

质谱与微透析应用进展

龚宽平, 熊少祥*

(中国科学院化学研究所北京质谱中心, 北京 100080)



[作者简介]: 龚宽平, 1998 年毕业于武汉大学环境科学系, 2001 年就读于中国科学院化学研究所北京质谱中心, 为在读硕士研究生, 主要研究课题为生物与微透析谱联用极其在生物神经分析中的应用。

摘要: 微透析(Microdialysis, MD)是一种优良的在线取样方法, 而质谱(MS)作为分析手段, 具有进样量少, 灵敏度高, 分析快捷等优点。因此, 微透析与质谱联用, 对活体生物样品进行在线检测具有不可替代的作用。通过 35 篇文献介绍了微透析技术的基本原理, 实验方法; 评述了微透析与质谱串联用于样品除盐, 生物活性物质在线检测, 药物代谢等领域的应用进展。

关键词: 质谱学; 微透析进展; 电喷雾电离; 基质辅助激光解吸电离(MALDI)

中图分类号: O 657. 63; R 741 文献标识码: A

文章编号: 1004-2997(2003)02-425-09

微透析(Microdialysis, MD)是一种优良的在线取样方法, 其最大的优点是: 在基本不干扰生物体内正常生命过程的情况下, 进行活体(In vivo)、实时(In time)、在线(On line)取样, 特别适合研究生命过程的动态变化。Bito 等于 1966 年首先报道了应用半透膜可以用在对狗的血浆和大脑的细胞外液的取样分析, 随后微透析广泛应用于生物活体的神经传质的研究, 由于质谱分析的快速, 灵敏和进样量少等特点, 其与微透析联用对生物活体的在线研究有不可替代的作用。

微体取样能力的要求, 使得微透析在酶和底物的特性分析研究中成为重要的手段, 尤其是与高灵敏的检测系统联用时。质谱作为一种有力的检测手段, 得到的分子离子和碎片离子, 可以较好地提供样品的结构信息。随着电喷雾电离源(ESI)和基质辅助激光解吸电离源(MALDI)的应用和发展, 质谱越来越成为生物分子的一种重要分析技术, 尤其是 ESI/MS 可以通过碰撞诱导解吸(CID)提供生物大分子的基本序列信息和结构信息, 其重要作用已日渐突出。质谱在生物

样品分析中的最大缺陷是存在一些物质效应, 如盐及小分子物质的存在, 将严重影响样品分子的离子化效率, 导致检测灵敏度下降, 甚至无法得到检测信号。因此, 用微透析脱盐, 除去生物样品基质的干扰, 也成为其在质谱应用中的一个重要方面。Liu 等^[1]对 DNA 等生物样品分析时, 应用在线微透析可以降低盐的浓度至 250 mmol, 证实了微透析去盐的快速和高能力。

1 透析原理

微透析采用透析技术, 关键部分是透析膜, 仅仅允许水分子和其他小分子透过, 膜内灌注液体介质, 这种介质与膜外液流(通过向两个方向的扩散)达到平衡。微透析体系的基本部件包括: 透析针, 连接管, 灌注介质, 注射泵, 样品收集器等示于图 1。样品可以通过样品收集器收集, 也可以通过在线注射阀引入分析系统。实验动物置于相应设计的装置中, 要求动物自由活动而不影响或者破坏连接管。

收稿日期: 2003-03-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20035010、20175033)

作者简介: 龚宽平(1975~), 男(汉族), 湖北潜江人, 在读硕士研究生, 分析化学专业

E-mail: gkp@iccas.ac.cn

* 通讯作用: 熊少祥, 副研究员, 电话: 010- 62554495, E-mail: msbj@iccas.ac.cn



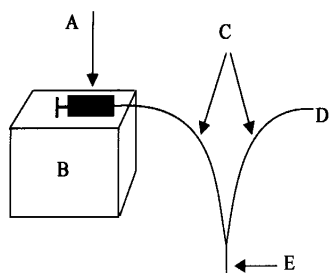


图 1 基本微透析系统示意图

A—灌注液(在透析针内); B—注射泵; C—连接管;
D—样品收集; E—微透析探针

Fig 1 Schematic diagram of basic microdialysis system

A — Perfusate (in syringe); B — Syringe pump;
C — Connective tubing; D — Sample;
E — Microdialysis probe

微透析探针的设计大致有三种: 线型方案, 同轴方案, 并列分路式方案, 其示意图示于图 2。透析针插入生物组织或生物母体, 灌注液由注射器推入膜内套管, 透析膜孔径大小允许小分子自由扩散通过而阻止蛋白质等大分子通过。被测分子足够小可以扩散通过透析膜, 透析液按顺序依次通过内外套管, 出口管, 样品收集器进行样品收集或在线分析。

透析针的选择主要根据插入的部位而定。线型方案使透析针插入球型组织时非常有利; 而在活体脑透析中, 同轴型针使用最为典型和普遍。并列式方案和环型方案实际上是同轴型的改进模式。前者由熔融硅管相互并列粘合, 表面覆盖

一层柱型透析膜。这种设计考虑到在动物运动时允许透析针弯曲以免结构损伤; 后者透析膜的长度相对较长, 约 2~4 cm, 适合于皮下组织、腹膜取样。并列分路式透析针, Lunte 和 Gunaratna 分别应用于胆汁的活体微透析取样, 得到较高的回收率。

