

国产高分辨飞行时间质谱成像技术研究报告

朱辉, 黄建鹏

(广州禾信仪器股份有限公司, 广东 广州 51053)

摘要: 质谱成像(Mass Spectrometry Imaging, MSI)技术是将质谱检测与影像技术相结合, 用于生物体内的内源性或外源性分子的原位分析与相对定量可视化检测的新型分子成像技术, 已成为质谱的前沿领域和研究热点。本研究基于自主研发的高分辨飞行时间质谱, 搭载空气动力辅助离子化(Air Flow Assisted Ionization, AFAI)及其质谱成像新技术, 充分利用质谱成像免荧光标记、不需要复杂样品前处理、可以提供丰富的被分析物空间分布信息的优势, 开展生物组织质谱成像分析研究工作。

关键词: 质谱成像; 质谱

1 实验仪器

API-TOFMS 10000 高分辨飞行时间质谱仪: 广州禾信仪器股份有限公司产品, 配备 AFAI 离子源与 MSI 装置; 中国医学科学院药物研究所研发; ApoloMs 质谱软件: 广州禾信仪器股份有限公司产品; 质谱成像软件 IMS V2.5.1: 中国医学科学院药物研究所研发。

2 实验试剂

质谱成像测试流动相: 正离子检测模式下为甲醇: 水 = 4:1 (V/V, 含 0.1%的甲酸); 负离子检测模式下为甲醇: 水 = 4:1 (V/V)。

质谱成像测试流动相流速为: 5 $\mu\text{L}/\text{min}$

3 质谱成像装置的参数优化

API-TOFMS 10000 高分辨飞行时间质谱仪参数:

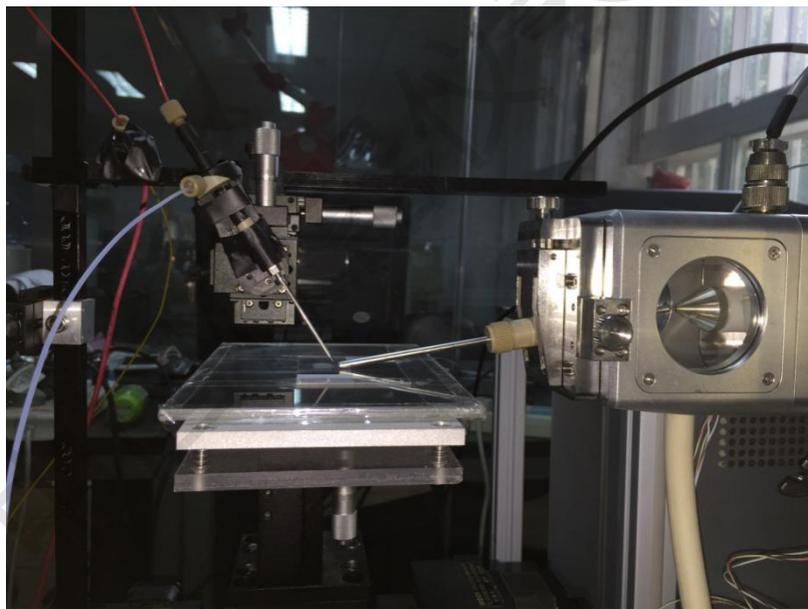
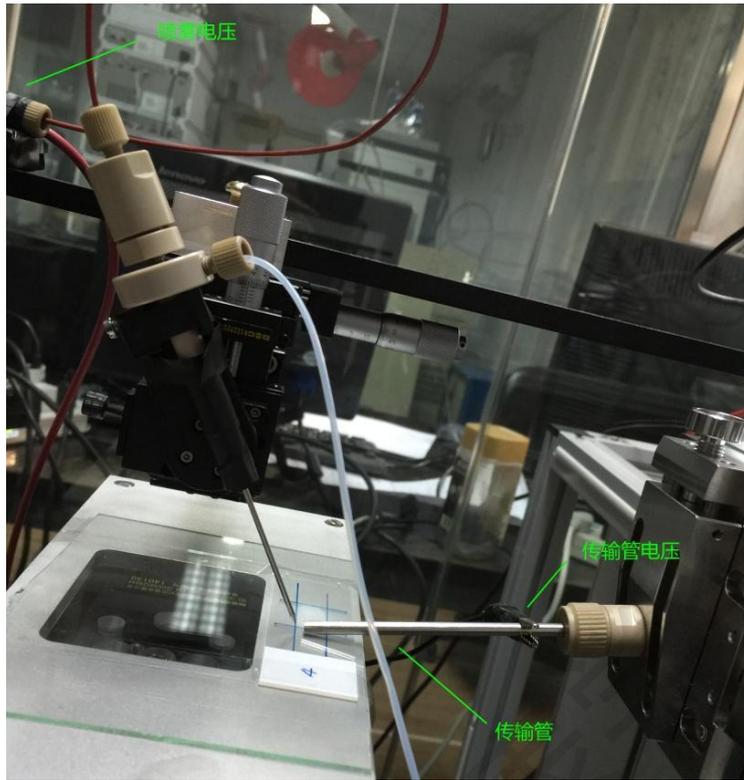
质量检测范围是 30Da~4000Da

分辨率优于 10000 FWHM

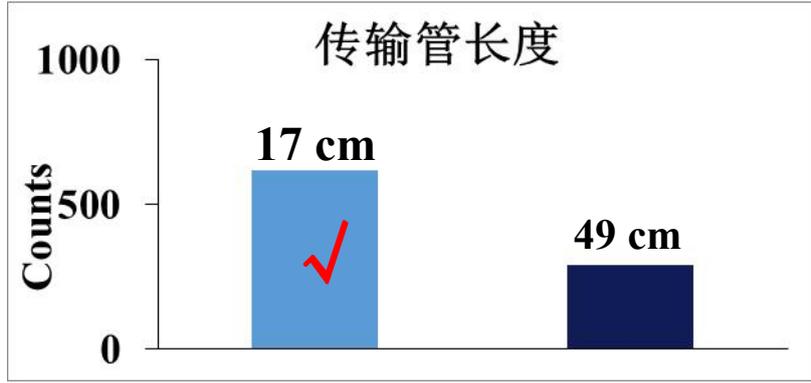
检出限为 2.5pg/ μL (利血平)

质量精度: 内标法优于 20ppm, 外标法优于 50ppm

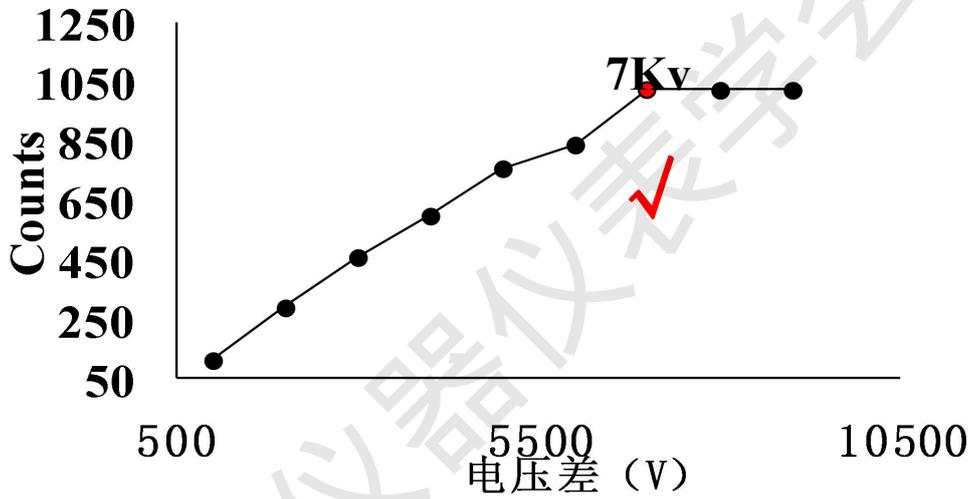
实验条件: 20 ppb 利血平甲醇标准溶液以 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速进样



