

新型电喷雾萃取电离质谱法快速标靶分析氨基酸

许 柠¹ 朱志强¹ 杨水平¹ 王 姜¹ 顾海巍*¹ 周 振^{2,3} 陈焕文¹

¹(东华理工大学,江西省质谱科学与仪器重点实验室,南昌 330013)

²(上海大学,环境与化学工程学院,环境污染与健康研究所,上海 200444)

³(广州禾信分析仪器有限公司,广州 510530)

摘 要 将新型电喷雾萃取电离源(EESI)和 LTQ XL 质谱仪耦合,在无需样品预处理情况下,建立了多种不同极性氨基酸的快速检测方法。新型 EESI 源优化后,检测模式为正离子模式,电离电压为 4.0 kV,离子传输管温度 150 °C,喷雾气压为 1.0 MPa。碰撞诱导裂解(CID)实验时,母离子隔离宽度 1.5,碰撞能量 17%~25%。本方法单个样品测定时间小于 0.5 min,对多种氨基酸的检出限为 0.14~26.2 μg/L,且具有较宽的线性范围。直接检测复杂基体尿液中的丝氨酸和精氨酸时,平均回收率为 82.6%~105.6%,测定结果的相对标准偏差(RSD)为 2.2%~11.4%。本方法分析速度快,灵敏度高,基体影响小,适用于大量样品快速检测。

关键词 电喷雾萃取电离; 标靶分析; 氨基酸; 尿液

1 引言

随着生命科学研究的深入,人们发现生物小分子不仅是基因和蛋白的底物和终端产物,同时也可作为指示和感受生物状态变化的标记物,它们通过与细胞内各种生物分子的相互作用调控着各种生理病理过程^[1~3]。在众多生物小分子中,氨基酸是重要的成员之一。氨基酸是构成肽和蛋白质的基本单位,同时也在一些疾病的发生和发展中扮演着至关重要的角色^[4,5]。Jain 等^[6]发现,最小的氨基酸(甘氨酸)是与肿瘤细胞增殖率相关的重要代谢产物。Asiago 等^[7]采用谷氨酸、组氨酸、脯氨酸、酪氨酸作为代谢标记物,成功地早期预测了乳腺癌的复发。因此,氨基酸的检测能为生物学研究提供一定的前期基础,并对一些疾病的风险评估具有重要的借鉴意义。

近年来,对氨基酸的测定方法有 GC-MS 法^[8]、LC-MS 法^[9,10]、CE 法等^[11~14]。这些方法通常需要预处理,繁琐而费时,难于实现对大量样品的快速检测。电喷雾萃取电离质谱(EESI-MS)是一种新型的常压环境电离质谱方法(Ambient mass spectrometry),它的最大优点在于能在无需预处理条件下对复杂基体样品直接进行质谱检测^[15~17]。本研究首先改进了 EESI 电离源,采用半封闭长方体构造,使之具有专门的管道排出实验中的废液和废气,提高实验的稳定性和安全性。不同极性氨基酸标准品被用来表征和优化 EESI-MS 检测平台,利用此平台直接进行复杂基体样品(尿液)中氨基酸检测。结果表明,EESI-MS 检测氨基酸时具有分析速度快、灵敏度高、基体影响小等特点,适宜用于大量样品的快速检测。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

EESI 离子源^[15~17]如图 1 所示,为满足实验的高安全性和高稳定性要求,同时确保 EESI 电离源的灵活可调性,实验设计并制造了 EESI 与质谱仪的半封闭接口。新型 EESI 离子源上下表面均有管道,分别排出无用的气体和液体,接口的高度可根据仪器尺寸调节。在提供充分电离空间的前提下,接口的材料对质谱信号没有明显影响。LTQ-XL 型线性离子阱质谱仪(美国 Finnigan 公司),配有 Xcalibur 数据处理系统。

甲醇(色谱纯,美国 TEDIA 公司);氨基酸标准:脯氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、异亮氨酸、谷氨酰胺、天

冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、色氨酸、酪氨酸、苏氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸(分析纯,上海蓝季科技发展有限公司);实验室用水为二次蒸馏水。

