

电喷雾质谱新方法及在生命分析化学中的应用*

罗国安** 梁琼麟 王义明 曲峻

(清华大学分析中心 北京 100084)

摘要 电喷雾质谱是目前应用最广泛的生物质谱技术之一。复杂生物基质对质谱分析的选择性和准确性提出挑战,迫切需要在质谱方法学上有所发展。本文介绍具有广泛应用前景的几种电喷雾质谱新方法的原理和特点及若干应用实例,对生物质谱的发展趋势和在生命分析化学中的应用前景进行展望。

关键词 电喷雾 质谱 生命分析化学 生物质谱

生命分析化学是一门新的交叉学科,它的着重点是在于为生命科学研究提供高效、快速、简便、准确的分析手段,综合运用来解决生命科学中的重大问题¹。生命分析化学所面临的分析对象都是生物样品,如组织提取液、血液、尿液等等,如何在复杂的基质中高灵敏度、高选择性、高准确地分析待测组分,是生命分析化学需要解决的关键技术问题。生物质谱及其与色谱联用方法被认为是当今最强大的混合物分析技术之一,在生命分析化学中有着广泛的应用。生物质谱技术的发展得益于电喷雾离子化(ESI)和基质辅助激光解析离子化(MALDI)技术的发展,MALDI技术主要应用于蛋白质等生物大分子的分析,ESI技术既可应用于大分子分析也可应用于小分子分析,目前ESI是色谱质谱联用最常用的离子化方式。本文介绍几种电喷雾质谱新方法及其应用实例,为生物质谱技术的新方法开发和应用提供参考。

1 能量梯度扫描中性丢失串联质谱法(EG-NLS)²

在生命分析领域经常希望对未知样品中的某一类化合物进行快速全面的筛查,例如考察样品中含某一类成分的情况或者某一类疾病的筛查。EG-NLS法为解决这一问题提供一种创新的方法。该方法的建立首先基于CAD下质谱反应最佳碰撞能量(OCE)的稳定性,并发现OCE数值与化合物结构的相关性。通过研究17种代表性苷类(黄酮类、萜醌类、蒽类和其杂类如芪类等母核所形成的苷类)的CAD行为,发现不同结构的苷类表现出特异而稳定的OCE数值,例如非芳香性的苷类OCE一般在55

~65eV而芳香性的苷类OCE一般在19~30eV,较小的非芳香性的苷类的OCE往往比较大的芳香性苷类更高(见图1)。这一实验结果显示化合物的结构是决定OCE的主要因素并且OCE对化合物结构具有特异性。因此,EG-NLS方法可以用来区分芳香性和非芳香性的苷类。而且,实验发现,每个离子的强度-能量离子流图峰宽、峰形相当重现,这也可能作为另一个定性的指标。另外,在CAD能量25eV下,大部分非芳香性苷类均不可见,而在60eV下,大部分芳香性苷类也不可见。因此,若使用普通的固定能量中性丢失扫描分析这个混合物,很容易丢失重要的化合物。

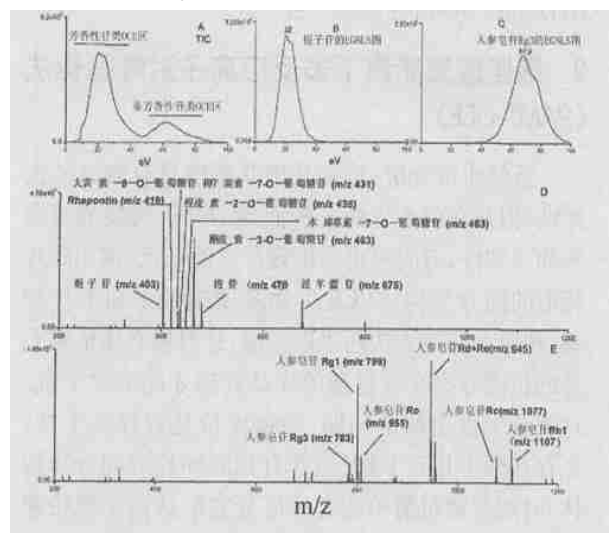


图1 17种代表性的一次扫描的EG-NLS图(丢失162)