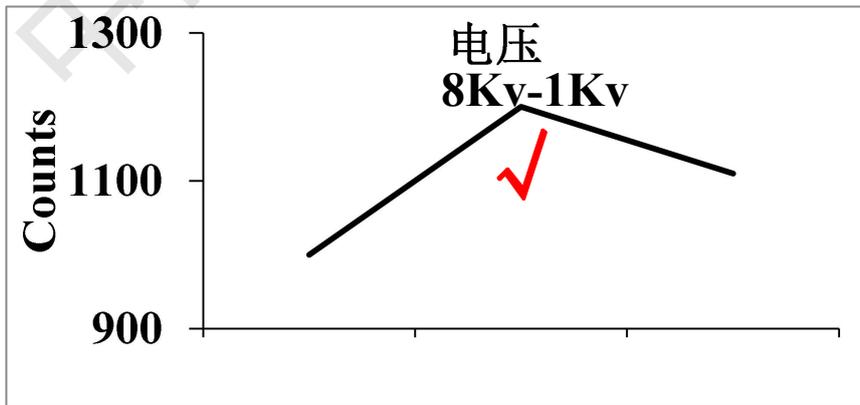
传输管长度优化：传输管的长管为 49cm，短管为 17cm



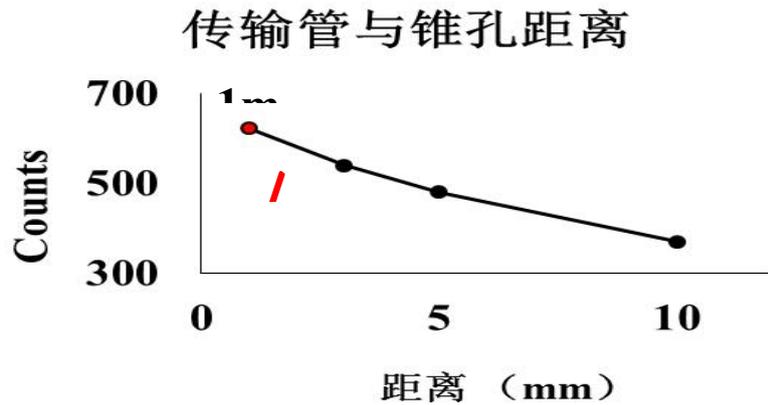
传输管电压设置为 1000v 时，调节喷雾电压，发现喷雾电压与传输管电压差为大于 7Kv 后，m/z 609 峰的强度最高。



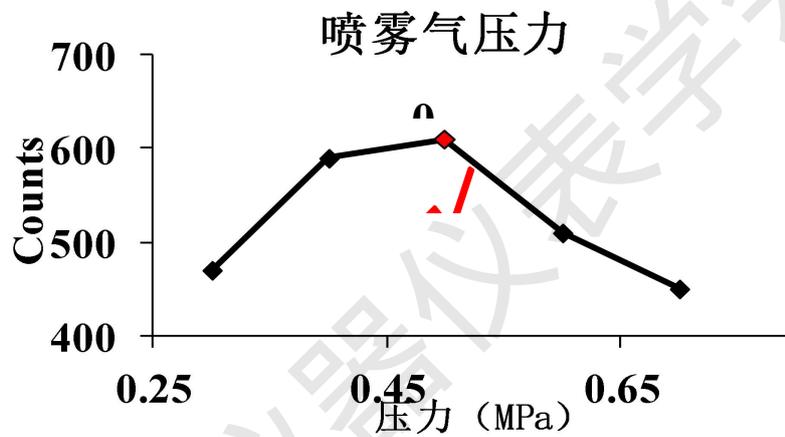
电压差恒定为 7Kv 时，分别调节传输管电压为 0v 喷雾电压为 7000v，传输管电压为 1000v 喷雾电压为 8000v，传输管电压为 2000v 喷雾电压为 9000v，对比 m/z 609 峰的强度



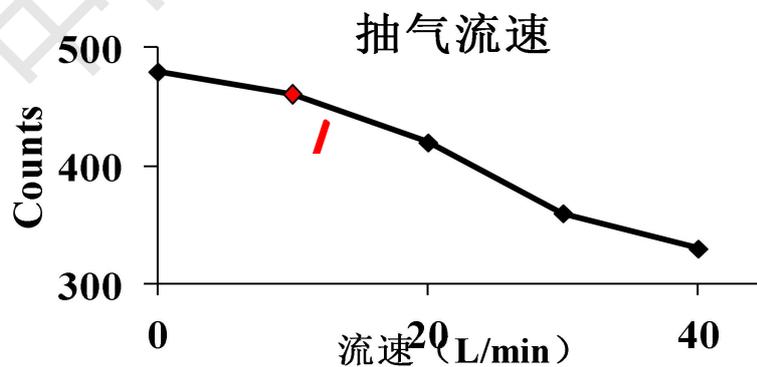
传输管与进样口距离优化，在 1mm~10 mm 共选择 4 个点，分别为 1mm、3 mm、5 mm 和 10 mm，经过测试发现 1mm 时 m/z 609 峰的强度最高。



喷雾气压参数优化，从 0.3MPa~0.7MPa 分别测试 5 个不同气压参数，最终发现 0.5MPa 时 m/z 609 峰的强度最高。



抽气流速参数优化，选取从 0 L/min~40 L/min 的五个抽气流速点分别进行测试，最终发现 10 L/min 的抽气流速时， m/z 609 峰的强度最高。



上述参数优化都重复进行了三次实验，确保实验时选择的为最佳参数，优化后选择的最佳参数为

传输管：17 cm

喷雾电压：8 Kv

传输管电压：1 Kv

传输管与锥孔之间的距离：1 mm

喷雾气压力：0.5 Mpa

抽气流速：10 L/min

4 质谱成像分析

4.1 小鼠脑组织样品质谱成像分析

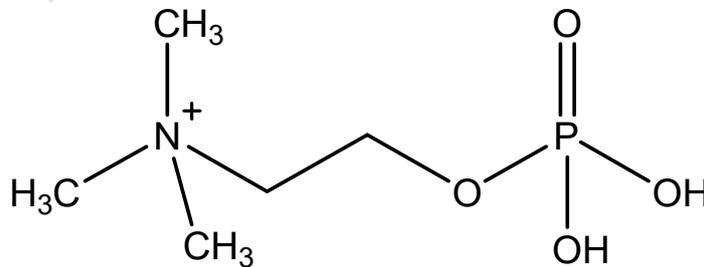
样品编号：脑组织 1

脑组织切片长度为 1.7cm,宽度为 1.1cm,累积谱图数量设置为 49 张, 共采集 55 行。

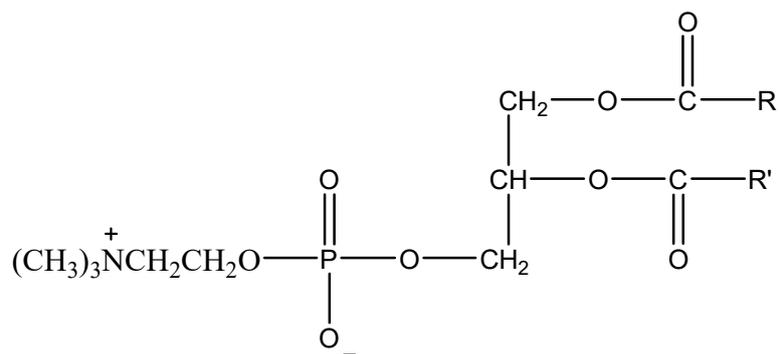
下列图 1 中的三张质谱图为脑组织 1 第 11 行和第 25 行的扫描质谱图,从该质谱图找到了 9 个脑组织内源性代谢物,其中 6 个在商业质谱仪上经过精确质量数和二级离子碎片鉴定结构如下表 1, 其他 3 个内源性代谢物 m/z :132.07、 m/z :170.03 和 m/z :734.52 结构未知。

