

研究报告

利用 MALDI-TOF 质谱技术研究胰岛素水解和酶切过程

方雪萍 黄河清

(厦门大学生命科学院分析测试中心, 厦门, 361005)

摘要 利用海牛卵制备的模拟微量混合内切酶体系, 用基质辅助激光解吸电离-飞行时间(MALDI-TOF)质谱技术研究了胰岛素在不同酸碱度和还原条件下的水解和酶解过程。实验结果为研制具有高生物利用度的胰岛素纳米粒口服制剂及选择具有适当耐酸碱及还原特性的包装材料提供了科学依据。

关键词 基质辅助激光解吸电离—飞行时间质谱法 胰岛素 水解 酶切 纳米粒

1 前言

胰岛素(insulin, INS)是治疗胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)的首选药物,目前临床常用的是注射剂型。这种给药方式给长期用药病人带来不便和痛苦,因此研究非注射给药途径是医药研究领域的重要课题^[1-2]。

近年来,采用纳米技术包装 INS 纳米粒制备口服制剂的研究工作发展迅速,已处于动物生物利用度的试验阶段^[3]。了解 INS 纳米粒在胃肠中的稳定性以及 INS 被胃蛋白酶和消化酶降解的产物,是研制 INS 口服液制剂并使之商品化的关键性科学依据,因此分析微量 INS 及其降解产物是优化制剂工艺的的必要条件。目前分析 INS 的方法多采用放射性免疫技术^[4],所需的检测时间长、费用高,故寻找快速简便的分析方法成为开发 INS 口服制剂亟待解决的问题。

MALDI-TOF 质谱是一种软电离分析技术,具有分析快速、灵敏度和准确度高、操作简便、样品耗量少等优点,是蛋白质组学研究的最佳分析技术之

一^[5],与其它痕量分析法相比,显示出极大优势。

本文采用 MALDI-TOF 质谱技术,通过建立海牛卵多肽内切酶混合体系,研究在不同酸碱度和还原条件下 INS 水解和酶切过程,为研制 INS 纳米粒口服制剂及提高 INS 生物利用度提供科学依据,同时也为寻找和研究动物中枢神经系统各种多肽内切酶提供了新思路^[6]。相关研究,尚未见有报导。

2 实验部分

2.1 材料

质谱测定所需的基质 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、2-氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)、芥子酸(SA),均购自美国 ICN 生物医学公司;

INS(40U),购自徐州万邦生化制药有限公司;

三氟乙酸、乙腈,均为 HPLC 级;

巯基乙醇(Amres CO)、二硫苏糖醇(BBI),纯度均大于 99%;

维生素 C(V_C)、连二亚硫酸钠(Na₂S₂O₄)等,均为分析纯。

海牛卵,取自捕获于厦门内海无污染区的海牛。

基金项目:国家自然科学基金(No. 40276033)和厦门科技项目基金资助(No. 3502Z2001262)。

作者简介:方雪萍,女,硕士。联系人:黄河清,男,教授。E-mail: hquang@jingxian.xmu.edu.cn

2.2 MALDI-TOF 质谱分析

将 0.1% TFA 水溶液和 ACN 按 7:3 体积比配制成混合溶剂,加入过量基质,超声波处理 5min,离心(5000g,5min),取上清液为基质饱和溶液。样品和基质饱和溶液按 1:1 体积比混合,取 0.8μL 混合物,直接点滴在 MALDI-TOF 质谱仪专用样品靶上,待样品自然干燥后,将样品靶直接放入质谱仪靶箱内进行分析。

Reflex™ MALDI-TOF 质谱仪(Bruker 公司产品),配置脉冲氮激光(337nm)作为电离解吸电离源。使用高分辨率反射模式,加速电压控制在 25kV,平均每次测定的激光脉冲数为 120 次/s。采用内标法校正仪器。

2.3 内切酶混合体系的制备

取 200g 海牛卵于 100mL 容器中,在冰水恒温条件下,用微量组织捣碎机将卵细胞破碎。卵破碎液以 10000r/min 的转速离心 20min。取上清液,经真空低温干燥,成为干粉状样品。取 Tris (0.025mol/L) - HCl (pH7.0) 5mL 溶解干粉状样品,制备成混合内切酶体系。

2.4 INS 的水解、还原和酶解

将 INS 样品分别调节成不同的酸碱度,水解 2h 后,进行质谱分析。

在 INS 样品中加入过量的 3% V_C,样品还原时间为 2h,随后进行质谱分析。

将 INS 样品和内切酶按 1:1 体积比均匀混合,在 37℃ 保温反应 1h。随后,迅速取样与基质混合,在显微镜下观察样品形成结晶的效果。如获得较为均匀的结晶样品,即可进行质谱分析。

