

磷 脂 的 质 谱 分 析

孙亦平

蒋祥玉

(中国药科大学) (中国科技大学)

〔摘要〕 本文综述了磷脂的各种分析技术, 讨论了一些生物化学应用实例。

一、前 言

磷脂是一类很重要的生化物质。它们不溶于水, 但能溶于有机溶剂。磷脂有甘油磷脂和神经鞘磷脂, 它们都含有磷酸组分。动物的心、脑、肾、肝、骨髓以及禽蛋的卵黄中, 磷脂的含量都很丰富。磷脂有许多生理功能^[1-2]: 例如, 可作为燃烧分子, 高能贮存形式以及生物膜结构组成部分。磷脂、糖苷脂以及固醇和类固醇是最主要的生物细胞膜脂质类化合物。

由于磷脂具有重要的生理功能, 故建立各种磷脂的分析技术对于脂质研究是很有意义的。一般的分析步骤是先用溶剂提取法从组织样品中分离出脂质混合物, 然后经薄层层析(TLC)或柱层析(CC)分离获得各种磷脂。分离所得的磷脂可用于定性或定量分析。尽管各种分析技术, 包括薄层层析法, 气相色谱法(GC)^[3], 已被用于磷脂的分析, 但它们通常包含许多步骤, 且分析专属性较差, 难以分析完整的磷脂结构。近年来, 高效液相色谱法(HPLC)越来越普及, 也被用于磷脂的分析。^[4]但它仍有一些局限性, 例如, 未经衍生化的磷脂只在200nm波长处有紫外吸收, 那些在200nm左右也有紫外吸收的溶剂就不能使用了。

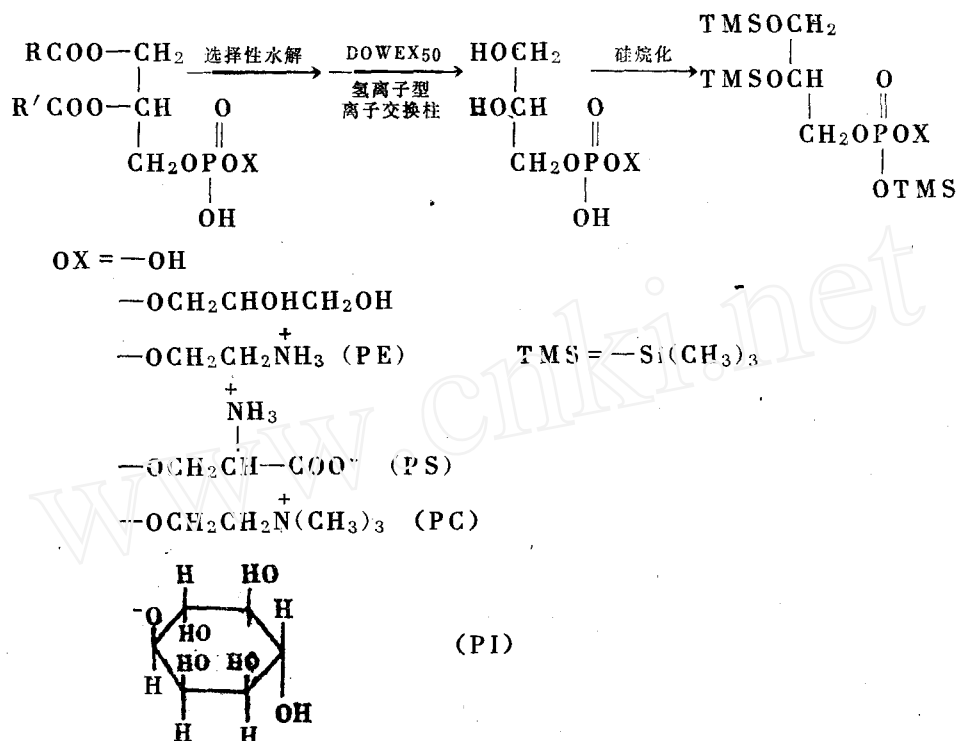
质谱法(MS)是一种具有高度选择性和灵敏度的分析技术。目前, 已被广泛地应用于各种化合物的分析。由于质谱法能提供许多结构信息, 它已成为磷脂分析的强有力手段。本文将着重介绍几种用于磷脂质谱分析的技术, 同时讨论几个分析实例。

二、磷脂的质谱分析

(一) 气相色谱——质谱法(GC-MS)^[5-12]