表 1 化学结构已鉴定的内源性代谢物

m/z	化合物	m/z	化合物
184.07	磷酸胆碱	806.57	磷脂酰胆碱 [PC(36:3)+Na] ⁺
760.58	磷脂酰胆碱 [PC(16:0/18:1)]	798.54	磷脂酰胆碱[PC(34:1)+K] ⁺
782.57	磷脂酰胆碱 [PC(16:0/18:1)+Na] ⁺	810.60	磷脂酰胆碱 [PC(18:0/18:1)+Na] ⁺

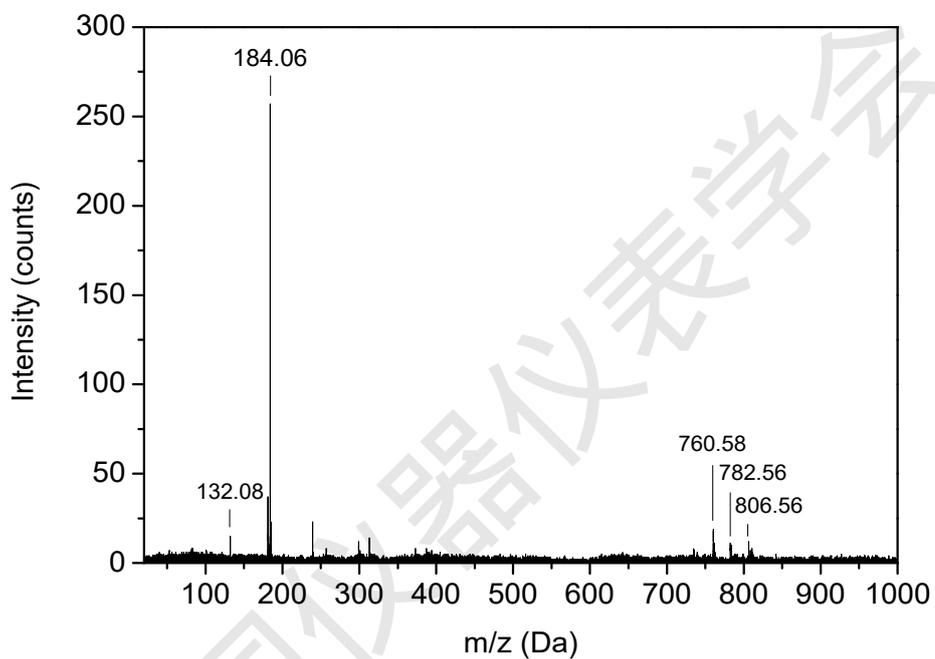


磷酸胆碱结构式

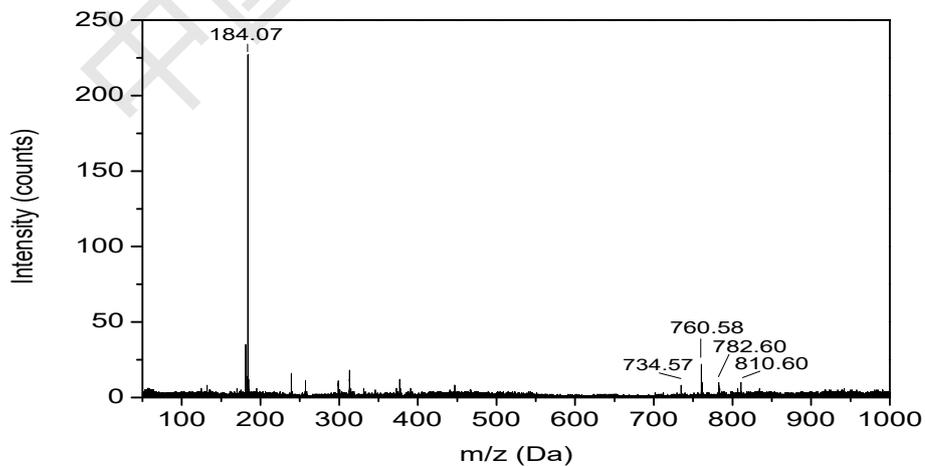


磷脂酰胆碱

样品编号：脑组织1-11



样品编号：脑组织1-25



样品编号：脑组织1-25（2）

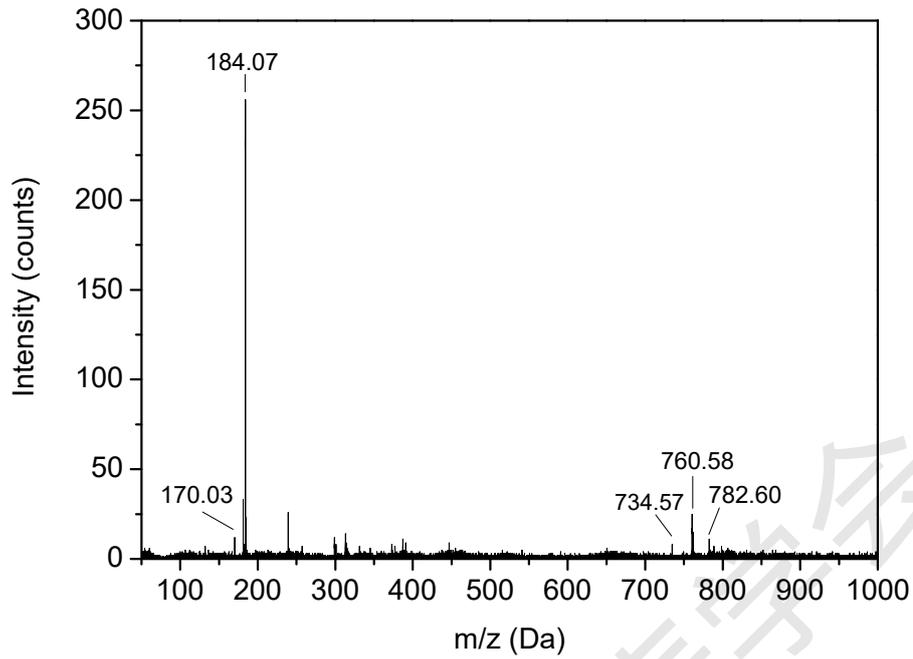


图1 脑组织1的第11行和25行扫描质谱图

利用成像软件 IMS V2.5.1 将脑组织1的质谱数据转换为脑组织中特定化合物的成像图，见图2。从成像图可以看到化合物在脑组织中的分布情况。



光学图像



Cerebral cortex (Red) 大脑皮层

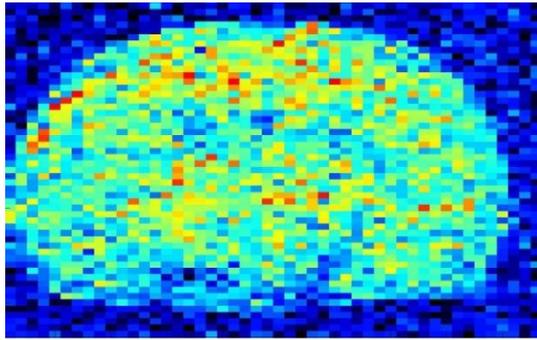
Corpus callosum (Yellow) 胼胝体

Hippocampus (Blue) 海马 Midbrain (Green) 中脑

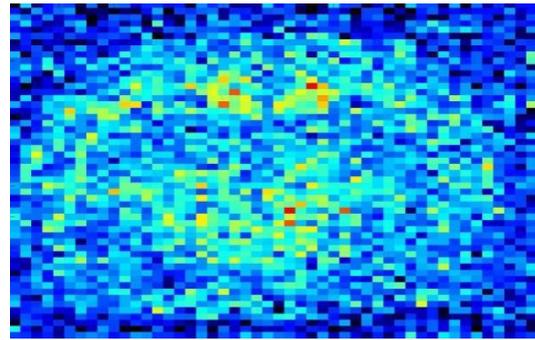
Periaqueductal gray (Purple) 中央导水管旁灰质

