



# 钠离子取代对气相分子氢氘交换反应的影响

方向\*, 杨金龙

合肥微尺度物质科学国家实验室, 中国科学技术大学, 合肥 230026

\*通讯作者, E-mail: fangxiang@china.com

收稿日期: 2011-11-18; 接受日期: 2012-02-09; 网络版发表日期: 2012-07-25

doi: 10.1360/032011-757

**摘要** 用质谱学方法测定分子的氢氘交换反应过程和结果是研究蛋白质分子等生物体系的分子构象, 如蛋白质折叠状态的常用方法之一. 本文利用线型离子阱-飞行时间质谱技术, 在气相中测定了由不同个数钠离子所取代的简单多肽分子——五联丙氨酸( $5\text{Ala}-n\text{H}+n\text{Na}$ ). $\text{H}^+$ ,  $n = 2, 3, 4, 5$  的氢氘交换反应情况, 得到了由不同个数钠离子取代的分子离子的氢氘交换反应速度以及交换的氢氘数量等, 并研究了钠离子个数对分子氢氘交换反应的影响. 结果表明, 在本工作的实验条件下, 钠离子的取代将影响分子离子的氢氘交换反应. 当钠离子数为 2 时, ( $5\text{Ala}-2\text{H}+2\text{Na}$ ). $\text{H}^+$  分子离子很难发生氢氘交换反应; 当钠离子数增加时, 对于 ( $5\text{Ala}-3\text{H}+3\text{Na}$ ). $\text{H}^+$ , ( $5\text{Ala}-4\text{H}+4\text{Na}$ ). $\text{H}^+$ , 和 ( $5\text{Ala}-5\text{H}+5\text{Na}$ ). $\text{H}^+$  等, 分子的氢氘交换反应速度会加快. 这可能是由于钠离子的取代导致了分子离子的构型以及分子的质子亲和势发生了显著的改变, 因此影响它们的氢氘交换反应. 此外, 我们还研究了线型四极场的  $q$  值对离子氢氘交换反应的影响, 发现对于某种离子, 当其对应的四极场  $q$  值低于 0.8 时, 对各种离子的交换反应速度影响不大, 但当  $q$  值接近第一稳定区图的边界点, 即当  $q$  接近 0.908 时, 对某些离子的交换反应速度影响很明显.  $q$  值对离子的交换反应速度影响可以用离子的运动速度加快而导致碰撞反应能量增加来解释.

**关键词**

多肽  
分子构型  
氢氘交换  
钠离子取代  
质谱  
气相分子离子

## 1 引言

用质谱学方法研究气相分子的氢氘(H/D)交换反应, 是研究气相蛋白质分子等生物大分子构象的常用方法之一<sup>[1-11]</sup>. 通过研究气相蛋白质分子的构象随外加物理化学条件的变化, 如溶液酸碱度、溶剂组成等的变化, 可以进一步推断蛋白质分子的构象变化过程及机理<sup>[12, 13]</sup>.

前人的研究工作表明, 在组成蛋白质的氨基酸分子中, 其氨基上(-NH, 或-NH<sub>2</sub>)的氢原子可以与相碰撞的含氘原子分子, 如 D<sub>2</sub>O、ND<sub>3</sub>、CD<sub>3</sub>OD 等分子中的 D 原子发生交换反应, 生成含一定数量 D 原子

的蛋白质分子. 而根据蛋白质等大分子在氢氘(H/D)交换反应中所交换的氢原子数量, 就可以推断出此蛋白质分子的构象. 其基本原理是, 如果被研究的蛋白质分子是处于自然的折叠状态, 则组成蛋白质的氨基酸分子, 有的将位于折叠后蛋白质分子的内部, 有的则位于折叠后蛋白质分子的外部. 位于蛋白质分子外部的氨基, 其中的 H 原子将可以与含氘原子分子, 如 D<sub>2</sub>O 发生碰撞, 进行 H/D 交换反应. 而被包含在蛋白质分子内部的氨基, 其中的氢原子由于无法与含 D 的分子发生碰撞, 将无法进行 H/D 交换反应. 当蛋白质分子的构象发生变化, 即处于非自然折叠状态, 如半折叠状态, 或完全展开状态, 则此时蛋

白质分子中, 有更多的氨基酸分子暴露在蛋白质分子的外部. 此时将有更多的氢原子可以与含 D 的分子发生碰撞并进行 H/D 交换反应. 因此, 根据蛋白质分子的 H/D 交换反应速度和完全交换后所交换的 H 原子数目, 即可判断蛋白质分子的构象.

用 H/D 交换反应来研究蛋白质分子的构象已有 60 多年的历史<sup>[14, 15]</sup>, 早期的研究是在溶液中进行, 其方法是, 通过精确测量交换反应后溶液密度的变化来计算反应的数量, 后来又采用 NMR 的方法来测量交换反应的数量. 近年来, 随着气相蛋白质分子离子产生技术的不断创新, 如电喷雾电离技术(electrospray ionization, ESI)<sup>[16-18]</sup>和基质辅助激光脱附电离技术(matrix assisted desorption and ionization, MALDI)<sup>[19-22]</sup>, 以及质谱技术的飞跃发展, 使得研究气相蛋白质分子的构象成为可能. 用质谱技术研究蛋白质分子的最大优势在于以下两个方面: 第一, 由于质谱技术可以准确测量单个分子的质荷比, 因此它可以准确地研究某个分子状态, 如同一种分子不同电荷状态的构象, 这与传统的研究方法只能研究溶液中所有样品分子的平均分子构象有所不同; 第二, 由于质谱分析速度可以在毫秒时间内完成, 因此它可以研究蛋白质分子的变化过程, 而传统的研究方法则只能测量到最终态的分子构象结果.

