

基于质谱检测的相关色谱技术在阿尔茨海默病诊断中的应用

王鼎乾, 辛贵忠, 石子琪, 陈君*, 李萍*

(现代中药教育部重点实验室 中国药科大学学生药学教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 随着世界老年人口的急速增长, 阿尔茨海默病发病人数也逐年增多, 已成为继心脑血管疾病和恶性肿瘤之后威胁人类健康的“第三大杀手”。疾病的诊断和治疗同等重要, 阿尔茨海默病诊断通常依靠典型的临床特征、神经影像技术以及检测疾病相关的生物标志物等。近些年来蛋白质组学和质谱技术迅速发展, 可以利用这些技术寻找与疾病相关的特异性的蛋白质分子作为早期诊断的生物标志物。本文就此进行了综述, 主要包括基于蛋白质组学的诊断标志物的筛选和基于质谱检测的色谱技术在阿尔茨海默病诊断中的应用, 引用文献 34篇。

关键词: 质谱; 色谱技术; 阿尔茨海默病; 生物标志物

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2011)04-0293-05

Application of mass spectrometry-based chromatographic technologies in the diagnosis of Alzheimer's disease

WANG Dingqian, XIN Guizhong, SHI Ziqi, CHEN Jun*, LI Ping*

(Key Laboratory of Modern Chinese Medicines, Ministry of Education, Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract With the rapid growth of the elderly population in the world, the incident number of Alzheimer's disease (AD) is also increasing year by year. AD has become “the third biggest killer” to human health besides cardiovascular and cerebrovascular diseases and cancers. The diagnosis and treatment of diseases are of equally significance. Generally, the diagnosis of AD relies upon the typical clinical features, neuroimaging techniques, and the detection of disease-related biomarkers. In recent years, proteomics and mass spectrometry technology have developed rapidly, which can be used to find specific disease-related proteins as biomarkers for early diagnosis. This review focused on the proteomics-based screening of diagnostic biomarkers and the mass spectrometry-based chromatographic technologies applied in the diagnosis of AD. 34 references are reviewed.

Key words mass spectrometry (MS); chromatographic technologies; Alzheimer's disease (AD); biomarker

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 又称老年痴呆症, 是一种慢性进行性精神衰退性疾病, 临床特征为严重的认知功能和记忆功能障碍。在中国, AD的患病率已经渐渐与西方国家水平接近, 65岁以上的老年人 AD的患病率大约是 5.0%^[1]。AD病因及发病机制尚未完全阐明, 目前主要认为与以下因素有关: 多基因缺陷、细胞凋亡、氧化应激、 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, $A\beta$) 沉积、tau蛋白

过度磷酸化和免疫炎症反应等。AD主要的临床特点是记忆力减退、脑组织存在神经元纤维缠结和老年斑, 其诊断通常依靠典型的临床特征和神经影像技术, 以及检测疾病相关的生物标志物等^[2]。目前, 一些诊断 AD的蛋白生物标志物已经确定, 主要是存在于脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 中的一些肽类, 如 tau蛋白和 $A\beta$; 但是仅仅依靠这些标志物进行临床诊断的准确率并不高, 且脑脊液检测为

* 通讯联系人: 李萍, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为生药活性成分与质量评价。E-mail: liping2004@126.com.

陈君, 副教授, 研究方向为中药复杂成分的分析与活性评价。E-mail: jinxin14@163.com.

基金项目: “十一五”国家“重大新药创制”科技重大专项 (No. 2009ZX09502-020) 和国家自然科学基金面上项目 (No. 81073006).

收稿日期: 2011-02-21

有创性操作,多数患者不愿意接受,因此需要找到一些新的 AD 诊断标志物以提高诊断的灵敏性和准确性以及监测疾病的发展^[3]。在寻找生物标志物方面,色谱与质谱联用技术与其他的生物检测手段相比,具有快速、简便、高通量、样品用量少及前处理简单等优势,它是基于色谱的高分离能力及质谱的高灵敏度和专属性的分离检测技术,已广泛应用于药物分析、天然产物分析、生物大分子分析等^[4]。蛋白质组学基于质谱检测的相关色谱技术对正常个体及病理个体间的蛋白质组进行比较分析,找到某些“疾病特异性的蛋白质分子”,即作为疾病的诊断标志物^[5]。本文对基于蛋白质组学的 AD 诊断标志物的筛选和基于质谱检测的相关色谱技术在阿尔茨海默病诊断中的应用进行了综述。