Substantia nigra (Black) 黑质

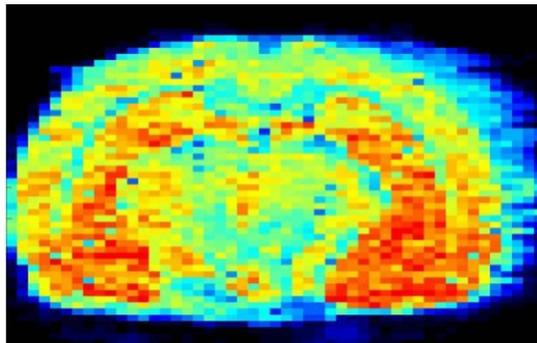
Mamillary nucleus (Brown) 乳头体核



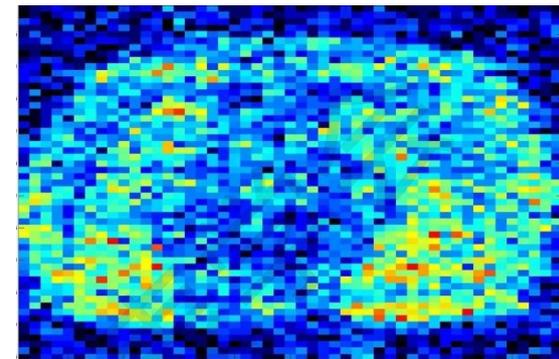
m/z 132.07



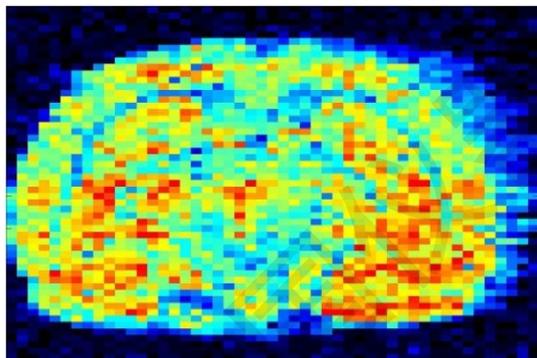
m/z 170.03



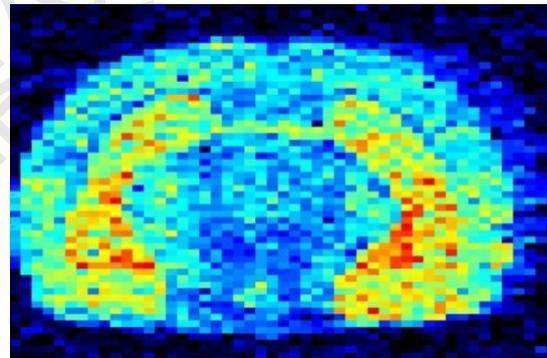
m/z 184.07



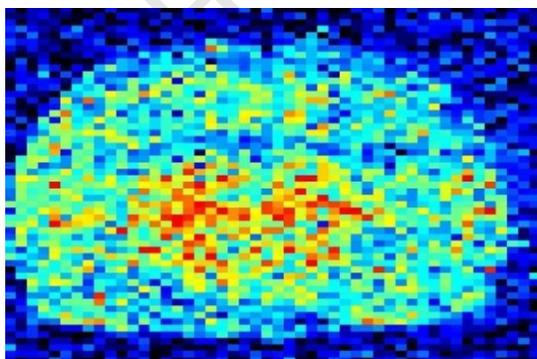
m/z 734.52



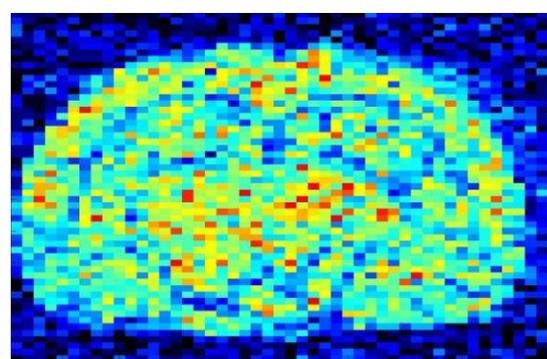
m/z 760.55



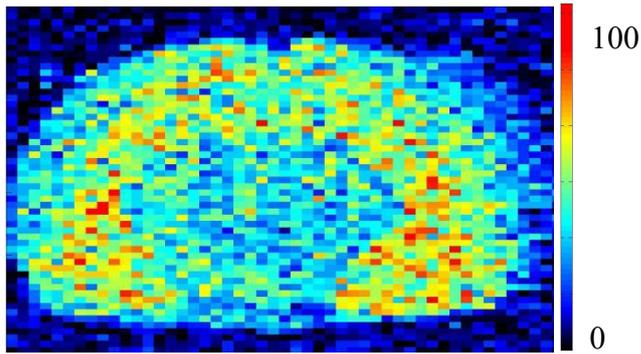
m/z 782.55



m/z 798.51



m/z 806.55



m/z 810.61

图2 脑组织结构图、脑组织 1 的光学图像和成像图

从图 2 中，可以看出内源性代谢物在脑组织的不同区域含量有所变化，较为明显的是磷酸胆碱（phosphoryl choline） m/z 184.07，在整个脑组织中都有分布，但在胼胝体和中脑区域含量较其他区域少。磷酸胆碱是动物细胞卵磷脂活体合成的中间产物，脑神经细胞中卵磷脂的含量约占其质量的 17%~20%。其它五种已知结构的化合物属于磷脂酰胆碱[PC]，磷脂酰胆碱[PC]就是俗称的卵磷脂。

