

采用安捷伦 8800 电感耦合等离子体串联质谱仪通过 capLC-ICP-MS 联机同时测定多肽和磷酸肽

应用简报

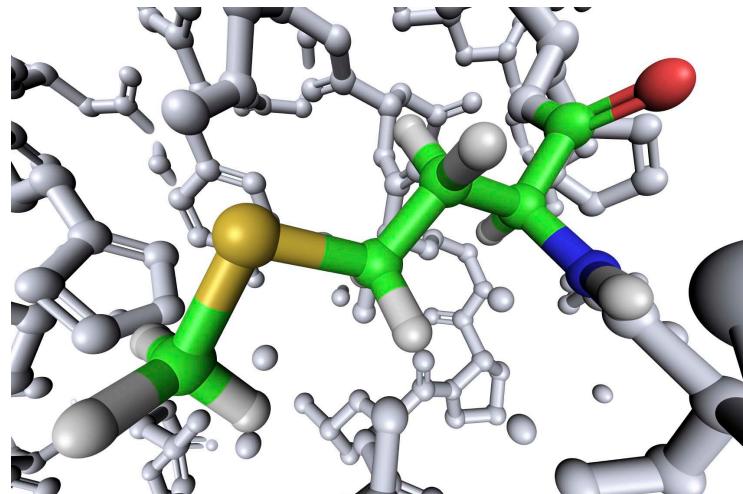
蛋白组学

作者

Silvia Diez Fernández¹、
Naoki Sugiyama²、
Jorge Ruiz Encinar¹ 和
Alfredo SanzMedel¹

¹ Oviedo 大学，物理与分析化学学院
Julián Clavería 8, 33006 Oviedo,
西班牙

² 安捷伦科技，东京，日本



摘要

结合毛细管液相色谱分离技术，Agilent 8800 电感耦合等离子体串联质谱仪在 MS/MS 质量转移模式下可痕量测定磷酸肽中的磷与含硫多肽中的硫。使用 LC-ICP-MS 可获得前所未有的含硫和含磷物质的最低绝对检测限（分别为 11 fmol 和 6.6 fmol）。硫的同位素比值测定结果与其理论值高度吻合，从而证明干扰得以有效消除。所观测到的硫和磷的峰形和信噪比表现优异。测定结果表明 capLC 与 ICP-MS/MS 联用技术在使用非特殊标样测定含硫和含磷多肽的高灵敏度和同时绝对定量分析方面有巨大潜力。



Agilent Technologies

前言

LC-MS/MS 用于定量分析制药/生物制药和临床研究中的目标蛋白质。此方法常常使用同位素标记的合成蛋白质和多肽作为内标来定量分析相应的目标化合物。与之相反，LC-ICP-MS 通过测定目标化合物中含有的杂原子硫和磷对蛋白质和多肽进行非特异性定量分析。通过这种方式可以使用含有杂原子的不同化合物，并将单个含杂原子的非蛋白质化合物作为通用标样对其进行定量。不幸的是，硫和磷的检测限因其高电离能和单四极杆 ICP-MS (ICP-QMS) 的多原子干扰而大打折扣——即使使用了碰撞/反应池 (CRC)。虽然扇形磁场高分辨 ICP-MS (HR-ICP-MS) 也被用于该类应用，但迄今为止仍没有任何 ICP-MS 仪器能够达到已报道的 ESI-MS/MS 仪器使用同位素标记合成多肽时所具有的检测限（特别是对于硫）。表 1 列出了关于 LC-ICP-MS 对于硫和磷检测限的已发表数据，包括所用的 ICP-MS 技术和分离技术。在这项工作中，我们采用了 Agilent 8800 电感耦合等离子体串联质谱仪（也简称为 ICP-MS/MS）通过对硫和磷杂原子进行绝对定量分析来测定蛋白质和多肽。

