

串联质谱法在合成多肽药物结构确证中的应用进展

温学美*,李悦#,陆静(中国医药工业研究总院上海医药工业研究院/创新药物与制药工艺国家重点实验室,上海 201203)

中图分类号 R943;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)20-2876-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.20.27

摘要 目的:综述串联质谱法在合成多肽药物结构表征方面的应用进展,为该类药物的结构表征提供方法参考。方法:以“合成多肽药物”“多肽测序”“串联质谱”“质谱法”“结构确证”“Synthetic polypeptide drugs”“Peptide sequencing”“Tandem mass spectrometry”“Mass spectrometry”“Structure interpretation study”等为关键词,组合查询了2000年1月—2019年1月中国知网、万方、维普、Springer Link、Web of Science、PubMed等数据库中的相关文献,对串联质谱法应用于确证合成多肽类药物结构的研究进展进行归纳与总结。结果与结论:共检索到相关文献192篇,其中有效文献52篇。合成多肽药物主要由氨基酸构成,这类药物在结构确证研究方面与一般药物有所不同。根据目前相关技术指导原则以及有关文献研究,合成多肽药物结构表征的主要内容包括分子量测定、氨基酸组成和序列分析、二硫键分析以及二级结构分析等。近年来,串联质谱法及其与其他方法的结合在合成多肽药物结构确证中应用广泛,成为Edman降解多肽测序法的有效补充,且其因灵敏度高、分析速度快、所需样品量少等优点,已成为确证多肽药物结构的有力工具。

关键词 合成多肽药物;串联质谱法;Edman降解;结构确证

多肽药物是介于大分子蛋白/抗体类药物和小分子药物之间的一类重要的药物分子,因其生物活性高、靶向专一性高、选择性高、毒副作用低等优点而被广泛应用于疾病治疗领域^[1]。近年来,微球、脂质体、聚乙二醇(PEG)修饰等方法的深入应用解决了多肽药物稳定性差、体内易降解、半衰期短等成药性差的问题,促进了多肽药物的开发利用^[2-4]。多项临床前实验和临床研究表明,多肽药物药效广泛,可用于治疗骨质疏松症、糖尿病、前列腺疾病、子宫内膜异位症、肢端肥大、溃疡和甲状腺功能减退等多种疾病^[5-7],未来的商业价值和发展前景巨大^[8-9]。到目前为止,美国FDA已批准了90多种活性多肽药物进入市场^[6,10-11],其中许多获批的多肽是通过化学方法合成的,包括液相合成或固相合成的方法,还有更多的合成多肽药物正处在上市前的研究中^[12]。随着合成多肽药物研发数量的不断增长,对这类药物结构确证方面的研究也在不断开展。目前常用的肽和蛋白质N端测序方法为Edman降解法,但其存在结果不明确、灵敏度低等缺点。例如,色氨酸和半胱氨酸等氨基酸残基因受到背景干扰可能无法检测到,因此Edman降解法难以对微量肽、N-端封闭肽或多肽混合物进行表征。随着测序技术和仪器的发展,串联质谱法已成为一种高效、高灵敏和高通量的肽类测序工具,在合成多肽药物分子结构确证方面发挥了重要作用。笔者以“合成多肽药物”“多肽测序”“串联质谱”“质谱法”“结构确证”“Synthetic polypeptide drugs”“Peptide sequencing”“Tandem mass spectrometry”“Mass spectrometry”“Structure

interpretation study”等为关键词,组合查询了2000年1月—2019年1月中国知网、万方、维普、Springer Link、Web of Science、PubMed等数据库中的相关文献。结果,共检索到相关文献192篇,其中有效文献52篇。现对串联质谱法在确证合成多肽药物结构中的相关应用研究进行综述,以为该类药物的研发提供参考。

