

附录IX J 质谱法

质谱法是使待测化合物产生气态离子，再按质荷比（ m/z ）将离子分离、检测的分析方法，检测限可达 $10^{-15} \sim 10^{-12}$ mol 数量级。质谱法可提供分子质量和结构的信息，定量测定可采用内标法或外标法。

质谱仪的主要组成如图 1 所示。在由泵维持的 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ Pa 真空状态下，离子源产生的各种正离子（或负离子），经加速，进入质量分析器分离，再由检测器检测。计算机系统用于控制仪器，记录、处理并储存数据，当配有标准谱库软件时，计算机系统可以将测得的质谱与标准谱库中图谱比较，获得可能化合物的组成和结构信息。

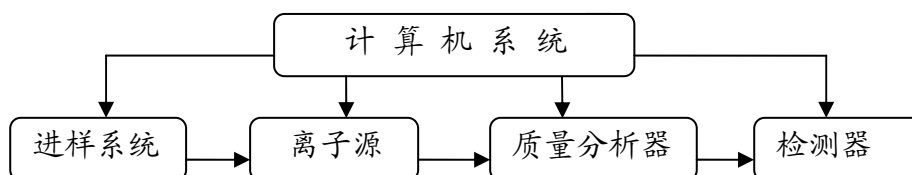


图 1 质谱仪的主要组成

一、进样系统

样品导入应不影响质谱仪的真空度。进样方式的选择取决于样品的性质、纯度及所采用的离子化方式。

1. 直接进样 室温常压下，气态或液态化合物的中性分子通过可控漏孔系统，进入离子源。吸附在固体上或溶解在液体中的挥发性待测化合物可采用顶空分析法提取和富集，程序升温解吸附，再经毛细管导入质谱仪。

挥发性固体样品可置于进样杆顶端小坩埚内，在接近离子源的高真空状态下加热、气化。采用解吸离子化技术，可以使热不稳定的、难挥发的样品在气化的同时离子化。

多种分离技术已实现了与质谱的联用。经分离后的各种待测成分，可以通过适当的接口导入质谱仪分析。

2. 气相色谱/质谱联用(GC/MS) 气相色谱分离后的流出物呈气态,待测化合物的分子大小也适宜于质谱分析。在使用毛细管气相色谱柱及大容量质谱真空泵的情况下,色谱流出物可直接引入质谱仪。

3. 液相色谱/质谱联用(LC/MS) 使待测化合物从色谱流出物中分离、形成适合于质谱分析的气态分子或离子需要特殊的接口。粒子束(PBI)、移动带(MBI)、大气压离子化(API)是可用的液相色谱/质谱联用接口。为减少污染,避免化学噪声和电离抑制,流动相中所含的缓冲盐或添加剂通常应具有挥发性,且用量也有一定的限制。

(1) 粒子束接口:液相色谱的流出物在去溶剂室雾化、脱溶剂后,仅待测化合物的中性分子被引入质谱离子源。粒子束接口适用于分子质量小于1 000道尔顿的弱极性化合物的分析,测得的质谱可以由电子轰击离子化或化学离子化产生。电子轰击离子化质谱含有丰富的结构信息。

(2) 移动带接口:流速为0.5 ml/min ~1.5 ml/min的液相色谱流出物,均匀地滴加在移动带上,蒸发、除去溶剂后,待测化合物被引入质谱离子源。移动带接口不适宜于极性大或热不稳定化合物的分析,测得的质谱可以由电子轰击离子化或化学离子化或快原子轰击离子化产生。

(3) 大气压离子化接口:电喷雾离子化、大气压化学离子化是目前液相色谱/质谱联用广泛采用的大气压离子化接口技术。由于兼具离子化功能,这些接口又称为大气压离子源,将在离子化方式中介绍。

4. 超临界流体色谱/质谱联用(SFC/MS) 目前,超临界流体色谱/质谱联用主要采用大气压化学离子化或电喷雾离子化接口,色谱流出物通过一个位于柱子和离子源之间的加热限流器转变为气态,进入质谱仪分析。

5. 毛细管电泳/质谱联用(CE/MS) 几乎所有的毛细管电泳操作模式均可与质谱联用。选择接口时,应注意毛细管电泳的低流速特点并使用挥发性缓冲液。电喷雾离子化是毛细管电泳与质谱联用最常用的接口技术。

二、离子化方式

根据待测化合物的性质及拟获取的信息类型,可以选择不同的离子化方式,使待测化合物生成气态正离子或负离子,进一步质谱分析。某些情况下,进样和离子化在同一过程中完成,很难明确区分。