较之传统的仪器或 ICP-MS，Agilent 8800 在八极杆反应池 (ORS³) 和四极杆质量过滤器 (Q2) 前方配备了额外的主四极杆质量过滤器 (Q1)。在该串联质谱结构中，Q1 作为单位质量过滤器仅允许目标分析物质量数的离子进入反应池，排除了所有其他离子。因为等离子体和基质中的离子被 Q1 排除，确保了即使在复杂高基质样品中，ORS³ 中的反应过程也能得到精确控制从而实现准确测量，并且灵敏度也得到了极大的增强。色谱分离过程通过与 8800 ICP-MS/MS 联用的安捷伦 cap-LC 系统完成。

实验

试剂和材料

超纯水 (Millipore, 东京, 日本)，HPLC 和分析试剂级乙腈以及甲酸 (Wako Pure Chemical, Ltd., 大阪, 日本)。ICP-MS 标准品 (SPEX CertiPrep, Inc., Metuchen, NJ, 美国)、对硝基苯酚磷酸二酯 (BNPP, 纯度 99%) 和蛋氨酸 (纯度 ≥ 99% 82) (Sigma Aldrich, Steinheim, 德国)。磷酸肽标准品的氨基酸序列为 LRRApSLG 和 KRSpYEEHIP，含硫多肽标样为 ACTPERMAE 和 VPMLK。所有多肽购自 AnaSpec (Fremont, CA, 美国)，纯度都 ≥ 95%。

表 1. 不同 ICP-MS 仪器分析含硫和磷物质的检测限的比较

仪器	磷			硫		
	分离技术	检测限 (化合物)	参考文献	分离技术	检测限 (化合物)	参考文献
ICP-QMS 碰撞池 (氦气)	capLC	110 fmol	1			
	LC	0.97 pmol	2			
	capLC	63 fmol	3			
	CE	19 fmol	2			
ICP-QMS 碰撞池 (氩气)				nanoLC CE	1.5 pmol 2.6 pmol	6 7
ICP-QMSDRC (氧气)	LC	2.2 pmol	4	microLC microLC LC	2.7 pmol 3.1 pmol 2.3 pmol	8 9 4
HR-ICP-MS	capLC capLC	100 fmol 50 fmol	5 10	microLC capLC capLC	9 pmol 11 pmol 10 pmol	11 12 13
ICP-MS/MS	capLC	6.6 fmol	本文	capLC	11 fmol	本文

制备含硫和磷的标样

使用 BNPP 和蛋氨酸在 1% 流动液相 B 基质中（这是液相色谱梯度淋洗的起始条件）制备 0、25、50、100 和 200 ng/mL（以硫、磷元素浓度计）的含硫和磷的校准标样。

磷酸肽溶液的制备

分别配制三份溶液（100 ng/mL，以磷元素浓度计）以确定每个多肽的保留时间和纯度。溶液 1 包含 LRRApSLG 和 ACTPERMAE，而溶液 2 包含 KRSpYEEHIP 和 VPMLK。两种溶液中均包含大约 100 ng/mL BNPP 和蛋氨酸。将溶液 1 和 2 按重量法 1:1 混合配制成 3。

仪器

capLC 系统

Agilent 1200 系列，采用 Agilent Zorbax SB C18, 5 μm , 150 \times 0.3 mm 反相毛细管色谱柱的。流动相 A 和 B 分别包含水和乙腈。两种流动相都含有 0.1% 甲酸和 10 ng/mL 锌（作为 ICP-MS 内标使用）。进样量为 1-2 μL 。液相色谱流速为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，液相色谱梯度淋洗条件如下：0-3 分钟：1% B，等度；3-35 分钟：1-60% B，线性梯度。

Cap LC-ICP-MS 接口

使用安捷伦 capLC 接口（安捷伦 G3680A 毛细柱液相色谱接口套件，图 1）将 capLC 色谱柱连接到 ICP-MS，此 capLC 接口结构为一个小的石英雾化室内包含一个消耗型的雾化器。