1 合成多肽药物结构确证相关技术指导原则及研究内容

1.1 相关技术指导原则

合成多肽药物本质上属于化学药物的范畴,国家食品药品监督管理局(SFDA)于2004年发布的《化学药物原料药制备和结构确证研究技术指导原则》^[13]将多肽药物归于化学药物之中,并对其结构确证的测试方案进行了简要说明。但是合成多肽药物因其结构的特殊性,在制备方法、结构确证、质量研究等方面有其特殊要求,对此美国FDA早在1994年就发布了有关多肽药物的指导原则“Guidance for Industry for the Submission of Chemistry, Manufacturing, and Controls Information for Synthetic Peptide Substances”^[14],但该指导原则于2006年被美国FDA官方撤回。我国SFDA在2007年发布了《合成多肽药物药学研究技术指导原则》^[15],该项指导原则的提出对合成多肽药物结构表征、质量控制等方面的相关研究起到了规范作用。但到目前为止,国内的相关指导原则也未进行相应更新,所以仍缺乏有关合成多肽药物结构确证的官方指南。在国内外现有的相关指导原则以及有关文献研究的基础之上,科学合理地对合成多肽药物结构进行准确表征,对这类药物的研发有着重要意义。

1.2 合成多肽药物结构确证研究内容

一般化学原料药结构确证研究的主要内容包括平面结构、立体结构、晶型及结晶水/结晶溶剂等方面^[13],而

* 硕士研究生。研究方向:药物分析。E-mail: wwxm1996@163.com

通信作者:研究员,硕士生导师。研究方向:化合物结构表征及药物杂质控制。E-mail: liyue13204109@163.com

合成多肽药物分子则更需要在氨基酸组成分析、氨基酸序列分析、二硫键分析等方面进行结构确证研究。

1.2.1 分子量测定 同化学原料药一样,合成多肽药物的结构确证中也包括分子量的测定,一般采用质谱法进行单同位素质量的测定,其质量偏差应在理论值的 ± 1.0 个质量单位内;对于分子量在2 kDa以上的多肽,使用高分辨质谱仪更为合适^[6]。

1.2.2 氨基酸组成分析 氨基酸组成分析可说明多肽的组成是否正确,不仅能证明多肽的结构,还能在一定程度上反映样品的纯度(是否含有合成杂质)。在进行氨基酸组成分析时,要注意考察所涉及各类氨基酸,尤其是非天然氨基酸和氨基酸衍生物的色谱行为,以准确进行定性、定量分析。此外,在该项分析当中应建立合适的水解方法,因为不同的水解条件可能会对某些氨基酸的回收产生较大影响^[7],如pH<3时,谷氨酰胺

(Gln)会经酸催化脱氨而发生水解;而在pH>7时,Gln不易形成六元环,更加稳定。

1.2.3 氨基酸序列分析 与其他分子一样,化学成分的阐明是确定肽同一性的基础,包括阐明氨基酸及其在肽链中的排列顺序,即一级结构/序列。传统氨基酸测序方法为Edman降解法,但该方法一般用来测定N端氨基酸;此外,Edman测序和串联质谱相结合也是目前常用的一种方法,可用于阐明含有二硫键的复杂肽,例如降钙素鲑鱼的一级结构^[7]。采用串联质谱法测定肽序列时通常使用碰撞诱导解离(CID)碎裂技术,但如果序列覆盖度差,应考虑采用其他的质谱碎裂技术^[18-23](见表1)。对于含有20个以上氨基酸残基的长肽,如不能直接确定其序列,可进行多肽肽图的分析,分析过程一般是用专一性较强的蛋白水解酶(一般为肽链内切酶)对多肽进行水解,再用液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)确定各肽段。