目前, 通过质谱法测量气相蛋白质分子的 H/D 交换数量来研究蛋白质分子的构象及其构象变化是一种被广泛应用的方法. 其实验过程是, 首先用 ESI 或 MALDI 产生气相蛋白质分子离子, 然后将这些离子引入到后置的质谱仪器中进行 H/D 交换反应. H/D 交换反应的产物被同一质谱仪进行质量分析, 将得到某一选定条件下的 H/D 交换反应的数量.

在离子 H/D 交换反应的研究中, 一般需要测量样品离子的 H/D 交换反应速度, 即测量被交换的 H/D 原子数目与交换反应时间的关系, 因此要求所使用的质谱仪器具有离子存储的功能. 通常用于研究分子 H/D 交换反应的质谱仪有几种, 一种是傅立叶变换离子回旋共振质谱仪(FTICR-MS)<sup>[23-25]</sup>. 在此种质谱仪中, 分别将样品离子和含 D 原子的分子气体, 如 D<sub>2</sub>O 蒸气, 引入到离子池中, 让它们在离子池中进行交换反应, 当反应进行到预定的时间后, 再对产物进行质谱分析, 测量 H/D 交换反应的数目. 另一种用于 H/D 交换反应研究的质谱仪是含有离子阱的质谱仪, 如离子阱-飞行时间质谱仪<sup>[26, 27]</sup>. 在此种质谱仪中,

分别将样品离子和含 D 原子的分子气体, 如 D<sub>2</sub>O 蒸气, 引入到离子阱中, 让它们在离子阱中进行交换反应, 当反应进行到预定的时间后, 即将产物离子逐出离子阱并引入到后续的飞行时间质谱仪中进行质谱分析, 测量 H/D 交换反应的数目.

由于 ESI 或 MALDI 方法都可以产生带多个电荷的蛋白质离子, 因此, 利用质谱法可以测量出每一种电荷状态的离子的 H/D 交换反应的数量, 并推断出每一种离子的构象, 这和利用 NMR 法只能测量出所有离子状态的平均构象有很大的不同.

关于气相分子的 H/D 交换反应机理, 前人根据他们的研究结果, 提出过多种理论解释<sup>[28-31]</sup>. 一种理论认为, 发生 H/D 交换的离子与分子, 其质子亲和势相差不多, 如 20 kJ/mol. Beauchamp 等人<sup>[28]</sup>在他们实验结果的基础上, 提出了 5 种 H/D 交换的机理. 前人的研究结果, 普遍认为影响分子 H/D 交换反应的根本因素是分子的结构和构象等分子基本性质.

至今为止, 研究蛋白质和金属离子加合物的 H/D 交换反应鲜有报道. Douglas 等<sup>[32]</sup>研究了一种多肽离子与钠离子加合离子的 H/D 交换反应, 他们发现, 含有一个钠离子的缓激肽(bradykinin)一价离子比它本身的离子具有高得多的 H/D 交换反应速度, 其交换反应进行得也很彻底. 但含一个钠离子的缓激肽二价离子比不含钠离子的 H/D 交换反应速度明显慢得多. 同时, 含有一个钠离子的缓激肽一价离子比含一个钠离子的缓激肽二价离子的 H/D 交换反应速度明显快得多. 他们认为, 这种交换速度的区别很有可能是由于分子构象的不同所造成的. 其他作者也进行过类似的研究<sup>[28]</sup>, 得到的含有其它分子的多肽加合物具有不同的 H/D 交换反应速度.

本工作利用线型离子阱-飞行时间质谱技术, 研究了由五个丙氨酸组成的多肽分子离子与 2~5 个钠离子形成的加合物离子的 H/D 交换反应, 发现不同的钠离子加合物将会明显影响离子的 H/D 交换反应速度和数量, 其可能的机理是: 含不同个数的钠离子加合物具有不同的空间构象, 其质子亲和势也会不相等, 因此它们将具有不同的 H/D 交换反应特性. 同时, 我们还研究了线型四极场的  $q$  值对离子氢氘交换反应的影响, 发现对于某种离子, 当其对应的四极场  $q$  值低于 0.78 时, 对各种离子的交换反应速度影响不大, 但当  $q$  值接近第一稳定区图的边界点, 即当  $q$  接近 0.908 时, 对某些离子的交换反应速度影响很明显.

$q$  值对离子的交换反应速度影响可以用离子的运动速度加快而导致碰撞反应能量增加来解释.

