

新技术新仪器

质谱法在生物医学中的若干应用

余 秉 良

(航天医学工程研究所)

〔摘要〕 近十余年,质谱法在生物医学研究中的应用有了很大发展,本文对质谱法在研究药物学和毒物学、生物化学、临床化学以及人体代谢物等方面的某些重要进展和应用作一简要介绍。

一、概 况

质谱法被用于有机化学研究已有近二十余年的历史,尤其是质谱与气相色谱联用以后,生物样品中的微量成分的分析也变得容易了。在广泛范围的分子结构定性和定量分析中,没有其他的物理化学技术能超过质谱法的灵敏度和特异性。它已经成为定性定量分析分子量直到1000范围的挥发性和容易衍生化的物质的重要方法。场解吸、快原子轰击、等离子体解吸、激光解吸等电离技术以及离子光学和质量测量等方面的重大改进,使质谱法可以研究质量数为数千的生物样品。有人认为,在其他范围的突破(如Multichannel array detectors)将使质谱法的灵敏度提高到 10^{-15} 克水平^{〔1〕}。

到目前为止质谱学有关论文除了基础理论、仪器及计算机研究以外,在有机质谱应用研究方面,生物化学、生物医学和环境保护已经成为目前最主要的应用领域,内容涉及到脂肪酸、类脂化合物、甾族化物、胆汁酸、氨基酸、肽、核酸、抗菌素、激素、药物代谢物、农药、生物碱、气味物质、毒性残留物、空气污染物和生物体液中的挥发性物质的检测和鉴定^{〔2-5〕}。

质谱法在生物医学中的应用,文献很多,除一般涉及到药物学和毒物学,生物化学和临床化学三部分外,还涉及到食品科学和人体代谢物中挥发性成分的研究。下面就这几部分作一简要介绍。

二、在药物学和毒物学中的应用

质谱法广泛地用于药物结构鉴定和药物代谢的研究。化学电离质谱法(CIMS)常常被

1984年4月20日收

用来筛选血液和尿提取物中的已知药物及其代谢物。例如应用质谱法研究氯霉素代谢机理,发现氯霉素代谢转变成一种化学活泼的中间物⁽⁶⁾。利用GC/MS技术研究 Hydrolazine (一种有效的抗高血压药)的代谢时,发现在人和动物的尿中存在该药的一种代谢物为联氨,此成分可能与药物的副作用有关⁽⁷⁾。

Gudzinowicz, B. J. 等人编著的《气相色谱-质谱分析药物和代谢物》一书叙述了中枢神经系统兴奋剂、止痛剂、局麻剂、抗菌素以及心血管、抗高血压、低血糖和甲状腺病等所用药物的质谱分析⁽⁸⁾。

CIMS负离子在分析许多药物和毒物中对EI和CI正离子是有价值的补充。Brandenberger, H. 等人研究了5,5-二烯丙基-苯巴比土酸的EI正离子质谱和CI正负离子质谱,他们看到在负离子谱中(甲烷反应气),从未饱和侧链丢失质量41产生M-41基峰。有趣的是,EI正离子基峰与CI负离子基峰的质量数相加就得到化合物的分子量(见图1)⁽⁹⁾。