磷酸甘油酯有二条长链非极性脂肪酸和极性磷酸酯, 使它们既亲水又亲脂。由于其独特结构, 磷脂本身不适用于GC-MS分析。Horning和Duncan^[5-6]建立了一种衍生化方法来测定磷脂的部分结构。它包括从磷脂结构中除去脂肪链, 硅烷化, 用GC-MS测定其甘油磷酸酯骨架部分等步骤。磷脂的三甲基硅烷化衍生物制备过程如下:

1987年4月7日收



通常, 磷脂经甲醇钠选择性水解除去脂肪酸链, 获得的磷酸二酯钠盐经离子交换柱层析(DOWEX50, 氢离子型), 将洗脱液浓缩, 干燥, 最后用硅烷化试剂衍生化。经硅烷化的衍生物增加了磷脂的挥发性, 可用于GC-MS分析。图1是磷脂酰丝氨酸(PS)三甲基硅烷化衍生物的电子轰击质谱(EIMS)。

从质谱上, 找不到分子离子峰, 但根据一系列的碎片离子峰, 例如, $m/z 604 (M - \text{CH}_3)$, $m/z 529 (M - \text{TMSO})$, $m/z 516 (M - \text{TMSOCH}_2)$ 可以推断其分子量。 $m/z 357, 299$ 峰来自于母体化合物, 而 $m/z 502 (M - \cdot\text{COO}^-\text{TMS})$ 是磷脂酰丝氨酸三甲基硅烷化衍生物的特征离子峰。

Ramesha和Pickett^[6]报道了一种较灵敏的血小板激活因子的定量方法。他们用磷脂酶C处理1-O-羟基-2-乙酰基-甘油磷脂酰胆碱, 使其转变成1-O-羟基-2-乙酰基甘油, 然后用五氟苯甲酰氯酰化, 用气相色谱-负离子化学电离质谱法测定所产生的五氟苯二甘油酯。当用甲烷作试剂气时, 该衍生物主要产生分子离子 $([M])^-$ 。氘标记的1-O-十六烷基-2-($^2\text{H}_3$)乙酰基磷脂酰胆碱可作为定量分析的内标。标准曲线成线性, 相关系数大于0.999。用1pg的氘标记内标可测定低至100fg的血小板激活因子。

(二) 高效液相色谱——质谱法 (HPLC-MS)^[13-15]

HPLC是一种十分有用的分析工具。用HPLC进行磷脂分析是在200nm左右用紫外检测器测定磷脂洗脱液。然而, 这种方法不适用于各磷脂的直接定量, 因其响应值往往随功能团的数目而变(主要是磷脂中双键的数目)。另一个局限性是层析的溶剂系统, 那些在200nm有紫外吸收的溶剂不能使用。磷脂的HPLC-MS能克服上述局限性, 并能提供鉴别各完整磷脂的结构信息。目前, 采用传送带(moving-belt)、热喷雾(thermospray)和直接液体注射(direct liquid injection)三种色质接口能成功地进行磷脂的分析。

Junglawala^[13]等人报道了用传送带接口HPLC-MS分析磷脂混合物。他们采用硅胶柱

(Accupak 3 μ m, 4.6mm i.d $\times$ 10cm), 二氯甲烷—甲醇—水—醋酸混合溶剂为梯度洗脱液, 用氨气或甲烷化学电离获得了各种磷脂的正、负离子质谱。

图2是鼠脑中磷脂的总离子流及特征离子检测图。由图可见, 用上述条件, 可较好地分离鼠脑中各种磷脂。含胆胺的磷脂(PE)和含胆碱的磷脂(PC)都裂分为二重峰。纯品质谱分析表明先出的峰主要含长链脂肪酸磷脂, 而后出的峰主要含短链脂肪酸磷脂。

Kim和Salem^[15]采用热喷雾接口HPLC—MS测定了磷脂和有关化合物。他们用反相或正相HPLC进行混合物分离, 加热毛细管使样品蒸发, 电子轰击电离(EI)获得质谱。质谱分析表明有二甘油化物, 单甘油化物, 分子离子以及用于区分不同磷脂的极性头基团离子存在。用新的层析系统可进行磷脂酰肌醇(PI), 磷脂酰丝氨酸(PS), 鞘磷脂(SP), 三甘油化合物以及血小板激活因子(PAF)等混合物的快速分离, 混合物的分离鉴别只需3分钟, 分析所要求的总样品量大约几微克。

