

高分辨快原子轰击质谱法及其在 生物医学分析中的应用

邱丰和

(军事医学科学院国家生物医学分析中心 北京 100850)

[摘要]快原子轰击质谱经过十几年的发展,已成为分析极性强、难挥发和热不稳定化合物最常用的质谱方法,然而用快原子轰击质谱进行精确质量测定的应用和研究开展还不很广泛。本文简要介绍了高分辨快原子轰击质谱法的方法和特点,并概述了高分辨快原子轰击质谱在生物医学分析几个主要方面(生物小分子、生物大分子、药物代谢产物和临床病理研究等)中的应用。

关键词:高分辨快原子轰击质谱 生物医学分析 应用

1 高分辨快原子轰击质谱(HRFABMS)法

1.1 高分辨质谱的基本原理

测定一个化合物的结构,首先要求得到的信息是化合物的分子量和分子式。因为每种元素的同位素的质量并不正好是整数。例如 ^1H 的精确质量为 1.00782506, ^{12}C 的精确质量为 12.00000000, ^{14}N 精确质量为 14.00307404, ^{16}O 的精确质量为 15.99491475 等等,每一种元素都有唯一和特征的质量。因此,当不同元素组成一个分子时,该分子的质量也是唯一和特征的,用高分辨质谱法测定质谱中离子的精确质量,推导出离子可能的元素组成,综合考虑不饱和度、N 规则及同位素峰型等因素,即可获得离子元素组成的数据,如果该离子是分子离子,便可获得化合物的分子式。

1.2 生物医学分析的特点

众所周知,HREIMS 是目前应用最广泛的高分辨质谱技术,但由于 EI 电离方式仅适合于极性小、沸点低和热稳定的化合物,在生物医学分析中,该技术的应用受到很大的限制。生物医学分析中所遇到的分析对象大部分都是极性大、不易挥发的化合物,例如肽、寡核苷酸、寡糖、皂甙等。分析这样一些生物小分子最有效的质谱方法是 FABMS 或 LSIMS。当一些待测物需进行精确质量测定时,HRFABMS 已成为一种必不可少的手段。

1.3 高分辨快原子轰击质谱的实验方法

进行精确质量测定,首先要使仪器达到足够的分辨率,以便把目标峰同噪音分开。在质谱中区分质量相差 Δm 的两个离子,需要的仪器分辨能力或分辨率可由 $R = m/\Delta m$

1996-05-13 收

计算。随着分子质量的增大,质量相近的分子的数目急剧增加,质量差也就越来越小,因此对分辨率要求更高,例如:分离质量为 100、相差 0.05u 的两个离子,需要 2000 的分辨率就可以了,而分离质量为 1000、同样相差 0.05u 的两个离子就需要 20000 的分辨率。当然在测定实际样品时,不可能也没有必要完全按照上述要求调整仪器的分辨率,这一方面是因为对一般的高分辨磁式质谱仪来说,分辨率的提高受到 FABMS 灵敏度的制约,FABMS 由于电离机理的问题,产生的二次离子的能量分布较宽,在提高分辨率时,灵敏度的损失比 HREIMS 更加严重,加之生物样品的量往往很少,所以尽管一些型号仪器的标称分辨率可达 10 万甚至更高,测定实际样品时,在能获得有效谱图的情况下,达到 20000 以上的分辨率是较困难的;另一方面,精确质量测量的准确度,并不与仪器的分辨率成正比,与仪器的状态特别是峰型等也有关系。一般来讲,要使质量测量准确度好于 5ppm,分辨率一般不应低于 4000(10%波谷),文献中用 FABMS 进行精确质量测量时,使用的分辨率多在 5000~15000 之间。