ICP-MS

使用 Agilent 8800 电感耦合等离子体串联质谱仪。以 80 mL/min 的流速从雾化气通道通入氧气（氩:氧比例为 8:2）到雾化器气体中。池气体：氧气，流速为 0.35 mL/min。样品流速：5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。 ^{31}P 、 ^{32}S 和 ^{34}S 的积分时间 150 ms（每个峰值一个点）。使用配于 30% 的乙腈中 100 ng/mL 磷和硫的标样对 8800 进行优化，以满足最低的磷、硫检出限要求，流速为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，注射泵进样。使用 Agilent ICP-MS MassHunter 软件进行液相色谱操作和对色谱峰进行积分。

在 MS/MS 模式下使用 Agilent 8800 消除对硫和磷的干扰
8800 在 MS/MS 质量转移模式下操作以消除对硫和磷的干扰。在图 2 中，上方的示意图 (a) 将 Q1 设为 $m/z = 32$ ，从而允许 $^{32}\text{S}^+$ 进入反应池，排除了其它质量数的干扰（包括质荷比为 48 的离子）。 S^+ 在池内通过与氧气反应转换为 SO^+ 。Q2 设置为 $m/z = 48$ ，从而允许 SO^+ 进入检测器，排除了 $m/z = 32$ 的所有原始质量数干扰物。 $m/z = 48$ 的干扰物在碰撞反应池之前已由 Q1 排除。这是 MS/MS 结构具有强大消干扰能力的关键所在——实现了在可控条件下进行准确无干扰的反应物离子测量。

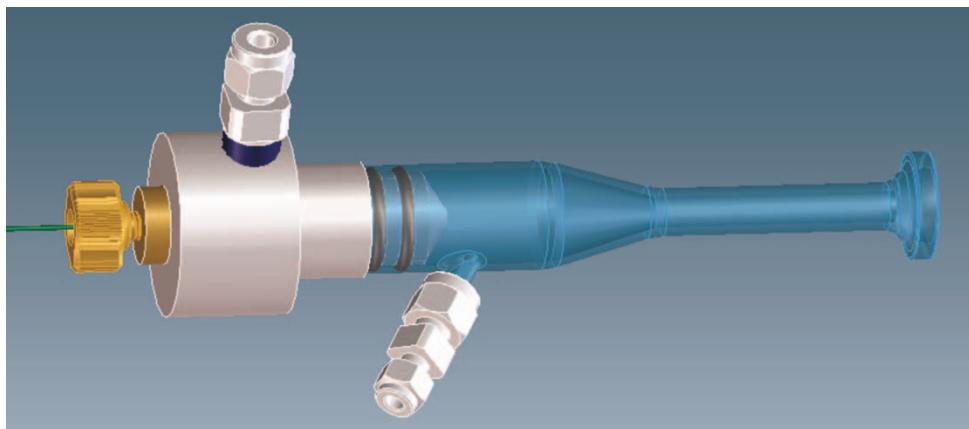


图 1. 安捷伦毛细柱液相色谱接口套件 (G3680A)

图 2 下方的示意图 (b) 显示了对磷的测定设置: Q1 设置为 $m/z = 31$, 从而允许 $^{31}\text{P}^+$ 通过, 排除了其它质量数的干扰 (包括 $m/z = 47$)。 $^{31}\text{P}^+$ 在池内通过与氧气反应转换为 PO^+ 。Q2 设置为 $m/z = 47$, 从而允许反应产物 PO^+ 进入检测器。 $m/z = 47$ 处的干扰物在碰撞反应池之前已由 Q1 排除。Q1 消除的干扰物包括: ($m/z = 47$ 处 $^{47}\text{Ti}^+$ 、 $^{32}\text{S}^{14}\text{NH}^+$ 、 $^{32}\text{S}^{15}\text{N}^+$ 、 $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 、 $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^+$ 对 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ 的干扰, 以及 $m/z = 48$ 处 $^{48}\text{Ti}^+$ 、 $^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ 、 P^{16}OH^+ 、 $^{31}\text{P}^{17}\text{O}^+$ 、 $^{48}\text{Ca}^+$ 对 SO^+ 的干扰), Q2 消除的干扰物包括: ($^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{16}\text{OH}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{17}\text{O}^+$ 、 $^{12}\text{C}^{18}\text{OH}^+$ 对 $^{31}\text{P}^+$ 的干扰, 以及 $^{16}\text{O}^+$ 、 $^{15}\text{N}^{17}\text{O}^+$ 、 $^{15}\text{N}^{16}\text{OH}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{18}\text{O}^+$ 对 $^{32}\text{S}^+$ 的干扰), 如各图中所示。