(三) 薄层层析——二次离子质谱法(TLC—SIMS)^[16-18]

Kushi^[16]等人报道了一种简单快速的分析方法, 即样品先经薄层分离, 然后用二次离子质谱分析。分析时, 不需将样品从TLC板上洗脱。用该法所得的质谱不受TLC板吸附剂和显色剂的干扰。分析样品量约为1微克。该法包括如下几步:

1. 在铝或塑料硅胶板上进行TLC分离, 用碘蒸气或其它显色剂显色, 剪下待分析的区域, 最大面积为5mm $\times$ 20mm。
2. 用双面胶带将剪下的TLC板小片粘在二次离子质谱仪进样杆上。
3. 在TLC板小片上加1~2 μ l的溶剂(如甲醇)以及2~5 μ l基质(如甘油)。
4. 将进样杆插进质谱仪离子源获得质谱。

图3为磷脂酰胆碱(PC)和鞘磷脂(SP)混合物的总离子及单离子检测图。由图可见, 用此条件可很好地分离磷脂混合物。

目前, 与GC—MS和HPLC—MS相比, 该法有一些优点: 不需色质接口, 较简单, 灵敏, 适用于不同来源的样品分析。

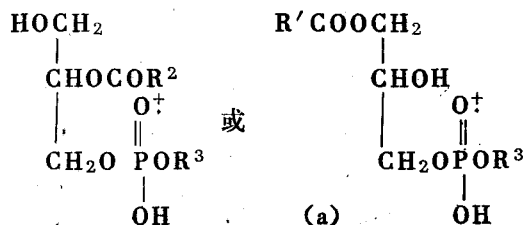
(四) 快原子轰击质谱法(FABMS)^[19-27]

快原子轰击质谱法是分析大分子、极性和非挥发性化合物的强有力的手段, 目前, 已有大量的文献报道。从分析的观点来看, 磷脂的FABMS分析有如下几个优点:

1. 磷脂可用FABMS直接进行分析, 无需做成衍生物。
2. 用FABMS可测定磷脂混合物中各磷脂的分子量。
3. FABMS与碰撞诱导解离(CID)技术联用, 可获得重要的结构信息。
4. FABMS和HPLC联用将成为强有力的分析手段之一。

由于磷酸二酯阴离子是十分稳定的, 所以除了可采用正离子快原子轰击质谱分析外, 负离子快原子轰击质谱也适合于磷脂的分析。

常见的磷脂的快原子轰击裂解碎片如下(a—f):



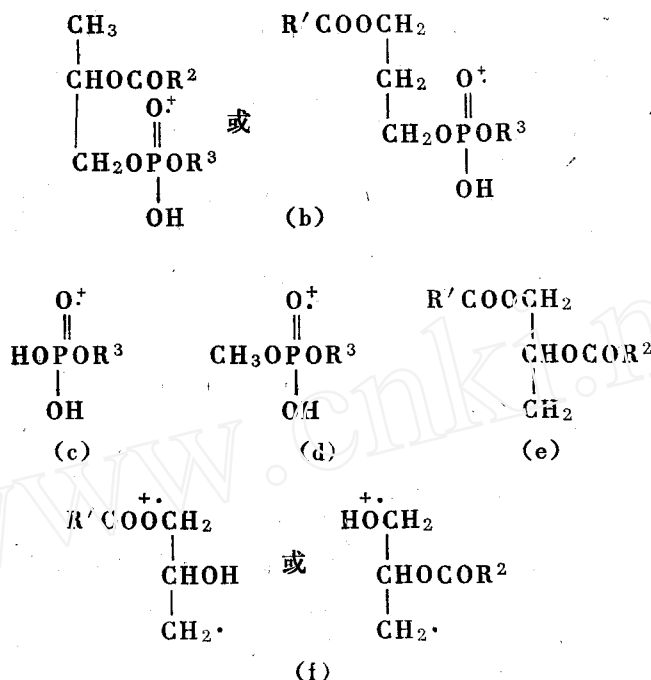


图4是磷脂酰胆碱(PC)的正离子快原子轰击质谱, 碎片离子a, b, c, d是各磷脂产生的特征离子, 而碎片离子e是所有磷脂共有的。

Fenwick^[19]等人报道了一系列磷脂的快原子轰击质谱。质谱上既有分子离子峰又有碎片离子峰, 这些为推断磷脂结构提供了重要的依据。他们还对蛋黄中磷脂混合物进行了分析。将已被分离的蛋黄样品放在质谱仪进样杆上, 不需另加基质, 直接进行分析。质谱分析表明, 蛋黄中有分子量分别为287, 785, 759和757的磷脂存在。经磷脂酰胆碱的标准品对照分析, 蛋黄中含(18:0, 18:1), (18:0, 18:2), (16:0, 18:1)以及(16:0, 18:2)不同脂肪酸链组成的磷脂酰胆碱。