HRFABMS 所需的底物同低分辨 FABMS 相同,可用甘油、硫甘油、3-硝基乙醇和“magic bullet”等。HRFABMS 所用的校正标准物质对于质量测量精度至关重要,基本原则是不能同待测物和底物发生化学反应,不能干扰或抑制待测物的信号,参考峰呈现规律性分布且容易辨认,参考峰之间的质量差尽可能小,参考峰能基本覆盖 FABMS 的质量检测范围。目前用的较多是聚乙烯醇(PEGs Polyethylene glycols)。PEGs 在甘油中主要出现 $[\text{PEGs} + \text{H}]^+$ 系列离子,离子与离子之间相差一个乙醇单体(44Da),不同聚合度的 PEGs 可满足从几十到一千以上离子精确质量测定的需要。

高分辨快原子轰击质谱可采用的扫描方式有磁场扫描(Magnet Scan)、电压扫描(Voltage Scan)、峰匹配(Peak Matching)及单离子检测(Single Ion Recording)。磁场扫描的优点是可进行全谱扫描,但测量误差较大,所以应用较少;电压扫描不能进行全谱测定,质量扫描范围一般小于 200Da,优点是质量测量精度比磁场扫描方式高,是目前较常用的扫描方式;峰匹配法精度好,但每次只能测定一个离子;另一种在生物医学分析中有重要应用价值的方式是基于连续流动快原子轰击质谱法(CF-FABMS)的单离子检测(Single Ion Recording)技术,由于单离子检测技术比通常的扫描方式能提高灵敏度两个数量级以上,因此该法能弥补高分辨带来的灵敏度的损失。

2 HRFABMS 在生物医学分析中的应用策略

HRFABMS 只能提供有关离子的精确质量,从而确定离子的元素组成,要解决生物医学分析中出现的各种不同的分析问题,需要灵活地运用 HRFABMS,根据 FABMS 能够测定的质量范围,不同的问题可采取不同的分析策略。

2.1 确定分子式

较小的生物分子(<2000Da),可以用 HRFABMS 直接测定分子离子的组成,给出化合物的分子式,如一些天然产物和药物代谢产物等。

2.2 测定主要碎片离子及指纹离子的组成

对于未知结构的生物小分子,通过对一些主要碎片离子和特征指纹离子进行精确质量测定,可以获得分子的亚结构乃至整个分子的结构信息,另外对于 FABMS 中离子裂解

机理的研究也有重要意义^[1,2]。

2.3 测定生物大分子的微区结构

较大的生物分子,如蛋白质和多肽等,用 FABMS 较难或不能直接测定分子离子,在这种情况下,就需要用酶解和化学解离的方法,将大分子中感兴趣的部分解离并分离出来,然后再用 FABMS 对其进行精确质量测定。这样将生化方法和质谱技术结合,能够得到其它方法无法获得的结构信息,特别象重组蛋白中特异位点化学修饰等结构问题的鉴定。

HRFABMS 无疑是测定分子结构的关键技术之一,但应该强调的是,要最后确定分子的结构,还需要用其它方法,特别是 NMR 方法和 MS/MS 等提供其它方面的结构信息。