表1 生物质谱中重要的质谱碎裂技术

质谱碎裂技术	主要产生的离子类型	常用质谱分析器	适用范围
低能CID	b型和y型离子	通用型质谱仪	氨基酸序列长度较短的、带2个或3个电荷为主的肽段
高能CID	所有的序列特征离子	通用型质谱仪	氨基酸序列长度较短的、带2个或3个电荷为主的肽段
高能碰撞解离技术(HCD)	b型和y型离子	轨道离子阱质谱仪	被广泛用于蛋白质翻译后修饰的研究
基于电子诱导的电子捕获解离技术(ECD)	c型和z型离子	傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(FT-ICR-MS)	氨基酸序列长度较长的、带3个及以上电荷为主的肽段
电子转移解离技术(ETD)	c型和z型离子	离子阱型的质谱仪	氨基酸序列长度较长的、带3个及以上电荷为主的肽段

1.2.4 二硫键分析 正确的二硫键数目和位置是多肽和蛋白质产生生物活性的结构保证,在对合成或天然多肽产品研究的过程中,二硫键的分析是需要考察的重要内容之一。合成多肽药物分子中如含有二硫键,一般先采用还原试剂如二硫代硫醇(DTE)、二硫苏糖醇(DTT)或三(2-羧乙基)膦(TCEP)对这类药物进行还原,然后进行质谱分析,通过比较还原前后的质量差可确定其含有的二硫键数目。其中,对含有多对二硫键的多肽还应该对其二硫键进行定位分析。部分还原是一种被广泛接受的定位二硫键的方法,在这种方法中,多肽在可控的条件下被消解,从而使不同还原动力学的二硫键被还原,再经串联质谱分离和分析,即可完成二硫键的定位。

1.2.5 二级结构分析 含有40个氨基酸以上的肽通常表现出高度的构象灵活性,其特征主要是随机螺旋和一定程度的二级结构(如 α 螺旋和/或 β 折叠)。结构的有序性可能对某些肽的生物活性有重要影响^[24],因此二级结构的阐明也是多肽结构表征的一部分。一般常用圆二色谱(CD)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)、核磁共振(NMR)、X射线晶体学、拉曼光谱和荧光光谱等方法对多肽药物的二级结构进行分析。例如,阮进成等^[25]通过体外折叠体系折叠化学合成抗菌肽Plectasin,经过高效液相色谱(HPLC)分离纯化之后采用CD进行二级结构鉴定,发现未折叠分子只具有 α 螺旋结构,外折叠的Plectasin具有 α 螺旋及反平行 β 折叠结构。高铮亚^[26]采用FT-IR法研究了可溶性鸟苷酸环化酶血红素结构域蛋白质的二级结构,发现在亚基单独的血红素结构域蛋白(hs-

GC α_{2H})及通过link连接的异源二聚血红素结构域蛋白(hsGC β_{1H-2H})中 α 螺旋结构的含量相对较高,但其重组后 α 螺旋结构含量有所降低, β 折叠结构相对升高,这一发现与CD法测得的结果相近。

结合目前已有合成多肽药物结构确证的相关技术指导原则以及有关研究文献,合成多肽药物结构表征的主要内容有分子量测定、氨基酸组成和序列分析、二硫键分析以及二级结构分析等,具体的研究内容可结合研究对象的具体结构而有所侧重。

2 串联质谱法在合成多肽药物结构确证中的应用

串联质谱是时间上或空间上两级以上质量分析的结合,用以测定第一级质量分析器中的前体离子(Precursorion)与第二级质量分析器中的产物离子(Producticm)之间的质量关系^[27]。软电离技术的发展和采用新技术的质量分析器的研发,进一步推动了串联质谱在多肽药物结构确证方面的研究应用。

2.1 串联质谱法在合成多肽药物结构确证方面的应用

2.1.1 常规电喷雾离子源串联质谱法(ESI-MS/MS)

在电喷雾质谱中,肽段经惰性气体碰撞而诱导裂解可产生稳定的N端系列a、b、c型离子和/C端系列x、y、z型离子(主要是b、y型离子),根据碎片离子间的质量差可以推断出多肽的氨基酸序列^[28]。相比于Edman降解测序法,ESI-MS/MS可用于分析N端封闭和经修饰的多肽^[29]。周红华等^[30]应用电喷雾质谱法(ESI-MS)及源内CID对胸腺五肽(TP5,人工合成五肽)进行测定,得到质荷比(m/z)680.3的[M+H]⁺峰, m/z 702.2的[M+Na]⁺峰等