十几年前就有工作者开始尝试微透析与质谱的联用。1990 年 Menacherry 和 Justice 将微透析与热喷雾串联质谱联用, 测定了老鼠脑细胞外液多巴胺水平; 1991 年 Caprioli 和 Lin 采用 FAB-MS 检测了老鼠体内盘尼西林的药物动力学过程; 液相色谱质谱联用及电泳质谱联用也逐渐被报道。微透析效率取决于透析针的透析效率。描述透析针的透析效率时, 科学工作者通常采用 Bungay-Morrison 模式^[2], 定义透析分数(EF)为:

$$EF = (C_d^{out} - C_d^{in}) / (C_b - C_d^{in})$$

$$= 1 - \exp[-1/Q_d(R_d + R_m + R_{ext})] \quad (1)$$

式(1)中, C_d^{out} , C_d^{in} , C_b 分别为样品在透析液、注射液和生物过程中的分析浓度; Q_d 为注射速度; R_d , R_m , R_{ext} 分别由透析液、透析膜和生物反应溶液引起的对扩散的阻力。

当注射速度一定, 同等几何尺寸下, 选择不同膜的关键取决于 R_m :

$$R_m = \ln(r_0/r_1) / L_{edl} D_{eff} \phi \quad (2)$$

式(2)中, r_0 , r_1 分别为膜的内径和外径; L_{edl} 为膜的有效透析长度; D_{eff} 为膜中水相有效扩散系数。当膜安装到透析针后, 其几何尺寸 L_{edl} 就固定下来, 不再影响 EF 值。

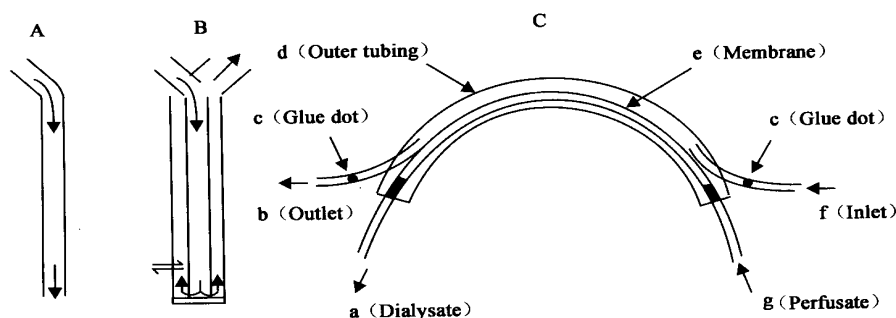


图 2 微透析探针设计三种方案示意图 (A) 线型; (B) 同轴型; (C) 并列分路型
(图中阴影部分代表透析膜, 箭头指向为注射液流过探针的方向)

Fig 2 Sketch map of microdialysis probe design

(The shading area represents the dialysis membrane. A arrows refer to direction of flow of perfusate through probes)
(A) Linear; (B) Concentric; (C) Shunt

事实上,膜总是对其环境作出响应。膜与生物基质的作用显然会影响式(2),这种效应常常是使EF的起始值降低,为此Andrade效应因子被引入作 R_m 的实际校正:

$$R_m = \ln(r_0/r_1)/\Delta_{\text{eff}} D_{\text{eff}} \phi + A \quad (3)$$

当生物作用环境变化时,A实际上包括了膜-蛋白质,膜-分析样品等其它相互作用的总和。所以,在管内或者是活体微透析取样中,必须保证微透析膜在整个研究过程中的有效寿命。

2 MD 技术的质量问题

应用微透析技术进行生物活体在线研究,如何对被测样品进行有效的定性和定量分析非常重要。微透析取样是在非平衡条件下取样。所以,所测得透析液中化合物的浓度只是探针周围样品基质中该化合物实际浓度的一部分。透析液中待测化合物的浓度与其在样品基质中浓度的关系被称为探针的提取分数(Extraction fraction, EF)。影响EF的参数有温度、灌流液流速、透析膜的化学和物理性质,探针的几何形状、膜表面积、待测化合物的理化性质及其在基质中的扩散速度。在正常微透析取样操作条件下,这些参数均保持恒定,因此,尽管未建立平衡但却快速地达到了稳态。在实际应用过程中,用回收率或释放(Delivery)实验来确定探针的EF,进而求得实际的样品浓度。具体方法如下:

2.1 流速法(Flow rate method)

早在1985年Jacobson等通过测定在不同注射速度条件下微透析液中待测化合物的浓度,观察EF与注射速度(F)、膜面积(A)、平均物质传递系数(r)等相关,于是,通过实验总结出如下非线性回归规律:

$$C_{\text{dial}} = C_0 (1 - \exp^{-rA/F}) \quad (4)$$

式(4)中, C_0 为探针周围样品基质中待测化合物浓度,假定样品基质中待测化合物浓度与探针膜内浓度处于平衡状态,则所测得微透析液中待测化合物的浓度即为取样部位样品基质中的浓度 C_{dial} 。

2.2 极慢流速法(Use of very low flow rate)