3 高分辨快原子轰击质谱法在生物医学分析中的应用实例

3.1 测定天然或人工孵化培养的生物小分子的结构和组成

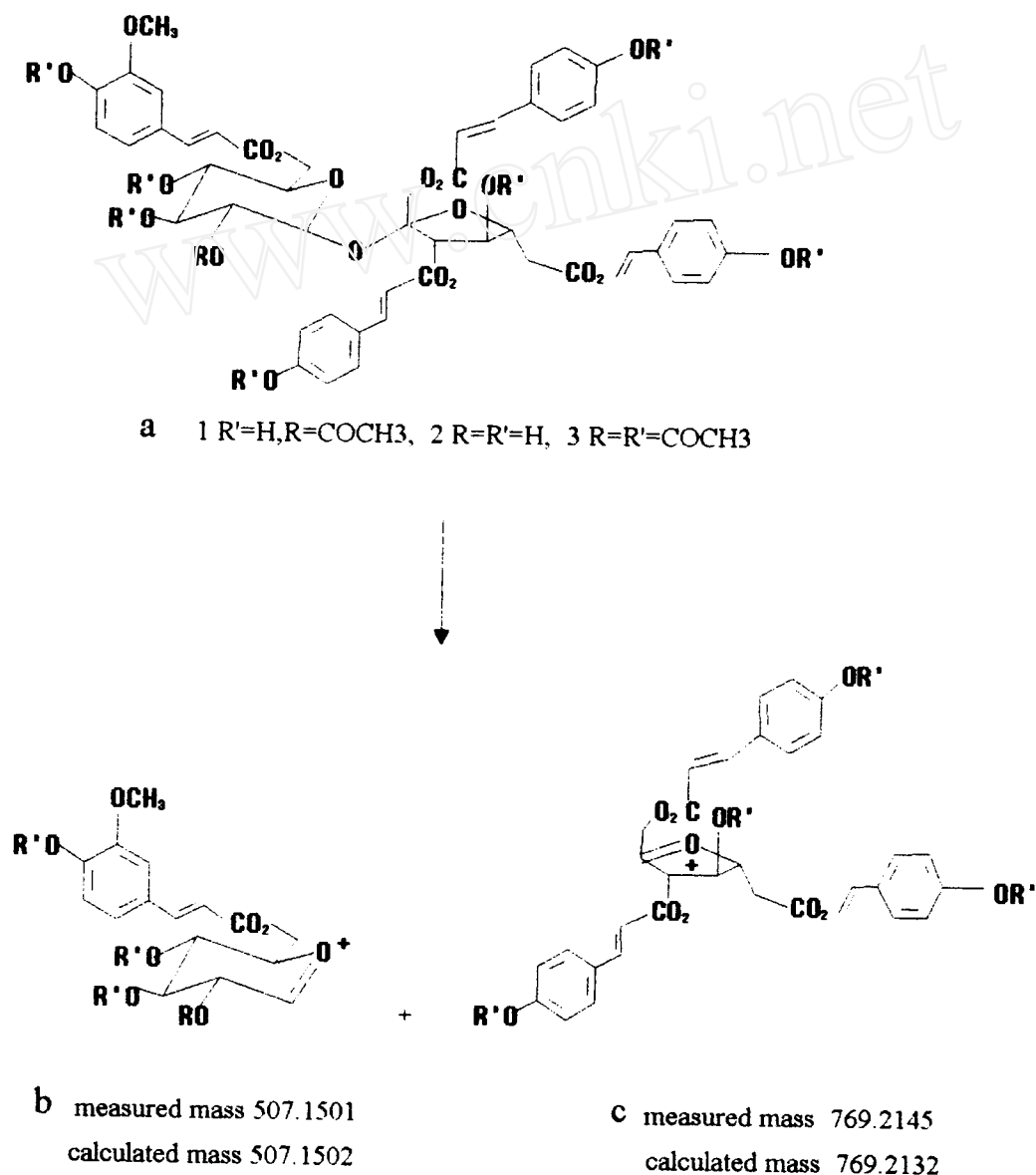
近年来,随着生命科学的发展,不断开发、发现或合成出一些具有生物活性的小分子,如寡糖、活性小肽、寡核苷酸等,由于能够得到的这类样品的量往往很少,发展灵敏准确的结构鉴定方法就非常重要,其中 HRFABMS 即是最有效的方法之一。

具有生物活性的小肽,是来源于天然物种细胞浆液或人工孵化培养产生的一类具有抗菌、抗肿瘤或毒性等活性的直链或环状小肽,是天然产物开发中的热点之一。这些小肽所含的氨基酸一般在 10 个以下,其结构测定主要是确定氨基酸组成和序列,HRFABMS 可以直接提供小肽分子元素组成的准确数据^[3,4,5,6],在此基础上同已知的小肽组成进行对比,可初步确定是已知的还是新发现的。进一步用 MS/MS、NMR 或氨基酸分析等技术,即可确定氨基酸组成或序列。另外精确质量测定获得的不饱和度的数据对于判断待测物是否为环肽很有帮助^[3]