A. 总离子流图;B. 槲子苷的提取离子流强度-能量图;C. 人参皂苷Rg3的提取离子流强度-能量图;D. 在CAD碰撞能量25eV下提取的一张质谱图;E. 在CAD碰撞能量60eV下提取的一张质谱图。

*基金资助:国家973项目(2001CB510306)和科技部十五攻关项目(2004BA721AB)资助。

**作者简介:罗国安,男,教授,研究领域为生命分析化学。luoga@mail.tsinghua.edu.cn

与一般的中性丢失扫描方法不同,EGNLS 不使用一个固定能量而是建立一个能量梯度对复杂生物样品进行快速连续的扫描,从而在能量梯度扫描谱图上达到对不同结构化合物的迅速分离。然后根据需要使用 LC/MS/MS 对发现和分离的目标化合物进行进一步的分析。EGNLS 方法的优点是:(1)因不同化合物在同样 CAD 条件下会有不同的 OCE,通常的固定能量中性丢失扫描方法容易丢失目标化合物;而 EGNLS 扫描过一个能量的梯度,从而避免这种情况的发生;(2)利用 EGNLS 不仅可以快速寻找生物样品中某一类化合物,而且通过不同类型化合物的 OCE 对找出的未知化合物进行分离,并得到未知化合物在结构方面的进一步信息。(3)在找出未知化合物的同时,测定出其 OCE 数值和母/子离子对信息,利用这些信息,无需优化 MS/MS 条件即可直接进行进一步的 LC/MS/MS 分析。

利用 EGNLS 方法,分别对一些未知植物样品(如稀有产地的黄芩和生物技术制造的杂交人参须根)中的苷类进行快速分析,无需复杂的植物化学分离提取,直接分析生物基质样品,即得到有效成分苷类的组成和比例等信息²。另外,通过对照分析已知的黄芩和人参植物,证明 EGNLS 方法还可以用苷类相对比例来快速鉴定同属植物,并与充分分离的 HPLC/MS/MS 研究结果一致^{3,4}。

2 最佳碰撞能量下多反应离子对峰面积法(PAMT-OCE)

虽然质谱分析,特别是串联质谱具有较高的选择性,但是在由于生命分析面临的分析对象的复杂性和未知性,有时候也会出现严重的干扰,例如碎片相似的同分异构体以及生物基质中的未知干扰物等,现有的质谱方法还难以克服,这时候必须依赖充分的色谱分离或者复杂的样品处理才能消除干扰。这就至少提出两个问题,如何评价是否存在干扰?在存在两个相互干扰(如含有相同碎片的同分异构体)时能否通过简单的方法区分它们从而实现快速分析?最佳碰撞能量下多反应离子对峰面积法(PAMT-OCE)提供一种参考的方法。

一般认为,电喷雾串联质谱碰撞活化解离(CAD)得到的碎片强度是不稳定的,随着碰撞能量、离子化条件的变化,子离子碎片种类和丰度也随之显著变化,因此,与 EI 固定能量图谱不同,ESI 质谱 CAD 谱图很难进行相对丰度比较。基于前面 OCE 稳定性的基础上,研究几十种模型化合物在 ESI 串

联质谱中的 CAD 行为,每种化合物可能存在丰度较大的多个子离子,采用多反应监测(MRM)模式,选择多个质谱反应在各自的 OCE 下考察其峰面积(Peak Area of Multiple Transitions),结果发现其相对强度非常稳定^{5,6},而且这种稳定性与样品所处的基质复杂程度无关,多个子离子流的相对峰面积比 RSD 一般在 5% 以内。这种稳定性需要满足的条件是:(1)每个子离子的离子流都在 OCE 下获得;(2)离子的相对丰度不低于 2%;(3)强度最小的离子流信噪比大于 10。作者认为产生此稳定性的原因有两个方面:(1)CAD 反应在其 OCE 附近有一个强度相对稳定区;(2)一个离子的 CAD 反应特性只与质谱条件和离子本身特性有关,与离子进入离子源之前的历史无关。