1 基于蛋白质组学的诊断标志物的筛选

近年来,蛋白质组学得到了广泛的研究。蛋白质组学即以蛋白质组为研究对象,应用相关研究技术,从整体水平上来认识蛋白质的存在及活动方式。蛋白质组学实验一般包括蛋白质的分离、消化、鉴定以及数据处理等几个步骤^[6]。目前,基于蛋白质组学技术来寻找 AD 诊断标志物的方法已得到广泛的应用,但该方法最大的挑战在于寻找到 AD 发病前期的蛋白质变化,并阐明此变化在 AD 病理学中的作用^[7]。表 1 总结了一些已发现的潜在 AD 生物标志物,包括在脑及脑脊液^[2 8- 11]、血液^[12- 14]和尿液^[15]中与 AD 相关的蛋白质的变化。

表 1 AD 潜在的生物标志物
Table 1 Potential biomarkers of AD

Sample	Potential biomarker	Level ¹⁾	Detection technique ²⁾	Ref
Brain or CSF	cystatin C	↑	SELD FTOF MS	[2]
	VGF	↓	SELD FTOF MS	[2]
	neurosteroids	↓	GC-MS	[8]
	α-1-acid glycoprotein	↑	LC-MADLI TOF/TOF MS	[9]
	β-2-glycoprotein 1	↑	LC-MADLI TOF/TOF MS	[9]
	sphingomyelin	↑	nanοLC-ESI-QTOF MS	[10]
	albumin	↑	nanοLC-MALDI TOF/TOF MS	[11]
	amyloid β A4 protein	↑	nanοLC-MALDI TOF/TOF MS	[11]
	β fibrinogen	↑	nanοLC-MALDI TOF/TOF MS	[11]
	β-2-microglobulin	↑	SELD FTOF-MS nanοLC-MALDI TOF/TOF MS	[2 11]
	neuronal pentraxin 1	↑	nanοLC-MALDI TOF/TOF MS	[11]
	thioredoxin	↑	nanοLC-MALDI TOF/TOF MS	[11]
	immunoglobulin heavy chain	↓	nanοLC-MALDI TOF/TOF MS	[11]
	N-acetyllactosamine	↓	nanοLC-MALDI TOF/TOF MS	[11]
Plasma or serum	docosahexaenoic acid	↓	GC-IT MS	[12]
	total hydroxyoctadecadienoic acid	↑	GC-QMS	[13]
	oxidatively modified peroxiredoxin	↑	GC-QMS	[13]
	LPCs	↓	UPLC-ESI-MS/MS	[14]
	sphingosine	↓	UPLC-ESI-MS/MS	[14]
	tryptophan	↓	UPLC-ESI-MS/MS	[14]
Urine	F ₂ -isoprostanes	↑	GC/MS-SM	[15]

1) differential levels from AD patients as compared to controls 2) SELDI surface-enhanced laser desorption/ionization TOF time-of-flight mass spectrometry; ESI electrospray ionization; MALDI matrix-assisted laser desorption/ionization IT ion trap; LC liquid chromatography; GC gas chromatography; UPLC ultra performance liquid chromatography MS mass spectrometry

2 基于质谱检测的色谱技术在 AD 诊断中的应用

质谱是蛋白质鉴定和定量环节中最为关键的技术,其包括样品离子化、质量分析以及数据采集三方面。对于蛋白质及多肽等大分子物质的鉴定,基质辅助激光解吸电离(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)和电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)^[16]两种离子化技术尤为重

要。此外,还有一种在 MALDI 基础上有所改进的离子化技术——表面增强激光解吸电离技术(surface-enhanced laser desorption/ionization, SELDI),可直接在固相的吸附了蛋白质的芯片表面使用脉冲氮激光能量,使被捕获的靶蛋白从芯片表面电离出来。此方法可用于从生物样品中捕获蛋白^[17]。蛋白质芯片根据色谱原理,表面经化学或生化处理后选择性地结合生物样品中的靶蛋白质,再通过清洗除去杂质。基于 SELDFTOF-MS 技术,

