

质 谱 技 术 丛 书

色谱质谱联用技术

盛龙生 苏焕华 郭丹滨 编著



化学工业出版社
化学与应用化学出版中心

· 北 京 ·

改图：飞翔的云 只限于学术交流，不可用于商业用途

内 容 提 要

作为在线联用技术，最常用的是气相色谱-质谱 (gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS) 和液相色谱-质谱 (liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS) 联用技术。

GC/MS 应是色谱-质谱联用技术中首选的方法。在第一章中，重点讨论气相色谱-质谱联用技术基本原理；气相色谱和质谱仪器及操作要点；数据采集与处理；谱库检索和典型应用示例，以帮助读者掌握质谱学的基本理论、方法和技术。

LC/MS 适用于极性、热不稳定、难气化和大分子的分离分析。第二章液相色谱-质谱联用技术中，重点讨论 ESI 原理和与 LC 及 MS 的接口技术，有关方法、技术及最新发展结合在应用实例中讨论。

本书适于从事质谱分析和物质结构、组成研究的科技人员阅读参考。

一、复杂混合物的成分分析	108
二、杂质成分的鉴定和定量分析	123
三、目标化合物的定量分析	126
主要参考文献	128
第二章 液相色谱-质谱联用技术	130
第一节 ESIMS 及其原理	131
一、ESIMS 硬件	131
二、ESI 原理	131
三、ESI 实验条件优化	149
第二节 APCI 基本原理	150
第三节 液相色谱-质谱联用中的进样和色谱技术	152
一、输注	152
二、流动注射	152
三、LC/ESIMS	152
四、LC/APCIMS	164
五、CE/ESIMS	164
第四节 液相色谱-质谱联用中的质谱技术	167
一、电喷雾和高电压的连接	167
二、喷雾针的位置和去溶剂方法	170
三、大气压离子源与真空的连接——自由喷射膨胀	171
四、簇离子问题	172
五、在取样孔和质量分析器之间的离子光学	174
六、仪器调谐和质量坐标的校准	174
七、质量分析器	175
八、准确质量测定	179
第五节 应用及有关原理与技术	182
一、肽和蛋白质	182
二、合成药物、抗生素及有关物质鉴定	199
三、中药和天然药物分析	205
四、药物代谢动力学及代谢物研究	220
五、二维液相色谱-质谱在蛋白质组学中的应用	230
六、样品的预处理	232
主要参考文献	235
附录	236
一、同位素、质量和丰度	236
二、常用原子量	236
三、常用质量坐标校正物及校正物离子质量	237
符号表	238

第二章 液相色谱-质谱联用技术

在第一章中，读者已了解了气相色谱-质谱联用技术这种方法的特点，包括高分离度、分析速度和灵敏度并可提供特测物质的分子量和结构信息，因而是定性、定量的优良工具。但是，GC/MS 应用范围有限，这是因为 GC/MS 分析时，样品必须气化，因而难以用于极性、热不稳定和大分子化合物的测定。

液相色谱-质谱法 (liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS) 将应用范围极广的分离方法——液相色谱法与灵敏、专属、能提供分子量和结构信息的质谱法结合起来，必然成为一种重要的现代分离分析技术。但是，LC 是液相分离技术，而 MS 是在真空条件下工作的方法，因而难以相互匹配。LC/MS 联用的主要困难见表 2-1。

表 2-1 LC/MS 联用的主要困难

HPLC	MS
高压液相操作	要求高真空
液体进入离子源转变为大量气体	只允许有限的气体进入离子传输系统
质量范围无限制	测定质量取决于 m/z 和质谱仪的类型
常常使用无机盐缓冲剂	需采用挥发性缓冲盐

LC/MS 经过了约 30 年的发展，直至采用了大气压离子化技术之后，才发展成为可常规应用的重要分离分析方法。现在，在生物、医药、化工、农业和环境等各个领域中都得到了广泛的应用，在组合化学、蛋白质组学和代谢组学的研究工作中 LC/MS 已经成为最重要研究方法之一。

在这一章中，主要讨论液相色谱-大气压离子化质谱法 (liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry, LC/APIMS)。API 是在大气压条件下的质谱离子化技术的总称，包括电喷雾离子化 (electrospray ionization, ESI) 和大气压化学离子化 (atmospheric chemical ionization, APCI) 等技术。现在，应用最为广泛的 API 技术是 ESI，因此，本章将重点讨论 ESI/MS 原理、技术、方法和应用。另外，ESI 和 APCI 又是液相分离技

术与质谱仪的接口 (interface)。这个接口是 LC/MS 联用的关键, 所以本章也将分别讨论 API 与液相进样系统和分离技术连接的有关问题, 以及 API 与质量分析器的连接技术。

第一节 ESIMS 及其原理

一、ESIMS 硬件

ESIMS 的硬件如图 2-1 所示, 包括: ①大气压腔, 为雾化、去溶剂和离子化区; ②真空接口和离子传输区, 将离子从大气压传送至处于高真空的质量分析器中; ③质量分析器, 常用四极质谱仪, 亦可用四极离子阱、飞行时间质谱仪、扇形磁场和傅里叶变换离子回旋共振质谱仪。

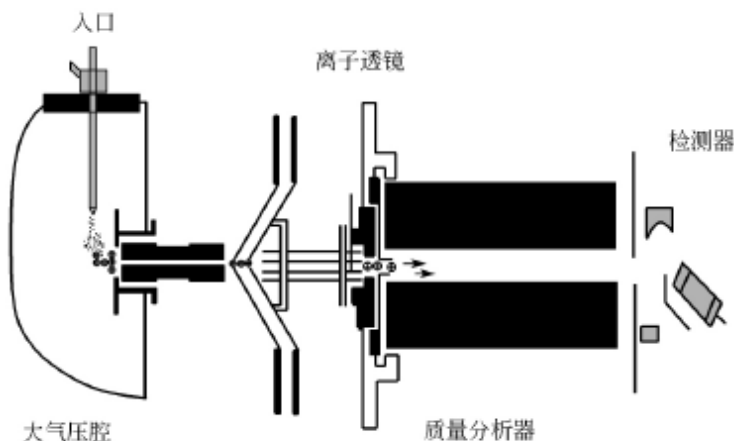


图 2-1 ESIMS 的硬件

ESI 是在高静电梯度 (约 3 kV/cm) 下, 使样品溶液发生静电喷雾, 在干燥气流中 (近于大气压), 形成带电雾滴, 随着溶剂的蒸发, 通过离子蒸发等机制, 生成气态离子, 以进行质谱分析的过程。单单使用静电场发生的静电喷雾, 通常只能在 $1\sim 5\mu\text{L/min}$ 或更低的流速下操作, 而借助气动或超声等雾化技术, 可在较高的流速, 如 1 mL/min 条件下工作, 便于与常规 HPLC 连接。

二、ESI 原理

如上所述, ESI 是一种离子化技术, ESI 将溶液中的离子转变为气相离子, 进而进行 MS 分析。

将离子从溶液中转移至气相是强吸热过程, 需要较高的能量, 因为溶液中的离子是溶剂化的。将 Na^+ 从水溶液中转移至气相需要的能量为:

$$-\Delta G_{\text{sol}}^{\ominus} = 98 \text{ kcal/mol} \quad (2-1)$$

$$-\Delta H_{\text{sol}}^{\ominus} = 106 \text{ kcal/mol} \quad (2-2)$$

式中 $G_{\text{sol}}^{\ominus}$ ——离子的溶剂化能；

$H_{\text{sol}}^{\ominus}$ ——焓，负号表示相反过程——将离子从溶液中移至气相。

这一能量大于使 C—C 键断裂所需的能量，如果在短时间内给予这一能量，将导致有机离子从溶液中转移至气相，同时，可能发生裂解。快原子轰击 (fast atom bombardment, FAB) 和等离子体解吸 (plasma desorption, PD) 是在很短的时间和很小的范围内，给予很高的能量，因而不只导致离子的去溶剂化，也产生裂解。和 FAB 及 PD 相比，ESI 在相对低的温度下，逐步去溶剂化，因而是迄今最软的质谱离子化技术。

1. 基本过程

ESI 将溶液中的离子转变为气相离子包括三个步骤：

- ① 在喷雾毛细管尖端产生带电雾滴；
- ② 通过溶剂蒸发和雾滴分裂使带电雾滴变小，这一过程反复进行，直至生成很小的带电雾滴；
- ③ 由很小带电雾滴产生气相离子。

2. 在喷雾毛细管尖端产生带电雾滴——电泳机制

如图 2-2 所示，约 2~4kV 的电压 (U_c) 加于金属毛细管（通常外径为 0.2mm，内径为 0.1mm，距离反电极约 2cm）。反电极在 ESIMS 中可以是一具小孔的金属板，或为固定在板上的取样毛细管，作为离子取样及传输系统的一部分。因为喷雾毛细管尖端很细，故在空气中，毛细管尖端的电场 (E_c) 很高，约 10^6 V/m ，当反电极较大且为平面时，毛细管尖端的电场可用下述近似的关系式估算，

$$E_c = \frac{2U_c}{r_c \ln \frac{4d}{r_c}} \quad (2-3)$$

式中 r_c ——毛细管外径；

d ——毛细管尖端至反电极的距离。

如 $U_c = 2000 \text{ V}$ ， $r_c = 10^{-4} \text{ m}$ 和 $d = 0.02 \text{ m}$ ，则 $E_c \approx 6 \times 10^6 \text{ V/m}$ 。 E_c 正比于 U_c ，大致与 r_c 成反比。由于对数关系， E_c 随 d 的增加，缓慢下降。

通常，毛细管中的溶液由极性溶剂组成，其中含有电解质溶质，例如，溶剂为甲醇-水，NaCl 或 BHCl (B 为有机碱) 为溶质，浓度 $10^{-5} \sim 10^{-3} \text{ mol/L}$ ，以下以正离子模式进行讨论。

当电场作用于毛细管， E_c 将穿透毛细管尖端的溶液，在电场作用下，溶

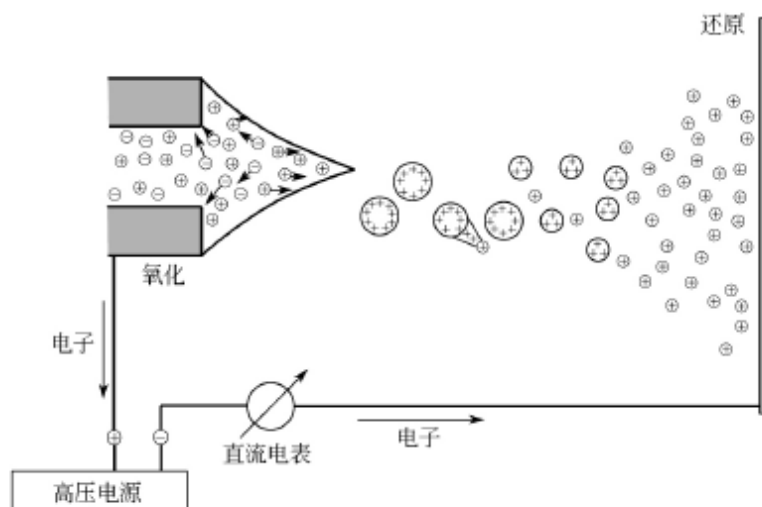


图 2-2 ESI 主要过程

电场使液体形成双电层，液体表面正离子的富集导致
毛细管尖端液面的不稳定形成一锥体并喷射带过量正电荷的
雾滴，最终产生气相离子

液中的正、负离子将移动，直至电荷分布产生的对外加电场的反作用在溶液中产生无场条件为止。如毛细管为正电极，正离子移向毛细管尖端处的弯月面，负离子以相反方向移动，由于液体表面正离子之间的斥力，克服液体的表面张力，因此毛细管尖端的液面扩张，使正电荷和液体进一步前移，形成一锥体，称 Taylor 锥。如电场足够高，细的喷口从锥体尖端形成并破裂为细的雾滴（见图 2-3）。

雾滴带正电是由于在锥体及其喷口表面有过量的正离子。如果在溶液中的电解质是 NaCl，在表面过量的正离子是 Na^+ 离子，这种带电模式取决于在电场作用下，正、负离子向相反方向迁移，称为电泳机制。由锥体喷雾产生的带电雾滴经空气向反电极方向漂移，随着溶剂蒸发，带电雾滴收缩，雾滴表面电荷密度增加。当雾滴缩小至一定的半径，电荷间的斥力克服了表面张力，雾滴发生分裂，这个过程重复发生（溶剂蒸发与雾滴分裂），直至生成气相离子，这将在下面详细讨论。

3. ESI 是特殊的电解池——电解机制

假定电荷的分离是电泳机制，在稳定的 ESI 操作下，带正电的雾滴将连续带走正离子，在这样的连续电流的装置中（图 2-2），必须实现电荷平衡，同时，只有电子能通过金属导线，因而推测 ESI 必定包括电化学过程，将移向电极的离子转换为电子。换言之，ESI 装置是一种特殊的电解池。其特殊之处在于部分的离子迁移是通过气相，由带电雾滴和其后产生的气相离子携带

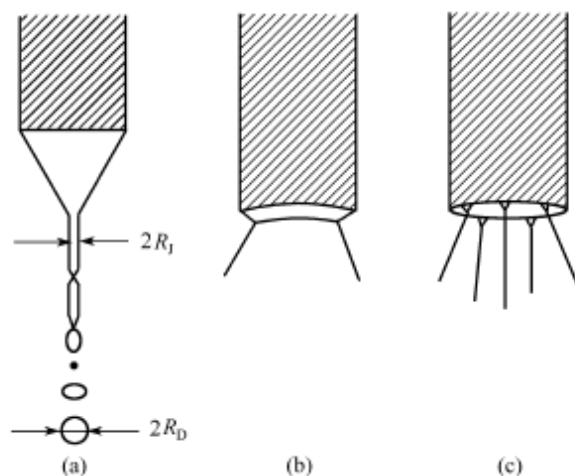
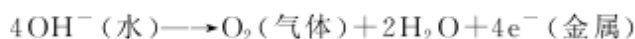
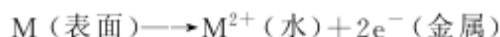


图 2-3 锥体-喷口模型

(a) 锥体尖端延伸为液体喷口, R_j 为喷口半径, R_D 为雾滴半径。对 ESIMS 常用的低黏度液体, R_D/R_j 约 1.9。当电压由(a)→(b)→(c)增加, 可观察到多喷口模型

的, 而常规电解池中, 离子的迁移是在连续的溶液中进行的。按照电化学反应, 氧化反应发生在阳极, 在上述 ESI 中, 应发生在溶液-金属毛细管界面。这一反应将金属中的原子转变为金属离子进入溶液, 以补充溶液中的正离子。或者, 通过氧化反应移走溶液中的负离子, 对于水溶液反应如下:



可以预期最低氧化电位的反应首先发生, 这取决于金属电极材料、溶液中的离子和溶剂的性质。用不锈钢毛细管在溶液中产生 Fe^{2+} 。用 Zn 毛细管尖端, 溶液中产生 Zn^{2+} 且单位时间释放至溶液中的 Zn^{2+} 的量转换为每秒的电流量 (C/s), 等于测得的电喷雾电流 I 。这些定量的结果, 充分证明了电解机制。

4. ESI 所需的电位

为使 Taylor 锥发生静电喷雾, 在毛细管尖端上所需的起始电场 E_{on} 为:

$$E_{on} \approx \left(\frac{2\gamma \cos \theta}{\epsilon_0 r_c} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (2-4)$$

这一起始电场的方程, 与式 (2-3) 合并, 得到起始电位 U_{on} 的方程:

$$E_{on} = \left(\frac{r_c \gamma \cos \theta}{2\epsilon_0} \right)^{\frac{1}{3}} \ln \left(\frac{4d}{r_c} \right) \quad (2-5)$$

式中 γ ——溶剂的表面张力;

ϵ_0 ——真空的介电常数;

r_c ——毛细管半径;

θ ——Taylor 锥的半角。

以 $\epsilon_0 = 8.8 \times 10^{-12} \text{ C}^2 / (\text{J} \cdot \text{m})$ 和 $\theta = 49.3^\circ$ 代入得:

$$U_{\text{on}} = 2 \times 10^5 (\gamma r_0)^{\frac{1}{2}} \ln \left(\frac{4d}{r_c} \right) \quad (2-6)$$

式中, γ 以 N/m 为单位; r_c 以 m 为单位; U_{on} 单位为 V 。

表 2-2 为四种溶剂的表面张力和 ESI 起始电位, 此处, $r_c = 0.1 \text{ mm}$ 和 $d = 40 \text{ mm}$ 。

表 2-2 不同表面张力 γ 的溶剂的起始电位 U_{on}

溶 剂	$\gamma / (\text{N/m})$	$U_{\text{on}} / \text{kV}$	溶 剂	$\gamma / (\text{N/m})$	$U_{\text{on}} / \text{kV}$
CH_3OH	0.0226	2.2	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$	0.043	3.0
CH_3CN	0.030	2.5	H_2O	0.073	4.0

水的表面张力最高, 最难于形成 Taylor 锥及喷雾, 故起始电位 U_{on} 最高。为了稳定喷雾, 必须加以较 U_{on} 高数百伏的电位。用水作溶剂, 容易导致毛细管尖端放电, 尤其是当毛细管为负电位时 (负离子方式)。虽然 ESI 起始电位对正或负离子方式是相同, 但是, 当毛细管处于负电位时, 毛细管尖端的放电起始电位较低。放电使毛细管电流 I 增加, 如电流在 10^{-5} A 以上, 通常是由于有放电现象。在正离子方式, 检测到质子化的溶剂簇, 如 $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ (水) 或 $\text{CH}_3\text{OH}_2^+(\text{CH}_3\text{OH})_n$ (甲醇) 说明发生了放电。放电使 ESIMS 性能降低, 待测离子强度大为下降, 放电产生的离子具高强度, 这可能是放电使毛细管尖端电位下降, 影响了带电雾滴的形成。

ESI 需高电位, 在大气压下进行不仅方便, 而且空气中的氧具电子亲和力, 易于捕获自由电子。当气体中有自由电子 (由宇宙线和背景辐射产生) 时, 为电场加速, 使气体分子电离, 则产生放电。在近于大气压下, 与气体分子碰撞的频率很高, 阻碍了电子的加速过程。 SF_6 和多氯芳烃比氧更易捕获电子, 故抑制放电更为有效, 所以, 以水为溶剂的 ESI 可用 SF_6 为电子清扫剂 (electro scavenger), 抑制放电。

5. 由带电雾滴产生的电流

带电雾滴离开毛细管的电流 I 是易于测量的 (如图 2-1 所示), 这个电流相当于离开毛细管的过量正离子的总数。

电流 I 和流速 v_f 的关系, 如图 2-4 (a) 所示。图 2-4 (b) 表示质谱分析所得的有机碱的 BH^+ 离子流与流速的关系。 $[\text{BH}^+] = 10^{-5} \text{ mol/L}$, 甲醇溶液, 分析时浓度恒定。比较图 2-4 (a) 和图 2-4 (b), 气相离子流并不与雾滴电流 I 相关, 随 I 的增加, BH^+ 强度保持恒定, 在高流速区, 甚至下降, 这是因为随着流速的增加雾滴增大, 因而从带电雾滴中产生气相离子的数目下降。随着流速的变化, 雾滴电流和离子强度缺乏相关性, 这提示需要进一步了解从雾滴中产生气相离子的过程。

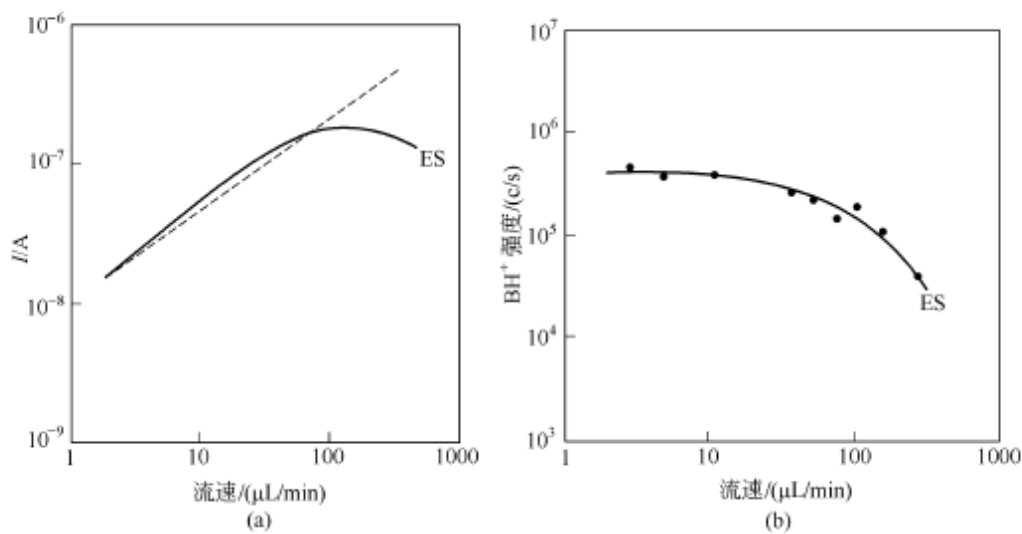


图 2-4 毛细管电流和待测离子强度与溶液流速的关系

(a) 毛细管电流 I 与溶液流速 v_f 的关系，实线盐酸可卡因 10^{-3} mol/L 甲醇溶液，
虚线为理论预示的结果；(b) 质谱测得的 BH^+ （质子化的可卡因）强度
（每秒计数，cps 或 c/s）与流速的关系

6. 雾滴电流 I 与电导率和溶液中离子浓度的关系

雾滴电流 I 与溶液电导率 K 的关系之所以得到关注，是因为电导率比例于溶液中离子的浓度：

$$K = \lambda_{0,m} c \quad (2-7)$$

式 (2-7) 中只有在低浓度 ($c < 10^{-1} \text{ mol/L}$) 时才有效。电解质的分子电导 $\lambda_{0,m}$ 取决于电解质离子的特定性质，决定 $\lambda_{0,m}$ 大小的重要性质是淌度，即溶液中正或负离子在电场作用下的迁移速度。

式 (2-7) 是对单一电解质而言的，当溶液中有几种电解质时， K 为各电解质电导率之和：

$$K = \sum_i \lambda_{0,m_i} c_i \quad (2-8)$$

表 2-3 列出了一些电解质在甲醇中的 $\lambda_{0,m}$ 值。

表 2-3 25℃ 时某些电解质在甲醇中的分子电导率

溶 质	$\lambda_{0,m}$	离子	$l_{0,m}$	溶 质	$\lambda_{0,m}$	离子	$l_{0,m}$
HCl	190	H^+	146	LiCl	91	K^+	52
HClO_4	214	Li^+	40	NaCl	97	Cl^-	52
HNO_3	203	Na^+	45	KCl	104	Br^-	56

分子电导为组成离子的电导之和：

$$\lambda_{0,m}(\text{MX}) = l_{0,m}(\text{M}^+) + l_{0,m}(\text{X}^-)$$

$\lambda_{0,m}$ 和 $I_{0,m}$ 以 Ω 为单位。实验测定电流 I 与溶液电导率 K (HCl 和 NaCl 在 60% 水和 40% 甲醇的混合溶液中) 的关系为:

$$I \propto K^n = (\lambda_{0,m} c)^n \quad n \approx 0.22 \quad (2-9)$$

如果待测物质离子在溶液中的浓度最高, 则质谱测得的待测物质离子强度约与雾滴电流 I 成正比, 而气相离子强度取决于溶液中的浓度。但是, 通常的实验条件下, 除了待测物质以外, 还有其它电解质存在于溶液中, 这就使情况变得复杂, 将在下文 (10. 雾滴蒸发过程中溶质浓度的变化) 中进一步讨论。

7. 带电雾滴中溶剂的蒸发导致雾滴缩小和库仑分裂

电喷雾产生的带电雾滴随着溶剂的蒸发而缩小, 但电荷保持恒定, 溶剂蒸发的能量由环境气体提供。

雾滴半径 R 变小而雾滴电荷 q 不变导致表面上电荷斥力的增加, 直至达到 Rayleigh 稳定限:

$$q_{Ry} = 8\pi(\epsilon_0 \gamma R^3)^{\frac{1}{2}} \quad (2-10)$$

Rayleigh 方程指出当雾滴半径 R 和电荷 q 满足式 (2-10) 时, 静电斥力等于表面张力 γ , 雾滴不再稳定, 发生裂解, 称之为库仑分裂 (Coulumbic fission) 或库仑爆炸 (Coulumbic explosion)。这种分裂不同于细胞分裂, 不是一分为二, 而是形成细小的喷口, 喷出许多小的雾滴, 如图 2-5 所示。

雾滴通过喷雾分裂释放了电荷张力后继续蒸发再次达到 Rayleigh 限, 再次发生喷雾分裂。

雾滴蒸发和分裂过程取决于雾滴的起始尺寸和电荷, 决定雾滴半径的重要参数是流速 v_f 和溶液电导率 K 。低流速和高电导率产生细雾滴, 流速为几微升/分和 $K \approx 4^{-4} \sim 10^{-2} \text{ S/m}$ (相当于在极性溶剂中, 电解质浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-4} \text{ mol/L}$) 产生半径为几微米的雾滴。其起始电荷 q_0 离 Rayleigh 限不远, $q_0 \approx 0.7 q_{Ry}$ 。

当用甲醇、水和乙腈等挥发性溶剂时, 雾滴半径为几微米或更小, 蒸发速率服从表面蒸发限定律, 雾滴半径与时间 t 有简单关系:

$$\frac{dR}{dt} = -\frac{\alpha \bar{v} p_0 M}{4\rho R_g T} \quad (2-11a)$$

$$R = R_0 - \frac{\alpha \bar{v} p_0 M}{4\rho R_g T} t \quad (2-11b)$$

式中 $\bar{v}$ ——溶剂蒸气平均热速率;

p_0 ——溶剂在雾滴温度下的饱和蒸气压;

M ——溶剂分子的摩尔质量;

ρ ——溶剂密度;

R_g ——气体常数;

T ——雾滴温度；

α ——溶剂凝集系数，对于水、乙醇和甲醇 $\alpha \approx 0.04$ 。

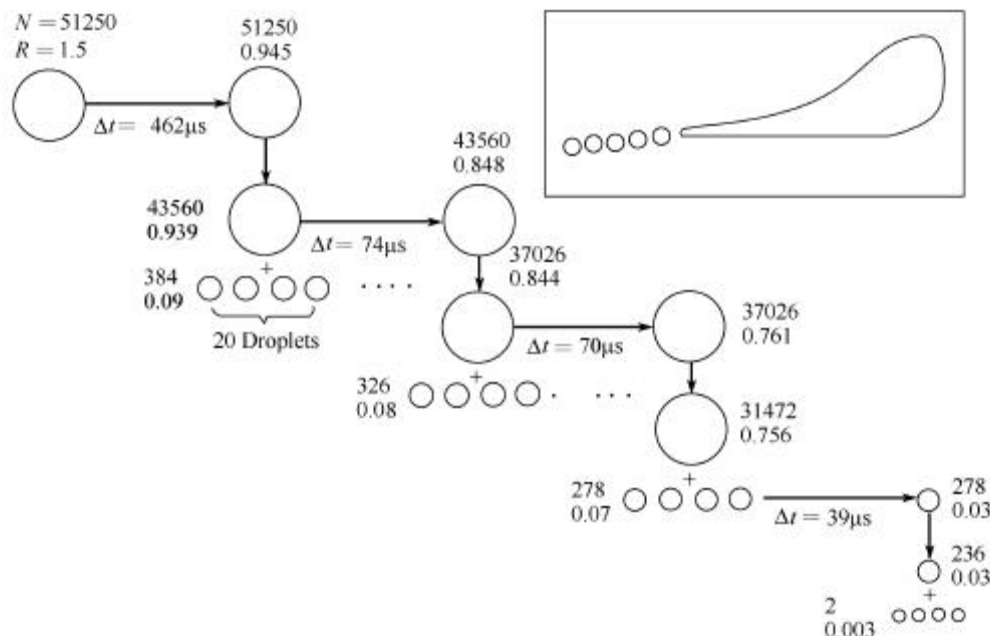


图 2-5 母和子雾滴示意图

左上角的雾滴是在室温下由毛细管电喷雾产生的雾滴，溶剂蒸发，电荷恒定，导致电荷斥力增加，通过喷雾释放子雾滴，右上角的插图是实验观察到的雾滴喷雾分裂 (jet fission)。N 为雾滴上的电荷数，R 为雾滴半径 (μm)。Δt 值代表蒸发缩小雾滴至开始分裂的尺寸时所需时间。图中仅画出三个连续的母雾滴分裂

喷雾分裂导致母雾滴质量的丢失仅为 2%，而电荷的丢失达 15%，子雾滴的半径约为母雾滴的 1/10，质量平衡预示约生成 20 个子雾滴。

喷雾分裂导致母雾滴质量的丢失仅为 2%，而电荷的丢失达 15%，子雾滴的半径约为母雾滴的 1/10，质量平衡预示约生成 20 个子雾滴。

雾滴演化过程中涉及的数字不是很准确的，往往是粗略的估计。图 2-5 中，由起始雾滴 ($R_0 = 1.5\mu\text{m}$, $q_0 = 10^{-4}\text{C}$) 到达首次分裂所需的时间 $\Delta t \approx 460\mu\text{s}$ ，整个过程的时间是几百微秒，与带电雾滴在大气压区停留时间相近。带电雾滴实际的停留时间取决于 ESI 离子源的设计，一般是几百微秒至几毫秒。

式 (2-11) 表明溶剂蒸发速率取决于溶剂的蒸气压，对于甲醇、水等极性溶剂，为了达到 ESIMS 应有的取样效率，雾滴及环境气体应处在高温下。

第一代子雾滴的半径 $R \approx 0.08\mu\text{m}$ ，电荷数 $N \approx 280$ (见图 2-5)。假定溶液中的离子是单电荷的，N 相当于雾滴中未被负离子平衡的正离子数目。这一子雾滴达到不稳定限的时间约 $40\mu\text{s}$ ，此时半径 $R \approx 0.03\mu\text{m}$ 。假定这一子雾滴的库仑爆炸也是喷雾分裂，则由其产生的第二代子雾滴 $R \approx 0.003\mu\text{m}$ 和 $N \approx 2$ 。雾滴半径远远小于 $1\mu\text{m}$ 是难于实验观察的，故这一雾滴喷雾分裂未经实验

证明。

8. 气相离子形成的机制

从很小的带电雾滴生成气相离子有两种机制：离子蒸发 (ion evaporation) 和带电残渣模型 (charged residue mode)。

(1) 离子蒸发的 Iribarne-Thomson 方程 Iribarne-Thomson 方式基于过渡态理论：从带电雾滴中发射离子的速率常数 k_1 为：

$$k_1 = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{kT}} \quad (2-12)$$

式中 k_B ——玻尔兹曼常数；

T ——雾滴温度；

h ——普朗克常数；

$\Delta G^\ddagger$ ——活化自由能，由图 2-6 的模型估算。

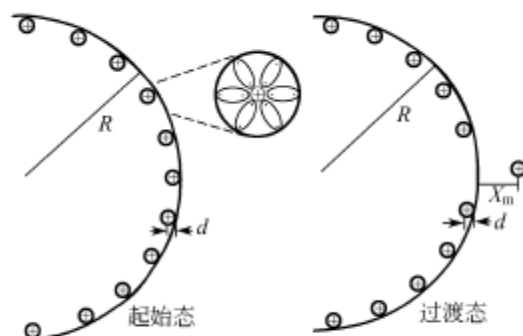


图 2-6 Iribarne-Thomson 模型

过渡态和起始态表示在雾滴表面有过量的 N 个单电荷正离子，雾滴半径 R 。溶剂化的离子具溶剂外壳，离子加溶剂壳的半径为 d 。在过渡态中，某一带溶剂壳的离子已移出雾滴达 X_m 距离。通常，对水溶液 $X_m = 0.6 \text{ nm}$ ， $R = 8 \text{ nm}$ ， $N = 70$ 。

在 Iribarne-Thomson 过渡态中，能量屏障（势垒，barrier）是由于相反的静电力，即雾滴中遗留电荷对逸出离子的斥力和雾滴极化后产生的对逸出离子的吸力相互作用的结果。

$\Delta G^\ddagger$ 取决于四个参数，其中主要是 N 和 R （雾滴中的电荷数和雾滴半径）。这些参数决定了雾滴表面的电场 E 并产生对逸出离子的斥力，电场的值由库仑方程确定：

$$E = \frac{q}{4\pi\epsilon_0 R^2} = \frac{Ne}{4\pi\epsilon_0 R^2} \quad (2-13)$$

由式 (2-12) 预示的速率常数 k_1 随 N 的增加和 R 的变小而增加。其它两个参数代表发射的离子的性质，最低 $\Delta G^\ddagger$ 的逸出离子不是裸露的电解质离子

M^+ , 而是溶剂化的离子 $M^+(\text{Sl})_m$ 。如式 (2-1) 所示, 裸露的 Na^+ 从水溶液中转移至气相需要较高的能量 (约 98kcal/mol), 但转移 $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_7$ 只需要约 56kcal/mol 。表 2-4 列出了裸露的碱金属离子 M^+ 和水合的 $M^+(\text{H}_2\text{O})_m$ 从气相至溶液的移迁自由能 $\Delta G_{\text{sol}}^\ominus$ 。

表 2-4 用于评价 Iribarne-Thomson 速率常数的数据和实验比较

M^+	Li^+	Na^+	K^+	Cs^+	NH_4^+	$(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$	$(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{N}^+$
$-\Delta G_{\text{sol}}^\ominus(M^+)$	122	98.2	80.6	67.5	81	(54)	(49)
$-\Delta G_{\text{sol}}^\ominus(M^+)$	74.4	56.4	36.5	23.5	—	—	—
m	7	7	6	5	约 6	—	约 0
$-\Delta G_{\text{sol}}^\ominus[M^+(\text{H}_2\text{O})_m]$	61.2	56.5	55.8	54	55.6	(54)	(49)
$-R_{\text{sol}}(\text{hydrated})=d$	3.82	3.58	3.3	3.29	3.3	—	(2)
$\Delta G^\ddagger$	13.1	9.3	9.7	7.9	9.5	—	7.9
$k_1/\times 10^{-5}\text{s}^{-1}$	0.02	9.8	4.9	94	6.8	—	98
k_1	2×10^{-4}	0.1	0.05	1.0	0.07	—	1.4
k	1.6	1.6	1.0	1.0	1.3	—	约 5
$k_1(\text{Iribarne})$	3.5	1.25	1.5	1.0	—	—	—

注: 所有自由能的单位为 kcal/mol 。 $R_{\text{sol}}(\text{hydrated})$ 为水合离子的半径, d 以 $\text{\AA}$ 为单位。 m 为具最低 $-\Delta G_{\text{sol}}^\ominus[M^+(\text{H}_2\text{O})_m]$ 的 $M^+(\text{H}_2\text{O})_m$ 中的水分子数; k_1 为 Iribarne-Thomson 常数, 相对于 $k(\text{Cs}^+)=1$; k 为实验系数, 相对于 $k(\text{Cs}^+)=1$; $k_1(\text{Iribarne})$ 为 Thomson 和 Iribarne 测定的 k_1 的相对实验值。

强烈水合的离子 Li^+ 和 Na^+ , 具较大的迁移自由能。Iribarne-Thomson 方程预示具高的活化势垒, 即较小的速率常数 k_1 。强溶剂化的离子如 Li^+ 强烈地结合了较大数目的溶剂分子, 因而有较大的 d 。Iribarne-Thomson 的 $\Delta G^\ddagger$ 表达式为:

$$\Delta G^\ddagger = \left(\frac{Ne^2}{4\pi\epsilon_0(R+X_m)} - \frac{e^2}{16\pi\epsilon_0 X_m} \right) - \left(\Delta G_{\text{sol}}^\ominus + \frac{Ne^2}{4\pi\epsilon_0(R-d)} \right) \quad (2-14)$$

第一个括号内的各项给出了过渡态的能量, 而第二个括号内的各项给出起始态的能量, 这两个状态的零水平相当于带电雾滴和溶剂化离子距离无限远。表达式的第一项表示单电荷溶剂化离子和具 N 个电荷的带电雾滴间的斥力 (静电位能)。第二项表示带电子和极化的雾滴之间的吸力产生的位能。第三项代表在中性雾滴中溶剂化离子 $M(\text{Sl})_m$ 的溶剂化能, 而最后一项对具 N 个电荷的非中性雾滴进行校正。这样, $\frac{Ne^2}{4\pi\epsilon_0(R-d)}$ 相当于需要克服将溶剂化离子从无穷远移至雾滴内距 d 处的静电排斥能。

图 2-7 说明由 Iribarne-Thomson 方程获得的结果。对恒定的 $\Delta G_{\text{sol}}^\ominus(-57$

① $1\text{\AA}=0.1\text{nm}$ 。

kcal/mol) 和 $N(70)$, $\Delta G^\ddagger$ 和 k_1 随雾滴半径的变化见图 2-7 (a), 结果表明 k_1 随 R 的改变极迅速地变化, 例如, R 从 $100\text{\AA}$ 变为 $70\text{\AA}$, k_1 由 $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 变为 $1.4 \times 10^{13} \text{ s}^{-1}$, 变化了 16 个数量级! Iribarne 假定当 $k_1 = 10^6 \text{ s}^{-1}$ 时, 离子蒸发先于 Rayleigh 分裂。

图 2-7 (b) 说明当 ΔG_{sol}^0 作为变量, 而 $N=70$, $R=80\text{\AA}$ 恒定时, $\Delta G^\ddagger$ 和 k_1 的变化。在表 2-3 中列出了碱金属离子在雾滴 $R=80\text{\AA}$ 和 $N=70$, 温度 $T=298\text{K}$ 时所得的速率常数 k_1 。这些数据说明 $M^+(\text{H}_2\text{O})_m$ 的迁移自由能 $-\Delta G_{\text{sol}}^0$ $[M^+(\text{H}_2\text{O})_m]$ 是 k_1 的决定性参数。锂离子具最大水合离子迁移能, 因而具最低的 k_1 。铯离子的 k_1 相对于锂离子的 k_1 要大 5000 倍。

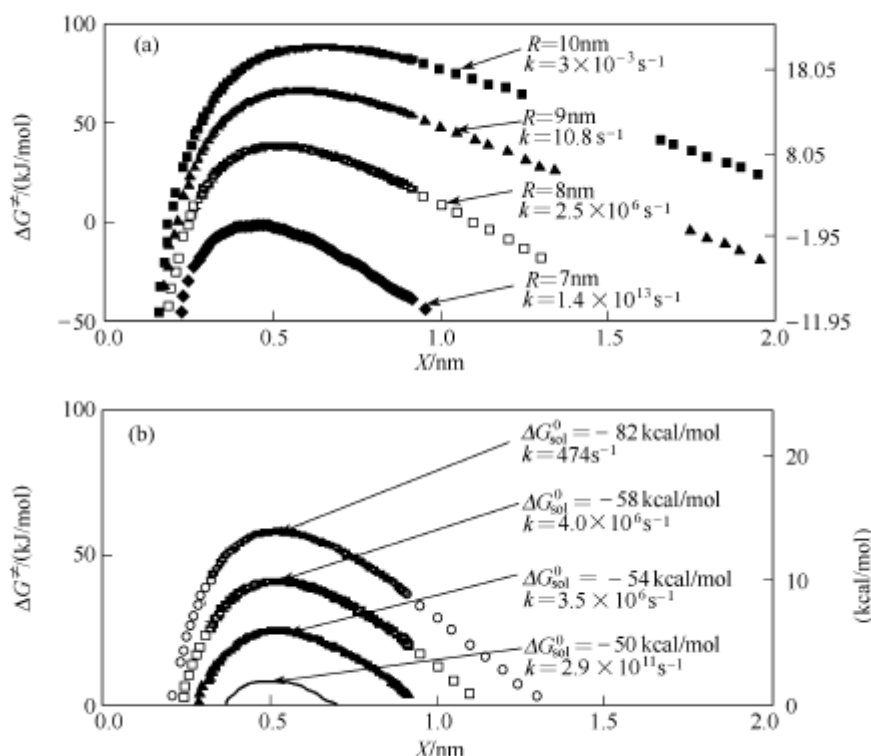


图 2-7 Iribarne-Thomson 方程的结果:

逸出离子迁移自由能与溶剂化离子和雾滴表面的距离 x 的关系

(a) 雾滴半径 R 作为变量, $\Delta G_{\text{sol}}^0 = -57 \text{ kcal/mol}$; (b) ΔG_{sol}^0 作为变量

两个图中 $R=8\text{nm}$, $N=70$, $d=0.385\text{nm}$ 均一样

速率常数 k_1 由式 (2-12) 估算

(2) 带电残渣模型 Dole 等在研究聚苯乙烯分子量测定时提出, 如果雾滴中只有一个聚苯乙烯分子, 这将生成加合物离子 (如 MNa^+), 生成的这种准分子离子可能用质谱法检出。Dole 等虽然未能用质谱法证明, 但这一模型保留了下来, 这将在以下的讨论中进一步说明。

9. 实验数据与离子蒸发理论的预示结果的比较, 表面活性对离子蒸发和带电残渣理论的影响

表 2-4 中的相对离子蒸发速率 k 的实验数据是基于质谱测定的离子强度比 I_A/I_B , 用等浓度的电解质 A^+X^- 和 B^+X^- 溶液进行电喷雾, 假定:

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{k_A}{k_B} \quad [A^+] = [B^+] \quad (2-15)$$

为得到好的相对数据, 用同一仪器在相同的条件下测定。在这样条件下得到了另外一些数据, 列在表 2-5 内。

表 2-5 实验测得的相对系数 k

离 子	k	离 子	k	离 子	k
Cs ⁺	1	CodH ⁺	5	Bu ₄ N ⁺	8
Li ⁺	1.6	HerH ⁺	6	Pen ₄ N ⁺	14
Na ⁺	1.6	CocH ⁺	10	C ₇ NH ₃ ⁺	10
K ⁺	1.0	Ni ²⁺ (Tpy) ₂	5	C ₁₁ NH ₃ ⁺	10
NH ₄ ⁺	1.3	Et ₄ N ⁺	2		
MorH ⁺	3	Pr ₄ N ⁺	5		

注: Mor—吗啡; Cod—可待因; Her—海洛因; Coc—可卡因; Tpy—三吡啶基; Bu—正丁基; Et—乙基; Pr—正丙基; Pen—正戊基; C₇— n -C₇H₁₅; C₁₁— n -C₁₁H₂₃。