## 2 实验

### 2.1 化学试剂

多肽: 由五个丙氨酸组成的多肽样品 5Ala(如图 1 所示)购自 Sigma-Aldrich 公司, 实验前没有作任何纯化处理. 电喷雾电离所用的溶剂为: 甲醇/水=90/10, 溶液浓度为  $2 \times 10^{-5}$  mol/L. 样品溶液由下列方式配制而成: 首先, 配制 pH~10 的 NaOH 溶液, 然后称取一定量的 5Ala 固体样品溶于此碱性溶液中, 配制成  $1 \times 10^{-2}$  mol/L 的 5Ala 碱性溶液. 实验前, 再用事先准备好的甲醇/水=90/10 溶剂稀释成  $2 \times 10^{-5}$  mol/L 的 5Ala 溶液, 供后续的电喷雾电离质谱试验使用.  $D_2O$  购自剑桥同位素实验室 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). 纯度为 99.9%, 实验中没有作进一步纯化等处理. 由于本试验所用的仪器为具有较高分辨率的质谱仪, 它可以准确地测量分析所感兴趣的离子产物, 其样品纯度对实验结果基本没有影响.

图 1 5Ala (Ala-Ala-Ala-Ala-Ala)的分子结构示意图. 其中红色的 H 可以被 Na 所取代或进行 H/D 交换反应

### 2.2 质谱仪

用于 H/D 交换反应研究的线型离子阱-飞行时间质谱仪是我们自主改进过的 PE Sciex Q-TOF 质谱仪, 如图 2 所示. 图 2 中, 有电喷雾电离离子源 ESI 产生的多肽离子经 0.1 mm 直径的小孔 1 和锥形孔 2 后进入到置放四极离子导引  $Q_{IG}$  和四极线型离子阱  $Q_{IT}$  真空腔 3 中. 离子经离子导引传输后进入到四极线型离子阱中.  $D_2O$  样品气由连接管道 4 引入到真空中, 其  $D_2O$  样品分压由针型阀控制调节.

进入真空腔中的  $D_2O$  将与存储在四极线型离子阱中的样品离子发生 H/D 交换反应, 其 H/D 交换反应时间将由外接的电子仪器控制, 在本实验过程中, 反应时间设置在 100 ms~10 s 范围内.

图 3 给出了离子存储的时序控制过程, 其中 T1 为离子引入过程, 一般为 50  $\mu$ s, T2 为离子存储或离

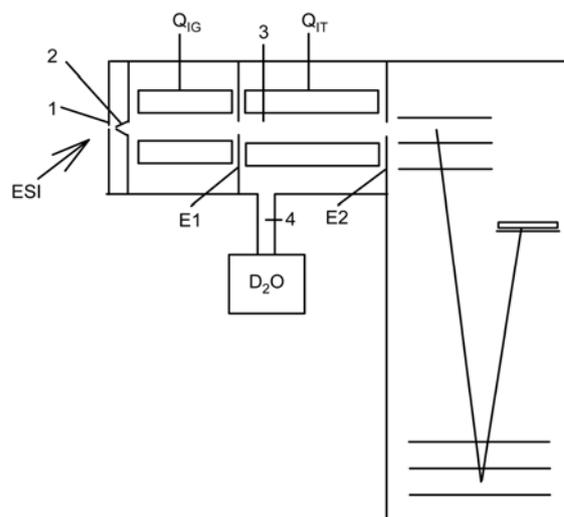


图 2 线型离子阱-飞行时间质谱计结构原理图

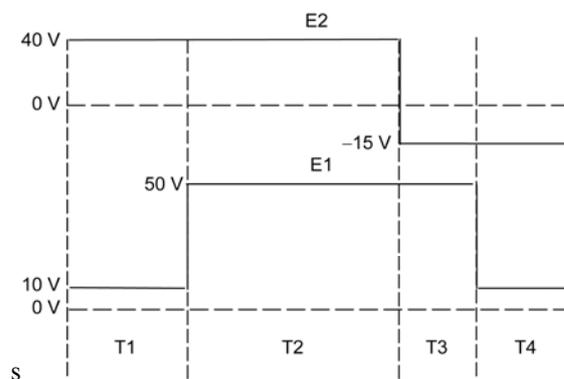


图 3 给出了离子存储的时序控制过程

子 H/D 交换反应过程, 实验中可以自由调节; T3 为离子探测过程, 一般为 50 ms, 在此过程中, 离子被加载在电极 E1 上的脉冲电压逐出离子阱, 并经安置在后面的离子透镜聚焦在飞行时间质谱的离子引出电极区内. T4 为离子排空过程, 一般为 20 ms, 它将可能残余在离子阱内的所有离子排出离子阱, 以免对下一个实验过程造成影响.

本实验中, 各电极的电压设置为: 电喷雾电离电极为 4500 V, 离子小孔 1 为 200 V, 锥形孔 2 为 15~20 V, 四极离子导引  $Q_{IG}$  电压为 15 V, 电极 E1 为 15 V, 四极线型离子阱  $Q_{IT}$  直流电压为 10 V, 电极 E2 为 -20 V, E3 为 -40 V, E4 为 0 V. 当进行离子存储和逐出实验时, E1 和 E2 上的电压加载方式和数值由外接电源控制, 如图 3 所示.