利用这个特性可以显著提高串联质谱化合物定性的可靠性,采用 PAMT-OCE 方法判断串联质谱分析的结果是否存在干扰,并且可以在不分离的情况下高速鉴定、分辨其子离子基本相同的同分异构体,甚至可对两种共流出的同分异构体进行定量分析,RSD 在 10% 以内,回收率在 90%~110%⁶,而这是普通 MS/MS 方法所不能做到的。例如,在不到 1min 的分析时间内,成功的分辨几对同分异构体亮氨酸和异亮氨酸,人参皂苷 Rg1 和 Rf,甚至手性异构体麻黄碱和伪麻黄碱等,而通常方法需要 20~40min 色谱分离的 LC/MS/MS 来区分这些异构体。与 HPLC 方法和常规的 LC/MS/MS 方法相比,本方法具有高准确性、高通量、可直接测定复杂基质样品、无需前处理的优点,而且可以大大减少“假阳性”结果出现。此方法可以应用于制药、生物、环境领域中的大规模、准确、快速的化合物筛查。

3 挥发性离子对反相色谱-串联质谱法(VIP-HPLC/MS/MS)

LC/ESI-MS/MS 在应用中,往往 HPLC 的分离效能大大低于常规 HPLC。主要原因是应 MS/MS 对离子化的要求,常规的流动相改性剂多不能应用于 LC/MS/MS 中,从而大大限制 LC/MS/MS 的选择性。因此作者提出挥发性的流动相改性剂 LC/MS/MS 方法,研究使用挥发性的流动相改性剂提高 LC/MS/MS 的色谱部分分离效能,同时不损害 ESI 离子化的效能,提高 LC/MS/MS 解析复杂生物样品的能力。以复杂生物样品中氨基酸的非衍生化分析为例,对此方法进行应用^{7,8}。