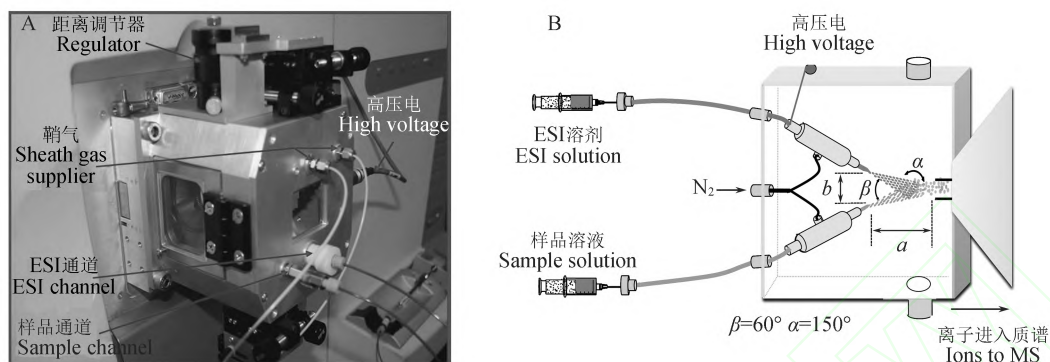


图 1 新型 EESI 离子源装置图(A)和新型 EESI 离子源示意图(B)

Fig. 1 (A) Extraction electrospray ionization (EESI) ion source, and (B) the schematic diagram of the EESI ion source

2.2 实验条件

设置 EESI-MS 为正离子检测模式,电离电压为 4.0 kV,离子传输管温度 150 °C;鞘气为氮气(纯度 99.999%);喷雾气压为 1.0 MPa;萃取剂:甲醇-水(1:1, V/V)流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$;样品流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。CID 实验时,扫描时间 0.5 min,母离子隔离宽度 1.5,碰撞能量 17% ~ 25%;其它条件由 LTQ-XL-MS 自动优化得到。

3 结果与讨论

3.1 新型 EESI-MS 条件的优化

EESI 拥有独特的设计,两个喷雾口沿着一定的角度和距离对着质谱仪的入口,其间形成离子-分子碰撞区/电离区(图 1)。样品分子在一个较大的三维空间中通过萃取和能量/电荷转移等过程被离子化。考察了离子源与质谱仪之间的距离(a 和 b)对质谱信号的影响。以精氨酸($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$, Arginine)质子化失去质量数 59($\text{NH}=\text{C}(\text{NH}_2)_2$)得到碎片离子 m/z 116 为例,在最佳角度($\alpha=150^\circ$, $\beta=60^\circ$)下,当 a 的距离为 4 ~ 5 mm, b 的距离在 1 mm 之内(图 2),EESI 离子源能形成较好的离子-分子碰撞区,离子化效果明显,信号强度大。因此,本实验选择 $a=5$ mm, $b=1$ mm。

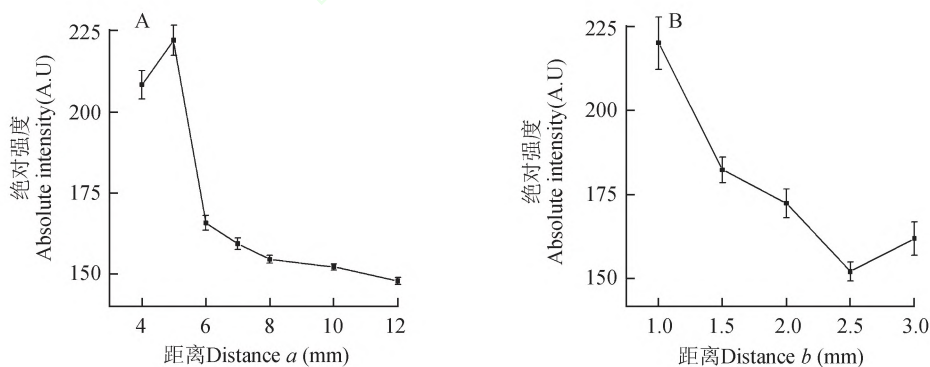


图 2 (A)图 1 中距离 a 对精氨酸碎片离子信号强度的影响,(B)图 1 中距离 b 对精氨酸碎片离子信号强度的影响

Fig. 2 (A) Effects of the distance a in Fig. 1 to the signal intensity of arginine detected by EESI-MS/MS, and (B) effects of the distance b in Fig. 1 to the signal intensity of arginine detected by EESI-MS/MS