寡糖是另一类得到广泛研究的生物小分子,其来源可以是天然或合成的^[7],也有的是糖蛋白酶解或化学裂解产物^[8]。寡糖的结构测定比小肽要复杂得多,除了糖基的种类序列外,还有连接位点和构型等,这就需要多种分析手段结合使用,包括适当的化学处理或衍生化^[9],最终才能确定一个寡糖的结构。因此,确定未知寡糖结构时,利用 FABMS 获得分子量的同时,用 HRFABMS 确定寡糖的组成或分子式是十分有益的。此外,HRFABMS 对一些在生命过程中起重要作用的小分子结构的确定方面也起到重要的作用^[10,11,12,13,14,28],例如 Grafe 等^[10]用 HRFABMS 测定了孵化培养产生的抗菌素 auranitmyeins A、B 和 C 的结构,Mathews 等^[13]用 HRFABMS 测定于血中提取出来一种钠泵抑制剂的组成时发现同已知的哇巴因完全相同,进一步的实验证明,两者可能是同一种物质。甲烷菌中产生甲烷的甲基还原酶由 A、B 和 C 三个部分组成,其中 A 和 C 两部分都是蛋白质,组分 B 是一种对热稳定的辅助因子,但其结构一直未能确定。Noll^[14]等用 HRFABMS 测得其分子式为 $C_{13}H_{26}NO_8PS_2$,结合 NMR 分析,其结构被确定为 7-mercaptopheptanoylthreonine phosphate。

Zimmermann 等^[11]从 *P. Pensylvanicum* 的根、茎、叶和果实中提取出两种具有蛋白激酶 C 抑制活性的两种糖苷 vanicosides A 和 B,并用 FABMS 确定了两者的分子量相差

42Da, 表明 A 和 B 只相差一个乙酰基, 全乙酰化后, 分子量均为 1292, 表明基本骨架是一致的, NMR 分析表明, 含有一个吡喃糖和呋喃糖糖苷, 一个阿魏酸酯(feruloyl ester), 三个对羟基丙烯酸酯(P-coumaroyl ester)。然而无法进一步证明它们的具体位置。作者用 HRFABMS 测定了全乙酰化(结构 3)产物糖苷键断裂碎片离子的精确质量, 分别为 507.1501 和 769.2145, 相应于 b 和 c 离子, 最后证实了 vanicosides A 和 B 分别具有 1 和 2 的结构式(式 1)。



式 1

3.2 生物大分子结构^[1,15,16,17,18]

蛋白质的分子量一般在数万以上甚至更高,因此用 FABMS 不能直接分析蛋白质大分子。尽管如此,用 HRFABMS 结合酶解的方法,在变异蛋白或重组蛋白中修饰基团的结构和组成分析中能起到重要作用。例如, *Saccharomyces Cerevisiae* 分泌的变异人溶菌酶 P110,由四个蛋白构成(P110-A、B、C、D),其中 P110-B 本应有四条二硫键, Cys6-Cys128, Cys30-Cys116, Cys65-Cys89, Cys77-Cys95,但 Kikuchi 等^[15]分析其一级结构时发现,其中有一个自由的 Cysteine 残基,肽谱分析表明, Cys77 被修饰,用 HRFABMS 直接测定含有 Cys77 的肽段 Thr70-Leu84,得到修饰基团七种可能的组成,综合考虑 N 原子数目及不饱和度等因素,修饰基团被确定为(1,2-Dicarboxyethyl),这一结果通过合成的相应基团取代的 Cysteine 同上述肽段水解后相应部分的 HPLC 的保留时间一致得以证实。据报道原始人溶菌酶由于四对二硫键得以稳定,所以 P110 中 Cys77 上的修饰是出乎意料的,考虑到这一点,作者用同样方法考察了其它变异溶菌酶 R110、K110 和 A110,发现其中均有部分 Cys77 被修饰,这表明原始人溶菌酶中 Val110 被其它氨基酸取代后,结构发生了变化。