相关加和峰,这些数据与TP5的理论相对分子质量679.4相符;并得到了TP5的系列碎片离子(主要是b型离子),通过解析碎片离子,最终确定了其氨基酸序列(从N端到C端)为:精氨酸-赖氨酸-天冬氨酸-缬氨酸-酪氨酸(RKD VY)。周红华等^[31]的另一项研究应用ESI-MS及源内CID技术对多肽类药物醋酸亮丙瑞林(人工合成九肽)进行了测定,结果测得其分子量与理论值一致;并通过分析得到的b、y型碎片离子,证实了亮丙瑞林的氨基酸序列。周红华等^[32]又应用ESI-MS及源内CID技术分析了曲普瑞林(人工合成十肽)和促黄体素释放激素类似物(人工合成九肽)的氨基酸序列,结果,这两种寡肽在正离子模式下均可得到较好的质谱信息,且均得到了其准分子离子峰[M+H]⁺及[M+Na]⁺信号峰,分子量分别与各自理论值一致;又通过分析得到的一系列典型的b、y型碎片离子,从而确证了这两种寡肽的一级结构。张冬梅等^[33]采用电喷雾-四极杆-飞行时间串联质谱法(ESI-Q-TOF-MS/MS)测定了磷酸化修饰后的5种模型肽的氨基酸序列,该方法很好地区分了m/z相近的赖氨酸和谷氨酰胺氨基酸残基,提高了质谱测序的准确度。

既往研究显示,环孢菌素类化合物(环状十一肽)的氨基酸序列信息丰富、差异性大,可利用ESI-MS/MS对该类化合物进行快速的初步鉴定。例如,陈振伟等^[34]应用电喷雾离子化多级质谱法分析了CsA、CsB、CsC、CsD 4种环孢菌素同系物,在m/z 50~1 400范围内进行多级扫描,分别得到了这4个样品的三级质谱图。其中,一级质谱图中主要是这4种同系物的[M+H]⁺分子离子,二级和三级质谱图中主要是[M+H]⁺经CID得到的一系列碎片离子(以b型离子为主)。对比分析所得质谱图发现,这4种环孢菌素同系物主要裂解位点在2-3位间、1-11位间、5-6位间;而分析[M+H-H₂O]⁺峰可以进一步确定环孢菌素中的氨基酸序列。该研究表明,该方法简便、准确,可用于这类化合物的快速鉴别。方剑英等^[35]应用ESI-MS/MS分析了9个环孢菌素类化合物经强酸水解后的产物,获得了这9个化合物一些组成氨基酸的特征分子离子峰,结果发现1位上特殊的氨基酸的分子离子峰特征明显。该研究表明,与已知的方法相比,该方法可在无对照品的情况下,快速准确地鉴别环孢菌素类化合物。

2.1.2 纳升电喷雾串联质谱(Nano-ESI-MS/MS) 常规电喷雾技术的耗样量大,而纳升电喷雾技术因其喷雾头口径小,使得样品分子的去溶剂化和离子化效率大大提高,故其已经越来越广泛地运用于生物大分子的分析鉴定中^[36]。李萍等^[37]加入还原剂DTT将奥曲肽(人工合成八肽)中的二硫键打开,采用Nano-ESI-MS/MS测得还原前奥曲肽相对分子量为1 019.450 2,与理论分子量的相对误差为1.9 ppm;测得还原后奥曲肽相对分子量为1 021.456 7,还原前后的相对质量差为2 Da,由此确定奥

