

图 9 袋泡茶阳性对照样品的色谱图

Figure 3 9 The chromatogram of positive tea bag sample

本方法的检出限, 从而造成未检出; 另一方面可能因为 ECH 为小分子化合物, 在检测过程中, 干扰物质较多, 检出限达不到 1 mg/kg 的水平; 此外, ECH 在袋泡茶包装袋中的存在形式, 液相微萃取提取过程中, 中空纤维膜的质量、实验条件的掌控等都对痕量 ECH 在两相间的传质有很大影响, 从而造成提取不完全, 也可能引起阴性结果。但液相微萃取法具有低价、溶剂消耗少、对环境友好等特点, 在未来的研究中尝试将环氧氯丙烷衍生为非极性大分子化合物, 用液相微萃取法进行萃取, 并在方法线性范围、检出限、实验的重复性等方面进行深入研究, 力求使该法满足实际样品测定的要求。

参考文献

[1] 顾振华. 中国食品包装材料卫生监管及与美国、欧盟的比较

[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(5): 418-421.
 [2] 石岩, 谢来苏. 聚酰胺-环氧氯丙烷(PAE) 湿强剂在造纸中的应用[J]. 黑龙江造纸, 2001, 5(1): 18-20.
 [3] PAULA M, BELGACEM, NACEUR M. Influence of impulse drying on the curing of polyamide-epichlorohydrin wet strength resin[J]. Cellul Chem Technol 2003, 6: 439-451.
 [4] MICHAEL B, WOLFGANG R, FRANK-MATHIAS G, et al. Quantification of N-(3-chloro-2-hydroxypropyl) valine in human haemoglobin as a biomarker of epichlorohydrin exposure by gas chromatography-tandem mass spectrometry with stable-isotope dilution [J]. J Chromatog B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2009, 877(13): 1402-1415.
 [5] SUNG J H, LEE Y J, PARK H J. New method for determination of epichlorohydrin in epoxy-coated cans by oxolane derivatization and gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatog A, 2008, 1201: 100-105.
 [6] BODEN L, LUNDGREN M, STENSIO K E, et al. Determination of 1,3-dichloro-2-propanol and 3-chloro-1,2-propanediol in papers treated with polyamidoamine-epichlorohydrin wet-strength resins by gas chromatography-mass spectrometry using selective ion monitoring [J]. J Chromatog A, 1997, 788: 195-203.
 [7] 漆爱明, 毛丽秋. 中空纤维膜液相微萃取及常规分析用于气相色谱-质谱分析白酒中的正己酸乙酯的比较研究[J]. 分析科学学报, 2009, 25(2): 153-156.
 [8] 刁春鹏, 苑金鹏, 李磊, 等. 中空纤维液相微萃取-气相色谱/质谱联用检测水中的氯化苯[J]. 分析化学, 2008, 36(11): 1559-1562.

研究报告

一种小分子生物活性肽(重组 BMP) 的质谱分析

杨永清¹, 董伯森¹, 赵芳²

(1. 邯郸市疾病预防控制中心, 河北 邯郸 056008; 2. 邯郸职业技术学院, 河北 邯郸 056001)

摘要:目的 对一种小分子生物活性肽(重组 BMP) 样品进行电喷雾质谱测定, 初步确定其一级结构。方法 离子化方式: 电喷雾离子化; 检测方式正离子; 质量扫描范围 m/z 150 ~ 1 000; 干燥气(N_2) 流速 5 arb; 雾化气(N_2) 压力 35 arb; 毛细管出口电压 4.5 kV; 碎裂器电压 100 V; 碰撞诱导解离技术碎裂器电压为 35%; 碰撞气流量为电子流量控制器自动控制; 进样方式: 流动注射进样; 流动相为乙腈: 水(50:50)。结果 利用电喷雾质谱技术, 初步测定重组 BMP 样品的一级结构为 H-Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Pro-OH。结论 该方法能够初步测定小分子生物活性肽的一级结构, 为实验室生物工程菌构建提供准确有效的检测技术。