Varenne^[20]等人用快原子轰击质谱分析了一系列血小板激活因子(PAF)的相关磷脂, 并将所得结果与化学电离(CI)质谱进行比较。

Münster^[21]等人报道了用负离子快原子轰击质谱分析未衍生化磷脂。该法可用于鉴别脂肪酸的类型以及混合物的分析。

(五) 质谱—质谱法 (MS-MS)^[28-32]

用质谱法确定烯烃或其它含双键化合物中双键的位置是一个极有趣且具挑战性的问题。磷脂中不饱和脂肪酸在生理功能上起着重要的作用, 因而对此进行研究有着十分重要的意义。但是, 双键的简单酯衍生物用电子轰击质谱分析时往往产生双键重排, 因而难以确定双键的位置。采用负离子化学电离技术则由于产生极少的碎片离子也不能获得较满意的结果。

Harvey等人^[30-32]制备了酸衍生物, 然后用电子轰击产生较强的碎片峰。然而, 该法不适用于高度不饱和的脂肪酸的分析。

质谱—质谱法 (MS-MS) 对于脂肪酸分析是十分有效的工具。最近, Gross等人^[28]表明, 对快原子轰击所产生的脂肪酸阴离子进行碰撞诱导解离(CID)能获得重要的碎片离子。

借助于这些碎片离子可以测定脂肪酸链中双键的存在和双键的位置,同时,也可以区别磷脂中二条脂肪链的取代位置。

仪器由一个高分辨的EB构型为质谱(I)和另一个静电分析器(E)为质谱(II)构成。用负离子检测。通过质谱(I)将欲测的离子聚焦进入碰撞室,再用氦气碰撞此离子,扫描质谱(II),记录子离子流便获得碰撞诱导解离图谱(CID Spectra)。

磷脂酰胆碱(PC)的负离子快原子轰击质谱见图5。脂肪酸阴离子的碰撞诱导解离图谱见图6。碰撞诱导解离复杂磷脂中脂肪酸阴离子能提供重要的结构信息。如采含饱和脂肪酸,那么,将通过专属的1,4-消除 H_2 失去一系列烷烃如 CH_4 , C_2H_6 , C_3H_8 ……那些裂解的 C_nH_{2n+2} 碎片将从烷基末端开始。如果含不饱和脂肪酸,将使 C_nH_{2n+2} 碎片裂解途径改变,从而确定脂肪酸链中双键的位置。然而,用碰撞诱导解离技术分析含2—3个双键不象仅含1个双键那么容易,含4个或4个以上双键的不饱和脂肪酸链更难分析,因其阴离子经碰撞诱导解离仅产生失去45原子质量单位的碎片峰。

磷脂中二条脂肪酸链的取代位置也可以通过碰撞诱导解离技术来区别。碰撞诱导解离磷脂酰胆碱负离子快原子轰击质谱图上高质量区离子,能产生二个脂肪酸阴离子。取代在2位的脂肪酸阴离子的丰度往往比取代在1位的脂肪酸阴离子丰度大二倍,对于磷脂酰胆碱,这是显而易见的。高质量区离子 m/z 699, 744的碰撞诱导解离图见图7。

三、结 论

由于质谱法能提供许多结构信息,它已成为磷脂分析的强有力的工具。然而,用GC-MS,必须将磷脂制成衍生物,如三甲基硅烷化衍生物。HPLC-MS已显示出具大的潜力,因为它适用于完整的磷脂的分析,不需制成衍生物,同时适用于较复杂的磷脂混合物的分析。一些软电离(Soft ionization)技术,例如,化学电离(CI)^[33-38]、场解吸(FD)^[39]和快原子轰击(FAB),二次离子质谱(SIMS)^[40-42]以及质谱—质谱(MS-MS)已被证明是十分有用的,因为它们不仅产生分子离子,而且提供许多结构信息。作者认为, HPLC分离技术、FAB电离技术以及质谱—质谱法联用,将是磷脂分析最有效的方法。几种用于磷脂质谱分析的技术的特点见表1。随着磷脂分析技术的发展,人们将会加深对生物膜的结构和功能的理解。