1. 电子轰击离子化 (EI) 处于离子源的气态待测化合物分子, 受到一束能量 (通常是 70eV) 大于其电离能的电子轰击而离子化。质谱中往往含有待测化合物的分子离子及具有待测化合物结构特征的碎片离子。电子轰击离子化适用于热稳定的、易挥发化合物的离子化, 是气相色谱/质谱联用最常用的离子化方式。当采用粒子束或移动带等接口时, 电子轰击离子化也可用于液相色谱/质谱联用。

2. 化学离子化 (CI) 离子源中的试剂气分子 (如甲烷、异丁烷和氨气) 受高能电子轰击而离子化, 进一步发生离子-分子反应, 产生稳定的试剂气离子, 再使待测化合物离子化。化学离子化可产生待测化合物 (M) 的 $(M+H)^+$ 或 $(M-H)^-$ 特征离子、或待测化合物与试剂气分子产生的加合离子。与电子轰击离子化质谱相比, 化学离子化质谱中碎片离子较少, 适宜于采用电子轰击离子化无法得到分子质量信息的化合物分析。

3. 快原子轰击 (FAB) 或快离子轰击离子化 (LSIMS) 高能中性原子 (如氙气) 或高能铯离子, 使置于金属表面、分散于惰性粘稠基质 (如甘油) 中的待测化合物离子化, 产生 $(M+H)^+$ 或 $(M-H)^-$ 特征离子或待测化合物与基质分子的加合离子。快原子轰击或快离子轰击离子化非常适合于各种极性的、热不稳定化合物的分子质量测定及结构表征, 广泛应用于肽、抗生素、核苷酸、脂质、有机金属化合物及表面活性剂的分析, 分子质量可高达 10 000 道尔顿。

快原子轰击 (FAB) 或快离子轰击离子化用于液相色谱/质谱联用时, 需在色谱流动相中添加 1%~10% 的甘油, 且必须保持很低流速 ($1\mu\text{l}/\text{min}$ ~ $10\mu\text{l}/\text{min}$)。

4. 基质辅助激光解吸离子化 (MALDI) 将溶于适当基质中的供试品涂布于金属靶上, 用高强度的紫外或红外脉冲激光照射, 使待测化合物离子化。基质辅助激光解吸离子化主要用于分子量在 100 000 道尔顿以上的生物大分子分析, 适宜与飞行时间分析器结合使用。

5. 电喷雾离子化 (ESI) 离子化在大气压下进行。待测溶液 (如液相色谱流出物) 通过一终端加有几千伏高压的毛细管进入离子源, 气体辅助雾化, 产生的微小液滴去溶剂, 形成单电荷或多电荷的气态离子。这些离子再经逐步减压区域, 从大气压状态传送到质谱仪的高真空中。电喷雾离子化可在 $1\mu\text{l}/\text{min}$ ~ $1\text{ml}/\text{min}$ 流速下进行, 适合极性化合物和分子量高达 100 000 道尔顿的生物大分子研究, 是液相色谱/质谱联用、毛细管电泳/质谱联用最成功的接口技术。

反相高效液相色谱常用的溶剂，如水、甲醇和乙腈等都十分有利于电喷雾离子化，但纯水或纯有机溶剂作为流动相不利于去溶剂或形成离子；在高流速情况下，流动相含有少量水或至少 20%~30% 的有机溶剂有助于获得较高的分析灵敏度。

6. 大气压化学离子化(APCI) 原理与化学离子化相同，但离子化在大气压下进行。流动相在热及氮气流的作用下雾化成气态，经由带有几千伏高压的放电电极时离子化，产生的试剂气离子与待测化合物分子发生离子-分子反应，形成单电荷离子。正离子通常是 $(M+H)^+$ ，负离子则是 $(M-H)^-$ 。大气压化学离子化能够在流速高达 2ml/min 下进行，是液相色谱/质谱联用的重要接口之一。

电喷雾离子源与大气压化学离子源常共用一个真空接口，很容易相互更换。选择电喷雾离子化还是大气压化学离子化，分析者不仅要考虑溶液（如液相色谱流动相）的性质、组成和流速，待测化合物的化学性质也至关重要。电喷雾离子化更适合于在溶液中容易电离的极性化合物，容易形成多电荷离子的化合物和生物大分子（如蛋白质、多肽等）可以采用电喷雾离子源。大气压化学离子化常用于分析质量小于 1 500 道尔顿的小分子或弱极性化合物（如甾醇类和类胡萝卜素等），主要产生的是 $(M+H)^+$ 或 $(M-H)^-$ 离子，很少有碎片离子。