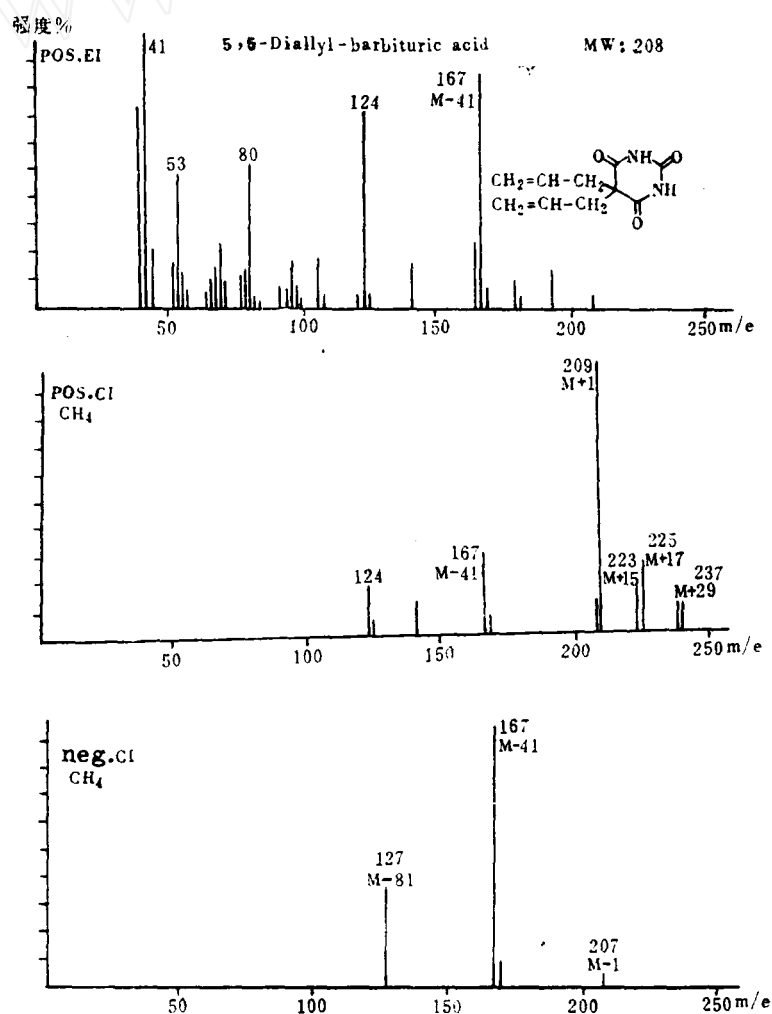


图1 5,5-二烯丙基-苯巴比土酸质谱图

上: EI正离子谱

中: CI正离子谱

下: CI负离子谱

在药物学和环境毒物学范围中,许多重要的毒性化合物都具有高的电子亲合力,负离子检测具有比正离子检测更高的灵敏度。

Brandenberger, H. 等人用电子捕获检测器(ECD)的GC法和负氯离子的CIMS法分析杀虫药六氯化苯和DDT,观察到负离子MS比ECD有更大的线性范围和更高的灵敏度(见图2)^[10]。

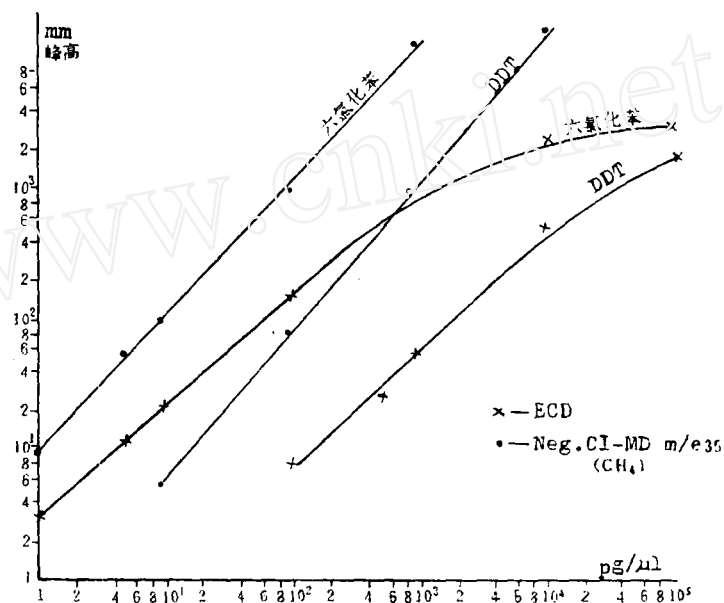


图2 ECD的GC和负离子MS分析微量的DDT和六氯化苯的比较^[10]

分析体液中的氰化物,常规用FID的GC分析法。以后应用热离子氮检测器进一步提高了灵敏度。现在应用CIMS负离子CN⁻来检测体液中的氰化物,能达到与热离子检测器同样的灵敏度^[10]。

质谱技术在分析血中微量毒物的应用,Self, R. 已作了详细综述^[11]。

三、在生物化学中的应用

类固醇是生命活动中起重要作用的一类物质。结合适当的化学衍生化程序,利用GC/MS可以满意地鉴定固醇和类固醇复杂混合物。Siekmann专门评述了分析类固醇激素雌二醇、雌三醇、睾酮、孕酮、醛酮和皮质醇的方法^[12]。该方法是基于利用¹⁴C标记激素类似物作内标的同位素稀释GC/MS分析。