3 结果与讨论

3.1 INS 酸碱稳定性

INS 分子由两条多肽链组成,分别称为 A 链和 B 链。A 链含有 21 个氨基酸残基,而 B 链则有 30 个,人以及猪、牛 INS 分子的一级结构约有 1~2 个氨基酸的差别。

目前,MALDI-TOF 质谱分析过程中常用的基质有 SA、HCCA 和 DHB。其中 HCCA 比较适合于分析分子量小于 10kD 的多肽,而 SA 比较适合于分析分子量大于 10kD 的蛋白质。

但我们的实验结果表明,除了 HCCA 基质,SA 和 DHB 基质也适合用于 INS 及其分解产物的分

析,只是相对噪声稍大些。

研究发现,在弱酸性(pH2.0~3.5)条件下,INS 分子显示出三个特征质谱峰,对应的 m/z 比值分别位于 2892.31 (双电荷),5784.20 (单电荷)和 11568.23 (二聚体)。其中双电荷质谱峰的相对强度弱于单电荷质谱峰;二聚体的质谱峰相对强度也低于单电荷质谱峰(图略)。

图 1 是 INS 经 0.01mol/L HCl 处理后的质谱图,质谱峰数和所对应 m/z 值(2892.01, 5784.45)与在弱酸性(pH2.5~3.5)介质中获得的结果是一致的。

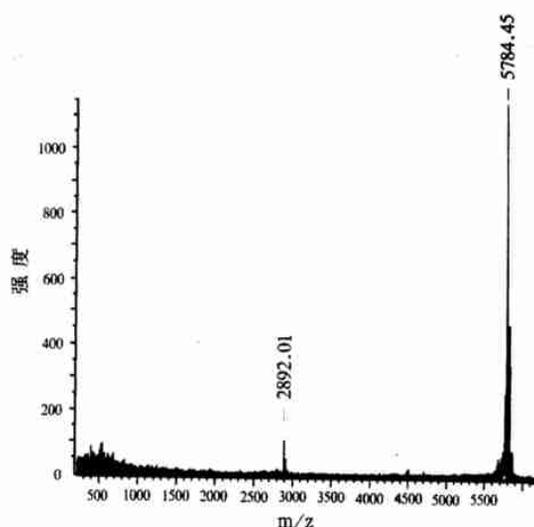


图 1 INS 在 10^{-2} mol/L HCl 中的质谱图

这一现象说明,INS 在 pH2.0~3.5 介质中呈稳定状态,没有发生水解或 A 链与 B 链之间的断裂,推测其分子结构稳定性与 INS 中的两对连接 A 链和 B 链的二硫键有关。图 2 是 INS 在 1.0mol/L HCl 中的质谱图,当反应介质的浓度提高至 1.0mol/L 时,出现 INS 被酸解成若干种短肽的现象(图 2A),其对应质谱峰的 m/z 值均位于 600~900 之间(图 2B)。

表 1(以及表 2、表 3)是用 paws 软件对图 2 中的短肽进行肽段归宿分析的结果,证明这些短肽是 INS 的水解产物。由于多肽不是有机小分子,故不考虑其同位素峰;表格中的所有肽段不含二硫键,这是由于胰岛素中的二硫键极不稳定,在弱酸性、弱碱性、氧化和还原条件下极容易被打开,生成半胱氨酸残基。