曲肽中存在一对二硫键。在一级质谱图中确定完全打开二硫键之后,选定了m/z 511.21的双电荷峰进行二级质谱分析,通过调节合适的碰撞能量得到了系列碎片离子峰,借助相关软件标识出y型离子,解析后最终确定了奥曲肽一级结构的氨基酸序列。梁艳等^[38]利用Nano-ESI-MS/MS通过全扫描模式测得阿托西班还原前样品[M+H]⁺离子峰的m/z为994.448 7,与理论值994.449 0的相对偏差为0.4×10⁻⁶,从而确认阿托西班样品的分子量是正确的;使用DDT还原后测得样品[M+H]⁺m/z为996.4,还原前后的质量差为2 Da,确定该样品中存在1对二硫键;在确定阿托西班的二硫键完全打开后,选择了m/z 498.73的双电荷峰为母离子进一步进行ESI-MS/MS分析,通过y型离子解析二级质谱图后确定了阿托西班一级结构的全序列并对其4个修饰位点(分别位于N端、C端和侧链上)进行了确证。结果表明,该方法灵敏度高、速度快,在多肽类药物一级结构分析方面具有独特的优势。

2.1.3 基质辅助激光解吸-飞行时间串联质谱法(MALDI-TOF/TOF-MS) MALDI-TOF/TOF-MS具有样品不易碎裂、分子离子峰强等明显优点,可快速测定生物大分子和高分子的分子量,在生物学等领域应用广泛^[39]。例如,桑志红等^[40]应用MALDI-TOF-MS测得使用DDT还原后的重组蛋白纽兰格林(rhNRGL)准分子离子峰[M+H]⁺m/z为7 051.185 5,与其理论值的偏差为5.57×10⁻⁶;分别选择m/z为880.538、1 043.617、1 277.732的碎片离子作为母离子,设定离子门窗口为6 Da,调节合适的质谱参数,使用BioTools软件分析二级质谱图,并手动及自动标注氨基酸序列,确证了重组蛋白纽兰格林C端序列的10个氨基酸序列。

2.1.4 多种方法结合 肽类药物一般要经过合理的化学修饰,以最大限度地提高其稳定性和生物利用度,同时保持甚至提高生物活性肽的作用和选择性,这也给串联质谱法的测序带来了一定的困难,所以有时需要综合使用多种技术进行结构确证。例如,薛燕等^[41]使用DTT还原重组人纽兰格林(rhtNRGL)中的二硫键,采用四极杆-傅里叶变换离子回旋共振串联质谱法(Q-FT-MS/MS)测定rhtNRGL还原前后的精确相对分子量,计算质量差,从而确定了分子中的二硫键数目;采用MALDI-TOF/TOF-MS测定rhtNRGL的N端的5个氨基酸序列;采用ESI-MS/MS测定rhtNRGL的C端的11个氨基酸序列;采用Tyrsin和Glun-C两种蛋白酶对样品进行酶解后,经MALDI-TOF-MS检测获得该样品的肽质量指纹图谱,计算得到两种酶切肽谱的序列覆盖率分别为82%和64%,经过分析确证主成分二硫键配对正确,同时发现少量错配二硫键异构体。依替巴肽N端是脱氨基半胱氨酸,用串联质谱法测定其氨基酸序列时存在一定的困难,为此厉保秋等^[42]采用ESI-MS/MS证实了依替巴肽的相对分子量及肽链环化结构,结合核磁共振氢谱

(¹H-NMR)分析,发现测得的化学位移可以与其已知结构较好地对应,从而进一步对依替巴肽的一级结构进行了确证。可见,多种分析技术相结合已成为复杂肽或长肽结构确证较常采用的分析手段。

2.2 图谱处理及分析

串联质谱法测定多肽序列时,所得到的质谱图既可以手动进行分析,也可以通过仪器提供的相关软件进行分析。具体的谱图处理及分析方式要结合所分析样品的结构、所采用的分析仪器以及具体的实验情况决定。