通常, 在 ESIMS 文献中, 可观察到巨大的疏水性基团的单电荷离子具较高的实验灵敏度, 因这些离子有低的溶剂化能 (如表 2-5 中, Pen₄N⁺ 和 C₁₁H₂₃NH₃⁺ 有相对高的 k 值)。这样的定性结果对离子蒸发理论较电荷残渣模型更有利。

在离子蒸发理论中, 离子的表面活性应仔细考虑, 如 A⁺ 离子和 B⁺ 离子存在于溶液中, A⁺ 离子较 B⁺ 离子有更强的表面活性。可以预期在雾滴表面的电荷是富集了 A⁺ 离子, 因而有较多的 A⁺ 离子被蒸发。因此, 灵敏度系数不仅取决于离子蒸发速率常数 k_1 , 也取决于表示整体对表面离子平衡的常数 K_s :

$$k \propto K_s k_1 \quad (\text{离子蒸发理论})$$

$$\frac{k_A}{k_B} = \frac{K_{s,A} k_{1,A}}{K_{s,B} k_{1,B}} \quad (2-16a)$$

对于表面活性的认识, 也为电荷残渣理论所考虑。在雾滴表面富集的离子将优先转移至小雾滴的表面, 因为小雾滴表面的离子来源于母雾滴表面的电荷。相同的过程代代相传, 可以预期最后的雾滴只含一个过量的离子, 这必将是表面活性离子优先。因为没有其它离子存在, 故不存在将这一离子推向表面的驱动力, 离子不再处在表面。以此为基础, 带电残渣理论成立, 可以预期实验反映表面活性:

$k \propto K_s$ (扩展的电荷残渣理论)

$$\frac{K_A}{K_B} = \frac{K_{S,A}}{K_{S,B}} \quad (2-16b)$$

对于表面活性相同的离子,如碱金属离子,可以预期灵敏度系数相似,这与实验一致(见表 2-4 和表 2-5)。已知四烷基铵离子的表面活性随烷基基团的增大而增加,实验灵敏度系数按相同次序增加(见表 2-5)。这样,实验灵敏度与修改的电荷残渣基本一致。由于离子的溶剂化能与表面活性相关,因而离子蒸发理论和电荷残渣理论所预示的灵敏度系数的变化方向是相同的。

在两个理论中,对于雾滴半径 $R > 10\text{nm}$,释放电荷张力均为通过 Rayleigh 分裂。当雾滴 $R \approx 10\text{nm}$ 或更小时,按照离子蒸发理论释放电荷张力是通过离子发射;而按电荷残渣理论, Rayleigh 分裂继续下去。当雾滴变得非常小, $R < 1\text{nm}$,雾滴中含几个过量电荷(见图 2-5)和一些溶剂分子(取决于溶质起始浓度)。对于这样微小的雾滴, Rayleigh 条件和离子蒸发理论均不能严格地应用。必须对表面张力的降低进行校正,而且更重要的是表面电荷应处理为分隔的电荷。随着溶剂的继续蒸发,必将发生电荷张力的释放,发射的电荷很可能是个别的溶剂化的离子。这一过程与 Iribarne-Thomson 模型相似。

10. 雾滴蒸发过程中溶质浓度的变化

随着溶剂的蒸发,雾滴体积变小,溶质的浓度必将增加。溶质可能是气相离子的前体。此外,如溶质是酸、碱,它们的浓度的变化,将导致溶液 pH 的改变,可能会影响观测到的质谱。

图 2-5 所示的母雾滴和子雾滴经历了不同的溶质浓缩过程。因为子雾滴得到约 15% 的母雾滴电荷,而约 2% 的质量。这些子雾滴的后代很快演变为高度带电的很小的雾滴,成为气相离子的前体。在这些雾滴中,溶质浓度的增加远较母雾滴中溶质浓度增加得慢。因此,母雾滴是固体残渣的前体,这些残渣是雾滴中溶质的聚集体,因而对质谱分析无用。

为了进行以下讨论,选择半径 $R = 0.03\mu\text{m}$ ($N = 278$) 的雾滴。按照离子蒸发理论,这样的雾滴可能通过离子蒸发直接生成气相离子。另一方面,按带电荷残渣理论, Rayleigh 分裂继续,将产生约 20 个半径 $R = 0.003\text{nm}$ 和 $N = 2$ 个电荷的雾滴。起始容积与最终容积的比率 V_i/V_f ,由于这一雾滴经历了若干个蒸发阶段,可由相应的多个蒸发阶段产生的雾滴的半径估算,可得到总的变化 $V_i/V_f \approx 94$,最大的比率 V_i/V_f 发生在第一阶段, $(R_i/R_f)^3 = (1.51/0.95)^3 = 4$ 。如 ESI 形成的起始雾滴接近于 Rayleigh 限,则第一阶段的比率低。因此,假定平均比率 $V_i/V_f \approx 50$ 。所以,不挥发溶质浓度增加的倍数为:

$$\frac{c_f}{c_i} = \frac{V_i}{V_f} \approx 50$$

如溶质有一定程度的挥发性, 则较难估算。在蒸发平衡条件下, 溶质 st 在气相中的克分子分数 Y_{st} 由 Henry 定律确定:

$$Y_{st} = k_{st} X_{st}$$

式中 k_{st} ——Henry 常数;

X_{st} ——溶液中溶质的摩尔系数。

可以预期:

$$k_{st} > 1 \text{ (溶质在雾滴中变少)}$$

$$k_{st} < 1 \text{ (溶质在雾滴中富集)}$$

许多溶质的 Henry 常数是已知的, 例如用于调节水和甲醇溶液 pH 的弱酸、弱碱。如果雾滴蒸发缓慢, 估算一定的初始和最后容积比 V_i/V_f 时浓度的变化是可能的。然而, 很小的雾滴蒸发极快, 超出了表面控制自由分子的规则, 因而也难以用蒸发平衡条件下的 Henry 定律计算溶质浓度的变化。由于蒸发很快, 高度非挥发的溶质在雾滴中富集的程度可能低于相平衡条件的数据。氨的挥发性很高, 故在蒸发的雾滴中浓度下降, 导致溶液 pH 变低。如用非挥发性酸、碱 (如 H_2SO_4 、 $NaOH$), 在蒸发的雾滴中的浓度将增加, 导致溶液 pH 的很大变化。由溶剂蒸发导致的高或低 pH 值可能使蛋白质变性。

11. 质谱测得的待测物质离子信号强度与电喷雾液滴中待测物质离子和其它电解质浓度的关系

这一部分将讨论 ESIMS 测定的待测物质离子信号强度与电喷雾溶液中待测物质离子浓度的关系, 以及溶液中其它电解质对这一强度的影响。其它电解质包括通常存在于溶剂中的杂质, 欲测定的其它成分, 缓冲剂及样品中的背景物质。

不同浓度的待测物质溶液用 ESIMS 测定其离子强度, 结果如图 2-8、图 2-9 所示。质谱中单一待测物质离子强度对待测物质浓度系列的变化见图 2-8。用对数图是为了容纳宽的离子强度和浓度范围。在低浓度区至约 $1\mu\text{mol/L}$ 是线性部分, 斜率约为 1, 随后是信号饱和区, 在最高浓度时, 甚至强度略有下降。

理解整个曲线的关键是必须理解电喷雾的溶液并非单一电解质体系。所用的溶剂, 除非专门去离子, 常含电解质杂质。试剂级甲醇中的杂质主要是铵和钠盐, 总浓度约 10^{-5}mol/L 。

在待测物质 A 的低浓度区, 毛细管电流主要由杂质 B 携带, B 的浓度是恒定的, 因而在此区域内, I 也是恒定的 (图 2-8 上部)。质谱测得的总离子强度, $I_{\text{total}} \approx I_A + I_B$, 也是恒定的, 因为杂质 B 是主要的。

待测物质 A 的浓度为 10^{-5}mol/L 左右时, 待测物质开始成为主体, 总电解质浓度开始增加。在这一区域毛细管电流也开始增加, 这可由式 (2-9) 所预示。

$$I \propto (\lambda_m^0 c)^n \quad (n \approx 0.2 \sim 0.4)$$

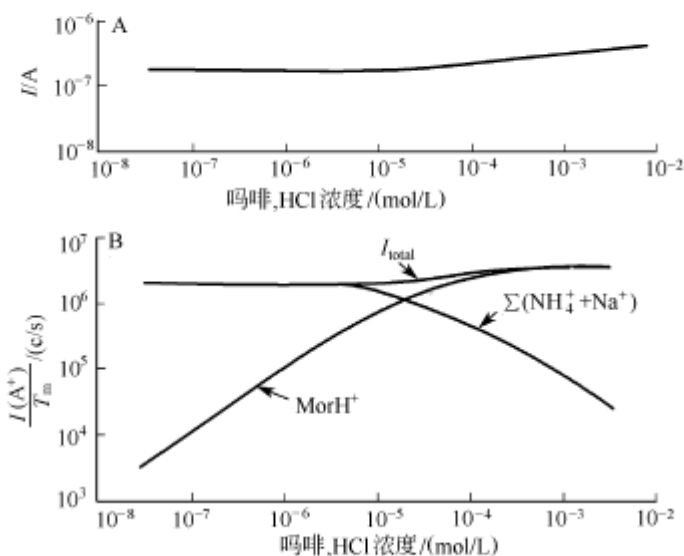


图 2-8 毛细管电流 I 和待测物质离子 A^+ 的强度对待测物质浓度的关系

测得的毛细管电流 I 和总离子强度 I_{total} 在约 10^{-5} mol/L 以前是恒定的，这是由于在试剂级的甲醇中有约 $3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的 Na^+ 、 NH_4^+ 电解质杂质。待测物质离子 A^+ 是质子化的吗啡， MorH^+ 。离子强度，每秒记数 (c/s)，已对质谱仪中的与质量相关的传输因素进行了校正，校正因子 T_m 。

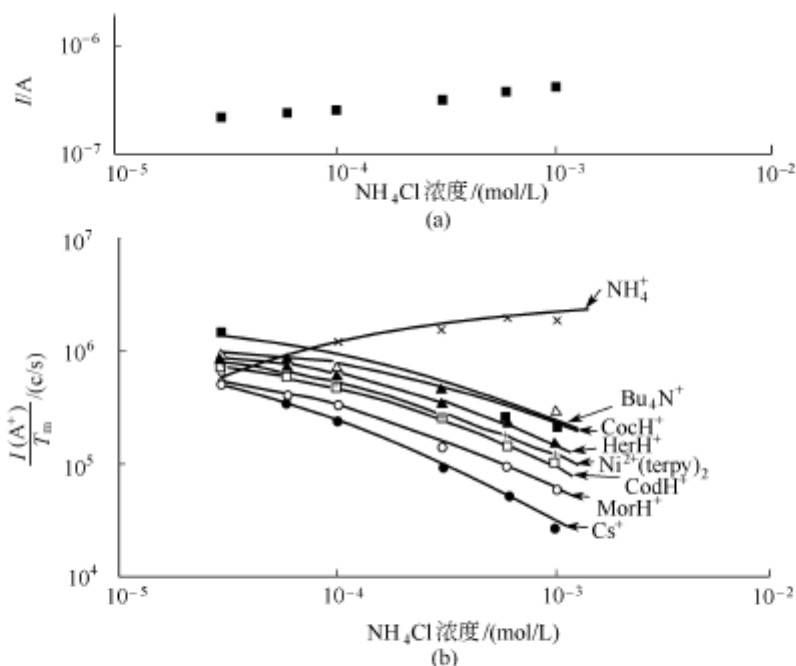


图 2-9 加 NH_4Cl 对质谱测定的待测物质 A^+ ($[A^+] = 10^{-5} \text{ mol/L}$) 的影响
(a) 总毛细管电流 I 的变化；(b) 由于加入 NH_4^+ 竞争的结果，待测物质 A^+ 强度下降

图中符号与图 2-8 和表 2-4 相同

因为不同电解质的分子电导的变化通常小于 2 (见表 2-3) 和指数 n 很低, 电流 I 基本上与电解质的性质 (即 λ_m^0) 无关。这样电流 I 随浓度 c 而变化, 但是由于指数 n 很低, 故变化相对较小 (弱相关)。例如 c 变化 100 倍, 电流变化 4~8 倍。

I_{total} 的形状与毛细管电流 I 相似。在这一区域, 这两个电流基本上成比例。

当待测物质浓度在 10^{-5} mol/L 以上时, 杂质离子 B^+ 的强度 I_B 下降。如上所述, 电流 I 与浓度 c 弱相关。这是因为这一电流与总的雾滴电荷成正比, 而 A 的增加几乎不增加雾滴电荷, 但是在气相离子转换过程中, 雾滴中的 A^+ 竞争 B^+ , 这样增加 $[A^+]$ 将导致气相离子的 B^+ 的降价, 因而 I_B 降低。

基于上述考虑, 提出了双电解质和三电解质体系的两个方程:

$$I_A = fp \frac{k_A [A^+]}{k_A [A^+] + k_B [B^+]} I \quad (2-17)$$

$$I_A = fp \frac{k_A [A^+]}{k_A [A^+] + k_B [B^+] + k_C [C^+]} I \quad (2-18)$$

这些方程对 I_B , I_C 也是相似的。为了简便, 下面仅仅讨论双电解质系统。

设 I_A 是质谱测定的 A^+ 离子强度, $[A^+]$ 、 $[B^+]$ 是电喷雾溶液中电解质的浓度, 常数 k_A 、 k_B 为灵敏度系数。假定积 fp 与离子的性质无关, 而 f 为雾滴上的电荷转变为气相离子的分数, p 是离子取样效率, 即被质谱仪检出的离子的分数相对于雾滴在 1atm 下产生的气相离子。 f 值取决于雾滴的质量, 而 p 值取决于大气压区至质量分析器的接口的质量, 积 fp 为:

$$I_A + I_B = fpI \quad (2-19)$$

测量质谱分析的总离子流 ($I_A + I_B$) 和毛细管电流 I 可得积 fp 。当电解质的浓度和性质改变时, 直到约 5×10^{-4} mol/L, fp 几乎恒定。以甲醇为溶剂, 流速 $20 \mu\text{L}/\text{min}$ 粗略估算 $fp \approx 0.3$ 。在约 5×10^{-4} mol/L 以上时, fp 下降, 这是由于高电解质浓度时, 电喷雾产生的雾滴中含较粗的雾滴, 使 f 下降。因为当浓度增加几个数量级时, 如流速不变, Taylor 锥喷雾不稳定, 故观察到粗雾滴。因此, 当电导率改变时, 应改变流速, 以保持稳定的锥喷雾。在高电解质浓度时, 应降低流速。

p 值取决于大气压区至质量分析器之间的接口 (离子传输区) 的设计。如用针孔取样, p 值为 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 。这是由于空间电荷使雾滴和离子分散及取样孔面积很小的原因, 导致取样效率很低。

式 (2-17) 和式 (2-18) 表示溶液内部离子进入气相的竞争, 强度 I_A 只取决于 k_A/k_B 的比率, 而并不取决于个别的 k_A 和 k_B 。比率 k_A/k_B 代表气相离子 A^+ 和 B^+ 的产率比 (相对于溶液本体中的浓度)。如 “10. 雾滴蒸发过程中溶质浓度的变化” 中所述, 随着溶剂蒸发, 雾滴体积缩小, 故电解质浓度增加。式

(2-17) 和式 (2-18) 只适用于强电解质 A、B 和 C。对于这些强电解质，雾滴中浓度增加的倍数相同，因方程式中只涉及浓度比，故这一因素将抵消。

图 2-9 说明待测物质 A^+ 的强度为存在于溶液中的第二种电解质 B 所抑制的情况。B 是缓冲剂。在实验中，待测物质 A 保持恒定的浓度， $[A^+] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ，而 B^+ （此处为 NH_4^+ ）的浓度增加至 $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。图 2-9 中的实线符合式 (2-17)，观察到 I_A 逐渐下降。如 A 为 Bu_4N^+ ，这一离子具最高的 k_A ，故观测到的下降最小，如为 Cs^+ ，因其 k_A 最低，故下降很快，当 $[\text{NH}_4^+]$ 由 10^{-5} mol/L 增加至 10^{-3} mol/L 时，下降了 12 倍。

式 (2-17) 预示，随 k_B 值增加，当 $[B^+]$ 增加时， I_A 下降较大。如用 Bu_4N^+ 代替 NH_4^+ ，则待测物质 Cs^+ 和 MorH^+ 的强度将下降约 200 倍。因此，在 ESIMS 实验中，应使用低灵敏度系数 k 的缓冲剂。

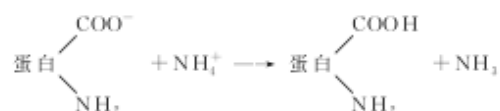
12. 离子从带电雾滴转移至气相时电荷和结构的改变

质子化的碱和去质子的酸分别是产生正和负离子的两类重要物质，这样的体系可能涉及非预期的质子转移化学，发生在离子从雾滴至气相的非常规条件的过程中，因为对离子而言溶液和气相是两种完全不同的环境。

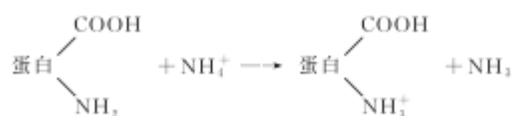
质子转移化学是影响多质子化的多肽和蛋白质的电荷态分布的重要因素。例如：当肌红蛋白的 50 : 50 甲醇-水溶液加氨碱化至 $\text{pH} = 10$ ，用负离子方式进行 ESIMS 分析，得到了一组肌红蛋白负离子，电荷态分布的极大值约 15 个负电荷，这个结果是可以“预期的”，因为可以预期去质子的肌红蛋白负离子存在于碱性溶液中。当用同一溶液在正离子方式测定质谱时，得到了质子化的肌红蛋白离子，电荷分布峰位在约 14 个正电荷。这是“非预期的”，在 $\text{pH} = 10$ 的溶液中，没有多质子化的肌红蛋白离子存在于溶液本体，相反，大多数肌红蛋白是去质子化的。

为了解释上述“预期的”和“非预期的”结果，涉及了三个反应物，第一、二个反应物是位于溶液内部，而第三个反应物是给雾滴提供电荷的离子，它们位于雾滴表面。此处，只讨论“非预期的”结果。当雾滴在毛细管尖端生成时，溶液的 $\text{pH} \approx 10$ ，溶液中主要的离子是 NH_4^+ 和 OH^- 。在正离子模式，在雾滴表面的电荷主要是 NH_4^+ 离子。蛋白分子浓度很低，大多数是去质子化的，位于溶液本体，周围为反离子 NH_4^+ 。雾滴蒸发时，丢失溶剂和氨，溶液 pH 下降。这将产生两个结果：一是表面的电荷部分由 NH_4^+ 变为 H_3O^+ ；二是溶液中的蛋白去质子化变少。当雾滴变得非常小时，溶液本体中的离子和蛋白质与表面的离子（ NH_4^+ 或 H_3O^+ ）均非常接近，发生如下反应：

(1) 本体离子的中和反应



(2) 表面离子反应



这样，产出了为质谱检出的质子化蛋白。

另一种变化涉及离子从雾滴转移至气相，如果蛋白质或多肽上的质子化碱性基团有一定的移动自由度，这个基团将与邻近的未质子化的碱性基团，如羰基氧形成氢键环状结构，质子同时与两个碱性基团配合。这样，分子内氢键的形成可引起多质子化多肽或蛋白构型的改变。

未被分子内氢键稳定的质子化碱性基团将为溶剂分子溶剂化。这些溶剂分子在离子从雾滴转移至气相时可能保留下来，或从大气压区的溶剂蒸气中获取。通常在进入质量分析器的接口中，通过碰撞诱导解离（collision-induced dissociation, CID）除去这些溶剂分子。这种 CID 强制去溶剂化可能导致质子丢失至溶剂分子。待测物质去质子化的程度取决于溶剂分子的性质。溶剂分子具高质子亲和力者，待测物质去质子化较多。因此，待测物质电荷态的分布取决于气相条件和待测物质进入质量分析器前的处理。

当多电荷局限于一个原子或一个小的原子团上，如多电荷金属离子或多电荷负离子 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} ，也会发生气相诱导电荷态的改变。当多电荷局限于很小的区域时，某些多电荷离子尽管已知是存在于溶液中的，但由于高的电荷斥力，不能在气相观察到。例如碱土金属 Be^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 系列。最小的离子 Be^{2+} 不能在气相中观察到。通常通过溶剂分子（如 H_2O ）的溶剂化稳定后，可观察到较高的电荷态。但是， Be^{2+} 即使水化后也观察不到，但 $\text{Mg}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_n$ 可以检出， $n \leq 3$ ，对 Ca^{2+} 和 Sr^{2+} ， $n \leq 2$ 。只有最大的 Ba^{2+} 可以观察到裸露的离子。

如欲通过 CID 从双电荷碱土金属离子中除去水分子，除了 Ba^{2+} 外，均导致电荷态由 2 变为 1。



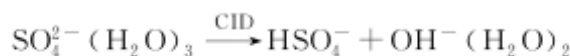
电荷态的改变也取决于溶剂分子的性质。例如 Cu^{2+} 用质子溶剂（如水），裸露的或溶剂化的离子均观察不到。但是，用偶极疏质子溶剂 [如二甲亚砜 (DMSO)] 即可以观察到。溶剂化的 CID 将导致还原反应发生了分子间电荷的转移。



三价过渡金属离子用一般溶剂不能观察到，用配合剂可能成功。

多电荷负离子情况类似。可观察到水合离子， $\text{SO}_4^{2-}(\text{H}_2\text{O})_n$ 。CID 除去水

时, 结果 $n \leq 3$, 进一步去水, 发生如下反应:



在 ESI 中, 从带电雾滴中除去溶剂时, 电荷张力的增加是通过 Rayleigh 分裂或离子蒸发释放的。溶剂化的气相离子生成之后, 去溶剂后增加的电荷张力是通过降低离子的电荷态和化学反应释放的。

综上所述, 由很小的、高度带电的雾滴产生气相离子的过程仍然不是很清楚。因为当雾滴小于 10nm 时, 蒸发迅速 (在几个微秒内), 所以无法实验观察是继续 Rayleigh 分裂直到成为带电残渣, 还是直接发射气相离子, 也即很难明确区分电荷残渣和离子蒸发理论。但是, 理解上述涉及离子从溶液转移至气相的过程、相互关系和参数, 在实际的 ESIMS 分析中是很有帮助的。

三、ESI 实验条件优化

按照上述讨论, 设定 ESI 条件应注意以下几个方面:

1. 待测物质在溶液中的状态 (溶液化学)

ESI 过程是将离子从溶液中转移至气相, 所以, 使待测成分在供试品溶液中成为离子状态, 可提高生成气相离子的效率, 以提高检测灵敏度。这可利用溶液化学原理, 即对可接受质子的待测物质, 如有机碱 B, 用极性溶剂并加甲酸或乙酸使呈酸性, pH2 左右, 使成 BH^+ , 用正离子方式测定。



对于可解离质子的待测物质, 如有机酸 HA, 在溶液中加氨水使碱化, pH8 左右, 使成 $(\text{A}-\text{H})^-$, 用负离子方式测定。



2. 溶剂的表面张力

如用纯水作溶剂, 因其表面张力高, 故形成 Taylor 锥和稳定喷雾所需电压高, 可能导致放电 (尤其是负离子方式), 所以, 常用水-甲醇 (50:50) 溶剂。同时, 水与甲醇混合, 黏度也下降, 这也有利于雾化。

3. 溶液的流速

电喷雾所得雾滴的半径与许多因素有关, 如溶液的表面张力、介电常数、电导率、流速及加在毛细管尖端的电场等。改变流速是最方便的, 低流速产生细雾滴, 有利于产生气相离子, 提高信号强度。在高流速范围, 需采用高速同轴气流辅助雾化。

4. 雾滴的蒸发速率

气相离子是从最终的非常细小的雾滴中产生的。如起始雾滴小, 采用挥发性溶剂 (甲醇、乙腈及其与水的混合物), 溶液表面能较低, 则溶剂迅速蒸发, 易于

达到库仑分裂条件 [见式 (2-10)], 产生更小的子雾滴, 最终产生气相离子。

为了提高溶剂蒸发速率, 可提高“干燥气”的温度和流速, 也可用加热金属毛细管使带电雾滴蒸发, 但应注意高温可能造成热不稳定的待测成分分解及不挥发成分堵塞毛细管。

水的热容量高, 故溶剂中含水量高时, 蒸发温度应予提高。

5. 气相离子的产生

表面活性高 (具低溶剂化能) 的离子将优先转移至雾滴表面, 最终转变为气相离子, 故有较高的实验灵敏度——竞争机制, 所以:

- ① 应采用表面活性低的缓冲剂;
- ② 采用低浓度的挥发性的酸、碱及缓冲盐;
- ③ 用高纯度的溶剂、试剂;
- ④ 样品应作预处理, 除去干扰物及盐。

第二节 APCI 基本原理

APCI 是 Horning 等创导的, 当时称 API, 并首次实现了与 HPLC 的连接。样品的离子化在处于大气压下的离子化室中完成。由⁶³Ni 放射源或放电电极产生的低能电子使试剂气, 如 N₂、O₂、H₂O 等离子化, 经复杂的一系列反应使样品产生正或负离子。APCI 的优点是检测限低, 易于与 GC 或 LC 连接。样品分子在 EI 中的绝对离子化效率是 0.01%~0.1%, 而 APCI 的起始离子化效率几乎是 100%。与 CI 相比较, APCI 的离子-分子或电子-分子反应在大气压下进行, 样品分子与试剂离子或电子可以进行有效碰撞, 在短时间内经数次碰撞即可达到热平衡。离子的损失, 主要是扩散至器壁、重新结合及传输过程引起的。相反, CI 的真空度约 1Torr, 达到热平衡的时间较长, 通常处在非平衡状态下, 样品仅仅一小部分被离子化, 且产生的离子处在激发态, 未能经碰撞使之稳定, 故易于碎裂。

图 2-10 是大气压离子化质谱仪的示意图。

在大气压条件下, 离子-分子反应取决于离子源中特定的气体或气相试剂。如用氮气 (常含微量水) 在放电电极电晕放电作用下, 反应过程如下:



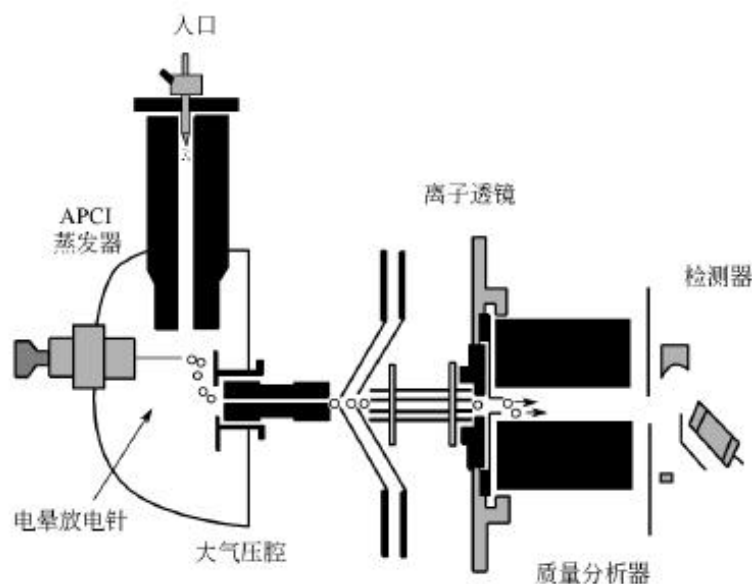


图 2-10 大气压离子化质谱仪

其它离子如 N^+ 和 N_3^+ 也可生成。如有氧存在，还有 O_2^+ 、 NO^+ 、 $NO^+(H_2O)_n$ 和 NO_2^+ 。

如将溶剂或 HPLC 流出物注入 APCI 源，则溶剂 (B) 成为气相试剂，可形成各种各样正反应剂离子或负反应剂离子，如 BH^+ 、 B^+ ，这取决于溶剂的性质。

供试品分子 (A) 的离子化通过质子化：



或电荷转移：



此外，还有去质子（供试品为酸）、电子捕获（卤素、芳香化合物）及加合物，如 $M + Na^+$ 、 $M + NH_4^+$ 、 $M + Ac^-$ 、 $M + Cl^-$ 等的形成。

在 APCI 中，样品溶液是借助于雾化气的作用，喷入高温（如 500℃）蒸发器的，此时，溶剂和溶质均成为蒸气，然后，如上所述，气化了样品分子经化学离子化生成气相离子。因此，热不稳定的或难于气化的极性化合物宜用 ESIMS 分析。在 ESI 中，如样品具酸、碱性，则样品分子在溶液中可去质子生成阴离子或接受质子成为阳离子，或者和 Na^+ 等生成加合物离子。APCI 适用于小分子极性较低的化合物，如醇和醚类，它们的质子亲和力低，不易在溶液中形成质子化的离子或去质子生成阴离子。因此，APCI 和 ESI 是互补的。由于 APCI 不像 ESI 那样涉及溶液化学等，故操作简易。

此外，正相色谱通常易于与 APCI 连接。非极性溶剂及其溶液易于蒸发，烷烃溶剂生成的试剂离子是强气相酸，易于将质子转移至样品分子。

第三节 液相色谱-质谱联用中的进样和色谱技术

如上所述, API 是一种质谱软电离技术, 也是质谱与液相分离技术 (如 HPLC 和 CE) 联用的一种接口技术。APIMS 的进样系统包括输注 (infusion)、流动注射 (flow injection)、高效液相色谱和毛细管电泳等。用分离系统作为 APIMS 的进样系统, 一般称为联用技术 (LC/MS, CE/MS)。在联用系统中, 质谱仪也可看作是 HPLC 或 CE 的检测器。MS 作为检测器既有广泛适用范围 (不取决于特定的功能团), 又有很好的专属性 (取决于被检测离子的质量及元素组成), 因而 LC/MS 和 CE/MS 是强有力的分离分析工具。

一、输注

输注是用注射器泵 (syringe pump) 将样品溶液直接缓慢输入 ESIMS 离子源。

这种方法简便、快速。缺点是需要相对多的样品 (通常将样品配成溶液, 样品体积大于 $10\mu\text{L}$); 样品中其它物质可能产生干扰; 难于实现自动进样分析。

二、流动注射

将样品溶液注入 HPLC 进样系统, 由 LC 泵缓慢推动溶剂将样品溶液直接注入 APIMS 离子源。

这个方法与输注法比较, 同样简便、快速; 样品溶液的用量可较小 (如 $1\mu\text{L}$); 易于实现自动进样分析。缺点是样品中盐和其它成分可能干扰测定; 进样过程中样品溶液可能被稀释, 从而降低仪器信噪比。

三、LC/ESIMS

LC/MS 联用技术, 将高分离能力, 使用范围极广的分离技术与高灵敏、专属及通用的质谱法结合起来, 成为一种强有力的分离分析工具。自从 20 世纪 80 年代末 ESIMS 商品化以来, LC/ESIMS 已经迅速成为应用最广泛的联用技术。

由于 LC/ESIMS 应用范围很广, 每一分析问题均有其特定的要求, 在此不可能一一予以讨论。但是有一些基本问题必须考虑, 除了已在第一节 ESIMS 及其原理中讨论过的以外, 本节将讨论溶剂的流速、灵敏度、线性与动力学范围等基本问题。

(一) 溶剂流速

溶剂的流速, 与之相关的 HPLC 柱的内径是影响 ESIMS 灵敏度的重要

因素。

对于 ESIMS，最高的绝对灵敏度（对一定的进样量产生最高的信号）是在可能的最低流速和最小的柱直径下获得的。这是因为采用较小的柱直径，流出峰浓度较高，而且在低流速下，离子化过程的效率增加。但是，现代技术的发展，可以将常规色谱柱与 ESI 连接。在高流速下，离子化效能的降低可以用改善喷雾过程和增加带电雾滴的溶剂蒸发速率予以一定程度的补偿，这包括气动辅助、加热去溶剂等方法。然而，用较大直径的柱，进样量一定时，流出峰浓度降低是无法改变的，这将降低灵敏度。

在实际工作中，应根据具体问题，选择柱内径，以提供足够的灵敏度，解决分析问题。在 LC/ESIMS 中，主要工作是选择适当的（兼顾 LC 分离和 ESIMS 检测）的条件，其次才是在不同溶剂流速下操作 ESIMS。

图 2-11 表示一定量的供试品，从不同内径的柱中，在其相应的流速下洗脱出来时，其浓度的差别，同时也说明了不同的柱的相对柱容量。如只考虑样品从柱中洗脱出来的浓度的差别，预期的灵敏度差别在 4.6mm 和 0.18mm 柱之间约为 600 倍（反比于柱内径的平方），因为 ESIMS 通常是一种浓度检测器。当样品量有限时，灵敏度是考虑的主要因素，因而应选择内径小的色谱柱。例如，从二维凝胶电泳上分离得到的蛋白质欲进行肽图谱（peptides mapping）测定时，常采用 1mm 内径或更细的填充柱，流动相流速约为 $40\mu\text{L}/\text{min}$ 或更低。如样品来源丰富，可选用内径较大的柱，适当增加进样量，以补偿由于采用较大的柱内径而造成的信噪比降低，例如质量控制、发酵液监测、药

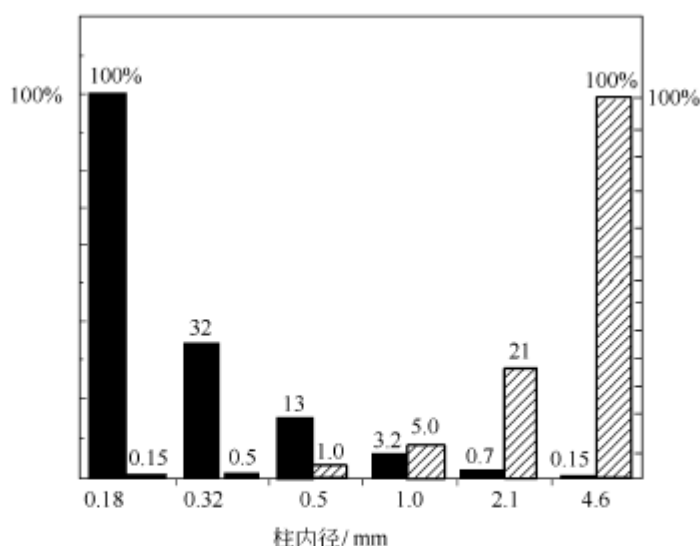


图 2-11 柱内径与相对灵敏度和柱容量的关系

■ 相对灵敏度；▨ 柱容量

物中的微量杂质分析等工作常用 4.6mm 内径的柱，在 1mL/min 的流速下操作。在药物代谢物鉴定、药物动力学研究等工作中需兼顾灵敏度和柱载样量时，常用 2.1mm 内径的色谱柱，约 300 μ L/min 的流速。

为了在不同的流速范围内维持 ESIMS 的最佳性能，对喷雾器有不同的设计，流速可大体分为三个范围：1nL/min $\sim$ 1 μ L/min，1 $\sim$ 200 μ L/min，200 μ L/min $\sim$ 1mL/min。

在 ESI 产生气相离子的过程中有四个连贯的阶段：①液体表面带电；②带电雾滴的形成；③雾滴蒸发；④气相离子从微小的雾滴中产生。在这些阶段中，对于特定的流速范围的电喷雾装置的优化设计，最重要的是雾滴的形成和液滴的蒸发阶段。为了得到最佳的灵敏度，从纳升至毫升整个范围内，采用了不同的技术，以使雾滴的形成和蒸发过程最优化。图 2-12 表示三种不同的电喷雾仪器。

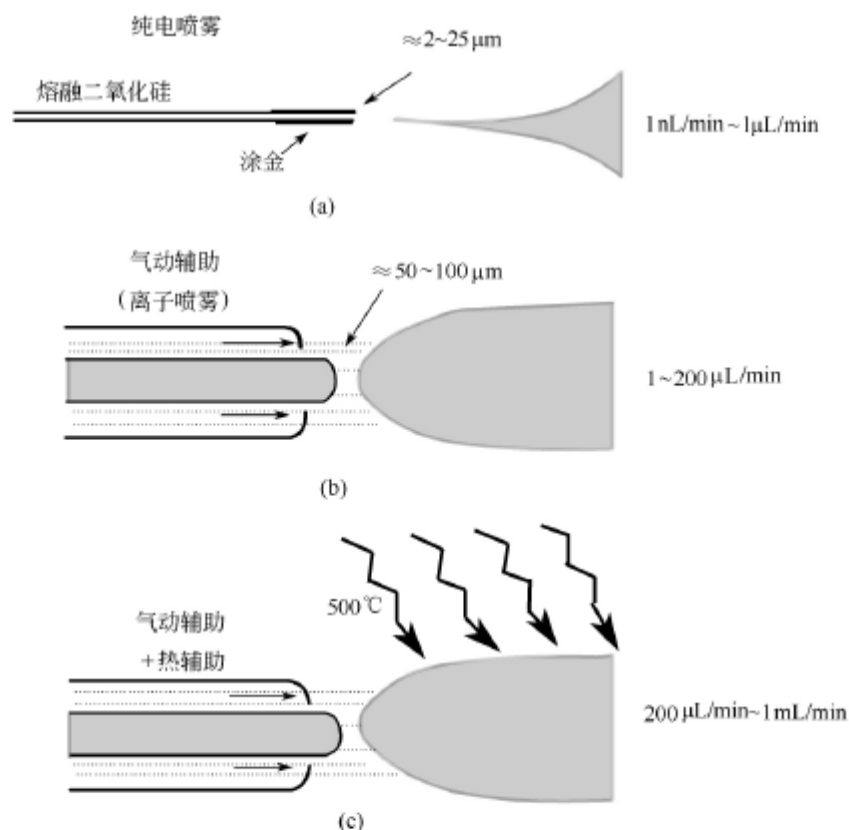


图 2-12 三种电喷雾在不同流速时的最佳效能

1. 低流速 (1nL/min $\sim$ 1 μ L/min) 范围

ESIMS 近来的发展主要在这一流速范围内。在这样低的流速下产生稳定的信号的目的是要将毛细管液相色谱法和毛细管电泳法与 ESIMS 连接起来，

以得到微量高灵敏度的（高流出峰浓度）结果。

喷口的直径决定了最佳的流速范围，低流速要求较小的喷口。当通过喷口的线速度太高时，将形成粗的液滴；反之，当通过特定直径的喷口的液体线速度太慢时，不能形成一恒定均匀的带电的雾滴流——Taylor 锥体。

有一种称之为纳升电喷雾（nanoES）的装置，如图 2-13 所示，用硼硅玻璃管制成尖端小孔直径为 $1\sim 3\mu\text{m}$ 细管，表面涂金以便电接触。将约 $1\mu\text{L}$ 样品液加在这种纳升喷雾器内，将喷雾器放在 ESI 离子源内，当加上电压后，液体从尖端引出，由于静电场的作用形成 Taylor 锥体。液体的流速由尖端直径、溶剂黏度、表面张力和电解质浓度确定，通常在 $25\text{nL}/\text{min}$ 左右。

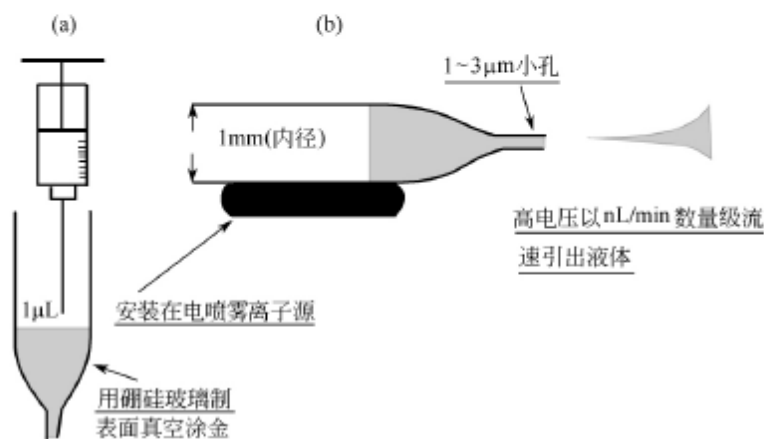


图 2-13 纳升电喷雾装置

(a) 上样；(b) 喷雾

这种装置，即使以纯水作溶剂，也能稳定喷雾。 $1\mu\text{L}$ 的样品溶液加在毛细管尖端内约可喷雾 26min（见图 2-14）。

这种技术的优点是可在长时间内进行信号平均，以增加信噪比。

纳升喷雾的孔径非常小（ $1\sim 3\mu\text{m}$ ），因而可以想像堵塞可能是个问题。但是，这种装置比较耐用，堵塞现象较少发生。这可能是由于液体不是用泵使之强行通过喷口的，而是由电喷雾过程的作用缓慢引出的，颗粒疏松地停留在锥部，而很少紧密地挤在一起而使液流停止。当然，样品溶液应清洁并滤去颗粒物。

纳升电喷雾及微电喷雾（micro ES）装置也可用金属（如不锈钢）制成，更加耐用，主要用于与毛细管液相色谱（Cap-LC）或毛细管电泳（CE）的在线联用。

此时，常采用同轴接口，加入补足液流（co-axial make-up flow）以使总流速达到气动辅助 ESI 工作的要求，如图 2-15 所示。补足液流在毛细管外形