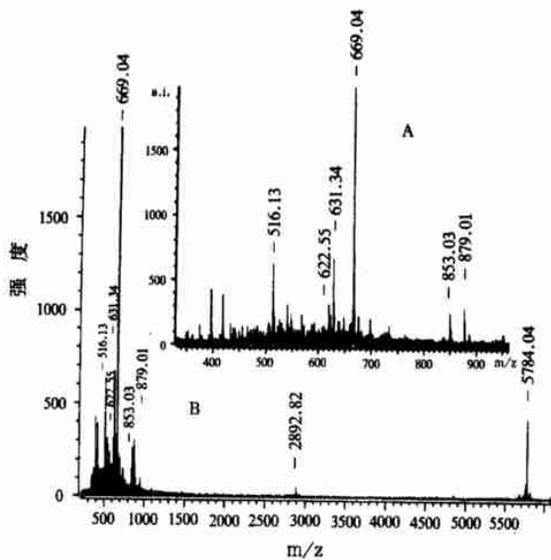


图 2 INS 在 1.0mol/L HCl 中的质谱图

表 1 INS 在 1.0mol/L HCl 中水解后的肽片段分析

理论值 (m/z)	测定值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	一级结构	位置
880.0	879.01	1125.0	LVCGERGF	B17 - 24
852.0	853.03	1208.9	GIVEQCCT	A1 - 8
669.7	669.04	985.5	EQCCTS	A4 - 9
633.7	631.34	3724.2	GFFYT	B23 - 27
622.7	622.55	240.9	TSICSL	A8 - 13
			SL YQL	A12 - 16
515.6	516.13	1027.9	HLCGS	B5 - 9
			LCGSH	B6 - 10
			CGSHL	B7 - 11

上述实验结果也提示,INS 在未经任何包装处理的条件下,直接用于口服,其生物利用度很低,根本原因不是 INS 受患者胃酸的影响而分解失效,因为 INS 具有耐弱酸的特点(图 1)。故在研制 INS 纳米粒口服制剂过程中,所选择的包装材料要有良好的耐胃肠中蛋白质酶和消化酶酶切的性能。这是提高 INS 口服制剂生物利用度的关键因素。

MALDI-TOF 的特点是准分子离子峰很强,几乎无碎片峰,很适合直接分析蛋白质经酶或酸碱水解后产生的短肽混合物;MALDI-TOF 另一个特点是对样品中杂质的耐受量较大,若盐浓度在基质的 5% 以下,不会影响分析结果。图 3 是 INS 经 0.1 mol/L NaOH (0.4% Na⁺) 处理后所显示的质谱图。

从图中可以看出,在 0.1 mol/L NaOH 的作用,INS 被水解成短肽,显示出许多小肽质谱峰(图 3A),短肽对应的 m/z 范围在 600 ~ 900 之间(图 3B)。图 3 中 INS 水解短肽质谱峰对应的 m/z 见表 2。把 NaOH 的浓度提高到 1.0 mol/L (4.0%),这些短肽会进一步水解成简单氨基酸或三肽以下的产物。由于基质的干扰,采用 MALDI-TOF 质谱无法检测到这些物质。在 1.0 mol/L 介质中,INS 因被完全水解而没有特征质谱峰(图略),处于极不稳定的状态。

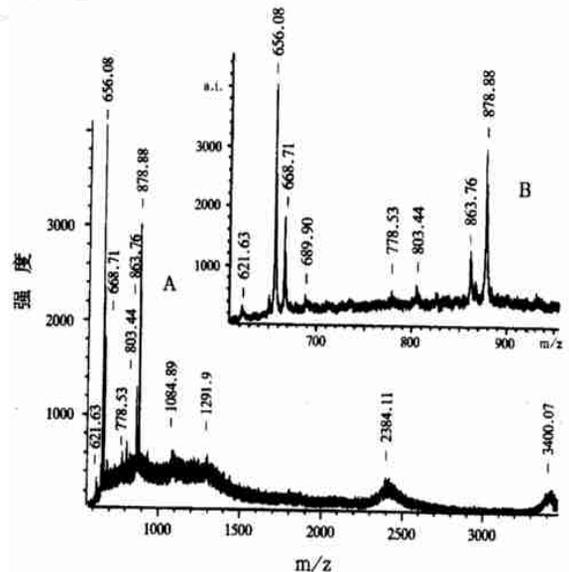


图 3 INS 在 0.1mol/L NaOH 中的质谱图

表 2 INS 在 0.1mol/L NaOH 中水解后的肽片段分析

理论值 (m/z)	测量值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	一级结构	位置
3399.9	3400.07	50.0	FVNQHLCSH LVEALYLVCG ERGFFYTPKA	B 链
2383.7	2384.11	172.0	GIVEQCCTSICS L YQLEN YCN	A 链
1291.5	1291.91	317.5	LVCGERGFFYT	B17 - 27
1086.3	1084.89	1298.0	EQCCTSICSL RGFFYTPKA	A4 - 13 B22 - 30
880.0	878.88	1272.7	LVCGERGF	B17 - 24
865.0	863.76	1433.5	HLCGSHLV	B5 - 12
801.9	803.44	1920.4	FFYTPK	B24 - 29
778.9	778.53	475.0	LYQLEN	A13 - 18
688.8	689.90	1597.0	RGFFY	B22 - 26
669.7	668.71	1478.3	EQCCTS	A4 - 9
654.8	656.08	1954.8	FYTPK	B25 - 29
622.7	621.63	1654.1	SL YQL TSICSL	A12 - 16 A8 - 13

