

# 电喷雾质谱法研究谷胱甘肽与 *L* 型芳香性氨基酸非共价复合物

储艳秋<sup>1</sup>, 戴兆云<sup>2</sup>, 蒋公羽<sup>1</sup>, 郑松柏<sup>2</sup>, 陈 玺<sup>2</sup>, 丁传凡<sup>1</sup>

(1. 复旦大学化学系激光化学研究所, 上海 200433; 2. 复旦大学附属华东医院, 上海 200040)

**摘要** 为探索谷胱甘肽和 *L* 型芳香性氨基酸的非共价相互作用, 将一定化学计量比的还原型  $\gamma$ -谷胱甘肽分别与 *L* 型芳香性氨基酸(包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸)在室温和生理 pH 条件下混合后, 温育 1 h, 生成非共价复合物, 并使反应完全. 电喷雾质谱测量结果揭示谷胱甘肽和 *L* 型芳香性氨基酸反应可以生成非共价复合物. 在二级串联质谱 MS<sup>2</sup> 测得的复合物碎片离子峰中, 除芳香性氨基酸离子峰外, 还包括谷胱甘肽及其它再次碎裂产生的 b<sub>2</sub> 和 y<sub>2</sub> 碎片离子, 进一步确认了非共价复合物的形成. 紫外光谱也证实了电喷雾质谱的实验结果. 为避免严重的离子化效率差异和质谱信号的相互抑制作用, 定量评估了谷胱甘肽和酪氨酸的相互作用, 结果显示反应物的初始浓度应该选择在  $5 \times 10^{-5} \sim 3.00 \times 10^{-4}$  mol/L 范围内. 用质谱滴定法测定了谷胱甘肽与 3 个芳香性氨基酸非共价复合物的解离常数, 结果表明, 谷胱甘肽复合物的稳定性按 Tyr, Trp 和 Phe 次序依次增大.

**关键词** *L* 型芳香性氨基酸; 谷胱甘肽; 非共价复合物; 质谱滴定法; 解离常数

**中图分类号** O657.63; O641.4

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2009)05-0869-07

在常见的氨基酸中, *L* 型苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸属于芳香性氨基酸. 酪氨酸(Tyr)是生物体内多种分泌物的母体化合物, 它与黑色素的形成有关<sup>[1]</sup>. 苯丙氨酸(Phe)是人体必需氨基酸, 可用于氨基酸输液, 抗癌药物、抗病毒药物的合成和开发以及婴幼儿的特殊奶粉及食品添加剂阿斯巴甜(Aspartame)的生产等方面, 是重要的营养物质. 色氨酸(Trp)是人体必需氨基酸之一, 人体自身不能合成, 所以必须从食物中汲取. 它是重要的神经导体 5-羟色胺(Serotonin)的前体<sup>[2]</sup>. *L* 型色氨酸对人体的生长发育及新陈代谢也起着重要的调节作用.

众所周知, 还原型谷胱甘肽(简称谷胱甘肽)在人体内具有活化氧化还原系统、激活巯基酶及解毒等重要的生理活性<sup>[3]</sup>, 并参与体内三羧酸循环和糖的代谢, 促进体内产生高能量, 起到辅酶作用. 同时参与多种外源性及内源性有毒物质结合生成减毒物质. 因此, 了解谷胱甘肽在体内复杂的变化过程, 对于解析谷胱甘肽的生物作用显得尤为重要. 在临床上, 谷胱甘肽可用于各种类型肝病的预防和治疗, 对治疗病毒性肝炎和酒精性肝炎等具有较好疗效<sup>[4]</sup>. 除此之外, 谷胱甘肽还能辅助治疗过敏性紫癜和肾性贫血等. 值得一提的是, 谷胱甘肽许多新的作用正在不断地被发现. 例如, 蛋白质(包括酶、转录因子等)可与谷胱甘肽共价结合后导致蛋白质谷胱甘肽化<sup>[5]</sup>. 此外, 谷胱甘肽还参与细胞内负责二硫化物还原的谷氧还蛋白系统. 据知, 谷胱甘肽在人体血液中的浓度范围在 1 ~ 3 mmol/L<sup>[6]</sup>, 谷胱甘肽与芳香性氨基酸相遇后可形成对生命活动有一定影响的非共价复合物, 为更好地了解这些非共价复合物, 建立快速、灵敏的检测方法意义重大.

近些年来, 质谱技术获得了广泛的应用<sup>[7-11]</sup>. 电喷雾质谱技术凭借其速度快、灵敏度高、样品用量低以及软电离<sup>[12]</sup>等特点, 被成功地应用于定性测定蛋白质主体分子和抑制剂、辅基和核酸等客体分子的非共价作用. 近年来, 应用电喷雾质谱进行定量测定取得了一定的进展, Yu 等<sup>[13]</sup>用电喷雾质谱

收稿日期: 2009-01-15.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 25027004)资助.