离子质量分析器为一反射式飞行时间质谱, 其

飞行管长度约为 1.5 m, 质量分辨率一般在 5000 左右. 离子采集与记录系统为 Ionwerks TDCx4, 其最小时间分辨为  $625 \times 10^{-12}$  s. 离子信号强度的测量系由离子质谱峰高度计算.

H/D 交换反应时间一般设置为 50 ms~30 s, 每个反应时间点的数据采集时间为 10 min.

### 3 结果与讨论

#### 3.1 分子中 Na 个数与 H/D 交换反应

图 4 为 5Ala 样品的电喷雾电离飞行时间质谱实验测量结果. 此时, 所有的离子既没有在离子阱中存储, 也没有与  $D_2O$  发生 H/D 交换反应. 由图 4 可知, 在本实验所使用的样品溶液及其它条件下, 所产生的离子产物主要有:  $(5Ala-nH^++nNa^+).H^+$ , 其中  $n=2, 3, 4, 5$ . 也就是说, 5Ala 分子中-NH 基团上的 H 将可能被 Na 按 1:1 所取代, 生成 Na 代多肽分子离子.

由图 1 所示的分子结构式可以看出, Ala-Ala-Ala-Ala-Ala 分子中含有 5 个 N 原子, 上面连接有 6 个可以被 Na 取代的 H. 此外, 在分子末端的-COOH 基团上的 H 也有可能被 Na 所取代. 即共有 7 个可以被 Na 取代的 H, 所以实验中观测到含有 2~5 个 Na 原子的离子产物.

基于上述同样的分子结构理由, Ala-Ala-Ala-Ala-Ala 共含有 7 个可以进行 H/D 交换反应的 H 原子, 加上电喷雾过程中生成 5Ala-H<sup>+</sup> 离子加上一个质子, 共有 8 个可以交换的 H. 所以不含 Na 原子的离子, 即 5Ala-H<sup>+</sup>, 总共有 8 个可以被 D 交换的 H 原子; 含有 2 个 Na 原子的离子,  $(5Ala-2H+2Na)H^+$ , 还有 6 个

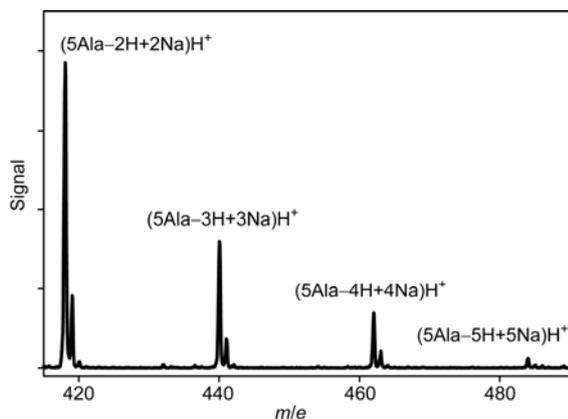


图 4 5Ala 样品的电喷雾电离飞行时间质谱

H 可以交换; 含有 3 个 Na 原子的离子  $(5Ala-3H+3Na)H^+$ , 还有 5 个 H 可以交换; 依此类推, 含有 5 个 Na 原子的离子, 即  $(5Ala-5H+5Na)H^+$ , 则只有 3 个 H 可以交换.

图 5 为含 2~5 个 Na 的 5Ala 离子的 H/D 交换反应实验结果, 从上到下, 分别给出了交换反应时间分别为 0 ms, 200 ms, 500 ms, 2 s, 5 s, 10 s 的质谱测量结果.

由图 5 可以看出, 对含不同个数 Na 的 5Ala 离子, 其 H/D 交换反应的速度明显的不同, 如经过 200 ms 的 H/D 交换过程,  $(5Ala-2H+2Na)H^+$  基本不发生 H/D 交换, 或最多只有一个 H 发生部分交换反应, 虽然  $(5Ala-2H+2Na)H^+$  离子是在本实验条件下含有最多可交换的 5 个 H; 含有 4 个可交换 H 的  $(5Ala-3H+3Na)H^+$  离子发生了 1~4 个 H 的交换; 含有 3 个可交换 H 的  $(5Ala-4H+4Na)H^+$  离子发生了 2~3 个 H 的交换; 含有 2 个可交换 H 的  $(5Ala-5H+5Na)H^+$  离子发生了 1~2 个 H 的交换.

当 H/D 交换过程持续时间为 2 s 时, 最多可交换 H 的  $(5Ala-2H+2Na)H^+$  一个 H 发生了明显的交换反应, 但所交换的 H 最多不超过 2 个, 如图 5 所示. 此时, 含有 4 个可交换 H 的  $(5Ala-3H+3Na)H^+$  离子发生了 1~3 个 H 的交换; 含有 3 个可交换 H 的  $(5Ala-4H+4Na)H^+$  离子发生了 1~2 个 H 的交换; 含有 2 个可交换 H 的  $(5Ala-5H+5Na)H^+$  离子发生了 1~2 个 H 的交换.