Carrette 等^[2]对比 AD 患者和健康对照者的脑脊液, 发现 AD 组中胰蛋白酶抑制剂 C 血管生长因子、 β -2 微球蛋白有明显的含量变化。Zhou 等^[18]用弱阳离子交换蛋白质芯片和 SELDI 技术从人血清中筛选出 383 个与疾病相关的蛋白质, 其中已鉴定出 50 个可作为潜在的生物标志物, 包括与 AD 相关的 α -2-HS 糖蛋白、色素上皮源性因子和血清淀粉样蛋白 P 等。目前常用的质量分析仪包括四极杆质谱仪、离子阱质谱仪、飞行时间质谱仪和傅里叶变换质谱仪。其中飞行时间质谱 (time-of flight mass spectrometry, TOF MS) 易于制造和操作, 在理论上无测定质量上限, 数据采集使用快电子元件, 具有很高的采样速率和灵敏度, 因而常用于蛋白质的质量分析。此外, 串联质谱 (tandem MS, MS/MS) 较常用于蛋白质组学研究, MS/MS 可测定一级结构, 例如测肽链的氨基酸序列, 一级质谱用于分离获得离子, 二级质谱将离子裂解获得氨基酸序列的信息^[19]。

质谱检测器具有高灵敏度、高分辨和高选择的特性, 但只有与色谱技术强大的分离能力结合时才能发挥其作用, 否则基质干扰、组分间相互干扰必然会造成离子抑制, 影响其灵敏度和选择性。目前色谱-质谱联用技术已成为一种重要的寻找生物标志物的技术手段, 主要包括以下三方面: 气相色谱-质谱联用 (GC-MS)、液相色谱-质谱联用 (LC-MS)、毛细管电泳-质谱联用 (CE-MS)。

2.1 GC-MS

气相色谱具有分析速度快、分离效能高、灵敏度高等优点, 但这些优点都是与气体作流动相, 被分离成分在分离过程中必须气化这个根本特点分不开的。对于极性高、挥发性低、热稳定性差的物质需要衍生化后再进行 GC-MS 分析。衍生化不仅可以改善分析对象的挥发性、峰形、分离度, 也可提高检测的灵敏度^[20]。

气相色谱可连接多种检测器, 其中以火焰离子化检测器和质谱检测器最为常见。在 AD 诊断方面, Schumacher 等^[8]应用 GC-MS 测定了 AD 患者和健康对照者不同脑区域中一系列神经甾体类成分, 发现其浓度与磷酸化 tau 蛋白和 $A\beta$ 呈负相关。Wang 等^[12]用气相色谱-离子阱质谱 (GC-IT MS) 技术对 AD 患者和健康对照者的血清中游离脂肪酸进行多变量统计分析, 通过比较发现存在 2 种饱和脂肪酸和 3 种不饱和脂肪酸的含量在 AD 组血清中明显低于对照组, 同时分析结果显示二十二碳六烯酸 (DHA) 是 AD 潜在的生物标志物。Yoshida 等^[13]

用双向凝胶电泳和气相色谱-四极杆质谱 (GC-QMS) 技术分离和鉴定了 AD 患者血浆及红细胞中的总羟基亚油酸 (tHODE) 和氧化修饰过氧化酶 (oxP rx-2 和 oxP rx-6), 发现其含量明显高于健康对照组, 以上两类成分可作为 AD 诊断的生物标志物; 同时发现可通过比较血浆和红细胞之间量的关系来鉴别血管型痴呆。Kim 等^[15]应用 GC-MS 在选择离子监测 (SM) 模式下测定 AD 患者尿液中 F_2 -异前列腺素水平明显高于健康对照者, 可将其作为 AD 潜在的生物标志物。此外, Wang 等^[21]应用 GC/MS-SM 定量测定 AD 患者和健康对照者脑中各区域的核脱氧核糖核酸 (DNA) 和线粒体 DNA 中的多种氧化的成分, 发现其在 AD 患者脑中的含量明显高于健康对照者, 并证明线粒体 DNA 氧化损伤可能导致了 AD 的神经退行性, 为 AD 的诊断提供了又一依据。在分析复杂生物样品时, 全二维气相色谱 (GC $\times$ GC) 相比一维 GC 具有分辨率高、峰容量大、灵敏度高及分析时间短等优势。Snyder 等^[22]开发出应用 GC $\times$ GC-TOF MS 分析神经毒素 β -甲氨基-L-丙氨酸 (BMAA) 的方法, 利用此方法分析小鼠脑中的 BMAA 检出限可达 0.7 ppb 在 AD 患者和健康对照者脑中并未检测出 BMAA。