Iwanaga 等^[17]在研究 bovine factor(VII)全部氨基酸序列时,发现了一个未知的丝氨酸衍生物(Ser-52),经酶切后分离出含 Ser-52 的七肽,它不能用气相序列仪鉴定, FABMS 证实其中含有一个三糖链,可以通过 β -消去丢失糖链,首次证实了 (Xy12)-Glc-Ser 结构的存在。

3.3 药物极性代谢产物^[4,19,20,21,22,23]

药物在动植物体内的代谢产物的质谱研究,以往多采用 EI 或 CI 质谱研究,对于极性代谢产物,特别是一些结合产物,通常需要衍生化,这样导致谱图解析复杂化,并可能引进

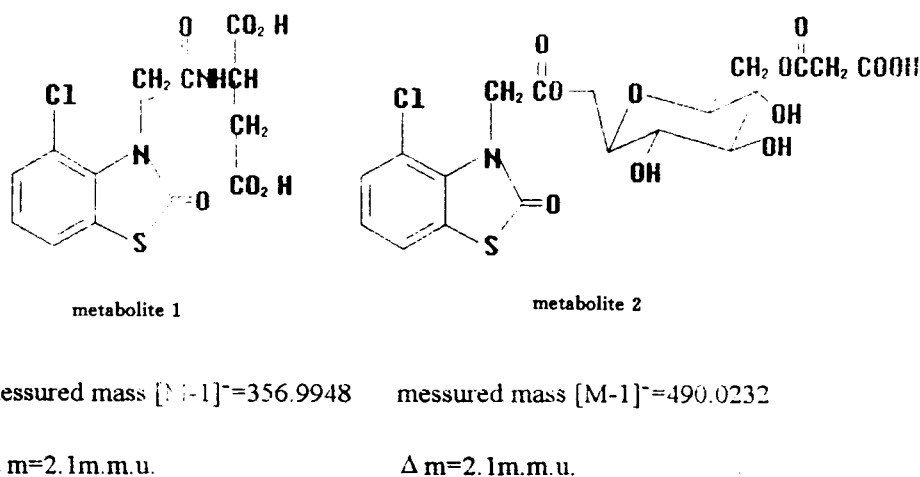


图1 Benazolin-Ethyl 代谢产物

干扰因素。HRFABMS 则是测定这些化合物的合适方法。Shirley 等^[20]等报道了 LB4 在分离出的 Rat Hepatocytes 中 8 种代谢物的结构鉴定,用衍生化 GC/MS 可发现大部份代谢物,但代谢物 Hv 无论用形成甲酯、三甲基硅醚和七氟卞酯均不能得到与 LB₄ 有关的代谢物的峰。而用负离子 CF-FABMS 得到很强的 m/z 444 峰,HRFABMS 表明含有 N 和 S,结合 MS/MS 分析,表明此代谢物为牛磺酸结合物。

在代谢产物的研究中,因为原形药物是已知的,利用 HRFABMS 测定代谢物的精确质量,同原形药物相比较,可以直接得到原形药物在代谢过程中的组成变化或结合物的组成,从而可直接对药物的代谢机理作出判断。例如,Kelly^[19]等从大豆叶中分离出两种 Benazolin-Ethy1 代谢产物,HRFABMS 测定表明,一种是天冬氨酸结合物(metabolite 1),一种为葡萄糖结合物(metabolite 2),见图 1。

Teffera^[21,23]等用 HPLC-CF-FABMS 负离子单离子检测方式精确测定了细胞浆液中 Benzo(a)Pyrene 的硫酸和 Glucuronide 结合物,HPLC 三个峰分别对应于 metabolite 3、4 和 5,三种组分的 FABMS 中都有精确质量为 267.0810 共同离子,对应于 $[M-H+O]^-$ 离子,见图 2。