当 H/D 交换过程进行到 10 s 时,  $(5Ala-2H+2Na)H^+$  有 2 个 H 发生了明显的交换反应, 但也有的离子只有 1 个 H 发生了交换, 表明此离子的 H/D 交换过程很慢;  $(5Ala-3H+3Na)H^+$  离子发生了 1~4 个 H 的交换;

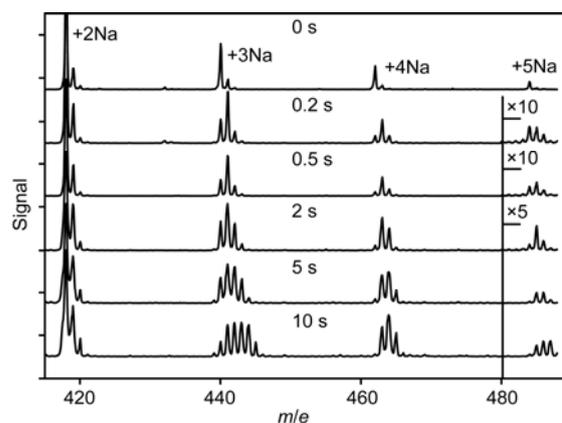


图 5  $(5Ala-nH+nNa)H^+$  ( $n=2, 3, 4, 5$ ) 中 H/D 交换与不同反应时间的质谱结果

(5Ala-4H+4Na) H<sup>+</sup>离子发生了 1~3 个 H 的交换;  
(5Ala-5H+5Na) H<sup>+</sup>离子发生了 1~2 个 H 的交换.

总之, 在完全相同的反应条件下, 不同的离子具有明显不一样的 H/D 交换反应速度和交换程度. 由此可见, Na 的取代改变了离子的 H/D 交换性质.

图 6 列出了不同离子经过不同时间的 H/D 交换反应后, 发生 H/D 交换的原子数量与反应时间的关系. 图 6 中, -1H 表示(5Ala-nH+nNa) H<sup>+</sup>离子失去一个 H 后随交换时间的变化, nH 表示交换 H 的数目. 如, -1H 表示(5Ala-nH+nNa) H<sup>+</sup>离子失去一个 H 随交换时间的变化, 它下降的速度最快, 表明离子中的一个 H 很快就被交换了. 1H 先是快速上升, 后又逐渐下降, 表明离子先快速交换一个 H, 但随后又交换了 2 个 H, 所以随着 1H 的下降, 2H 将上升. 由于交换的进一步进行, 1H, 2H 都下降, 3H 等将上升, 直到越来越多的 H 被交换掉. 由图 5 可以看出, 含有较多 Na 的离子具有最快的交换速度, 而含有最多 H 原子, 或最少 Na 原子的(5Ala-2H+2Na) H<sup>+</sup>离子, 其 H/D 交换反应的速度最慢, 其交换的 H 原子数也最少. 同样地, 从图 6 可以明显看出不同离子的交换反应过程的区别.

如前所述, 在蛋白质分子中, 凡是暴露在蛋白质分子外表面的 H 原子将很容易被 D 所交换. 由于蛋白质分子一般都比较大, 当它处于折叠状态时, 将有一定比例的可交换 H 被包裹在分子结构的内部, 因此, 这一部分的 H 将很难被 D 交换. 但对于像 5Ala 这样大小的分子, 很难想象将有可交换的 H 被包裹在分子结构的内部, 而无法发生 H/D 交换反应. 也就是说, 此时各种离子的 H/D 交换速度和交换的 H/D 原子个数并不是由于有的 H 原子被包裹在分子构型的内部所造成的.

显然, 分子离子中 Na 原子个数的多少会影响 (5Ala-nH+nNa) H<sup>+</sup>离子的下列性质: 第一, 分子的构型. 我们知道, 任何分子的构象与它的组成是密切相关的, 因此, 分子组成的变化毫无疑问会引起其构象的变化. 第二, 分子的质子亲和势. 质子亲和势是分子与其组成和结构都密切相关的基本性质, 因此, 分子组成的变化导致其质子亲和势的变化. 由前面的讨论可知, 分子的 H/D 交换反应速度和程度与分子的构象和质子亲和势都有直接的关系, 这两种分子性质的改变将导致 H/D 交换反应性质发生变化.

综上所述, 对 Ala-Ala-Ala-Ala-Ala 分子, 当分子中-NH 或 NH<sub>2</sub> 基团上的 H<sup>+</sup>被 Na<sup>+</sup>所取代后, 有可能导