同时可以看出, 如果不使用 Q1, 来自磷和硫的多原子离子将会彼此干扰, 比如干扰 P/S 比例、含磷和硫的物质的测量 (导致磷酸化水平的计算错误)、以及硫的同位素比例 (例如, 导致同位素稀释计算错误)。使用 8800 的 MS/MS 质量转移模式, 反应产物离子保持了和母离子相同的同位素类型——而在 ICP-QMS 反应池中情况并非如此。在 ICP-QMS 中没有 Q1, 因此硫的两种同位素都进入池内反应产生 SO 反应产物离子而彼此重叠。

最初, 我们在高有机基质 (30% 乙腈, 通过注射泵连续进样) 中测量了检测限以评估 Agilent 8800 消除干扰的有效性。所得的 ^{31}P 检测限为 0.6 ng/mL, ^{32}S 检测限为 1.2 ng/mL, 两者的背景等效浓度分别为 9 ng/mL 和 5 ng/mL。这些值在水溶液中显著降低, 意味着乙腈中含有磷和硫。为确认硫所受干扰被完全消除, 测定了硫 $34/32$ 的比率。由于 ^{32}S 所受干扰要高得多, 如果测得的 $34/32$ 比率与 $^{34/32}\text{S}$ 的理论值吻合, 则说明干扰得以有效去除。结果表明, 空白溶液中 $34/32$ 的比率 (0.0484 ± 0.0017) 与标准值 (0.0487 ± 0.0012) 吻合得非常好。 $^{34/32}\text{S}$ 的 IUPAC 值为 0.0447 ± 0.0025 。测定值与理论值的差异在于质量偏离 (8800 的比率值未经过质量歧视校正)。-4.0% 至 -4.3% 的质量歧视因子与文献 [14-16] 中的报道相匹配, 证实了 8800 能够有效消除所有对硫的干扰, 且乙腈中含有一定量的硫。