联系人简介: 储艳秋, 男, 博士, 副教授, 主要从事有机分子和生物大分子质谱研究. E-mail: chuyq@fudan.edu.cn;

丁传凡, 男, 博士, 教授, 主要从事生物质谱研究. E-mail: cfding@fudan.edu.cn

法测量了环糊精与黄酮类药物非共价复合物的结合常数, 并采用傅里叶回旋共振质谱法 (FTICR-MS) 测定了该复合物的键合位点. Frycak 等<sup>[14]</sup> 用电喷雾质谱结合动态滴定法测量金鸡纳碱氨基甲酸酯与 *N*-二硝基苯甲酰亮氨酸非共价复合物的解离常数. 最近, Li 等<sup>[15]</sup> 又成功地采用电喷雾质谱内标法定量测定了黄连中生物碱 (如小檗碱、巴马汀等) 的实际含量, 并用毛细管电泳法进行了验证.

但迄今为止, 对于质谱滴定法测得的气相常数能否直接代表溶液中复合物的解离常数仍然存在一定的争论. 例如, 在去溶剂和离子化的过程中, 某些样品离子除了产生特异性结合的配合物之外, 还可能产生一些非特异性结合的配合物, 导致溶液中各种质点的离子化效率产生差异以及分析试剂浓度较高等因素也会引起质谱信号的相互抑制. 但人们还是不断地探索新方法和新技术, 如 Konermann 等<sup>[16]</sup> 通过改变小分子配体与生物大分子键合前后的扩散系数以进行校正, 然后再进行质谱测定, 此外还有采用响应因子进行校正的方法<sup>[14]</sup> 等. 大量事实表明, 只要反应体系和条件选择适当, 质谱滴定法与传统的溶液分析方法相结合还是可以用来测量生物大分子和配体复合物解离常数的. 如张寒琦等<sup>[17]</sup> 成功地利用电喷雾质谱研究了氨基酸与人参皂苷  $Rb_3$  的非共价复合物, 并测定了该复合物的解离常数.

本实验室在采用电喷雾质谱法成功研究谷胱甘肽与 *D* 型氨基酸非共价相互作用的基础上<sup>[18,19]</sup>, 采用上述技术探讨在生理 pH 条件下谷胱甘肽与 *L* 型芳香性氨基酸 (包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸) 产生的非共价复合物的二级或三级串级质谱, 以紫外光谱进一步确认非共价复合物的生成, 并采用质谱滴定法测定了复合物的解离常数.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

谷胱甘肽 (GSH, 纯度 99%) 购于 Sigma 公司 (美国). *L* 型芳香性氨基酸 (简称为芳香性氨基酸), 包括 Phe, Tyr 和 Trp (纯度 99%), 购于上海朝瑞生物科技有限公司. 甲醇 (A. R. 级) 购于国药集团化学试剂有限公司. 所有化学试剂均溶解于蒸馏水中, 并制成 1.0 mmol/L 储备液.

PE-Sciex API III 三重四级杆串级质谱仪 (加拿大,  $m/z$  2400), 在喷雾器上施加 4500 V 电压, 接口板电压 500 V. 采用正离子检测模式. 质谱仪的质量由聚丙二醇 (PPG) 校正. 高纯氮气 (纯度 99.999%) 作为雾化气和帘气. 雾化气和帘气的流速分别为 0.4 和 0.6 L/min.

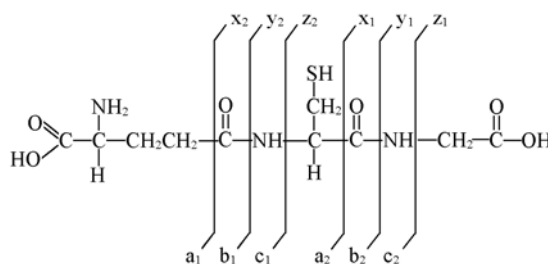
二级串级质谱  $MS^2$  实验所用碰撞气体为氩气 (纯度 99.99%), 采用子离子扫描进行检测. 首先, 由电喷雾引入的待检测离子在四级杆  $Q_0$  上进行聚焦, 由  $Q_1$  选择需要碰撞的母离子. 然后在  $Q_2$  碰撞池中引入一定密度的氩气, 母离子和氩气在  $Q_2$  中进行碰撞, 由  $Q_3$  检测碰撞解离产物.