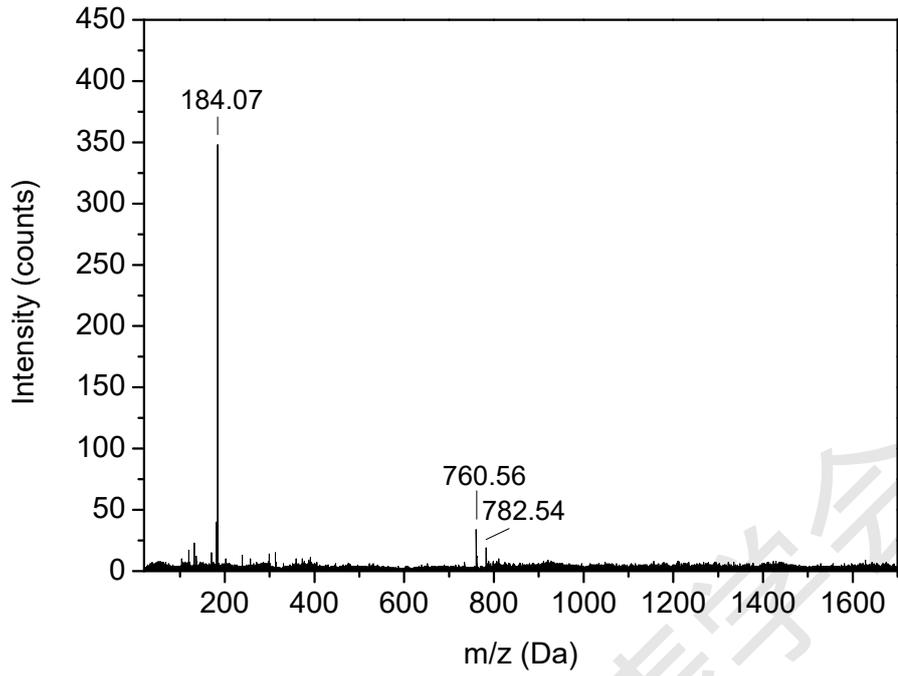
样品编号：脑组织 4

脑组织切片长度为 1.6cm,宽度为 0.95cm,累积谱图数量设置为 52 张，共采集 50 行

下列图 3 中的三张质谱图为脑组织 4 第 11 行的扫描质谱图，从该质谱图找到了 5 个内源性代谢物，包括磷酸胆碱的分子离子峰 m/z :184.07，磷脂酰胆碱（Phosphatidyl cholines,PC）[PC(16:0/18:1)]的分子离子峰 m/z :760.56、[PC(16:0/18:1)+Na]⁺ 的分子离子峰 m/z :782.55 和 [PC(18:0/18:1)+Na]⁺的分子离子峰 m/z :810.61，还有一个未知结构化合物的分子离子峰 m/z :132.07。