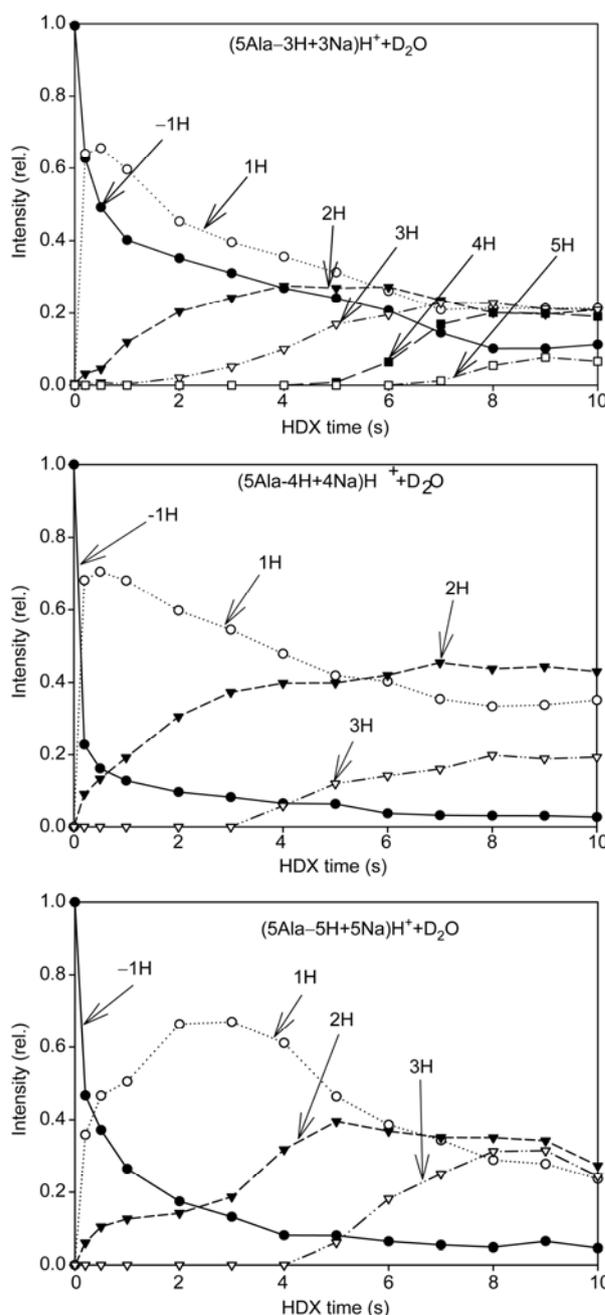


图 6 (5Ala-nH+nNa) H<sup>+</sup> (n = 3, 4, 5) H/D 交换反应与时间的关系

致分子离子的构型以及分子的质子亲和势发生显著的改变, 因此影响它们的氢氘交换反应速度和程度.

### 3.2 线型四极场的 q 值对分子 H/D 交换反应的影响

在四极线型离子阱中, 被存储的离子将受到两

种作用,一种是所谓的碰撞冷却,即离子与离子阱中的气体,如真空残余气体或实验过程中导入的气体,遇到本实验中引入的  $D_2O$  样品等的碰撞传能而被冷却到环境温度;另一种作用是离子被四极线型离子阱的工作电场所加热,即离子在离子阱中,由于在四极电场作用下不断作加速运动,其获得的动能在与其它分子碰撞过程中,将全部或部分转换成离子的内能,使得离子的温度升高. 理论研究表明,离子在四极线型离子阱中被加热后的温度取决于四极电场的  $q$  值.

由 Mathieu 方程,  $q$  值为:

$$q = \frac{4eV}{mr_0^2(4\pi f)^2}$$

上式中,  $m$  为存储的离子质量,  $e$  为离子所带电荷,  $V$  为四极线型离子阱 RF 工作电源的电压,  $r_0$  为四极电场的场半径,  $f$  为 RF 电源的工作频率.

本实验中  $r_0 = 4.0$  mm,  $f = 768$  kHz, 实验中通过改变  $V$  来改变对应于某种  $m/e$  离子的  $q$  值.

线型四极场的  $q$  值对离子氢氘交换反应的影响,可能通过两种途径,一种是由于离子在不同的  $q$  值情况下,其温度不同,因此会具有对应于一定温度的分子构型. 一般来讲,较高的温度下,分子结构会相对比较“松散”,因此更有利于 H/D 交换反应的发生. 也就是说,  $q$  值是通过影响分子构型来影响 H/D 交换的;第二种是离子的温度会随着  $q$  值升高而升高,而对于某些具有一定活化能的 H/D 交换反应,其温度的升高显然有利于反应的发生和反应速度的提高. 即  $q$  值也可以通过影响反应分子的温度来影响 H/D 交换反应速度.

本工作中,我们通过逐步提高 RF 电压来改变对应于某种  $m/e$  离子的  $q$  值,在实验过程中,所有离子的存储时间,即 H/D 交换反应的时间都是 500 ms,离子阱中的  $D_2O$  气体压力保持不变,为 5 mTorr. 不同  $q$  值下的 H/D 交换反应实验结果如图 7 所示. 由图 7(a~c)可见,对于某种离子,当其所对应的四极场  $Q$  值低于 0.8 时,对各种离子的交换反应速度影响不大,但当  $Q$  值接近第一稳定区图的边界点,即当  $q$  接近 0.908 时,对某些离子的交换反应速度影响很明显.

图 7 给出了  $(5Ala-3H+3Na) H^+$  离子的 H/D 交换反应与  $q$  值大小的变化关系,对于其它离子的影响,也有相似的结果. 为说明问题,这里仅给出其中一种离子的实验结果.