3.2 氨基酸的 EESI 串联质谱分析

在直接检测复杂样品中目标化合物时,一般需要通过串联质谱排除假阳性结果。为此,以精氨酸

($C_6H_{14}N_4O_2$, Arginine) 为例, 其分子量为 174。在二级质谱中, 质子化分子离子 (m/z 175) 失去质量数为 17 (NH_3) 和 18 (H_2O) 的碎片分别产生 m/z 158 和 157 的质谱峰, 同时 $[M+H]^+$ 也可以丢失质量数为 45 (NH_3+CO) 和 59 ($NH=C(NH_2)_2$) 的碎片得到 m/z 130 和 116 的质谱峰, 而 m/z 116 的碎片离子峰进一步失去质量数 46 (H_2O+CO) 的碎片得到 m/z 70 的离子峰 (图 3)。取健康成年人的尿液, 用蒸馏水稀释 100 倍进行检测, 能够检测到信号峰 m/z 175, 并且在 MS/MS 谱图中观察到主要特征离子 m/z 158, 157, 130 和 116, 因此可以判断该样品中含有精氨酸 (图 4)。以上结果与文献 [18] 一致, 证明 EESI-MS 能检测并鉴定多种氨基酸 (表 1 列出了 10 种典型氨基酸的 EESI-MS/MS 谱图的主要特征)。

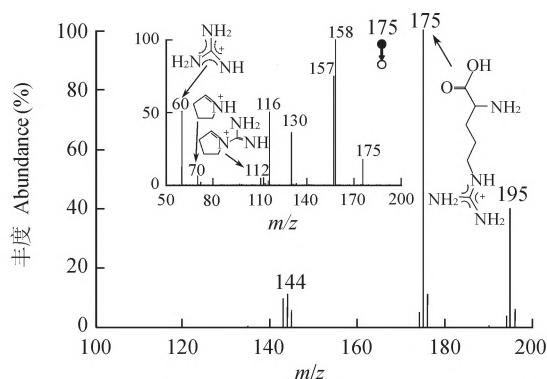


图 3 精氨酸的 EESI 质谱图, 插图为 m/z 175 的二级串联质谱图

Fig. 3 EESI-MS spectrum of arginine

The inset shows the EESI-MS/MS spectrum of arginine

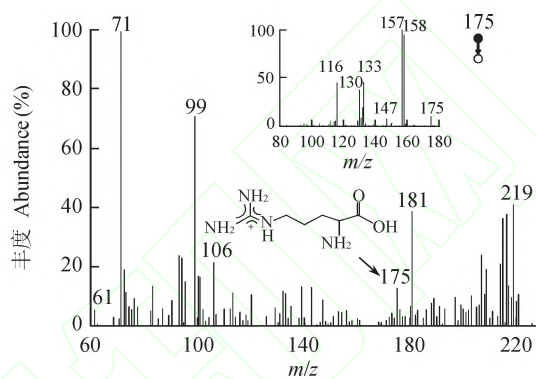


图 4 尿液稀释 100 倍的 EESI 质谱图像, 插图为精氨酸 m/z 175 的二级串联质谱图

Fig. 4 The EESI-MS spectrum of a human urine sample (diluted 100 times)