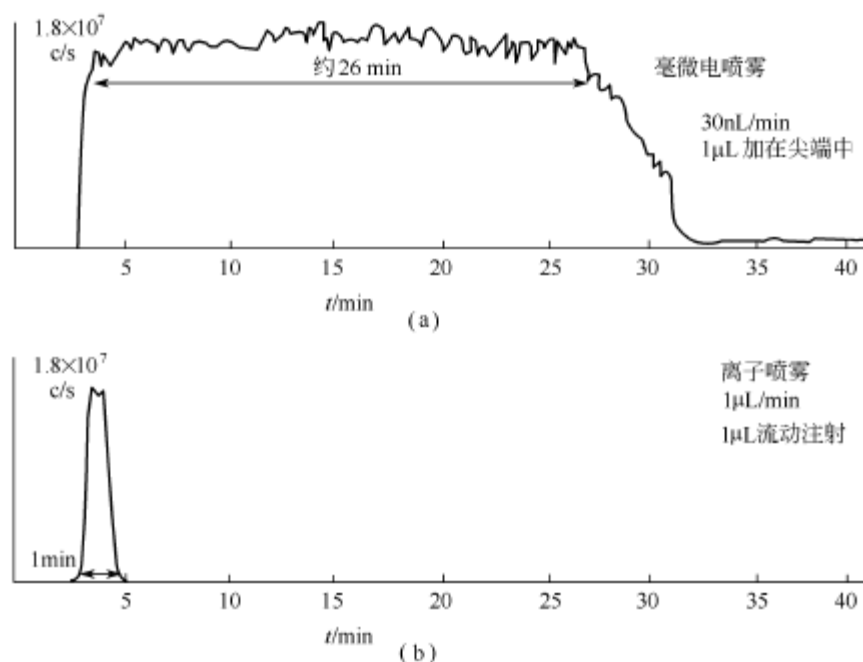


图 2-14 信号比较

(a) 1 μ L 样品加在纳升电喷雾装置中；(b) 1 μ L 样品流动注射，流速 1 μ L/min

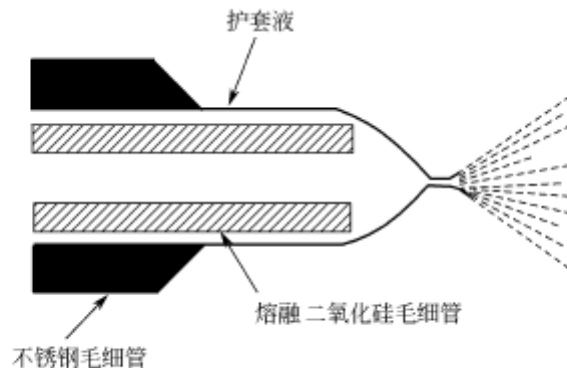


图 2-15 同轴夹套液喷雾器

成液体夹套 (liquid sheath)，在与毛细管电泳联用时，此处充当一个电极。这个方法的优点是非理想的流动相，如含非挥发缓冲剂和高含水量等，可用理想的喷雾溶剂等修饰，参见下述 (三) 从 LC 转换至 LC/ESIMS。缺点是由于样品被稀释而使灵敏度下降。

2. 中等流速范围 (1~200 μ L/min)

当流速较高时，仅仅用电场不足以分散液体成雾并使雾滴带电，尤其是溶剂中含水量较高时更是如此。气动辅助 ESI 是简便实用的方法。现在，在 ESI 应用中，最常用的是气动辅助的技术。内径为 0.5~2mm 的色谱柱产生较高

的峰浓度同时又不严重影响色谱系统的耐用及可靠性。对于既要高灵敏度又要较大的柱容量的工作,如药物代谢定性定量分析,常用 2.1mm 内径的色谱柱。串联质谱法 (MS/MS) 采用多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 已被广泛采用,尤其是在高通量 (high throughput) 定量工作中,因为 MRM 具很高的选择性。图 2-16~图 2-18 表示用 MS/MS 测定 FK506 血药浓度的方法。以 $(M+NH_4)^+$ 为母离子,监测其碎片离子 m/z 576 进行定量。用 MRM,在 50pg/mL 浓度时,几乎无背景信号。用 2.1mm 短柱,保留时间约 2min,用化学结构类似物作内标。由于这种中等内径的色谱柱的可靠性,样品量大于 200 个/d。

对于肽图谱分析,主要考虑的是灵敏度而不是高通量,常选用 1mm 内径的柱,灵敏度约 1~100pmol。

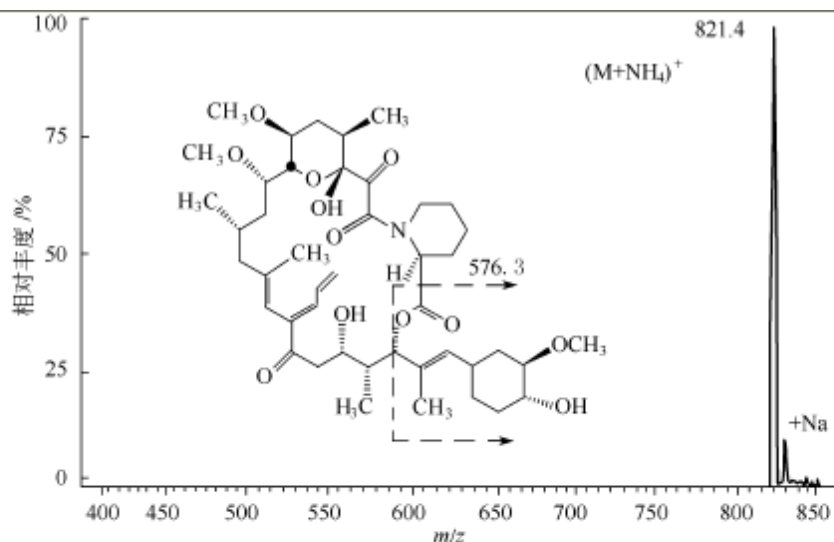


图 2-16 FK506 的质谱
溶剂 20mmol/L NH_4OAc

3. 高流速范围 ($200\mu L/min \sim 2mL/min$)

高流速时,雾滴的蒸发速率可能严重影响离子化效率,因而影响灵敏度。必须增加热能的输入,以增加雾滴的蒸发速率。图 2-19 说明奥美拉唑 (omeprazole) 用 4.6mm 内径的色谱柱,流动相流速 $1mL/min$,当干燥气温度为 $500^\circ C$ 时,较不加热时的信号提高近百倍。

不同的商品仪器采用不同的加热方法,如气动辅助喷雾时注入热气流;雾滴经加热的金属毛细管吸入真空;雾滴喷入逆向高温的干燥气流(通常为氮)。为了迅速去溶剂,雾滴周围的温度需要高达几百度。在这样的环境下,有机分子似乎会热分解,但是当溶剂蒸发时,雾滴会冷却,其温度通常不超过 $50^\circ C$,

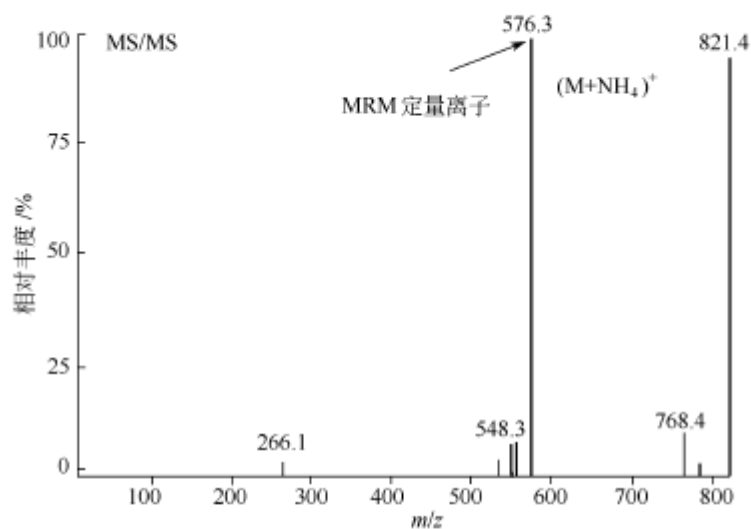
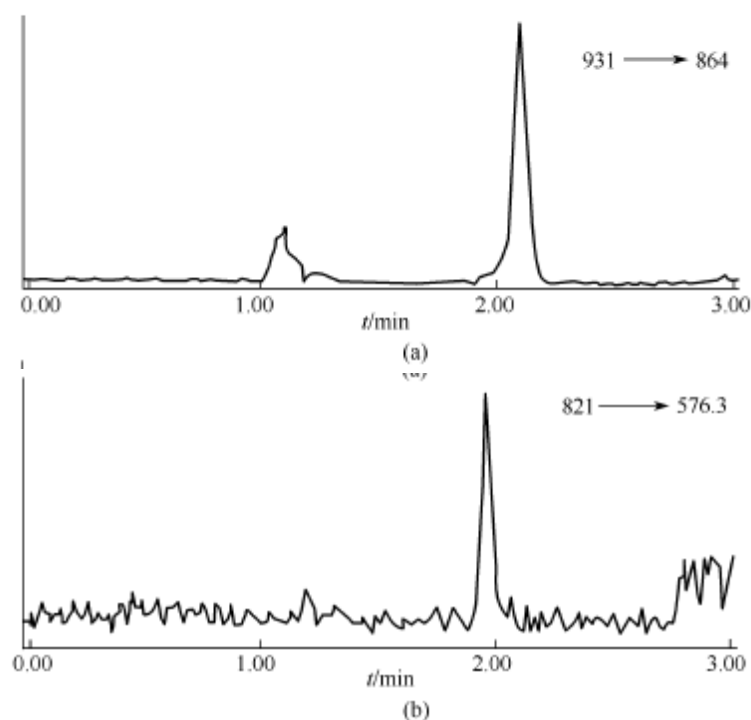
图 2-17 $M+NH_4^+$ 母离子 20eV 碰撞能 (氩) 所产生的离子

图 2-18 血浆中 FK506 检测限

(a) 血浆中 1ng/mL 纳帕霉素内标物;

(b) 血浆中 50pg/mL FK506 待测物进样量 < 50pg

因而一般有机化合物不会热降解。

在质量控制工作中,样品量充足或为了鉴定微量杂质,可采用 4.6mm 内径的柱,必要时采用柱后分流,以保证离子化效率。

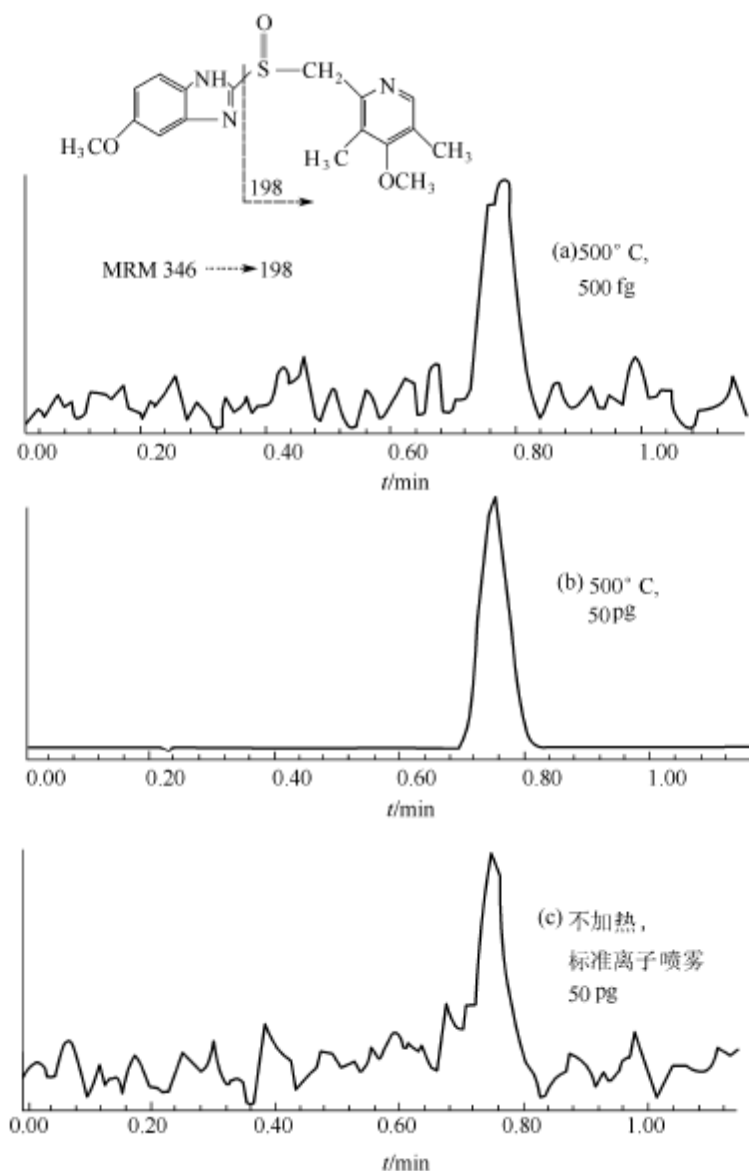


图 2-19 不同离子源温度时奥美拉唑 (omeprazole) MRM 信号比较

更有实际意义的是柱后分流可收集成分作进一步分析。由于 ESI 在通常条件下是浓度检测器，分流并不影响灵敏度，因此可将 90% 样品分部收集。

随着组合化学、代谢组学等研究工作的发展，高效、高通量色谱法得到了重视。这些方法中采用细粒径的填料 ($<2\mu\text{m}$) 填充的短柱，分析工作在几分钟内即完成。这也是 LC/MS 近来发展的一个重要方面。

4. 分流与检测器性质

为了讨论 ESI 灵敏度与流速的关系，必须理解质量检测器和浓度检测器的概念。质量型检测器的响应与待测成分的质量流速（质量通量）成正比，而浓

度型检测器的响应与流动相中待测成分的浓度成正比。紫外检测器是一种典型的浓度型检测器，吸收值与浓度的关系符合 Beer 定律。进样量相同，柱内径较小时，灵敏度较高，因为流出峰浓度较高。浓度反比于柱内径的平方。因此，在理想情况下，1mm 内径的柱的流出峰浓度 16 倍于 4mm 内径柱的流出峰浓度。

质量型检测器的响应与待测成分在流动相中的浓度无关，正比于通过检测器的待测成分的质量。典型的质量检测器是放射性同位素检测器和在电子轰击或化学离子化条件下的质谱仪。APCI 源作为 HPLC 的接口与质谱仪联用是质量型检测器，因此常用 4.6mm 内径的色谱柱。

和其它质谱离子源不同，ESI 的表现行为如浓度型检测器。为了证明这一点可通过柱后分流将不同比例的柱流出物移去。图 2-20 证明了分流实验的结果。相对分子质量为 581 ($t_R=1.2\text{min}$) 的药物和内标 ($t_R=1.7\text{min}$) 经内径为 2.1mm 的色谱柱分离，取不同的柱后分流比，观察实际响应，即使进入离子源的量相差大于 25 倍（不分流和最大分流），也无甚差别。

对于上述表观浓度型现象的解释有两种：第一种解释是随着流速的降低，离子化效率增加，但是，随着流速的降低，进入喷雾器的质量流速也比例地降低，因此信号保持恒定；另一种解释认为离子化效率在一定范围内的不同的流速下是恒定的，但是通过自大气压至真空的接口处的小孔的离子分量随流速的增加而降低。其物理模型是带电液滴的相互排斥。在高流速下，大量的带电液滴导致液滴散开，远离从大气压至真空的传输孔，使之不能进入质谱仪。离子传输效率与进入喷雾器的质量流速之间平衡，使信号很少改变。

不论采用何种假说，从实用的观点来说，ESI 的浓度响应说明：

- ① 内径较细的色谱柱具较高的绝对灵敏度；
- ② 对于一定量的样品，较低的流速意味着较长的信号采集时间；
- ③ 在一定的流速范围内，柱后分流不导致明显的信号丢失。

已经证明柱后分流是可靠的，易于安装且并不增加系统的复杂性。用分流器有许多好处：①可同时收集经色谱纯化的样品；②可同时使用与质谱仪平行的另一检测器；③以较低的流速通过离子源以增加离子化效率；④因为只有一小部分样品进入离子源，因而有利于保持质谱仪清洁。

（二）灵敏度及线性范围

ESIMS 通常被认为是一种很灵敏的技术，但是，灵敏度很大程度上取决于柱内径、流速和溶剂组成。待测成分的化学性质也对检测限有很大的影响。化合物的一个很重要的性质是其表面活性，因为 ESI 的机制假定作为一种表面离子化技术，具表面活性的化合物（例如去污剂）用 ESI 时具最高的响应。这些化合物也是对其它表面活性较弱的分子的最有效的离子化抑制剂，因为它们占据了雾滴表面。分子能在溶液中生成离子也很重要，酸性化合物主要检测

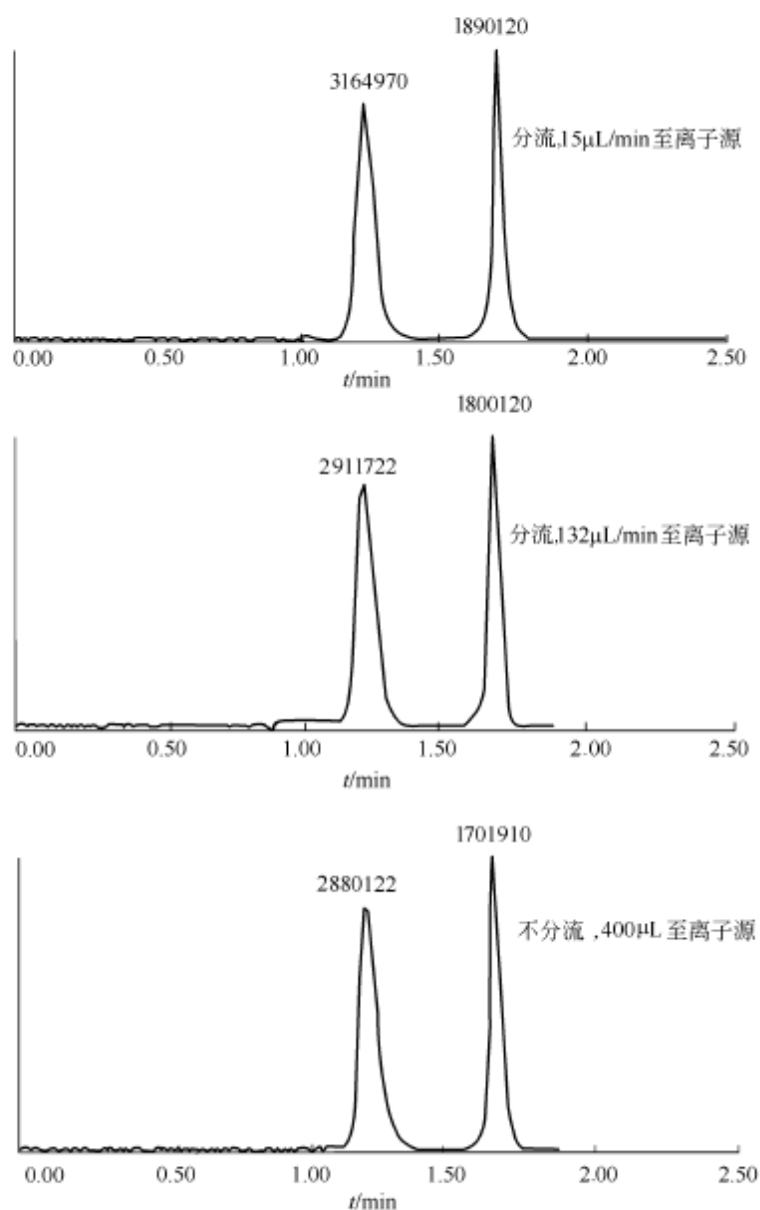


图 2-20 内径 2.1mm 柱，流动相流速 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时分流对信号的影响

其负离子，碱性化合物检测其正离子，已如前述（见第一节 ESIMS 及其原理），除了离子化的酸碱机理外，分子可通过多种途径取得电荷，如加合物 (adduct) 的形成 ($\text{M} + \text{NH}_4^+$, $\text{M} + \text{K}^+$, $\text{M} + \text{Na}^+$, $\text{M} + \text{Ac}^-$, $\text{M} + \text{Cl}^-$ 等) 及在喷雾器的金属/液体表面氧化/还原。

用 ESIMS 进行定量分析，线性及动力学范围是很重要的。在制药工业中，ESI (和 APCI) 是测定低浓度 (pg/mL) 血浆生物样品中药物及其代谢物的首选方法。

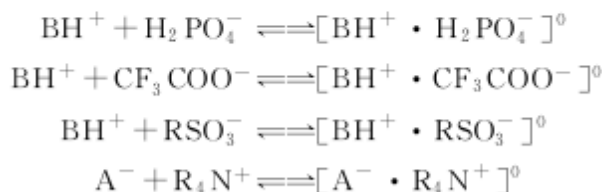
ESIMS 的线性范围约 $10^3 \sim 10^4$ ，取决于样品的性质和溶液中的其它带电物质以及离子源的设计。当样品浓度约 10^{-5} mol/L 时，样品离子信号达到上限，这是由于离子竞争有限的微滴表面电荷之故。继续增加溶液中的样品浓度，不能使样品离子在表面中继续增加。为了进一步扩大线性范围，主要是要设法降低检测限。

(三) 从 LC 转换至 LC/ESIMS

反相液体色谱法 (reversed phase liquid chromatography, RPLC) 与 ESIMS 联用是应用最广泛的 LC/MS 技术。

RPLC 要求待测物质以非解离状态 (或部分解离状态) 存在于流动相，以在固定相中得到保留；而 ESI 则希望待测物质解离成离子存在于溶液中，以利于气相离子的形成。因此，好的 RPLC 条件，可能是“坏的”ESI 条件。

有机酸、碱、多肽和蛋白质的分析是 LC/ESIMS 应用的重要方面，用 RPLC 分离分析有机酸、碱，常用的流动相是在甲醇-水、乙腈-水中添加磷酸盐等缓冲液。在肽和蛋白质分析中常用 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 作添加剂。对于酸、碱化合物，离子对色谱法也是常用的方法。例如：



使溶液中的待测物质离子成为电中性的离子对化合物。显然，这有利于 RPLC 的保留，而不利 ESI。

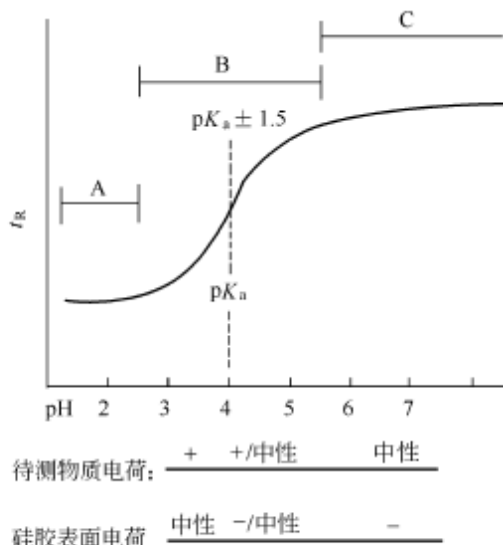


图 2-21 pH 值和 pK_a 值

对碱性化合物保留时间 (t_R) 的影响

为了得到好的 LC/ESIMS 结果，对于 RPLC 不宜应用非挥发性和低挥发性的磷酸盐、酸、碱及强离子对试剂。可以通过用甲酸、乙酸或氨及其缓冲溶液调节溶液 pH，控制 RPLC 的保留。酸、碱物质的保留行为如图 2-21 所示 (以碱性化合物为例)。

在 t_R -pH 曲线的中点，溶液的 pH 值等于化合物的 pK_a 值 (对于碱为 BH^+ 的值)。当溶液 pH 值等于化合物的 pK_a 时，化合物半解离，即 HA 和 A^- 或 BH^+ 和 B 的浓度相等。在 $pK_a \pm 1.5$ 范围内， t_R 随 pH 值的

变化而变化,超过此范围,化合物完全解离或不解离, t_R 随pH值的变化很小。对于两性化合物,如氨基酸,最小的 t_R 在等电点。

在ESI过程中,挥发性酸、碱在雾滴蒸发过程中浓度将很快降低,造成有利于待测物质离子化的pH值的变化。

这样,如果欲在低pH值下分离酸性化合物,应选择耐酸的 C_{18} 柱,如:用碱性流动相分析碱性化合物或在宽pH值范围内工作,应选择耐碱的或可在宽pH值范围工作的色谱柱。

总之,将现有的HPLC方法用于LC/ESIMS时应注意:

(1) 缓冲剂 硫酸盐、磷酸盐和硼酸盐等非挥发性缓冲剂,需用挥发性缓冲剂,如乙酸铵、甲酸铵、乙酸、三氟乙酸(TFA)、七氟丁酸(HFBA)、氨水、氢氧化四丁基胺(TBAH)等代替。注意离子强度是个重要参数。

(2) pH值 当用挥发性酸、碱(如甲酸、乙酸、TFA和氨水)等代替非挥发性酸、碱时,pH值通常应保持不变。

(3) 离子对试剂 应采用挥发性的,如HFBA、TBAH。但是,更换离子对试剂后,很难达到相同的保留时间。分子量较大的离子对试剂干扰较大。

(4) 有机溶剂 大多数LC用的溶剂,尤其是反相色谱流动相与LC/ESIMS相匹配。

(5) 色谱柱 大多数色谱柱与LC/ESIMS相匹配,但离子交换柱因用非挥发性流动相添加剂及高离子强度会产生困难。疏水相互作用色谱需用盐浓度梯度洗脱生物分子,非挥发性盐与ESIMS不匹配。

此外,通过柱后修饰可使ESIMS响应改善,这只需在色谱柱后加一个三通及用一输液泵添加修饰剂即可。柱后修饰的作用有:

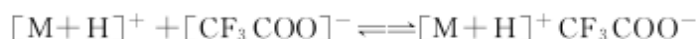
① 调节pH以优化正或负离子检测。

② 添加异丙醇以利于含水溶剂的去溶剂化和稀释缓冲盐以达到ESIMS正常工作可接受的程度。

③ 添加乙酸钠(约 $50\mu\text{mol/L}$)以使缺乏或只有弱质子化位点的样品阳离子化($M+\text{Na}^+$)。

④ 用“TFA Fix”改善灵敏度。

在生化色谱分离时,流动相中常添加0.1%TFA。 CF_3COO^- 是个较强的离子对试剂,因而在ESI过程中不易生成 $[\text{M}+\text{H}]^+$,使其质谱信号减弱。



可在柱后添加丙酸或乙酸(20%酸,80%异丙醇,流速 0.1mL/min)。由于沸点(bp)的差别(丙酸>乙酸>三氟乙酸),在ESI溶剂蒸发过程中,TFA为沸点较高而离子对作用弱的丙酸或乙酸所取代,因而易于生成 $[\text{M}+$

$H]^+$ ，得到较强的质谱信号。



⑤ 增加流速，以达到稳定的喷雾。如填充毛细管柱色谱或毛细管电泳，常需柱后添加适当溶剂（补足液流）以利工作。

⑥ 柱后分流，降低流速，这常在采用直径较大的色谱柱，流速较高时使用。

⑦ 柱后衍生化，以提高质谱响应。

在某些情况下，难于用 ESI 得到有用的待测物质信号，可将待测物质制备成衍生物，或试用 APCI 测定。

四、LC/APCIMS

如果 LC 分离的成分无酸或碱性，如醇、醛、酮、酯等；样品可以蒸发；LC 流动相的流速、溶剂、添加剂与 ESI 不匹配；样品的 ESI 响应很差，此时采用 APCI，可能得到较好的结果。而且，LC/APCI 较 LC/ESIMS 易于操作，方法耐用性较好。

APCI 离子源的关键参数是蒸发器的温度。较高的温度有利于去溶剂及样品蒸发，但太高的温度可能使样品分解，因此蒸发器温度应用实验确定。

APCI 是质量型检测器，因此不应使用柱后分流器，LC/APCIMS 可采用较高的流动相流速，如 2mL/min。

五、CE/ESIMS

随着毛细管电泳的发展，需要一种灵敏、选择性及能提供结构信息的检测方法。质谱法是可以满足这些要求的。但是，CE/MS 的结合在方法学等方面仍需改进。质谱法的新近进展，包括 ESI、串联质谱法、多级质谱法（ MS^n ， $n>2$ ），可达到更低的检测限和提供更多的结构信息。

CE/MS，在某种意义上，是近于理想的联用技术：CE 分离分析离子基本上基于其质荷比及其在溶液中的不同淌度，而 MS 分离或分析离子基于其在气相中的质荷比的差异。但是，这两种方法是在两种完全不同的环境中研究离子的运动，CE 采用中等电导的液体系统，而 MS 采用高真空条件。CE/MS 接口的主要作用是这两种不同的环境连接起来。将液相分离方法和 MS 结合起来受到人们的关注已有约 30 年之久，发明了各种 LC/MS 的接口，而 CE/MS 与 LC/MS 接口相比较，有其不同的要求。例如，CE 流速很低，缓冲系统具中等电导，分析毛细管两端均需保持电接触以确定 CE 电场梯度，溶质区带的毛细管外展宽必须减低至最小以保持高分离效能等。

下文中将简述 CE/ESI 接口及其问题。

(一) ESI 接口

目前,常用的是同轴夹套液流 (sheath flow) 和液体汇合 (liquid junction) 接口。最近,有所谓“无夹套流”接口,即将电泳毛细管末端腐蚀并涂金以实现电接触,也可将毛细管与微喷针 (micro tip) 或纳升喷雾器直接连接。

夹套液流接口及液体汇合接口如图 2-22 所示。

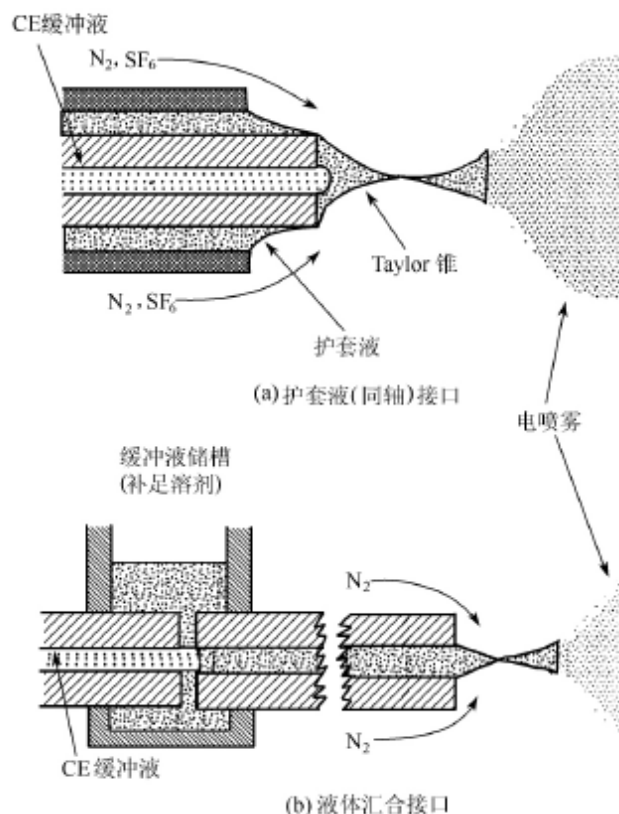


图 2-22 CE/ESIMS 的同轴夹套液流接口
(a) 及液体汇合接口 (b)

在夹套液流接口中的夹套液体通常为甲醇、甲氧基甲醇、乙腈、水并含 10%~20% 甲酸、乙酸或与其铵盐的缓冲溶液,在 CE 毛细管 (外径约 140~180 μm) 和熔融二氧化硅或不锈钢毛细管 (内径约 250 μm) 间流过。分析毛细管通常从夹套毛细管中伸出约 0.2mm。图 2-23 是 Smith 的实验室的设计,用内径 300 μm 的熔融二氧化硅毛细管套在电泳毛细管之外。

对于 ESI 正离子操作方式, +2~5kV 的电压加在夹套液体上,夹套液体的流速为 2~5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

液体汇合接口由 Henion 等发明。由图 2-22 (b) 可见,毛细管末端的电

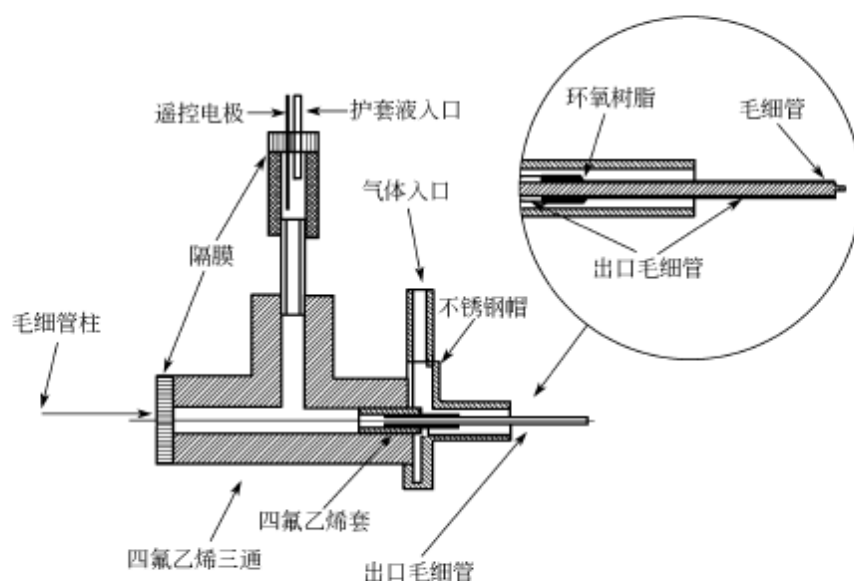


图 2-23 CE/MS 同轴夹套流 ESI 接口设计

接触可由贮槽液体建立（插入一电极），贮槽液环绕着分析毛细管和传输毛细管。两毛细管之间的间隙调整至 $10\sim 20\mu\text{m}$ ，以兼顾既要有足够的补足液体吸入传输毛细管，又要避免被分析成分扩散入贮槽导致损失。补足液体流是由重力驱动及高速雾化气流产生的吸力的综合作用产生的。

ESI 离子流取决于溶液的电导，通常为 $0.1\sim 0.3\mu\text{A}$ ，只有约 $20\sim 200\text{pA}$ 的总离子流通过质量分析器并被检测。有时为防止毛细管末端的放电电晕需用电子清扫剂（electron scavenger），最常用的是六氟化硫（ $50\sim 200\text{mL/min}$ ），除了抑制电晕放电外，还可增加负离子 ESI 的稳定性。

（二）CE 分离有关问题

CE/MS 要取得成功，除了接口问题之外，有关 CE 的各种问题，如进样、缓冲剂成分，溶质与毛细管内壁的相互作用，分离效能等均将对 CE/MS 产生影响。

大多 CE/MS 实验是用内径 $50\sim 100\mu\text{m}$ 的毛细管进行的。这是多种因素折中的结果，包括常规检测器的灵敏度、进样方法、毛细管表面相互作用等。但是，用这样直径较大的毛细管将降低分离效能，这是热效应的结果。此外，与使用直径更小的柱相比较，也将降低 ESIMS 检测灵敏度。

许多 CE 缓冲系统均可用于液体汇合或夹套液流接口，但是缓冲液的浓度应尽可能低并采用挥发性缓冲盐，同时，其它非挥发的带电成分的浓度也应尽量低。与待测成分相互作用较强的缓冲剂将明显降低检测灵敏度，这是由于形

成加合物的缘故。表面活性剂 [如十二烷基磺酸钠 (SDS)] 在正、负离子 ESI 中均产生强背景信号, 这造成了胶束电动毛细管电泳与质谱法联用的主要困难。

目前, 最常用的缓冲盐是乙酸、乙酸铵、碳酸氢铵和甲酸系统。缓冲盐的纯度应较高, 以减少背景信号。

CE/MS 宜采用自动进样器及精密温控以提高准确度及重现性。

第四节 液相色谱-质谱联用中的质谱技术

ESI 和 APCI 是大气压离子化 (API) 技术, 与经典的质谱离子源处于低压 (真空) 条件下不同, 样品的离子化是在大气压下进行的, 因此 APIMS 要有从大气压至真空的接口及离子传输等装置。由于 ESI 还涉及带电雾滴的形成、去溶剂及气相离子的产生等问题, 而 APCI 则主要是离子传输问题, 所以下面以 ESI 为主讨论 API 离子源与质谱的连接技术。

API 是软电离技术, 得到的质谱中主要是分子量信息。对于未知物分析, 准确质量测定以及由此得到的化合物元素组成 (分子式)、不饱和度 (即环和双键数或双键相当数) 及同位素丰度比等数据是十分重要的。

为了得到化合物更多的结构信息, 需要进行多级质谱 (MS^n) 分析。此外, APIMS 可选用不同类型的质谱仪以满足工作的需要。这些问题可参考第一章第三节二。本节中, 将讨论与 API 离子源连接的各种质量分析器的性能特点。

一、电喷雾和高电压的连接

无论是电喷雾或气动辅助电喷雾, 喷雾针均处于高电场下。就原理而言, 电场的产生可将高压电源连接至喷雾针而将离子源接地, 或者相反, 将喷雾针接地而将离子源接至高压, 还可将喷雾针和离子源分别接至不同的电源。选择何种接法, 取决于所用的质谱仪和液相分离联用系统, 以将离子从离子源的大气压腔转移至质量分析器的真空中。如图 2-24 所示, 用四极质谱仪, 喷雾针可为 +5kV 或 -5kV, 而反电极 (取样孔) 处于地电位; 在扇形磁场质谱仪中, 当用 ESI 源时, 加速电压常限于 3~5kV, 故喷雾针电压对地为 8~10kV。为了保护操作者, 离子源的设计应适当绝缘或有安全内锁。如喷雾针为高压, 与 HPLC 或注射器泵连接应采用熔融二氧化硅毛细管。应当注意, 如毛细管中充满电解质溶液, 熔融二氧化硅毛细管不再是绝缘体, 而是一个电阻。此时, 如操作者接触喷雾针或注射器泵的针和活塞, 可因电击而刺痛。为安全起见, 当 ESI 工作时 (加上了高压), 操作者不应拆装连接管线。更好的方法是将注射器泵接地。



图 2-24 ESI 喷雾毛细管与离子源反电极之间的电压

值得注意的是，喷雾针连接高压是否会影响样品经熔融二氧化硅毛细管的传输，以及在和毛细管电泳联用时是否干扰毛细管电泳系统的工作。

毛细管电泳独立工作时，通常在阳极和阴极间加以 30kV 电压。在 CE/MS 正离子操作时，阴极处于喷雾针的电压，如 5kV。这样加在电泳毛细管柱上的电压降降低至 25kV，导致分析时间的延长。更复杂的情况是，如图 2-25 (a) 所示，在简单的 CE/MS 系统中，从 CE 电源流出的电流只有很少的部分为带电雾滴所带走，大部分电流流入 ESI 电源。ESI 电源是设计为供电电源的，而不是接收电

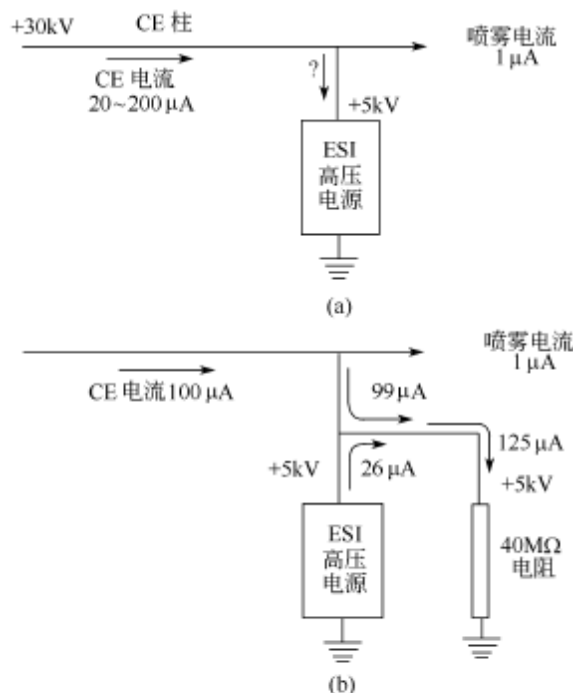


图 2-25 CE/MS 系统

- (a) 在简单的 CE/MS 系统中，CE 电流 100 μA ，为带电雾滴带走的电流为 1 μA ，ESI 电源必然接收 99 μA 电流；(b) 40M Ω 接地电阻接在 ESI 电源和地之间，在 5kV 时，带走 125 μA 电流，ESI 电源输出 26 μA 电流以维持平衡

流的。如 ESI 电源接收的电流太多, 电源内部反馈电路 (用于稳定输出电压至设定值) 将不能保持电源输出电压的稳定, 导致输出电压失控升高和电喷雾的不稳定。如图 2-25 (b) 所示, 用一接地电阻, 强制 ESI 电源输出电流, 这样可使输出维持稳定。接地电阻的选择, 取决于所用的电源的规格。

一个常常会忽略的问题是, 在喷雾针和注射器泵间的传输线中, 可能会有电迁移发生。为了节省样品, 注射器泵可设定为 $1\mu\text{L}/\text{min}$, 在内径 $50\mu\text{m}$ 毛细管中, 相当于 $50\text{cm}/\text{min}$ 的线速度, 在内径 $100\mu\text{m}$ 毛细管中, 线速度为 $12\text{cm}/\text{min}$ 。如果带正电的样品离子的淌度为 $10^{-3}\text{cm}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$ 及 50cm 毛细管接在 5kV 喷雾针上, 则从喷雾针方向返回注射器泵的样品电泳速度为 $6\text{cm}/\text{min}$, 此时, 溶液流速远大于反向电泳速度。但是, 如用内径 $100\mu\text{m}$ 的毛细管, 接在扇形磁场质谱仪的 ESI 源上 (电压为 $+8\text{kV}$ 或更高), 则逆向电泳速度可能超过溶液流速。所以, 传输线应采用细内径的毛细管, 以防止这种情况的发生。在注射器泵筒内, 溶液的线速度很低, 如推动活塞的金属块接地, 而注射器针未接地, 则在筒内的液柱两端产生电压降, 故可能在注射器筒内产生电泳迁移, 如图 2-26 所示。可以将注射针接地, 避免这种现象的产生。

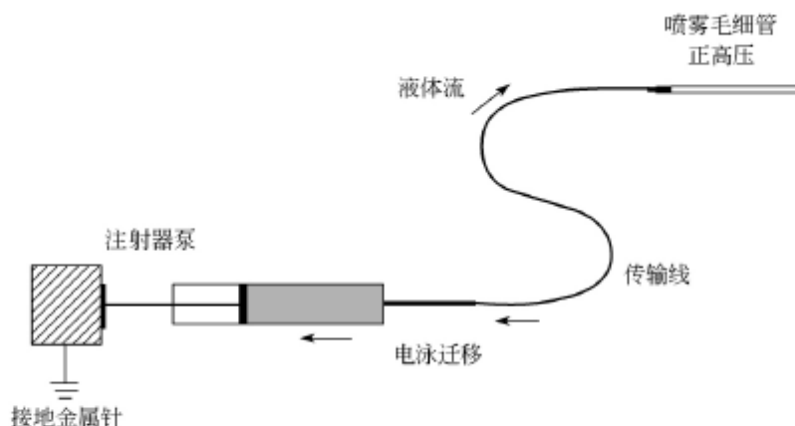


图 2-26 正电荷样品离子可能发生反向电迁移

如喷雾针在地电位工作, 则 CE/MS 的电压降的下降和样品输注过程中可能发生电迁移的问题均可避免。为了生成带正电荷的雾滴, 可将离子源的反电极接以负高压, 以生成所需的电场。正离子将引入反电极的取样孔。为了将离子加速进入处于真空的质量分析器内, 必须加以更高的负电位, 这是很不实用的设计。用玻璃毛细管传输离子是一种优良的系统, 可避免采用负高压将离子从大气压区输入质谱仪的真空区 (图 2-27)。