关键词: 生物活性肽; 食品感官肽; 电喷雾质谱; 一级结构

中图分类号: Q51; Q55 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)06-0510-05

收稿日期: 2011-05-25

作者简介: 杨永清 男 主管检验师 研究方向为卫生检验 E-mail: tustyyq@sina.com

Mass spectrometric analysis of a small molecular bioactive peptide (BMP)

Yang Yongqing¹, Dong Bosen¹, Zhao Fang²

(Handan Municipal Center for Disease Control and Prevention,
Hebei Handan 056008, China)

Abstract: Objective To determine the first-order structure of a recombinant beefy meaty peptide (BMP) by using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). **Methods** Ionization mode: electrospray ionization; detection mode: positive ion; range of ion mass scanning m/z 150 ~ 1 000; flow rate of drying gas 5 arb; nebulizer pressure 35 arb; voltages at the outlet of capillary 4.5 kV; fragmentation voltages 100 V; collision induced dissociation voltages 35%; the flow of collisions gas was controlled by electronic flow controller; mode of sample injection: flow injection; mobile phase (ACN: water): 50: 50. **Results** The first-order structure of recombinant BMP was determined as H-Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Pro-OH by electrospray ionization mass spectrometry. **Conclusion** The first-order structure of small molecular bioactive peptides could be determined by this method, which provided an effective way of detecting the construction of bioengineering strains in laboratories.

Key words: Bioactive peptide; beefy meaty peptide (BMP); electrospray ionization mass spectrometry; first-order structure

生物活性肽可以分为生理活性肽和食品感官肽。食品感官肽包括甜味肽、苦味肽、咸味肽、抗氧化肽和增强风味的肽等。Beefy Meaty Peptide (BMP) 是一种可以增强风味的八肽, Yamasaki 和 Maekawa^[1] 于 1978 年确定其一级结构为 H-Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala-OH。Spanier 等于 1992 年报道 BMP 实质上是一个类似于味精的天然风味强化剂, 但它不具味精的咸味。Bolen 等^[2] 于 2003 年申请美国专利称, 用 BMP 取代 thaumatinII 蛋白的第 19 ~ 26 氨基酸区域或 monellin 蛋白的 4 ~ 11 氨基酸区域(风味活性区), 新修饰蛋白在盐类增强剂存在的条件下, 具有牛肉、肉汤的风味和口感。本文利用质谱技术对毕赤酵母工程菌发酵产重组 BMP 进行了一级结构的初步分析, 旨在为实验室工程菌构建提供准确有效的检测技术。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

BMP 标准品由上海生工化学合成; 重组 BMP 样品来自天津科技大学食品工程与生物技术实验室; 乙腈为色谱纯, 其余均为色谱纯; 实验用水全部为 Millipore 纯净水。

1.1.2 仪器

LC-10AT VP 型高效液相色谱仪(日本岛津); Shimadzu SPD-M10AVP 二极管阵列式检测器; 美国 Thermo Finnigan 公司 LCQ Advantage MAX 电喷雾质谱仪, 具电喷雾离子源, 离子阱质量分离器。

1.2 方法

1.2.1 重组 BMP 样品的制备

重组 BMP 样品经凝胶过滤色谱分离后, 利用反相高效液相色谱分离制备, Shimadzu VP-ODS C_{18} (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm i. d.) 分析柱; 进样量为 20 μ l; 流速 1.0 ml/min; 检测波长 230 nm; 室温检测; 流动相 A 为含有 0.1% 三氟乙酸(TFA)的水溶液, 流动相 B 为含有 0.1% 三氟乙酸(TFA)的乙腈溶液, 采用线性梯度洗脱: 流动相 B 的体积分数在 30 min 内由 5% 线性升至 50%, 收集色谱图上保留时间为 10.8 ~ 11.2 min(目标产物馏出起止时间)的组分。