INS 经 0.01mol/L 氨水处理后显示 4 个特征质谱峰, m/z 值分别 5784.27, 3400.36, 2892.33 和 2384.11, 分别与带单电荷的 INS、INS B 链、双电荷的 INS 和 INS A 链的分子量吻合, 见图 4。在相同浓度条件下, 氨水水解程度要小于 NaOH, 即前者碱度小于后者。氨基参与破坏 INS 分子结构的机理主要是 NH_4^+ 与 INS 发生静电作用, 改变了 INS 的电荷密度, 降低了 INS 的稳定性, 使半胱氨酸侧链上的巯基 ($-\text{SH}$) 发生解离, 形成巯醇阴离子, 导致 INS 裂解。

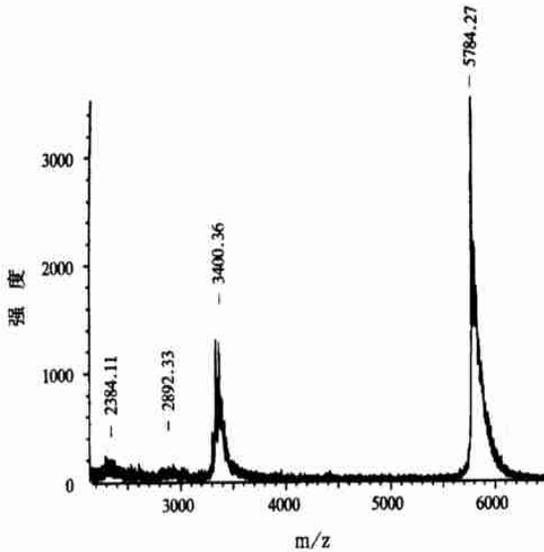


图 4 INS 在 0.01mol/L 氨水中的质谱图

质谱图可直观地反映出 INS 的水解和裂解过程。由于不同酸碱或其他官能团的参与, INS 水解和裂解的机理和途径有所不同。在酸性条件下, 二硫键较稳定, 而在碱性条件下, OH^- 和 NH_4^+ 通过削弱 L-R 酰氨键键能, 加速 INS 水解和降解, 与 NaOH 相比, 在相同浓度情况下, 经氨水处理后的 INS, 水解产物中有中间产物存在, 例如 A 链和 B 链产物(图 4)。这一现象与氨水水解程度和 NH_4^+ 保护机制有关。因此, 在 INS 纳米粒口服制剂中, 适当加入某些无毒有机小分子, 有利于降低 INS 在胃肠中被酸碱物质水解的速率, 从而提高 INS 的生物利用度。

3.2 维生素 C 的还原作用

V_C 在生物体内是一种高效电子供体, 它不仅把电子输送给高电位的酶和蛋白, 而且还能通过络合方式降低蛋白质还原电位, 把电子输送给比 V_C 氧

化还原电位更低的生物大分子^[7]。近年来, 有关 V_C 是否能降低患有糖尿病大白鼠血糖的实验结论始终处于争论之中。图 5 是经 V_C 处理后 INS 和分解产物所显示的质谱峰图谱, 其主要特征质谱峰的 m/z 值分别为 5784.45 (强峰)、3400.26 (弱峰) 和 2892.45 (弱峰)。同样, 对于 INS, 由于半胱氨酸的二硫键能被氧化剂和还原剂打开, 而二硫键在蛋白质的构像上起很大的作用。所以 V_C 是通过还原作用打开二硫键, 使 INS 裂解为 A 链和 B 链。由于 V_C 是较温和的还原剂, A 链和 B 链的分解产物数量极少。当使用质谱的正离子模式时, 在质谱图上只能观察到 B 链的离子峰, 且相对强度较弱(图 5); 而当使用质谱的负离子模式时, 质谱图上无双电荷峰, 但有 A 链(2384.99)和 B 链(3400.18)的分子离子峰, 如图 6 所示。当采用强电子供体 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 还原 INS 时, 由于受 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (盐) 干扰, 无法获得 INS 及其分解产物的质谱峰。