利用成像软件 IMS V2.5.1 将脑组织 4 的质谱数据转换为脑组织中特定化合物的成像图，见图 4.从成像图可以看到化合物在脑组织中的分布情况。

样品编号：脑组织4-11



样品编号：脑组织4-11

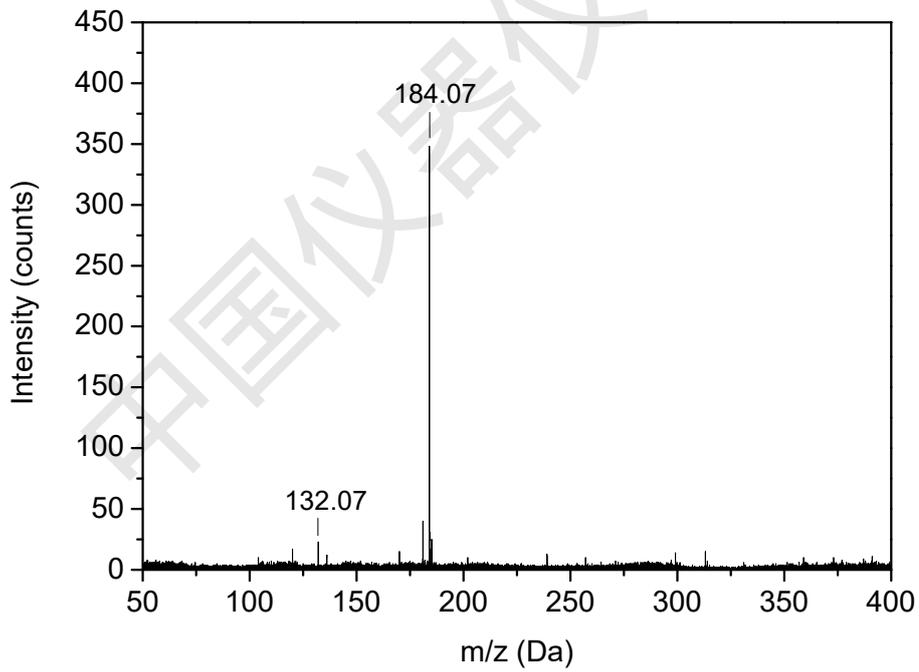


图3 脑组织4的第11行扫描质谱图

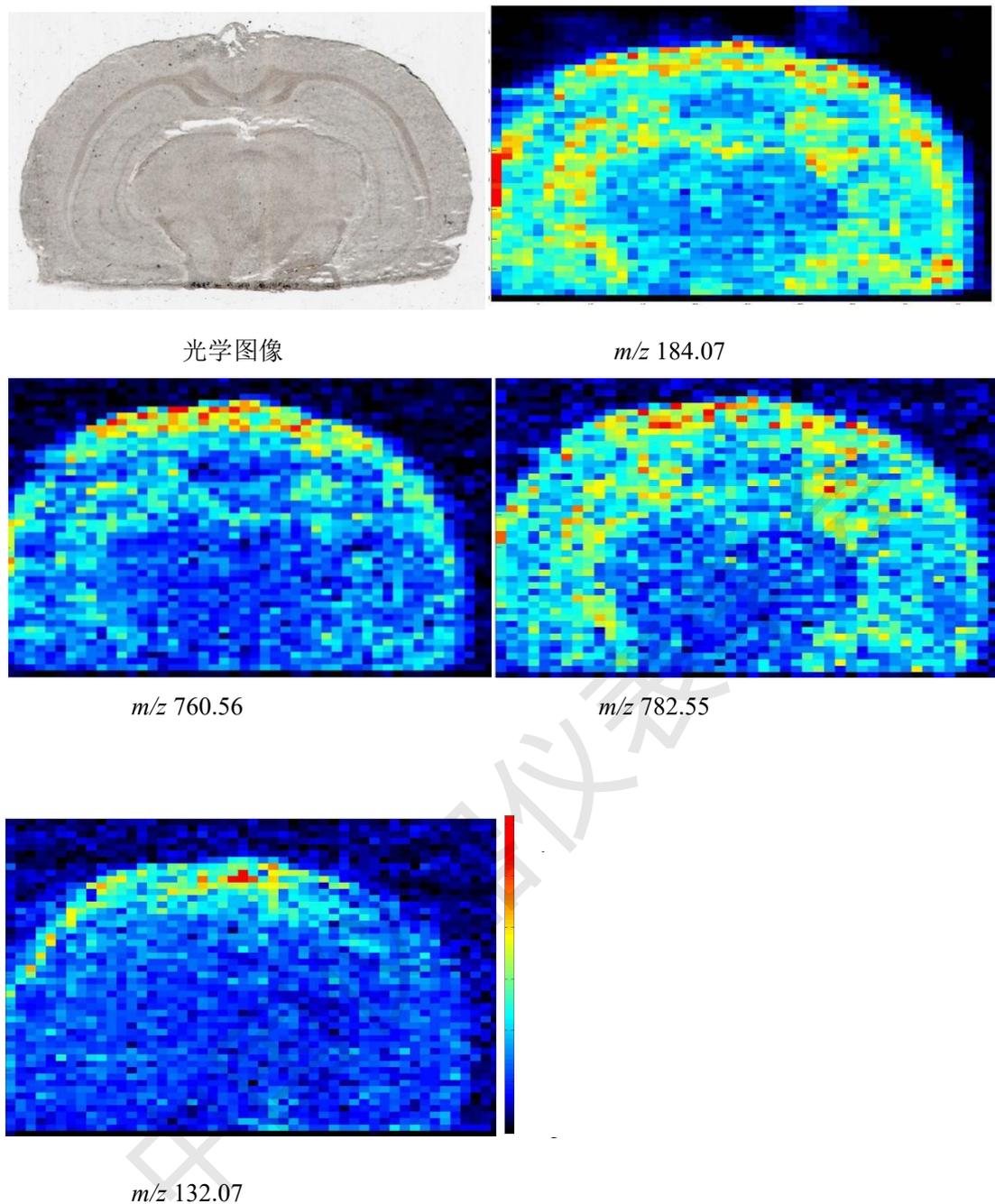


图 4 脑组织 4 的光学图像和成像图

样品编号：脑组织 3

脑组织 3 为脑纵切片长度为 1.35cm,宽度为 1.0cm,累积谱图数量设置为 39 张,共采集 50 行

下列图 5 中的一张质谱图为脑组织 3 第 10 行的扫描质谱图,从该质谱图找到了 5 个内源性代谢物,包括磷酸胆碱的分子离子峰 $m/z:184.07$, 磷脂酰胆碱(Phosphatidyl cholines,PC) [PC(16:0/18:1)]的分子离子峰 $m/z:760.55$ 、[PC(16:0/18:1)+Na]⁺ 的分子离子峰 $m/z:782.55$ 、[PC(34:1)+K]⁺的分子离子峰 $m/z:798.54$ 和[PC(36:3)+Na]⁺的分子离子峰 $m/z:806.56$ 。

样品编号：脑组织3-10

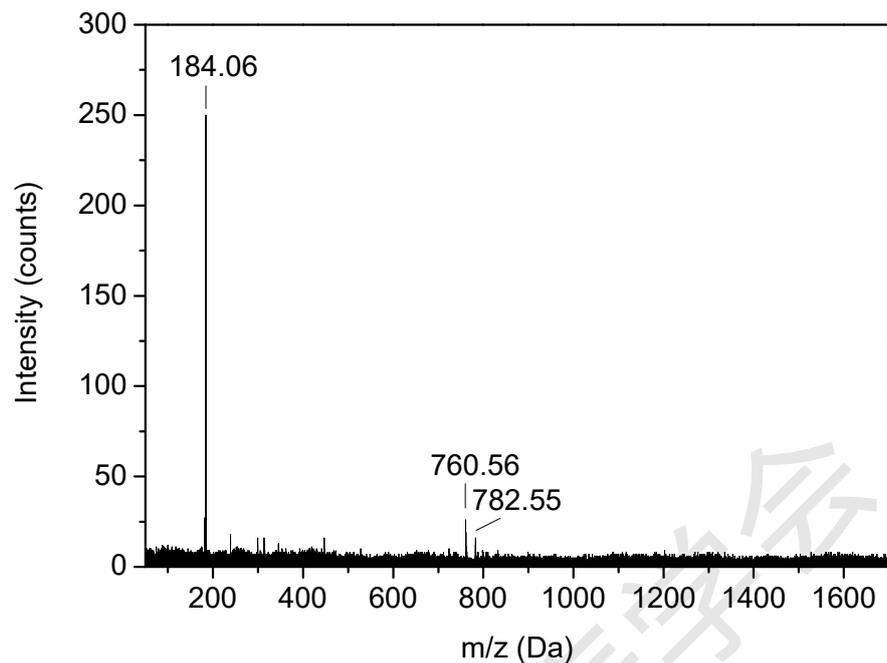
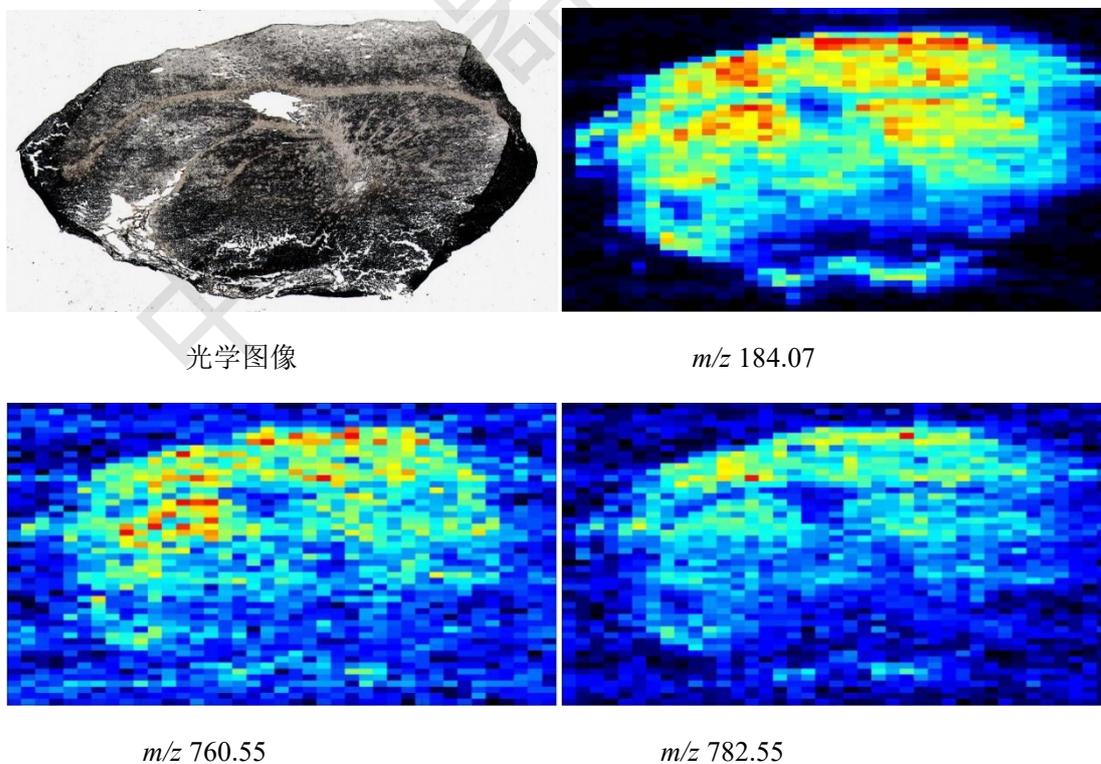