相对而言，电喷雾离子化更适合于热不稳定的样品，而大气压化学离子源易与正相液相色谱联用。许多中性化合物同时适合于电喷雾离子化及大气压化学离子化，且均具有相当高的灵敏度。无论是电喷雾离子化还是大气压化学离子化，选择正离子（Positive ion）或负离子（Negative ion）电离模式，主要取决于待测化合物自身性质。

三、质量分析器

在高真空状态下，质量分析器将离子按质荷比分离。质量范围、分辨率是质量分析器的两个主要性能指标。质量范围指质谱仪所能测定的质荷比的范围，分辨率表示质谱仪分辨相邻的、质量差异很小的峰的能力。常用的质量分析器有扇形磁场分析器、四极杆分析器、离子阱分析器、飞行时间分析器和傅里叶变换分析器。

1. 扇形磁场分析器 离子源中产生的离子经加速电压(V)加速,聚焦进入扇形磁场(磁场强度B)。在磁场的作用下,不同质荷比的离子发生偏转,按各自的曲率半径(r)运动:

$$m/z = B^2 r^2 / 2V$$

改变磁场强度,可以使不同质荷比的离子具有相同的运动曲率半径(r),进而通过狭缝出口,达到检测器。

扇形磁场分析器可以检测质量高达15 000道尔顿的单电荷离子。当与静电场分析器结合、构成双聚焦扇形磁场分析器时,分辨率可达到 10^5 。

2. 四极杆分析器 分析器由四根平行排列的金属杆状电极组成。直流电压(DC)和射频电压(RF)作用于电极上,形成了高频振荡电场(四极场)。在特定的直流电压和射频电压条件下,仅一定质荷比的离子可以稳定地穿过四极场,到达检测器。改变直流电压和射频电压大小,但维持它们的比值恒定,可以实现质谱扫描。

四极杆分析器的质量上限通常是4 000道尔顿,分辨率约为 10^3 。

3. 离子阱分析器 四极离子阱(QIT)由两个端盖电极和位于它们之间的环电极组成。端盖电极处在地电位,而环电极上施加射频电压(RF),以形成三维四极场。选择适当的射频电压,四极场可以储存质荷比大于某特定值的所有离子。采用“质量选择不稳定性”模式,提高射频电压值,可以将离子按质量从高到低依次射出离子阱。挥发性待测化合物的离子化和质量分析可以在同一四极场内完成。通过设定时间序列,单个四极离子阱可以实现多级质谱(MS^n)的功能。

线性离子阱(LIT)是二维四极离子阱,结构上等同于四极质量分析器,但操作模式与三维离子阱相似。四极线性离子阱具有更好的离子储存效率和储存容量,可改善的离子喷射效率及更快的扫描速度和较高的检测灵敏度。

由电喷雾离子化或基质辅助激光解吸离子化产生的生物大分子离子,可以借助离子引导等方式,进入离子阱分析器分析。离子阱分析器与四极杆分析器具有相近的质量上限,分辨率为 $10^3 \sim 10^4$ 。

4. 飞行时间分析器(TOF) 具有相同动能、不同质量的离子,因飞行速度不同而实现分离。当飞行距离一定时,离子飞行需要的时间与质荷比的平方根成正比,质量小的离子在较短时间到达检测器。为了测定飞行时间,将离子以不连续的组引入质量分析器,以明确起始飞行时间。离子组可以由脉冲式离子化

(如基质辅助激光解吸离子化)产生,也可通过门控系统将连续产生的离子流在给定时间引入飞行管。

现代飞行时间分析器具有质量分析范围宽(上限约 15 000 道尔顿)、离子传输效率高(尤其是谱图获取速度快)、检测能力多重、仪器设计和操作简便、质量分辨率高($\sim 10^4$)的特点,已成为生物大分子分析的主流技术。

5. 傅里叶变换分析器 (FTMS) 离子在一定强度的磁场中作回旋运动,运行轨道随着共振交变电场而改变。当交变电场的频率和离子回旋频率相同时,离子被稳定加速,轨道半径越来越大,动能不断增加。关闭交变电场,轨道上的离子在电极上产生交变的像电流。利用计算机进行傅立叶变换,将像电流信号转换为频谱信号,获得质谱。

