

促甲状腺激素释放激素的电喷雾电离-飞行时间质谱检测^{*}

夏冰¹, 朱辉², 黄正旭², 刘仲明¹, 王捷¹ (1. 广州军区广州总医院医学实验科, 广州 510010; 2. 广州禾信分析仪器有限公司, 广州 510530)

【摘要】 目的 探讨质谱技术在促甲状腺激素释放激素(TRH)检测中的应用。**方法** 将样品用电喷雾电离源在正离子模式下电离,然后置入飞行时间质谱仪检测。先使用利血平甲醇溶液观察仪器状况,再用稀释好的 TRH 溶液进样。**结果** TRH 产生 5 个明显的信号峰,分别位于 m/z 249.074 8、363.138 2、385.111 9、401.000 0、763.234 5,其中 m/z 249.074 8 为 TRH 的特征性碎片峰。**结论** 该研究建立了电喷雾电离-飞行时间质谱技术鉴定 TRH 的方法,其特异性高及检测速度快,为下一步研究 TRH 的定量质谱检测方法奠定了基础。

【关键词】 促甲状腺激素释放激素; 质谱技术; 电喷雾电离

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.11.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)11-1504-02

Detection of thyrotropin-releasing hormone by electrospray ionization-time of flight mass spectrometry^{*} XIA Bing¹, ZHU Hui², HUANG Zheng-xu², LIU Zhong-ming¹, WANG Jie¹ (1. Department of Medical Research, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 2. Guangzhou Hexin Analytical Instrument Company, Guangzhou, Guangdong 510530, China)

【Abstract】 Objective To explore the application of mass spectrometry in the detection of thyrotropin-releasing hormone (TRH). **Methods** The sample was ionized by electrospray source operating in positive-ion mode, and then was analyzed by a time of flight mass spectrometer. After we were sure that the equipment condition was fine by injecting reserpine first, we injected TRH to the system. **Results** TRH produced 5 peaks, which were at m/z 249.074 8, 363.138 2, 385.111 9, 401 和 763.234 5 respectively, and the fragment at m/z 249.074 8 was a specific TRH product. **Conclusion** In this study we have established a method of detection of TRH by electrospray ionization-time of flight mass spectrometry, which has high sensitivity and high speed, so it has laid the foundation for our future study on quantification of TRH by mass spectrometry.

【Key words】 thyrotropin-releasing hormone; mass spectrometry; electrospray ionization

促甲状腺激素释放激素(TRH)是最早被发现的促垂体激素,其相对分子质量较小,仅为 1 个三肽(pGlu-His-Pro-NH₂),主要产生于下丘脑^[1]。近年来研究发现,TRH 并不仅表达于脑内,其在肌体内广泛分布,发挥多种多样的生理功能。TRH 除了调控促甲状腺激素(TSH)从垂体前叶释放,还具有抗抑郁、抗癫痫、神经修复、升血压、抗休克、降血糖、免疫调节、促进头发生长和变黑等作用^[2-4]。在已有的 TRH 检测方法中,电化学荧光和高压液相色谱(HPLC)法的操作十分繁琐,放射免疫法灵敏度很高但特异性较低^[5]。这些方法的缺点限制了在实际工作中的应用,尤其满足不了临床检验和药学研究的需要。为此,本研究尝试建立一种利用质谱仪检测 TRH 的新方法,报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 (1)仪器:电喷雾电离源(广州禾信分析仪器有限公司自主研制);大气压电离飞行时间质谱仪(广州禾信分析仪器有限公司自主研制,型号 APITOF5000);0.5 mL 注射器(Hamilton);兰格实验室用注射泵 LSP01-1A;喷针(内径 250 μ m、外径 1/16 英寸)、喷雾毛细管(内径 100 μ m、外径 190

μ m)。(2)试剂:促甲状腺激素释放激素(Sigma-aldrich, P1319-50 mg);利血平(阿拉丁试剂上海有限公司, HPLC 级);甲醇(Dikma 公司, HPLC 级);纯净水(广州屈臣氏食品饮料有限公司, 屈臣氏)。

1.2 方法 首先使用 1.7×10^{-7} mol/L 利血平甲醇溶液[溶剂为甲醇:水=80:20(V/V)],观察仪器状况,然后取 100 μ L TRH 水溶液(5×10^{-4} mol/L)与 2 mL 溶剂[甲醇:水=80:20(V/V)]混匀,获得浓度为 2.5×10^{-5} mol/L 的 TRH 溶液,上样。第 1 步使用电喷雾电离源将样品电离,第 2 步利用质谱仪进行分析。电喷雾离子化模式:正离子模式;TOF 运行模式:V 模式;分辨率:4 000~5 000;扫描范围: m/z 80~3 000;离子源电压 3.5 kV;毛细管电压(Capillary):150 V;毛细管温度:150 $^{\circ}$ C;四极杆接口电压 150 Vpp;调谐溶液:利血平(m/z 609.273),30 pg/ μ L。辅气为 0.5 MPa 高纯氮气,进样流速为 7 μ L/min。质谱检测与分析软件为禾信自主研发的 TDC 数据采集处理软件,版本号 TDC-V1.1。