Justice等发现,在灌流速度低于50 nL/min,分子量小于500 D的化合物回收分数高于95%;在极慢灌流速度下,回收率达到100%,所引入的误差可忽略不计^[3]。利用这种方法进行研究时要解决微透析液样品收集和分析都比较困难。非在线分析一般至少需要2 μ L样品,所以要考虑延长取样时间以收集足够量的样品,并要能够处理少量样品所存在的诸如蒸发之类的问题。

不过使用在线系统(如微透析取样结合毛细管电泳或毛细管LC)有可能实现纳升级样品的分析。

2.3 零净流量法(Zero-net flux method)

用一系列含有已知浓度($C_{p,i}$)的待测化合物溶液注射入探针;稳定条件下,流出透析液的浓度(C_e)是可测定的;注射基质中这些待测化合物在透析前后的浓度差($C_{p,f} - C_{p,i}$)与初始注射液浓度存在线性关系示于图3^[4]。直线斜率的绝对值即为化合物的提取系数EF,Y轴截距为净流量点——既没有损失也没有得到,表征了待测化合物在组织中的浓度。该方法比反透析法更准确,在于它用实际研究的化合物自身校正,但数据量大而操作过程耗时。该方法在探针校标过程中 $C_{p,i}$ 的持续稳定,在药物动力学研究中影响了实验间参数的设定,所以此方法不适用药物动力学的研究。

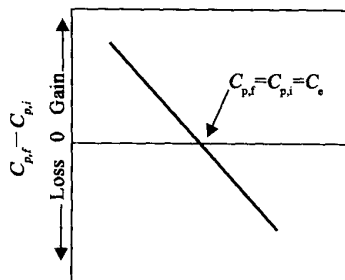


图3 应用于活体微透析探针回收率测定的净零流量法的示意图

Fig 3 Typical plot of a zero-net flux method used to determine in vivo probe recovery

2.4 反透析(Retrodialysis)

反透析法实际是净流量分析的一种特例。取样时将一种内标物加到注射液中,测定该化合物向组织中的穿过速度。假定待测化合物的体内回收率与内标物向组织中的穿过量相等。该方法要求内标物与待测化合物物理特性和生物特性各方面均完全相似,否则EF准确性是不可靠的。反透析法改良后的释放量法能克服应用一种类似物作内标所引入的不确定因素^[5]。就是测定分析样的释放量,并且假定同一物理条件下EF是不变的。释放量就是从注射液里损失的浓度相对于当样品浓度为零时注射液起始浓度的比值。因为释放量的测定只需要注射液的浓度和透析液的浓度,所以释放量法对管内和活体实验具有决定性意义。如果建立了EF和释放量的关系,那么就可以通过测定释放量来得到EF的值。Zhao等对此项研究做了深入探讨,并且讨论了在不同流速,不同膜的几何尺寸,不同pH值下两者有

固定的比例关系。

3 质谱与微透析体系的联接

解决微透析技术中样品的分析方法问题是成功应用该项技术的必要前提,在开发分析方法时首先要考虑微透析取样的特点。由于使用低流速,微透析样品量一般只有 $1 \sim 10 \mu\text{L}$,另外收集样品时,透析过程也不可避免地会稀释样品。样品量少、浓度低 ($1 \text{ pmol} \sim 1 \mu\text{mol}$) 的特点为建立分析方法提出了极大挑战。要求使用的分析方法具有灵敏度高、样品量少、分析速度快的特点,最

好利用在线分析对微量样品进行实时操作以减少实验误差。描述以微透析取样为基础的色谱联用体系示于图 4。^[6]该体系可以用于流动注射分析 (FIA) 和色谱分析。只要开启阀门 A, FIA 模式中灌注液由注射器在线注射,在进入生物传感器或质谱前通过阳离子交换膜去盐。如果采用色谱模式,分析样直接被积分脉冲电化学检测器 (Integrated pulsed electrochemical detector, IPED) 检测。原位取样、样品净化、高效分离、在线去盐、直接电化学检测、质谱检测等技术联合使用在生物分析过程中是不可或缺的。

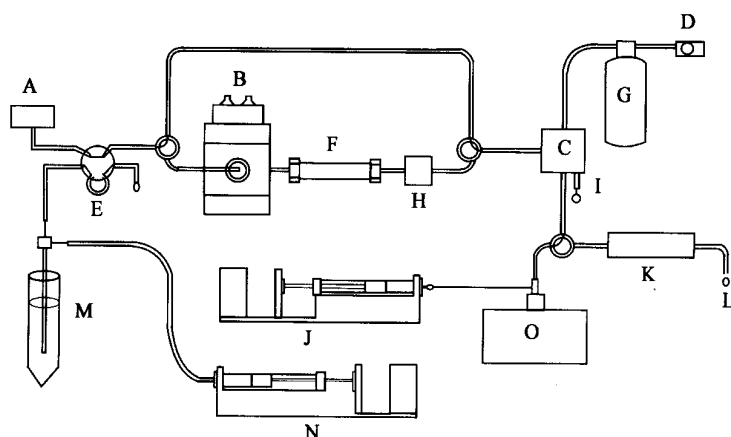


图 4 整合有脉冲电化学检测, 生物传感器, 质谱, 在线阳离子交换膜去盐, 流动注射或离子交换色谱的微透析体系

A—流动注射 (FIA) 泵; B—色谱系统; C—糖膜脱盐器; D—压缩机; E—进样环管; F—分析柱; G—再生水; H—电化学检测室; I—排泄物; J—注射泵 B; K—生物传感器; L—排泄物; M—微透析探针; N—注射泵 A; O—质谱计