ESI 或 APCI 在离子源的大气压区产生的离子通过两端镶嵌金属的毛细管携入真空区。即使玻璃毛细管的入口端为负高压而出口端为地电位, 由于毛细管内的气流线速度很高, 足以将离子带入真空区。这样, 处在地电位的毛细管

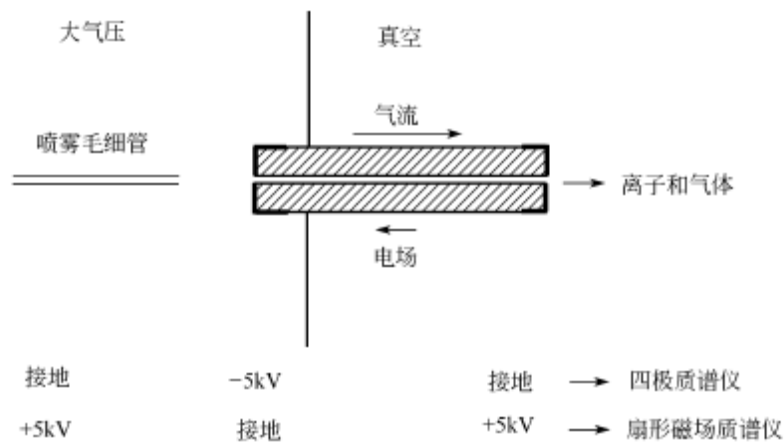


图 2-27 用玻璃毛细管隔离 ESI 离子源反电极和加速电压并传输离子的电压设计

的出口作为离子源，易于将离子聚焦进入质量分析器。将大气压离子源和离子光学及质量分析器相互电隔离，对扇形磁场质谱仪也很合适。如图 2-27 所示，将喷雾针接高压，传输毛细管在地电位。

二、喷雾针的位置和去溶剂方法

最初的设计，喷雾针位于离子源的中心，对准离子源的离子取样孔。后

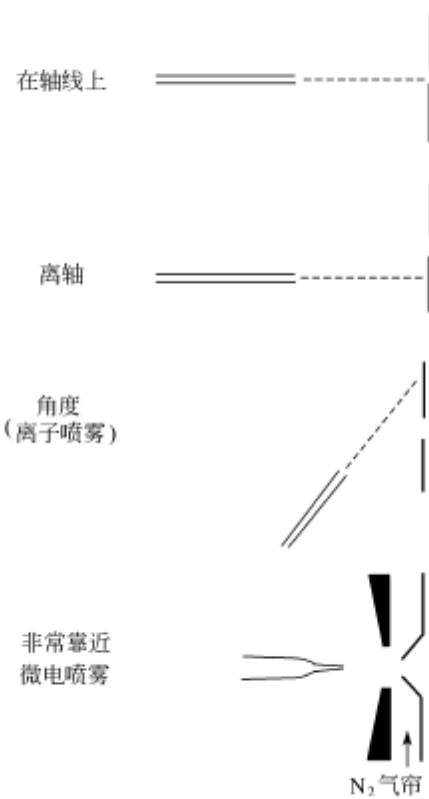


图 2-28 喷雾针在离子源中的位置

来，发现喷雾针偏离轴线时，测得的离子信号比较稳定，灵敏度不低，甚至更高（图 2-28）。理想的状况是取样孔只取离子而不取雾滴。带电雾滴进入质谱仪可能撞击离子光学元件或质量分析器，产生离子脉冲，在质谱图中出现尖峰信号。在 ESI 产生的气雾中，位于中心的雾滴直径较大，而处于周边的雾滴直径较小。从周边的小的带电雾滴产生离子的效率较在中心处的雾滴要高，这是因为喷雾中心的雾滴可能不能完全去溶剂化。

将喷雾针置于与轴线垂直的位置，喷雾不是对着取样孔，而距离取样孔约 1cm 之外，从而减少将雾滴发射进入质谱仪的可能性。气动辅助电喷雾采用这种设计最为有效，距离取样孔约 2cm。增加了信号的稳定性，提高了信噪比。

单纯的电喷雾的最佳位置取决于喷雾针和离子源最接近的部件的距离及电位差，这决定了产生喷雾的电场并影响喷雾性能。因此，喷雾针的位置和喷雾电压是相互关联的，不像气动辅助电喷雾那样有较大的自由度。在气动辅助电喷雾中，气雾的产生取决于气体的流速，电场对喷雾的影响较小，喷雾的发生与喷雾针位置无关。喷雾针的最佳位置取决于样品性质。蛋白质的气动辅助 ESI 的最佳喷雾针位置较小分子更靠近取样孔。

常规 ESI 与微电喷雾不同，前者针尖和取样孔的距离约 1cm，而微 ESI 喷雾针是位于轴线上，与取样孔的距离仅几毫米并采用较低的喷雾电压。

ESI 生成的雾滴的去溶剂可采用同轴或逆向热氮气流或加热的取样毛细管等方法。如用加热毛细管，若进入喷雾针的溶液流速较低时，带电雾滴的去溶剂主要发生在离子源的大气压腔内，离子与溶剂蒸气和喷雾气一起吸入加热毛细管内。在高溶剂流速时，不仅是离子，带电雾滴也被吸入毛细管。雾滴的去溶剂化在毛细管中发生，产生样品离子进入质量分析器。但是，非挥发性物质将在管内沉积，可能堵塞毛细管。

三、大气压离子源与真空的连接——自由喷射膨胀

气体从大气压离子源到质量分析器是一个从高压到低压、高真空的扩散过程。在有气压差的界面上，如界面两边的气压差足够大且气体分子的自由程与界面孔径的比值足够小，则气体的扩散呈现特殊现象，取样孔附近的气体的扩散为绝热膨胀。气体分子的温度随着与采样孔的距离的增加而迅速降低，热能转化为动能，可以认为气体中的分子和离子，不管其质量大小，扩散速度均为音速。气体和离子的混合物的迅速冷却导致极性分子（水和溶剂分子）在样品离子上凝聚，生成簇离子，其质量可超过多数质谱仪的质量范围：



气体向低压区的扩散如图 2-29 所示，称自由喷射膨胀（free jet expansion）。在取样孔内和取样孔之后，气体分子得以加速，气体分子和气体中的离子沿着取样孔直线运动，气流密度的最高处位于取样孔的轴线上。远离取样孔的气体被真空泵抽去，气体分子随机运动。在直线运动和随机运动的过渡区，称冲击波，离子和气体分子经过多次碰撞，导致离子和分子束散开。在筒状冲击波内和取样孔与 Mach 碟之间的区域，称为安静区，离子和气体同向等速运动。

Mach 碟的位置对 API 质谱仪的设计是很重要的。Mach 碟与取样孔的距离（ X_M ）为：

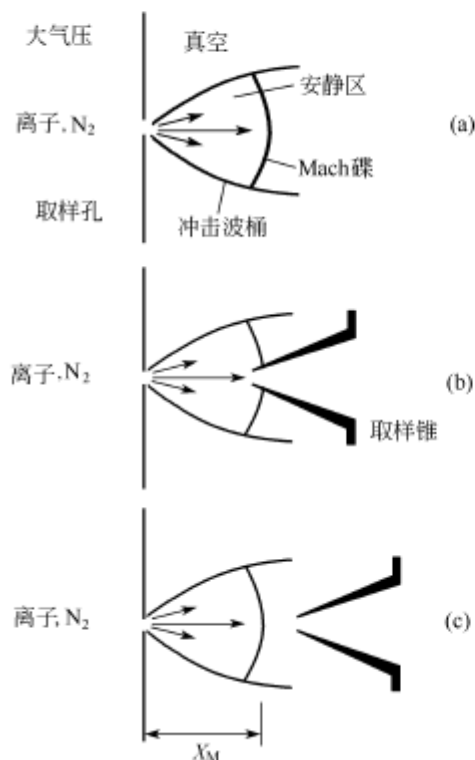


图 2-29 气体和离子向真空自由喷射膨胀

(a) 基本原理；(b) 取样锥在安静区采样；

(c) 取样锥位于 Mach 碟后一定距离

$$X_M = 0.67 D_0 \sqrt{\frac{p_0}{p_1}}$$

(a) 式中 D_0 ——取样孔内径；
 p_0 ——上游（大气压）的压强；
 p_1 ——下游（真空）的压强。

对于内径为 0.3mm 的取样孔，用 35m³/h 的旋转真空泵抽至 1.2Torr，Mach 碟的位置离取样孔 5mm。 X_M 取决于泵抽速。冲击波的中心部分可用取样锥（skimmer）采集至下一级真空（图 2-29）。在图 2-29（b）中，从安静区取样中心部位取样，离子和气体继续以直线运动，用取样锥在气流中采集离子效率是高的。但是，在自由喷射膨胀中，气流是由于绝热膨胀而强烈冷却了的，故如有水分子存在，离子将与水分子成簇。在图 2-29（c）中，取样在 Mach 碟之后，离子和分子很快散开，提取和聚焦离子比较困难，但是好处是气体经过碰撞，温度

升高，簇离子的氢键已断裂。

四、簇离子问题

1. 防止簇离子的产生

在 APIMS 中，不可避免地会涉及簇离子形成的问题。在 APIMS 与溶液进样及液相分离技术联用时，由于溶剂的蒸发，在离子源中有溶剂和水蒸气，它们由大气压进入真空区时，由于自由喷射膨胀，迅速冷却，极性分子将与离子簇合。API 仪器的设计采取防止簇离子的生成或破坏簇离子的方法。

如能在引入离子时排除水蒸气等中性分子进入真空系统，则可防止簇离子的生成。使离子与中性分子以相反方向运动可达到这一目的。用干燥气流（通常为氮气）在离子取样孔前形成气帘或反冲，是一种有效的方法（图 2-30）。离子由电场引入取样孔，而氮气流迫使水、中性质点和粉尘离开取样孔。部分氮气将为真空吸入取样孔，携带离子进入真空区。用气帘或反冲气的另一优点是在很大程度上防止堵塞取样孔和污染离子透镜和质量分析器等，使 APIMS 仪器耐用可靠。

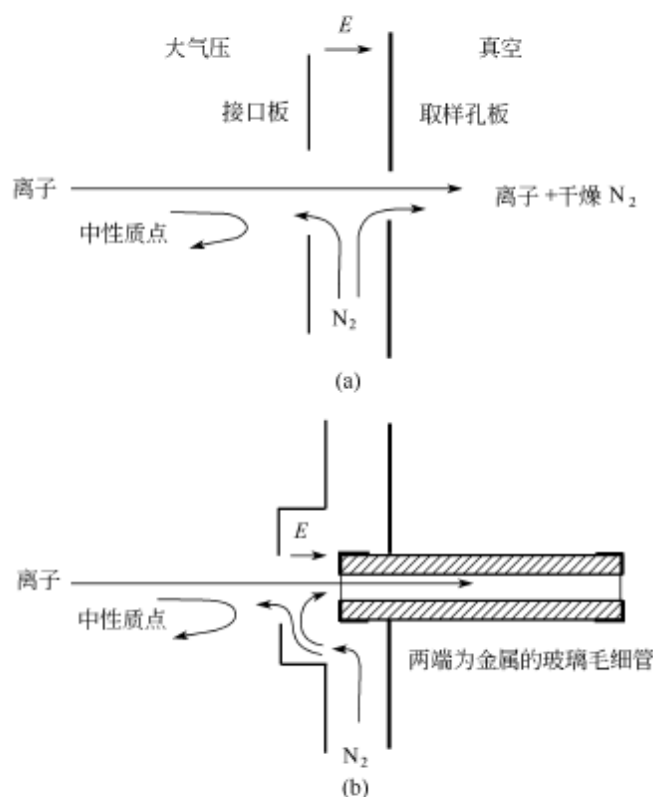


图 2-30 防止簇离子的形成和堵塞取样孔的方法
(a) 气帘；(b) 逆向气流

如离子源是加热的，气体温度在绝热膨胀降温后，仍能保持足够的温度，则簇合物可避免。

另一种在自由膨胀之前加热离子和蒸气混合物的方法为用加热毛细管传输系统。加热毛细管也有助于带电雾滴的去溶剂。

2. 剥离簇离子上的溶剂分子

气体和离子通过膨胀向真空扩散时，气体密度迅速下降，离子在低密度区 ($10^{-3} \sim 1$ Torr) 为电场所加速。这一区域可在取样孔和取样锥之间或取样孔和第一个离子光学元件之间。此处，簇合物与随机运动的背景气碰撞而被“加热”，可导致氢键的断裂，这就是用碰撞诱导解离 (collision induced dissociation, CID) 技术去簇合的方法。

如果加速电场较高，不仅剥离溶剂分子，而且也导致样品离子的裂解，这种由样品离子生成碎片离子的技术称为源内 (in-source) CID。这种方法更恰当的名称为前方 (up-front) CID，即刚刚离开离子源进入低压区，在取样孔 (nozzle, N) 和取样锥 (skimmer, S) 之间，用 ΔV (N-S)，或者在取样锥和

只有射频的 (RF-only) 四极 (quadrupole, Q) 或多极之间, 用 ΔV (S-Q) 加速离子使之与背景气体碰撞发生裂解的过程。用这种方法产生的碎片离子可非常有效地迁移至质量分析器。其突出优点是简便, 只需调节一个电压, 不需切换和调节碰撞气和调节离子光学。当然, 不能选择母离子。温和的 CID 可降低背景离子的丰度, 是又一个突出的优点。在 LC/MS 和 CE/MS 中, 在总离子流中由背景离子产生的基线噪声, 是个严重问题。随着 ΔV (N-S) 的增加, 质量较大的离子, 尤其是蛋白质离子的传输效率将增加, 而不至于裂解, 这是因为碰撞能分配在大量的振动自由度上。这在 APIMS 的实验中是一个需要优化的参数, 以提高检测灵敏度, 尤其是对分子量较大的化合物, 此时, 通常需提高 ΔV 。

五、在取样孔和质量分析器之间的离子光学

在取样孔和取样锥之间的区域, 离子在气体的自由喷射膨胀中迁移。部分的离子束和气体经取样锥进入下一级真空。在这一区域, 有效地聚焦离子成窄的离子束是不可能的, 但是, 如在取样孔和取样锥之间加一管状电极或环电极, 可将离子驱使至靠近轴向, 从而使灵敏度增加 2~5 倍。

在取样锥之后的压力较低, 但真空度仍然不够, 不能用离子透镜进行聚焦。RF-only 四极、六极或八极是最常用的将离子导入质量分析器的元件。离子与背景气的碰撞, 使离子集中在多极的轴向通路上。离子经碰撞减速, 能量分布仅几个电子伏特。从只有射频的多极转移至质量分析器是比较容易的, 且聚焦在很大程度上与离子的质量无关。

六、仪器调谐和质量坐标的校准

如第一章中所述, 质谱仪在安装调试和使用过程中, 需要对仪器的分辨率、灵敏度和质量 (m/z) 坐标等进行调整。在 GC/MS 中, 常用全氟三丁胺 (PFTBA) 作校正物。在 APIMS 中, 由于质量范围很宽。因此, 在质量坐标校准时, 希望有一系列校正物离子, 在仪器质量范围内均匀分布。聚乙二醇 (polyethylene glycols, PEG) 和碘化钠 (NaI) 是常用的调谐和校正物。

PEG 是合成聚合物, 其重复单元是 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ 。PEG 有不同的规格, 按其平均分子量, 常用的有 PEG 200、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 2000、PEG 3000、PEG 4000、PEG 6000 等。用乙腈-水 (50 : 50) 作溶剂, 以 ESI 方式, 主要生成一系列相差 44u 的 $\text{PEG} + \text{Na}^+$ 离子, 也有 $\text{PEG} + \text{H}^+$ 、 $\text{PEG} + \text{K}^+$ 离子, 还可能有 $\text{PEG} + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}^+$ 等。如溶液中加入适量甲酸或乙酸铵, 可增加 $\text{PEG} + \text{H}^+$ 强或生成 $\text{PEG} + \text{NH}_4^+$ 离子的强度。必要时将不同规格的 PEG 混合, 以产生分布范围宽、强度比较接近的校正物离子。

用 NaI, 用其簇离子 $\text{Na}^+(\text{NaI})_n$ 或 $\text{I}^-(\text{NaI})_n$ 作为校正物, 后者常用于负离子方式质量校正。

在生物质谱中, 也可用生物分子 (如氨基酸、肽、蛋白质、糖和核苷酸等) 作校正物质。

有的厂商还为其仪器提供专用的调谐和校正液, 以自动调谐和校正质谱仪。

PEG 和 NaI 生成的校正物离子的准确质量见本书附录。

七、质量分析器

各种质量分析器的原理和结构等请参阅王光辉编著的本丛书之《有机质谱仪器》分册及第一章中有关系统的配置部分。下面的讨论主要涉及用 API 离子源与 HPLC、CE 等联用的质谱仪的性能特点。每种质谱仪均有其自身的优点和缺点, 没有一种仪器可充分满足各种应用, 因此, 选用何种仪器, 取决于主要应用领域。

1. 四极质谱仪 (quadrupole mass spectrometer)

至今, 四极质谱仪与其它质谱仪相比较, 仍然是应用得最为广泛 LC/APIMS 仪器。

单级四极质谱仪的主要优点是相对可靠、优良的性能价格比。适合于定性、定量分析。四极质谱仪主要缺点是得到的是低分辨质谱, 只有在测定的成分是纯的且没有化学背景杂质与之重叠时, 才有可能测定准确质量。

用单级四极质谱仪作定量分析采用选择离子监测 (selected ion monitoring, SIM)。检测限取决于能否将目标化合物与样品中的其它成分 (包括背景干扰) 加以区别。虽然单级四极质谱仪没有 MS/MS 功能, 但用源内 CID 具有使离子诱导裂解的“准 MS/MS”功能。

如果需要 MS/MS 功能以进行化合物结构分析或用选择反应监测 (selected ion reaction monitoring, SRM) 以提高选择性及定量分析检测限, 应采用三重串联四极质谱仪 (triple quadrupole mass spectrometer, TQMS)。在 TQMS 中, 最简单, 也是最常用的形式是第一级四极 (MS-1) 用于前体离子选择, RF-only 四极作为 CID 区, 最后一级四极 (MS-2) 分析产物离子。至今, 用 LC/ESIMS 进行复杂成分的定量分析时, 如药物代谢动力学研究, TQMS 仍然是首选的仪器。

TQMS 具有多种 MS/MS 功能, 除上述产物离子扫描外, 还有前体离子扫描和恒定中性丢失扫描。TQMS 的 CID 是低能过程, 能量在 10~100eV 范围。因为低能 CID 对操作条件较敏感, 故不同的仪器所得的产物离子质谱的重现性较差。但是, 与离子阱质谱所得的产物离子光谱比较, 较少发生重排和

离子-分子反应产生的（假象）。

2. 扇形磁场质谱仪 (magnetic sector mass spectrometer)

这是高分辨仪器，用于准确质量测定和高分辨选择离子监测。对于复杂样品，如环境污染分析，高分辨 SIM 可提高对目标化合物的选择性和减少背景干扰。分辨率取决于狭缝宽，故提高分辨率将导致灵敏度下降。此外，对于扫描质谱仪，灵敏度也取决于离子的采样速率。在与色谱技术联用时，需要较高的采样速率，这也限制了扇形磁场质谱仪的应用。

串联扇形场质谱仪有联动扫描、高能 CID 的性能。碰撞能量为 kV 级，故信息丰富，对实验条件的变化相对不敏感，重现性较好。

3. 傅里叶变换离子回旋共振质谱仪 (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer, FTICRMS)

傅里叶变换离子回旋共振质谱仪，简称傅里叶变换质谱 (FTMS)。将 ESI 源和 FTICRMS 的优点结合在一起，ESI/FTICRMS 是一种强有力的研究工具。FTICRMS 有很高的分辨率，可以达到很好的质量准确度。对蛋白质的多电荷分子和碎片离子能达到同位素分辨，因而易于确定离子的电荷数，使大的生物分子的 MSⁿ 数据的解析成为可能。因而，ESI/FTICRMS 的高分辨率和多级质谱功能是研究高分子量化合物所必需的。FTICRMS 信号取决于离子的数目，在分析池接受板（检测板）上形成象电流。象电流延续时间越长，即信号检测的时间越长，分辨率越高，同时，灵敏度也越高。这与扫描仪器不同，扫描仪器的分辨率和灵敏度是相互矛盾的。FTICRMS 的一个基本问题是空间电荷效应 (space-charge effects)，即离子间的静电斥力。分析池中离子的数目越多，信号检测时间越长，空间电荷效应的影响越严重，将导致离子（尤其是低丰度离子）的丢失、峰形变坏、质量位移和其它问题。ESI 有助于克服这些问题。生物大分子的 ESI 生成多电荷离子，故产生较强的象电流，因而有较高的灵敏度。离子与离子间的排斥大为降低，因为许多电荷是处在单个离子上。一个特例是，用 FTICRMS 检测了单个离子，这是因为在这个离子上带了很多电荷。

FTICRMS 和下面要讨论的四极离子阱中，进行多级质谱实验常称之为“时间串联”，与四极质谱仪和扇形磁场质谱仪的“空间串联”不同。在 FTICRMS 和四极离子阱中，MS/MS 实验是通过对捕获的离子进行一系列操纵实现的。这些操纵包括离子的排斥（如用于选择前体离子等），离子的激发（增加动能以实现 CID）和离子的检测。

FTICRMS 是 ESI 和基质辅助激光解吸离子化 (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI) 良好的质量分析器。通常，ESI 为外离子源，将 ESI 产生的离子用四极杆或静电透镜导入 ICR 分析池，FTICRMS 需采用超

导磁场及高真空，硬件、软件均较复杂等，使这种仪器费用较高，对操作者的要求也较高，主要用于研究实验室。

4. 四极离子阱质谱仪 (quadrupole ion trap mass spectrometer)

FTICRMS 是“静态”离子阱，离子的捕获是静磁场和加在分析池阱板上的低直流电压共同作用下实现的，而四极离子阱，常简称为离子阱，是“动态”离子阱，用加在离子阱环电极上的射频电场捕获离子。四极离子阱也能进行 MSⁿ 实验，同样对捕获的离子进行一系列的操纵。四极离子阱体积很小，费用较低，使之广泛用于 LC/MS，尤其是蛋白质组学研究。

与 FTICRMS 不同，四极离子阱质谱仪通常以选择性不稳定扫描方式工作。ESI 产生的离子在外离子源中产生，再注入离子阱并积累。然后，用类似于 FTICRMS 的技术操纵已捕获的离子。不同的是离子阱通常以轴向不稳定扫描方式检测离子。扫描时，离子从小到大依次排斥，通过端盖上的小孔，在电子倍增管中产生信号。由于离子的积累和用电子倍增管检测离子，故灵敏度较高。影响检测限的主要因素是离子导入和捕获的效率，以及操作有效周期。离子在注入和捕获过程中也会损失。

离子阱质谱仪的动力学范围取决于离子阱可能捕获的最大离子数和可以检出的最小离子数。空间电荷效应随捕获离子数的增加而增加，引起质量坐标的偏移，因此，应控制导入的离子总数。

离子阱质谱仪是低至中分辨率仪器。慢扫描“zoom scans”可提高分辨率，确定多电荷离子的电荷数。由于空间电荷效应和其它电场的影响，质量坐标偏移，故难以进行准确质量测定。

在离子阱中，CID 是用激发波形，选择前体离子并使之在碰撞气中加速和减速而完成的。缓慢和缓和的低能碰撞效率较高，但离子发生重排的倾向优先于单键裂解。产物离子光谱通常由几个丰度较高的离子所组成，缺少低质量端的信息。所以，为了进行结构分析 MSⁿ 的实验常常是必需的。由于在长时间的捕获过程中，倾向重排反应和可能发生离子-分子反应，产生假象，故对未知物的产物离子光谱的解析应当谨慎。在蛋白质组的应用中，通过数据库检索，可减小这个问题的影响。因为，知道了肽的分子量和由几个关键碎片所得的部分序列信息，就可能鉴别蛋白质。

定量分析不是离子阱质谱仪的强项，这是因为这种仪器的动力学范围有限，加之在捕获期间，离子-分子、离子-离子相互作用的发生，进一步对定量造成不利影响。

由于仪器小巧、低价位、较高的灵敏度和 MSⁿ 功能，故四极离子阱质谱仪适合于目标化合物分析和肽及蛋白质定性。

上述四极离子阱与四极质量过滤器不同，前者形成的是三维四极场，而后

者为二维四极场。近来,又有了二维离子阱。与三维离子阱相比较,二维离子阱由于离子贮存体积的增加,降低了空间电荷效应;由于较高的捕获效率,提高了自外部注入离子的仪器的灵敏度。如果将二维离子阱作为三重四极质谱仪的最后一个四极质量分析器,这种仪器将兼有三重四极质谱仪和离子阱的各种功能。

5. 飞行时间质谱仪 (time-of-flight mass spectrometer, TOFMS)

飞行时间质谱仪和 FTICRMS、离子阱质谱仪都属于脉冲工作仪器。但是,TOFMS 早期是一种低分辨仪器,随着快电子和实验室计算机以及离子脉冲引出技术的发展,飞行时间质谱仪得到了新生。现在,MALDI/TOFMS 和 ESI/TOFMS 快速增长。ESI/TOFMS 采用正交加速 (orthogonal acceleration, OA) 离子导入技术。在垂直于 TOFMS 的轴向,将连续离子束用门控技术变为脉冲离子束,加速进入质量分析器。这种方法有效地克服了由于离子的空间分布、动能分布等造成的分辨率下降,反射式 TOF 进一步提高了分辨率。商品 ESI/TOFMS 分辨率已达 5000 或更高,可以进行准确质量测定。TOFMS 所用的检测器为微多通道板 (multiple channel plate, MCP),通常用时间-数字转换器 (time to digital conversion, TDC) 记录质谱图。

TOF 仪器与扫描质谱仪不同,它平行记录所有离子,所以其有效周期 (duty cycle) 较扫描仪器大得多,但是,ESI 连续的离子流需经调制器用高频脉冲电压引出,故有效周期远低于 100%。这是因为为了避免质谱重叠,下一推斥脉冲只有在最慢的离子到达检测器后才能开始。TOFMS 是最快的质量分析器,某些仪器每秒可获得 100 张质谱。

ESI/TOF 采用 TDC 记录信号是因为信号低,尤其是在 MS/MS 方式时,可达到好的信噪比。但是,MCP 和数字转换器有饱和及死时间问题,造成强质谱峰的峰高降低 (因而线性范围较低) 并在质量坐标上左移,需用适当的方法加以校正。除此之外,质量校正的漂移常常是由于温度改变造成的,因为电源输出和飞行管的长度与温度相关。一般温度改变 1°C , 电源变化约 25×10^{-6} , 而不锈钢的温度系数是 $18 \times 10^{-6}/^{\circ}\text{C}$ 。所以,测定待测物质的准确质量宜用内标,或者用双 ESI 喷口,将样品和校正物质同时或分别喷入离子源 (lock spray), 以免将样品和内标加在一起,导致可能的相互抑制。

为了尽可能避免上述死时间问题,有的 TOFMS 仪器的数据采集用模-数转换技术 (ADC),以提高线性范围及质量测定的准确度。同时,用低膨胀率的合金制造飞行管并加真空夹套,高压电源采用温度控制,以减少温度变化造成的质量坐标的漂移。

6. 杂交系统

杂交系统是将不同的质量分析器结合在一起。例如将四极质谱仪和 TOF

结合,称 QTOF,可以看作是将三级串联四极质谱仪的最后一级四极换为 TOF 分析器。进行 MS/MS 分析时,第一级四极选择一个前体离子,然后加速至一定能量(如 20~200eV),再进入只有射频的四极(或六极)碰撞池与惰性气体碰撞而碎裂(CID 过程),生成产物离子,这些离子经再加速和聚焦成平行的离子束后连续进入 TOF 分析器的离子调制器(加速区),此处,在其垂直方向加以几千赫的高压脉冲场,将离子推入 TOF 无场漂移区,按其质荷比进行分离。

QTOF 系统在与 LC 或 CE 联用系统中取得了很大的成功。一些新的杂交系统也已问世,如将二维线性离子阱作为三级串联四极质谱仪的 MS-2,已如前述。或者和 FTICRMS 或 TOFMS 的结合,是新型的强有力的与 LC 或 CE 联用分离分析工具。

八、准确质量测定

气相色谱-质谱联用主要采用电子轰击离子源(EI)及低分辨单级四极质谱仪作化合物定性、定量分析。对化合物进行鉴定时可利用已经建立的化合物的质谱数据库,如 NBS、EPA/NIH Mass Spectral Data Base 和 Wiley Registry of Mass Spectral Data 等,这就是人们常说的“标准质谱库”。这些谱库收集的电子轰击质谱,已有几十万张图谱,涉及几十万个化合物。电子轰击(EI)质谱中除了分子量信息外,富有结构信息。可以随仪器订购“标准质谱库”及其软件,以通过谱库检索鉴别待测化合物。检索程序通常用“概率匹配”(probability-based matching, PBM),匹配率越高(最高为 100),待测物质的鉴定越可靠。还有一些专业质谱库,如药物、药物与代谢物、环境污染等。

液相色谱-质谱联用时,采用 API 技术,主要生成以准分子离子为主的质谱,缺乏结构信息,所以“标准质谱库”的建立并非必要。为了得到结构信息,可用 CID 和 MS/MS 技术,但是,同一化合物,用不同的仪器,所得 CID 谱不尽相同,难于标准化,因此,也没有商品“标准质谱库”。有些实验室建立了自己的 ESI/CID/MS 数据库,有一定参考价值。因此,LC/MS 应用中,在进行化合物鉴定时,高分辨质谱、准确分子量测定显得更为重要。

1. 准确质量和元素组成

如果离子质量测定的准确度足够高,则可以得到该离子确定的元素组成。对于未知物分析,这个方法非常重要,常常称为“高分辨质谱”。其实,仪器的分辨率和质量测定的准确度显然是两个不同的概念。但是,通常,质谱的准确质量测定是以高分辨率为前提的。如果仪器的分辨率不高,不能分离名义质量相同而准确质量稍有差别的离子,则质谱测定的是由不同离子重叠而成的质

谱峰的质量。为了进行准确质量测定,首先应对仪器进行调谐。质量坐标的校正,需要使用校正物,通常调谐物也是校正物,参见本节六。测定待测物质的准确质量可用外标法或内标法,通常内标法测定结果比较准确。但是,在ESI/MS中,如将样品和校正物加在同一溶液中,则待测物质与校正物之间可能发生离子化抑制效应。所以,可采用双喷口技术,将样品溶液和校正物溶液分别从各自的喷口中喷入离子源,如本节七、(五)中所述。

因为每个元素均有特定的准确质量,因此,如能准确测定离子或分子的质量,就可以计算其元素组成。例如 $C_{13}H_{24}$ 和 $C_{12}H_{22}N$ 的质量分别为180.1753u和180.1879u,相差0.0126u,为了分离这两个化合物,仪器的分辨率 $m/\Delta m$ 应为14300。为了区分它们,质量测定应准确到至少5位有效数字。但是,随着待测物质质量的增加,由各种元素组合成该质量的可能性迅速增加,而且其中某些组合的质量的差别可能很小,因此,对仪器的分辨率及质量测定的准确度的要求更高。

用质谱仪的应用程序,根据仪器测定的质量及离子或分子中可能存在的元素,可计算出在一定测定误差范围内分子或离子的各种可能的元素组成,即实验式。用准确质量计算元素组成时,不能忽略电子的质量。质量测定的误差越小,可能的元素组成越少。确定待测物质的实验式或元素组成时,应考虑质谱法及其它理化方法提供的各种信息。

高分辨质谱法也提高了目标化合物筛选和定量测定的选择性。

2. 不饱和度

如果分子或碎片的元素组成已知,可计算其不饱和度,包括环、双键和叁键,故又称双键相等数(double bond equivalents, DBE)。

设分子式的通式为 $C_xH_yN_zO_n$,则:

$$DBE = x - \frac{1}{2}y + \frac{1}{2}z + 1$$

卤素等取代一个H的元素计作H,S计作O,P计作N,Si计作C。

在质谱法中,此式只适用于分子离子。例如, CH_3^+ 比 CH_4 少1个氢,故导致DBE出现半整数。同理,由 $M+H^+$ 计算所得的DBE应加0.5; $(M-H)^-$ 计算得到的DBE应减去0.5。

3. 同位素丰度

绝大多数元素在自然界以同位素混合物存在。天然的碳是98.90%的 ^{12}C 和1.10%的 ^{13}C 的混合物。由于元素的同位素的存在,所以质谱峰呈现为同位素峰簇,是各种元素及其同位素组成的表现,它们提供了另一重要性息。在质量测定的准确度有限时,根据同位素丰度数据有可能限定元素组成。例如,

$C_{10}H_{20}$ 和 $C_8H_{12}O_2$ 的名义质量均为 140u，而其在 m/z 141 处的同位素峰相对于 m/z 140 峰的强度分别为 11% 和 8.8%，这是由 ^{13}C 存在的概率所确定的，因而可区分这两个离子。应该注意低丰度同位素峰的测定误差较大，还可能与其它成分的离子与之重叠，所以实际应用有限。

计算同位素峰簇的理论相对丰度已有计算程序：

<http://www.sisweb.com/mstools.htm>

根据准确质量及误差范围计算了可能的元素组成后，按照相关的知识和信息，可以推定该成分的分子式。此时，应计算该实验式的理论同位素丰度比并和测得的该化合物的质谱的同位素峰进行比较，如实测同位素丰度比与理论值一致（在一定的误差范围内），则该待测成分的分子式通常可以确定。

4. “氮规律”，奇电子离子，偶电子离子

一般分子含有偶数电子，但有极少数例外，如 NO。在质谱中，观察到的离子既有具偶数电子的，也有具奇数电子的。

在普通化学计算中，原子量用的是其同位素混合物的平均相对原子质量，如二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 的相对分子质量为 $12.01 + 2 \times 1.00 + 2 \times 35.45 = 84.91$ 。在质谱中，二氯甲烷 CH_2Cl_2 的相对分子质量（以名义质量计）为 $12 + 2 \times 1 + 2 \times 35 = 84$ ，质谱中同位素峰已分离，计算是基于丰度最高的同位素峰 $CH_2^{35}Cl^{35}Cl^+$ 。在 CH_2Cl_2 的质谱中，除了 m/z 84 的峰外，在 m/z 86 处有强度相当于 m/z 84 的 64.8% 的 $CH_2^{35}Cl^{37}Cl^+$ 峰。

通常，有机化合物由 C、H、O、N、S、P 和卤素组成。下面的讨论仅限于这些元素组成的化合物（不包括同位素标记化合物）且以名义质量计算。分子量的计算是基于丰度最高的同位素的原子量，即单同位素原子量。

氮规律指出：含偶数氮原子或不含氮原子的分子其分子量为偶数。这是因为氮的质量是偶数（14），价态为奇数；而其它元素的质量和价态要么均为偶数，要么均为奇数。

在质谱中，氮规律指出：不含氮或含偶数氮原子的任何离子，如含奇数电子（游离基阳离子或游离基阴离子），其质量应为偶数；反之，若为偶电子离子（阳离子或阴离子），其质量应为奇数。

或者，含奇数氮的离子，如为奇电子离子，其质量应为奇数；如为偶电子离子，其质量应为偶数。

准确质量、元素组成、双键相当、同位素丰度比及氮规则在化合物鉴定时十分重要。

其它质谱技术，如数据采集、定量分析、扫描方式等，请参考本书第一章第六节中的质谱技术。

第五节 应用及有关原理与技术

本丛书中另有一些分册专门介绍了有机质谱在生物医药、石油化工、环保毒物等各个方面的应用。在这一节中,结合典型实例讨论生物分子的正负离子质谱及分子量测定、质量肽图谱与氨基酸序列分析;合成药物、抗生素、中药和天然药物、药物动力学研究以及二维液相色谱和质谱联用技术在蛋白质组研究中的应用等原理与技术。

一、肽和蛋白质

1988年,John Fenn教授在美国质谱学年会上发表了用ESI和低质量范围的四极质谱仪分析从胰岛素至40kDa醇脱氢酶等一系列的肽和蛋白质得到的ESI质谱。接着,Fenn等在“Science”上发表了ESI/MS分析生物大分子的论文。从此,ESI/MS迅速在各个领域得到了广泛应用。2002年,Fenn教授因为这一贡献获得了诺贝尔化学奖。

在ESI/MS中,多肽及蛋白质得到的主要是多质子化的分子,即多电荷离子,一般没有碎片离子。分子中可质子化的位点的数目是影响ESI/MS观测到的多电荷离子的主要因素。对于大多数化合物,在水溶液中,pH<4时,最大的电荷数和碱性氨基酸残基的数目间存在近乎线性的关系。

由于分析时所用的溶剂和添加剂不同,观测到的分子离子种类(molecular ion species)有 $(M+H)^+$ 、 $(M+Na)^+$ 、 $(M+K)^+$ 、 $(M+NH_4)^+$ 、 $(M+X)^+$,X为溶剂或缓冲剂阳离子;在高浓度时,有 $(2M+H)^+$ 、 $(M+H+S)^+$ 等,S为溶剂分子。

(一) 生物分子的ESI正负离子质谱及平均分子量计算

如果仪器的分辨率对蛋白质生成的多电荷离子不能实现同位素分离,则测得的是平均质量,而不是单同位素质量。

对于蛋白质的正离子ESI/MS,测定其平均分子量(M_r)是基于两个假定:①系列中的相邻峰相差1个电荷;②电荷是由于阳离子的加成(通常为质子)所致。因而,图2-31中每一个峰代表蛋白质分子加上一定数目的质子所形成的离子,即 $(M_r+nH)^{n+}$ 。

H 为质子的质量(1.0079)。

质谱仪测得每一个质谱峰的质荷比 m 为:

$$m = \frac{M_r + nH}{n}$$

如 n 已知,则易于计算其平均分子量:

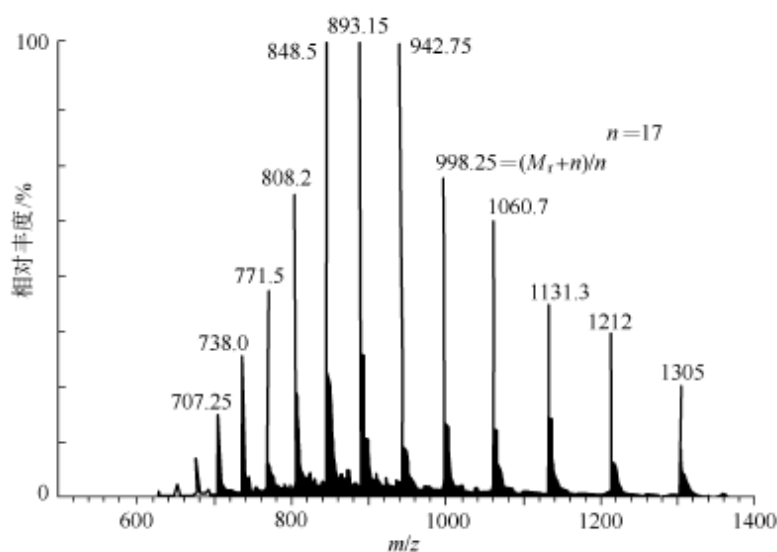


图 2-31 马肌红蛋白的 ESI/MS

M_r —理论值 = 16950.7;

M_r —测得值 = 16951.9 ± 1.7 ;

$\Delta = +0.007\%$

$$M_r = n(m - H)$$

为了确定 n ，可利用任意两个相邻峰：

$$m_1 = \frac{M_r + (n+1)H}{n+1}$$

$$m_2 = \frac{M_r + nH}{n}$$

m_2 和 m_1 为具有 n 和 $n+1$ 个质子的两个相邻峰的质荷比。解上述联立方程得：

$$n = \frac{m_1 - H}{m_2 - m_1}$$

由此可由每一个质谱峰计算蛋白质的平均分子量 [$M_r = n(m - H)$]，取平均值以提高测定的准确度。在上例中，标准偏差为 $\pm 1.7u$ ，相对偏差为 0.007% 。

上述计算过程常称为 deconvolution，有人译为“去卷积”，其实 deconvolution 本义为“去复杂化”，用在不同的场合应有不同的意义。例如，在组合化学法 (combinational chemical methods) 中需要采用高分辨的正交色谱系统 deconvolute 复杂的混合物。显然，此处的 deconvolute 实际意义为分离分析复杂样品。在上述蛋白质平均分子量的计算中，deconvolution 是一种计算程序，由多电荷离子系列的质荷比计算蛋白质的分子量，因此，在此处应译作分子量

求解。相应的计算软件译作求解软件。同样, Robert B. Cody 也认为 deconvolution 是由多电荷离子质谱测定分子量的数学方法, 是将多电荷质谱转换为不带电荷的质谱。他指出 deconvolution 这个字会造成混淆, 以为是 convolution (卷积) 的逆运算。

用上述方法, 利用多电荷离子系列的形成, 就可以用质荷比范围和分辨率有限的常规质谱仪 (如四极质谱仪) 研究高分子量的蛋白质。

如用 ESI/FTICRMS, 则可得到高分辨、高准确度的测定结果, 如图 2-32 所示。

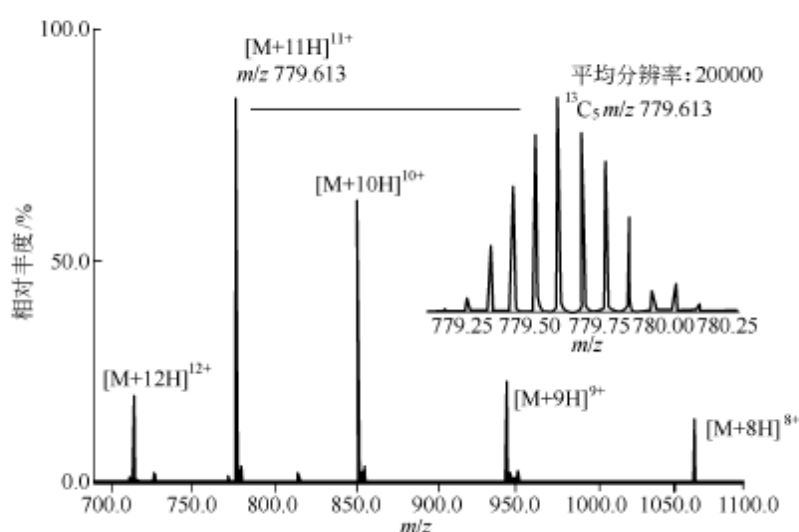


图 2-32 牛泛素的 ESI/FTICRMS

在上述测定中, 平均分辨率达 200000, 由此可分辨 ^{13}C 同位素峰。由于是多电荷离子, 相邻峰相差一个 ^{13}C 的间距 (m/z) 为 $1/n$, n 为离子所带电荷。因此, 可由图谱直接确定离子的电荷数。如图中 m/z 779.613 的峰放大后可见同位素峰得到很好的分离, 峰间距为 0.090909, 故确定该离子的电荷数 $n=11$ 。测得含 5 个 ^{13}C 同位素的质谱峰的 m/z 8564.666 与计算值 8564.631 的误差为 4×10^{-6} 。