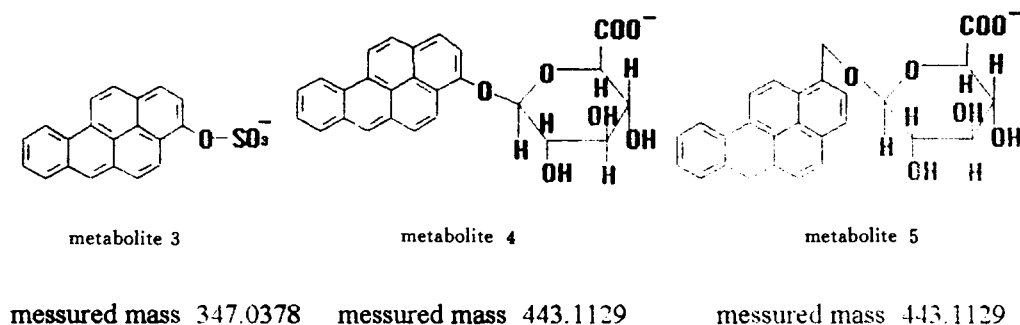


图 2 细胞浆液中结合物的代谢物

3.4 临床病理学研究^[24,25,26]

HRFABMS 在临床病理学研究中也有重要应用价值,能够获得通常临床检验方法不能得到的信息。例如估计成年人体 Ca 的吸收常用的方法是放射性同位素(radio calcium)方法,但这一方法对于儿童和孕妇是不能接受的,Miller^[24]等建立的 HRFABMS 的方法解决了这一问题。

Rey's 综合症的二羧酸 β -氧化部分禁阻,导致 dodecandioyl CoA 积累,然后代谢为 dodecandioyl carnitine,这些代谢中间体的累积,对 Rey's 综合症的发病机理起重要作用。Tracey 等^[26]证明 HRFABMS 和 B/E linked Scanning 可用于鉴定酰基肉碱。特征酰基肉碱羧酸氧化反应的鉴定有助于对不同病症的诊断,通常 Rey's 综合症患者尿中出现 C6-C10 二羧酸,作者用 HRFABMS 首先发现一个两岁女孩尿中存在 C₆-C₁₂二级羧酸酰基肉碱。

4 结语

HRFABMS 不是一种新的质谱技术,自 Barber 等^[29]在 80 年代初发展 FABMS 以来,HRFABMS 的应用即受到人们的重视,但由于 FABMS 的电离机理比较复杂,二次离子的能量分布比电子轰击产生的离子能量分布要宽得多,而且在进行实际样品测试时,样品离子流往往受到底物或溶剂及杂质的影响,使得 HRFABMS 在技术上比 HREIMS 要困难得多,因此影响其在分析中的应用。在国内质谱界,只有少数实验室曾经应用过这一方法^[2,27]。近两年,我们实验室已开展高分辨快原子轰击质谱的测试工作,应用该法测定了几十例样品的精确质量,取得了较好的效果。

近年来,生物质谱技术的发展可以说是日新月异,新方法、新技术、新概念层出不穷。ESI/MS 和 MALDI/TOF/MS 在生物大分子的分析方面显示了强大的威力,但在质量测量精度方面,上述方法都达不到 HRFABMS 的精度,在精确质量测定方面很有前途的方法是 FT/ICR/MS,据报道其分辨率可达几十万甚至更高,但目前这类仪器由于价格昂贵,普及程度远比不上高分辨磁质谱仪。因此,可以预言 HRFABMS 在生物医学领域将得到越来越广泛的应用。