Fig 4 Typical microdialysis-based system coupled with flow injection analysis (FIA) or high-performance anion exchange chromatography (HPAEC); integrated pulsed electrochemical detection (IPED); biosensor; mass spectrometry (MS) and on-line cation exchange membrane desalting device (CEMDD)

A—FIA pump; B—Chromatographic system; C—Carbohydrate membrane desalter; D—Compressor; E—Sample loop; F—Analytical column; G—Regenerating water; H—Electrochemical detector cell; I—Waste; J—Syringe pump B; K—Biosensor; L—Waste; M—Microdialysis; N—Syringe pump A; O—Mass spectrometer

Kerns 等^[7]1999 年报道的串联质谱 (MS/MS) 与微透析取样的连用体系示于图 5, 并对毒品代谢、酶催化反应和蛋白质配体络合反应做了在线检测和管外检测实验, 证实了这套设备的优越性, 使用热喷雾和电喷雾接口的检出限分别达到 $100 \mu\text{g/L}$ 和 $200 \mu\text{g/L}$, 而且有效地减少了样品存贮和预处理步骤。同时, 通过串联质谱的 SRM 响应 (选择反应检测), Kerns 等研究了取样时间、透析液流速、微透析取样效率等因素对实验结果的影响, 并对实验条件进行了优化。对热喷雾接口优化结果为: 透析针尺寸: 20×0.4

mm ID, 4 mm 膜; 透析速度: $10 \mu\text{L}/\text{min}$; 切换阀尺寸: $200 \times 0.12 \text{ mm ID}$; 醋酸铵反冲洗速度: $1.5 \text{ mL}/\text{min}$; 碰撞气 (氙气): 93 mPa , 50 eV ; 透析速度比通常用于微透析的要高些, 然而这样减少了流体传输时间, 降低了稀释作用。透析针与切换阀连接, 透析液在 1.0 min 内捕集到切换阀的 $50 \mu\text{L}$ 样品环中, 然后用 50 mmol 的醋酸铵反冲洗出来。切换阀通过 $200 \text{ mm} \times 0.26 \text{ mm ID}$ 的管道连接到有一 $100 \mu\text{L}$ 样品环管进样阀, 样品被进样到 MS/MS。在电喷雾中, 整套微透析取样和热喷雾多级质谱装置流程类似图示于图

5, 只不过微透析针直接连接到电喷雾接口, 安装在 MS/MS 底盘上。氙气的流量为 450×10^{12} 原子/ cm^2 , 能量为 50 eV。对多肽样品而言, 透析流体是为 0.1% 醋酸; 对其他样品选择 2 mmol 的醋酸铵。该体系也适用于快原子轰击 (FAB) 离子源, 有科学家使用 FAB 对盘里西林 G 和 V、

可卡因、丙戊酸、含磷物质在生物活体内代谢产物等进行了在线质量分析^[8~11]。1999 年 Wong 及其合作者^[12]采用类似但更为简洁的 MD-LC-MS/MS 装置在线测定了活体老鼠的褪黑色素, 其装置与图 5 不同之处是用一个在线注射器代替了切换阀和进样阀。

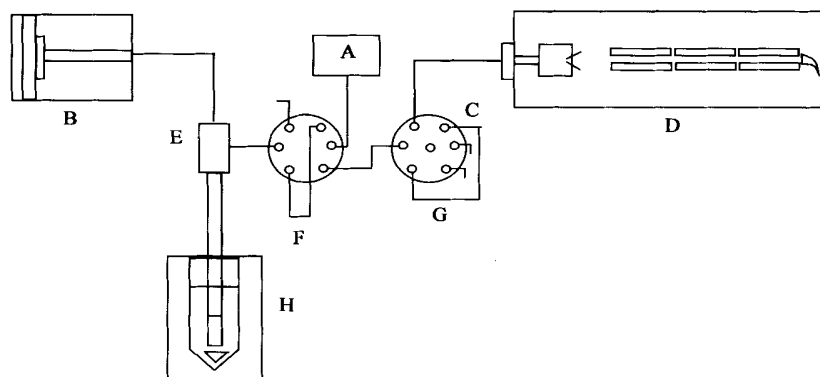


图 5 微透析取样和热喷雾多级质谱装置流程类似图

(整个电喷雾体系与此图类似, 除了微透析可以不需要连接阀而直接连到电喷雾接口)

A—HPLC 泵; B—灌注泵; C—热喷雾接口; D—串级四极杆质谱计;

E—微透析探针; F—开关伐门; G—灌注液注入伐门; H—微管型反应器

Fig 5 Apparatus design for integration of microdialysis sampling with thermospray

MS/MS (component not to scale)

(The integrated electrospray system is similar, except that MD dialysis was allowed to follow directly to the electrospray interface without intervening valves)

A—HPLC pump; B—Syringe pump; C—Thermospray interface; D—Tandem quadrupole mass spectrometer;