图5 脑组织3的第10行扫描质谱图

利用成像软件 IMS V2.5.1 将脑组织3的质谱数据转换为脑组织中特定化合物的成像图，见图6。从成像图可以看到化合物在脑组织中的分布情况。



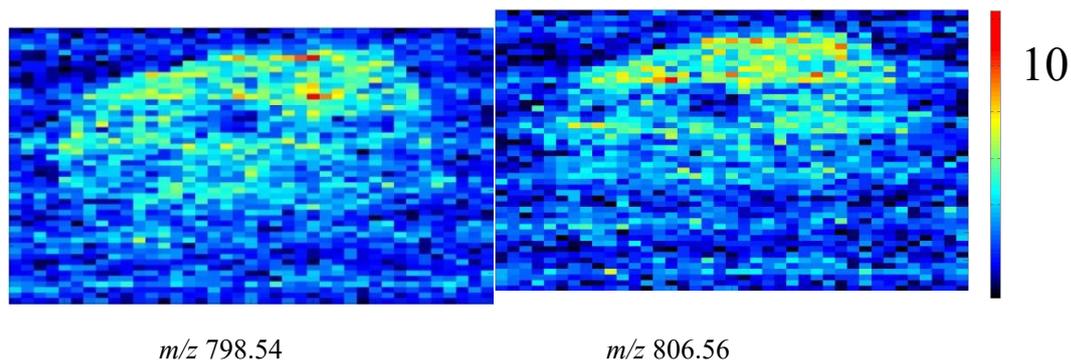


图 6 脑组织 3 的光学图像和成像图

样品编号：20160420 脑组织 3

20160420 脑组织 3 切片长度为 1.7cm,宽度为 1.0cm, 累积谱图数量设置为 49 张, 共采集 50 行

下列图 7 中的三张质谱图为 20160420 脑组织 3 第 12 行的扫描质谱图, 由于此次成像测试信号较弱, 从该质谱图只找到了 1 个内源性代谢物, 磷酸胆碱的分子离子峰 m/z :184.07。

样品编号：20160420脑组织3-12

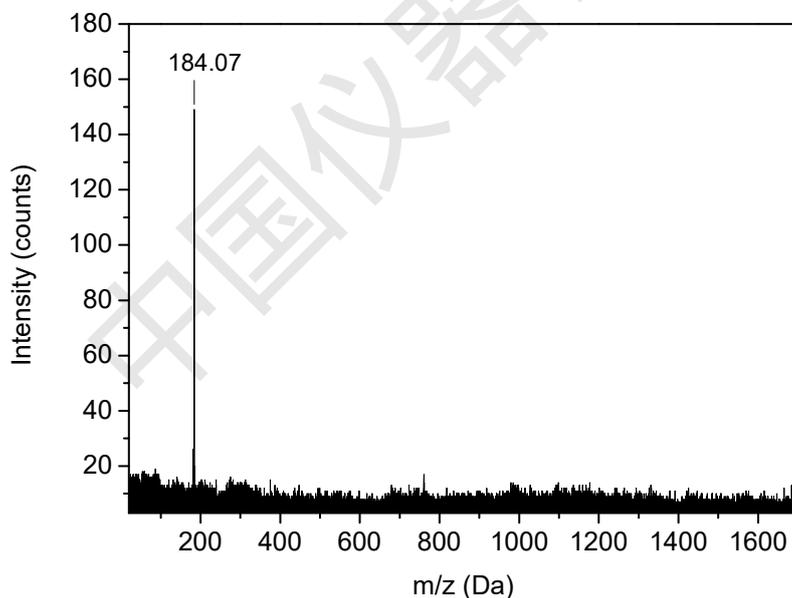


图 7 20160420 脑组织 3 的第 12 行扫描质谱图

利用成像软件 IMS V2.5.1 将 20160420 脑组织 3 的质谱数据转换为脑组织中特定化合物的成像图, 见图 8。从成像图可以看到化合物在脑组织中的分布情况。

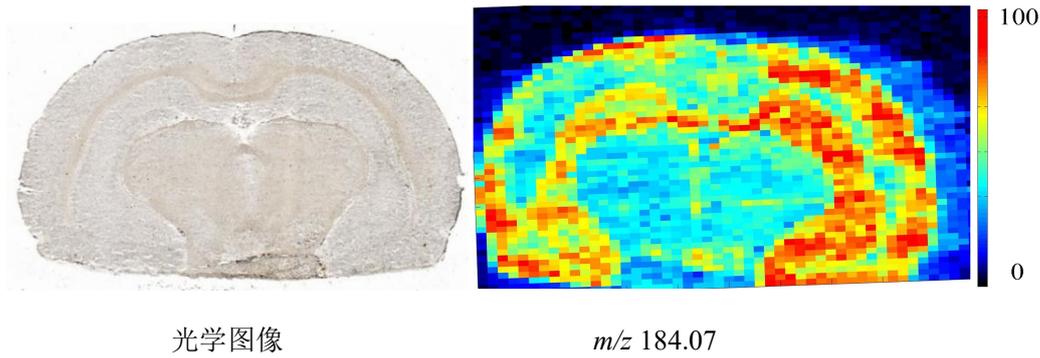


图 8 20160420 脑组织 3 的光学图像和成像图

临床肺癌术后组织样本质谱成像测试

样品编号：肺癌组织 L2463-H

组织切片长度为 1.9cm,宽度为 1.0cm,累积谱图数量设置为 55 张，共采集 50 行

下列图 9 中的 2 张质谱图为肺癌组织 L2463-H 第 12 行的扫描质谱图，从该质谱图只找到了磷酸胆碱的分子离子峰 $m/z:184.07$ ，其余为背景离子。由于磷酸胆碱在脑组织中含量高于在肺组织中含量，所以肺组织的磷酸胆碱信号较弱。

利用成像软件 IMS V2.5.1 将肺癌组织 L2463-H 的质谱数据转换为肺组织中特定化合物的成像图，见图 10.从成像图可以看到此化合物在脑组织中的分布情况。可能是由于用来将组织黏贴在载玻片上的胶较多，外加组织碎屑共同堵塞了质谱口，所以成像未完整，下半部分组织未能成像。