ESI/MS 已成功地用于寡核苷酸的分析, 小分子寡核苷酸的负离子质谱的特点是形成 $(\text{M}-n\text{H})^{n-}$ 离子, 电荷数近乎内部和末端磷酸酯的电离最大可能数。计算 M_r 的方法与正离子质谱相似, 离子的质量为分子减去丢失的质量。随着分子量的增加, 即磷酸酯数目的增加, Na 取代 H 的可能性增加, 如生成 $(\text{M}-11\text{H}+\text{Na})^{10-}$, 如图 2-33 所示。如分辨率足够, 则 M_r 的测定相似于蛋白质的正离子谱所得的准确度。对于较大的核苷酸, 质谱峰变宽, 导致分辨率下降, 这是由于碱金属取代峰的存在之故。如分辨率不足以区分这些有 Na 取代的峰时, 测得的 M_r 值偏高。

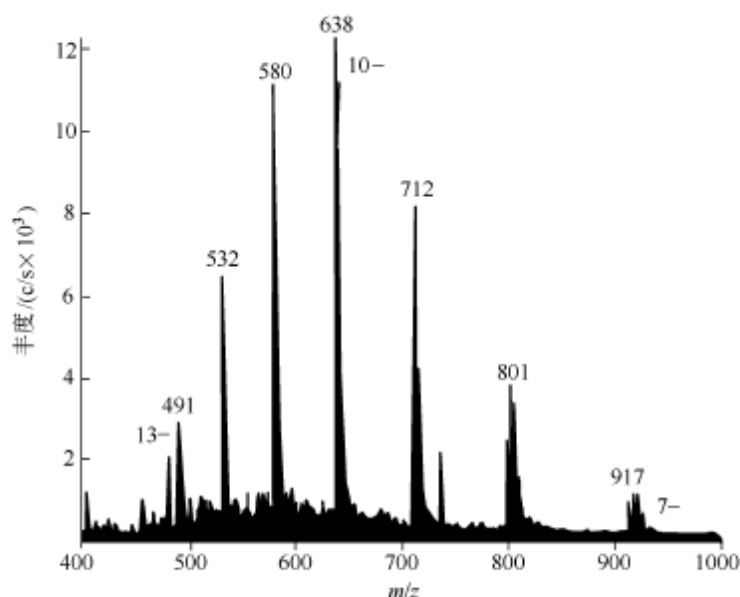


图 2-33 合成去氧核苷酸 [d(AAATTGTGCACATCCTGCAGC)], $M_r=6090$ 的 ESI/MS

(二) 肽的氨基酸序列分析

肽的 $M+H^+$ 用 CID 技术可得到其氨基酸序列信息。其 CID 裂解主要沿着肽键进行, 可得到氨基端 (N 端) 离子 a、b、c 或羧基端 (C 端) 离子 x、y、z。质谱中是 N 端还是 C 端离子为主, 取决于电荷的位置是在 N 端还是 C 端。低能碰撞主要产生 y 和 b 离子, 如图 2-34 所示。

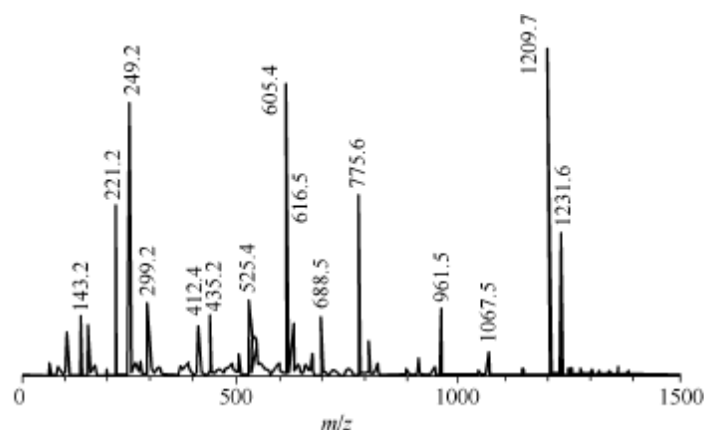


图 2-34 肽的 CID 裂解

1. 醋酸亮丙瑞林的序列分析

醋酸亮丙瑞林 (leuporelin acetate, LPA) 为合成九肽, 是强效促性腺激素释放激素激动剂, 临床上用于激素依赖性肿瘤的治疗。LPA 氨基酸序列为 焦谷-组-色-丝-酪-亮-亮-精-脯-乙基酰胺 (用 pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Leu-Leu-

Arg-Pro-NHC₂H₅ 或 pE-H-W-S-Y-L-L-R-P-NHEt 表示), 该药物为两端封闭的多肽, 不能直接用 Edman 降解法对其进行序列分析。可用 ESI/MS 测定其分子量, 运用源内碰撞诱导解离技术得到一系列 y 离子及部分 b 离子 (见图 2-34, 表 2-6 和表 2-7), 直接得到其序列信息, 不需对样品进行预处理。

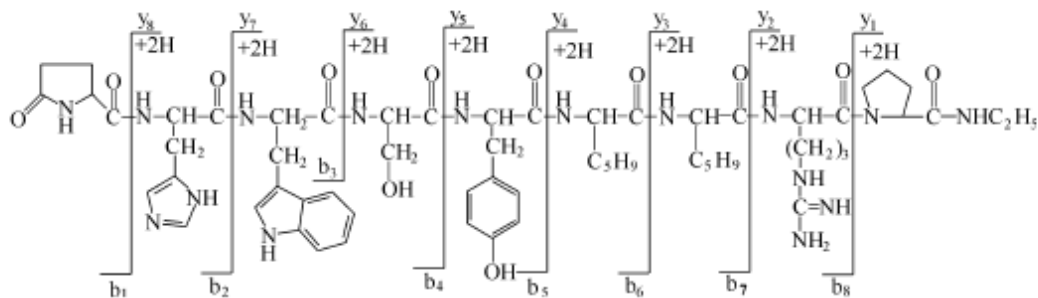


表 2-6 LPA 的 y 离子

碎片离子	氨基酸序列和实验式		计算值 m/z	测得值 m/z
(M+H) ⁺	pEHSYLLRPNH	C ₅₉ H ₈₅ N ₁₆ O ₁₂	1209.65	1209.65
y ₈	HWSYLLRPNHEt	C ₅₄ H ₈₀ N ₁₅ O ₁₀	1098.62	—
y ₇	WSYLLRPNHEt	C ₄₈ H ₇₃ N ₁₄ O ₉	961.56	961.55
y ₆	SYLLRPNHEt	C ₄₂ H ₆₅ N ₁₀ O ₈	775.48	775.60
y ₅	YLLRPNHEt	C ₃₄ H ₅₈ N ₉ O ₆	688.45	688.60
y ₄	LLRPNHEt	C ₂₅ H ₄₉ N ₈ O ₄	525.39	525.40
y ₃	LRPNHEt	C ₁₉ H ₃₈ N ₇ O ₃	412.30	412.40
y ₂	RPNHEt	C ₁₃ H ₂₇ N ₆ O ₂	299.22	299.20
y ₁	PNHEt	C ₇ H ₁₅ N ₂ O	143.12	143.20

注: —表示未测得。

表 2-7 LPA 的 b 离子

碎片离子	氨基酸序列和实验式		计算值 m/z	测得值 m/z
b ₁	pE	C ₅ H ₆ NO ₂	112.04	—
b ₂	PEH	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃	249.10	249.20
b ₃	PEHW	C ₂₂ H ₂₃ N ₆ O ₄	435.18	435.20
b ₄	PEHWS	C ₂₅ H ₂₈ N ₇ O ₆	522.21	522.20
b ₅	PEHWSY	C ₃₄ H ₃₇ N ₈ O ₈	685.27	—
b ₆	PEHWSYL	C ₄₀ H ₄₈ N ₉ O ₉	798.36	—
b ₇	PEHWSYLL	C ₄₆ H ₅₉ N ₁₀ O ₁₀	911.44	—
b ₈	PEHWSYLLR	C ₅₂ H ₇₁ N ₁₄ O ₁₁	1067.54	1067.50
(M+H) ⁺	pEHSYLLRPNH	C ₅₉ H ₈₅ N ₁₆ O ₁₂	1209.65	1209.65

关于用 CID 技术测定肽的氨基酸序列的方法将在下一应用实例中进一步讨论。

2. 生长抑素 (somatostatin, ST) 的序列分析

生长抑素广泛存在于人体的内分泌及外分泌系统中, 它不仅具有抑制生长激素分泌的作用, 而且表现出对胃、肠、胆、胰内外分泌以及胃肠运动的抑制

效应，临床上用于各种原因引起的急性上消化道出血、重症胰腺炎、胰腺术后合并症以及腹部痿的治疗。生长抑素是由 14 氨基酸组成的肽，两个半胱氨酸之间形成一个双硫键，可从下丘脑分离，亦可人工合成，其氨基酸序列为丙氨酸-甘氨酸-半胱氨酸-赖氨酸-天冬氨酸-苯丙氨酸-苯丙氨酸-色氨酸-赖氨酸-苏氨酸-苯丙氨酸-苏氨酸-丝氨酸-半胱氨酸：



分子量与一级结构测定是肽类药物研究的重要环节，也是其生产过程及最终产品质量控制的重要组成部分。可用 ESI/MS 测定其分子量，用 2-巯基乙醇将生长抑素的双硫键还原，运用源内碰撞解离技术得到一系列碎片离子，以测定 ST 的序列。

(1) 质谱测定条件 离子化方式：电喷雾离子化。检测方式：正离子。质量扫描范围： m/z 50~2000。干燥气 (N_2) 流速：9.0 L/min。雾化气 (N_2) 压力：320 kPa。干燥气温度：350℃。毛细管出口电压：4000 V。碎裂器 (fragmentator) 电压：100 V。碰撞诱导解离技术碎裂器电压设为： m/z 50~1300，150 V； m/z 1300~2000，250 V。进样方式：流动注射进样 (FIA)。流动相为甲醇-水 (50 : 50)。

(2) 生长抑素的分子量测定 取生长抑素适量，用甲醇-水 (50 : 50) 溶解，制成浓度约为 1 mg/mL 的溶液，取 0.5 μL 注入质谱仪测定。

(3) 生长抑素还原产物的质谱测定 取生长抑素适量，配制成浓度约为 1 mg/mL 的水溶液，加入 2-巯基乙醇 40 μL ，用氨试液调 pH=8~9，室温放置 1 h，用乙酸调 pH=3 左右，取 1.0 μL 注入质谱仪测定。

(4) 结果与讨论 生长抑素分子量测定的质谱图见图 2-35。

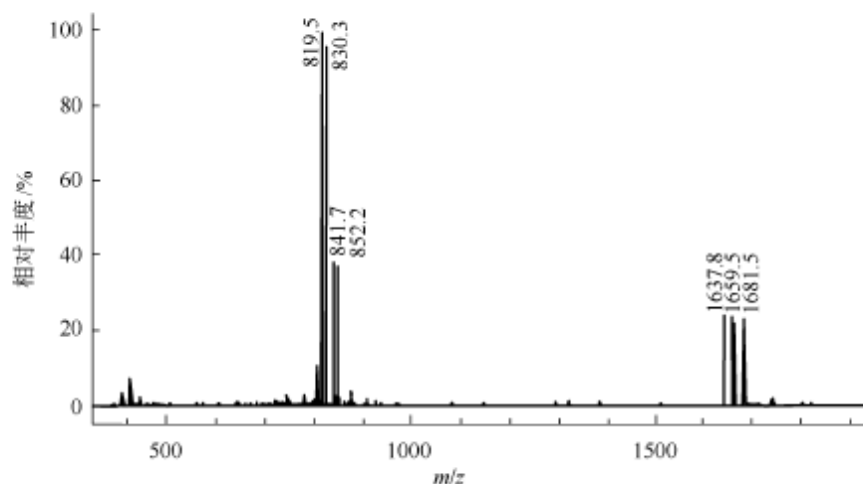


图 2-35 生长抑素的 ESI/MS

图 2-35 中 m/z 1637.8 为 ST 的 $(M+H)^+$ 离子信号, m/z 1659.5 为 $(M+Na)^+$ 离子信号, m/z 1681.5 为 $(M+2Na-H)^+$ 离子信号, m/z 819.5 为 ST 的 $(M+2H)^{2+}$ 离子信号, m/z 830.3 为 ST 的 $(M+H+Na)^{2+}$ 离子信号, m/z 841.7 为 ST 的 $(M+2Na)^{2+}$ 离子信号, m/z 852.2 为 ST 的 $(M+3Na-H)^{2+}$ 离子信号, 这些数据与 ST 分子量为 1636.7 相符。

由于 ST 的两个半胱氨酸之间形成双硫键, 利用源内碰撞诱导解离 (CID) 技术对 ST 进行分析, 不能得到有用的序列信息。用 2-巯基乙醇将 ST 的双硫键还原, 转变为直链肽, 再用 CID 技术进行测定, 可得到准分子离子及一系列 y 和 b 系列的特征碎片离子 (图 2-36)。

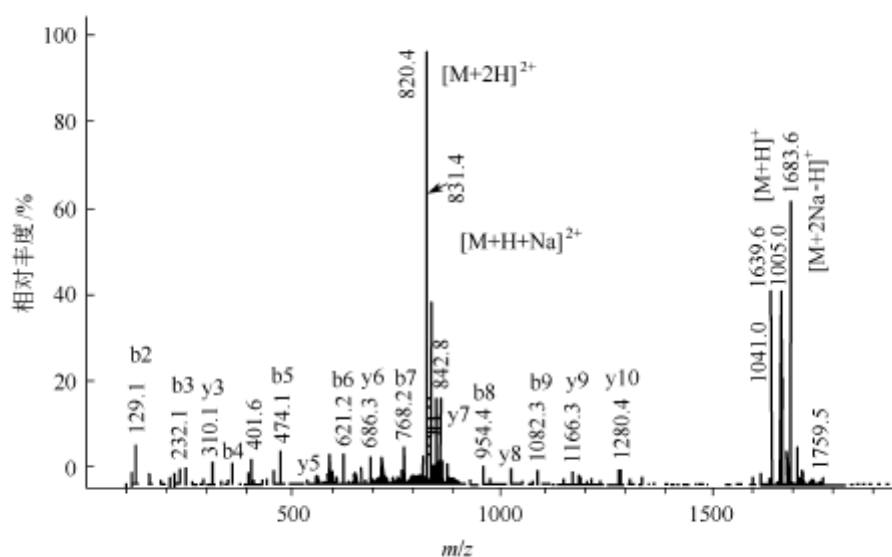


图 2-36 ST 还原物的源内 CID 谱

图 2-36 中 m/z 1639.6 为 ST 双硫键打开所得还原物的 $(M+H)^+$ 离子信号, m/z 1683.6 为 $(M+2Na-H)^+$ 离子信号, m/z 820.4 为 ST 还原物的 $(M+2H)^{2+}$ 离子信号, m/z 831.4 为 $(M+H+Na)^{2+}$ 离子信号, m/z 842.8 为 $(M+2Na)^{2+}$ 离子信号, 这些数据与 ST 双硫键还原物相对分子质量 1638.7 相符。y 和 b 系列的特征碎片离子结果见表 2-8、表 2-9。

由 ST 还原产物的 y 系列及 b 系列离子, 确证了 ST 还原产物氨基酸序列 (从氨基端起) 为:



由此, 可确定生长抑素的一级结构为:

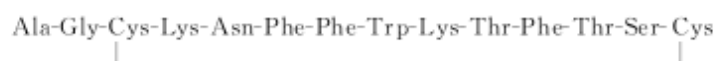


表 2-8 ST 还原物的 CID 产物离子 (y 系列)

碎片离子	氨基酸序列和实验式		计算值 m/z	测得值 m/z
(M+H) ⁺	AGCKNFFWKFTFTSC	C ₇₆ H ₁₀₇ N ₁₈ O ₁₉ S ₂	1639.7	1639.6
y ₁₃	GCKNFFWKFTFTSC	C ₇₃ H ₁₀₂ N ₁₇ O ₁₈ S ₂	1568.7	—
y ₁₂	CKNFFWKFTFTSC	C ₇₁ H ₉₉ N ₁₆ O ₁₇ S ₂	1511.7	—
y ₁₁	KNFFWKFTFTSC	C ₆₈ H ₉₄ N ₁₅ O ₁₆ S	1408.7	—
y ₁₀	NFFWKFTFTSC	C ₆₂ H ₈₂ N ₁₃ O ₁₅ S	1280.6	1280.4
y ₉	FFWKFTFTSC	C ₅₈ H ₇₄ N ₁₁ O ₁₃ S	1166.5	1166.3
y ₈	FWKFTFTSC	C ₄₉ H ₆₇ N ₁₀ O ₁₂ S	1019.5	1019.3
y ₇	WKFTFTSC	C ₄₀ H ₅₈ N ₉ O ₁₁ S	872.4	872.3
y ₆	KFTFTSC	C ₂₉ H ₄₈ N ₇ O ₁₀ S	686.3	686.3
y ₅	TFTSC	C ₂₃ H ₃₄ N ₅ O ₉ S	558.2	558.1
y ₄	FTSC	C ₁₉ H ₂₈ N ₄ O ₇ S	457.2	457.0
y ₃	TSC	C ₁₀ H ₂₀ N ₃ O ₆ S	310.1	310.1
y ₂	SC	C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₄ S	209.1	209.0
y ₁	C	C ₂ H ₄ NO ₂ S	122.0	—

表 2-9 ST 还原物的 CID 产物离子 (b 系列)

碎片离子	氨基酸序列和实验式		计算值 m/z	测得值 m/z
b ₁	A	C ₃ H ₅ NO	72.1	—
b ₂	AG	C ₅ H ₉ N ₂ O ₂	129.1	129.1
b ₃	AGC	C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	232.1	232.1
b ₄	AGCK	C ₁₄ H ₂₅ N ₅ O ₄ S	360.2	360.1
b ₅	AGCKN	C ₁₈ H ₃₂ N ₇ O ₆ S	474.2	474.1
b ₆	AGCKNF	C ₂₇ H ₄₃ N ₈ O ₇ S	621.3	621.2
b ₇	AGCKNFF	C ₃₆ H ₅₀ N ₉ O ₈ S	768.4	768.2
b ₈	AGCKNFFW	C ₄₇ H ₆₀ N ₁₁ O ₉ S	954.4	954.4
b ₉	AGCKNFFWK	C ₅₃ H ₇₂ N ₁₃ O ₁₀ S	1082.5	1082.3
b ₁₀	AGCKNFFWKT	C ₅₇ H ₇₉ N ₁₄ O ₁₂ S	1183.6	1183.2
b ₁₁	AGCKNFFWKTF	C ₆₆ H ₈₈ N ₁₅ O ₁₃ S	1330.6	—
b ₁₂	AGCKNFFWKFT	C ₇₀ H ₉₃ N ₁₆ O ₁₅ S	1431.7	—
b ₁₃	AGCKNFFWKFTS	C ₇₃ H ₁₀₀ N ₁₇ O ₁₇ S	1518.7	—
(M+H) ⁺	AGCKNFFWKFTFTSC	C ₇₆ H ₁₀₇ N ₁₈ O ₁₉ S ₂	1639.7	1639.6

(三) 蛋白质分子量、肽图谱及序列分析

重组蛋白质药物的质量标准包括性状、鉴别、检查、含量或效价测定等,其中,分子量、肽图谱等均可用 ESIMS 分析。如蛋白质纯度较好,没有大量无机盐等干扰物质,可用流动注射分析(FIA)直接进样测定蛋白质溶液(常用含适量甲醇或乙腈的水溶液,加约 0.1% 乙酸)的 ESI 质谱并计算其分子量。“肽图谱”是将蛋白质用适当的酶,在一定条件下,水解为一系列肽的混合物后,用 HPLC/UV 测得的指纹图谱。将供试品的肽图谱与相同条件下测得的标准品的肽图谱比较,以对供试品作鉴别并判断生产工艺等是否稳定。用 LC/ESIMS

测定肽图谱,其总离子流(TIC)轨迹与常规HPLC指纹图相似,由于UV与ESIMS的响应不同,故图谱中的峰相对强度可能不同。LC/ESIMS所得肽图谱常称之为“质量肽图谱”,因为每一色谱峰中成分的分子量可由质谱确定。在此基础上,用源内CID或MS/CID/MS技术,可测定肽图谱中各个由蛋白质酶降解所得的肽碎片的氨基酸序列,进而从头到尾(de novo)“拼装”出蛋白质完整的氨基酸序列。即使未能得到蛋白质完整的氨基酸序列,只有分子量和部分序列信息,通过数据库检索也可能作出鉴别。现以重组L-天冬酰胺酶II的研究为例,说明LC/ESIMS在重组蛋白质药物分析中的应用。

1. 分子量测定

取供试品 $10\mu\text{g}$,溶于乙腈-水-乙酸(50:50:1) $10\mu\text{L}$ 中,进样 $2\mu\text{L}$,用ESI/MS,以FIA方式进行测定,由总离子流提取质谱并用分子量求解软件计算供试品分子量,结果如图2-37所示。测定结果与理论分子量一致。

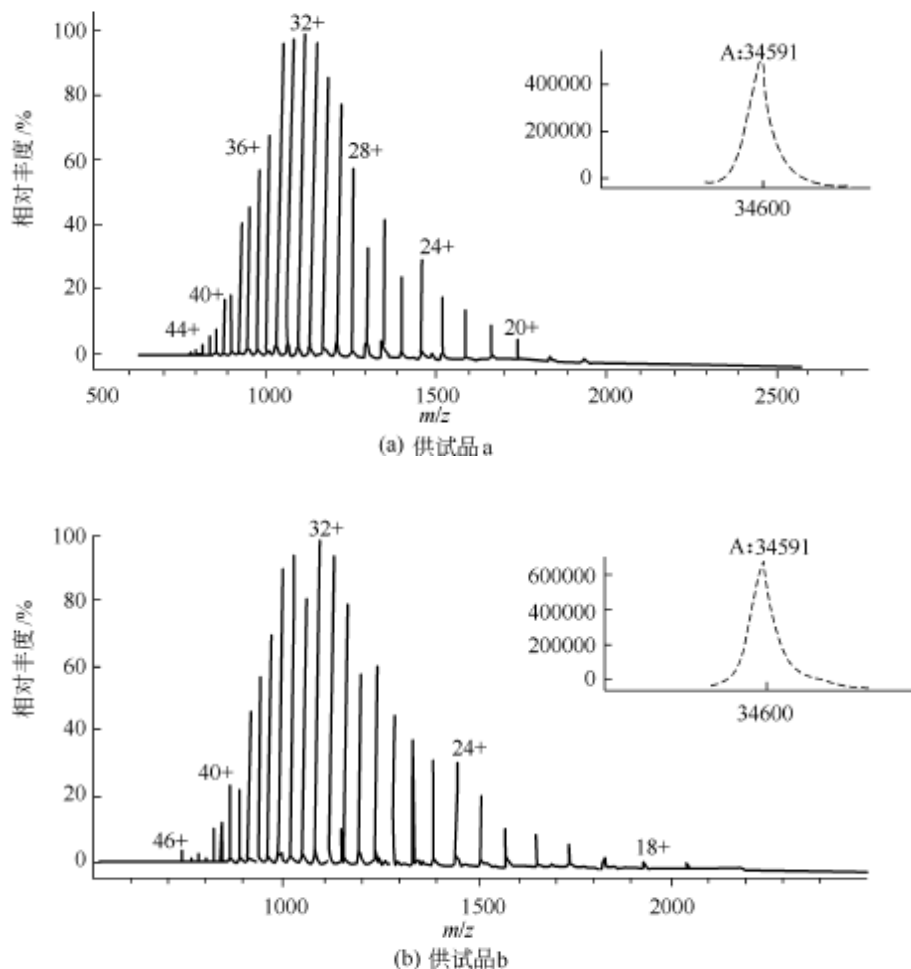


图 2-37 重组 L-天冬酰胺酶 II 供试品 a 和 b 的 ESI/MS 及分子量计算结果(右上角插图)

在进行样品测定前,仪器除了用常规校正物进行质量校正之外,还可用蛋白质标准品进行测定,以验证仪器及测定方法的准确度。

2. 纯度分析

用上述 FIA 测定蛋白质的分子量时,由多电荷离子质谱图及分子量求解软件所示结果,常常可以说明供试品的纯度。图 2-37 说明样品是纯的,只有一组多电荷离子峰及一个计算结果。如样品不纯,含杂蛋白,则图谱中通常会有另外的一组或几组丰度较低的多电荷离子峰及几个计算结果。但是,蛋白质的纯度,通常用 HPLC 方法测定。色谱系统一般用反相色谱柱(如 C_8 , 填料粒度 $5\mu\text{m}$ 及孔度 30nm),乙腈-水-0.1%三氟乙酸(TFA)流动相。梯度洗脱。对于肽和蛋白质,梯度洗脱的保留时间的重现性常较等度洗脱为好。上述供试品 a 和 b 经检验均未检出杂蛋白。

3. 质量肽图谱测定

(1) 蛋白质的酶解 取供试品,约相当于 L-天冬酰胺酶 II 1mg,置 1.5mL 聚丙烯小管中,加水 2 滴,使完全溶解,加 10%三氯乙酸水溶液 1mL,密塞,轻摇,放置 2h,时时振摇,使 L-天冬酰胺酶 II 充分变性、析出,3500r/min 离心 10min,倾去上层液,残留物用少量水多次洗涤至近中性,加 0.1mol/L 碳酸铵溶液(稀氨水调至 $\text{pH}=8.5$) 1mL,振摇,加 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 胰蛋白酶溶液 $10\mu\text{L}$, 37°C 保温 6h,取出,加 TFA $10\mu\text{L}$ 终止反应。

(2) 色谱与质谱条件 色谱柱: Zorbax 300SB C_8 , $5\mu\text{m}$, $2.1\text{mm}\times 150\text{mm}$, 柱温 30°C 。流动相 A: 0.125% TFA; 流动相 B: 乙腈-水(60:40) 内含 0.1% TFA。0~60min, B 0~28%; 60~120min, B 28%~40%; 120~155min, B 40%~64.5%。流速 0.3mL/min。柱后添加 TFA-Fix 修饰剂, 0.12mL/min。检测条件: UV 检测波长 210nm, MSD ESI, 扫描范围 m/z 120~2500, 雾化气压力 320kPa, 干燥气温度 350°C , 流速 13L/min。

(3) 结果和讨论 在上述实验条件下,所得肽图谱如图 2-38 所示。

供试品的酶解前,用三氯乙酸处理是为了使蛋白质变性。实验证明 L-天冬酰胺酶 II 具有抗胰蛋白酶水解的性质,用三氯乙酸使之变性简便易行,以解除其抗胰蛋白酶解的性质。

在上述工作中,需对方法进行验证,包括用标准蛋白试验、空白试验(考察胰蛋白酶的自身水解)等。

在肽图谱中,还可发现供试品的非胰蛋白酶水解片段。这是因为尽管所用的胰蛋白酶是 TPCK(*N*-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone trypsin, *N*-甲苯磺酰-L-苯基丙氨酰氯甲基酮酪氨酸)处理过的,但仍有胰凝乳蛋白酶部分活性,从而产生相应的肽段。

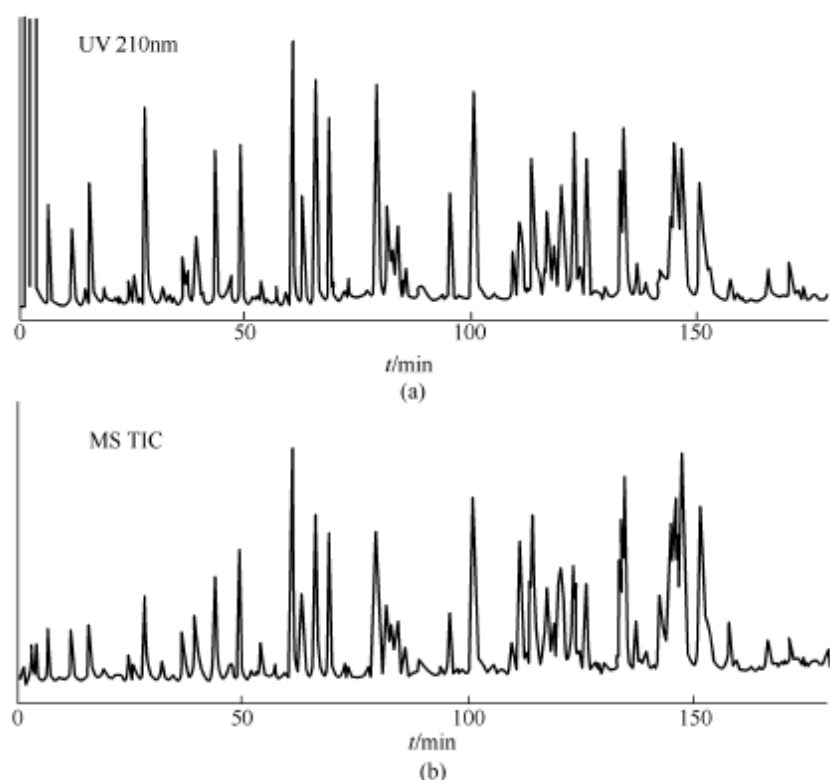


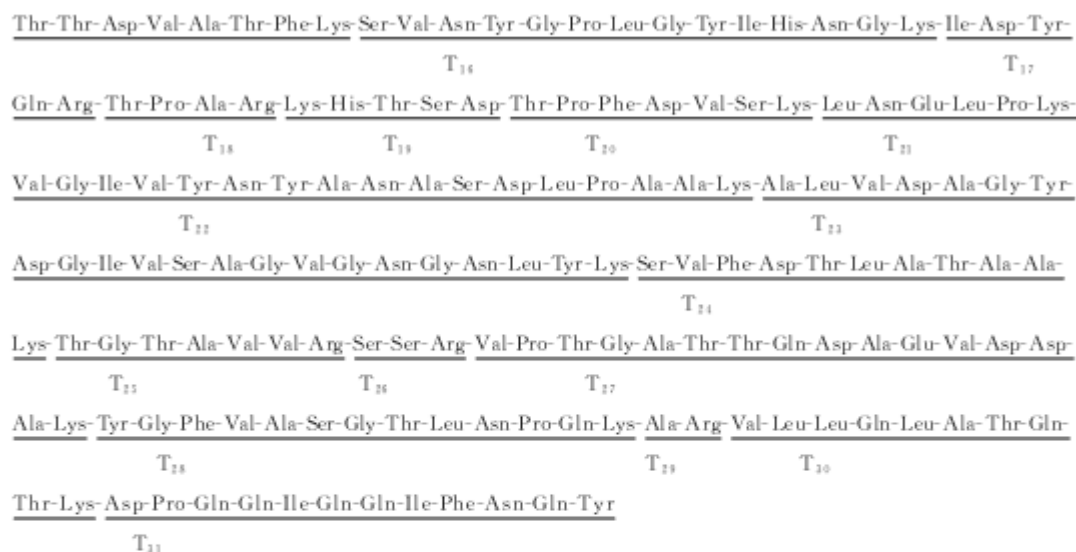
图 2-38 重组 L-天冬酰胺酶 II 的胰蛋白酶解肽图谱

(a) UV 指纹图谱; (b) MS 总离子流图

4. 序列分析

(1) 理论肽段 由大肠杆菌染色体的 *ansB* 基因的核苷酸序列推断的本品的氨基酸序列如下:

Leu-Pro-Asn-Ile-Thr-Ile-Leu-Ala-Thr-Gly-Gly-Thr-Ile-Ala-Gly-Gly-Thr-Ile-Ala-Gly-Gly-Gly-Asp-Ser-Ala-
 T₁
Thr-Lys-Ser-Asn-Tyr-Thr-Val-Gly-Lys-Val-Gly-Val-Glu-Asn-Leu-Val-Asn-Ala-Val-Pro-Gln-Leu-Lys-
 T₂ T₃
Asp-Ile-Ala-Asn-Val-Lys-Gly-Glu-Gln-Val-Val-Asn-Ile-Gly-Ser-Gln-Asp-Met-Asn-Asp-Asn-Val-Trp-Leu
 T₄ T₅
Thr-Leu-Ala-Lys-Lys-Ile-Asn-Thr-Asp-Cys-Asp-Lys-Thr-Asp-Gly-Phe-Val-Ile-Thr-His-Gly-Thr-Asp-Thr-
 T₆ T₇ T₈
Met-Glu-Glu-Thr-Ala-Tyr-Phe-Leu-Asp-Leu-Thr-Val-Lys-Cys-Asp-Lys-Pro-Val-Val-Met-Val-Gly-Ala-Met-Arg-
 T₉ T₁₀
Pro-Ser-Thr-Ser-Met-Ser-Ala-Asp-Gly-Pro-Phe-Asn-Leu-Tyr-Asn-Ala-Val-Val-Thr-Ala-Ala-Asp-Lys-Ala-Ser-
 T₁₁ T₁₂
Ala-Asn-Arg-Gly-Val-Leu-Val-Val-Met-Asn-Asp-Thr-Val-Leu-Asp-Gly-Arg-Asp-Val-Thr-Lys-Thr-Asn-
 T₁₃ T₁₄ T₁₅



根据胰蛋白酶的水解特性,从蛋白质的碱性氨基酸的C端进行水解,标出了理论水解肽段。其中,T₇与T₉之间有一双硫键连接。据此计算的各肽段的分子量见表2-10。

(2) 测定结果 按照上述肽图谱的测定条件,测定4个样品,分别为a、b、c₁和c₂。所得结果列入表2-10。

(3) 变异分析 对样品a和b肽图谱中的色谱峰进行归属时,未能找到与肽段T₂、T₂₄、T₂₉相应的色谱峰,但有分子量分别为739.4u、716.5u和1136.8u的三个峰未有归属。对这三个肽段进行CID/MS分析的结果证明T₂、T₂₄、T₂₅发生了变异。

① T₂的变异分析 由DNA推断的T₂的氨基酸序列为Ser-Asn-Tyr-Thr-Val-Gly-Lys,对应于L-天冬酰胺酶Ⅱ肽链的第23~29个氨基酸残基,分子量767.8u。对肽图谱中的3号峰进行CID/MS分析得到了图2-39的结果。

该肽段的氨基酸序列由N端至C端为Ser-Asn-Tyr-Thr-Ala-Gly-Lys。与未发生变异的T₂比较,发生了Val²⁷→Ala²⁷的变异,使其分子量减少了28u。

② T₂₄的变异 未发生变异的T₂₄的氨基酸序列为Ser-Val-Phe-Asp-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Lys,对应于L-天冬酰胺酶Ⅱ中的第252~262位的残基,分子量1122.6u。对肽图谱中的12号峰进行CID/MS分析,得到了如图2-40所示结果。

该肽段的氨基酸序列自N端至C端为Thr-Val-Phe-Asp-Thr-Leu-Ala-Thr...,与T₂₄比较,发生了Ser²⁵²→Thr²⁵²的变异,使其分子量增加14u。

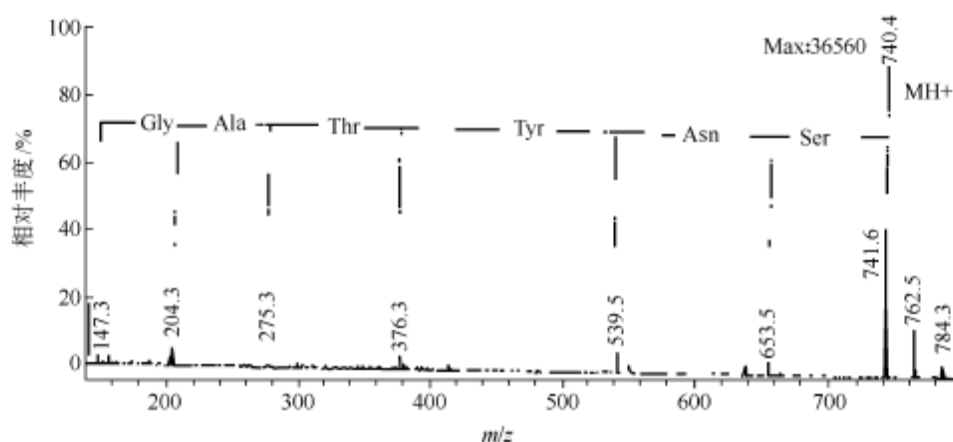
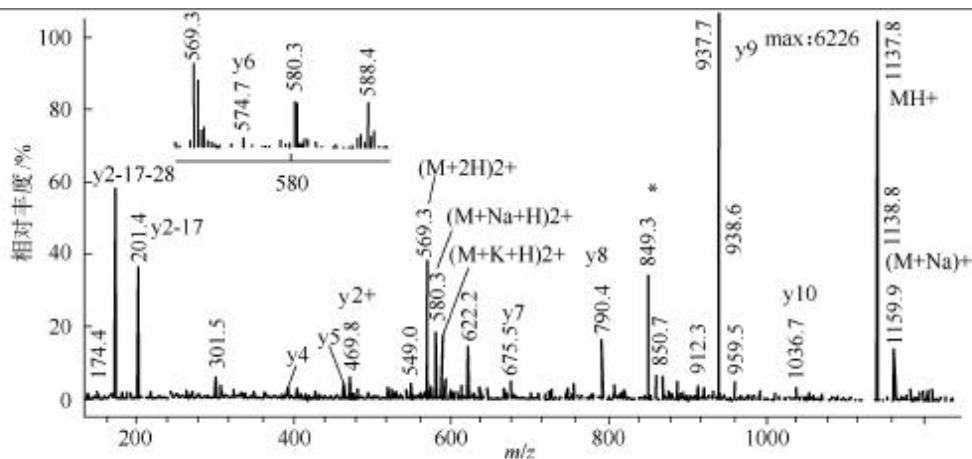
表 2-10 L-天冬酰胺酶 II 的胰蛋白酶水解肽段的质量分析

肽 段 ^①	氨基酸序列	计算质量 ^②	测 定 质 量		
			a, b	c ₁	c ₂
T ₁	1~22	2027.1	2027.3	2027.1	2027.2
T ₂	23~29	767.4	739.5 ^③	739.6 ^③	739.5 ^③
T ₃	30~43	1478.8	1478.8	1478.8	1478.5
T ₄ + T ₅		3070.6	—	3071.6	—
T ₄	44~49	658.4	658.3	658.5	658.7
T ₅	50~71	2430.2	2430.6	2430.8	2399.6 ^③
T ₆ + T ₇ + T ₈ + T ₉ + T ₁₀ + T ₁₁		7347.3	7365~7366	7365~7366	7365~7366
T ₇ + T ₈ + T ₉ + T ₁₀ + T ₁₁		7219.2	7237	7237	7237
T ₆ + T ₇ + T ₈ + T ₉ + T ₁₀		5008.5	5026~5027	5026~5027	5026~5027
T ₇ + T ₈ + T ₉ + T ₁₀		4890.4	4898~4899	4898~4899	4898~4899
T ₆	72	146.2	—	—	—
T ₇ - T ₉		1169.47	—	—	—
T ₇	73~79				
T ₈	80~104	2803.3	—	—	—
T ₈ C'	99~104	834.5	834.7	834.5	834.9
T ₉	105~107				
T ₁₀	108~116	958.5	—	—	—
T ₁₁	117~139	2355.6	2355.7	2356.2	2356.2
T ₁₂	140~144	517.3	517.3	517.7	517.5
T ₁₃	145~158	1486.8	1486.7	1486.9	1486.6
T ₁₄	159~162	461.3	461.4	461.6	461.6
T ₁₅	163~172	1096.5	1096.4	1096.2	1096.7
T ₁₆	173~186	1517.8	1517.8	1517.6	1517.9
T ₁₇	187~191	693.3	693.4	677.5 ^③	677.8 ^③
T ₁₈	192~195	443.5	443.4	443.7	443.6
T ₁₉ + T ₂₀		1360.7	1360.6	1360.9	1360.8
T ₁₉	196	146.2	—	—	—
T ₂₀	197~207	1232.6	1232.7	1232.3	1232.7
T ₂₁	208~213	712.4	712.6	712.8	712.6
T ₂₂	214~229	1693.9	1693.7	1693.4	1693.8
T ₂₃	230~251	2152.1	2152.0	2152.4	2152.1
T ₂₄	252~262	1122.6	1136.8 ^③	1122.5	1122.8
T ₂₅	263~269	702.4	716.6 ^③	716.4 ^③	716.7 ^③
T ₂₆	270~272	348.2	348.4	348.2	348.6
T ₂₇	273~288	1616.8	1616.7	1616.8	1616.8
T ₂₈	289~301	1380.8	1380.7	1380.5	1380.8
T ₂₉	302~303	245.2	245.2	245.3	245.3
T ₃₀ + T ₃₁		2729.5	2730.3	2730.1	2729.8
T ₃₀	304~314	1226.8	1226.9	1227.1	1226.9
T ₃₁	314~326	1520.7	1520.8	1520.5	1520.7

① + 表示未水解肽段相连；—表示双硫键连接。

② 单同位素质量。

③ 胰蛋白酶水解片段与理论值有差异，可能有氨基酸变异。

图 2-39 m/z 740.4 (分子量 739.4u 的肽段) 的 CID/MS图 2-40 m/z 1137.8 (分子量 1136.8u 的肽段) 的 CID/MS