E—Microdialysis probe; F—Switching valve; G—Syringe loading valve; H—Micro-vial reaction vessel

4 ESI-MS 除盐接口

近年来色谱联用技术受到了广泛关注, 尤其是电喷雾质谱, 因为其在原理上很容易与高效分离技术如 HPLC 偶联。然而, 当盐和其它小分子杂质存在时, 给样品的离子化带来很大困难, 所以目前实践中 ESI-MS 主要还是与反相色谱偶联。离子交换、憎水交互作用、亲和色谱等技术是非常流行的生物分离技术, 它们能很好的保存蛋白质的生物活性和天然结构, 可是这些色谱技术都采用含高盐缓冲试剂, 为解决这一难题, Dwilson 等^[13~16]做了不懈努力。目前最常用的去盐方法是反相柱子的 2-D 色谱, 其缺点是体系复杂, 操作耗时; Kable 等^[17, 18]尝试过离子捕获技术, 然而这种技术却不适应延时操作, 因为离子捕获模式下离子很快就会趋向饱和。利用在线透析可以很好使生物质谱分与液相色谱柱偶联, 而且具有高通量的特征。基于此, Liu 等^[1, 19, 20]做了许多有益的工作。Canarelli 等^[21]用

透析对质谱和色谱偶联体系的示意图示于图 6。这种偶联模式具有模块化特点, 其在线透析仪的各部分可以快速互换, 而且, 在线透析仪能调节流过其中的缓冲液温度, 准确的温度控制对完善去盐过程是必要的。除了离子交换色谱外, 其它应用含盐缓冲液的色谱也可使用这种接口来偶联 ESI-MS, 可测定分子量高达 150 000 D 的抗体蛋白。Lamoree 等^[22]也曾报道过用类似装置实现了等电聚焦-微透析-质谱 (IEFMD-MS) 的偶联。

Liu 等^[1]设计的利用微透析膜接口, 将电喷雾质谱与离子型高效液相色谱偶联。除盐的装置示意图示于图 7。该体系的除盐效果示于图 8。可见, 在用 5 mmol 缓冲液, 100 mmol NaCl 盐 (图 8A) 和 50 mmol 缓冲液, 1 mol NaCl 盐 (图 8B) 配制的样品溶液条件下, 均可得到清晰的样品多电荷质谱峰。

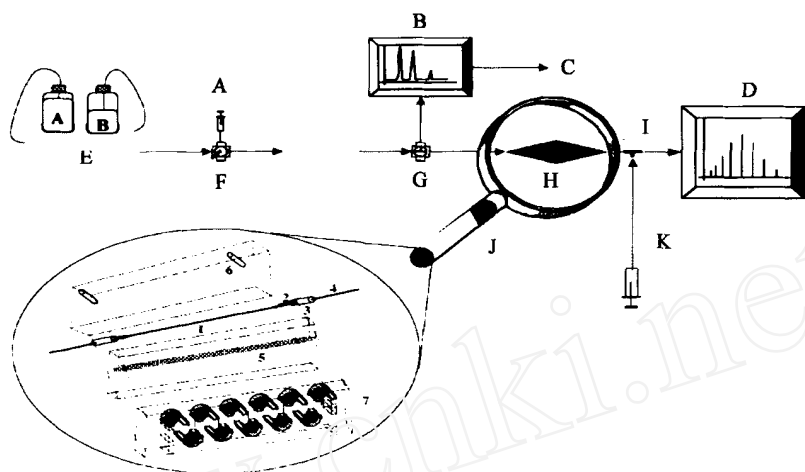


图 6 在线微透析液相色谱电喷雾质谱偶联装置示意图

(图中放大的微透析部分为: (1) 空心纤维; (2) 微密封套管; (3) PTFE 管; (4) 熔硅毛细管; (5) 微透析通道; (6) 微透析缓冲液进口; (7) 包括加热体系的低端部分)

A—样品注入; B—紫外探测器; C—收集器或排泄物; D—质谱计; E—泵;
F—柱子; G—分流器; H—透析器; I—三通阀门; J—灌注泵; K—鞘液

Fig 6 Sketch map of electrospray ionization mass spectrometry directly coupled with liquid chromatography through on-line microdialyzer

(Insert: Microdialyzer with (1) Hollow fiber; (2) Micro-tight tubing sleeves; (3) PTFE tubing; (4) Fused-silica capillary; (5) Dialysis channel; (6) Dialysis buffer inlet; (7) Lower end part of the module including heating system)

A—Sample injection; B—UV Detector; C—Collector or waste; D—Mass spectrometer; E—Pump;
F—Column; G—Splitter; H—Dialyser; I—Tee; J—Syringe pump; K—Sheath liquid