三级串级质谱  $MS^3$  实验在接口区 (Interface region) 解离产生感兴趣的初级碎片离子, 其后步骤与  $MS^2$  相同.  $Q_0$  和碰撞池 ( $Q_2$ ) 的电压差 [ $n(R_2 - R_0)$ ] 决定离子碰撞能量的大小 ( $n$  为电荷数), 本实验中碰撞能量为 30 eV, 碰撞气体密度 (CGT) 为  $8 \times 10^{14}$  molecules/cm<sup>2</sup>. 为便于讨论, 采用 Biemann 规则命名谷胱甘肽碎裂碎片<sup>[20]</sup>, 结果见 Scheme 1.

Agilent 8453 UV-Vis 分光光度计 (美国安捷伦), 在室温下测定紫外光谱. 混合前所有组分的浓度均为 0.1 mmol/L, 反应物摩尔比为 1:1. 溶液的 pH 值由 PHS-3C 精密 pH 计 (上海林达仪器厂) 测得.

### 1.2 实验过程

将谷胱甘肽分别与 Phe, Tyr 及 Trp 储备液按一定摩尔比在室温下混合, 配制成一系列不同初始浓度的酸度为生理 pH 6~8 的混合溶液, 然后放入 20 °C 培养箱内, 静置, 温育 1 h, 使谷胱甘肽与 *L* 型芳香性氨基酸生成非共价复合物, 并使反应完全, 取出后进行质谱和紫外光谱检测. 在质谱检测前, 先在待测样品中加入 5% 甲醇, 以提高质谱检测的信号强度.



Scheme 1 Fragmentation of glutathione

## 2 结果与讨论

### 2.1 谷胱甘肽和 Phe, Tyr 及 Trp 在气相中形成的非共价复合物的电喷雾质谱

谷胱甘肽是由  $\gamma$ -谷氨酰、半胱氨酰及甘氨酸组成的三肽( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly), 分子式为  $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ , 分子量为 307.3. 质谱峰  $m/z$  308.2 为谷胱甘肽离子峰  $[GSH + H]^+$ .

图 1 显示了谷胱甘肽分别与芳香性氨基酸 Phe, Tyr 及 Trp 形成的复合物的电喷雾质谱图. 由图 1 可见, 除了谷胱甘肽( $m/z$  308.2)、Phe( $m/z$  166.2)、Tyr( $m/z$  182.2) 和 Trp( $m/z$  205.2) 的离子峰之外, 还出现了非共价复合物的离子峰, 质谱峰  $m/z$  473.5 [图 1(A)],  $m/z$  489.4 [图 1(B)] 和  $m/z$  512.4 [图 1(C)] 可以分别归属于  $[Phe - GSH + H]^+$ ,  $[Tyr - GSH + H]^+$  和  $[Trp - GSH + H]^+$ . 在图 1(A) 还出现了  $m/z$  331.3 质谱峰, 它可以归属于苯丙氨酸自身反应形成的二聚物  $[Phe - Phe + H]^+$ . 从图 1 中的 3 个插图可以看到, 生成的均为单电荷离子. 由此可见, 谷胱甘肽与芳香性氨基酸反应后, 导致非共价复合物的生成.

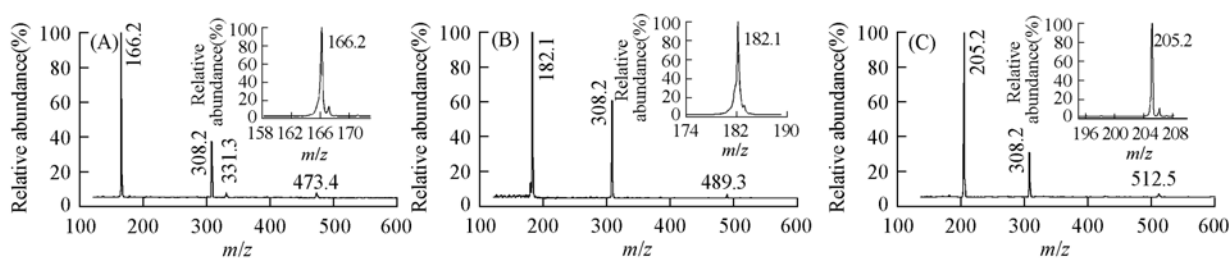


Fig. 1 ESI mass spectra for complexes of glutathione with Phe, Tyr or Trp

$[GSH]$  is at a fixed concentration of  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L. (A)  $[Phe] = 2.0 \times 10^{-4}$  mol/L;

(B)  $[Tyr] = 1.8 \times 10^{-4}$  mol/L; (C)  $[Trp] = 2.8 \times 10^{-4}$  mol/L.