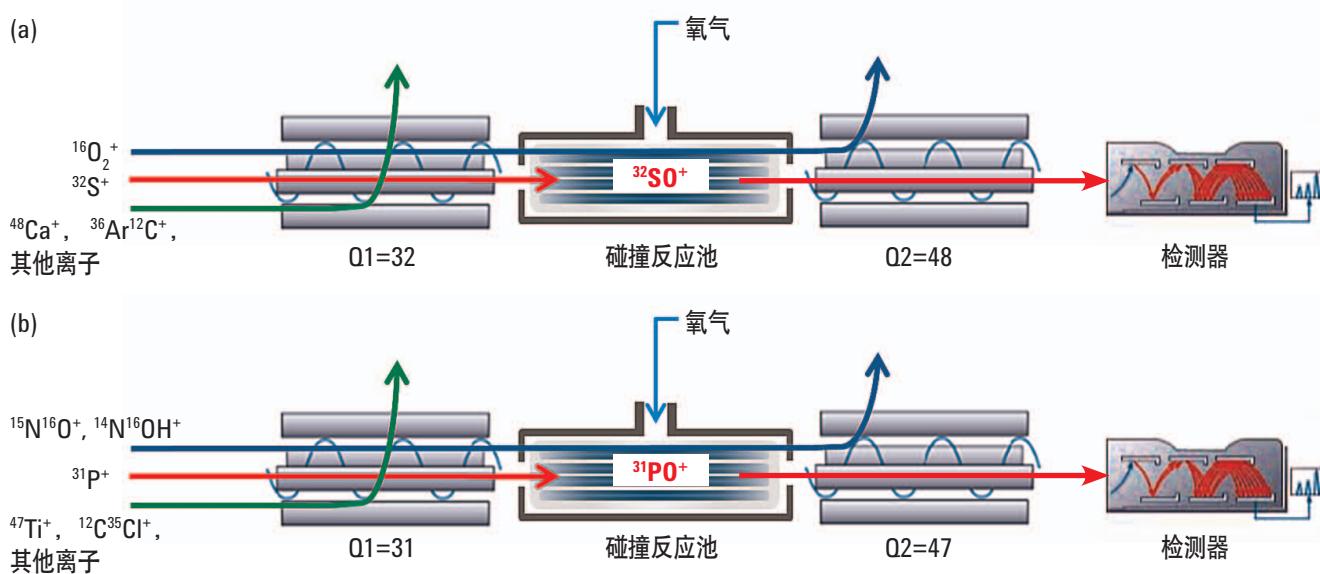


图 2. 8800 ICP-MS/MS 在 MS/MS 质量转移模式下操作可消除硫 (图 a) 和磷 (图 b) 所受到的质谱干扰

结果与讨论

改用 capLC-ICP-MS 分离和检测了含有 0、25、50、100 和 200 ng/mL 磷和硫（分别为 BNPP 和蛋氨酸）的校准标样，结果获得了优异的线性以及 < 4% 的 RSD（图 3）。

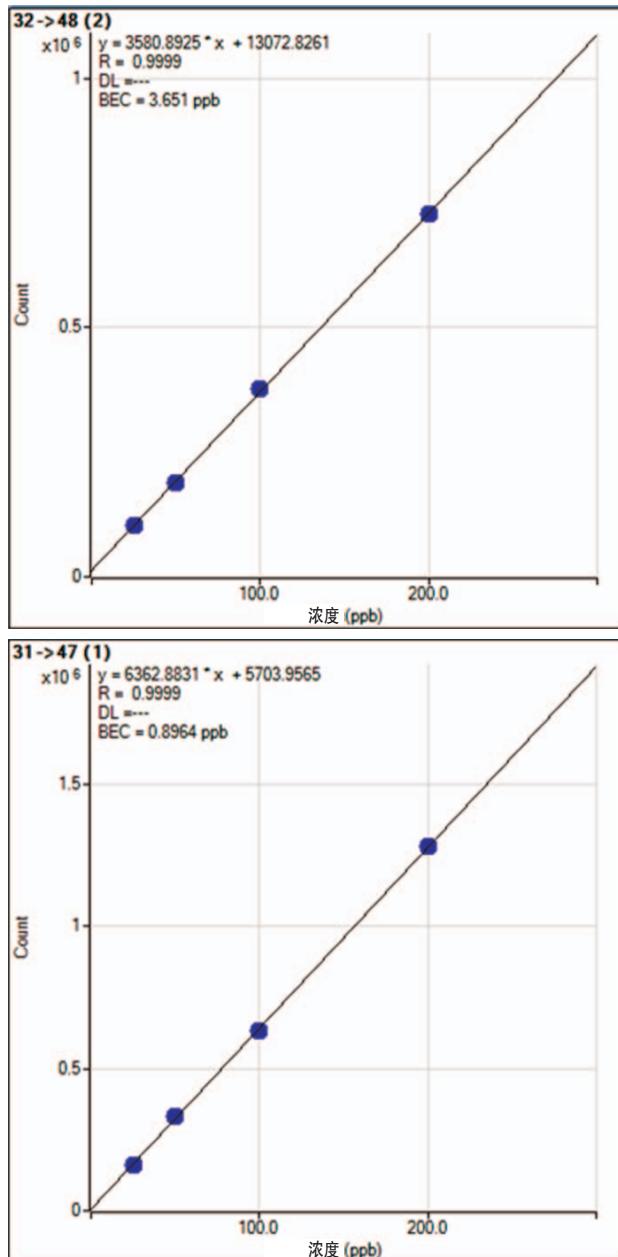


图 3. ^{32}S 和 ^{31}P （分别为蛋氨酸和 BNPP）在浓度为 25、50、100 和 200 ng/mL 时（以硫和磷元素浓度计）的校准曲线。进样量 = 2 μL ，流速 = 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，按文中所给梯度洗脱条件