表1 几种用于磷脂质谱分析的技术的特点

分 析 方 法	特 点
GC-MS	必须制成衍生物进行分析。
LC-MS	适用于完整的磷脂以及混合物的分析。
TLC-MS	比较简单,不需色质接口。
FAB-MS	可测定混合物中各磷脂的分子量。
MS-MS	确定磷脂脂肪酸链中双键的存在位置以及脂肪酸链取代位置。

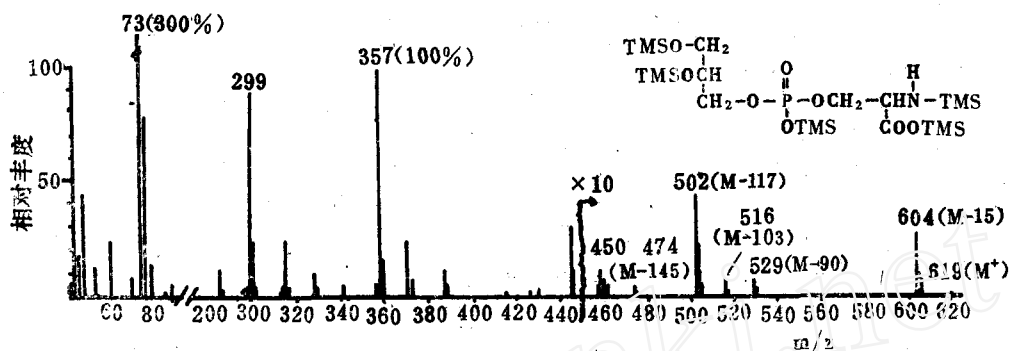


图1 磷脂酰丝氨酸(PS)三甲基硅烷化衍生物的电子轰击质谱

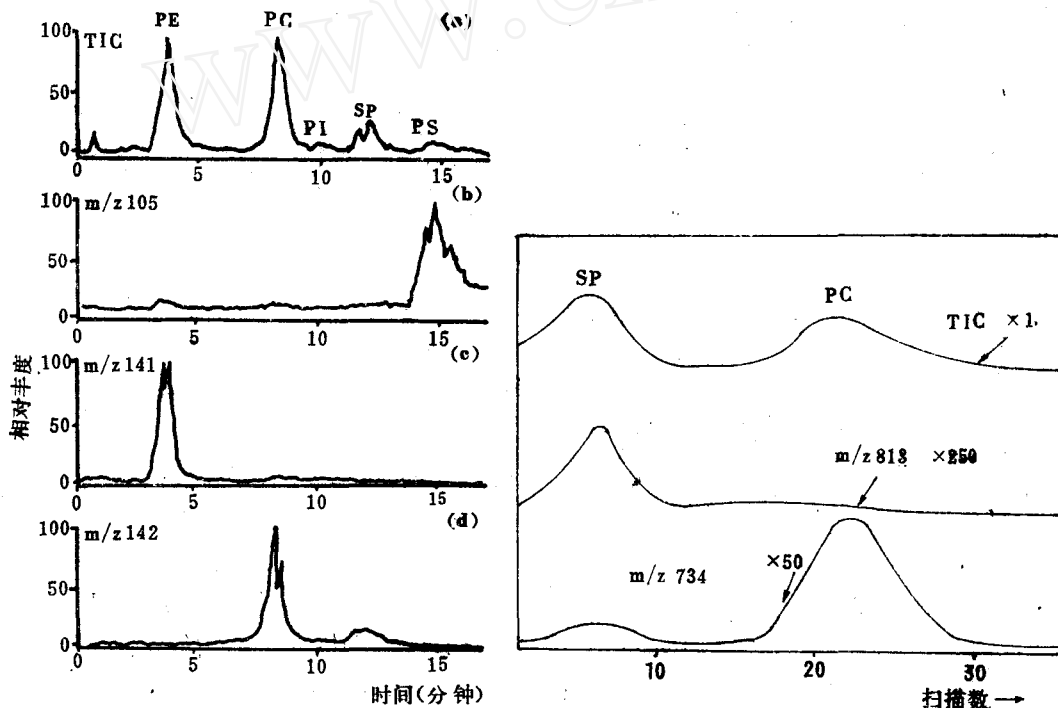