1.2.2 重组 BMP 样品的质谱分析

分别取 10 μ l 浓度为 0.125 mg/ml 的 BMP 标准品及经反相高效液相色谱法制备的重组 BMP 样品注入质谱仪, 采集样品一、二级质谱图。质谱条件: 离子化方式: 电喷雾离子化; 检测方式正离子; 质量扫描范围 m/z 150 ~ 1 000; 干燥气(N_2) 流速 5 arb; 雾化气(N_2) 压力 35 arb; 毛细管出口电压 4.5 kV; 碎裂器电压 100 V; 碰撞诱导解离技术(CID) 碎裂器电压设为 35%; 碰撞气流量为电子流量控制器自动控制; 进样方式为流动注射进样; 流动相为乙腈: 水(50:50)。

2 结果

2.1 重组 BMP 样品的色谱图

采用半制备型高效液相色谱仪装置, C_{18} (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm i. d.) 分析柱, 对保留时间为 10.8 ~ 11.2 min 之间的组分进行制备收集, 合并收集液, 适当浓缩之后, 将样品再次注入色谱仪, 对收集得到的产物进行组分的纯度确认。其色谱图如图 1 所示。

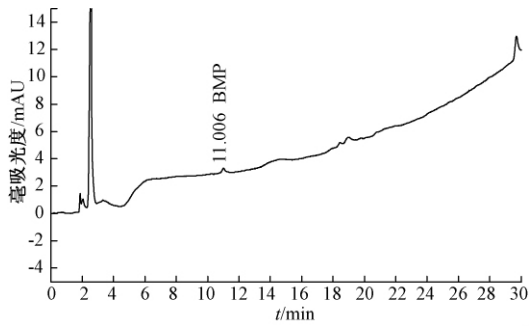


图 1 重组 BMP 样品的色谱图

Figure 1 Chromatogram of recombinant BMP

2.2 BMP 标准品的质谱分析

取浓度为 0.125 mg/ml 的 BMP 标准品注入质谱仪,采集一级质谱图,见图 2。利用源内碰撞诱导解离技术对 BMP 目标离子进行二级质谱分析,采集其二级质谱图见图 3。