为进一步确认谷胱甘肽能够与芳香性氨基酸形成非共价复合物, 对  $[GSH + L + H]^+$  前驱体离子进行了碰撞诱导解离(CID)实验(L为Phe, Tyr或Trp). 图 2 显示了将谷胱甘肽与 Phe, Tyr 或 Trp 形成的复合物作为前体母离子的二级串级质谱  $MS^2$  实验结果. 在图 2(A) 中, 来自于前体离子( $m/z$  473.5) 的断裂碎片离子  $m/z$  166.2 和 308.2 可以分别归属于  $[Phe + H]^+$  和  $[GSH + H]^+$  的分子离子峰. 除此之外还观察到  $m/z$  为 177.2, 231.3 和 289.5 的碎片离子峰, 它们可以分别归属于谷胱甘肽碎裂后产生的  $y_2$ ,  $b_2$  和  $b_3$  碎片离子, 其中  $b_3$  为谷胱甘肽 C 端羧基脱去羟基后的产物. 谷胱甘肽进一步碎裂并产生  $y_2$ ,  $b_2$  和  $b_3$  碎片离子的现象也出现在图 2(B) 和 (C) 中. 为了确认  $m/z$  177.2 碎片离子峰为谷胱甘肽碎裂后产生的  $y_2$ , 又进行了三级串级质谱  $MS^3$  实验, 即将  $GSH-Phe$  复合物源内解离产生的  $y_2$  离子再次在  $Q_2$  碰撞池内碰撞解离, 结果在谱图中发现了  $y_1$  离子( $m/z$  为 76.2, 谱图在此没有列出). 同样, 在图 2(B) 中, 来自于前体离子( $m/z$  489.4) 的断裂碎片离子  $m/z$  182.3 和 308.2 可以分别归属于  $[Tyr + H]^+$  和  $[GSH + H]^+$  的分子离子峰. 在图 2(C) 中, 来自于前体离子( $m/z$  513.4) 的断裂碎片离子  $m/z$  205.2 和 308.2 可分别归属于  $[Trp + H]^+$  和  $[GSH + H]^+$  的分子离子峰. 根据图 2 的实验结果可以看到, 断裂后的碎片离子一般为  $[L + H]^+$  (L 为芳香性氨基酸)、 $[GSH + H]^+$  以及谷胱甘肽进一步碎裂产生的  $y_2$ ,  $b_2$  和  $b_3$  碎片离子, 即断裂位点容易发生在谷胱甘肽与芳香性氨基酸结合部位, 这可能与非共价复合物中非共价键的键能相对较弱有关. 与此同时, 谷胱甘肽也容易再次发生进一步碎裂. 图 2 串级质谱

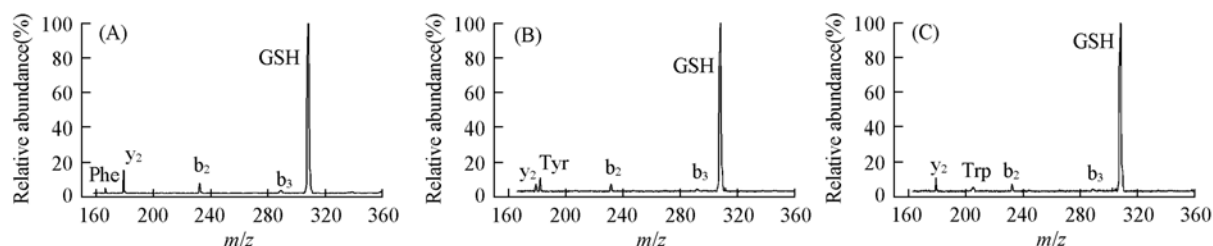


Fig. 2  $MS^2$  spectra of non-covalent complexes of glutathione with Phe, Tyr or Trp

(A) Phenylalanine; (B) tyrosine; (C) tryptophan.

实验结果进一步确认了谷胱甘肽与芳香性氨基酸反应可以形成非共价复合物的结论。

文献[17]结果表明, 由于氨基酸为两性物质, 所以它们的离子化效率较低。液相中不同的质点在电喷雾的离子化过程会产生差异, 分析试剂浓度过高或质子亲和势相差过大等因素均会引起测定信号的相互抑制作用, 而离子化效率的差异和质谱信号的相互抑制作用是影响电喷雾质谱测量复合物解离常数准确度的两个主要因素<sup>[18]</sup>。因此, 定量地评估谷胱甘肽系列氨基酸的相互作用显得尤为重要。图3比较了Tyr和Tyr与GSH的摩尔比为1:1以及Tyr与浓度为 $3 \times 10^{-4}$  mol/L GSH 3种溶液的电喷雾质谱强度。由图3插图可见, Tyr和Phe质谱峰强度随着浓度的增加呈线性单调上升趋势, 揭示它们的离子化效率较高; 而Tyr的斜率小于Phe, 表明它们的离子化效率略有差异。谷胱甘肽呈现饱和特征的结果表明它的离子化效率会随浓度的上升而略有下降。由图3可以看到, 当Tyr浓度在 $5 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-4}$  mol/L范围内, 加入谷胱甘肽后没有明显的信号抑制现象出现。然而, 当Tyr浓度高于 $3 \times 10^{-4}$  mol/L时, 开始出现小的信号抑制现象。尽管如此, 比较谷胱甘肽与Tyr相同摩尔比时的信号下降程度可见, Tyr在GSH浓度固定为 $3 \times 10^{-4}$  mol/L时的质谱信号强度下降相对较少。