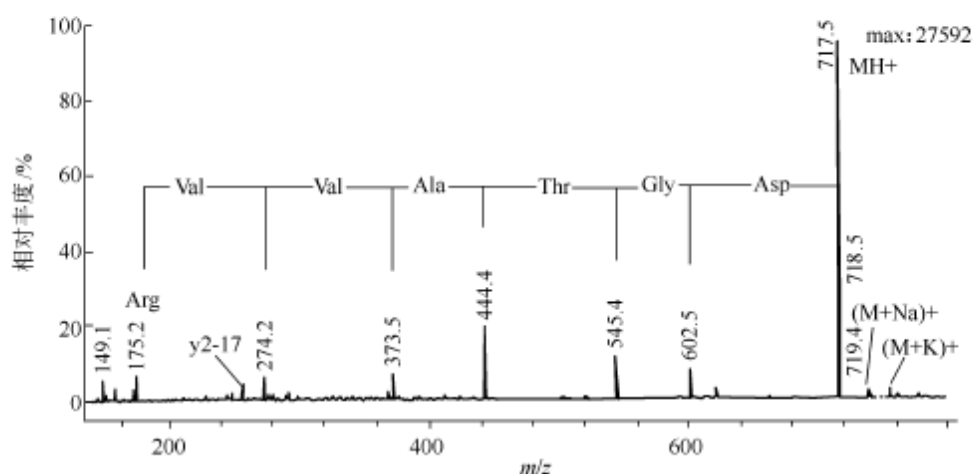
③ T_{25} 的变异分析 T_{25} 的氨基酸序列应为 Thr-Gly-Thr-Ala-Val-Val-Arg, 对应于 L-天冬酰胺酶 II 中的第 263~269 位的氨基酸残基, 分子量 702.8u。对肽图谱中的 4 号峰进行 CID/MS 分析, 结果如图 2-41。

与未变异的 T_{25} 序列比较, Thr²⁶³ 变异为 Asp²⁶³, 肽段的分子量增加 14u。

上述 L-天冬酰胺酶 II 的两个样品 a 和 b 均发生了上述三个变异, 碰巧变异后蛋白质的分子量没有发生变化。这一实例说明, 样品分子量与理论值一致, 不一定氨基酸或其序列未发生变异。所以, 对基因工程产品应用现代理化及生物方法进行严格的质量控制。

(四) 糖蛋白的分析

1. 寡糖的质谱裂解

图 2-41 m/z 717.5 (分子量 716.5u 的肽段) 的 CID/MS

在解吸离子化和 ESI 技术发展之前,寡糖必须经适当的衍生化后才能进行质谱分析。现代质谱法可以直接分析寡糖。寡糖,包括寡糖衍生物,质谱裂解后生成还原端离子 X、Y、Z 和非还原端离子 A、B、C,如图 2-42。

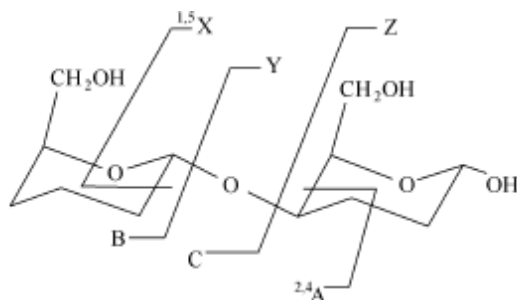


图 2-42 还原端离子和非还原端离子

2. 重组人促红细胞生成素 (recombinant human erythropoietin, rHuEPO) 的分析

rHuEPO 在我国已进入临床阶段,运用酶解、液相色谱-电喷雾离子化质谱联用法和基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱法 (matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight mass spectrometry, MALDI/TOFMS) 将寡糖和肽段连在一起分析,虽有唾液酸的影响,但肽段可离子化,有利于 ESIMS 和 MALDI/TOFMS 分析。

(1) rHuEPO 的 Glu-C 酶解 Glu-C 酶 $12\mu\text{g}$ 溶于磷酸盐缓冲溶液 (25 mmol/L , $\text{pH}=7.8$) $100\mu\text{L}$ 中,和 EPO 1mg 混合, 25°C 反应 20h 。

(2) LC/ESIMS 分析 色谱分析和流分收集:色谱柱为 Zorbax 300SB, C8, $5\mu\text{m}$, $150\text{mm} \times 2.1\text{mm}$, 美国 Agilent 公司。流动相: B. 乙腈;

A. 0.06% 三氟乙酸。梯度洗脱条件：0~60min, B 5%~51%；60~68min, B 51%~5%。流速：0.3mL/min。检测波长：(214±20)nm。在线 LC/ESIMS 分析：柱后添加 TFA-Fix 溶液（丙酸-异丙醇，20:80）。流速：0.1mL/min。雾化气压力：320kPa。干燥气温度：350℃。流速：10L/min。喷雾电压：3500V。碎裂器（fragmentator）： m/z 120 ~ 500, 250V； m/z 500 ~ 2500, 120V。

(3) 含糖色谱峰组分及样品的制备 含糖色谱峰组分的制备：HPLC 条件同上，进样体积为 100 μ L，进样 3 次。收集含糖色谱组分，用 N₂ 气吹干，低温保存。样品制备：基质为 DHB 的 60% 甲醇-水（含 1% 三氟乙酸）饱和溶液；样品用水 100 μ L 溶解，取样品和基质各 0.5 μ L，置于不锈钢 26 点样品靶上，混合均匀，空气中自然结晶。

(4) 糖肽的 MALDI/TOFMS 分析 氮激光器 337nm，激光能量衰减 24；延时引出时间 50ns，加速电压为 19kV，质量偏转 1800u，工作方式为线性，累加次数 80 次。

(5) 结果和讨论

① rHuEPO 的一级结构、Glu-C 酶解片段 rHuEPO 的一级结构及 Glu-C 酶解片段如图 2-43 所示。

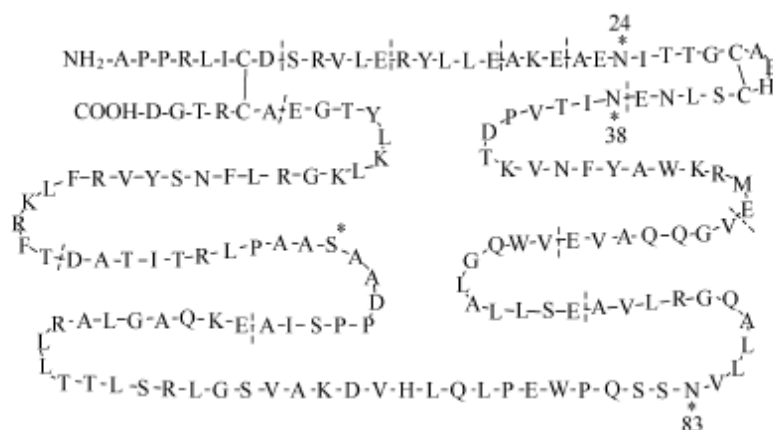


图 2-43 rHuEPO 的一级结构

*糖基化位置；---- Glu-C 酶解位置；—二硫键

② 在线 HPLC/ESIMS 分析 由于寡糖不易离子化，加上唾液酸（sialic acid, SA）的影响，常规的电喷雾离子化方法分析 EPO 得不到质谱信息，分析 EPO 酶解的糖肽片段也不理想。采用 TFA-Fix 溶液，柱后添加，消除了 TFA 对肽段离子化的影响，得到了较好的结果，EPO 的 Glu-C 肽图谱如图 2-44 所示。电喷雾离子源的碎裂器电压为： m/z 100~500, 250V； m/z 500~2600, 120V，在一次分析谱图中可得到肽的分子量信息以及氮连接寡糖的特征碎片离子 m/z

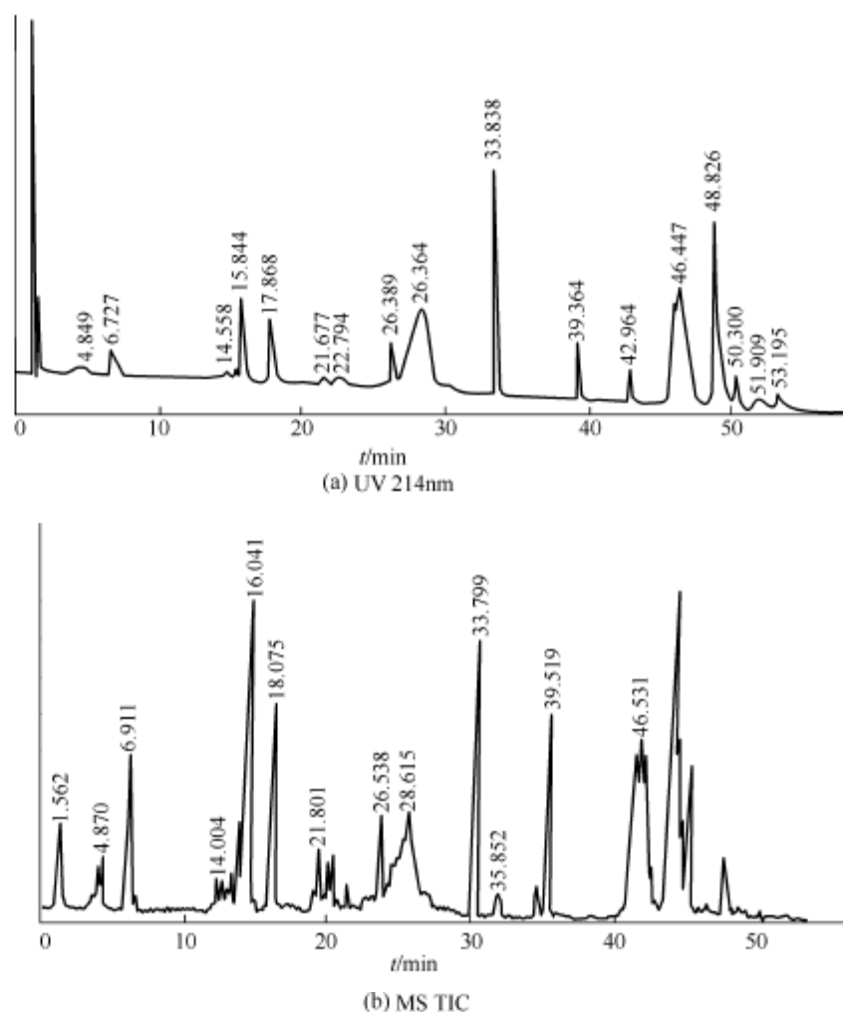


图 2-44 rHuEPO 的 Glu-C 酶解溶液的肽图谱

204 HexNAc⁺, m/z 366 HexHexNAc⁺ (Hex 为 hexose, 己糖; HexNAc 为 N-acetylhexosamine, 乙酰氨基己糖), 可以判断糖肽的位置。结果表明在保留时间 14.6min, 28.3min 和 46.4min 的组分为氮连接糖肽。

保留时间在 46.4min 左右的糖肽, 为 83 位点的氮连接寡糖肽段, 在本实验条件下, 得到了主要是带 6 个和 5 个电荷的多电荷离子 (见图 2-45)。

由 83 位点糖肽的 ESIMS, m/z 1100~2000 的放大图可以明显发现寡糖的微不均一性。主要为带 6 个电荷的离子, ESIMS 分析结果说明寡糖结构 (参见图 2-46 MALDI/TOFMS 图中所示) 主要为: 三天线+2SA、三天线+3SA、四天线+SA、四天线+2SA、四天线+3SA、四天线+4SA、四天线+LacNAc+2SA (Lac: 半乳糖, lactose)、四天线+LacNAc+3SA、四天线+LacNAc+4SA、四天线+2LacNAc+3SA、四天线+3LacNAc+3SA, 同时发

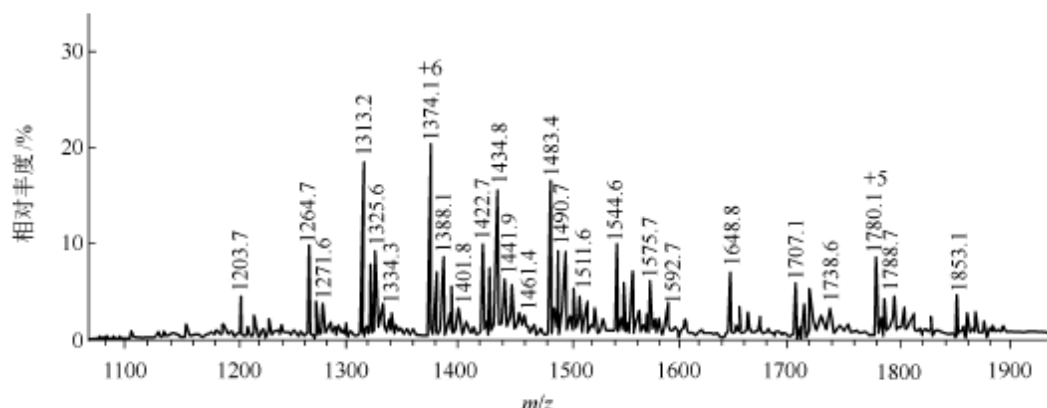


图 2-45 rHuEPO 经 Glu-C 酶解后的 N-83 糖肽的 ESI/MS 图

现比糖肽的分子离子峰 (6^+) 质荷比大 7 的系列峰, 以及比糖肽的分子离子峰 (5^+) 质荷比大 8.5 的系列峰, 这表明唾液酸发生了乙酰化。

将 83 位点的总离子流色谱图分成 0.25min 的段, 从各个段的质谱图中可以分析出糖肽的流出顺序和糖的微不均一性。寡糖天线数多的先流出, 对于同一寡糖结构, 乙酰化多的后流出。与文献报道的唾液酸乙酰化状况有区别, 乙酰化的程度高、比例大, 大部分寡糖的唾液酸都被乙酰化了, 特别是发现了四天线+2LacNAc+4SA、四天线+3LacNAc+4SA 的唾液酸乙酰化。这种多天线唾液酸乙酰化有助于 EPO 在体内的抗酶解, 降低代谢速率, 提高生物活性。

③ HPLC 分离收集 3 个位点糖肽的 MALDI/TOFMS 分析 用 MALDI/MS 分析糖肽, 基质中加酸有利于离子化, 提高质谱分辨率。MALDI/TOFMS 质谱图 2-46 中, 都是相差 365 质量单位和 291 质量单位的系列, -HexHexNAc 的质量为 365u, -SA 的质量为 291u, 表明寡糖的类型为复杂型, 并且含唾液酸。

实验结果表明 (未全部列出), 二天线寡糖主要存在于第 24 位点中, 38 位点和 83 位点以多天线为主。

二、合成药物、抗生素及有关物质鉴定

长期以来, 质谱法在化学合成药物反应过程监测及中间体、目标化合物和副反应产物的分析中, 一直发挥着重要的作用。APIMS 的出现, 进一步扩大了质谱法的应用范围, 包括极性、不稳定、难气化和大分子药物的分析。关于生物大分子, 包括重组蛋白质药物的分析, 已如前述。此处主要讨论小分子药物的分析。

(一) 分子量测定

在对化合物进行鉴别时, 分子量测定通常是第一步和首要的工作。如果化

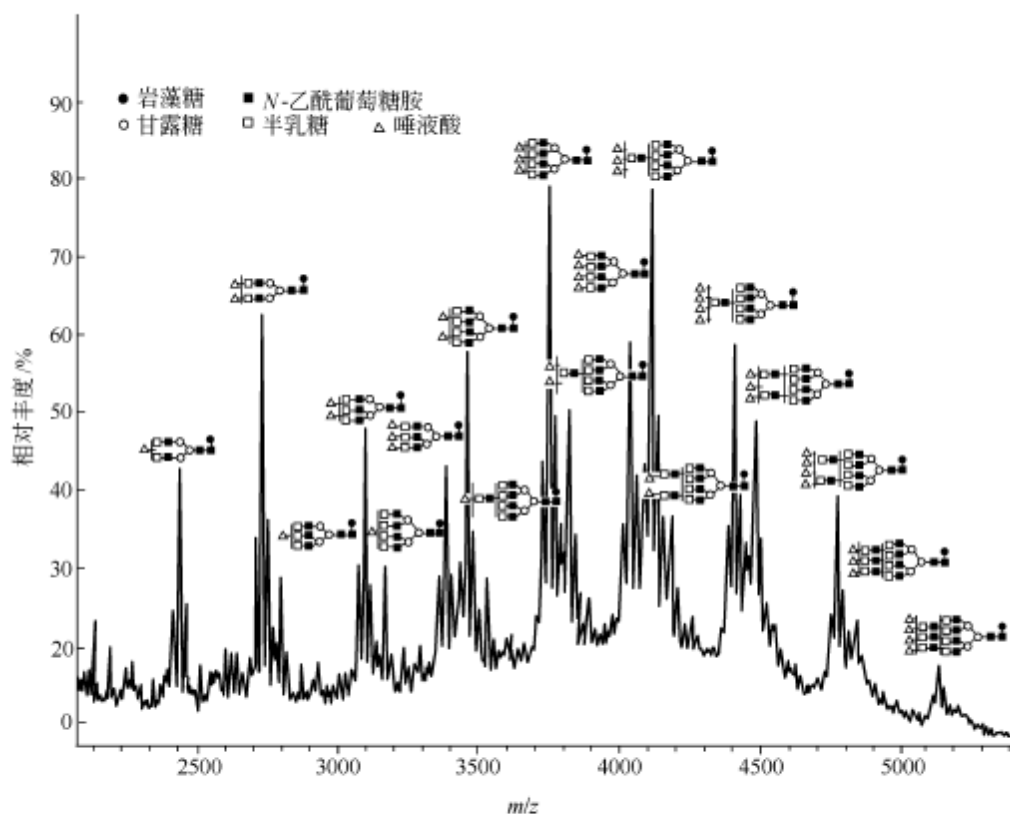


图 2-46 rHuEPO 寡糖苷的 (负离子) MALDI/TOFMS 图

合物的纯度较高, 可用输注或 FIA 直接测定其质谱, 得出分子量及有关信息, 方法简便、快速, 且 FIA 易于自动化。如用高分辨质谱仪, 测定其准确质量, 可推定其分子式并比较其理论同位素丰度比与实测丰度比是否一致予以确认。

如果样品是混合物, 通常需用 LC/MS 联用技术, 对样品中的成分进行分离分析。因为 API (APCI 和 ESI 等), 尤其是 ESI, 是“软离子化”技术, 样品的质谱图中, 主要由准分子离子组成, 很少碎片, 故易于确定分子量。通常将样品溶于甲醇或乙腈与水的混合液中。以约 $10\mu\text{L}/\text{min}$ 流速注入质谱仪。图 2-47 为左芬普利钙 $[(\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{S}_2)_2\text{Ca}]$ 的 ESI/TOF 质谱图。 m/z 430.1146 为左芬普利的 $\text{M}+\text{H}^+$, 而 m/z 897.1678 为左芬普利钙的 $\text{M}+\text{H}^+$, 与理论值的误差分别为 1×10^{-6} 和 2.5×10^{-6} , 经计算确定其元素组成分别为 $(\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{S}_2 + 2\text{H})^+$ 和 $(2\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{S}_2 + \text{H} + \text{Ca})^+$ 与本品的分子式一致, 理论与实测同位素丰度比一致。 m/z 452.0963 为 $(\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{S}_2 + \text{H} + \text{Na})^+$, 而 m/z 881.2024 为 $(\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_4 + 2\text{H} + \text{Na})^+$ 。

左芬普利钙的结构如图 2-48。

如样品溶液浓度较大, 有可能发现双分子离子 $(2\text{M}+\text{H})^+$ 。此外, 由于所用的溶剂和添加剂的不同, 在质谱中常常出现 $\text{M}+\text{Na}^+$ 、 $\text{M}+\text{K}^+$ 、 $\text{M}+$

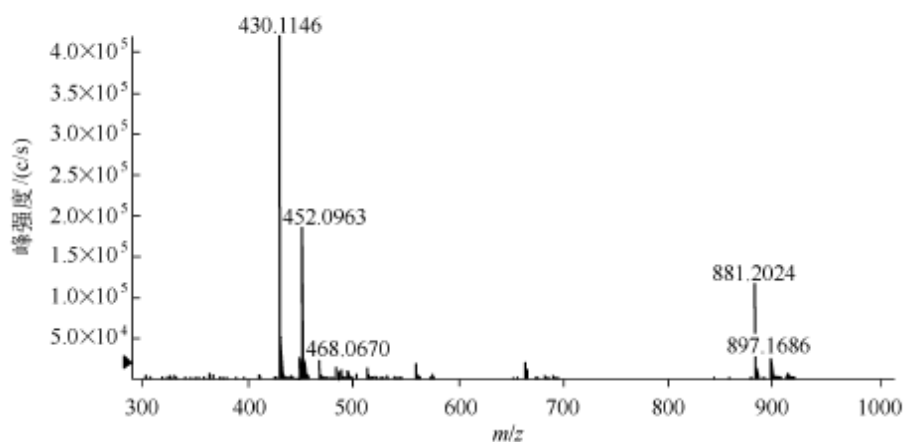


图 2-47 左芬普利钙的 ESI/TOF 质谱图

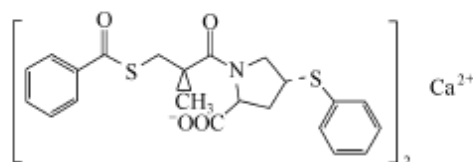


图 2-48 左芬普利钙的结构

NH_4^+ 、 $\text{M}+\text{Cl}^-$ 、 $\text{M}+\text{Ac}^-$ 等。这些离子的存在，虽然增加了质谱的复杂性，但是，有助于确定样品的分子量。

对于碱性化合物的有机酸盐，如需确定酸、碱组成，应测定其正和负离子质谱。如 4[6-胍基-己酰氧基]-苯甲酸乙酯甲磺酸盐的质谱测定，其结构如图 2-49。

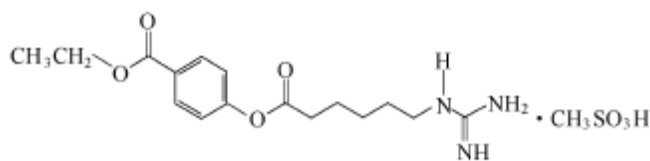


图 2-49 4[6-胍基-己酰氧基]-苯甲酸乙酯甲磺酸盐的结构

图 2-50 (a) 和 (b) 分别是本品的正、负离子质谱。图 2-50 (a) 中， m/z 332 为本品游离基 (B) 的准分子离子 $\text{B}+\text{H}^+$ ， m/z 739.3 为 $(2\text{B}+\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}+\text{H})^+$ 。在图 2-50 (b) 中，基峰 m/z 95 为甲磺酸的负离子 CH_3SO_3^- ，而 m/z 512.2 为 $(\text{B} \cdot \text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}+\text{CH}_3\text{SO}_3)^-$ 。如上所述，双分子离子的生成，常常是样品溶液的浓度较高，但是，也与样品的性质有关。

克拉霉素乳糖酸盐 (以 MA 表示)，也需用正离子质谱得到 $\text{M}+\text{H}^+$ 和用负离子质谱得到 $(\text{A}-\text{H})^-$ 。在测定其负离子质谱时发现，其负离子质谱中不

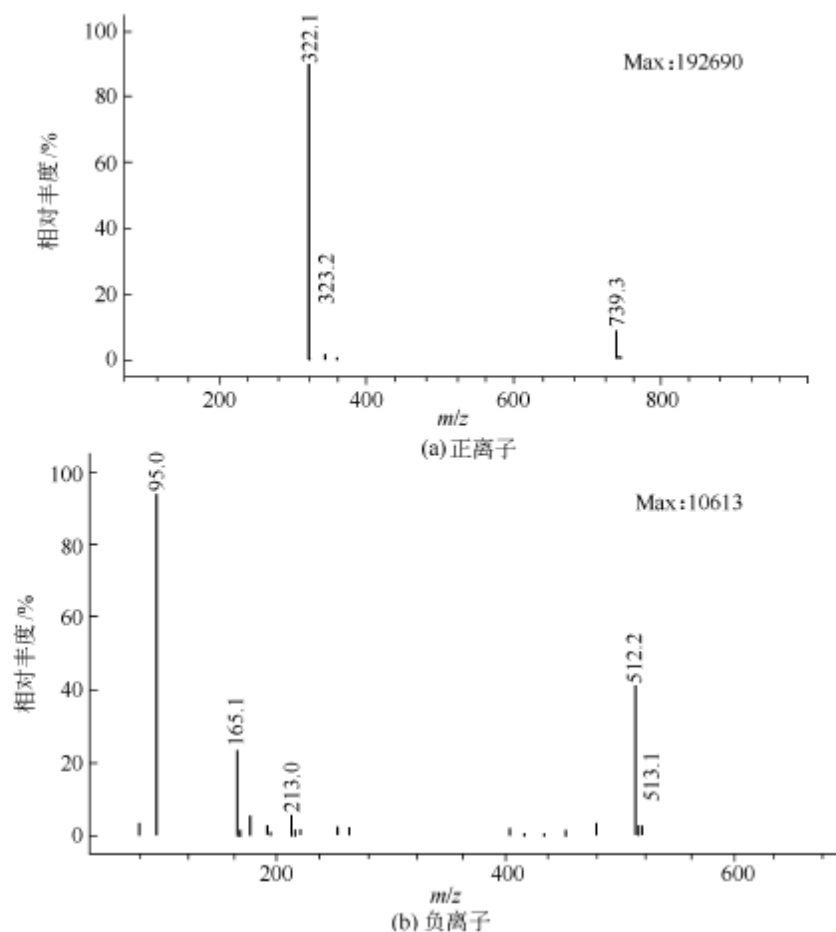


图 2-50 4[6-胍基-己酰氧基]-苯甲酸乙酯甲磺酸盐的质谱

仅有乳糖酸的阴离子，还有克拉霉素的负离子 ($M-H$)⁻ 存在。这是因为克拉霉素分子中有糖基，可失去质子生成负离子，如图 2-51 所示。

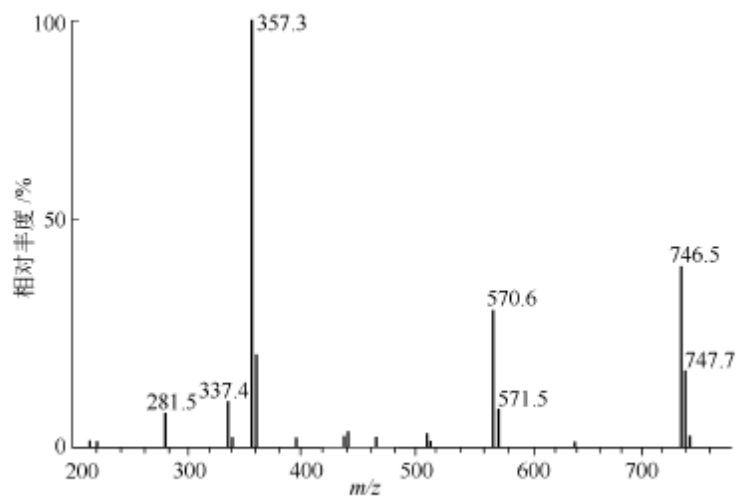


图 2-51 克拉霉素乳糖酸盐的负离子质谱

(二) 有关物质与降解产物检查

有关物质检查是药品质量控制的重要内容。合成药物中的有关物质通常来源于合成原料、中间体和副反应产物。对于药物中的这些杂质（含量 $>0.1\%$ ）应进行鉴定。LC/MS 在此项工作中可以发挥重要作用。此外，药物中还存在由于受热、光照等原因产生的降解产物，也需分析鉴定。下面以枸橼酸莫沙必利（mosapride citrate）为例说明 LC/MS 在这一工作中的应用。图 2-52 为 LC/MS 分析结果（总离子流色谱图），测定的是正离子信号，(c) 为一批不合格产品的 MS 总离子流（TIC），保留时间（ t_R ）11.6min 处为主要杂质峰，其质谱图如图 2-53(c) 所示。其 $M+H^+$ 的 m/z 为 404， $M+Na^+$ 的 m/z 为 426，

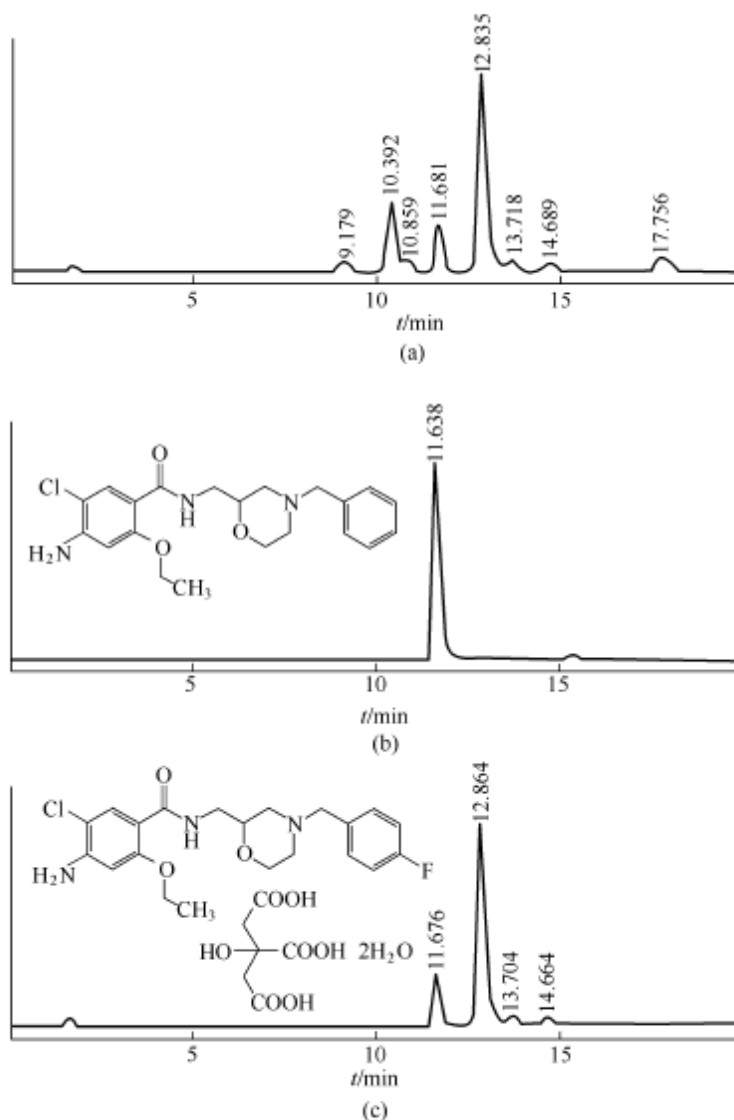


图 2-52 枸橼酸莫沙必利 LC/MS 总离子流色谱图

(a) 热降解样品；(b) 主要有关物质；(c) 样品

故确定该有关物质的相对分子质量为 403。样品中的主成分莫沙必利的质谱图见图 2-53(d)，其 $M+H^+$ 和 $M+Na^+$ 的 m/z 分别为 422 和 444，即其相对分子质量为 421，与莫沙必利游离基相对分子质量的理论值一致。因此，杂质游离基的相对分子质量较莫沙必利游离基相对分子质量少 18。由莫沙必利结构[图 2-52(c) 左上角]和合成工艺推断，杂质可能是莫沙必利结构中苯环未氟代的化合物，其结构见图 2-52(b) 左上角。

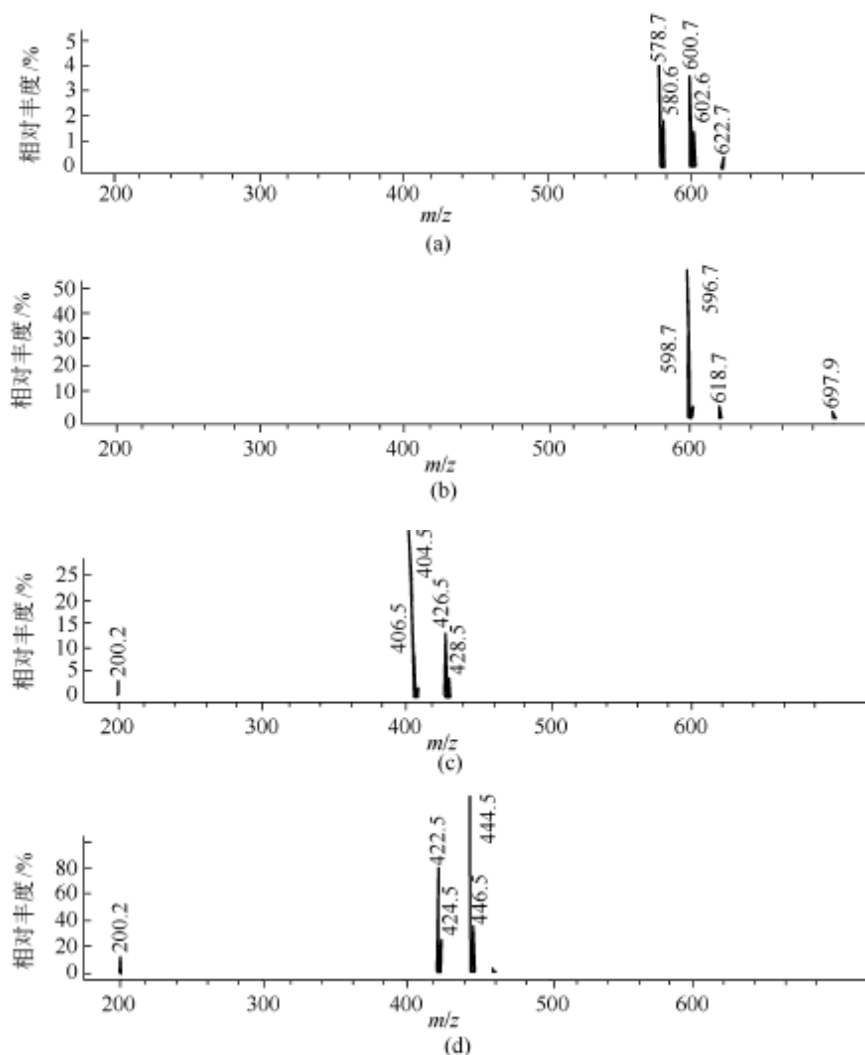


图 2-53 ESI 质谱图

(a) t_R 9.18min 的降解产物；(b) t_R 10.39min 的降解产物；
(c) 主要有关物质；(d) 主成分

图 2-52 (a) 是枸橼酸莫沙必利受热后的 LC/MS 的 TIC 图，热降解主要产物的 t_R 为 10.39min，其质谱如图 2-53 (b) 所示， m/z 596 和 m/z 618 应为该杂质的 $M+H^+$ 和 $M+Na^+$ ，故主要降解产物的相对分子质量应为 595，并

推断该物质由下述反应产生：

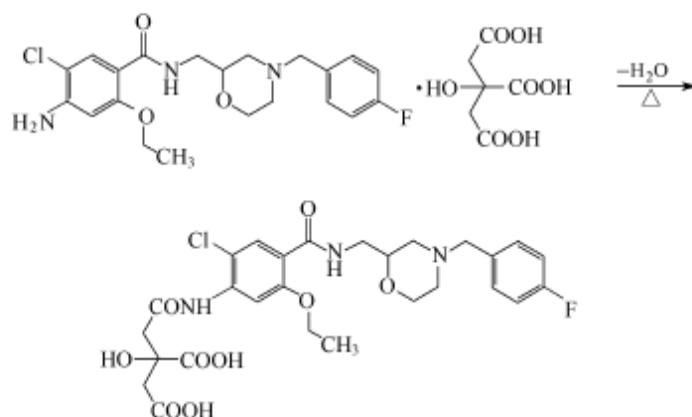


图 2-52 (a) 为 t_R 9.18min 的热分解产物的质谱图，其 $M+H^+$ 和 $M+Na^+$ 分别为 m/z 578 和 m/z 600，故这一杂质的相对分子质量为 577，较上述热降解产物的相对分子质量少 18，因而推断为主要有关物质的热降解产物。这两个降解产物分别与主成分和主要有关物质保留时间差均约为 2.5min (12.84~10.39, 11.68~9.18)，可作为佐证。

三、中药和天然药物分析

通常，中药和天然药物的成分比较复杂。因而，具高分离能力且通用、灵敏、能提供分子量及结构信息的 LC/MS 在这一领域中的应用日益广泛。

(一) 银杏内酯注射液指纹图谱研究

在银杏内酯的总提取物中存在一些微量成分，这些物质的存在对分析结果会引起测定误差。银杏总内酯提取物的色谱图，如图 2-54 所示，图中 t_R 8min 和 t_R 9min 分别为银杏内酯 A 和银杏内酯 B。值得注意的是 t_R 24min 处的化合物为一未知物质，经空白实验确证该物质并非溶剂干扰。在进一步的实验中还发现从 Sigma 和中国药品生物制品检定所购买的银杏内酯 B 的对照品中也存

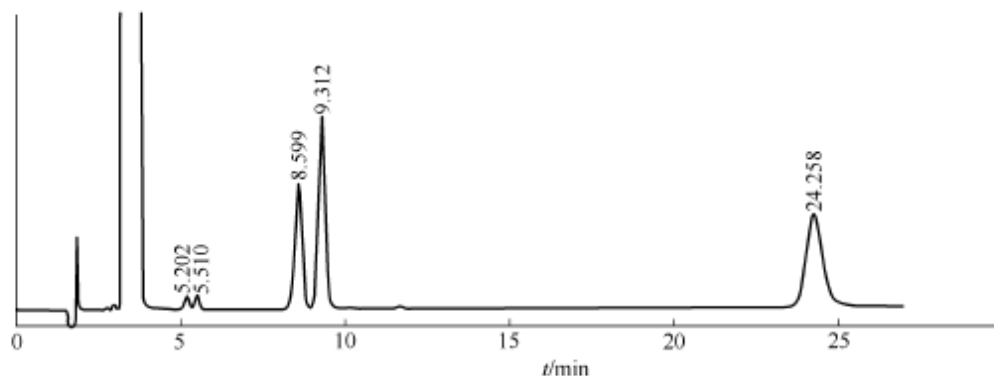


图 2-54 银杏内酯提取物的含量测定

在该物质。该化合物的紫外响应较强，它的存在使得对银杏内酯 B 的含量测定发生系统正误差。通行的色谱条件多采用等度洗脱方式，流动相洗脱能力相对较弱，该成分在色谱柱内扩散，逐渐“流失”而不能被检测。在图 2-54 中，因只针对银杏内酯 A、银杏内酯 B 进行分离测定，为减少分离时间，色谱流动相的洗脱能力较强，银杏内酯 C 和白果内酯虽未能完全分离 (t_R 约 5min)，但该未知成分得以洗脱出来。

为了测定银杏内酯注射液的指纹图谱和研究银杏总内酯提取物中的成分，进行了下述研究。

(1) 样品处理 银杏叶 (2000 年 7 月采收，色绿，江苏邳州) 2kg，适当风干，碾碎，称取 500g 置 1000mL 烧瓶中，加入 60% 丙酮 750mL，水浴回流 2h，过滤，残渣以相同溶剂 500mL 水浴回流 1h，滤过。合并提取液，减压回收丙酮，剩余水溶液以石油醚、环己烷萃取去除提取液中的强脂溶性成分，水相再以乙酸乙酯萃取 5 次 (300mL、200mL、100mL $\times$ 3)，合并萃取液，减压回收溶剂，残渣加 10% 甲醇 10mL，超声制成一混悬液，用聚酰胺柱色谱分离得银杏总内酯提取物，以 70% 丙酮溶解，制成 1mg/mL 溶液，经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过，作为供试液，取 20 μ L 进样。

(2) 液相色谱条件 色谱柱：Shim-Pack CLC-ODS 5 μ m，6mm $\times$ 150mm，柱温 35 $^{\circ}$ C。流动相 A：水；流动相 B：甲醇-异丙醇 (3 : 1)。线性梯度：0 $\sim$ 20min，B 15%；20 $\sim$ 60min，B 15% $\sim$ 60%；60 $\sim$ 65min，B 60%；65 $\sim$ 70min，B 15%。流速：1.5mL/min，柱后分流，0.5mL/min 进质谱仪。检测：UV (220 $\pm$ 8)nm，DAD 同时记录 UV 190 $\sim$ 400nm 的紫外光谱；记录时间 60min。

(3) 质谱条件 离子化方式：ESI (负离子方式)。扫描范围： m/z 50 $\sim$ 600；干燥气流速：12L/min。干燥气温度：350 $^{\circ}$ C。雾化气压：310kPa。毛细管电压：3500V。碎裂器 (Fragermentor) 电压：70V，250V。

为避免大量溶剂 (丙酮) 污染质谱系统，在进样 5min 后再将色谱流分切换至 MSD 开始采集质谱数据。

(4) 结果与讨论 银杏内酯在丙酮中具有良好的溶解性能，所以通常选用一定比例的含水丙酮作为提取溶剂。以石油醚和环己烷有效去除银杏叶提取液中的多种脂溶性成分，用乙酸乙酯萃取有效成分。因黄酮在乙酸乙酯中具有一定的溶解性，因此乙酸乙酯萃取物中除了内酯还包含有黄酮。为了去除黄酮化合物的干扰，以聚酰胺进行选择吸附。

为了有效地分离银杏总内酯提取物中的各个成分，液相色谱在前 20min，以等度洗脱方式尽量分离可能存在的保留行为相近的化合物，之后采用梯度洗脱，使极性相对较弱的微量成分得以洗脱并分离。因流动相中有机相的逐渐增加，用低波长检测时基线上扬。

质谱曾采用正、负离子方式进行实验,实验结果表明负离子检测的信噪比优于正离子方式,在负离子的 MS TIC 图中,检测得到的微量成分多于正离子模式;对于碎裂器电压,采用相对较低的 70V,以保证获得各成分的分子离子峰;而在 250V 条件下采集碎片信号。