图 4 为 50 ng/mL 标样的色谱图。观测到的两种元素的信噪比 (S/N) 均很好。在 LC-ICP-MS 分析中，由于乙腈流动相中的磷和硫带来的背景干扰能被有效去除，从而使得 8800 具备可准确测定此类分析物的能力。所得检测限分别为 0.10 ng/mL 磷和 0.18 ng/mL 硫 (6.6 fmol 磷, 11 fmol 硫，绝对值)。相信这是迄今为止所报道过的使用 LC-ICP-MS 获得的硫和磷分析的最低绝对检测限。详见表 1 中的总结。

测量磷酸肽和含硫多肽

采用 LC-ICP-MS 系统测量磷酸肽和含硫多肽。每种多肽的保留时间通过两种不同溶液（实验部分所描述的溶液 1 和 2）进行计算。溶液 3 含有两种多肽各约 45 ng/mL 和 105 ng/mL（以硫和磷元素计）的标样，在相同仪器条件下进行测量。由溶液 3 获得的色谱见图 5，该图清楚地显示了两种多肽和硫、磷标样的谱图。只有含磷酸化酪氨酸的多肽显示了一个小肩峰，所对应的可能是磷酸肽杂质，占信号的 9%。观测到的信噪比 S/N 极为优异（未进行平滑处理）。含硫多肽的检测限均值 (0.18 ng/mL S) 比从蛋氨酸标样中获取的值 (0.18 ng/mL S) 略高，这可能是由于其基峰的宽度 (24 s) 略微宽于蛋氨酸标样 (9 s)。就磷而言，所得检测限均值 (0.33 ng/mL P) 大大高于 BNPP 标样中获得的值 (0.10 ng/mL P)，主要由于碳的存在使得磷的灵敏度提高（梯度洗脱）。