样品编号：L2463-H-12

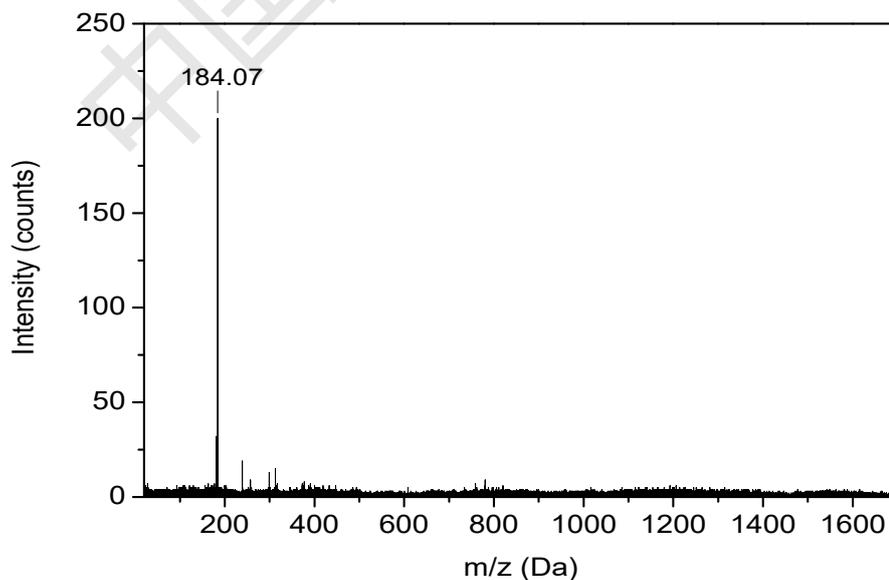


图 9 肺癌组织 L2463-H 的第 12 行扫描质谱图

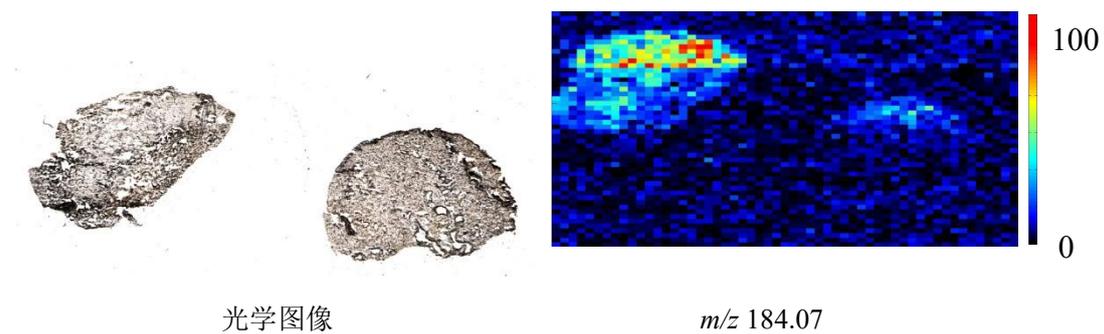


图 10 临床肺癌术后组织 L2463-H 的光学图像和质谱成像图

样品编号：肺癌组织 L1806-H

组织切片长度为 1.6cm,宽度为 0.9cm,累积谱图数量设置为 47 张,共采集 45 行

下列图 11 中的 2 张质谱图为组织 L1806-H 第 15 行的扫描质谱图,从该质谱图只找到了磷酸胆碱的分子离子峰 m/z :184.07。

利用成像软件 IMS V2.5.1 将组织 L1806-H 的质谱数据转换为肺组织中特定化合物的成像图,见图 12.

样品编号：L1806 HT-15

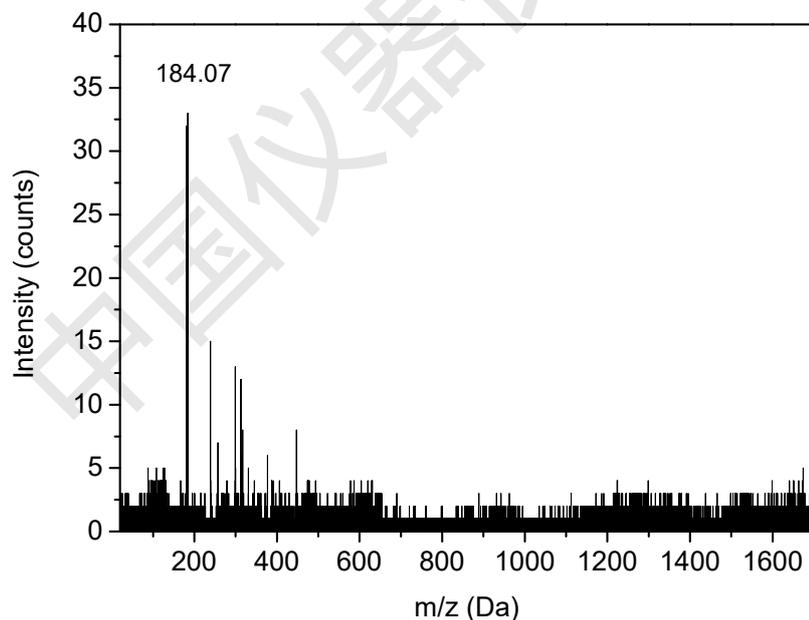


图 11 肺癌组织 L1806-H 的第 15 行扫描质谱图

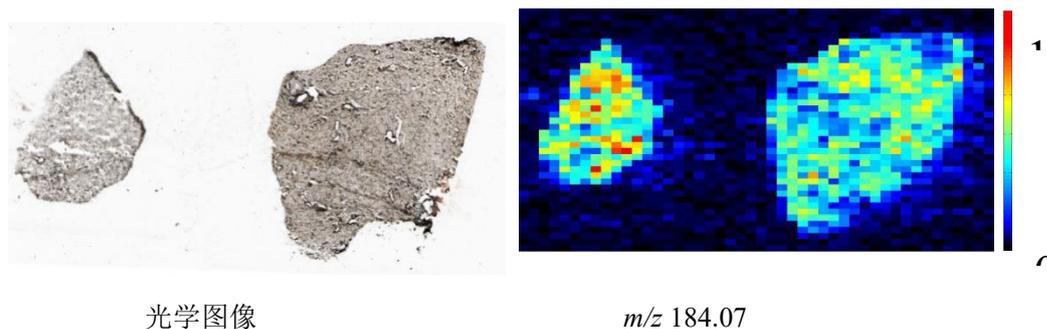


图 12 肺组织 L1806-H 的光学图像和成像图

5 结果与讨论

本研究根据质谱成像实验的要求，设计、优化并研制了 AFAI-MSI 系统所必需的质谱接口和联动控制软件，将国产高分辨飞行时间质谱仪与自主研发的空气动力辅助离子化质谱成像技术相结合，实现了生物组织的质谱成像分析。重点针对抽气流速、传输管的长度、传输管出口至质谱仪采集锥的距离、电压等关键参数进行了优化考察。

基于上述构建优化的 AFAI-MSI 成像系统平台，分别对小鼠的脑组织切片和临床术后肺癌组织切片进行了质谱成像分析，得到了生物组织中磷酸胆碱和磷脂酰胆碱类化合物的分布情况。通过对质谱成像图与光学扫描图像的对比，发现质谱成像图反应出的生物组织中内源性代谢物的分布情况与生物组织的光学扫描图像呈现的组织结构相一致，说明本研究构建的 AFAI-MSI 成像系统平台能够准确的对生物组织进行质谱成像检测。

在 AFAI-APITOF-MSI 的组织成像结果的分析过程中，发现仪器设备存在一些问题。小鼠脑组织的成像质谱图中，除了磷酸胆碱 m/z 184.07 的质谱峰强度较高（200~300 左右），其他质谱峰的强度都较弱（10~20 左右）。由于已经针对药物研究所的空气动力辅助离子化质谱成像装置进行了参数优化，所以推断组织中内源性化合物质谱峰信号弱与 API-TOFMS 10000 灵敏度低有关。由于组织中内源性化合物本身含量较低，AFAI 离子源的离子化效率又低于 ESI 离子源，所以组织成像分析对质谱仪的灵敏度要求较高。API-TOFMS 10000 灵敏度低导致了组织成像分析中内源性化合物检出少，小鼠脑组织中脂质化合物含量较高，所以共检出了 9 种内源性化合物，肺组织中脂质化合物含量低，所以只检出了磷酸胆碱 m/z 184.07 一种内源性化合物。另外，由于仪器灵敏度较低，为了检测到尽可能多的内源性化合物，需要将采集参数中的累积次数设置为 10000 次，这样的设置导致每张谱图的扫描时间增加为 1.4 秒左右，1.4 秒一份质谱数据的间隔使得成像分辨率变差，图像不够清晰。由于 API-TOFMS 10000 无法对检测到的内源性化合物进行多级碎片分析，也使得对内源性化合物的结构解析工作难以开展。综上所述，API-TOFMS 10000 如果想在质谱成像的应用中发

挥作用，必须在仪器灵敏度、扫描速度等方面进行优化改进，希望 API-TOFMS 10000 在应用领域取得更好的成绩！

中国仪器仪表学会