## 2.2 质谱滴定法测定非共价复合物的解离常数

由图3可见, 采用质谱滴定法可测量谷胱甘肽和芳香性氨基酸配体形成的复合物的解离常数, 两种反应物的初始浓度应选择 $5 \times 10^{-5} \sim 3.00 \times 10^{-4}$  mol/L范围内, 这样可避免严重的质谱信号相互抑制作用。此外, 应选择离子化效率与谷胱甘肽接近的氨基酸研究体系, 以免引入测量误差。

由于电喷雾离子化的时间很短<sup>[21]</sup>, 对化学平衡不会产生明显影响<sup>[22]</sup>。文献[23]中假设: (1) 复合物从液相转移到气相的过程中不会发生分解反应; (2) 溶液中各种质点的质谱峰强度正比于其液相中的平衡浓度; (3) 液相中主体分子、配体分子和复合物具有相同的离子化效率。基于上述3个基本假设, 即可推得主体分子和单一配体分子形成复合物的解离常数公式。

在谷胱甘肽和芳香性氨基酸配体的体系中, 只形成了单一配体的复合物, 没有生成混合配体的复合物, 自身聚合形成的低聚物的质谱峰强度也较弱, 不会对计算结果产生明显影响, 因此可将公式简化为

$$K_{d1} = \frac{(1 - a_1)([L]_0 - [G]_0 a_1)}{a_1} \quad (1)$$

式中,  $K_d$ 为解离常数,  $[G]_0$ 和 $[L]_0$ 分别代表谷胱甘肽和配体芳香性氨基酸的初始浓度,  $a_1$ 数值可通过 $GL^+$ 和 $G^+$ 质谱峰的强度计算得到。

$$a_1 = \frac{[GL]}{[G]_0} = \frac{I_{GL}}{I_G + I_{GL}} \quad (2)$$

式中,  $I_{GL}$ 和 $I_G$ 分别代表复合物GL和谷胱甘肽G质谱峰的强度,  $[GL]$ 为复合物GL的平衡浓度。

通过系列质谱图中获得的各种质点的质谱峰的相对强度, 可由式(2)计算出 $a_1$ , 将 $a_1$ 及两种反应物的系列初始浓度代入式(1), 即可计算出谷胱甘肽与Phe, Tyr和Trp复合物的解离常数 $K_d$ 值, 计算结果列于表1~表3。通过计算获得的Phe, Tyr及Trp复合物的相对标准偏差(RSD)分别为3.7, 5.5和4.1。由于本实验采用的是质谱静态滴定法, 即配制一系列已知浓度的反应物混合溶液, 然后用质谱

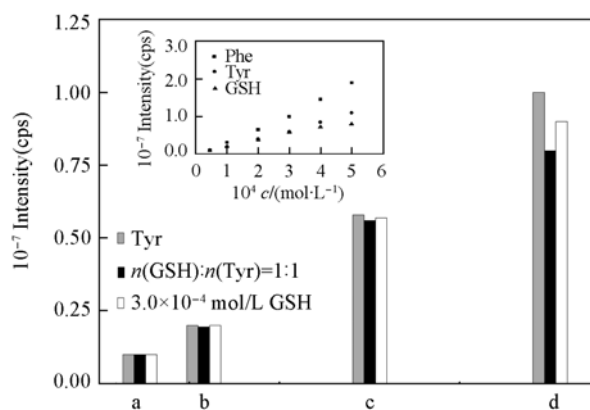


Fig. 3 Quantitative evaluation of interactions of glutathione with tyrosine

$10^4 c(\text{Tyr})/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ : a. 0; b. 1; c. 3; d. 5. Inset: Comparison of ESI-MS signal intensities of  $[M+H]^+$  of Tyr, Tyr in the presence of GSH at a molar ratio of 1:1 or at a fixed concentration of  $3 \times 10^{-4}$  mol/L. Inset presents the dependence of the ESI-MS signal intensities for  $[M+H]^+$  of Tyr, Phe and GSH on concentrations in aqueous solution, respectively. cps represents count per second.

法测定溶液离子化以后的各种质点的质谱强度来计算复合物的解离常数, 所以要获得较好的精密度, 首先必须选好待测反应物的浓度范围, 从而采用质谱信号相对稳定的浓度范围进行测定; 其次必须控制好测定时的温度、压力以及质谱仪器参数等条件. 采用质谱动态滴定法<sup>[14]</sup> 在线 (On-line) 连续进样, 进一步改进实验方法, 以避免因多次配制溶液而引入偶然误差.