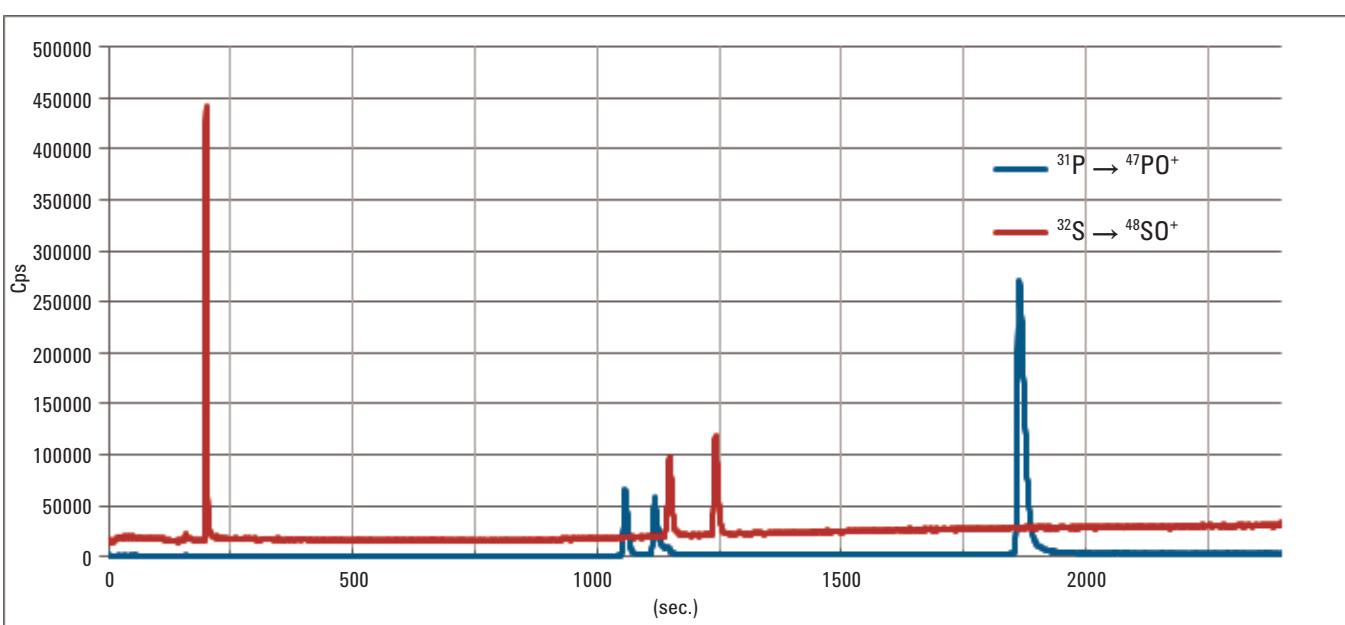
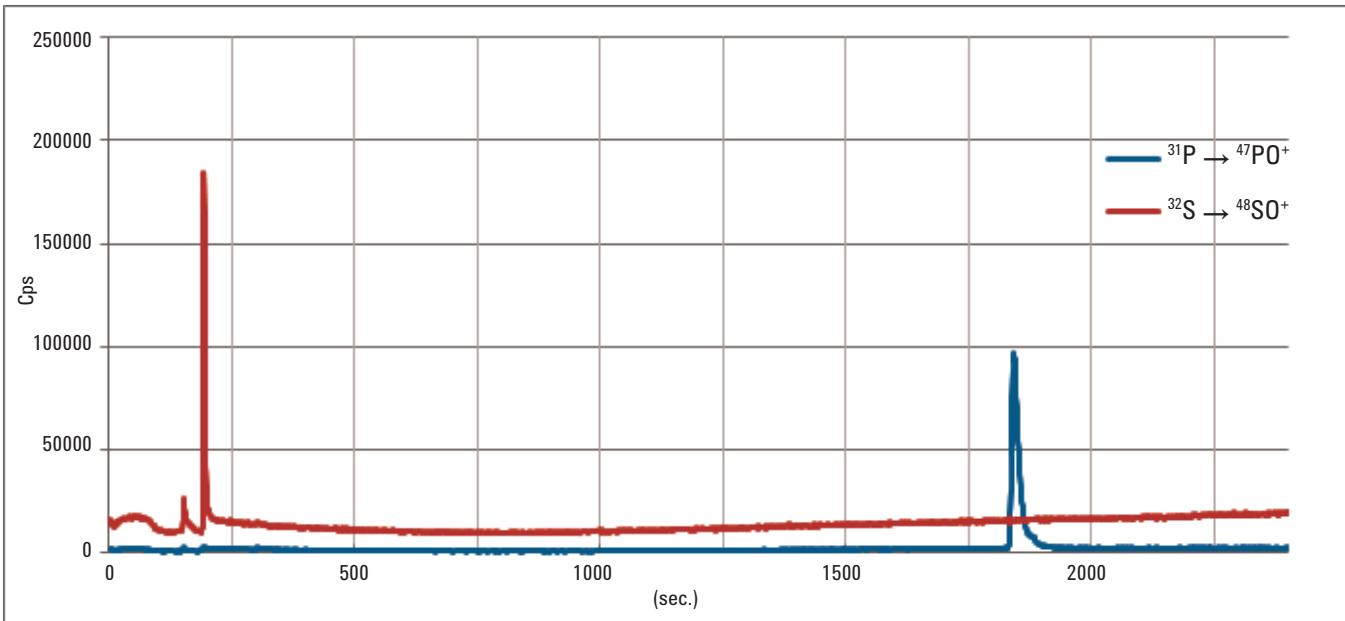


图 5. 含有 LRRApSLG、ACTPERMAE、KRSpYEEHIP、VPMLK 以及 BNPP 与蛋氨酸的混合溶液 3 的色谱图

结论

对蛋白质中天然存在的 ICP-MS 可检测元素进行高灵敏度和无干扰的定量检测将扩展 LC-ICP-MS 方法在蛋白质组学中的应用。通过与 cap-LC 分离方法联用，Agilent 8800 电感耦合等离子体串联质谱仪利用 LC-ICP-MS 分析含硫和磷物质时可获得前所未有的最低检测限（分别为 11 fmol 和 6.6 fmol）。