图2 鼠脑中磷脂的总离子流及特征离子检测图

图3 磷脂酰胆碱(PC)和鞘磷脂(SP)混合物的总离子流及单离子流检测图

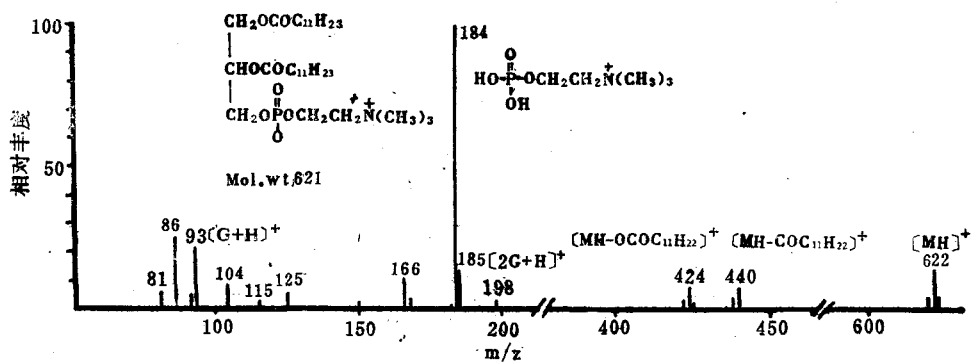


图4 磷脂酰胆碱(PC)的正离子快原子轰击质谱

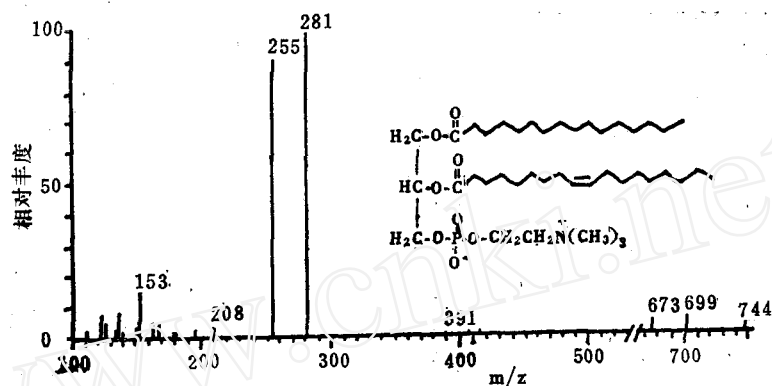


图5 磷脂酰胆碱(PC)的负离子快原子轰击质谱

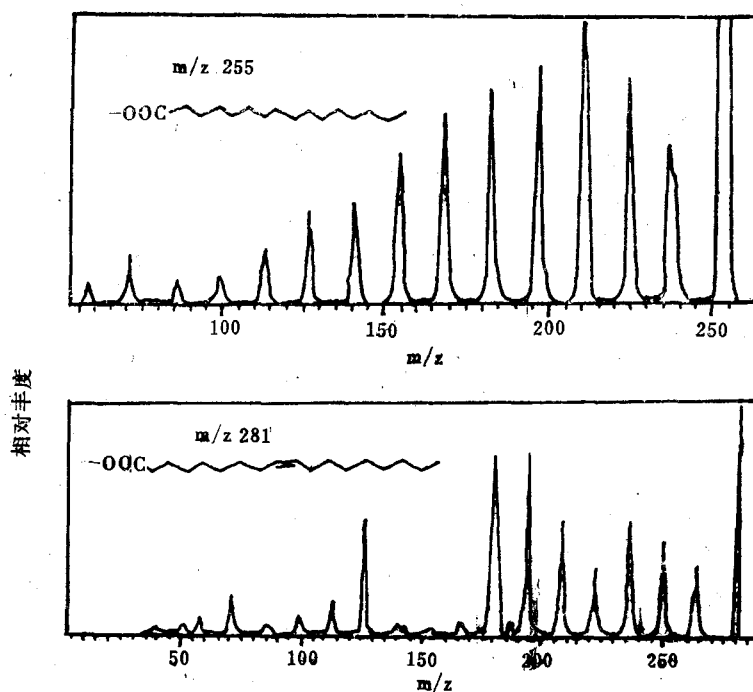
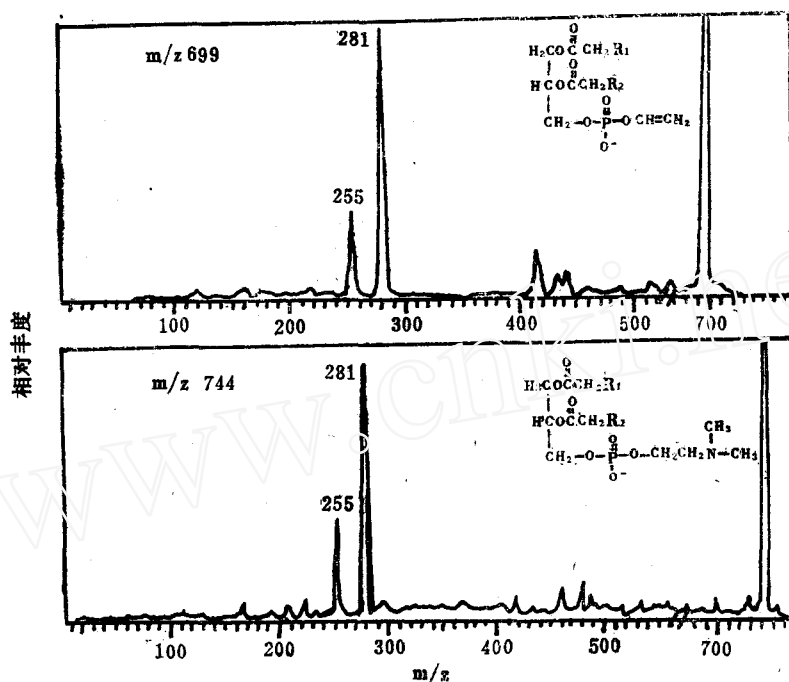