2.3 重组 BMP 样品的质谱分析

用同 BMP 标准品相同的方法,将制备得重组 BMP 样品注入质谱仪,采集目标离子一、二级质谱图,见图 4、图 5。

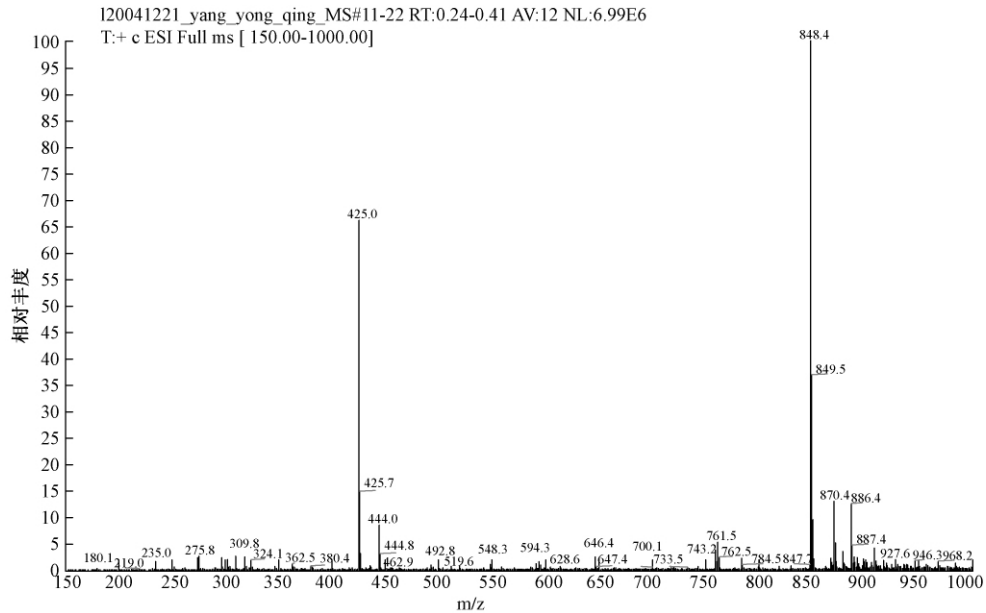


图 2 BMP 标准品的一级质谱图

Figure 2 The first-level mass spectra of standard BMP

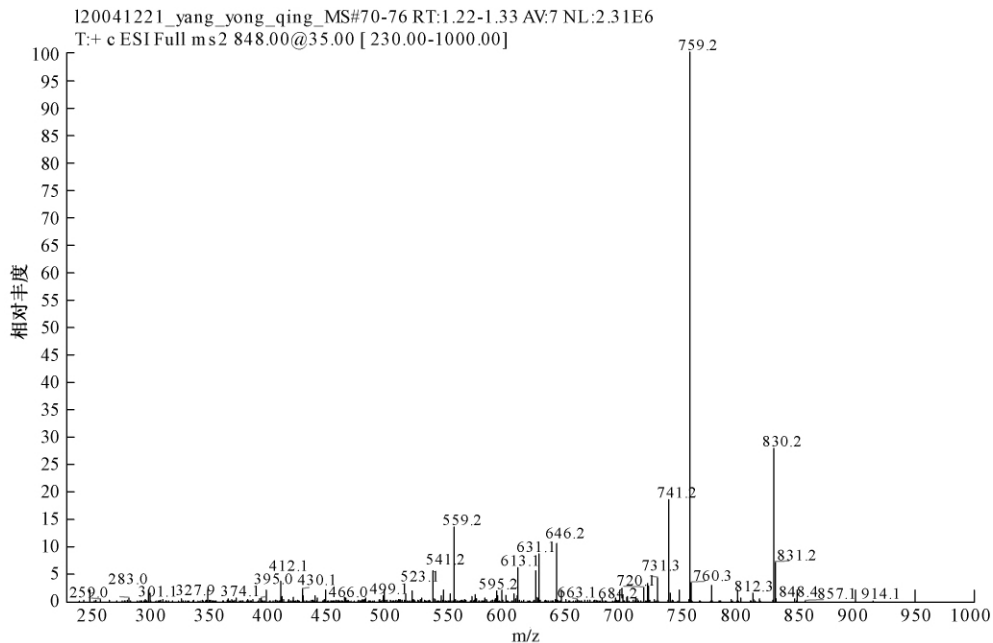


图 3 BMP 标准品的二级全扫描质谱图

Figure 3 The second-level full scan mass spectra of standard BMP

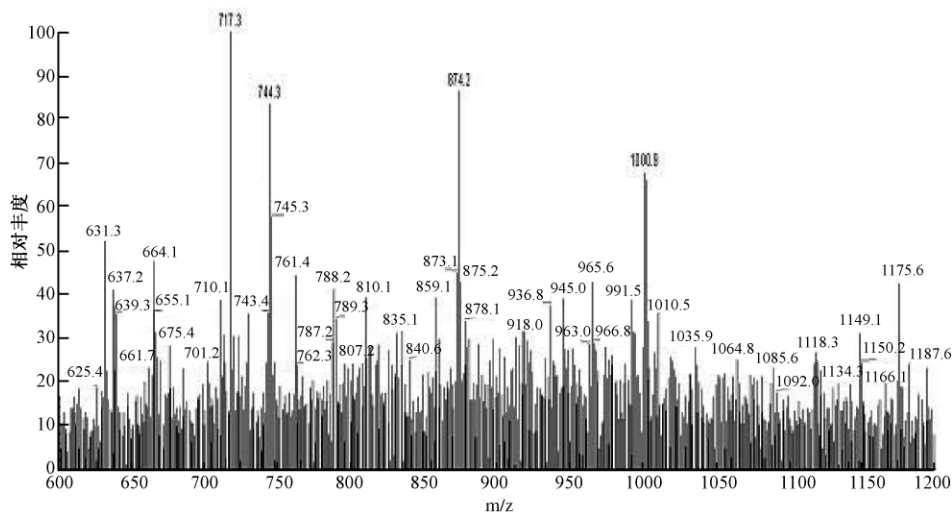


图4 重组 BMP 样品的一级质谱图

Figure 4 The first-level mass spectra of recombinant BMP

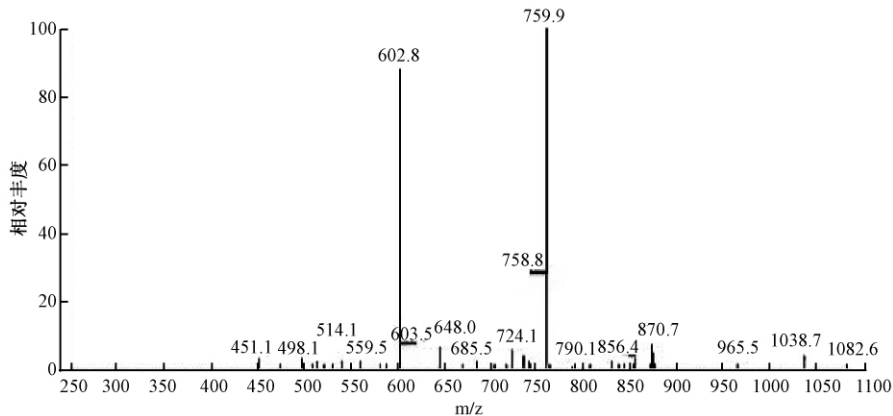


图5 重组 BMP 样品的二级全扫描质谱图

Figure 5 The second-level full scan mass spectra of recombinant BMP

3 讨论

电喷雾质谱技术 (electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS) 是近几年来发展最快的一种新的电离技术,电喷雾中所形成的多电荷离子可以直接用来准确、高灵敏度地确定多肽与蛋白质的分子量,但这还是缺乏提供信息的碎片离子。为得到进一步的结构信息,可进行碰撞诱导解离 (CID),再利用肽类的典型碎片离子来推断其结构。