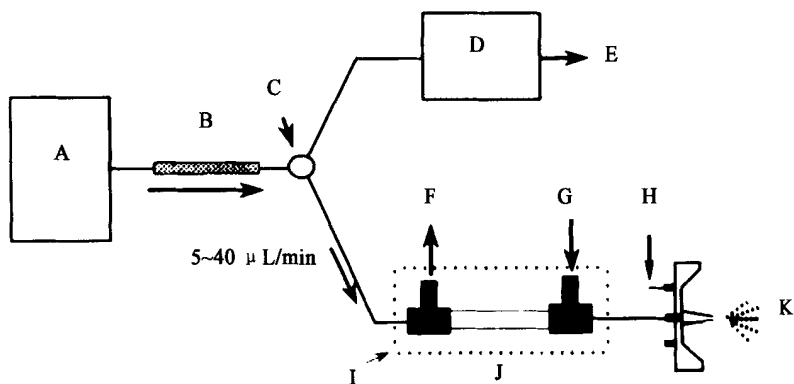


图 7 高效液相离子色谱在线微透析联用示意图

A—HPLC 泵; B—HPLC 柱; C—针形阀门分流器; D—紫外探测器; E—样品收集或排泄物;
F—缓冲液输出; G—缓冲液输入; H—鞘液; I—水浴; J—在线微透析分析; K—电喷雾电离质谱计

Fig 7 Sketch map of ionic HPLC coupled with on-line microdialysis-ESIMS system

A—HPLC pump; B—HPLC column; C—Needle valve splitter; D—UV Detector; E—Sample collection or waste;
F—Buffer out; G—Buffer in; H—Sheath liquid; I—Water bath; J—On-line microdialysis; K—ESIMS

5 质谱-微透析联用在生物学中的应用

5.1 研究颅脑的分子生物化学机理

为了深入了解人类内心世界即意识领域的活动规律, 在分子水平对其脑部或者相关器官的

化学物质进行探究, 无疑为科学工作者提供了有力证据。现代科技发展表明, 微透析确实可以用来分析, 探测甚至实时控制大脑的生命活动。主要包括 (1) 检测乳酸含量变化来分析代谢性功能

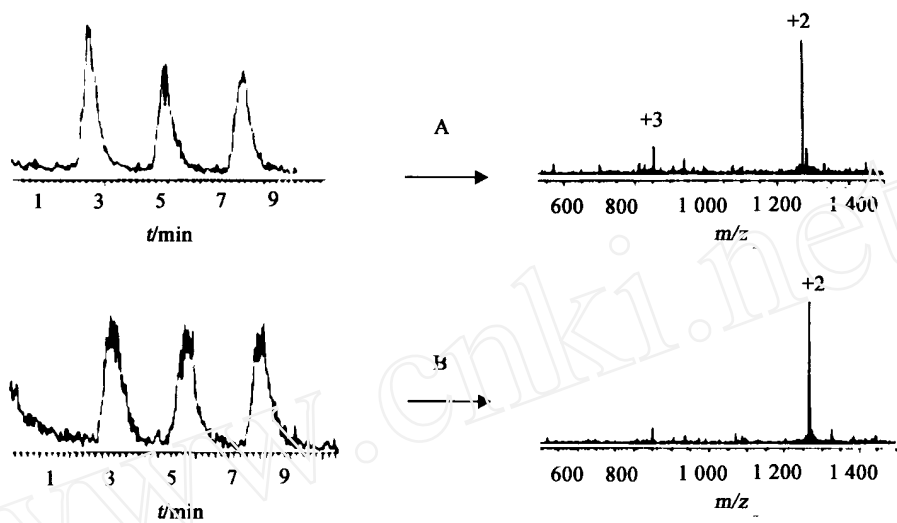


图 8 图 7 所示装置的微透析除盐效率
(流动相为(A) 5 mmol 缓冲液和 100 mmol NaCl; (B) 50 mmol 缓冲液和 1 mmol NaCl 胰岛素 A 链样品的总离子色谱图和质谱图)
Fig 8 Desalting efficiency for microdialysis system shown in fig 7
(ESI total ion current chromatogram for three repetitive injections and corresponding mass spectrum of insulin chain A with a LC buffer: (A) 5 mmol Tris-HCl and 100 mmol NaCl; (B) 50 mmol Tris-HCl and 1 mmol NaCl)

障碍, 脑损伤后脑组织缺血缺氧, 那么神经元对葡萄糖的有氧氧化能力降低甚至丧失, 此时主要靠葡萄糖的无氧酵解提供能量并伴随大量乳酸产生, 引起酸中毒(乳酸含量的高低与伤情呈正比), 导致神经细胞膜结构与功能破坏, 细胞生理丧失, 生化代谢停止, 脑屏障破坏以及脑水肿形成; (2) 检测神经递质与兴奋性氨基酸的变化为神经科学提供理论依据。神经递质释放的多少和正常与否常常决定着大脑的工作情况。How s 等^[23]用 LC/MS/MS 检测鼠脑透析液中乙酰胆碱 (ACh) 的浓度, 其检出限为 1 fmol, 信噪比 3 : 1, 整个过程已经程式化。同时对 ACh 酶抑制剂的柱条件进行了调试; 兴奋性氨基酸 (EAA) 对中枢神经有兴奋作用, 在动物脑部受外界刺激后会发生明显变化, 例如, 谷氨酸和天门冬氨酸分别升高 8~ 13 倍和 6~ 17 倍。也有科学家在研究影响神经系统的化学物质基础及其作用机理^[24~ 26]; (3) 氧自由基在原发性和继发性脑损伤的作用。Demopoulos 指出脑组织缺氧产生的自由基导致细胞膜和细胞内膜结构脂质过氧化反应, 引起细胞膜损伤, 近年大量研究证实此生化作用伴随继发性脑损伤过程, 而且原发性损伤后释放内源性物质神经多肽和花生四烯酸的代谢产物, 引起神经元和脑血管的继发性损伤; (4) 缓