图6 不同脂肪酸阴离子的碰撞诱导解离(CID)图

图7 离子 m/z 699, 744的碰撞诱导解离图

参 考 文 献

- [1] Stryer, Lubert, "Introduction to Biological Membrane" in "Biochemistry", W. H. Freeman and Company, New York, 2nd ed., 205—227, (1981)
- [2] Hawthorne, J. N., Ansell, G. B., "Phosphatidylserine, Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine" in "Phospholipids", Elsevier Biomedical Press, 1—41 (1982)
- [3] Helmut, K. Mangold, "Glycerophospholipids" in "CRC Handbook of chromatography, Lipids 2", CRC Press Inc. 481—509(1984)
- [4] Jungalwala, F. B., S. Sanyal, and F. LeBeron, "Use of HPLC to determine the turnover of molecular species of phospholipids" in "Phospholipids in the nervous system" Vol. 1, Metabolism, Raven Press, New York, 91—103(1982)
- [5] Duncan, J. H., Lennarz, W. J. and Fenselau, C. C., Biochemistry, 10, 927—932 (1971)
- [6] Horning, M. G., Murakami, S., and Horning, E. C., Am. J. Clin. Nutr. 24, 1086—1096, (1971)
- [7] Tokumura, A., Yoshioka, Y., Tsukatani, H., Biomed. Mass Spectrom., 13, 175—180 (1986)
- [8] Ramesha, C. S., Pickett, W. C., Biomed. Mass Spectrom., 13, 107—111, (1986)
- [9] Tokumura, A., Suzuki, T., Journal of Chromatography, 343, 138—142, (1985)
- [10] Curstedt, T., Sjövall, J., Biochimica et Biophysica Acta, 360, 24—27(1974)
- [11] Hasegawa, K., Suzuki, T., Lipids, 10(11), 667—672(1975)
- [12] Hughes, H., Smith, C. V., Anal. Biochem., 152, 107—112(1986)
- [13] Jungalwala, F. B., Evans, J. E., and McCluer, R. H., J. Lipid Res., 25, 738—748(1984)
- [14] Hee-Yong Kim and Norman Salem, Jr., Anal. Chem., 58, 9—14(1986)
- [15] Hee-Yong Kim and Norman Salem, Jr., Anal. Chem., 59(5)722—728(1987)
- [16] Kushi, Y. H., Handa, S., J. Biochem. 98, 265—268(1985)