肽类的裂解碎片离子包括: N 端碎片离子 (有 a、b、c 型) 和 C 端碎片离子 (有 x、y、z 型)。a、y、z 型离子侧链断裂分别形成 d、v、w 型离子,此外还有两端断裂形成的内部离子等^[3-4],以 b、y 系列离子最为常见,根据肽的 b 或 y 系列碎片离子可解析推断出肽的一级结构。

利用二极管阵列检测器,对制备后的 BMP 样品色谱图进行了纯度分析,经计算,保留时间为 11.006 分的色谱峰的三点峰纯度值为 0.960 7,该值落入 0.950 0 与 1.000 0 之间。从光谱的角度,可以认为该色谱峰为一纯峰,也就是经 RP-HPLC 制

备的组分为单一 BMP 组分。

为推断目标产物 BMP 的一级结构,先对标准 BMP 样品进行了质谱测定。图 2 中 m/z 848.4 为 BMP 的 $[M + H]^+$ 离子信号,这与 BMP 分子量为 847.6 相符。为确定 BMP 标准样品的氨基酸序列,利用源内碰撞诱导解离技术对 BMP 进行二级质谱分析,得到一系列 y 离子及 b 离子碎片,如图 3 所示。需要特殊提及的是,碱性氨基酸如精氨酸 Arg、赖氨酸 Lys 对肽键碎裂的特殊作用。碱性氨基酸的质子亲和能较高,具有使质子在肽链或碎片上定位的倾向,如果精氨酸 Arg 在肽链的 N 端,碎裂中则倾向于产生 N 端离子,同样 Arg 在 C 端亦然^[5]。BMP 其一级结构为 H-Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala-OH,恰逢碱性氨基酸 Lys 在肽链的 N 端,因此,质子在碎片上定位的倾向作用,必然会导致碎裂中产生 N 端离子,即 b 离子,与此同时,定位作用导致了 C 端离子即 y 离子在质谱图上的缺失,这与本文结果完全一致。