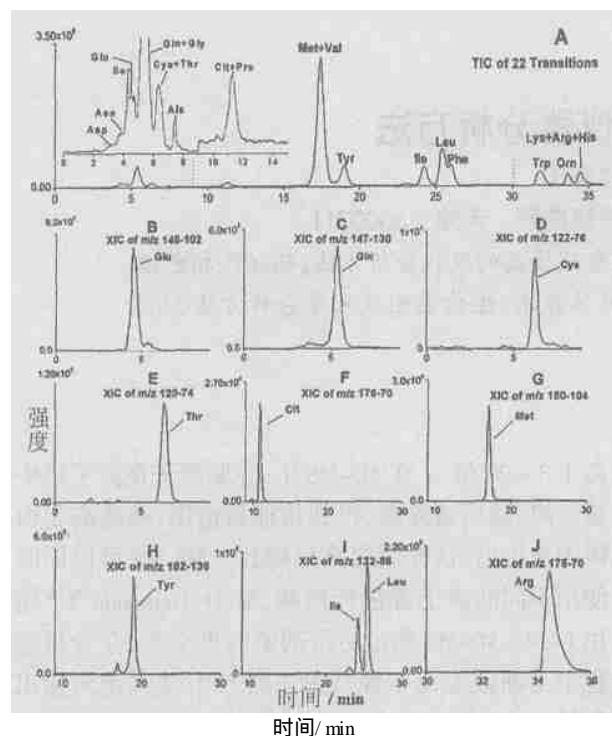


图2 LC/MS/MS定量分析人血清中22种非衍生氨基酸(AA)离子流色谱图

A. 总离子流图; B. ~ (J) 代表性的提取离子流图。前9min同时监测9种AA; 接下来21min监测8种AA; 最后6min监测5种AA。

由于氨基酸的特殊性质,很难在反相柱上用常规方法得到很好的分离,而且多数缺乏发色团,不能直接用UV等检测。MS/MS可作为潜在的未衍生氨基酸检测器,但因ESI离子化的要求,目前分离未衍生氨基酸的手段无法与MS/MS直接相连。故此目前测定复杂体系中的多种氨基酸一般对其衍生以提高其分离、检测性能,但衍生化的缺点是费时费力而且损害准确性。使用两种全氟长链有机酸(PFHA和PDFOA)作为流动相改性剂,首次实现在反相柱上对22种未衍生氨基酸的有效分离,并结合多对反应监测(MRM)-氨基酸特有的中性丢失(-46)作为检测手段和稳定同位素稀释法作为定量手段,首次实现直接定量血液样品中的22种未衍生化的主要氨基酸(见图1)⁷,这可以说是氨基酸分析方法的一大进步。本方法也可应用于发酵液中的氨基酸非衍生化快速分析⁸。

4 展望

生物质谱是生命分析化学的关键技术之一,广泛应用于生物医学研究、临床检验、药物分析等生命科学领域,例如血清中生物标志物的快速检测⁹,遗传性代谢缺陷疾病的快速筛查^{10,11},中药研究^{3,4,12}和药物的体内分析¹³等。近年来,蛋白质组学和代谢

物组学成为生命科学的研究热点,但目前的瓶颈问题仍然是技术和方法问题。近20年来生物质谱技术发展非常迅速,目前已经成为蛋白质组学研究的核心技术,在刚刚兴起的代谢物组学的研究中也显示突出的优势。正如人们所说的“21世纪是生命科学的世界”,与此相对应,必然带动生命分析化学的快速发展。从目前生命分析化学的发展现状和趋势看,几个前沿领域和要解决的关键科学问题,包括生物大分子分析(如蛋白质组),小分子分析(如代谢物组,药物小分子等),以及小分子与大分子的相互作用(如化学生物学研究),而生物质谱具备上述各个领域应用的潜力,必将在生命分析化学的发展中发挥更大的作用。

参考文献

- 1 罗国安,梁琼麟,王义明. 生命分析化学展望,药物分析杂志,2004,24(1):100~105
- 2 Qu J, Liang QL, Luo GA, Wang YM. Screening and identification of glycosides in biological samples using energy - gradient neutral loss scan and liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal. Chem. 2004, May, 76(9):2239~2247
- 3 Qu J, Wang YM, Luo GA. Determination of scutellarin in Erigeron breviscapus extract by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry. J. Chromatogr. A, 2001, 919:437~441
- 4 Qu J, Wang YM, Luo GA, et. al. Identification and determination of glucuronides and their aglycones in Erigeron breviscapus by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry. J. Chromatogr. A, 2001, 928:155~162
- 5 孙萍,罗国安,曲峻. 串联质谱中子离子相对强度稳定性的研究,高等学校化学学报,2003,24(12):2169~2172
- 6 Qionglin Liang, Guoan Luo, Jun Qu, Yiming Wang, Xiangdong Liu. A simple and reliable approach based on tandem mass spectrometry for the differentiation and quantitation of isomers in complex matrices. Submitted to Anal. Chem.
- 7 Qu J, Wang YM, Luo GA, et. al. Validated Quantitation of Ur-derivatized Amino Acids in human Blood Samples by Volatile Ion - Pair Reversed - Phase Liquid Chromatography Coupled to Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. Analytical Chemistry, 2002, 74(9):2034~2040
- 8 Qu J, Luo GA, Wang YM. Rapid determination of underivatized pyroglutamic acid, glutamic acid, glutamine and other relevant amino acids in fermentation media by LC - MS - MS. Analyst 2002, 127(1):66~69
- 9 Wang QG, Wang J. Determination of levonorgestrel in human serum by liquid chromatographic - electrospray tandem mass spectrometry. ANALYTICAL LETTERS, 2001, 34(1):103~112