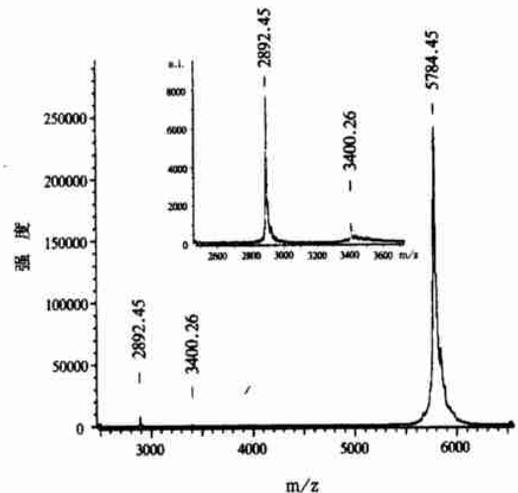


图 5 V_C 对 INS 质谱图的影响(正离子模式)

图 1~图 6 结果说明, 在不同酸碱度及还原条件下, INS 可被水解成不同产物。

3.3 酶解过程

目前, 测定大白鼠口服 INS 制剂后的生物利用度, 主要依据是大白鼠的血糖含量。但对 INS 被胃肠蛋白酶和消化酶所降解的产物无法进行监测, 使优化包装纳米粒材料缺乏理论数据和实验结果的支持。海牛卵含有许多蛋白酶和类似胃肠的消化酶, 因而可以模拟混合多肽内切酶体系, 用于研究 INS 酶切过程。

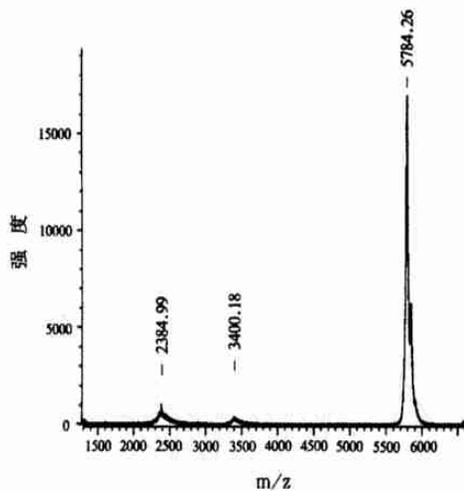


图6 V_c 对INS质谱图的影响(负离子模式)

INS被海牛卵混合内切酶体系酶切后,分解成许多不同肽段,经MALDI-TOF质谱分析,显示出对应质谱峰,见图7,INS酶解后的肽片段分析见表3。短肽质谱峰数也反映出海牛卵中含有许多不同种类的氨基酸内切酶。

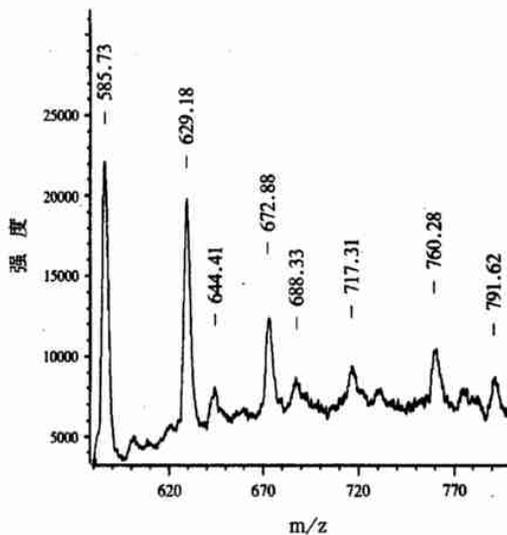


图7 INS酶解质谱图

表3 INS酶解后的肽片段分析

理论值 (m/z)	测量值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	一级结构	位置
789.9	791.62	2177.5	RGFFYT	B22 - 27
757.8	760.28	3272.6	NQHLCGS	B3 - 9
715.9	717.31	1969.5	CCTSICS	A6 - 12
688.8	688.33	682.3	RGFFY	B22 - 26
673.8	672.88	1365.4	FFYTP	B24 - 28
643.7	644.41	1103.0	FVNQH	B1 - 5
			QHLCGS	B4 - 9
628.8	629.18	603.4	CCTSIC	A6 - 11
583.6	585.73	3649.8	SHLVE	B9 - 13

4 结论

MALDI-TOF质谱技术是一种适合检测超微量INS分解产物和不同聚合态m/z的分析技术,同时也适用于直观地分析INS构象变化过程和规律。INS酶切后的产物,无需特殊处理就可直接分析,且呈现出高灵敏度和高分辨率的特点,优于放射免疫法等技术。MALDI-TOF质谱的分析结果,为优化制剂过程,确保INS纳米粒口服液制剂具有高生物利用度,为筛选具有耐酸碱及适当还原性特性的包装材料,提供了科学依据。