用同样的方法对经反相高效液相色谱制备的

重组 BMP 样品进行了质谱分析。图 4 所示,图中未见 m/z 848.4 的分子离子峰,发现存在 m/z 874.2 的分子离子峰。为研究该组分与目标离子的关系,对其进行碰撞诱导解离,得到一系列碎片离子,将这些碎片离子与标准 BMP 碎片离子进行对比,见表 1。

表 1 BMP 标准样品与重组 BMP 的 b 系列离子对照表
Table 1 Comparison of standard BMP and recombinant

碎片离子	氨基酸结构	BMP in b series ions		
		荷质比 (m/z)		
		计算值	BMP 标准	重组 BMP
b_3	KGD	301	301.1	-
b_4	KGDE	430	430.1	-
b_5	KGDEE	559	559.2	559.5
b_6	KGDEES	646	646.2	646.0
b_7	KGDEESL	759	759.2	758.8

由表 1 可知,重组 BMP 的 b_5 、 b_6 及 b_7 碎片离子 m/z 值与 BMP 标准品以及计算值相一致。可以认定,重组 BMP 与 BMP 标准样品的第 1~7 个氨基酸(氨基端起)序列完全一致,其差异仅在第 8 个氨基酸。又因 874.2 与 848.4 仅相差 25.8,而氨基酸中分子量最小的为甘氨酸(75.07),初步推断,重组 BMP 也为 1 个八肽。通过 b_7 碎片离子与重组八肽的 m/z 值,可以确定第 8 个(氨基端起)氨基酸的分子量应该为 115.4,即脯氨酸。此前 Koganesawa 等^[6]

曾经报道,在毕赤酵母中表达生长抑制肽 GBP 时,由于翻译终止密码子不能被正确阅读,导致宿主错误的表达。因此,初步推断,毕赤酵母工程菌发酵产重组 BMP 产生了错误表达,其表达产物是同 BMP 只有 1 个氨基酸相差的八肽,其一级结构为 H-Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Pro-OH。

参考文献

[1] YAMASAKI Y, MAEKAWA K. A peptide with delicious taste [J]. *Agricul Biolog Chem*, 1978, 42: 1761-1765.

[2] BOLEN PAUL L, CIHAK, et al. Flavor active modified thaumatin and monellin and methods for their production and use [P]. United States: 20030050445.

[3] BORCHERS C, PETER J F, HALL M C, et al. Identification of in-gel digested proteins by complementary peptide mass fingerprinting and tandem mass spectrometry data obtained on an electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometer [J]. *Anal Chem*, 2000, 72(6): 1163-1168.

[4] 周红华, 马仁玲, 严立勇, 等. 电喷雾质谱法(ESI-MS)分析两种寡肽的一级结构 [J]. *药物分析杂志*, 2006, 26(3): 374-376.

[5] 陈晶, 付华, 陈益, 等. 质谱在肽和蛋白质序列分析中的应用 [J]. *有机化学*, 2002, 22(2): 81-90.

[6] KOGANESAWA N, AIZAWA T, SHIMOJO H, et al. Expression and purification of a small cytokine growth-blocking peptide from armyworm *Pseudaletia separata* by an optimized fermentation method using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Protein Express Purifica*, 2002, 25: 416-425.

公告栏

关于公布聚己二酰丁二胺等 107 种可用于食品包装材料的树脂名单的公告

2011 年 第 23 号

根据《食品安全法》及其实施条例的规定,按照卫生部等 7 部门《关于开展食品包装材料清理工作的通知》(卫监督发(2009)108 号)的要求,经组织专家评估,现公布聚己二酰丁二胺等 107 种可用于食品包装材料的树脂名单。

特此公告。

附件:聚己二酰丁二胺等 107 种可用于食品包装材料的树脂名单(略)

卫生部
二〇一一年十月十一日