**Table 1** Dissociation constant of complex of glutathione with Phe\*

$10^4 [G]_0 / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$10^4 [L]_0 / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$I_G$	$I_{GL}$	$a_1$	$K_{d1} / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$
1.00	1.00	23.1	3.5	0.132	0.570
2.00	1.00	24.2	3.3	0.120	0.551
2.00	0.50	32.0	2.2	0.064	0.540
2.00	0.30	75.2	3.1	0.039	0.533
2.00	0.40	82.0	4.2	0.048	0.590
2.50	0.40	95.2	4.8	0.048	0.553
Average					0.556
SD					0.02
RSD (%)					3.7

\*  $I$  represents the relative ion intensity of different species; SD: standard deviation; RSD: relative standard deviation.

**Table 2** Dissociation constant of complex of glutathione with Tyr\*

$10^4 [G]_0 / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$10^4 [L]_0 / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$I_G$	$I_{GL}$	$a_1$	$K_{d1} / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$
1.50	0.55	85.2	2.6	0.0296	1.65
1.50	1.10	72.1	4.2	0.0551	1.74
1.50	0.77	70.0	2.8	0.0384	1.78
1.50	0.66	65.2	2.6	0.0384	1.50
1.50	0.88	45.0	2.2	0.0466	1.65
1.50	0.99	24.1	1.3	0.0513	1.68
Average					1.67
SD					0.093
RSD (%)					5.5

\*  $I$  represents the relative ion intensity of different species; SD: standard deviation; RSD: relative standard deviation.

**Table 3** Dissociation constant of complex of glutathione with Trp\*

$10^4 [G]_0 / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$10^4 [L]_0 / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$I_G$	$I_{GL}$	$a_1$	$K_{d1} / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$
1.00	1.00	48.1	2.8	0.0551	1.61
2.00	0.80	50.2	2.2	0.0421	1.62
2.00	0.60	55.0	1.8	0.0316	1.63
2.00	0.40	72.1	1.5	0.0204	1.72
2.00	0.20	100.1	1.1	0.0108	1.62
2.00	1.10	70.2	3.9	0.0527	1.78
Average					1.66
SD					0.069
RSD (%)					4.1

\*  $I$  represents the relative ion intensity of different species; SD: standard deviation; RSD: relative standard deviation.

通过比较可见,  $K_{d1}(\text{Tyr}, 1.67 \text{ mmol/L}) > K_{d1}(\text{Trp}, 1.66 \text{ mmol/L}) > K_{d1}(\text{Phe}, 0.556 \text{ mmol/L})$ , 即 Phe 与谷胱甘肽形成的复合物的键合强度比 Tyr 或 Trp 的复合物的要大. 前文<sup>[18]</sup> 曾经报道, 氨基酸和细胞色素 c 非共价结合的作用力主要为氢键, 可以推测 Phe 与谷胱甘肽非共价复合物较大的键合作用原因可能同 Phe 的苯基比 Tyr 或 Trp 具有更小的空间位阻、容易与谷胱甘肽接近并形成氢键有关. 与文献<sup>[18]</sup> 值比较可知, 在相同条件下测得的谷胱甘肽和 *D* 型 Phe 形成的复合物的解离常数  $K_{d1}$  (*D*-Phe, 1.07 mmol/L) 大于谷胱甘肽和相应的 *L* 型氨基酸复合物的解离常数  $K_{d1}$  (*L*-Phe, 0.556 mmol/L). 由此可见, 谷胱甘肽和 *L* 型 Phe 形成的复合物的稳定性要大于谷胱甘肽与相应的 *D* 型氨基酸.

### 2.3 谷胱甘肽和 Phe, Tyr 及 Trp 在溶液中形成的非共价复合物的紫外光谱

紫外光谱 (UV) 作为一种传统的溶液分析测试方法, 具有操作简便、分析快速等优点, 可以作为一种辅助技术定性确认非共价复合物在液相中的生成<sup>[24,25]</sup>, 比较谷胱甘肽和芳香性氨基酸 Phe, Tyr 及 Trp 混合并反应前后吸收曲线的变化, 并判断是否发生化学反应. 在图 4(A) 和 (B) 的紫外光谱中可以

观察到, 在 Tyr 和 Trp 的紫外吸收曲线中, 波长范围 240 ~ 290 nm 出现较强的吸收峰, 可以推测该峰由芳香环的  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁引起的; Tyr 和 Trp 中分别含有具有  $n$  电子杂原子的基团, 如—OH 和—NH, 在接近 200 nm 的位置出现吸收峰, 该吸收峰应该是由  $n \rightarrow \sigma^*$  跃迁引起的。