参考文献

- 1 Peliknov T. Vnitr Lek, 2002, 48(6): 523 - 528
- 2 Owins D R. Nat Rev Drug Discov, 2002, (7): 529 - 76
- 3 Cournarie F, Auchere D, Chevenne D et al. International Journal of Pharmaceutics, 2002, 242:325 - 328
- 4 Chevenne D, Trivin F, Porquet D. Diabetes Metab, 1999, 25(6): 459 - 476
- 5 黄河清. 分析仪器, 2003, (1): 37 - 41
- 6 Chaurand P, Luetzenkirchen F. J Am Soc Mass Spectrom, 1999, 10:91 - 103
- 7 黄河清等. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15:10 - 14

收稿日期:2003 - 01 - 10

Study on hydrolysis and enzymolysis of insulin by MALDI-TOF mass spectrometry. Fang Xueping, Huang Heqing (Analytical and Testing Center, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Using simulated micro mixed endopeptidase system prepared with crushed sea slug eggs, the hydrolysis and enzymolysis of insulin under different pH and reductive conditions were studied by MALDI-TOF mass spectrom-

etry. The experimental results provide scientific data for the development of nanoparticle oral insulin agent with high bioavailability factor and for the selection of packing materials with suitable acid-base endurance and reductive property.

用紫外 - 可见光谱仪研究玻璃基掺氮二氧化钛薄膜的沉积速率和光学带隙

赵青南 张君 李春领 何鑫 赵修建

(武汉理工大学硅酸盐材料工程教育部重点实验室, 武汉, 430070)

摘要 用紫外 - 可见光谱仪研究了不同溅射功率下磁控溅射法在玻璃基上沉积掺氮二氧化钛膜的沉积速率和光学带隙。结果表明,随着溅射功率的增加,薄膜的沉积速率增加,吸收边波长红移,薄膜的光学带隙宽度减小。热处理温度对不掺氮二氧化钛薄膜的吸收边和光学带隙的影响较小。

关键词 紫外 - 可见光谱 磁控溅射 二氧化钛薄膜 沉积速率 光学带隙

1 前言

玻璃基二氧化钛薄膜具有自洁功能^[1],在紫外线的作用下,它可以降解有机污染物。二氧化钛薄膜的厚度和光学带隙影响玻璃的自洁净效率^[2]。在用磁控溅射法沉积二氧化钛薄膜时,有时用在线石英振荡测厚仪测定薄膜厚度。但是,由于基片在线加热到一定温度时,严重干扰测厚仪的测量精度,给测量带来较大的随机误差。在实验室的研究工作中,膜厚的测量一般采用离线检测方法,常用的仪器有台阶仪、扫描电镜(观察端面)等。这些仪器检测费用相对较高,不适合大量实验样品的检测。在研究工作的初始阶段,制备实验样品的数量较多,适合利用检测费用相对较低的仪器。紫外 - 可见光谱仪是一种常规仪器,使用费用较低,利用它得到试样的光谱曲线和对应的数据,经过计算,就可同时得到薄膜的沉积速率和光学带隙宽度^[3-5]。

氮离子掺杂二氧化钛薄膜具有较高的光催化效率^[6]。本文用紫外 - 可见光谱仪研究了玻璃基掺

氮二氧化钛薄膜在不同溅射功率下的沉积速率和光学带隙,以及热处理温度对不掺氮二氧化钛薄膜光学带隙和吸收边的影响,讨论了溅射工艺参数对二者性能的影响。用紫外 - 可见光谱仪测得的数据,可以很好地指导进一步的研究工作。

2 实验部分

2.1 仪器与试样制备

UV1601 紫外 - 可见光谱仪(日本岛津)。

用金属纯钛靶反应磁控溅射法沉积玻璃基二氧化钛薄膜,靶材与基片间的距离为 10cm。调整不同的溅射功率和气氛制备试样。

2.2 数据处理方法简介

根据文献^[4]介绍的方法,用紫外 - 可见光谱仪测试试样的透射光谱曲线,通过公式(1)、(2)、(3)计算薄膜的折射率和厚度。

$$n = [N - (N^2 - s^2)^{1/2}]^{1/2} \quad (1)$$

$$N = 2s \frac{T_M - T_m}{T_M T_m} + \frac{s^2 + 1}{2} \quad (2)$$

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2001abb077)。

作者简介:赵青南,男,1963年出生,博士,副教授。