质谱法也适合分析生物样品中游离的或结合的、饱和的或未饱和的脂肪酸。通常应用脂肪酸的甲基酯衍生物进行GC/MS分析,特-丁基二甲基甲硅烷醚在类脂物的分析中也得到广泛应用。

测量生物样品中儿茶酚胺(CA)有许多方法。如比色法、荧光法、放射免疫法、气相色谱法、液相色谱法和色谱-质谱法等。据Ehrhardt等人的报道,荧光法的灵敏度较低,特异性较差。放射酶法灵敏度高,但特异性不理想。气相色谱法和GC/MS法有较高的灵敏度

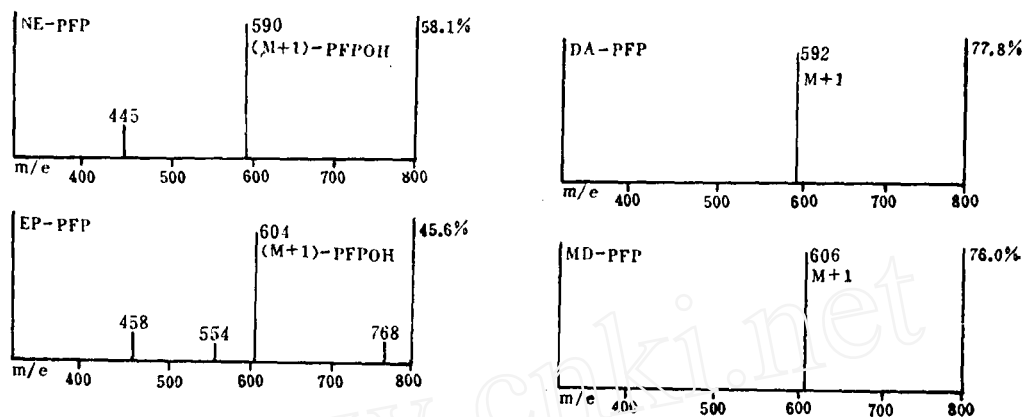


图2 儿茶酚胺的CI质谱图
NE: 去甲肾上腺素, EP: 肾上腺素, DA: 多巴胺,
MO: α -甲基多巴胺。

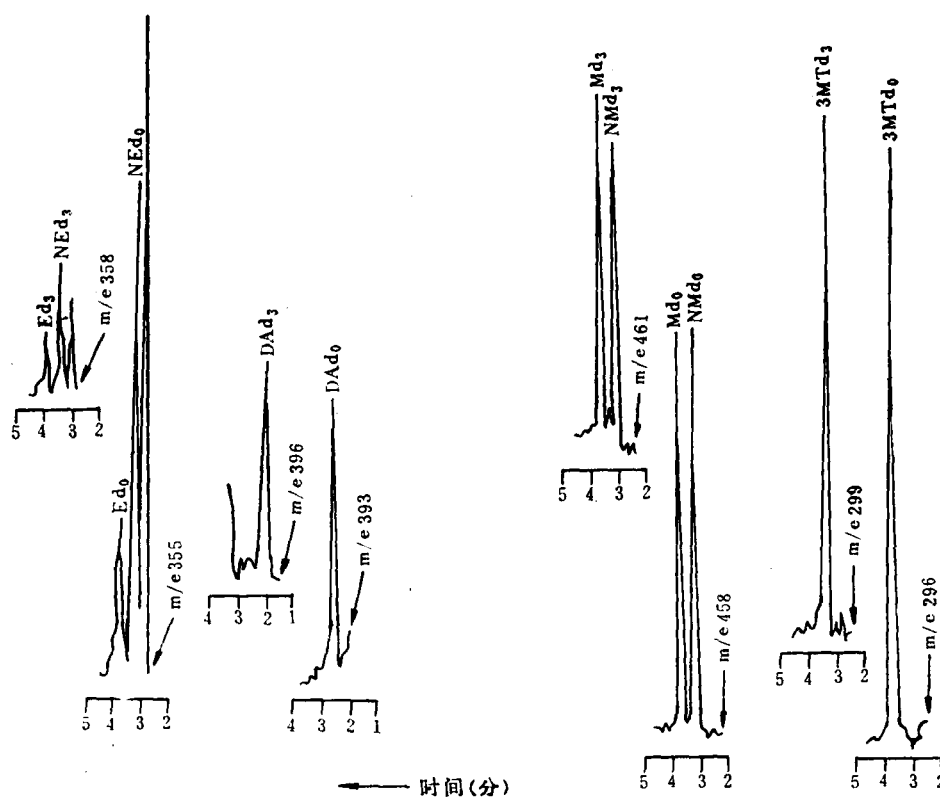


图4 一个正常成人尿中, E、NE和DA的三甲基硅烷-N-三氟乙酰衍生物和M、NM和3MT的五氟丙酰衍生物以及它们氘化内标物的MF图

和特异性^[13]。

Mizuno, Y. 等人用GC/MS化学电离源的质量碎片法定测定脑组织中的CA分布^[14]。他们将样品制备成五氟丙酰衍生物(-PFP), 异丁烷作反应气, 四种成分都给出不同质量数的基峰, 而且这些基峰都在 m/e 590—606之间。因此用质量碎片法能同时监测这四个碎片离

表1 GC/MS 法分析生物样品中化合物

| 内源化合物 | 生物样品 | 内 标 | 衍 生 物* | 质 谱 特 点 | | 测量水平 |
|------------------|-------|----------------|---------------------|---------|------------------------------------|-----------------------------|
| | | | | 离解式 | 仪器类型 m/e | |
| 氨基酸 β-氨基异丁酸 | 尿 | α-氨基辛酸 | N-TFAO-正丁酯 | — | Q 153:210 182:210 304:318 | 11.1—25.7μg/ml ~1nmol/mg |
| γ-氨基丁酸 (GABA) | 脑组织 | 5-氨基戊酸 | 三-TMS | EI | M | |
| 谷氨酸 | 脑脊髓液 | d ₂ | TFA-HFIP | EI | M | 1.34—8.34nmol/mg |
| | 神经组织 | d ₂ | PFP-HFIP | EI | M | 84—120μmol/mg |
| 甘氨酸 | 血浆和尿 | d ₂ | N-TFAO-正丁酯 (异丁烷) | CI | Q | 0.29μg/ml |
| 生物胺 乙酰胆碱 | 脑组织 | d ₉ | 二甲基氨基醋酸乙酯 | EI | Q | 13.5pmol/mg |
| 胆碱 | 脑组织 | d ₉ | 二甲基氨基丙酸乙酯 | EI | Q | 39.2pmol/mg |