2.2.1 手动分析 经典的氨基酸质谱测序方法是在碎裂谱图中观察这些离子,通过计算质量差来反推多肽序列^[43-45]。例如,盛龙生等^[46]应用基质辅助红外激光解吸质谱法(IR-MALDI/FTMS)分析九肽药物促黄体素释放激素类似物(LRH-A),获得了样品的相关碎片离子信息,并手动分析了所得到的系列碎片离子,根据相关碎片离子之间的质量差确定了氨基酸残基的连接方式。

2.2.2 借助相关软件分析 随着串联质谱从头测序软件(如PEAK、SMSNovo、RAID、UniNovo、Novor等)的开发^[47],研究人员在进行结构确证时可不依赖于已知数据库,在快速鉴定多肽序列同时还可以指定翻译后修饰位点^[48-49],这也使得串联质谱法成为多肽药物结构确证研究的首选方法之一。一些公司也推出了匹配串联质谱仪器的商业软件,例如梁艳等^[38]对还原后的阿托西班牙样品进行ESI-MS/MS分析,用仪器上匹配的MaxEnt 3软件对获得的二级质谱图进行处理,借助于MasSeq软件标识出y型离子,从而可以解析m/z为98.73的肽段所对应的氨基酸序列,并利用MasSeq软件中的编辑功能最终确证了阿托西班牙的一级结构。王红霞等^[50]用纳升电喷雾四极杆-飞行时间串联质谱分析了亮丙瑞林及EPD等样品,分别获得其二级质谱图,经仪器上匹配的MaxEnt软件转化、结合MasSeq软件及其中的编辑功能推导出了样品的多肽序列。

由此可见,串联质谱法在合成多肽药物结构确证中的应用广泛,不同的串联质谱有其不同优点,可结合分析对象的结构灵活选择合适的方法;对获得的有关质谱图进行解析也随着相关软件的开发及多种数据库的建立而越来越简便。

3 结语

为了提高药效、延缓半衰期、降低副反应或改善其稳定性,很多新的多肽药物往往都要进行相关的化学修饰^[51-52]。目前常用的Edman降解法主要是用于测定N端不含有封闭及修饰氨基酸的多肽分子,而质谱法则适用于对Edman降解法无法分析的多肽药物,是一种强大的肽测序工具。虽然串联质谱测序存在有时难以区分m/z相近的氨基酸残基、部分离子缺失、内部或侧链断裂产生复杂的碎片离子,给图谱解析带来困难等缺点,但随着相关分析软件的不断完善及衍生化质谱技术的不断发展,质谱法在分析复杂的多肽药物分子及混合肽的结构中显示出了明显优势。质谱法或质谱法与其他分析