- [17] Unger, S. E., Vincze, A., *Anal. Chem.* 53, 976—981(1981)
- [18] Chang, T. T., Lay, J. O., Jr., and Francel, R. J., *Anal. Chem.* 56, 109—111 (1984)
- [19] Fenwick, G. R., Eagles, J., and Self, R., *Biomed. Mass Spectrom.*, 10, 382—386 (1983)
- [20] Varenne, P., Das, B. C., *Biomed. Mass Spectrom.*, 1, 6—10(1985)
- [21] Munster, H., Stein, J., *Biomed. Mass Spectrom.*, 13, 423—427(1986)
- [22] Chilton III, F. H., Murphy, R. C., *Biomed. Mass Spectrom.* 13, 71—76(1986)
- [23] May, H. E., Desiderio, D. M., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 72—73(1983)
- [24] Ross, M. M., Neihof, R. A., *Analytica Chimica Acta*, 181, 149—157(1986)
- [25] Sherman, W. R., Ackermann, K. E., *Biomed. Mass Spectrom.*, 8, 409—413(1985)
- [26] Ayanoglu, E., Wegmann, A., Pflügl, G., *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 5246—5251 (1984)
- [27] Gross, R. W., *Biochemistry*, 23, 158—165(1984)
- [28] Jensen, N. J., Tomer, K. B., Gross, M. L., *Lipids*, 9, 580—588(1986)
- [29] Jensen, N. J., Tomer, K. B., Gross, M. L., *Anal. Chem.* 57, 2018—2021(1985)
- [30] Andersson, B. A., Heimermann, W. H., *Lipids*, 9, 443—449(1974)
- [31] Andersson, B. A., Christie, W. W., Holman, R. T., *Lipids* 10, 215—219 (1975)
- [32] Andersson, B. A., Holman, R. T., *Lipids*, 9, 185—190(1974)
- [33] Lin, Y. Y., Smith, L. L., *Mass Spectrom. Review*, 319—355(1984)
- [34] Dessort, D., Mersel, M., Lepage, P., *Anal. Biochem.*, 142, 43—52(1984)
- [35] Thomas, M. J., Samuel, M., *Journal of Lipid Res.*, 27, 172—176(1986)
- [36] Crawford, C. G., Plattner, R. D., *Journal of Lipid Res.*, 24, 456—460(1983)
- [37] Rohwedder, W. K., Emken, E. A., *Lipids*, 20(5), 303—311(1985)
- [38] Tokumura, A., Handa, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 31(12), 4425—4435(1983)
- [39] Wood, G. W., Perkins, S. E., *Anal. Biochem.*, 122, 368—371(1982)
- [40] Ohashi, Y., *Biomed. Mass Spectrom.*, 11(8)383—385(1984)
- [41] Benfenati, E., Reginato, R., *Biomed. Mass spectrom.* 12(11)643—651(1985)
- [42] Aberth, W., Straub, K. M., Burlingame, A. L., *Anal. Chem.* 54, 2029—2034 (1982)
- [43] Kemp, P., Dawson, R. M. C., *Biochem. J.*, 130, 221—227(1972)
- [44] Kuwabara, H., Viden, I., *J. Biochem.*, 100, 477—484(1986)
- [45] Kagawa, Y., Ariga, T., *J. Biochem.* 81, 1161—1165(1977)
- [46] Terao, J., Asano, I., *Lipids*, 20(5), 312—317(1985)
- [47] Carballeira, N. M., Maldonado, L., *Lipids*, 21(7)470—471(1986)
- [48] Witzke, N. M., Bittman, R., *Journal of Lipid Research*, 26, 623—628(1985)
- [49] Petrossian, A., Kantor, A. B., *Journal of Lipid Research*, 26, 767—773(1985)
- [50] Ohashi, M., Ohashi, Y., Shida, Y., *Org. Mass Spectrom.*, 20(10), 642—643 (1985)
- [51] Wijekoon, W. M. D., Ayanoglu, E., Djerassi, C., *Tetrahedron Letters*, 25(3), 3285—3288(1984)
- [52] Ayanoglu, E., Kornprobst, J. M., Djerassi, C., *Tetrahedron Letters*, 24(11), 1111—1114(1983)
- [53] Futrell, J. H., “Biomedical applications of mass spectrometry” in “Gaseous ion chemistry and mass spectrometry”, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Son, 1986

Characterization of Phospholipids by Mass Spectrometry

Sun Yiping

(China Pharmaceutical University)

Jiang Xiangyu

(University of Science & Technology of China)

Received 7, April 1987

Abstract

This paper reviews some different techniques of mass spectrometry for analyzing phospholipids. Some examples of biochemical application are discussed.