在实验条件下获得的 UV 色谱图和 MS TIC 图见图 2-55。与对照品比较确

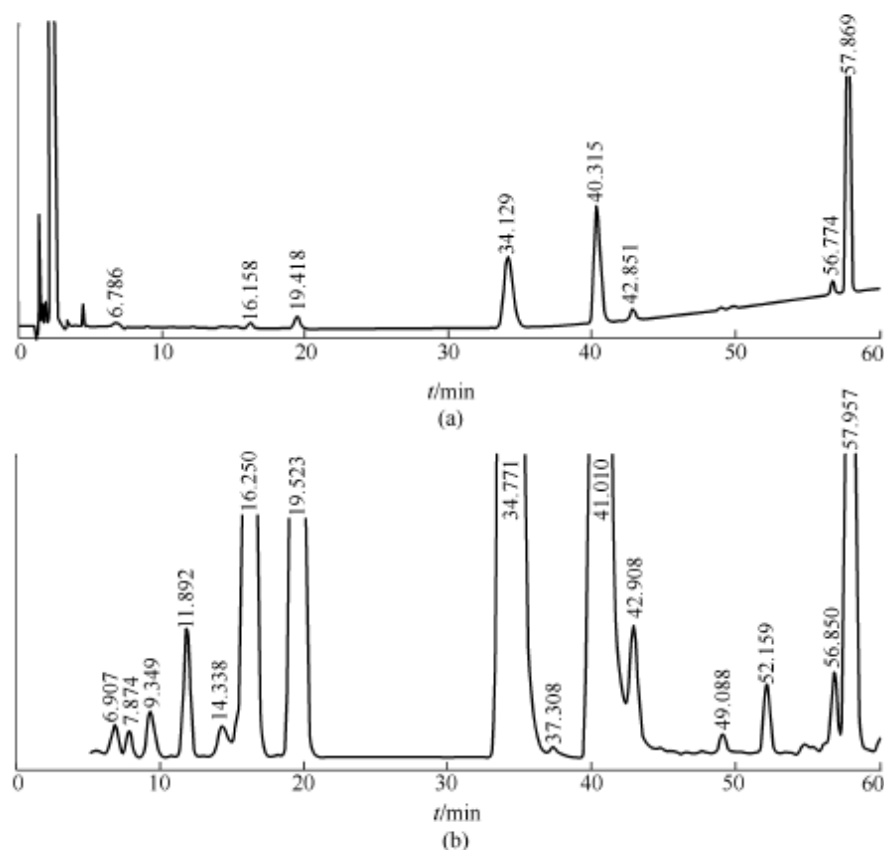


图 2-55 银杏内酯提取物的 UV 色谱图 (a) 和 MS TIC 图 (b)

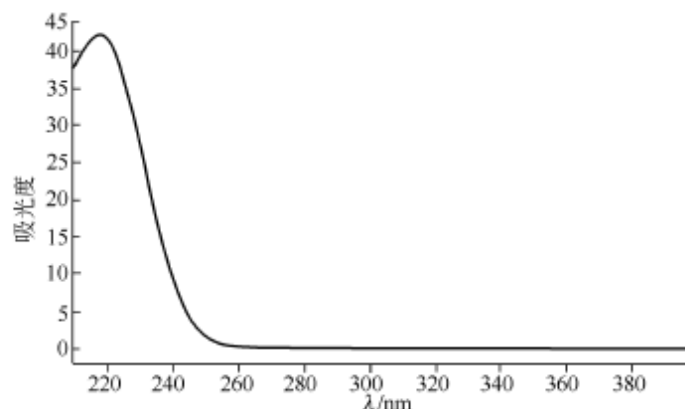


图 2-56 银杏内酯 B (GB) 在流动相中的紫外光谱图

其它已知成分与银杏内酯 B 类似

定在 UV 色谱图中, t_R 16min、 t_R 19.4 min、 t_R 34.1min 和 t_R 40.3min 的色谱峰分别为白果内酯、银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B。这四个色谱峰的 UV 光谱及质谱也与对照品相同。在流动相中, 这 4 个化合物的 UV 光谱非常相似, 只在 220nm 处有一最大吸收峰, 主要是由于内酯羰基的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁形成的 (见图 2-56)。

因质谱检测器串联于 DAD 之后, 所以各成分在 MS TIC 中的保留时间相应略为滞后。在 ESI (-) 70V MS 质谱 (见图 2-57) 中, 各成分均有信号, 同时根据同位素丰度 M^- 与 $[M+2]^-$ 之比约为 3:1, 判断有 $[M+Cl]^-$ 形成。由电喷雾离子化形成偶电子分子离子的特征, 根据“N 规则”, 偶数质量的偶电子离子应含奇数个 N, 因此可判断各成分还形成了 $[M+NO_3]^-$ 信号。有趣的是, 当 CID 电压升高至 250V 后, 各化合物的 $[M+Cl]^-$ 信号消失, $[M+NO_3]^-$ 信号减弱, 而 $[M-H]^-$ 均为基峰, 由此可推测 $[M+Cl]^-$ 加合离子稳定性较差, 在加速碰撞过程中容易丢失 Cl^- , 使信号消失; 而 NO_3^- 离子与化合物的结合力相对较强, 在碰撞过程中, 尚能保存一定的信号强度。

在正离子检测中, 各已知成分也均有质谱信号生成。在正离子谱中, 各化合物无碱性基团, 因此主要形成 $[M+Na]^+$ 和 $[2M+Na]^+$ 的加合离子信号 (图 2-58)。各已知化合物的保留时间及质谱数据见表 2-11。

表 2-11 银杏内酯提取物中主要已知成分的 LC/MS 测定数据

成分	UV t_R /min	$[M-H]^-$	$[M+Cl]^-$	$[M+NO_3]^-$	$[M+Na]^+$	$[2M+Na]^+$	相对分子质量
GA	34.1	407	443	502	431	839	408
GB	40.3	423	459	486	447	871	424
GC	19.4	439	475	470	463	925	440
BD	16.2	325	361	388	349	675	326

未知成分分析及结构推断: 用 UV 检测时, t_R 为 42.9min、56.7min 和 57.8min 处为未知物。这三个色谱峰的 UV 光谱 (见图 2-59) 也非常相似, 与银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的 UV 光谱对比可发现除在 220nm 有最大吸收外, 在 240nm 处均多出一肩峰; 三个峰的色谱流出顺序也与 GC、GA、GB 对应。从负离子谱的数据中可推知这三个化合物的相对分子质量分别比 GC、GA、GB 少 18。而在正离子谱中, 仅 t_R 57.8min 处的化合物有质谱响应, 与银杏内酯 B 的 ESI (+) 70V 的质谱比较可发现, 在浓度较低的前提下, 该化合物的二聚体加合离子信号仍较 GB 的强度高。这三个化合物的 t_R 及质谱 (图 2-60 和图 2-61) 数据见表 2-12。

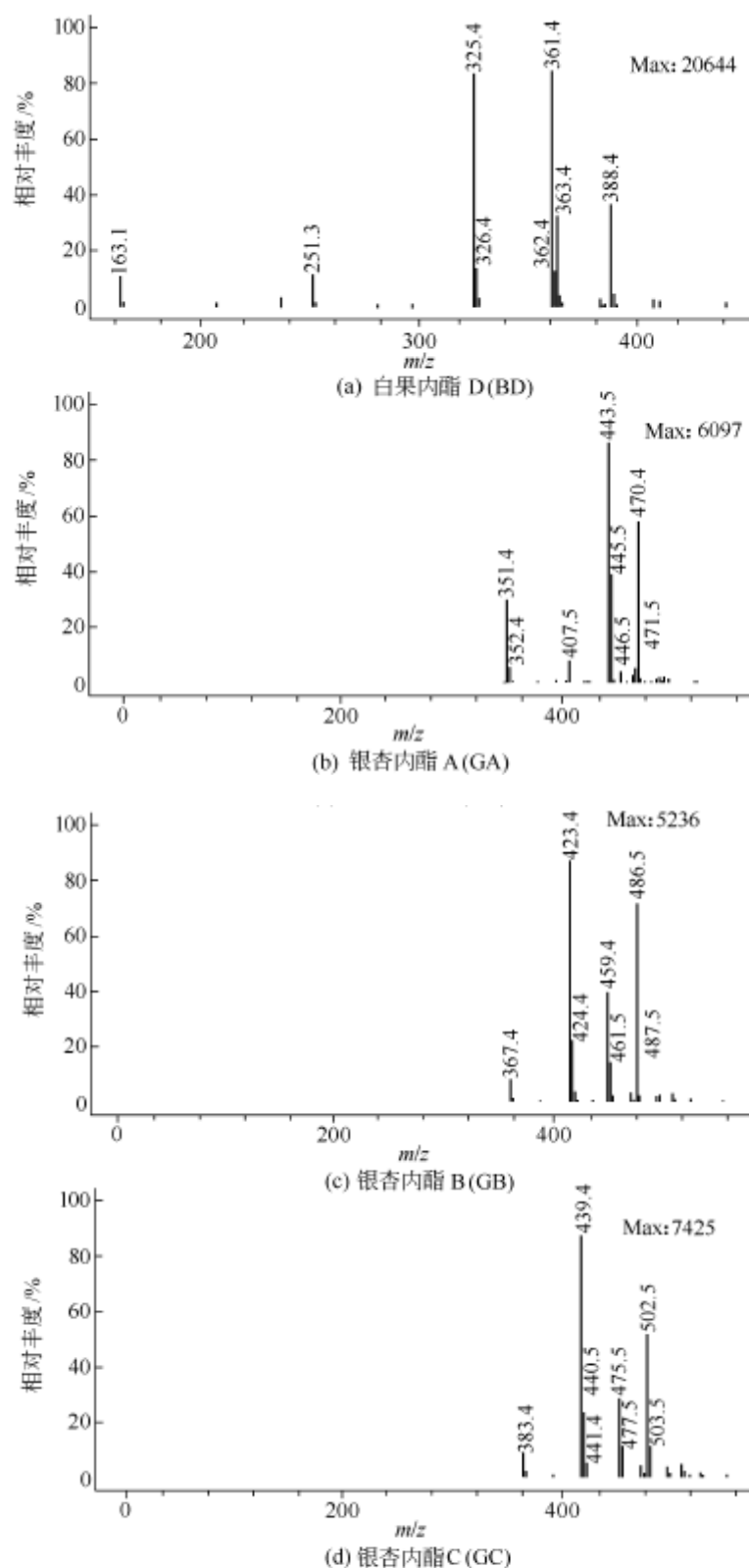


图 2-57 白果内酯 D (BD)、银杏内酯 A (GA)、银杏内酯 B (GB)、银杏内酯 C (GC) 的 ESI (-) 70V 质谱图

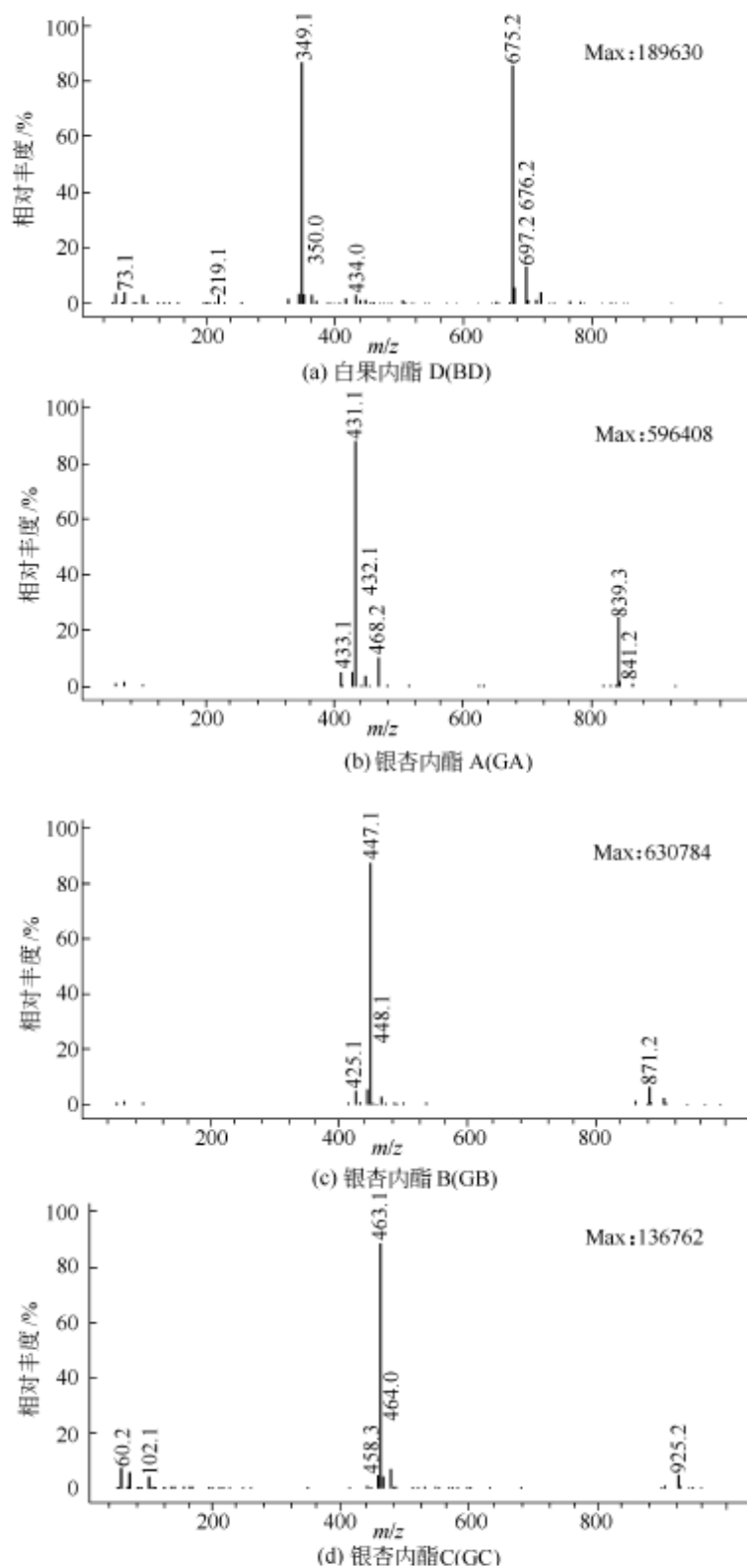


图 2-58 BD、GA、GB、GC 的 ESI (+) 70V 质谱图

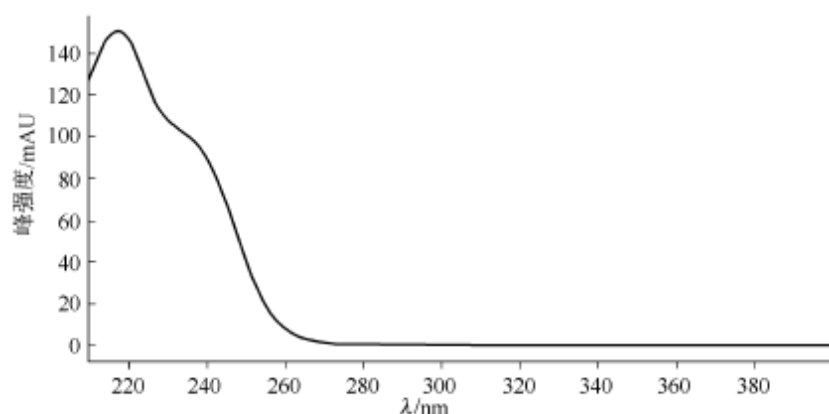


图 2-59 未知化合物在流动相中的紫外光谱图

表 2-12 未知化合物 LC/MS 测定数据

t_R / min	$[M-H]^-$	$[M+Cl]^-$	$[M+NO_3]^-$	$[M+Na]^+$	$[2M+Na]^+$	相对分子质量
42.8	421	457	484	—	—	422
56.8	389	425	452	—	—	390
57.8	405	441	468	429	835	406

这 3 个未知成分的 UV 光谱,与银杏叶中的主要成分黄酮类化合物的紫外光谱不同,不存在黄酮化合物的特征吸收峰,加上样品制备提取过程中已针对性地消除了黄酮的干扰,因而可排除这几个化合物是黄酮类化合物的可能性。又因无苯环吸收,因而也不可能为另一类常见成分——银杏酚酸。这 3 个化合物的紫外光谱均存在 220nm 吸收峰,与各已知银杏内酯类成分相似,推测这几个物质更可能是银杏内酯类化合物,根据其中出现了 240nm 的吸收峰,推

断这几个化合物的结构中可能存在双键。此外,质谱显示这三个化合物的分子量均分别较银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 少 18u,且色谱流出顺序也与之相应。由于银杏内酯结构中含有多个羟基,故推测可能为羟基脱水形成双键后生成的银杏内酯类化合物的次生代谢产物。

为了从质谱检测器获得更多结构信息,又以 250V 的裂解电压进行了测定。结果在所得质谱图中不仅保存了分子离子峰信息,而且获得了更多碎片信号。因含量较低, t_R 42.9min 和 56.7min 处的未知成分未获得有效的质谱信号,银杏内酯 B 和 t_R 57.8min 处未知化合物 250V 的 ESI (—) 质谱见图 2-62。图中可见两者均可生成 $[M-H-28]^-$ 和 $[M-H-56]^-$ 的碎片,根据对已知化合物的推断,这两个离子分别为从分子去质子生成的准分子离子再进一步脱去 CO 及 C_2H_4CO 。根据三个化合物的相似性及以上有关数据,可进一步认为这三个化合物应为内酯类化合物。

为了对这些未知物进行结构确证,用制备色谱分离得到了 t_R 56.8min 和 t_R 57.8min 的化合物。用 IR 和 NMR (1H -NMR、 ^{13}C -NMR、 1H - 1H COASY、

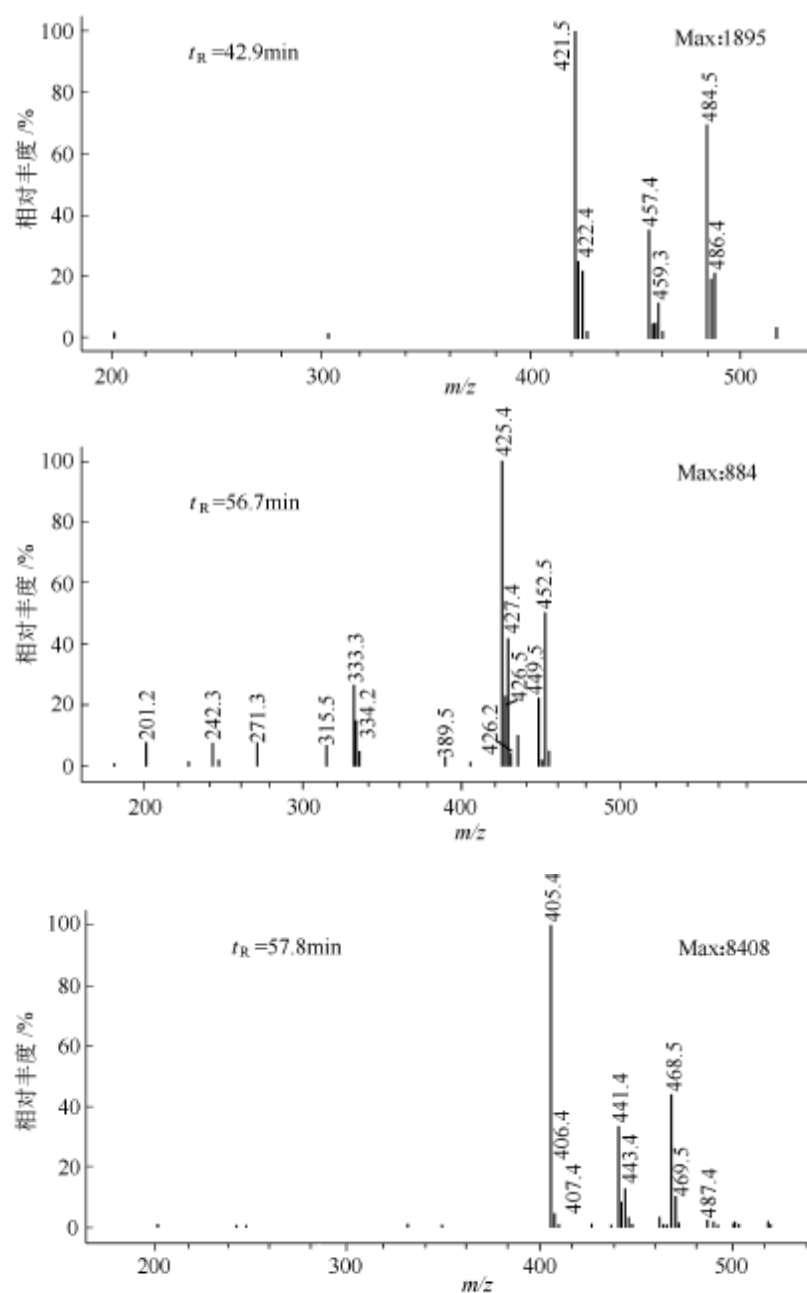
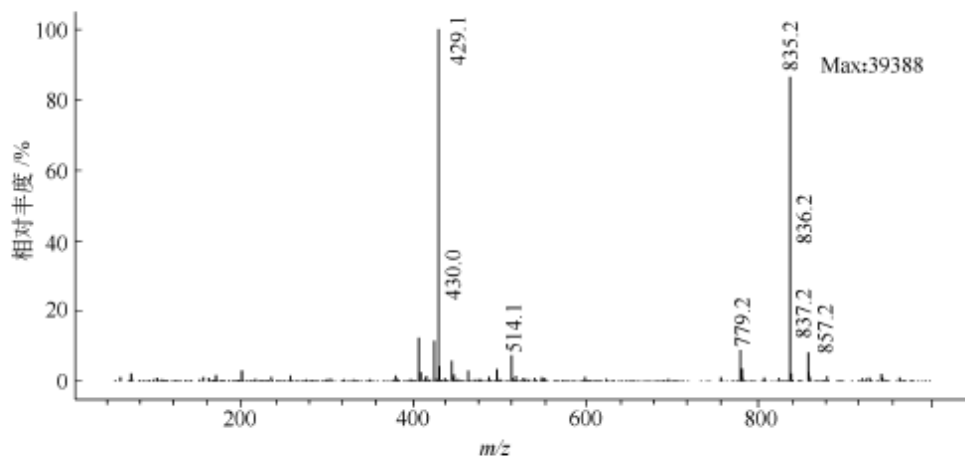
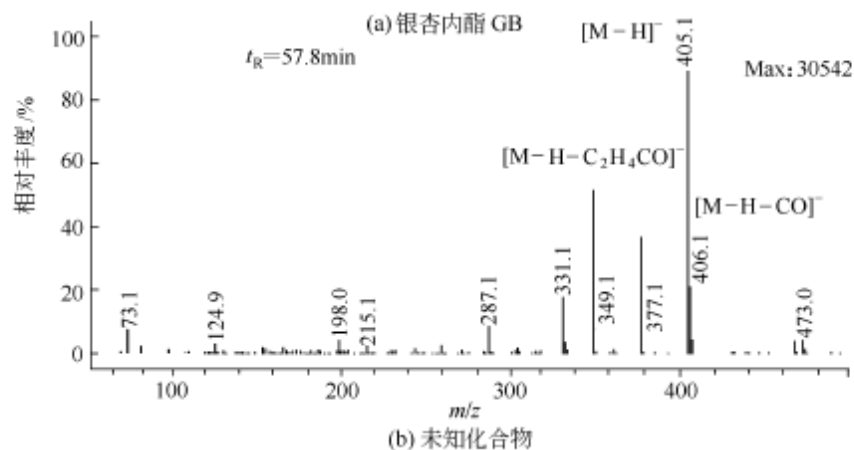
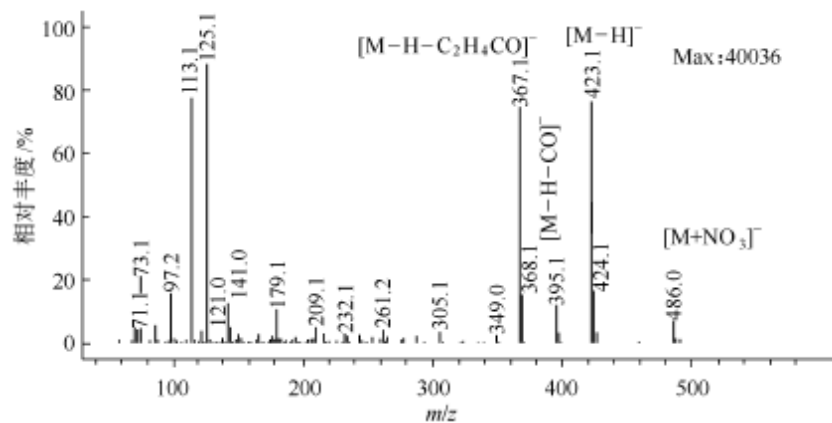


图 2-60 未知化合物 (t_R 为 42.9min、56.7min 和 57.8min) 的 ESI (-) 70V 质谱图

HMQC 和 HMBC) 等鉴定了其结构, 分别为 10-羟基-3,14-二去氢银杏内酯和 1,10-二羟基-3,14-二去氢银杏内酯, 并分别命名为银杏内酯 L 和银杏内酯 K。

异构体检查: 在植物提取物中, 经常存在各种异构体。在质谱总离子流图 (TIC) 中, 用提取离子流 (EIC) 的方法检查了 GA、GB、GC 和 BD 的异构体, 结果见图 2-63。

从图 2-63 中可以看出: 在 t_R 52.2min 处有与 GA 分子量相同的物质, 该

图 2-61 未知化合物 (t_R 为 57.8min) 的 ESI (+) 70V 质谱图图 2-62 银杏内酯 GB 和未知化合物 (t_R 为 57.8min) 的 ESI (-) 250V 质谱图

化合物的质谱与 GA 的质谱相似, 推测该物质是 GA 的异构体; 此外, 在 t_R 16.2min 和 t_R 57.9min 处也有与 GA 分子量相同的物质, 经检查发现

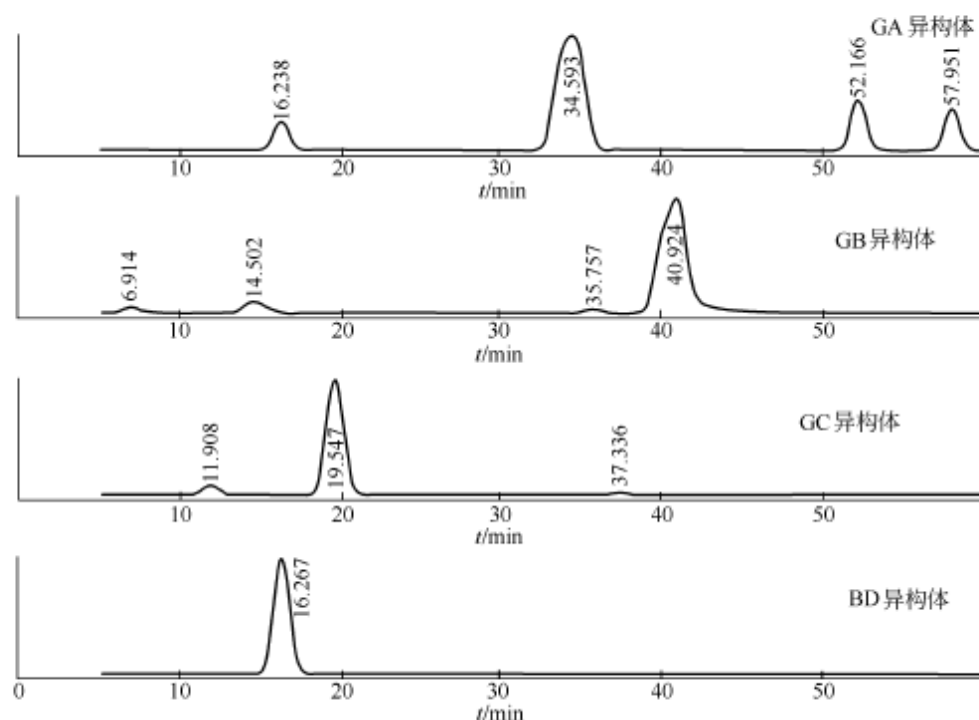


图 2-63 GA、GB、GC 和 BD 异构体的 EIC 图

t_R 16.2min 处为白果内酯中的一个杂质峰。在 EIC 图中, 在 t_R 6.9min、 t_R 14.5min 和 t_R 35.7min 的三个峰的质谱中均有 $[M-H]^-$ m/z 423 和 $[M+Cl]^-$ m/z 459 的峰, 说明这三个化合物的相对分子质量均为 424, 与 GB 相对分子质量相同; 三者的 UV 光谱也与 GB 类似, 根据文献推测 t_R 14.5min 应为银杏内酯 J, t_R 6.9min 和 t_R 35.7min 的其中之一应为银杏内酯 M, 以及另一个 GB 异构体。GC 的异构体在 t_R 11.9min 和 t_R 37.3min 处, 两者的质谱也与 GC 类似。在本实验中未发现 BD 的异构体。对于银杏内酯 A 和银杏内酯 C 的异构体的研究, 尚未见报道; 而银杏内酯 B 的第三个异构体也未见报道。

从以上分析结果可以发现在银杏内酯的提取物中, 除主成分 GA、GB、GC 和 BD 以外, 还有多个微量成分存在, 这些组分的结构与几个已知物质都相似。

(二) 银杏叶中白果酚酸指纹图谱测定及成分分析

(1) 供试品制备 精密称取碾碎银杏叶 1.0g 置 100mL 圆底烧瓶中, 加无水乙醇 40mL 浸泡后加热回流提取 60min, 过滤, 以无水乙醇洗涤残渣, 合并滤液及洗涤液, 定容至 50mL, 混匀, 精密量取 10mL 于分液漏斗中, 加稀醋酸调节 pH 至 3.0, 加入少许硅藻土及正己烷 15mL, 振荡, 静置分层后, 分取上层有机相, 减压回收溶剂, 残渣以 5mL 甲醇超声溶解, 经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

(2) 液相色谱条件 色谱柱: Zorbax Eclipse C₈ 4.6mm×150mm, 5 μ m。柱温: 40℃。流动相: 甲醇-水-冰醋酸 (80:20:0.5)。流速: 1.0mL/min。柱后分流: 1:1 (仅限 ESI 模式)。紫外检测: (243±10)nm, 同时用 DAD 记录 190~900nm 的光谱。

(3) 质谱条件 离子极性: ESI (+), APCI (-)。扫描范围: m/z 100~500。干燥气流速: 10L/min (ESI), 4L/min (APCI)。温度: 350℃。雾化气压: 310kPa (ESI), 620kPa (APCI)。毛细管电压: 4000V (ESI); 3500V (APCI)。蒸发器温度: 325℃。传输电压: 70V。

(4) 结果与讨论 质谱检测: 在相同的色谱条件下, 用 ESI 只在正离子检测条件下, 能够获得质谱信号。这是因为流动相中含有一定量的酸, 而在酸性流动相的作用下, 各种银杏酸分子羧基上的质子因酸性较弱不易解离, 因而负离子方式不能采集到质谱信号。在电喷雾离子化过程中, 各银杏酸分子通过羧基上的氧或分子中其它供电子基团结合一个质子生成正离子。相反, 当采用 APCI 源时, 只能获得负离子信号。这是由于在 APCI 源的蒸发器中, 流动相中的乙酸以分子形式随溶剂蒸发, 酸性环境散失后, 各银杏酸分子作为气相酸可给出质子, 形成负离子得以检测。这个实例可很好地说明 APCI 与 ESI 是互为补充的。

获得的 UV 和 APCI(-) TIC MS 色谱图 (图 2-64), ESI(+) TIC MS 与 APCI (-) TIC MS 图均相似。试验中, 25min 后, UV 和 MS 均无信号产

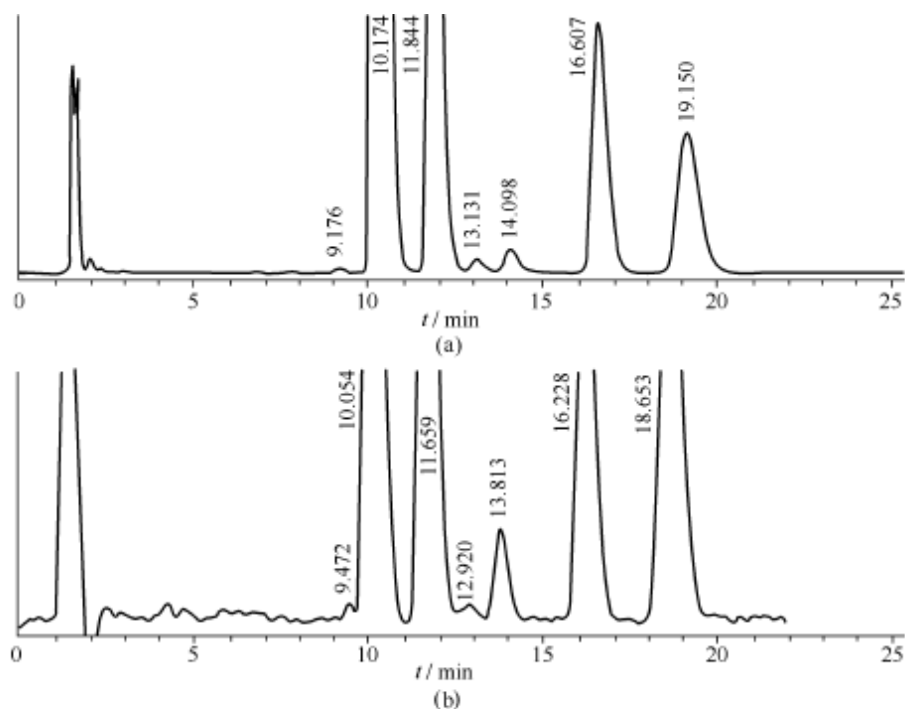


图 2-64 银杏酸检测 UV 色谱图 (a) 和 APCI (-) TIC MS 图 (b)

生, 故不再记录。

由 ESI (+) 和 APCI (-) 得到的各色谱峰的质谱图可互为补充, 以确定各化合物的分子量。在 ESI (+) 谱中, 各化合物在 70V 的电压下都能得到一组准分子离子峰, 分别对应 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 、 $[M+2Na-H]^+$, 而在 APCI (-) 70V 谱中, 得到的准分子离子峰是 $[M-H]^-$ 。比较 ESI(+)70V 和 APCI (-) 70V 的质谱, 即可确定各流分的分子量, 进而确定其归属, 结果见表 2-13。由于正、负离子状态下稳定电荷的位置不同, 故因裂解过程不同而生成不同的碎片离子。在 ESI (+) 谱中, 主要得到脱 H_2O 峰, 而在 APCI (-) 谱中, 各化合物均容易脱去 CO_2 , 得到 $[M-H-CO_2]^-$ 峰。由此即可证明 $t_R 10.1min$ 的色谱峰对应的是白果新酸, 而非与之分子量相等的白果二酚。

表 2-13 银杏酸 LC/MS 实验相关数据

项 目	白果新酸	白果酸	氢化白果酸	氢化白果亚酸
UV t_R/min	10.1	11.8	13.1	16.6
$[M+H]^+$	321	347	335	349
$[M+Na]^+$	343	369	357	371
$[M+2Na-H]^+$	365	391	379	393
$[M+H-H_2O]^+$	303	329	317	331
$[M-H]^-$	319	345	—	347
$[M-H-CO_2]^-$	275	301	—	303
M_w	320	346	334	348

为了进一步确证上述归属的正确性, 升高碎裂器电压至 180V 再进行测试, 结果在各化合物的质谱图的低质量端均得到了一些特征碎片离子。在白果新酸的质谱图 (图 2-65) 中, 得到了 m/z 107、 m/z 135、 m/z 145 及 m/z 159 等特征碎片信息。裂解过程多为 β -H 转移, m/z 145 则是由 α -H 转移形成的特征离子。其它几个化合物的裂解过程与此类似。由此可进一步推断上述归属的正确性。此外, 升高碎裂器电压后, 在各化合物的质谱图的高质量端得到了相对更复杂的加合物离子峰, 如在白果新酸的质谱图中, 可明显观察到 m/z 359

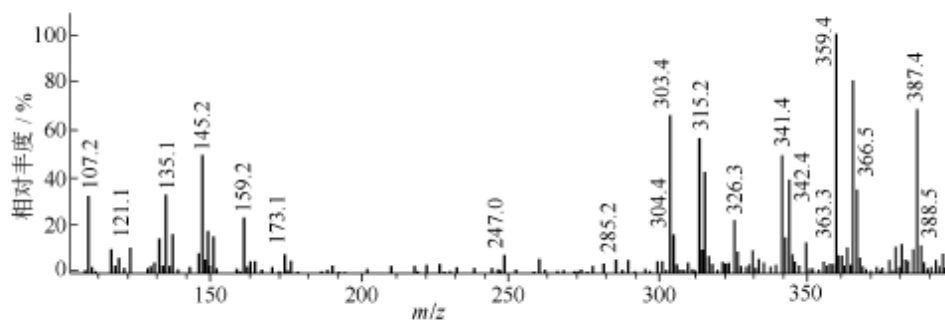


图 2-65 白果新酸质谱

$[M+K]^+$ 、 m/z 366 $[M+2Na-H]^+$ 、 m/z 387 $[M+3Na-2H]^+$ 的峰, 以及 m/z 325 $[M+Na-H_2O]^+$ 和 m/z 341 $[M+K-H_2O]^+$ 的峰。

在 UV 色谱图中, t_R 13min 处的色谱峰的 ESI(+) 和 APCI(-) 的质谱图中, 检测到这样一些离子: m/z 373 $[M+H]^+$, m/z 355 $[M+H-H_2O]^+$, m/z 337 $[M+H-2H_2O]^+$, m/z 395 $[M+Na]^+$, m/z 417 $[M+2Na-H]^+$, m/z 371 $[M-H]^-$ 、 m/z 327 $[M-H-CO_2]^-$ 。此外, UV 色谱图中, t_R 19min 处的色谱峰对应的 ESI(+) 和 APCI(-) 的质谱图中, 检测到 m/z 375 $[M+H]^+$ 、 m/z 357 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 397 $[M+Na]^+$ 、 m/z 419 $[M+2Na-H]^+$ 、 m/z 373 $[M-H]^-$ 、 m/z 329 $[M-H-CO_2]^-$ 。在已知的银杏酸类化合物中, 目前尚无与这两个物质相对应的化合物; 从在线 DAD 记录所得紫外光谱可看出这两个物质的紫外光谱很相似, 并且与已知化合物也较类似, 从上述数据及提取分离方法等方面考虑, 推测这两个化合物可为比银杏酸分子多两个饱和碳原子 ($-CH_2-CH_2-$) 及多一对双键 ($-CH=CH-$) 的同系物。

分析结果发现银杏总酸中以白果新酸、白果酸、氢化白果酸的含量相对较高, 另外尚含有少量氢化白果亚酸及未知化合物。

(三) 苦参注射液指纹图谱研究

苦参 (*Sophora flavescens* Ait.) 是一种常用中药, 为豆科槐属植物苦参的干燥根。苦参中主要含有生物碱、黄酮等化学成分。苦参注射液为总生物碱制剂。苦参生物碱的 HPLC 分析, 常用反相离子对色谱法, 需严格控制流动相的 pH 和离子对试剂的浓度, 色谱系统平衡缓慢, 不宜梯度洗脱; 也可采用正相色谱法, 但使用过程中柱效下降, 重现性较差。用 Zorbax Extend C₁₈ 柱, 调整流动相的 pH 为 8, 使生物碱成为游离基, 在反相色谱柱上保留, 得以分离。

(1) 供试液的制备

① 药材样品处理 取苦参药材粉末 (过 40 目筛) 1.0g, 置于 150 mL 圆底烧瓶中, 加水 40mL, 回流 1h (沸腾开始计时), 用滤纸滤过, 取续滤液放冷, 经 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过, 即得。

② 苦参总生物碱 (中间体) 精密称取适量, 以流动相 A 溶解制成 2.0mg/mL 的溶液, 然后经 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过, 即得。

③ 注射液 将注射液成品直接以 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过, 即得。

取以上供试液各 5 μ L 分别注入 LC/MS 联用仪进行测定。

④ 参照物 以指纹图谱中氧化苦参碱 (保留时间为 10min) 作为指纹图谱的参照物。

(2) 液相色谱条件 色谱柱: Zorbax Extend C₁₈ 柱, 2.1mm×50mm, 5 μ m。保护柱: Zorbax Extend C₁₈ 柱, 2.1mm×12.5mm, 5 μ m。柱温: 25℃; 流速: 0.5mL/min。检测波长: 220nm。记录时间: 60min。

流动相 A: 10mmol/L 的乙酸铵水溶液, 用浓氨水调 pH 值为 8.0; 流动相 B: 8.5mmol/L 的乙酸铵的甲醇-水溶液 (甲醇: 水=9:1), 采用梯度洗脱: 0~30min, B 0~40%; 30~55min, B 40%~100%; 55~60min, B 100%; 60~61min, B 100%~0。平衡 5min。

(3) 质谱条件 MS 记录总离子流 (TIC) 色谱图。离子扫描方式: ESI(+). 质量扫描范围: 120~800。毛细管电压: 4000V。传输/裂解电压: 70V。干燥气 (N₂) 流速: 10L/min。干燥气压力: 310kPa。干燥气温度: 350℃。

(4) 结果和讨论

① 药材提取方法 考察了苦参药材的氯仿加浓氨溶液提取法、水提取法以及 50% 甲醇-水溶液提取法。发现氯仿加浓氨溶液提取法和水提取法主要提取生物碱类成分, 提取物相似。50% 甲醇-水溶液提取法则提取了生物碱和黄酮两大类成分。苦参注射液的有效成分为生物碱, 因指纹图谱主要考察与成品相关的类别成分, 综合各方面的因素, 苦参药材采用水作为提取溶剂。此法能最大限度地保留供试品中的生物碱类成分, 提取方法简便、无毒且与生产工艺中药材的提取方法一致, 与注射剂的指纹图谱有很好的相关性。

② 检测波长的选择 苦参中所含的生物碱类化学成分在 210~230nm 范围紫外吸收较强, 最大吸收波长在 210nm 处, 考虑 HPLC 梯度洗脱中基线的稳定性等因素, 选择 220nm 作为检测波长。

苦参生物碱碱性较强, 所以 LC 分离较困难。试验中曾试用过氨基柱 (Hypersil APS2 4.6mm×150mm, 5 μ m)、ODS 柱 (Zorbax Bonus-RP 4.6mm×150mm, 5 μ m) 和 Zorbax Extend C₁₈ 柱 (2.1mm×50mm, 5 μ m)。最后确定所使用的色谱柱为 Zorbax Extend C₁₈ 柱 (2.1mm×50mm, 5 μ m)。

③ 指纹图谱中参照物的选择 用外标法对照可知, 图谱中保留时间为 10min 的色谱峰为氧化苦参碱, 考虑到氧化苦参碱的标准品易得到, 其色谱峰与其它峰分离良好, 各批样品中均为主峰, 且峰形稳定, 保留时间适中, 故采用此峰作为参照物峰。

④ 重复进样精密度 取同一供试品溶液, 连续进样 5 次, 考察色谱峰的相对保留时间和峰面积比值的一致性, 试验结果表明重复进样精密度良好。

⑤ 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 24h 内不同时间进样, 考察色谱峰的相对保留时间和峰面积比值的一致性, 试验结果表明供试品溶液至少在 24h 内稳定。

⑥ 重复性试验 取同一批号的供试品, 按供试品的制备和检测方法制备

供试品并进行检测。考察色谱峰的相对保留时间和峰面积比值的一致性，试验结果表明其重复性良好。

⑦ 指纹图谱及其相关性 图 2-66 为苦参药材 [图 2-66 (a)]、中间体 [图 2-66 (b)]、注射液 [图 2-66 (c)] 的 HPLC/UV 典型指纹图谱。从图中可以看出，苦参药材中峰 1、2、3、4、5 处的色谱峰在苦参中间体和注射液中的相应位置均存在这些色谱峰。由此可见，苦参药材、中间体和注射液指纹图谱之间存在相关性。