The inset shows the EESI-MS/MS spectrum of arginine

表 1 10 种典型氨基酸的 EESI-MS/MS 谱图的主要特征

Table 1 Summary of the EESI-MS/MS spectra for 10 typical amino acids

No.	氨基酸 Amino acid	分子量 M_w	质子化分子量 $[M+H]^+$	碰撞能量 Collision energy (%)	碎片离子 Fragments (MS/MS)
1	赖氨酸 Lysine	146	147	19	$84[M+H-CO-H_2O-NH_3]^+$ $130[M+H-NH_3]^+$ $129[M+H-H_2O]^+$
2	脯氨酸 Proline	115	116	19	$70[M+H-CO-H_2O]^+$
3	组氨酸 Histidine	155	156	22	$110[M+H-CO-H_2O]^+$
4	谷氨酰胺 Glutamine	146	147	22	$101[M+H-CO-H_2O]^+$ $130[M+H-NH_3]^+$
5	精氨酸 Arginine	174	175	22	$116[M+H-NH=C(NH_2)_2]^+$ $130[M+H-NH_3-CO]^+$ $70[M+H-NH=C(NH_2)_2-H_2O-CO]^+$ $158[M+H-NH_3]^+$ $157[M+H-H_2O]^+$
6	异亮氨酸 Isoleucine	131	132	22	$69[M+H-CO-H_2O-NH_3]^+$ $86[M+H-CO-H_2O]^+$ $115[M+H-NH_3]^+$
7	丝氨酸 Serine	105	106	21	$60[M+H-CO-H_2O]^+$ $88[M+H-H_2O]^+$
8	天冬酰胺 Asparagine	132	133	19	$87[M+H-CO-H_2O]^+$ $116[M+H-NH_3]^+$
9	天冬氨酸 Aspartic acid	133	134	24	$88[M+H-CO-H_2O]^+$ $116[M+H-H_2O]^+$
10	谷氨酸 Glutamic acid	147	148	25	$102[M+H-CO-H_2O]^+$ $130[M+H-H_2O]^+$

3.3 线性范围、检出限和精密度

各种氨基酸分别用蒸馏水配制成浓度 0.001, 0.002, 0.005, 0.010, 0.050, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 和 5.0 mg/L 的标准溶液,按前述实验方法,并在最优条件下进行 EESI-MS/MS 实验。各氨基酸的每个浓度测定 6 次,以氨基酸浓度为横坐标,二级串联质谱获得的信号强度为纵坐标,绘制标准曲线。线性回归和相关系数表明这些氨基酸都具有两个数量级以上的线性范围。按 $S/N=3$, 根据 $LOD=3\sigma/S$ (c 为标准品浓度, σ 为标准偏差, S 为响应信号强度平均值) 计算检出限^[19], 所得结果见图 5 和表 2。

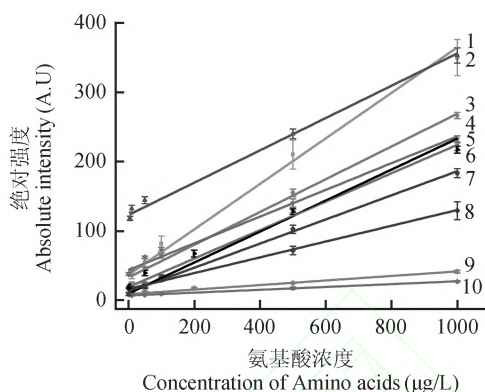


图 5 10 种典型氨基酸的 EESI-MS/MS 标准曲线

Fig. 5 Calibration curves of 10 typical amino acids determined by EESI-MS/MS

氨基酸序号同表 1 (The number of amino acids are the same as in Table 1)。

表 2 多种氨基酸标准品的测定

Table 2 Summary of the performance of EESI-MS/MS for quantitative detection of amino acids