激肽对脑工作的作用。缓激肽是最早发现进入脑损伤部位的化学物质之一, 具有强力的脑破坏性。Haskins 等用 LC-MS/MS 对内源代谢肽进行了检测和阐述, 可以达到 amol 水平^[27]。
5.2 研究药物代谢和药物动力学
MD-MS 已用于研究药物在外周组织和器官中的药物动力学 (包括皮肤和皮下脂肪组织、眼、骨骼肌、血液胆汁、肝脏及肾脏)。Leveque 等^[28]用 MD-GC-MS 测定了牛皮癣病人皮肤中的甲氧基补骨脂素 (8-MOP), 检测限达到 0.29 ng/mL。8-MOP 目前是一种治疗白癜风、先天遗传性皮炎的理想药物, 通过十个病人口服此药物, 然后接收检测并作药物的动力学分析表明, MD-GC-MS 在此项工作中起着重要作用。随着人们生活水平和追求层次的提高, 越来越多关心自己的饮食和健康。科学家们也用 MD-MS 对肥胖、脂肪水解、饮食、运动和用药进行了深入广泛的研究^[29~ 33]。
许多蛋白质容易形成金属加合物离子而严重影响质谱分析, Benkestock 等^[34]研究了如何将非理想的金属加合物离子的形成减少到最小, 它可以将 ESI-MS 的灵敏度和分辨率提高至少 5 倍。很多科学工作者尝试将质谱与其它分离手段如 HPLC 偶联, 研究了一些蛋白酶抑制剂,

酶水解产物等的检测^[35], 为药物代谢动力学研究提供了化学依

参考文献:

- [1] Liu C, Vemba SS. Direct Coupling of Ionic High-performance Liquid Chromatography With Electrospray Ionization Mass Spectrometry Utilizing a Microdialysis Junction Interface[J]. J Chromatogr A, 1999, 835 (1-2): 93~ 104
- [2] Bungay PM, Morrison PF, Dedrick RL. Steady-state Theory for Quantitative Microdialysis of Solutes and Water in Vivo and in Vitro [J]. Life Sci, 1990, 46(2): 105~ 119
- [3] Parsons LH, Justice JB. Perfusate Serotonin Increases Extracellular Dopamine in the Nucleus-accumbens as Measured by In vivo Microdialysis [J]. Brain Res, 1993, 606(2): 195~ 199
- [4] Zhao YP, Liang XZ, Lunte CE. Comparison of Recovery and Delivery In-vitro for Calibration of Microdialysis Probes [J]. Anal Chim Acta, 1995, 316 (3): 403~ 410
- [5] Ault JM, Riley CM, Meltzer NM, et al. Dermal Microdialysis Sampling In-vivo [J]. Pharmaceut Res, 1994, 11(11): 1 631~ 1 639
- [6] Torto N, Gorton L, Laurell T, et al. Technical Issues of In-vitro Microdialysis Sampling in Bioprocess Monitoring [J]. TrAC, 1999, 18 (4): 252~ 260
- [7] Edward H, Kerns L, Kevin J, et al. Monitoring In-vitro Experiments Using Microdialysis Sampling On-line With Mass Spectrometry [J]. J Pharmaceut Biomed, 1999, 20 (1~ 2): 115~ 128
- [8] Caprioli RM, Lin S. On-line Analysis of Penicillin Blood Levels in the Live Rat by Combined Microdialysis/Fast-Atom Bombardment Mass Spectrometry [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87 (1): 240~ 255
- [9] Lin S, Caprioli RM. Proc 36th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics [C], 1988, 1 000
- [10] Lin S, Chang S, Caprioli RM. Proc 38th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics [C], 1990, 1012
- [11] Deterding LJ, Tomer K. Proc 40th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics [C], 1992, 547
- [12] Wong Philip SH, Yoshioaka K, Xie F, et al. In-vivo Microdialysis / Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry for the On-line Monitoring of Melatonin in Rat [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1999, 13 (5): 407~ 411
- [13] Dwilson I. Multiple Hyphenation of Liquid Chromatography With Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Mass Spectrometry and Beyond [J]. J Chromatogr A, 2000, 892 (1-2): 315~ 327
- [14] Konig S, Weiler S, Fales H M. On-line Microdialysis for Mass Spectrometry [J]. Biotech, 1998, 24 (5): 712~ 719
- [15] Linnemayr K, Rizzi A, Josic D, et al. Comparison of Microscale Cleaning Procedures for (Glyco) Proteins Prior to Positive Ion Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 1998, 372 (1~ 2): 187~ 199
- [16] Prokai L, Aaserud DJ, Simonsick WJ. Microcolumn Size-exclusion Chromatography Coupled With Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J]. J Chromatogr A, 1999, 835 (1~ 2): 121~ 126
- [17] Kable MA, Schols HA, Voragen AGJ. Mass Determination of Oligosaccharides by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Following HPLC, Assisted by On-line Desalting and Automated Sample Handling [J]. Carbohydr Polym, 2001, 44 (2): 161~ 165
- [18] Van de Merbel NC. Membrane-based Sample Preparation Coupled On-line to Chromatography or Electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 1999, 856 (1~ 2): 55~ 82
- [19] Liu C, Hofstadler SA, Bresson JA, et al. On-line Dual Microdialysis With ESI/MS for Direct Analysis of Complex Biological Samples and Microorganism Lysates [J]. Anal Chem, 1998, 70 (9): 1 797~ 1 801
- [20] Liu C, Wu Q, Hams AC, et al. On-line Microdialysis Sample Cleanup for Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Nucleic Acid Samples [J]. Anal Chem, 1996, 68 (18): 3 295~ 3 299
- [21] Canarelli S, Fisch I, Freitag R. On-line Microdialysis of Proteins With High-salt Buffers for Direct Coupling of Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Liquid Chromatography [J]. J Chromatogr A, 2002, 948 (1~ 2): 139~ 149
- [22] Lamoree MH, Tjaden UR, Van der Greef J. Use of Microdialysis for the On-line Coupling of Capillary Isoelectric Focusing With Electrospray Mass Spectrometry [J]. J Chromatogr A, 1997, 777 (1): 31~ 39
- [23] HowsMEP, Organ AJ, Murray S, et al. High-performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Assay for the Rapid High Sensitivity Measurement of Basal Acetylcholine

