectrometry. Various dilute water solutions of tripeptides with increasing non-polar area were investigated in ESI time-of-flight mass spectrometry, and the ESI response of the tripeptides was linearly correlated to the non-polar areas in the molecules. Therefore, the hydrophobicity of peptides can be measured quantitatively in terms of ESI signal intensity. Thus hydrophobicity of the peptides was experimentally measured within a few minutes, and data showed a good agreement with previous results obtained in high performance liquid chromatography.

Key words hydrophobicity, petides, electrospray ionization, mass spectrometry, non-polar area

---

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (20505003) and Simon Fellowship (HWC 2006).

**Corresponding author . Tel: 86-794-8258703, E-mail: chw8868@gmail.com

Received: August 22, 2006 Accepted: September 30, 2006