在 MS/MS 质量转移模式下操作时，Agilent 8800 通过使分析物与氧气反应并测量产生的氧化物离子，从而有效消除了对磷和硫的干扰。硫的同位素比测量值与理论值吻合良好，证明硫干扰物得以有效消除，并且由于串联质谱模式能保留正确的同位素模式，可以通过同位素稀释法来校正因梯度淋洗导致的硫灵敏度的变化。

所测得的含硫和磷物质及多肽的峰形和信噪比极佳。这也是首次将通用标样应用于多肽和磷酸肽的同步绝对定量分析。

这种全新的功能强大的硫磷（特别是硫）检测法将使 LC-ICP-MS 在诸多领域中得到应用：如药物研究（药物和代谢物）、环境分析（农药）和纳米技术（工程纳米颗粒的表征）。

更多信息

为详细了解该应用，请参看出版期刊：Triple Quad ICPMS (ICPQQQ) as a New Tool for Absolute Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics, Silvia DiezFernández, Naoki Sugiyama, Jorge RuizEncinar, Alfredo Sanz-Medel, Anal.Chem., 2012, 84(14), pp 5851–5857, Publication Date (Web): June 18, 2012

参考文献

1. Pereira Navaza, A.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A. Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 569-671.
2. Pröfrock, D.; Leonhard, P.; Prange, A. J. Anal. At. Spectrom. 2003, 18, 708-713.
3. Pröfrock, D.; Leonard, P.; Ruck, W.; Prange, A. Anal. Bioanal. Chem. 2005, 381, 194-204.
4. Smith, C. J.; Wilson, I. D.; Weidolf, L.; Abou-Shakra, F.; Thomsen, M. Chromatographia. 2004, 59, S165-S170.
5. Wind, M.; Edler, M.; Jakubowski, N.; Linscheid, M.; Wesch, H.; Lehmann, W. D. Anal. Chem. 2001, 73, 29-35.
6. Schaumlöffel, D.; Giusti, P.; Preud'Homme, H.; Szpunar, J.; Lobinski, R. Anal. Chem. 2007, 79, 2859-2868.
7. Pröfrock, D.; Leonhard, P.; Prange A. Anal. Bioanal. Chem. 2003, 377, 132-139.
8. Hann, S.; Koellensperger, G.; Obinger, C.; Furtmüller, P. G.; Stingededer, G. J. Anal. At. Spectrom. 2004, 19, 74-79.
9. Stürup, S.; Bendahl, L.; Gammelgaard, B. J. Anal. At. Spectrom. 2006, 21, 201–203.
10. Zinn, N.; Hahn, B.; Pipkorn, R.; Schwarzer, D.; Lehmann, W. D. J. Proteome Res. 2009, 8, 4870–4875.
11. Hann, S.; Koellensperger, G.; Obinger, C.; Furtmüller, P. G.; Stingededer, G. J. Anal. At. Spectrom. 2004, 19, 74-79.
12. Zinn, N.; Krüger, R.; Leonhard, P.; Bettmer, J. Anal. Bioanal. Chem. 2008, 391, 537-543.
13. Wind, M.; Wegener, A.; Eisenmenger, A.; Kelner, R.; Lehmann, W. D. Angew. Chem. Int. Ed. 2003, 42, 3425-3427
14. Clough, R.; Evans, P.; Catterick, T.; Evans, E. H. Anal. Chem. 2006, 78, 6126-6132.
15. Becker, J. S. J. Anal. At. Spectrom. 2002, 17, 1172-1185.
16. Mason, P. R. D.; Košler, J.; de Hoog, J. C. M.; Sylvester, P. J.; Meffan-Main, S. Anal. At. Spectrom. 2006, 21, 177–186.

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中涉及的信息、说明和规格，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2012
2012 年 11 月 28 日出版
出版号: 5991-1461CHCN