待测化合物的离子化和质量分析可以在同一分析器内完成。傅立叶变换分析器的质量范围 $>10^4$,分辨率可高达 10^6 ,质荷比测定精确到千分之一道尔顿。

四、串联质谱法

串联质谱法 (MS/MS) 是时间上或空间上两级以上质量分析的结合。空间串联由两个以上的质量分析器构成,如三级四极杆串联质谱,其中第一级质量分析器 (MS1) 选取的前体离子,进入碰撞室活化、裂解,产生的碎片离子被第二级质量分析器 (MS2) 分析、获得 MS/MS 谱。在时间串联质谱中,前体离子的选取、裂解及碎片离子的分析在同一质量分析器(如四极离子阱分析器)中完成。前体离子的裂解可以通过亚稳裂解、碰撞诱导解离、表面诱导解离、激光诱导解离等方式实现。

串联质谱法并不局限于两级质谱分析,多级质谱实验常表示为 MS^n 。实际应用中,串联质谱法可以通过产物离子扫描 (Product-ion scan)、前体离子扫描 (Precursor-ion scan)、中性丢失扫描 (Neutral-loss scan) 及选择反应检测 (Selected-reaction monitoring, SRM) 等方式获取数据,但值得注意的是时间串联质谱仪不能进行前体离子扫描和中性丢失扫描。

串联质谱技术在未知化合物的结构解析、复杂混合物中待测化合物的鉴定、碎片裂解途径的阐明以及低浓度生物样品的定量分析方面具有很大优势。在药物领域的应用也很多,如通过产物离子扫描,可以获得药物、杂质或污染物的前体离子的结构信息,有助于未知化合物的鉴定;产物离子扫描还可用于

肽和蛋白质碎片的氨基酸序列检测。当质谱与气相色谱或液相色谱联用时，若色谱仪未能将化合物完全分离，串联质谱法可以通过选择性的测定某组分的特征性前体离子，获取该组分的结构和量的信息，而不会受到共存组分的干扰。

在药物代谢研究中，串联质谱技术可用于寻找具有相同结构特征的代谢物分子。由于代谢物可能包含作为中性碎片丢失的相同基团（如羧酸类均易丢失中性二氧化碳分子），采用中性丢失扫描可以发现所有可能的代谢物。若丢失的相同碎片是离子，则前体离子扫描方式可帮助找到所有丢失该碎片离子的前体离子。

选择反应离子检测（SRM）可消除生物基质对低浓度待测化合物定量分析的干扰。如药物代谢动力学研究中，待测药物的某离子信号可能被基质中其他化合物的离子信号掩盖，通过 MS1 和 MS2 选择性的检测特征的前体离子和产物离子，可实现待测物的专属、灵敏分析。

五、信号检测和数据获取

来自质量分析器的离子束经检测器转化为电信号、放大，再由数据处理系统储存并显示为质谱图。通过测定待测化合物离子的质荷比和相对丰度，质谱法可以实现对供试品的定性和定量分析。

中性分子丢失或捕获一个电子，即形成了一个与母体分子质量相同的分子离子。通过高分辨质谱仪（分辨率 $>10^4$ ）或使用参照化合物峰匹配测定，可以获得待测化合物的分子组成和分子质量信息。分子离子断裂不同的键产生各种碎片离子，裂解模式（或碎片模式）与分子结构有关。通过测定碎片离子的质量及其相对丰度，获取裂解特征，可以推测或确证待测化合物的分子结构。

通过测定某一特定离子或多个离子的丰度，并与已知标准物质的响应比较，质谱法可以实现高专属性的定量分析。外标法和内标法是质谱常用的定量方法，内标法具有更高的准确度。质谱法所用的内标化合物可以是待测化合物的结构类似物或稳定同位素标记物。前者的优点是费用较低，但使用稳定同位素（如 ^2H , ^{13}C , ^{15}N ）标记物可以获得更高的分析精密度和准确度，尤其当采用 FAB 或 LC/MS 离子化技术（如电喷雾离子化）时。稳定同位素标记物是指标记物在样品制备、分离、离子化的过程中，始终保留同位素标记。

相对于全扫描技术，选择性离子检测（SIM）用于定量分析更具优势。SIM 技术使质谱仪将更多的时间用于检测选定质荷比离子的离子流，因而提高了分析灵敏度。选择反应检测（SRM）是复杂混合物中微量待测化合物准确定量的重要手段。当同时检测两对及以上的前体离子—产物离子时，选择反应检测（SRM）又称为多反应监测（MRM），可以同时、专属、灵敏地定量测定供试品中多个组分。