在图 4(A) 紫外光谱中, 谱线 *a* 和 *b* 分别表示谷胱甘肽和 Phe 的吸收曲线, 谱线 *c* (虚线) 为 Phe 和谷胱甘肽刚混合时按吸收定律加和的计算值 (用作对比), 谱线 *d* 为反应物混合后 1 h 的吸收曲线. 从图 4(A) 中可以看到, 在 190 ~ 300 nm 区域内, 谷胱甘肽没有明显的吸收峰, Phe 的吸收峰在 190 nm 处, 将谱线 *d* 与谱线 *c* 比较后可以看到, 反应后混合物的吸收曲线发生了细微的变化, 即最大吸收峰由 190 nm 偏移到 192 nm, 移动了 2 nm, 与此同时, 吸收峰形状发生了细微的变化. 这一现象说明了将 Phe 和谷胱甘肽混合并反应后, 紫外光谱不是反应物的简单叠加, 而有新的物质生成, 即进一步确认了在液相中两者反应后有 GSH-Phe 复合物生成。

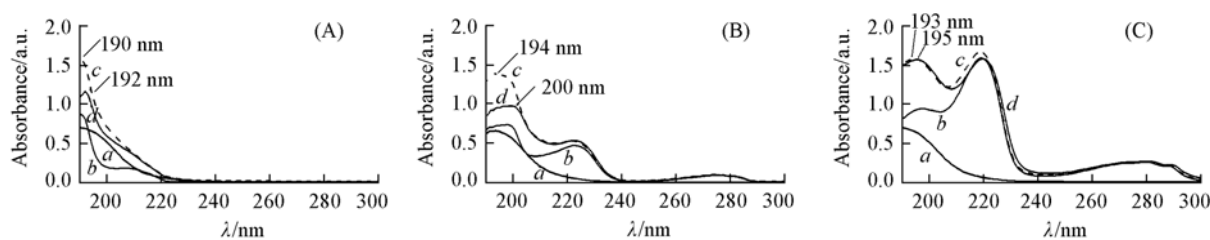


Fig. 4 UV spectroscopies of GSH and mixtures of GSH with Phe(A), Tyr(B) or Trp(C)

*a*. GSH; *b*. Phe(A), Tyr(B), Trp(C); *c*. mixture; *d*. complex.

从图 4(B) 中可以看到, 反应后混合物 (谱线 *d*) 的紫外光谱也不是反应物 GSH 和 Tyr 的简单叠加 (谱线 *c*), 其最大吸收峰由 194 nm 红移到 200 nm, 移动了 6 nm, 与此同时, 吸收峰形状也发生了明显的变化, 它证实了在液相中, Tyr 和谷胱甘肽反应后有复合物生成. 类似地, 在图 4(C) 中, 由谷胱甘肽和 Trp 混合后最大吸收峰由 192 nm 经移到 195 nm, 移动了 3 nm, 同样地, 它也证实了在液相中谷胱甘肽和 Trp 反应后有复合物生成。

## 参 考 文 献

- [1] Fernstrom J. D., Fernstrom M. H. J. Nutrition[J], 2007, **137**(6): 1539s—1547s
- [2] Le Floch N., Seve B. Livestock Science[J], 2007, **112**(1/2): 23—32
- [3] Geer C. B., Stasko N. A., Rus I. A., *et al.* Biomacromolecules[J], 2008, **9**(7): 1876—1882
- [4] ZHANG Fan(张帆), WANG Xi-Mei(王喜梅), DENG Tong-Mei(邓同美). Chinese J. Clinical Hepatology(临床肝胆病杂志)[J], 2006, (01): 58—59
- [5] Huang Z., Pinto J. T., Deng H., *et al.* Biochem. Pharmacol. [J], 2008, **75**(11): 2234—2244
- [6] Dai Z. Y., Chu Y. Q., Wu B., *et al.* Acta Pharmacol. Sin. [J], 2008, **29**(6): 759—771
- [7] HUANG Xin(黄鑫), SONG Feng-Rui(宋凤瑞), LIU Zhi-Qiang(刘志强), *et al.* Acta Chim. Sin. (化学学报)[J], 2008, **66**(9): 1059—1066
- [8] YAN Cun-Yu(闫存玉), YU Biao(俞彪), LIU Shu-Ying(刘淑莹), *et al.* Chin. J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 2008, **36**(7): 910—914
- [9] Chen H. W., Zhang J., Zhang X., *et al.* J. Mass Spectrom. [J], 2007, **42**(8): 1045—1056
- [10] Hou K. Y., Wang J. D., Li H. Y. Rapid Commun. Mass Spectrom. [J], 2007, **21**(22): 3554—3560
- [11] HU Bin(胡斌), CHEN Lan-Hui(陈兰慧), HUAN Yan-Fu(郇延富), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(5): 912—915
- [12] LIU Yue(刘悦), LIU Zhi-Qiang(刘志强), LI Hui-Lin(李慧琳), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(9): 1727—1735
- [13] Yu Z., Cui M., Yan C. Y., *et al.* Rapid Commun. Mass Spectrom. [J], 2007, **21**: 683—690
- [14] Frycak P., Schug K. Anal. Chem. [J], 2007, **79**(14): 5407—5413
- [15] LI Wei, SONG Feng-rui, LIU Zhi-qiang, *et al.* Chem. Res. Chinese Universities[J], 2008, **24**(2): 162—166
- [16] Clark S. M., Konermann L. Anal. Chem. [J], 2004, **76**(23): 7077—7083
- [17] QU Chen-Ling(渠琛玲), ZHANG Han-Qi(张寒琦), ZHANG Hua-Rong(张华蓉), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(9): 1721—1726