- From Microdialysates [J]. J Neurosci Meth, 2002, 121 (1): 33~ 39
- [24] Kondrat RW, Kanamori K, Ross BD. In-vivo Microdialysis and GC/MS for ^{13}C -Enrichment Measurement of Extracellular Glutamate in Rat brain [J]. J Neurosci Meth, 2002, 120 (2): 179~ 192
- [25] Kennedy RT, Watson CJ, Haskins WE, Strecker RE. In-vivo Neurochemical Monitoring by Microdialysis and Capillary Separations [J]. Curr Opin Chem Biol, 2002, 6 (5): 659~ 665
- [26] Schabitz WR, Giuffrida A, Berger C, et al. Release of Fatty Acid Amides in a Patient With Hemispheric Stroke: A Microdialysis Study [J]. Stroke, 2002, 33 (8): 2112~ 2114
- [27] Haskins WE, Wang ZQ, Watson CJ, et al. Capillary LC-MS² at the Attomole Level for Monitoring and Discovering Endogenous Peptides in Microdialysis Samples Collected In-vivo [J]. Anal Chem, 2001, 73 (21): 5005~ 5114
- [28] Laveque N, Muret P, Mary S, et al. Validation of a Microdialysis GC/MS Method to Assess 8-Methoxypsoralen in Psoriatic Patient Dermis [J]. J Chromatogr B, 2002, 780 (1): 119~ 127
- [29] Gravholt CH, Dall R, Christiansen JS, et al. Preferential Stimulation of Abdominal Subcutaneous Lipolysis After Prednisolone Exposure in Humans [J]. Obes Res, 2002, 10 (8): 774~ 781
- [30] Marion-Latard F, Gliszinski DE. A Single Bout of Exercise Induces α -adrenergic Desensitization in Human Adipose Tissue [J]. Amer J Physiol-Regul Integr C, 2001, 280 (1): R166~ R173
- [31] Lange KH, Lorentsen W. Subcutaneous Abdominal Adipose Tissue Lipolysis During Exercise Determined by Arteriovenous Measurements in Older Women [J]. J Amer Geriatr Soc, 2002, 50 (2): 275~ 281
- [32] Karpe F, Fielding BA. Monitoring Adipose Tissue Blood Flow in Man: a Comparison Between the (133) Xenon Washout Method and Microdialysis [J]. Int J Obesity, 2002, 26 (1): 1~ 5
- [33] Kolehmainen M, Vidal H. Hormone Sensitive Lipase Expression and Adipose Tissue Metabolism Show Gender Difference in Obese Subjects After Weight Loss [J]. Int J Obesity, 2002, 26 (1): 6~ 16
- [34] Benkestock K, Edlund PO, Roeraade J. On-line Microdialysis for Enhanced Resolution and Sensitivity During Electrospray Mass Spectrometry of Non-covalent Complexes and Competitive Binding Studies [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002, 16 (21): 2054~ 2059
- [35] Rumbold K, Okatch H. Monitoring On-line Desalted Lignocellulosic Hydrolysates by Microdialysis Sampling Micro-high Performance Anion Exchange Chromatography With Integrated Pulsed Electrochemical Detection/Mass Spectrometry [J]. Biotechnol Bioeng, 2002, 78 (7): 821~ 827

Application Progress on Coupling Mass Spectrometry and Microdialysis

GONG Kuan-ping, XIONG Shao-xiang

(Beijing Mass Spectrometry Center, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Coupling mass spectrometry (MS) with microdialysis (MD) has an unsubstitutable role for the on-line detection of biological sample in living animal, because MD is the best in-vivo sampling technology and MS has characteristics of minimum sample, high sensitivity and time-saving. In this review the basic principle and experimental method of microdialysis is introduced with thirty-five references, and some application progress in coupling MS with MD for the sample desalting, on-line detection of active biological component and pharmaceutical metabolism is reviewed.

Key words mass spectrometry; application progress on microdialysis; reviews; electrospray ionization; matrix assisted laser desorption ionization