方法的结合将越来越多地运用在合成多肽药物结构表征的研究方面。

参考文献

- [1] 王凤亮.非天然氨基酸在构象锁定多肽合成中的应用[D].北京:中国科学技术研究院,2016.
- [2] 王姗.热敏凝胶用于多肽与蛋白药物的研究进展[J].中国新药杂志,2014,23(19):2266-2270.
- [3] 程念.多肽药物长效化研究进展[J].中国新药杂志,2016,25(22):2574-2580.
- [4] 胡玉玺,蒋煜,韩天娇.制备工艺和过程控制对合成多肽药物有关物质的影响[J].中国新药杂志,2017,26(18):2143-2148.
- [5] DU QS, XIEN Z, HUANG RB. Recent development of peptide drugs and advance on theory and methodology of peptide inhibitor design[J]. *Med Chem*, 2015, 11(3): 235-247.
- [6] VLIEGHE P, LISOWSKI V, MARTINEZ J, et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market[J]. *Drug Discov Today*, 2010, 15(1/2): 40-56.
- [7] CRAIK DJ, FAIRLIE DP, LIRAS S, et al. The future of peptide-based drugs[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2013, 81(1): 136-147.
- [8] AYOUB M, SCHEIDEGGER D. Peptidedrugs, overcoming the challenges, growing business[J]. *Chem Today*, 2006, 24(3): 46-48.
- [9] 聂彩辉,徐寒梅.多肽药物的发展现状[J].药学进展,2014,38(3):196-202.
- [10] DANHO W, SWISTOK J, KHAN W, et al. Opportunities and challenges of developing peptide drugs in the pharmaceutical industry[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 611(88): 467-469.
- [11] 王克全,徐寒梅.多肽类药物的研究进展[J].药学进展,2015,39(9):642-650.
- [12] 孙立春.多肽药物的研究进展[J].新药研发,2014,35(5):55-60.
- [13] 国家食品药品监督管理局.化学药物原料药制备和结构确证研究技术指导原则[S].2004-03-21.
- [14] FDA. *Guidance for industry for the submission of chemistry, manufacturing, and controls information for synthetic peptide substances*[EB/OL]. (1994-11-01)[2019-03-22]. <https://www.fda.gov/drugs/guidancesdrugs/withdrawn-guidances-drugs>.
- [15] 国家食品药品监督管理局.合成多肽药物药学研究技术指导原则[S].2007-10-23.
- [16] ALEKSANDER S, HAROLD R, ANITA S, et al. Control strategies for synthetic therapeutic peptide APIs: part I: analytical consideration[J]. *Bio Pharm Inter*, 2014, 27(3): 16-21.
- [17] LARISA C, WU FU, CHEN SAU, et al. Building parity between brand and generic peptide products: regulatory and scientific considerations for quality of synthetic peptides[J]. *Inter J Pharm*, 2017, 518(1/2): 320-334.