| 腐胺 | 血清 | d ₄ | TFA | EI | | 0.13nmol/ml |
| 儿茶酚胺 多巴胺 | 神经组织 | α-甲基多巴胺 | PFP | EI | M | 2—60pmol/mg |
| | 鼠脑纹状体 | α-甲基多巴胺 | HFB | EI | M | |
| | 神经组织 | d ₃ | PFP | EI | M | |
| 正肾上腺素 | 神经组织 | α-甲基正肾上腺素 | PFP | EI | Q | |
| 肾上腺素 | 鼠脑 | α-甲基正肾上腺素 | PFP | EI | M | 1.1—5.7pmol/mg |

续表 1

| 内源化合物 | 生物样品 | 内 标 | 衍 生 物* | 质 谱 特 点 | | 测 量 水 平 |
|------------------------------|----------|---|-------------|---------|-------------------------|----------------------|
| | | | | 离 子 式 | 仪 器 类 型 m/e | |
| 有机酸 神经氨酸 | 鼠 脑 | d ₆ (三氘甲基 酯三氘甲基酯) | Me/N-乙酰/TMS | EI | M 298:301 420:426 | 900nmol/mg |
| 前列腺素和代谢物 PGA ₂ | 血 浆 | d ₄ | Me/TMS | EI | — | 0.056±0.134ng/ml |
| PGE ₂ | 脑: 生物合成率 | d ₄ | Me/TMS | EI | M 321:325 | 266±39pg/mg/60min |
| 类固醇 胆甾烷醇 | 血 浆 | 5 α -胆甾烷 | TMS | EI | M 306:329 | 3.36±0.54 μ g/ml |
| 胆甾醇 | 血 清 | (¹⁴ C)胆甾醇 | TMS | EI | M 458:460 | — |
| 胆汁酸 | 胆 汁 | 氧化共轭化合物 | Me/TMS | EI | M 300-500 | — |
| 醛甾酮 | 尿 | — | TMS | EI | M 401和414 | — |
| 皮质醇 | 血 浆 | (4- ¹⁴ C) | Acetal/HFB | EI | M 539:542 | ~100pg/ml |
| 孕甾酮 | 血 浆 | (4- ¹⁴ C) | MO/TMS | EI | M 605:607 | 25-300ng/ml |
| 维生素 维生素D ₃ | 血 清 | (1,2- ³ H ₂) (4- ¹⁴ C) | MO/TMS | EI | M 605:609 | — |
| | 血 浆 | 二氢发育类脂醇 (DHT ₂) | HFB | EI | M 510:512 | 20-70pmol/ml |
| | 血 浆 | | HFB | EI | M 580:594 | 5-30ng/ml |