2.2 LC-MS

高效液相色谱 (HPLC) 具有分离效率高、分析速度快、应用范围广等特点, 与 GC 相比, 样品可以经简单的预处理之后直接用于 HPLC 分析, 避免了衍生化等繁杂的预处理, 且不受样品挥发性和热稳定性影响, 是一种更加普适性的分析手段。当其与 MS 联用时, 能够集 HPLC 高分离性能和 MS 高灵敏度、高专属性优点于一体, 且具有提纯和制备单一物质的能力, 适用于那些热不稳定、不易挥发、不易衍生化和相对分子质量较大的物质。目前, LC-MS 技术已发展成为寻找疾病生物标志物的主流技术手段之一^[23]。

Yin 等^[24]应用一维凝胶色谱与高效液相色谱-三重四极杆质谱联用测定 AD 和帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 患者患病各阶段的脑脊液中的 371 种蛋白质, 发现脑脊液中的神经穿透素受体 (neuronal pentraxin receptor, NPR) 是潜在的 AD 诊断生物标志物。Mueller 等^[25]通过认知正常、轻度认知功能障碍 (mild cognitively impaired, MCI) 和轻度 AD 的受试者收集到 AD 各阶段的血清样品, 应用高效液相色谱-静电场轨道阱组合式高分辨傅里叶变换质谱联用 (LC-LTQ-Orbitrap MS) 技术测定血清中低相对分子质量的蛋白质, 鉴定出与

AD病理过程相关的蛋白质,如鞘脂激活蛋白原、磷脂酶 D1、胆绿素还原酶 B 和钙结合蛋白 S100A7 等,通过反相蛋白质阵列分析进行确证,结果显示血红素降解途径很可能是 AD 早期诊断的蛋白质生物标志物的来源。此外, Mielke 等^[26]应用 HPLC-ESI-MS/MS 测定血浆中神经酰胺类物质的含量,发现其中长链的 C22:0 和 C24:0 神经酰胺类物质的含量 MCI 组明显低于正常组和 AD 组,并且发现其含量降低与右侧海马体积缩小相关。基于 LC-MALDI TOF/TOF MS 技术, Pan 等^[9]进行定向定量蛋白质组学研究,利用同位素标记的合成肽作为参比鉴别和定量蛋白质, MS 用于确证结果,最后应用此方法对比 AD 患者和 PD 患者以及健康对照者的脑脊液样本,筛选出了一组相关的蛋白质,其中 AD 组中 α -1-酸性糖蛋白质和 β -2-糖蛋白 1 的含量明显高于其他组。Bahl 等^[27]开发了一种分离和鉴别从脑脊液蛋白衍生所得的磷酸化胰蛋白酶肽的方法,利用简单的样品处理后经二氧化钛亲和柱色谱分离,然后应用 MALDI-TOF MS 或者高效液相色谱-线性离子阱质谱联用 (LC-MS/MS linear ion-trap-FT) 鉴别,在 38 种蛋白中找到了 56 个新的磷酸化位点。此方法可应用于在脑脊液磷酸化蛋白质中寻找新的生物标志物。