- [18] XU H, ZHANG LW, FREITAS MA. Identification and characterization of disulfide bonds in proteins and peptide from trandem MS data by use of the MassMatrix MS/MS search engine[J]. *Proteom Research*, 2008, 7(1):138-144.
- [19] 林琳, 罗树生, 王灵珏, 等. 色谱与质谱联用技术在蛋白质翻译后修饰研究中的进展及应用[J]. *分析化学*, 2015, 43(10):1479-1489.
- [20] 王翌, 孙伟. 碰撞诱导解离和高能碰撞解离方式进行蛋白质组学分析的比较[J]. *质谱学报*, 2016, 37(2):140-145.
- [21] 孙瑞祥, 董梦秋, 迟浩, 等. 基于电子捕获裂解/电子转运裂解串联质谱技术的蛋白质组学研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37(1):94-102.
- [22] SANGTAE K, NIKOLAI M, NUNO B, et al. The generating function of CID, ETD, and CID/ETD pairs of tandem mass spectra: applications to database search[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(12):2840-2852.
- [23] 郭成. 质谱分析蛋白质裂解的特征离子的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2018.
- [24] 枚春成. 二级结构对抗菌肽的抗菌活性及特异性的影响[D]. 吉林: 吉林大学, 2013.
- [25] 阮进成, 叶跳菲, 荆许恩, 等. 抗菌肽 Plectasin 的新型体外折叠方法与活性鉴定[J]. *药物生物技术*, 2018, 25(4):316-318.
- [26] 高铮亚. 水溶液中蛋白质二级结构红外分析方法的建立及受体蛋白构象研究[D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- [27] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 431.
- [28] HARRISO N, ALEX G, YOUNG AB, et al. Scrambling of sequence information in collision-induced dissociation of peptides[J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(32):1034-1036.
- [29] 王红霞, 李萍, 何家田, 等. 人肝癌细胞系 HLE 细胞表面抗原多肽的纳升电喷雾串联质谱从头测序分析[J]. *分析化学*, 2006, 34(7):915-918.
- [30] 周红华, 马仁玲, 黄海燕, 等. 胸腺五肽一级结构的电喷雾质谱分析[J]. *西北药学杂志*, 2004, 19(6):243-244.
- [31] 周红华, 马仁玲, 盛龙生, 等. 醋酸亮丙瑞林一级结构的电喷雾质谱分析[J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34(3):244-246.
- [32] 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.
- [33] 张冬梅, 刘红霞, 毕开顺, 等. 基于生物质谱技术的磷酸化修饰策略在多肽测序中的应用[J]. *分析测试学报*, 2010, 9(9):900-905.
- [34] 陈振伟, 温耀明, 季新燕, 等. 电喷雾离子化多级质谱解析环孢菌素结构[J]. *中国抗生素杂志*, 2007, 32(6):350-354.
- [35] 方剑英, 方东升, 陈秀明, 等. 电喷雾离子化质谱分析环孢菌素的组成氨基酸[J]. *海峡药学*, 2007, 19(12):34-36.
- [36] 许雪姣, 翟建军, 水雯箐, 等. 辅助电极对纳升电喷雾影响的研究[J]. *高等学校学报*, 2004, 25(4):627-629.
- [37] 李萍, 薛燕, 王鸿丽, 等. 纳升电喷雾串联质谱对奥曲肽一级结构的确证[J]. *军事医学科学院院刊*, 2007, 31(3):254-267.
- [38] 梁艳, 赵庆国, 刘炳玉, 等. 纳升电喷雾串联质谱法确证阿托西班的一级结构[J]. *分析化学*, 2009, 37(4):602-604.
- [39] 陈友存, 陈文章, 刘光祥. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱用于高分子端基修饰反应的监控[J]. *分析化学*, 2003, 31(1):127-128.
- [40] 桑志红, 刘炳玉, 李萍, 等. 应用基质辅助激光解吸质谱的源内衰变及串联质谱技术测定重组人纽兰格林的 C 端序列[J]. *军医进修学院学报*, 2011, 32(9):947-948.
- [41] 薛燕, 刘炳玉, 李萍, 等. 重组人纽兰格林二硫键分析[J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(8):1302-1305.
- [42] 厉保秋, 杨桂芹, 王红霞, 等. 依替巴肽一级结构的确证[J]. *药物分析杂志*, 2007, 27(7):961-964.
- [43] BELA P, MICHAEL VAN S. Focus issue on peptide fragmentation[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008, 19(12):1717-1718.
- [44] YOSHITOMO H, JUSTINE CT, STEPHEN JC. A simple test to detect hydrogen/deuterium scrambling during gas-phase peptide fragmentation[J]. *Anal Chem*, 2008, 80(17):6785-6790.
- [45] FALTH M, SAVITSKI MM, NILSEN ML, et al. SwedCAD, a database of annotated high-mass accuracy MS/MS spectra of tryptic peptides[J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(10):4063-4067.
- [46] 盛龙生, 周红华, 郭寅龙, 等. 寡肽 (LRH-A) 分子量及一级结构的基质辅助红外激光解吸质谱分析[J]. *中国药科大学学报*, 1996, 27(12):730-733.
- [47] TRAN NH, ZHANG X, XIN L, et al. De novo peptide sequencing by deep learning[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2017, 114(31):8247-8252.
- [48] 孙汉昌, 张纪阳, 刘辉, 等. 串联质谱图谱从头测序算法研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37(12):1278-1288.
- [49] 莫凡. 蛋白质组学质谱数据分析的新方法研究开发[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [50] 王红霞, 何昆, 李卫华, 等. 部分结构特殊多肽的纳升电喷雾串联质谱测序分析[J]. *军事医学科学院院刊*, 2003, 27(1):36-39.
- [51] 李治国, 高静, 郑爱萍. 提高蛋白质、多肽类药物稳定性的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2017, 44(11):1069-1074.
- [52] PATRICK V, VINCENT L, JEAN M, et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market[J]. *Drug Discov Today*, 2010, 15(1/2):40-56.

(收稿日期:2019-06-20 修回日期:2019-09-11)

(编辑:孙冰)