* TFA: 三氟乙酸; HFIP: 六氟异丙基; PFP: 五氟丙酰; TMS: 三甲基硅烷; HFB: 七氟丁酰; Me, Et: 甲基, 乙基; MO: 甲酰化物; Ac: 乙酰; Bu: 丁基;
 ** Q: 四级质谱计; M: 磁扇形质谱仪;

子。图3就是这四种成分的CI质谱图。该法灵敏度高,只用5毫克的脑组织也能成功地分析其中的CA。

Muskiet, F. A. J. 等人用氘标记物的GC/MS质量碎片法研究人尿中CA及其代谢物^[15]。作者应用三甲基硅烷-N-三氟乙酰衍生物(-BSTFA),因为它们有极好的GC性能和NE、E衍生物的 α - β 断裂占优势,能得到强的碎片离子 m/e 355。用氘标记相应化合物的衍生物作内标物分析人尿,图4列出了人尿中CA的MF图。该方法在灵敏度、选择性和精确度方面均优于其他方法。

质谱分析生物样品中维生素A和D系列,分析氨基酸、生物聚合物(肽,核苷酸和酯)、神经介质等也是一个有效的技术。表1摘要列出了生物化学研究中某些重要生命物质的GC/MS分析法^[16]。

四、在临床化学中的应用

应用范围主要有四方面:(1)鉴定人体液中的内源或外源性的未知成分;(2)在“代谢特征”(Metabolic profile)研究中作为一种诊断各式各样病理状态的技术;(3)定量分析体液中已知的化合物;(4)在代谢研究中定性定量分析稳定同位素标记化合物。

应用MS定性定量分析人体液中的内源性物质已经是许多课题的重要研究方法。例如有人研究在生理性衰老和老年性痴呆中,脑一元胺、一元胺代谢物和酶的关系^[17]。在早发性痴呆检验中,用质谱检测二种尸胺代谢物^[18]。用质谱法定量检测N-乙酰神经胺和与白血病细胞免疫的关系^[19]。

“代谢特征”的概念由Gates和Sweeley作了很好的叙述^[20]。有人利用玻璃毛细管柱和EI或CI质谱法分析了尿毒症血清中许多化合物的“代谢特征”,为临床尿毒症的诊断和治疗提供了丰富信息。还有许多工作是研究健康人和病人尿中有机酸的“代谢特征”,发现

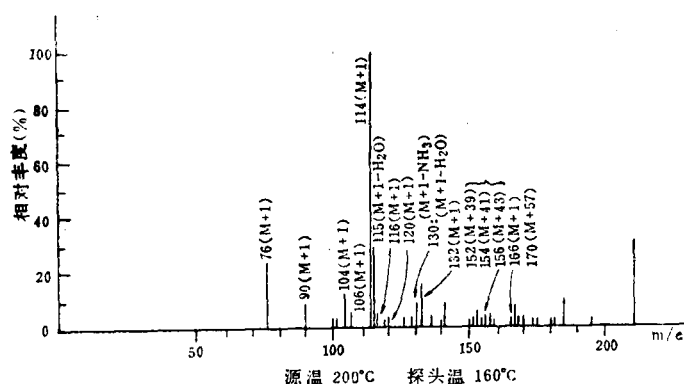


图5 MSUD病人尿的CI质谱(异丁烷)

| | | | |
|-----------|---------------|----------|-------|
| 76: 甘氨酸 | 116: 脯氨酸 | 152 | } 肌酸酐 |
| 90: 丙氨酸 | 120: 苏氨酸 | 154 | |
| 104: 氨基丁酸 | 130: 谷酰胺 | 156 | |
| 114: 肌酸酐 | 132: 亮氨酸/异亮氨酸 | 106: 丝氨酸 | |
| 115: 鸟氨酸 | 166: 苯基丙氨酸 | 170: 肌酸酐 | |