氨基酸 Amino acid	线性关系 Linear equation	相关系数 R^2	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/L}$)	检出限 LOD ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%, $n=6$)
赖氨酸 Lysine	$y=36.287+0.328x$	0.984	10 ~ 1000	3.5	8.8
脯氨酸 Proline	$y=122.70+0.233x$	0.980	5 ~ 1000	0.5	3.6
组氨酸 Histidine	$y=32.540+0.236x$	0.991	10 ~ 1000	4.0	4.6
谷氨酰胺 Glutamine	$y=43.234+0.193x$	0.974	1 ~ 1000	0.2	4.6
精氨酸 Arginine	$y=9.413+0.224x$	0.992	10 ~ 1000	3.4	6.0
异亮氨酸 Isoleucine	$y=18.789+0.205x$	0.991	2 ~ 1000	0.4	4.1
丝氨酸 Serine	$y=16.070+0.114x$	0.985	10 ~ 1000	6.3	9.5
天冬酰胺 Asparagine	$y=11.752+0.174x$	0.994	1 ~ 1000	0.14	6.3
天冬氨酸 Aspartic acid	$y=8.531+0.033x$	0.980	10 ~ 1000	2.0	5.0
谷氨酸 Glutamic acid	$y=6.536+0.021x$	0.999	10 ~ 1000	2.0	4.6
甘氨酸 Glycine	$y=1.163+0.0009x$	0.985	100 ~ 3000	26.2	5.7
丙氨酸 Alanine	$y=8.720+0.005x$	0.986	50 ~ 5000	6.9	7.1
缬氨酸 Valine	$y=118.681+0.073x$	0.994	10 ~ 1000	1.7	4.3
亮氨酸 Leucine	$y=24.278+0.181x$	0.986	10 ~ 1000	2.0	5.9
苏氨酸 Threonine	$y=4.609+0.006x$	0.982	1 ~ 3000	0.22	4.7
苯丙氨酸 Phenylalanine	$y=20.910+0.031x$	0.940	50 ~ 5000	4.3	4.0
色氨酸 Tryptophan	$y=70.167+0.024x$	0.995	50 ~ 5000	2.5	6.1
酪氨酸 Tyrosine	$y=23.33+0.117x$	0.955	10 ~ 1000	2.0	5.5
甲硫氨酸 Methionine	$y=33.53+0.043x$	0.990	50 ~ 5000	7.0	7.1

3.4 尿液样品分析

一般健康成人的尿量为 2 L/24 h, 其中尿液中丝氨酸含量平均约为 777 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ (40827.47 $\mu\text{g/L}$), 精氨酸含量平均约为 26 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ (2264.6 $\mu\text{g/L}$), 具体浓度与多种因素有关, 如采集时间、健康状态等^[20]。将健康成人尿液用蒸馏水稀释 100 倍, 本次检测中丝氨酸的本底值为 125 $\mu\text{g/L}$, 精氨酸的本底值为 57 $\mu\text{g/L}$, 其数值均在生理浓度的合理变化范围之内。样品中分别加入浓度为 100, 300 和 500 $\mu\text{g/L}$ 丝氨酸, 50, 100 和 500 $\mu\text{g/L}$ 精氨酸, 进行回收率实验, 测得的含量分别为 225.69 (RSD=2.2%, $n=6$), 372.80 (RSD=2.4%, $n=6$), 641.94 (RSD=5.2%, $n=6$) $\mu\text{g/L}$ 丝氨酸; 98.84 (RSD=11.4%, $n=6$), 162.56 (RSD=5.1%, $n=6$), 527.97 (RSD=4.6%, $n=6$) $\mu\text{g/L}$ 精氨酸, 加标回收率分别是 100.7%, 82.6%, 103.4% 和 83.7%, 105.6%, 94.2%。值得注意的是, 每个样品的分析时间均在 0.5 min 以内。

结果表明, 本方法的选择性、准确度和精密度较好, 并能够满足对大量样品的快速检测。因此, 本方法将对一些科研领域, 如代谢组学中测定生物复杂样品中氨基酸的含量及其变化, 具有一定的积极意义。