- [18] CHU Yan-Qiu(储艳秋), PAN Ting-Ting(潘婷婷), DAI Zhao-Yun(戴兆云), *et al.*. Acta Phys. Chim. Sin. (物理化学学报)[J], 2008, **24**(11): 1981—1987
- [19] PAN Ting-Ting(潘婷婷), CHU Yan-Qiu(储艳秋), ZHOU Ming-Fei(周鸣飞), *et al.*. Acta Chim. Sin. (化学学报)[J], 2008, **66**(22): 2462—2468
- [20] Paizs B., Suhai S. Mass Spectrom. Rev. [J], 2005, **24**(4): 508—548
- [21] LIU Li, ZHAO Xiao-ping, ZHU Di-feng., *et al.*. Chem. Res. Chinese Universities[J], 2008, **24**(4): 420—426
- [22] ZHANG Hua-Rong(张华蓉), ZHANG Han-Qi(张寒琦), WANG Yu-Tang(王玉堂), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(11): 2061—2065
- [23] Zhang H. R., Chen G., Wang L., *et al.*. Int. J. Mass Spectrom. [J], 2006, **252**: 1—10
- [24] BAI Li-Fei(白立飞), ZHANG Hai-Tao(张海涛), ZHANG Han-Qi(张寒琦), *et al.*. Spectrosc. Spect. Anal. (光谱学与光谱分析)[J], 2007, **27**(11): 126—130
- [25] LÜ Na(吕娜), ZHENG Yong-Yong(郑永勇), LI Jian-Qi(李建其), *et al.*. Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 2009, **37**(2): 199—204

## Studies on Non-covalent Complexes of Glutathione with *L*-Aromatic Amino Acids by Electrospray Ionization Mass Spectrometry

CHU Yan-Qiu<sup>1\*</sup>, DAI Zhao-Yun<sup>2</sup>, JIANG Gong-Yu<sup>1</sup>, ZHENG Song-Bai<sup>2</sup>,  
CHEN Xi<sup>2</sup>, DING Chuan-Fan<sup>1\*</sup>

(1. Laser Chemistry Institute, Chemistry Department, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. Huadong Hospital Affiliated with Fudan University, Shanghai 200040, China)

**Abstract** To explore the non-covalent interaction between reduced tripeptide glutathione and *L*-aromatic amino acids, a stoichiometry of reduced  $\gamma$ -glutathione and three *L*-aromatic amino acids, including phenylalanine, tyrosine and tryptophan were mixed respectively, and then incubated at room temperature and physiological pH conditions for 1 h to reach the equilibrium. The electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) results indicate that glutathione and three *L*-aromatic amino acids could form non-covalent complexes, respectively. The primary fragment ions of complexes obtained from MS<sup>2</sup> in a tandem mass spectrometer included aromatic amino acid, glutathione as well as its  $y_2$ ,  $b_2$ , which confirmed the results of ESI-MS. Moreover, in UV spectroscopies, the discrepancy between complexes and reactants also confirmed the formation of complexes in aqueous solution. To avoid distinct ionization efficiency discrepancy and signal suppression in ESI-MS measurements, the interaction between glutathione and *L*-Tyrosine was evaluated quantitatively, which revealed that the reactant concentration should range from  $5 \times 10^{-5}$  to  $3.00 \times 10^{-4}$  mol/L. The dissociation constants of three complexes were determined using mass spectrometric titration method, the calculation results revealed that the stabilities of complexes formed by glutathione and three *L*-aromatic amino acids increased gradually according to the order of tyrosine, tryptophan and phenylalanine.

**Keywords** *L*-Aromatic amino acids; Glutathione; Non-covalent complexes; Mass spectrometric titration method; Dissociation constants

(Ed. : A, G)