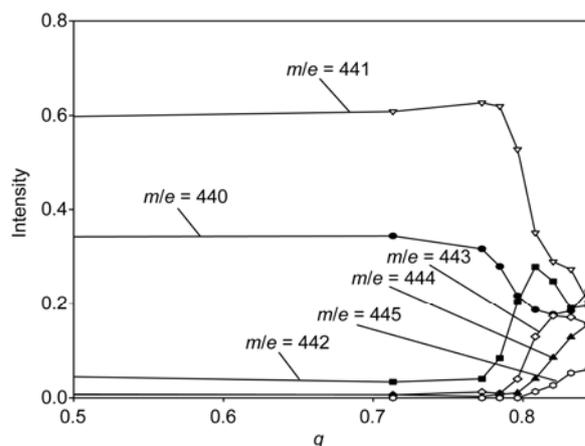


图 7  $(5Ala-3H+3Na) H^+$  离子的 H/D 交换反应与  $q$  值大小的变化关系

由此可见,当  $q < 0.8$  时,它对离子的 H/D 交换反应基本没有影响,但当  $q > 0.8$  时,它对离子的 H/D 交换反应有显著的影响,使反应速度和交换的数量都有明显的加速作用. 其准确的作用机理还有待进一步的理论和实验研究. 这里只作探讨性的解释:根据前面的讨论,5Ala 分子属于比较小的体系,其分子在不同条件的构型虽然会有所不同,但不至于有很大的变化,也就是说,可以认为,离子构型的变化对离子 H/D 交换反应的影响在这里不是决定性的,所以 H/D 交换反应的明显改变更多地是由于  $q$  值的提高改变了离子的温度. 这里需要说明的是,  $q$  值的提高不会改变  $D_2O$  分子的温度,因为  $D_2O$  不带电荷,它的运动状态也因此不受  $q$  值变化的影响. 总之,我们认为,本实验中观测到的离子交换反应速度受  $q$  值的影响,主要是由于离子温度的升高,而非离子构型的变化.

## 4 结论

根据我们对含不同钠离子取代的简单多肽分子  $(5Ala-nH+nNa).H^+$ ,  $n = 2, 3, 4, 5$  的氢氘交换反应情况研究,发现:

(1) 在本工作的实验条件下,多肽分子将很容易生成钠离子取代的分子离子;

(2) 钠离子的取代将影响分子离子的氢氘交换反应速度和参加交换的 H 原子个数. 这可能是由于钠离子的取代导致了分子离子的构型以及分子的质子亲和势发生了显著改变的缘故;

(3) 线型四极场的  $q$  值在某些范围内对离子氢氘交换反应有很大的影响, 特别是当  $q$  值低于 0.8 时, 对各种离子的交换反应速度影响不大, 但当  $q$  值接近第一稳定区图的边界点, 即当  $q$  接近 0.908 时, 对某些离子的交换反应速度影响很明显.  $q$  值对离子的交换反应速度影响可以用离子的运动速度加快而导致碰撞反应能量增加来解释.

对本工作所得到的实验结果的更准确的解释, 需要进一步结合理论研究工作, 如用量子化学计算的方法, 对分子结构与其组成, 以及温度关系的确认. 我们拟与理论化学家合作, 用理论计算的方法, 计算出不同温度等条件下,  $(5\text{Ala-nH+nNa})\text{H}^+$  分子离子构型, 再进一步理解分子构象、温度等与离子交换反应速度的关系.

**致谢** 本工作得到国家重大科学仪器设备开发专项项目基金资助(2011YQ090005), 特此致谢.

## 参考文献

- 1 Katta V, Chait BT. Conformational changes in proteins probed by hydrogen-exchange electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1991, 5: 214–217
- 2 Zhang Z, Smith DL. Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: A new tool for protein structure elucidation. *Protein Sci*. 1993, 2: 522–531
- 3 Liyanage R, Devarapalli N, Puckett LM, Puckett LM, Phan NH, Gidden J, Stites WE, Lay Jr JO. Comparison of two ESI-MS based H/D exchange methods for extracting protein folding energies. *Int J Mass Spectrom*, 2009, 287: 96–104
- 4 Kaltashov IA, Bobst CE, Abzalimov RR. H/D exchange and mass spectrometry in the studies of protein conformation and dynamics: Is there a need for a top-down approach? *Anal Chem*, 2009, 81:7892–7899
- 5 Rennella E, Corazza A, Fogolari F, Viglino P, Giorgetti S, Stoppini M, Bellotti V, Esposito G. Equilibrium unfolding thermodynamics of beta(2)-microglobulin analyzed through native-state H/D exchange. *Biophys J*, 2009, 96: 169–179
- 6 Wright PJ, Douglas DJ. Gas-phase H/D exchange and collision cross sections of hemoglobin monomers, dimers, and tetramers. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20: 484–495
- 7 Hoaglund-Hyzer CS, Counterman AE, Clemmer DE. Anhydrous protein ions. *Chem Rev*, 1999, 99: 3037–3079
- 8 Jarold MF. Peptides and proteins in the vapor phase. *Ann Rev Phys Chem*, 2000, 51: 179–207
- 9 Konermann L, Tong X, Pan Y. Protein structure and dynamics studied by mass spectrometry: H/D exchange, hydroxyl radical labeling, and related approaches. *J Mass Spectrom*, 2008, 43:1021–1036
- 10 Katta V, Chait BT. Hydrogen/Deuterium exchange electrospray ionization mass spectrometry: A method for probing protein conformational changes in solution. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 6317–6321
- 11 Mo JJE, Todd GC, Hakansson K. Characterization of nucleic acid higher order structure by gas-phase H/D exchange in a quadrupole-FT-ICR mass spectrometer. *Biopolymers*, 2009, 1: 256–264
- 12 Englander SW, Kallenbach NR. Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids. *Q Rev Biophys*, 1983, 16: 521–655
- 13 Wales TE, Engen JR. Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. *Mass Spectrom Rev*, 2006, 25: 158–170
- 14 Hvidt A, Niesen SO. Hydrogen exchange in proteins. *Adv Protein Chem*, 1966, 21: 287–386
- 15 Engen JR. Analysis of protein conformation and dynamics by hydrogen/deuterium exchange MS. *Anal Chem*, 2009, 81: 7870–7875
- 16 Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989, 246: 64–71
- 17 Loo JA, Udseth HR, Smith RD. Peptide and protein analysis by electrospray ionization-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal Biochem*, 1989, 179: 404–412
- 18 Henry KD, Williams ER, Wang BH, McLafferty FW, Shabanowitz J, Hunt DF. Fourier-transform mass spectrometry of large molecules by electrospray ionization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 9075–9078
- 19 Strupat K, Karas M, Hillenkamp F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: A new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, 1991, 72: 89–102
- 20 Beavis RC, Chait BT. Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1989, 3: 436–439
- 21 Beavis RC, Chait BT. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun*