参 考 文 献

- 1 Ackermann B L,Barbuch R J,Coutant J E. *Rapid Commun Mass Spectrom*,1992;6(4):257~264
- 2 贺晓然,林孝元,何美玉等. *质谱学报*,1993;14(3):26~30
- 3 Pettit G R,Feng Gao,Cerny R L. *J Med Chem*,1994;37:1165~1168
- 4 Namikoshi M,Sivonen k,Evans W R. *Toxicon*,1992;30(11):1473~1479
- 5 Sivonen K,Namikoshi M,Evans W R. *Chem Res Toxicol*,1992;5(4):464~469
- 6 Sivonen k,Carmichael W W,Namikoshi M. *Applied and Environmental Microbiology*,1990;56(9):2650~2657
- 7 Havlicek V,Flieger M,Kren V. *Biol Mass Spectrom*,1994;23(2):57~60
- 8 Folkert R. *Carbohydrate Research*,1994;259:93~101
- 9 方一苇. *质谱学报*,1995;16(1):1~8
- 10 Grafe U,Schlegel R,Ritzau M. *J Natural Products*,1995;48(2):119~125
- 11 Zimmermann ML,Snedden AT. *J Natural Products*,1994;57(2):236~242
- 12 Ankenbauer RG,Staley AL,Rinehart KL. *Proc Natl Acad Sci USA*,1991;88:1878
- 13 Mathews WR,DuCharme DW,Hamlyn JM. *Hypertension*,1991;17(6):930~935
- 14 Noll KM,Rinehart KL,JR,Tanner RS. *Proc Natl Acad Sci USA*,1986;83:4238~4242
- 15 Kikuchi M,Taniyama Y,Kanaya S. *Eur J Biochem*,1990;187:315~320
- 16 Busby W H,Jr Quackenbush G E,Human J H. *J Bio Chem*,1987;262(18):8532~8536
- 17 Iwanaga S,Nishimura H,Kawabata S. *Adv Exp Med Biol*,1990;281:121~131
- 18 Vestling MM,Murphy CM,Keller DA. *Drug Metabolism and Disposition*,1993;21(5):911~917
- 19 Kelly I D,Smith S. *Inter J Environ Anal Chem*,1986;25:136~149

- 20 Shirley M A, Murphy R C. *J Biol Chem*, 1990; 265(27): 16288~16295
- 21 Teffera Y, Baird W M, Smith D L. *J Chromatogr Biomedical Application*, 1992; 577: 67~76
- 22 Sinz M W, Rimmel R P. *Drug Metabolism and Disposition*, 1991; 19(1): 149~153
- 23 Teffera Y, Baird W M, David L, Smith DL. *Anal Chem*, 1991; 63: 453~465
- 24 Miler JZ, David L, Smith DL, Flora L. *Clinica Chimica Acta*, 1983; 183: 109~114
- 25 Tracey BM, Cheng K N, Rosankiewicz J. *Clinica Chimica Acta*, 1988; 175: 79~88
- 26 Stampfli A A, Ballevre O, Fay L B. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1992; 6(9): 547~549
- 27 程光荣, 曹淑兰, 张刚. *质谱学报*, 1994; 15(2): 77~80
- 28 Bobik T A, Donnelly, MI, Kenneth, L, Rinehart K L, JR. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1987; 254(2): 430~436
- 29 Barber M, Bordoli R S, Sedgwick, RD. *J Chem Soc, Chem Commun*, 1981; 325

High Resolution Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry And Its Application In Biomedical Analysis

Qiu Fenghe

(National Center of Biological Analysis, Academy of
Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Received 1996-05-13

Abstract

Since Barber and coworkers developed the method of Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry (FABMS) in the early of 1980's, FABMS has become the most powerful mass spectrometric method for the analysis of polar, involatile and thermo-labile compounds. Considering the usefulness of high resolution FABMS in the evaluation of molecular structures, studies on accurate mass measurement by HRFABMS, and other applications of it have not been carried out extensively, in the present paper the experimental methods of HRFABMS, and the applications of HRFABMS in 4 aspects (small biomolecule, large biomolecule, polar products of drug metabolism and clinical pathological analysis) in the field of biomedical analysis were briefly described.

Key Words: HRFABMS, biomedical analysis, application