常规反相 (RP)-HPLC 在分离复杂生物样品时有明显的不足之处,如分离度较低,对极性化合物的保留能力差,损失了这些强极性样品的信息。目前有两种解决方式:一是通过使用更小的色谱柱填料来增加峰容量和分离度,其次是增加柱压。此时可选择纳流液相色谱 (nanoliquid chromatography, nano-LC) 代替常规的反相色谱。Myint 等^[28]开发出应用 nano-LC/MS 分析强极性样品的方法,并用此方法寻找 AD 的生物标志物,从 10 μ L 脑脊液中可检测出数百个峰,用主成分分析法 (PCA) 筛选出 55 个潜在的脑脊液 AD 候选生物标志物。基于 nano-LC-ESI-QTOF MS 技术, Kosicek 等^[10]比较了 AD 疑似病例和健康对照者脑脊液中磷脂类的含量,结果显示 AD 疑似病例脑脊液中鞘磷脂含量明显升高,可以将其作为诊断 AD 的一个潜在指标。Abdi 等^[11]应用同位素相对标记与绝对定量 (iTRAQ) 结合 nano-LC-MALDI TOF/TOF MS 技术比较 AD 患者与健康对照者脑脊液的蛋白质,发现其中有 132 个蛋白质含量改变。可采用超高效液相色谱 (UPLC) 改善极端复杂样品的分离状况, UPLC 相对于 HPLC 更高效、快速、灵敏,和质谱联用时基质干扰减少,从而可提高质谱的检测灵敏度。Li

等^[14]应用 UPLC-ESI-MS/MS 分别测定 AD 患者和健康对照者的血浆,利用 PCA 法对比二者之间的代谢差异,筛选出潜在的生物标志物,如溶血磷脂胆碱 (LPCs)、鞘胺醇和色氨酸等,表明 AD 明显对卵磷脂、氨基酸和磷脂的代谢存在干扰。

质谱寻找生物标志物的主要方式是对目标肽类的定量分析,一般在定量时需加入内标物,导致后续的数据处理过程相当耗时费力,因而开发数据处理软件很有必要。Oh 等^[29]开发了基于 LC/MALDI TOF/TOF MS 的自动定量和鉴定蛋白质的数据分析软件,并通过其比较 AD 组和空白组的脑脊液蛋白质定量分析结果,检测出了一组可作为 AD 潜在生物标志物的相关蛋白质。

2.3 CE-MS

与其他色谱技术相比, CE 具有分析速度快、分离效率高及样品量需求少等优点。CE 应用范围很广,可用于分析无机离子、有机酸、氨基酸、核苷及核苷酸、糖类和肽类等^[30]。CE 可在单次分析实验中分离阴离子、阳离子和中性分子,因此 CE-MS 可同时测定不同类型的化合物。

在疾病诊断方面,生物样品只要简单预处理便可用于 CE-MS 分析。Varesio 等^[31]比较了 nano-LC 和 CE 分别与 MS 联用测定血浆中 $A\beta$ 1-40 的浓度来监测 AD 的疾病发展,发现血浆中 $A\beta$ 1-40 的浓度低于检出限,需要装预柱富集样品。Vepillot 等^[32]开发出利用 CE-UV (紫外检测) 分离和定量 5 个淀粉样蛋白 ($A\beta$ 1-42, 1-40, 1-39, 1-38 和 1-37) 的方法,并证明此方法可应用于生物样品。Wittke 等^[33]应用 CE/ESI-TOF MS 对比分析患者和健康对照者尿液和脑脊液中的多肽,寻找到一些疾病的潜在生物标志物,其中包括脑脊液中一些与 AD 相关的多肽。CE-MS 分析蛋白质时存在重现性不好的问题,这是由于蛋白质和毛细管内表面之间相互作用使得电渗流 (EOF) 不稳定造成的。为此, Akashi 等^[34]开发了微型芯片 (μ Chip) CE/ESI-QTOF MS 用于快速测定碱性蛋白质,其微通道内表面采用碱性多聚体涂层以达到良好的重现性,同时减少了分析时间和进样量。此方法可借鉴用于寻找 AD 生物标志物。

3 展望

色谱-质谱联用技术在寻找 AD 生物标志物方面起了相当关键的作用,为 AD 的明确诊断提供了重要的证据,以达到监测疾病发展过程和观察药物治疗效果的目的。但是由于 AD 的发病机制尚未完

全阐明以及色谱-质谱联用技术上的一些不足, 还有许多问题仍需要解决。同时, 对极端酸性、碱性和难溶性蛋白质的分离和鉴定仍很困难, 因而许多重要蛋白质的信息可能会丢失。此外, 目前的研究往往只局限于检测某一类型的蛋白质, 并且很难解释其与 AD 神经退行性病理过程之间的关系, 但是若要将研究应用于临床, 应从多角度、多层次整体检测 AD 相关蛋白质, 并阐明其在 AD 病理过程中的作用, 才能更准确地诊断 AD。