*Mass Spectrom*, 1989, 3: 432–435

- 22 Beavis RC, Chaudhary T, Chait BT.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Org Mass Spectrom*, 1992, 27: 156–158
- 23 Zhang HM, Bou-Assaf GM, Emmett MR, Marshall AG. Fast reversed-phase liquid chromatography to reduce back exchange and increase throughput in H/D exchange monitored by FT-ICR mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20: 520–524
- 24 Mo JJE, Todd GC, Hakansson K. Characterization of nucleic acid higher order structure by gas-phase H/D exchange in a quadrupole-FT-ICR mass spectrometer. *Biopolymers*, 2009, 91: 256–264
- 25 Somogyi A. Probing peptide fragment ion structures by combining sustained off-resonance collision-induced dissociation and gas-phase H/D exchange (SORI-HDX) in fourier transform ion-cyclotron resonance (FT-ICR) instruments. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008, 19: 1771–1775
- 26 Collings BA, Campbell JM, Mao D, Douglas DJ. Combined linear ion trap time-of-flight system with improved performance and MS<sup>n</sup>. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001, 15: 1777–1795
- 27 Campbell JM, Collings BA, Douglas DJ. A new linear ion trap time-of-flight system with tandem mass spectrometry capabilities. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1998, 12: 1463–1474
- 28 Campbell S, Rodgers MT, Marzluff EM, Beauchamp JL. Deuterium exchange reactions as a probe of biomolecule structure. Fundamental studies of gas phase H/D exchange reactions of protonated glycine oligomers with D<sub>2</sub>O, CD<sub>3</sub>OD, CD<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D and ND<sub>3</sub>. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 12840–12854
- 29 Chitta RK, Rempel DL, Gross ML. The gramicidin dimer shows both EX1 and EX2 mechanisms of H/D exchange. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20: 1813–1820
- 30 Atzrodt J, Derdau V, Fey T, Zimmermann J. The renaissance of H/D exchange. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007, 46: 7744–7765
- 31 Huang YQ, Marini JA, McLean JA, Tichy SE, Russell DH. A mechanistic study of the H/D exchange reactions of protonated arginine and arginine-containing di- and tripeptides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20: 2049–2057
- 32 Mao D, Douglas DJ. H/D exchange of gas phase bradykinin ions in a linear quadrupole ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003, 14: 85–94

## The effect of non-covalent binding of sodium to a peptide on the H/D exchange reaction

FANG Xiang<sup>\*</sup>, YANG JinLong

Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

<sup>\*</sup>Corresponding author (email: fangxiang@china.com)

**Abstract:** The gas phase H/D exchange of some sodium attached peptide ions, (5Ala- $n$ H+ $n$ Na).H<sup>+</sup>,  $n = 2,3,4,5$  have been studied with an electrospray ionization linear ion trap time-of-flight mass spectrometry (ESI-LIT-TOFMS) system. The exchange reaction rates of the peptide with different sodium ions have been investigated and the mechanism of the sodium ion effect was discussed. When two Na<sup>+</sup> attached to the peptide and formed (5Ala-2H+2Na).H<sup>+</sup>, there was no H/D exchange in our experimental conditions. The exchange rates were accelerated if 3, 4 or 5 Na<sup>+</sup> attached to the peptide and formed (5Ala-3H+3Na).H<sup>+</sup>, (5Ala-4H+4Na).H<sup>+</sup>, and (5Ala-5H+5Na).H<sup>+</sup> ions. The peptide might have different conformations if different sodium ions were attached. The effect of the  $q$ -value of the quadrupole field on the H/D exchange rate were also studied in this work. The exchange rate was not changed if the  $q < 0.8$ , and the rate were certainly increased when the  $q$  is close to 0.908 because the ions have higher kinetic energy at this point.

**Keywords:** peptide, gas phase conformations, H/D exchange, sodium ions effect, mass spectrometry, gas phase molecular-ion