尿中低分子量的酸对于诊断代谢紊乱以及对于提供代谢损害性质都有重要意义。槭糖浆尿病 (Maple syrup urine disease—MSUD) 是由于缺乏某种能分解白氨酸的酶, 从而使患者代谢物具有特殊的糖浆气味。将尿的有机酸制成TMS衍生物, 用GC-MS能诊断MSUD^[21a]。Issachar等人用CIMS直接检测尿中的氨基酸。图5是一个MSUD病人尿酸的特征图^[21b]。

用稳定同位素标记类似物作内标的直接化学离解质谱法来定量检测生物样品中的已知代谢物, 在诊断先天性代谢疾病方面引起了人们的重视。Mee, J. M. L. 利用氘标记氨基酸化合物和CIMS技术来研究甲型氨基异戊酸代谢失调患者和酥氨酸代谢失调病人的血和尿中的氨基酸代谢情况^[22]。

Eldzarn等人估计, 大约有三分之一的遗传性疾病现在能用GC/MS普查出来^[23]。表2摘要列出了能用GC/MS发现的先天性代谢障碍。

表2 用GC/MS技术能发现的先天性代谢病

| 疾 病 | 检测到的化合物 | 疾 病 | 检测到的化合物 |
|-----------|-------------------|-------------|--|
| 亲碱体尿 | 2, 5-二羟苯醋酸 | 高离胺酸血症 | 离胺酸 |
| 先天性乳酸尿 | 乳酸 | 高草酸盐尿症 | 草酸, 羟基醋酸, 乙醛酸 |
| 半胱胺甲硫胺酸尿症 | 半胱胺甲硫胺酸 | 高脯胺酸血症 | 脯胺酸 |
| 胱胺酸尿症 | 胱胺酸 | 高肌氨酸血症 | 肌氨酸 |
| 糖尿病 | 葡萄糖, 羟基丁酸 乙酰醋酸 | 槭糖浆尿病 | 甲型氨基异戊酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, α -酮异戊酸, α -酮异己酸, α -酮- β -甲基戊酸 |
| 原因不明的果糖尿 | 果糖 | Oast-House病 | β -羟丁酸 |
| 原因不明的戊糖尿 | 1-木酮糖 | 鸟氨酸血症 | 鸟氨酸 |
| 单奶糖症 | 半乳糖, 氨基酸 | 乳清酸性尿 | 乳清酸 |
| 1-甘油酸性尿 | 1-甘油酸, 草酸 | 丙酸血症 | 丙酸 |
| Hartnup病 | 中性氨基酸 | 短链脂肪酸血症 | 酪酸, 己酸 |
| 组织胺酸血症 | 组氨酸 | 甲基丙二酸血症 | 甲基丙二酸 |
| 羟基赖胺酸尿症 | 羟基赖胺酸 | | |
| 羟基脯胺酸血症 | 羟基脯胺酸 | | |

五、人体代谢物挥发性成分的研究

现在已经从人体中检测到数千种化合物, 其中许多是挥发性有机物, 目前已定性的有数百种。这些化合物的来源有: 环境污染、正常和病理代谢物、口腔、肠道和皮肤上微生物的付产物以及饮食中的食入成分^[24]。研究表明, 人体挥发物既是制定机体生理状况的重要信息, 又是密闭环境空气污染的重要来源。因此, 引起了许多不同学科的学者注意。

由于人体挥发性混合物的复杂性, 经典的化学分析法已不能满足需要。GC/MS法则提供了有效的手段。

头皮含有高密度的皮脂腺。头皮的气味来自头皮表面的皮屑芽孢菌属 (Pityrosporum

ovale) 和毛束内的初丙酸菌属 (*Propionibacterium acnes*) 对皮脂的一连串作用, 最后产生较易挥发的产物。用GC和MS法分析离体皮屑芽胞菌属培养物的顶隙气 (Headspace) 表明, 这些挥发成分有一系列的内酯和芳香醇。γ-内酯的MS碎片图中的主要峰是m/e85离子, 它是五元内酯环上烷基侧链的断裂所形成的 (见图6)^[24]。