参考文献:

- [1] Zhang ZX, Zahner GE, Roman GC, et al. Arch Neurol. 2005; 62(3): 447
- [2] Carrette O, Demalte I, Scherl A, et al. Proteomics. 2003; 3(8): 1486
- [3] Grundke-Iqbal I, Rolkova G, Konstekova E, et al. Bratisl Lek Listy. 2006; 107(9/10): 359
- [4] Jimenez CR, Pierson S, Pham TV. Biomark Med. 2007; 1(4): 541
- [5] Blackstock WP, Weir MP. Trends Biotechnol. 1999; 17(3): 121
- [6] Aebersold R, Mann M. Nature. 2003; 422(6928): 198
- [7] Cedazo-Minguez A, Winblad B. Exp Gerontol. 2010; 45(1): 5
- [8] Schumacher M, Weill-Engerer S, Liere P, et al. Prog Neurobiol. 2003; 71(1): 3
- [9] Pan S, Rush J, Peskind ER, et al. J Proteome Res. 2008; 7(2): 720
- [10] Kosicek M, Kirsch S, Bene R, et al. Anal Bioanal Chem. 2010; 398(7/8): 2929
- [11] Abdi F, Quinn J F, Jankovic J, et al. J Alzheimers Dis. 2006; 9(3): 293
- [12] Wang D C, Sun C H, Liu L Y, et al. Neurobiol Aging. 2010; doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.013
- [13] Yoshida Y, Yoshikawa A, Kimura T, et al. Neurobiol Aging. 2009; 30(2): 174
- [14] Lin J, Lin W T, Li W, et al. Clin Biochem. 2010; 43(12): 992
- [15] Kim KM, Jung BH, Paeng K J, et al. Brain Res Bull. 2004; 64(1): 47
- [16] Lovestone S, Guntert A, Hye A, et al. Expert Rev Proteomics. 2007; 4(2): 227
- [17] Issaq H J, Veenstra T D, Connors T P, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 292(3): 587
- [18] Zhou M, Prieto D A, Lucas D A, et al. J Proteome Res. 2006; 5(9): 2207
- [19] Thompson A, Schafer J, Kuhn K, et al. Anal Chem. 2003; 75(8): 1895
- [20] Sinek P, Husek P, Zahradnickova H. Anal Chem. 2008; 80(15): 5776
- [21] Wang J, Xiong S, Xie C, et al. J Neurochem. 2005; 93(4): 953
- [22] Snyder LR, Hoggard JC, Montine TJ, et al. J Chromatogr A. 2010; 1217(27): 4639
- [23] Chen G, Pramanik B N. Drug Discov Today. 2009; 14(9/10): 465
- [24] Yin G N, Lee H W, Cho J Y, et al. Brain Res. 2009; 1265: 158
- [25] Mueller C, Zhou W, Varmer A, et al. J Alzheimers Dis. 2010; 19(3): 1081
- [26] Mielke M M, Haughey N J, Ratnam Bandaru V V, et al. Alzheimers Dement. 2010; 6(5): 378
- [27] Bahl JM, Jensen SS, Larsen MR, et al. Anal Chem. 2008; 80(16): 6308
- [28] Myint K T, Aoshima K, Tanaka S, et al. Anal Chem. 2009; 81(3): 1121
- [29] Oh JH, Pan S, Zhang J, et al. Rapid Commun Mass Spectrom. 2010; 24(4): 403
- [30] Soga T, Imaizumi M. Electrophoresis. 2001; 22(16): 3418
- [31] Varesio E, Rudaz S, Krause KH, et al. J Chromatogr A. 2002; 974(1/2): 135
- [32] Verpillot R, Otto M, Kalki H, et al. J Chromatogr A. 2008; 1214(1/2): 157
- [33] Wittke S, Mischak H, Walden M, et al. Electrophoresis. 2005; 26(7/8): 1476
- [34] Akashi S, Suzuki K, Arai A, et al. Rapid Commun Mass Spectrom. 2006; 20(12): 1932