References

- 1 XU Guo-Wang, YANG Jun. *Chinese Journal of Chromatography*, **2003**, 21(4): 316-320
许国旺, 杨 军. 色谱, **2003**, 21(4): 316-320
- 2 TANG Hui-Ru, WANG Yu-Lan. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, **2007**, 19(3): 272-280
唐惠儒, 王玉兰. 生命科学, **2007**, 19(3): 272-280
- 3 Kaddurah-Daouk R, Kristal B S, Weinshilboum R M. *Pharmacology and Toxicology*, **2008**, 48: 653-683
- 4 Chace D H, Kalas T A. *Clinical Biochemistry*, **2005**, 38(4): 296-309
- 5 Wang T J, Larson M G, Vasan R S, Cheng S, Rhee E P, McCabe E, Lewis G D, Fox C S, Jacques P F, Fernandez C, O'Donnell C J, Carr S A, Mootha V K, Florez J C, Souza A, Melander O, Clish C B, Gerszten R E. *Nat Med*, **2011**, 17(4): 448-453
- 6 Jain M, Nilsson R, Sharma S, Madhusudhan N, Kitami T, Souza A L, Kafri R, Kirschner M W, Clish C B, Mootha V K. *Science*, **2012**, 336(6084): 1040-1044
- 7 Asiago V M, Alvarado L Z, Shanaiah N, Gowda G A N, Owusu-Sarfo K, Ballas R A, Raftery D. *Cancer Research*, **2010**, 70(21): 8309-8318
- 8 Kaspar H, Dettmer K, Gronwald W, Oefner P J. *Journal of Chromatography B*, **2008**, 870(2): 222-232
- 9 LI Peng-Fei, WANG Yan, TAO Bei-Bei, WANG Jing, LUO Jing, ZHANG Xu-De, AN Zhuo-Ling, LIU Li-Hong. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(5): 762-767
李鹏飞, 王 燕, 陶蓓蓓, 王 静, 罗 静, 张绪得, 安卓玲, 刘丽宏. 分析化学, **2012**, 40(5): 762-767
- 10 WANG Yi-Hong, FENG Jia-Li, PAN Zhen-Qiu, FANG Xue-Xin, LI Bang-Rui. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, **2006**, 16(2): 161-163, 239
王一红, 冯家力, 潘振球, 方学新, 李帮锐. 中国卫生检验杂志, **2006**, 16(2): 161-163, 239
- 11 Waterval W A H, Scheijen J L J M, Ortmans-Ploemen M M J C, Habets-van der Poel C D, Bierau J. *Clin. Chim. Acta*, **2009**, 407(1-2): 36-42
- 12 Min J Z, Hatanaka S, Yu H-f, Higashi T, Inagaki S, Toyooka T. *Analytical Methods*, **2010**, 2(9): 1233-1235
- 13 ZHAI Hai-Yun, CAI Pei-Xiang, CHEN Zuan-Guang, Li Guan-Hong, YE Xin, MO Jin-Yuan. *Chem. J. Chinese Universities*, **2004**, 25(6): 1037-1039
翟海云, 蔡沛祥, 陈缙光, 李冠宏, 叶 欣, 莫金垣. 高等学校化学学报, **2004**, 25(6): 1037-1039
- 14 Strieglerová L, Kubáň P, Bocek P. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218(37): 6248-6255
- 15 DING Jian-Hua, YANG Shui-Ping, LIU Qing, WU Zhuan-Zhang, CHEN Huan-Wen, REN Yu-Lin, ZHENG Jian, LIU Qing-Jun. *Chemical Journal of Chinese Universities*, **2009**, 30(8): 1533-1537
丁健桦, 杨水平, 刘 清, 吴转璋, 陈焕文, 任玉林, 郑 健, 刘清珺. 高等学校化学学报, **2009**, 30(8): 1533-1537
- 16 Chen H W, Yang S P, Li M, Hu B, Li J Q, Wang J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49(17): 3053-3056
- 17 Law W S, Wang R, Hu B, Berchtold C, Meier L, Chen H W, Zenobi R. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(11): 4494-4500
- 18 Piraud M, Vianey-Saban C, Petritis K, Elfakir C, Steghens J P, Morla A, Bouchu D. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2003**, 17(12): 1297-1311
- 19 Ding J H, Gu H W, Yang S P, Li M, Li J Q, Chen H W. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(20): 8632-8638
- 20 GONG Dao-Yuan. *Clinical Laboratory Medicine*. Beijing: Higher Education Press, **2007**: 101-181
龚道元. 临床基础检验学. 北京: 高等教育出版社, **2007**: 101-181