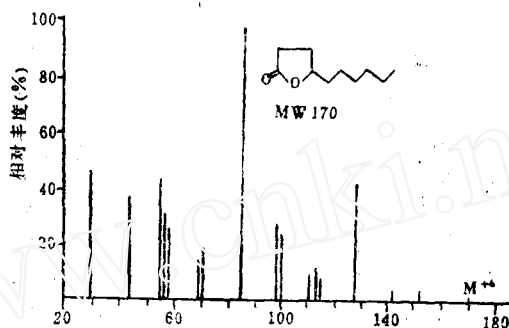


图6 癸烷内酯质谱
(介面温度260℃, 离化电压70eV,
离子源温210℃)

Conkle, J. P., Krotoszynski, B. 等人分别应用GC/MS法检测正常成人的呼出气中的微量成分, 取得很好的效果^[25,26]。Ellin, I. R. 等人应用GC/MS法检测出整个人体挥发物中300—400种成分。其中已定性的约有135种^[27]。它们包括许多种烃类、酮类、醇类和杂环化物。表3列出了定性结果。

有人用GC/MS法研究正常人和牙患者口腔气中和唾液中挥发物的成分和特征, 为鉴定

表3 全身顶隙气的挥发物

| 化合物类型 | 种类 | 链直 | 支链 | 环状 | 其他成分和注解 |
|--------|----|------------|----------|----|--|
| 饱和烃 | 15 | 9 | 4(全是甲基) | 2 | 在这一组中, n-C ₁₂ 是最大的。 |
| 不饱和烃 | 23 | 14 | 6(乙基和甲基) | 3 | 蒎烯, 蒎烯, 环己烯。 |
| 醇 | 24 | 10 | 8(乙基和甲基) | 1 | 还有三个不饱和的醇, 乙二醇和丙三醇。 |
| 酸 | 2 | 2 | — | — | 乳酸和丙酮酸。 |
| 胺 | 8 | 5 | 2 | — | NH ₃ |
| 酮 | 9 | 6 | 2(全是甲基) | 1 | 环己酮 |
| 醛 | 8 | 6 | 1(乙基) | — | 丁烯醛 |
| 酯 | 6 | 6 | — | — | 甲基、丁基、戊基和烯丙基酯 |
| 腈 | 4 | 4 | — | — | C ₅ |
| 硫醇 | 5 | 5 | — | — | C ₁ 、C ₄ 、C ₅ 、C ₆ 、C ₇ |
| 醚 | 2 | 2 | — | — | 二甲基和己二烯醚 |
| 卤代烃 | 1 | 1 | — | — | 二氯丁烷 |
| 芳香烃和杂环 | 24 | 含N、O、S的化合物 | | | |

口腔疾患的诊断提供了有益的依据〔24〕。

化学通信存在于一些昆虫和哺乳动物中的事实已经得到证实。科学家利用 GC/MS 法研究昆虫释放出的气味（性外激素）来进行生物防治的研究已经取得显著成效。因此许多科学家推测人体挥发物能否传递信息，目前已经进行了一些初步探讨。GC/MS 法在这个领域中将有广阔的前景。

六、结 束 语

1. 近些年来，质谱法在生物医学研究中的应用有了很大发展。质谱技术由于它本身固有的优越性，已经成为生物医学研究中的重要和有效的手段。生物医学质谱已经发展为有机质谱的一个新的分支。在许多研究成果中，质谱技术作出了至关重要的贡献。

2. 稳定同位素标记技术使质谱法在生物医学的应用领域更加广阔。采用稳定同位素标记类似物作为内标的直接化学离解质谱法来定量检测生物样品中的已知代谢物，为临床日常分析提供了有效的手段。而且对于诊断和研究各种先天性代谢疾病也是一个有效的途径。可以预料，一种新的直接质谱系统可能在临床日常分析中得到开发。

3. 在生物医学研究中，经常遇到一些大分子和热不稳定的化合物。虽然快原子轰击电离方法为这类物质的分析开辟了新的途径，但是，GC/MS法目前仍然是生物医学领域中最广泛使用的技术。