2 结果

2.1 利血平溶液(1.7×10^{-7} mol/L)实验结果 利血平相对

^{*} 基金项目:广东省科技计划项目(2013B021800052)。

作者简介:夏冰,女,博士,副主任医师,主要从事基础医学研究。

分子质量为 608.68, 质谱图上显示的数据与之相符, 表明仪器状况正常, 可用于后续样品检测。见图 1。

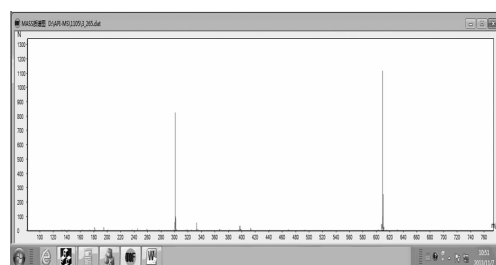


图 1 利血平溶液 (1.7×10^{-7} mol/L) 实验

2.2 TRH 样品的检测结果 将稀释好的 TRH 溶液 (2.5×10^{-5} mol/L) 进样, 一共产生 5 个明显的信号峰, 分别位于 m/z 249.074 8、363.138 2、385.111 9、401.000 0、763.234 5。见图 2。

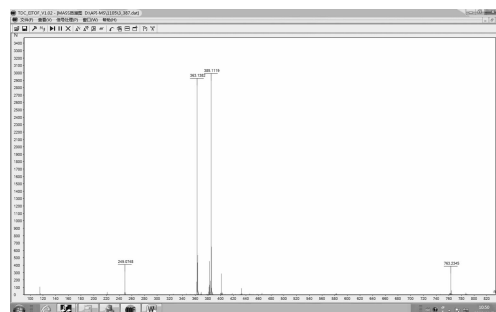


图 2 TRH 样品的检测结果

3 讨 论

1970 年 Guillemin 小组首次报道了 TRH 这一参与调节垂体激素释放的物质, 但后来的相关研究表明, 该三肽的生理功能远不止于此, 而且在某些疾病时其含量会发生变化。这些新发现要求建立一种检测 TRH 的特异而敏感的方法。目前已有的检测方法均存在各种缺陷, 如放射免疫测定法由于仅针对免疫表位从而缺乏分子的特异性, 导致定性与定量的不准确; 荧光定量 PCR 技术则由于 mRNA 水平不总是反映实际的基因表达量而造成检测结果也不准确, 因此有必要研发更高特异性的定性与定量手段检测 TRH。

质谱技术被认为是一种检测和分析蛋白质及小分子的重要方法。有学者研究报道, 可用质谱法检测的生物活性多肽包括视紫质、C-反应蛋白、 β -内啡肽等^[6-8]。本研究建立了一种基于质谱的快速而敏感的 TRH 检测方法, 本实验数据显示, m/z 249.074 8 为 TRH 电离后产生的特异性碎片峰, 相当于 N 端焦谷氨酸-组氨酸二肽, 与 Chambery 等^[9]用质谱方法检测的结果一致。TRH 的相对分子质量为 362.38, 因此其分子离子峰 ($M+H^+$) 理论上应在 m/z 363.38。而本组实验的测定值为 363.138 2, 与理论值略有差异, 可能是由于样品浓度过高、相应的峰过于饱和导致实验误差。 m/z 385.111 9 为 TRH 与 Na^+ ($MW=23$) 络合形成的峰 ($M+Na^+$), m/z 401.000 0 为 TRH 与 K^+ ($MW=39$) 络合形成的峰 ($M+K^+$), m/z 763.234 5 为 2 个 TRH 分子与 1 个 K^+ 络合形成的峰 ($2M+K^+$)。图谱中这些 Na^+ 、 K^+ 的掺入可能是由于原液在玻璃瓶

中浸泡时间过长所导致。

综上所述, 本研究方法用于检测 TRH 具有高度的特异性, 而且操作简便, 耗时少, 从上样到取得结果仅需数分钟。下一步本组将研究 TRH 定量分析的质谱技术, 最终达到检测生物体液和组织 TRH 含量的目标。

参考文献

- [1] 夏冰, 王钢, 王捷. 促甲状腺激素释放激素的广泛生物学作用[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(22): 105-107.
- [2] Asai H, Watanabe Y, Yamauchi-Kohno R, et al. Reversal of hemorrhagic shock in rats using the metabolically stable thyrotropin-releasing hormone analog taltirelin hydrate[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2011, 31(6): 416-422.
- [3] Luo L, Luo JZ, Jackson I. Tripeptide amide L-pyroglutamyl-histidyl-L-prolineamide (L-PHP-thyrotropin-releasing hormone, TRH) promotes insulin-producing cell proliferation[J]. Curr Aging Sci, 2013, 6(1): 8-13.
- [4] Gáspár E, Nguyen KT, Hardenbicker C, et al. Thyrotropin-releasing hormone selectively stimulates human hair follicle pigmentation[J]. J Invest Dermatol, 2011, 131(12): 2368-2377.
- [5] Nillni EA, Vaslet C, Harris M, et al. Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis: evidence for direct and indirect pathways[J]. J Biol Chem, 2000, 275(46): 36124-36133.
- [6] Barnidge DR, Goodmanson MK, Klee GG, et al. Absolute quantification of the model biomarker prostate-specific antigen in serum by LC-MS/MS using protein cleavage and isotope dilution mass spectrometry[J]. J Proteome Res, 2004, 3(3): 644-652.
- [7] Kuhn E, Wu J, Karl J, et al. Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ^{13}C -labeled peptide standards[J]. Proteomics, 2004, 4(4): 1175-1186.
- [8] Han SH, Kim JS, Lee Y, et al. Both targeted mass spectrometry and flow sorting analysis methods detected the decreased serum apolipoprotein E level in Alzheimer's disease patients[J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13(2): 407-419.
- [9] Chambery A, Severino V, Di Maro A, et al. Quantification of thyrotropin-releasing hormone by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry[J]. Amino Acids, 2010, 38(4): 1031-1041.

(收稿日期: 2014-12-15 修回日期: 2015-02-18)