Direct Detection of Amino Acids Using Extractive Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

XU Ning¹, ZHU Zhi-Qiang¹, YANG Shui-Ping¹, WANG Jiang¹, GU Hai-Wei^{*1}, ZHOU Zhen^{2,3}, CHEN Huan-Wen¹

¹(*Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China Institute of Technology, Nanchang 330013, China*)

²(*Institute of Environmental Pollution and Health, School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China*)

³(*Guangzhou Hexin Analytical Instrumentation Company, Guangzhou 510530, China*)

Abstract A novel method, based on extractive electrospray ionization (EESI) tandem mass spectrometry (MS), was developed for the direct detection of amino acids in biological fluids with minimal sample pretreatment. Based on our previous research, we constructed a new EESI ion source to improve the analytical performance and operation safety. We optimized EESI-MS conditions using representative amino acid standards. The reagent solvent (methanol : water = 1 : 1) was electrosprayed at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ at high voltage (+4 kV, positive ion detection mode). The temperature of the heated capillary was optimized to be 150 $^{\circ}\text{C}$. Collision induced dissociation (CID) experiments were done by applying 17%–25% of the collision energy to the precursor ions isolated with a window width of 1.5 mass/charge (m/z) units. The limit of detection (LOD) of these amino acids was in the range of 0.14 – 26.2 $\mu\text{g}/\text{L}$, and the linear dynamic range was larger than two orders of magnitude. The amino acid concentration in human urine samples was measured by the method, and the average time for a single sample analysis was less than 0.5 min. The recovery rates for different concentrations ranged from 82.6% to 105.6%, and the relative standard deviations (RSDs) ranged from 2.2% to 11.4%. This study showed that EESI-MS was a powerful tool for the rapid, sensitive, and quantitative detection of amino acids in complex biological samples.

Keywords Extractive electrospray ionization; Ambient mass spectrometry; Amino acids; Urine

(Received 21 September 2012; accepted 7 December 2012)

第十三届应用化学年会组委会第一轮通知

由中国化学会应用化学专业委员会主办,中国科学院长春应用化学研究所承办的“应用化学与社会和谐发展”第十三届全国应用化学年会将于2013年8月23~26日在长春召开,这是中国应用化学界学者的一次盛会。本届学术会议旨在促进应用化学的学术交流与发展。届时来自全国各地的著名科学家及青年学者将汇聚一堂,报道应用化学领域的最新研究成果,研讨应用化学领域的发展趋势、学科前沿与研究热点。热诚欢迎各高等院校、科研院(所)以及企事业单位的科研、工程技术人员和管理人员与研究生踊跃参加。

会议主题:(A)应用化学与环境友好材料;(B)应用化学与绿色储能及转换材料;(C)应用化学与社会安全;(D)应用化学与化工新材料;(E)应用化学与教育;(F)应用化学企业论谈。

征文要求:(1)符合会议主题、未公开发表的论文均可应征。(2)应征论文需提供1~2页中文摘要,同时接受英文撰写稿件。组委会聘请专家对论文进行审核,录用后,将发通知告知作者。优秀论文将推荐在《应用化学》发表。(3)应征论文请用E-mail投到《应用化学》编辑部邮箱 yhxnh@ciac.jl.cn,投稿时主题中请注明论文所属征文范围(征文领域编号)。征文请用Word文件保存以便编排收录在光盘中。版面24 cm×16 cm(A4纸),作图尺寸8 cm×6 cm,论文标题用小二号黑体;作者用小四号仿宋体(报告人用下划线标明),工作单位、邮编及摘要均用小五号宋体,正文均用五号宋体。(4)摘要首页脚注注明通讯作者职称、电话、E-mail和简介。收稿截止日期:7月20日。

联系人:孙智权 电话:0431-85262016, 传真:0431-85262881 E-mail: yhxnh@ciac.jl.cn

地址:长春市人民大街5625号 中国科学院长春应用化学研究所 邮编:130022

详情请登录 <http://www.ciac.jl.cn/yhxnh>