制备衍生物是一个很重要的辅助技术。对于生物医学中常见的化合物，现在已有许多可供参考的方法。对于制备的衍生物，总的要求是应有好的色谱性能和适合质量碎片法分析用的特征离子。

4. 质谱技术的特点在于它的高灵敏度和高特异性。但是质谱仪器价格昂贵，操作复杂，需要熟练的操作和维修人员，这在一定程度上又限制了质谱技术的迅速推广和应用。象呼吸质谱仪那样，可望今后开发一些单功能的小型专用质谱仪，如果在样品的前处理和进样技术方面有所突破，将为质谱法在生物医学领域的应用开拓更广泛的前景。

参 考 文 献

1. Burlingame, A. L. et al., Anal. Chem., Vol. 52, №5 (1980)
2. Frigerio, A. Ed., Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine, Vol. 1, Plenum Press, New York, 658 (1978)
3. Frigerio, A. Ed., Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine, Vol. 2, Plenum Press, New York, 492 (1979)
4. Waller, G. R. et al., Biochemical Applications of Mass Spectrometry, Wiley-Interscience, New York, 1279 (1980)
5. Leenheer, O. P. et al., Ed., Quantitative Mass Spectrometry in Life Sciences II, Elsevier Scientific Publishing Company, 501 (1978)
6. Pohl, L. R. et al., Biochem. Pharm. 27, 491 (1978)
7. Noda A. et al., Chem. Pharm. Bull. 27, 1938 (1979)
8. Gudzinowicz, B. J. et al., Analysis of Drugs and Metabolites by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Vol. 4, Marcal Dekker, New York, 458 (1978)
9. Brandenberger, H. et al., Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine, Vol. 1, Plenum Press, New York, 327 (1978)
10. Brandenberger, H. Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and

- Medicine, Vol. 2, Plenum Press, New York, 227 (1979)
11. Self, R. *Biomed. Mass Spectrom.* **6**, 361 (1979)
 12. Siekmann, L. J. *Steroid Biochem.* **11**, 117 (1979)
 13. Ehrhardt, Jean-Daniel et al., *Clinica Chimica Acta*, Vol. 88, №1, 71 (1978)
 14. Mizuno, Y. et al., *Clinica Chimica Acta*, Vol. 98, 217 (1979)
 15. Muskiet, Frits A. J. et al., *Clin. Chem.* Vol. 25, №3, 453 (1979)
 16. Leenheer, A. P. D. et al., *Biochem. Applicat. of Mass Spectr.* A Wiley-Interscience Publication, New York, 1169 (1980)
 17. Winblad, B. et al., *Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*, Vol. 1, 253 (1978)
 18. Dolezalova, H. et al., *Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*, Vol. 2, 269 (1979)
 19. Roboz, J. et al., *Quant. Mass Spectr. in Life Sciences II* 191
 20. Gates, S. C. et al., *Clin. Chem.* Vol. 24, 1663 (1978)
 - 21a. Chalmers, R. A. et al., *Clin. Chim. Acta*, Vol. 52, 43 (1974)
 - 21b. Issachar, D. et al., *Clin. Chim. Acta*, Vol. 73, 307 (1976)
 22. Mee, J. M. L., *Quantit. Mass Spectr. in Life Scie. II* 227
 23. Eldzarn, L. et al., *Mass Spectrom in Biochem. and Med.* Frigerio, A. Eds., Raven, New York, 294 (1974)
 24. Sastry, S. D. et al., *Biochem. Applic. of Mass Spectr.* A Wiley-Interscience Publication, New York, 1086 (1980)
 25. Conkle, J. P. et al., *Archives of Environmental Health*, Vol. 30, №6, 290 (1975)
 26. Krotoszynski, B. et al., *J. Chromatog. Sci.* Vol. 15, 239 (1977)
 27. Ellin, R. I. et al., *J. of Chromatog.* Vol. 100, 137 (1974)

Some Applications of Mass Spectrometry to Biomedicine

Yu Bingliang

(Institute of Space Medico-engineering, Beijing)

Received 20, April 1984

Abstract

Significant advances in the application of mass spectrometry to biomedical research have been made at dramatic pace over the past ten years. In the present paper some important developments in this field and the novel applications of mass spectrometry to studying pharmacology and toxicology, biochemistry, clinical chemistry, as well as research for volatile constituents of human metabolites, have been reviewed in brief.