(上转第4页)

- 9 Yanagida T., Harada Y and Ishijima A. (1993) Nano-manipulation of actomyosin molecular motors in vitro :a new working principle. *TIBS*, 18 319 ~ 324
- 10 Ishijima Akihiko, Yanagida Toshio. (1994) Single-molecule analysis of the actomyosin motor using nano - manipulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 199 1057 ~ 1063
- 11 李银妹. 光镊原理技术与应用, 北京:中国科学技术出版社, 1996
- 12 Finer. J. T., Robert. S and Spudich J. A. (1994) Single myosin molecule mechanics :piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, 386 113 ~ 119
- 13 Suzuki M, Fujita H and Ishiwata S. (2003) Bio-nanomuscle project :contractile properties of single actin filaments in an A - band motility assay system. *Adv EXP Med Biol*. 538 103 ~ 109
- 14 Lister I, Schmitz S, Walker M, Trinick J, Buss F, Veigel C, Kendrick - Jones J. (2004) A monomeric myosin VI with a large working stroke. *EMBO J*, 23 1729 ~ 1738
- 15 Veigel C, Coluccio LM, Jontes JD, Sparrow JC, Milligan RA, Molloy JE. (1999) The motor protein myosin - I produces its working stroke in two steps. *Nature*, 398 530 ~ 533
- 16 Lister I, Roberts R, Schmitz S, Walker M, Trinick J, Veigel C, Buss F, Kendrick - Jones J. (2004) Myosin VI: a multifunctional motor. *Biochem Soc Trans*, 32 685 ~ 688
- 17 Svoboda K, Schmidt CF, Schnapp BJ, Block SM. (1993) Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365 (6448) :721 ~ 727
- 18 Yin H, Wang MD, Svoboda K, Landick R, Block SM, Gelles J. (1995) Transcription against an applied force. *Science*. 270 (5242) 1653 ~ 7

The application of micro - video recorder system and single molecular manipulation of optical tweezers in the movement study of motor proteins in vitro

Zhao Heping Huang Lingyun He Dacheng

(College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing, 100875)

Abstract This review summarizes the application of micro - video recorder system and single molecular manipulation of optical tweezers in the movement study of motor proteins in vitro, especially the actin - based motor proteins - myosin

Key words Micro - video recorder Motor protein Movement Optical tweezers

(下接第 7 页)

- 10 赵基源, 王义明, 罗国安等. GC/MS 和 ESI/MS/MS 同位素内标法检测甲基丙二酸血症, 高等学校化学学报, 2003, 24(8) :1368 ~ 1372
- 11 曲峻, 吴筑平, 罗国安等. LC/MS/MS 方法筛查新生儿苯丙酮尿症, 高等学校化学学报, 2002, 21(2) :210 ~ 212
- 12 肖盛云, 罗国安, 王义明等. LC/MS 鉴定中药三七及其复方制剂, 药学报, 2004, 39(2) :127 ~ 131
- 13 李广, 王清刚, 王义明等. 高效液相色谱串联质谱法测定血清中内美通, 分析化学, 2001, 29(7) :745 ~ 749

Novel approaches of electrospray ionization mass spectrometry and their application in the field of bio - analytical chemistry

Luo Guoan Liang Qionglin Wang Yiming Qu Jun

(Analysis Center of Tsinghua University, Beijing 100084, P. R. China)

Abstract The electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS) was one of the most widely applicable bio - MS technologies. The complexity of biological matrices challenged the selectivity and accuracy of MS analysis, and demanded the development of MS methodology. Therefore several novel approaches based on ESI MS, which had a wide potential, were introduced with respect to their principle and merits as well as real examples in application. The trend of bio - MS technology and its future application in the field of bio - analytical chemistry were prospected.

Key words Electrospray ionization Mass spectrometry Bio - analytical chemistry Bio - MS