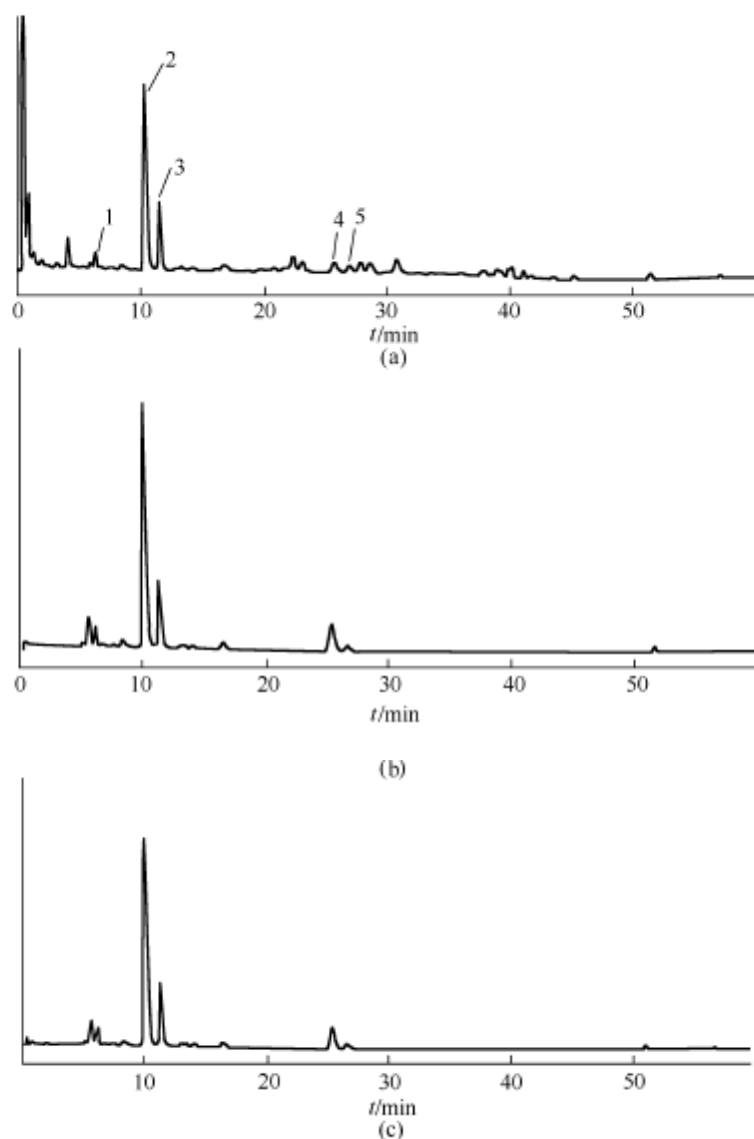


图 2-66 苦参药材 (a)、中间体 (b)、注射液 (c) 的 HPLC/UV 指纹图谱

⑧ 指纹图谱中主要色谱峰的鉴别 采用 LC/ESI/MSD 联用技术，鉴别了苦参药材指纹图谱中的 5 个色谱峰。根据质谱所提供的分子量信息，与苦参

碱、氧化苦参碱对照,结合文献数据,对注射液指纹图谱中的主要色谱峰进行了归属,其质谱数据见表 2-14。

表 2-14 主要色谱峰的鉴别

峰号	相对分子质量	化 合 物
1	280	槐花醇 N-氧化物
2	264	氧化苦参碱
3	262	N-氧化槐碱
4	248	苦参碱
5	246	槐果碱或异槐果碱

四、药物代谢动力学及代谢物研究

药物代谢涉及药物在生物体内吸收、分布、代谢和排泄的研究。

现在,测定药物代谢动力学参数以研究药物的生物利用度和生物等效性,常用三级串联四极质谱仪,因其有较高的选择性、信噪比。但是,单级四极仪器小型、价廉,能满足多数定量应用。仔细选择色谱分离和质谱检测条件,可以达到 ng/mL 的检测限。

药物代谢物的研究中,由于母体药物结构已知,药物代谢途径常常可以预期,所以常常应用离子阱质谱仪的多级质谱功能进行代谢物鉴定。

(一) 扎来普隆 (Zaleplon) 生物等效性研究

扎来普隆 (Zaleplon) 是由美国惠氏医药公司研制开发的用于镇静催眠的药物。扎来普隆在人体血浆中的浓度较低,用紫外检测灵敏度不够。用高效液相色谱/电喷雾离子化质谱联用技术,采用选择性离子检测 (SIM) 测定人体血浆中扎来普隆的浓度,可提高检测灵敏度。用此法测定了 20 名健康志愿者口服两种扎来普隆制剂后的血药浓度,对两者的药动学和生物利用度进行了比较,为临床用药提供了依据。

(1) 色谱条件 色谱柱: Kromasil-C₁₈ 柱, 4.6mm×250mm, 5μm。柱温: 30℃。流动相: 0.5%冰醋酸水溶液-甲醇 (30:70)。流速: 1mL/min。

(2) 质谱条件 检测方法: ESI (+)。选择性离子检测 (SIM): 扎来普隆 m/z 306.1[M+H]⁺; 非那西丁 m/z 180.1[M+H]⁺。喷雾电压: 4000V。传输/裂解电压: 100V。干燥气 (N₂) 流速: 10L/min。雾化气压力: 320kPa。干燥气温度: 350℃。

(3) 样品制备 对照品溶液的配制: 精密称取扎来普隆对照品适量,以乙醇溶解配制成约 500μg/mL 对照品贮备液,以水稀释成各种浓度的扎来普隆对照品溶液; 精密称取非那西丁对照品适量,加甲醇溶解配制成约 200μg/mL 的对照品贮备液,以甲醇经过稀释得浓度约为 200ng/mL 的非那西丁溶液作为内标溶液。

(4) 血浆样品的处理 取 10mL 尖底玻璃离心管, 加入待测血浆 1mL, 加入内标溶液 25 μ L, 加 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 0.1mL, 加乙酸乙酯 5mL, 涡旋 3min, 3500r/min 离心 10min, 取上层清液约 4mL 于另一离心管中, N₂ 气吹干, 加入流动相 100 μ L, 涡旋 60s, 溶解残渣。16000r/min 离心 10min, 取 40 μ L 上层清液注入 HPLC/ESIMS 系统, 记录分析结果。

(5) 方法的专属性 在本实验条件下, 血浆中杂质不干扰样品的测定。扎来普隆和非那西丁的保留时间分别为 3.9min 和 4.1min (图 2-67), 从图中可见本法具有较高的专属性。

(6) 血浆中扎来普隆标准曲线的制备 精密取扎来普隆对照品溶液适量置于离心管中, 各加入空白血浆 1mL 和内标溶液 25 μ L, 制成浓度约为 0.5ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL、10.0ng/mL、20.0ng/mL、50.0ng/mL 的血浆样品。按“(4) 血浆样品的处理”项下操作, 每种浓度做 5 份样品, 记录峰面积。以扎来普隆的标准浓度为横坐标, 扎来普隆与内标的峰面积比值 (A_s/A_{is}) 为纵坐标, 以 $1/y^2$ 为权重进行线性回归, 绘制标准曲线图。结果表明, 扎来普隆在 0.5~50ng/mL 浓度范围内, 线性关系良好。回归方程为 $y=0.233x-0.072$, 相关系数 $r=0.9996$ 。扎来普隆的最低定量限为 0.5ng/mL。

(7) 回收率试验

① 样品 1 取 10mL 尖底玻璃离心管, 加入空白血浆 1mL, 定量加入扎来普隆标准溶液, 分别配制成浓度约为 0.5ng/mL、5.0ng/mL、50.0ng/mL 的低、中、高三个浓度的样品, 加 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 0.1mL, 定量加乙酸乙酯 5mL, 涡旋 3min, 3500r/min 离心 10min, 定量取上层清液 4mL 于另一离心管中, 加入内标溶液 25 μ L, 涡旋混匀, N₂ 气吹干, 加入流动相 100 μ L, 涡旋 60s, 溶解残渣。16000r/min 离心 10min, 取 40 μ L 上层清液注入 HPLC/ESIMS 系统, 记录分析结果。计算扎来普隆与内标的峰面积比值 (A_1/A_{i1})。

② 样品 2 取 10mL 尖底玻璃离心管, 定量加入扎来普隆标准溶液, 分别配制成浓度约为 0.5ng/mL、5.0ng/mL、50.0ng/mL 的低、中、高三个浓度的样品, 加入内标溶液 25 μ L, 加少量乙酸乙酯和 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 0.1mL, 涡旋混匀, N₂ 气吹干, 加入流动相 100 μ L, 涡旋 60s, 溶解残渣。16000r/min 离心 10min, 取 40 μ L 上层清液注入 HPLC/ESIMS 系统, 记录分析结果。计算扎来普隆与内标的峰面积比值 (A_2/A_{i2})。

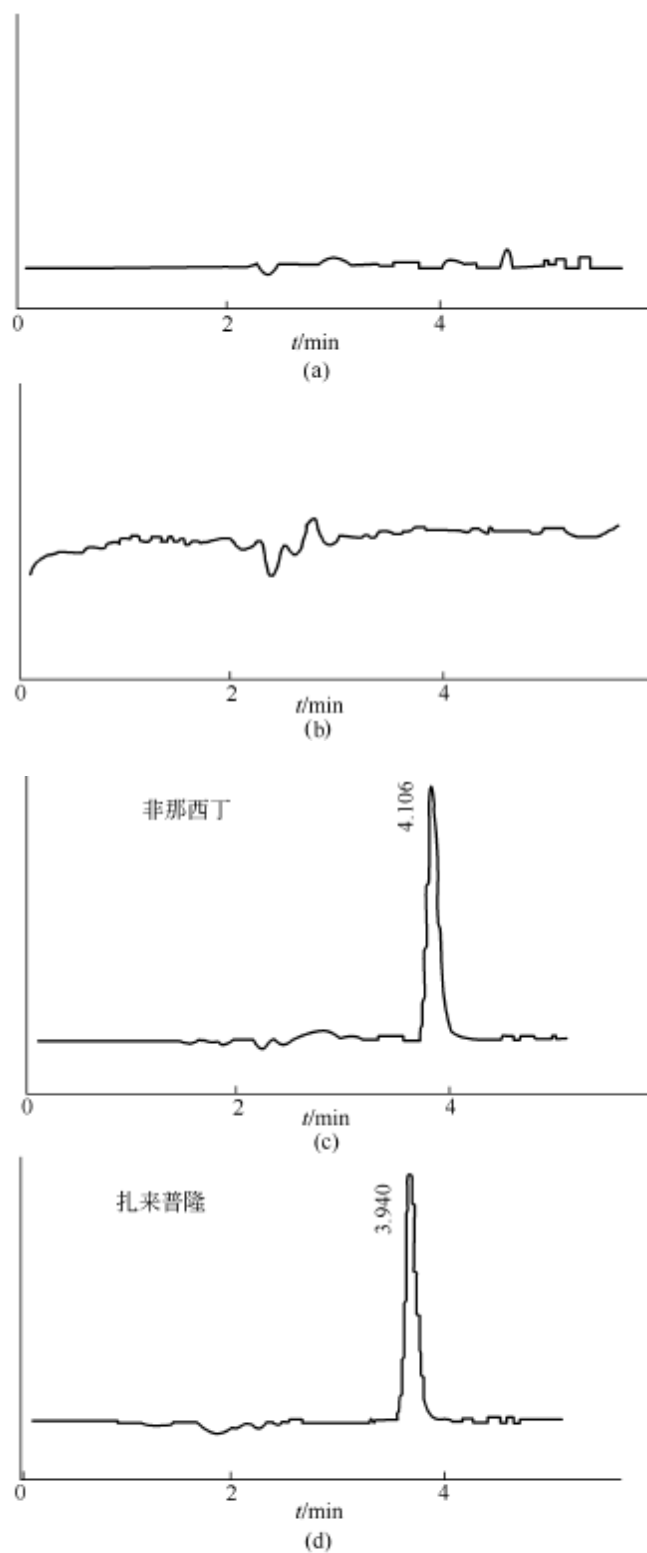


图 2-67 LC/MS 选择离子流色谱图 (a) 人血浆空白 m/z 180;
(b) 人血浆空白 m/z 360; (c) 含药血浆 m/z 180; (d) 含药血浆 m/z 360

按公式 $\frac{A_1/A_{i1} \times 5/4}{A_2/A_{i2}} \times 100\%$ 计算扎来普隆的绝对回收率, 结果见表 2-15。

表 2-15 扎来普隆血浆回收率 ($n=5$)

加入量/(ng/mL)	回收率/%	RSD/%
0.5	79.76 ± 1.94	2.43
5.0	85.68 ± 5.26	6.13
50.0	89.27 ± 2.75	3.08

(8) 精密度试验 按“(6) 血浆中扎来普隆标准曲线制备”项下操作配制扎来普隆浓度分别为 0.5ng/mL、5.0ng/mL 和 50.0ng/mL 的血浆样品, 加入内标溶液 25 μ L, 按“(4) 血浆样品的处理”项下操作, 用 HPLC/ESIMS 测定, 计算扎来普隆与内标的峰面积比值。测定日内精密度和 5 天内的日间精密度, 结果见表 2-16。

表 2-16 方法的精密度 ($n=5$)

浓度/(ng/mL)	日 内		日 间	
	$\bar{x} \pm s$	RSD/%	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
0.5	0.51 ± 0.01	1.16	0.52 ± 0.04	8.30
5.0	5.19 ± 0.05	0.95	5.43 ± 0.25	4.61
50.0	46.7 ± 0.38	0.82	46.1 ± 0.86	1.86

注: $\bar{x}$ 为测得均值; s 为标准偏差。

(9) 结果与讨论: 药代动力学研究 20 名健康志愿者口服扎来普隆胶囊和片剂 10mg 后, 其给药后的血药浓度-时间曲线见图 2-68。将所得血药浓度-时间数据用 Bapp2.0 程序计算药物的药代动力学参数, 再取均值 ($\bar{x} \pm s$)。

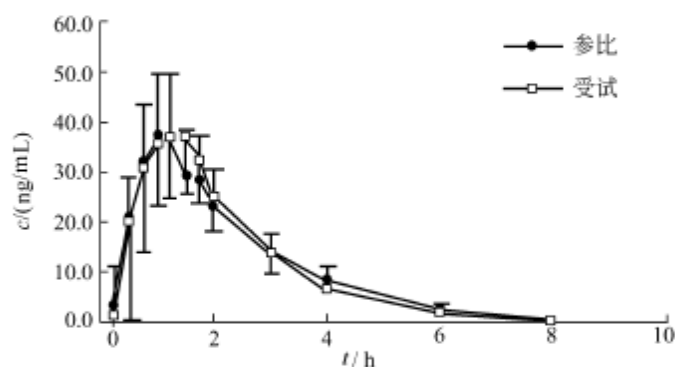


图 2-68 20 名受试者口服扎来普隆受试胶囊和参比片剂后平均血浆药物浓度-时间曲线

本试验采用非房室模型依赖性参数估算方法, 求得口服扎来普隆胶囊和参

比片剂的药代动力学参数如表 2-17 所示。算得供试胶囊对参比片剂的平均相对生物利用度为 $98.2\% \pm 12.9\%$ 。 $AUC_{0 \sim 8}$ 、 $AUC_{0 \sim \infty}$ 、 $c_{\max}$ 通过自然对数转换后经交叉试验下的方差分析和双单侧 t 检验均无显著性差异， $t_{\max}$ 经非参数检验（Wilcoxon 符号秩检验）无显著性差异（ $P > 0.05$ ），认为扎来普隆胶囊和片剂具有生物等效性。

表 2-17 口服扎来普隆后的人体药代动力学参数

参数	受试胶囊	参比片剂	参数	受试胶囊	参比片剂
$t_{1/2}(K_e)/h$	0.92 ± 0.16	1.08 ± 0.24	$AUC_{0 \sim 8}/ng \cdot h/mL$	90.31 ± 17.86	92.28 ± 16.36
$t_{\max}/h$	1.18 ± 0.41	1.16 ± 0.31	$AUC_{0 \sim \infty}/ng \cdot h/mL$	92.24 ± 18.05	94.69 ± 16.70
$c_{\max}/ng/mL$	46.76 ± 10.73	43.85 ± 12.29			

（二）罗红霉素及其代谢物的电喷雾离子阱质谱研究

罗红霉素（Roxithromycin, RXM）化学名为（9E）-{O-[(2-甲氧基乙氧基）甲基] 肟基} 红霉素，是新型半合成大环内酯类抗生素。在已有研究的基础上，采用 LC/MS 联用技术，在人尿样中检出了罗红霉素的 10 种代谢物，并利用质谱解析软件，系统分析了这些代谢物的多级质谱断裂规律。

（1）试剂与仪器 罗力得片，含罗红霉素 150mg/片（法国罗素优克福公司）；甲醇、乙腈为色谱纯试剂（山东禹王公司）；其余化学试剂均为分析纯（沈阳化学试剂厂）。

罗红霉素标准品和（9E）-红霉素肟由沈阳华泰药物研究所提供，（9Z）-罗红霉素、（9E）-去甲基红霉糖罗红霉素和（9Z）-红霉素肟按文献方法合成，（9E）-N-去甲基罗红霉素由罗素优克福公司提供，（9E）-O-去甲基罗红霉素由沈阳药科大学孙铁民教授合成。

Finnigan 公司 LCQ 型液相色谱-质谱联用仪，包括 ESI（电喷雾电离）源及 LCQ 1.0 数据处理系统。岛津公司 LC-10A 色谱系统。Highchem 公司 MassFrontier 1.0 质谱解析软件。

（2）待测尿样的制备 4 名健康女性志愿受试者，年龄 23~25 岁，单剂量口服 150mg 罗红霉素片，收集 0~12h 尿样。取 1mL 尿样，加入 0.1mol/L 碳酸钠溶液 200 μ L 碱化，涡旋混匀后加入乙醚 3mL，涡旋混合 1min，往复振荡 10min，离心后取有机相于 40℃ 下氮气流吹干，残留物溶于 100 μ L 流动相中，用于液相色谱-质谱分析。

（3）液相色谱-质谱分析 色谱柱为 Alltima C₁₈（200mm × 4.6mm，5 μ m，天津凯德公司），流动相为甲醇-乙腈-0.01 mol/L 乙酸铵（体积比 10 : 43 : 47），流速 0.6mL/min，柱温 20℃，进样量 50 μ L；离子源（ESI）喷射电压 4.20kV，毛细管温度 180℃，毛细管电压 30V，鞘气（N₂）流速 0.75L/min，辅助气（N₂）流速 0.15L/min。正离子方式检测，采用全扫描一级质谱

(full scan)、选择离子全扫描二级质谱 (full scan MS^2) 和选择离子全扫描三级质谱 (full scan MS^3) 3 种方式。

(4) 结果与讨论

① 尿样中 RXM 代谢物的鉴定 在 LC/(+)-ESI-MS 全扫描一级质谱条件下, 测得尿样中有一组罗红霉素相关物质的准分子离子峰, 分别为 m/z 837、 m/z 823、 m/z 749、 m/z 735 和 m/z 679, 对上述质荷比的代谢物进行 LC/MS 联机检测, 发现除 m/z 823 外, 每个 SIM 色谱图中均出现一对 MS, MS^2 和 MS^3 质谱相同的色谱峰 (图 2-69)。与合成的标准物质及胆汁中罗红霉素代谢物的 LC/MS 分析结果对比, 确认它们分别对应于罗红霉素及其 (9Z)-异构体 (M1)、(9E)-红霉素肟和 (9Z)-红霉素肟 (M5 和 M6)、(9E)-N-去甲基红霉素肟和 (9Z)-N-去甲基红霉素肟 (M7 和 M8) 以及 (9E)-去红霉素糖罗红霉素和 (9Z)-去红霉素糖罗红霉素 (M9 和 M10)。在 m/z 823 的 SIM 色谱图中出现 3 个色谱峰, M2 和 M3 的 MS^2 和 MS^3 质谱图一致, 与 M4 不同。通过与 (9E)-O-去甲基罗红霉素、(9E)-N-去甲基罗红霉素标准品对照, 证明 M2 和

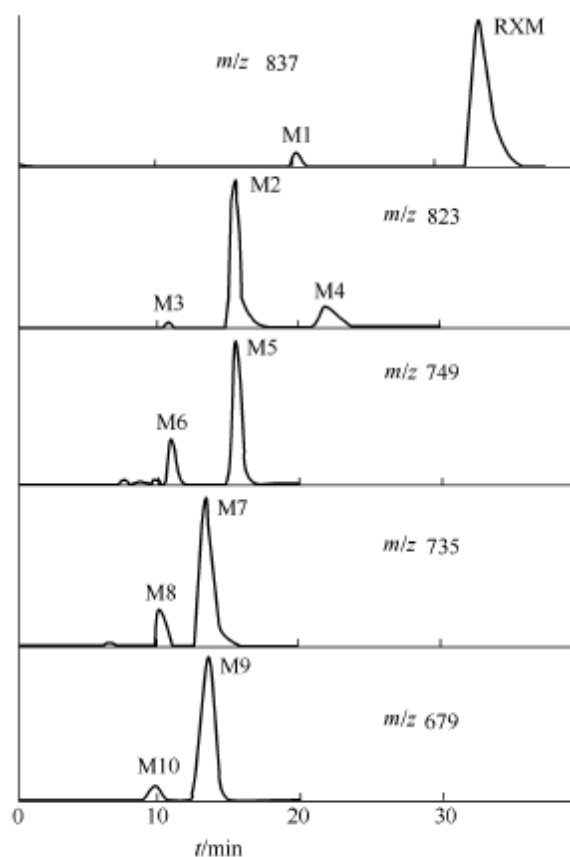


图 2-69 尿样中罗红霉素及其代谢物的选择性离子监测 (SIM) 色谱图

M3 为罗红霉素的 O-去甲基代谢物的 (9E)-异构体和 (9Z)-异构体, M4 为罗红霉素的 (9E)-N-去甲基代谢物。

平行对照实验证明, 罗红霉素及其代谢物 C—N 双键的异构化是体内代谢过程中发生的, 而在体外生物样品的处理过程中未发生异构化。在尿样中, 未检出胆汁中曾发现的罗红霉素和红霉素肟的双去甲基衍生物。每一对 C—N 双键异构体均可由 LC 分离, 在所选的反相高效液相色谱条件下, (9Z)-异构体均比相应的 (9E)-异构体先出峰, 且色谱峰分离度良好。因每对 (9E)-异构体和 (9Z)-异构体的各级质谱均相同, 故仅对 6 种具有 (9E)-构型的衍生物质谱进行了详细解析。

② 尿样中 RXM 及其代谢物的质谱行为分析 罗红霉素和 M1 的 $[M+H]^+$ 准分子离子为 m/z 837, 其 MS^2 质谱丢失 158u 的中性碎片红霉糖, 生成 m/z 679 的子离子。为进一步了解它们的质谱断裂规律, 对 m/z 679 进行 MS^3 质谱分析, 生成一系列碎片离子 m/z 661、 m/z 603、 m/z 558、 m/z 540 和 m/z 522, 根据质谱解析软件提供的裂解图, 其中 m/z 661 为 m/z 679 脱水后生成, m/z 603 为 m/z 661 进一步脱去烷基侧链 $CH_2-CH-OCH_3$ 后生成; m/z 558 为一质荷比为偶数的离子, 该离子应为脱去一含氮碎片后产生的, RXM 的结构中含有 2 个氮原子, 根据分子结构, 推测是 14 元环 C-9 位上的羟肟键重排后断裂, 脱去含氮烷基侧链 $C_4H_9O_3NH_2$ 后生成, 然后脱水, 生成 m/z 540, m/z 522。碎片 m/z 522 也可由 m/z 837 直接脱去红霉糖 (158u) 和氨基糖 (157u) 后产生。RXM 的质谱断裂过程见图 2-70。

代谢物 M2、M3 和 M4 的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰为 m/z 823, 与 m/z 837 相差 14u, 分别为 RXM 的 O-去甲基和 N-去甲基代谢物。它们的 MS^2 质谱优先生成脱去红霉糖的碎片 m/z 665。对 m/z 665 进行 MS^3 质谱分析, 发现 M2 和 M3 生成一系列质荷比为偶数的碎片离子 m/z 558、 m/z 540、 m/z 522 和 m/z 508, 而 M4 生成系列碎片离子 m/z 544、 m/z 526、 m/z 522 和 m/z 508。M2 和 M3 与罗红霉素的差别在于 C-9 位烷基侧链末端少了一个甲基, 它们的 MS^3 质谱脱去该烷基侧链 (107u) 后, 即生成与罗红霉素相同的碎片离子 m/z 558、 m/z 540 和 m/z 522, 而 m/z 508 为直接脱去红霉糖 (158u) 和氨基糖 (157u) 后产生。M4 与罗红霉素的差别在于氨基糖侧链的 N 上少了一个甲基, 其碎片离子 m/z 544 也是脱去环上 C-9 位含氮烷基侧链 (121u) 生成, 并进一步脱水生成 m/z 526 和 m/z 508, 而 m/z 522 则是由 m/z 823 直接脱去红霉糖 (158u) 和氨基糖 (143u) 后产生。

尿样中各 (9E)-构型代谢物的 MS^2 和 MS^3 质谱断裂方式见图 2-71, 相应全扫描质谱图见图 2-72, 其 (9Z)-异构体的质谱断裂方式与之相同。

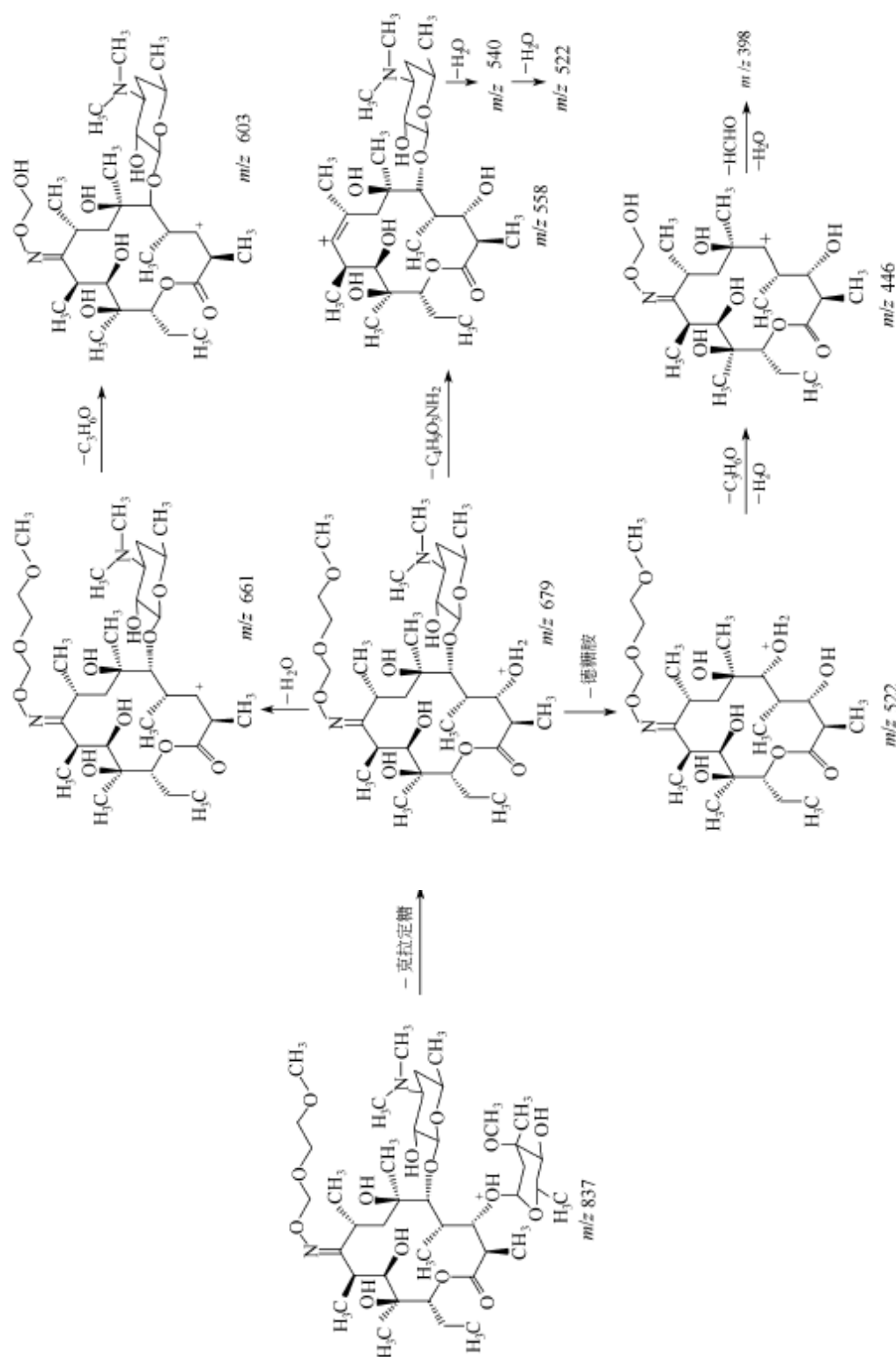


图 2-70 罗红霉素的 MS/MS 裂解图

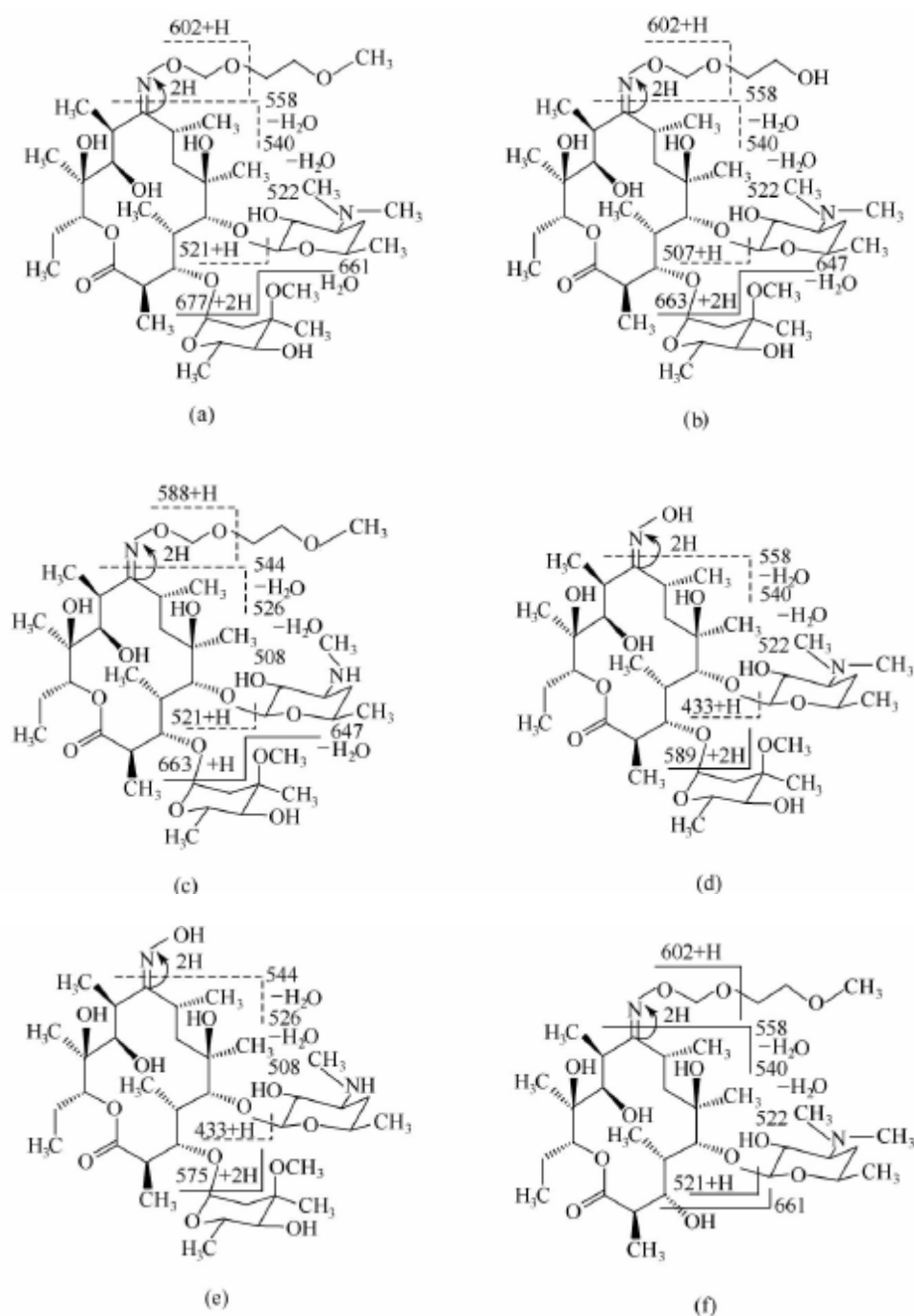
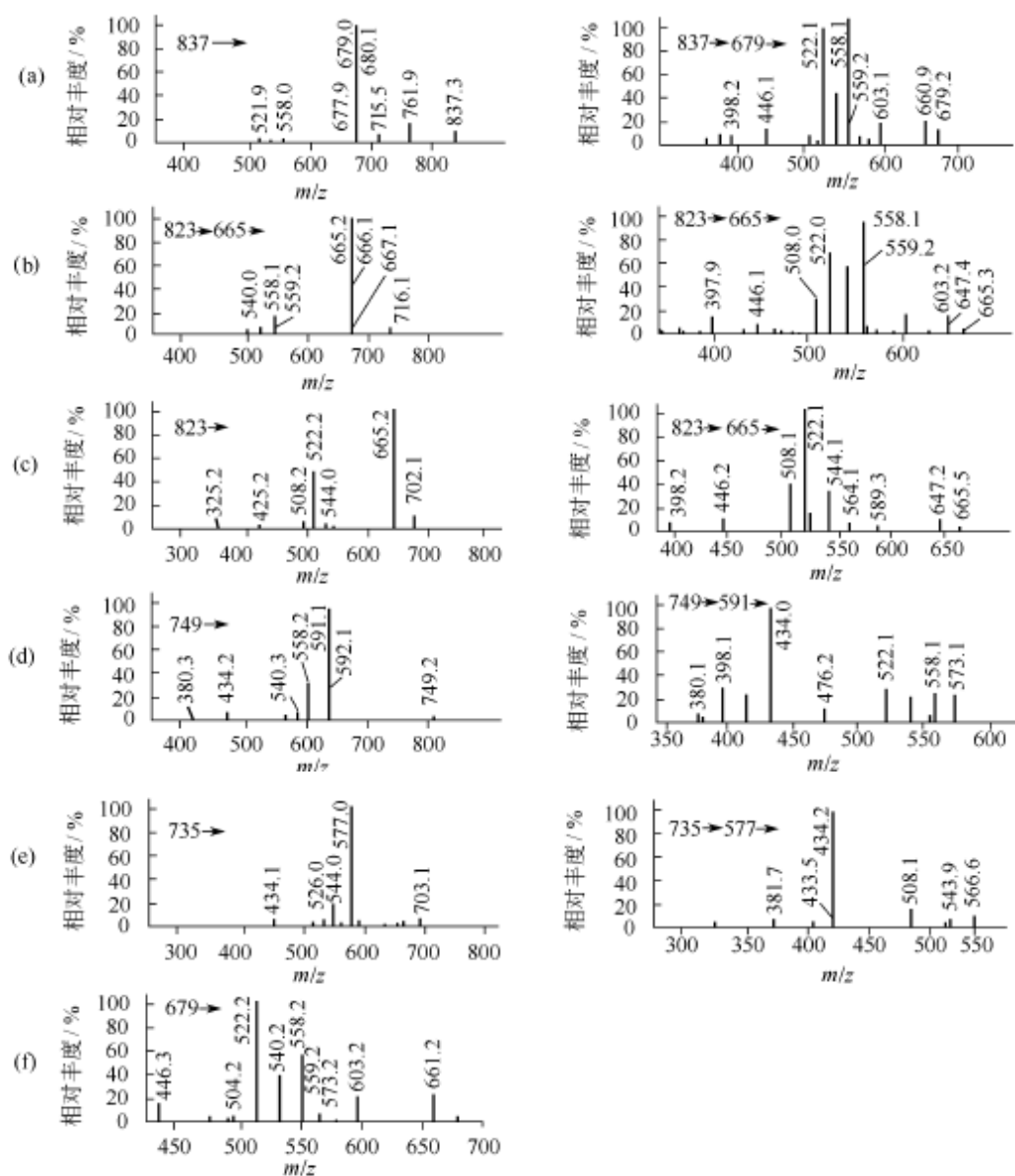


图 2-71 罗红霉素及其 (9E)-构型代谢物的质谱断裂方式图

代谢物 M9 和 M10 的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰为 m/z 679, 与 m/z 837 相差 158u, 为 RXM 的脱红霉糖代谢物。它们的 MS^2 质谱与 m/z 837 的 MS^3 质谱一致, 断裂规律也相同。

图 2-72 罗红霉素及其(9E)-构型代谢物的 MS² (左) 和 MS³ (右) 质谱图

代谢物 M5 和 M6 的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰为 m/z 749, 与 m/z 837 相差 88u, 为 RXM 的红霉素衍代谢物。它们的 MS² 质谱优先生成脱去红霉糖的碎片 m/z 591。对 m/z 591 进行 MS³ 质谱分析, 发现也生成一系列质荷比为偶数的碎片离子 m/z 558、 m/z 540、 m/z 522 和 m/z 434。 m/z 558 为 m/z 591 通过环上的羟肟键重排后断裂, 脱去 NH_2OH 后生成。 m/z 558 进一步脱水, 生成 m/z 540 和 m/z 522。 m/z 434 为 m/z 591 进一步脱去氨基糖 (157u) 后产生。代谢物 M7 和 M8 的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰为 m/z 735,

与红霉素肟离子 (m/z 749) 相差 14u, 为红霉素肟的 N-去甲基代谢物。它们的 MS^2 质谱优先脱去红霉糖, 生成 m/z 577。对 m/z 577 进行 MS^3 质谱分析, 发现生成系列碎片离子 m/z 544、 m/z 526、 m/z 508 和 m/z 434。与红霉素肟的 MS^3 质谱碎片 m/z 558、 m/z 540 和 m/z 522 相比, M7 和 M8 的 MS^3 质谱碎片相应少 14u, 说明它们之间存在结构差异的氨基糖没有断裂, 也与上文关于红霉素肟的质谱断裂规律一致。 m/z 434 同样为 m/z 577 进一步脱去氨基糖 (143u) 后产生。

③ RXM 及其代谢物的质谱行为特征 进行药物代谢研究, 尤其是体内代谢物的研究, 因其浓度较低, 分离出代谢物纯晶进行结构鉴定的难度很大。应用 LC/MS 联用技术有助于解决这一难题, 它可同时分离鉴定生物体液中的药物及其代谢物。其主要依据是药物发生代谢转化时, 多在原药的基础上进行部分结构修饰, 药物母核变化相对较小, 因此代谢物与原药常有相似的质谱特征离子。据此可对代谢物进行识别, 并结合其它碎片特征, 对其结构作出合理推断。

这里通过分析罗红霉素及其代谢物的 $MS \sim MS^3$ 各级碎片离子的关系, 发现在正离子检测方式下, 各化合物的质谱断裂方式存在共性, 即 MS^2 质谱都优先失去一中性碎片红霉糖 (158u), 进一步的 MS^3 质谱分析又可获得失去氨基糖的碎片离子, 并且 14 元环 C-9 位上的羟肟键重排后断裂, 生成脱去含氮烷基侧链的碎片离子; 由于罗红霉素及其代谢物的分子结构中含羟基较多, 在 MS^2 和 MS^3 质谱中均可见一系列质荷比相差 18 的脱水碎片离子。这些结果显示了罗红霉素及其结构类似物的质谱特征, 从而有助于更深入地研究它们在体内的代谢转化。

五、二维液相色谱-质谱在蛋白质组学中的应用

现在, 国内外的有关研究机构, 包括企业在内, 正在集中力量对细胞、组织、甚至机体的蛋白质组进行研究, 以揭示生命现象, 发现治疗疾病的新方法和药物。为达到这一目的, 所采用的方法学应能快速定性、定量分析蛋白质成分的改变, 发现目标蛋白及其修饰变异。

目前, 分离复杂的蛋白组样品, 常用二维凝胶电泳 (2D gel electrophoresis, 2D GE), 先用等电聚焦分离蛋白质混合物, 然后用聚酰胺凝胶电泳在第二维进一步分离。蛋白质的鉴别, 常用胶内酶解、MALDI/MS 或 ESI/MS 分析和数据库检索方法。

但是, 2D GE 存在某些缺点, 如耗时、重现性较差。此外, 由于溶解度、分辨率和检测灵敏度等问题, 膜蛋白和低含量的蛋白质可能丢失。因此, 人们开始应用 2D LC/MS 分离分析蛋白质组样品, 以克服 2D GE 的主要缺点。Davis 等建立了 2D 离子交换-梯度反相 LC/MS/MS 自动分析技术平

台。用 Agilent 1100 液相色谱仪, 150mm×1mm C₁₈ 柱作为分析柱, 流动相 A 0.1% 甲酸, 流动相 B 90% 乙腈-水溶液 (含 0.09% 甲酸)。以 3% B, 60μL/min 等度洗脱 15min 后, 185min 线性梯度洗脱至 50% B, 然后 5min 内升至 90% B, 维持 15min 以洗涤色谱柱, 最后, 在 5min 内, 以下降梯度回复至起始条件并平衡 40min。为了 2D-LC, 仪器需稍加改动。增加一于单泵用于输送挥发性低离子强度上样缓冲溶液 (5mmol/L 甲酸铵, 含 5% 乙腈、0.01% NaN₃, pH=3.8), 通过由自动进样器, 将样品加至强阳离子交换柱 (SCX 50mm×2.0mm) 上。SCX 柱流出物经柱箱内柱选择阀, 通过 C₁₈ 50mm×2.0mm 预浓缩柱, 保留未被 SCX 柱保留的流分, 而缓冲溶液将流至废液口。为了对这一流分进行 LC/MS/MS 分析, 切换柱选择阀, 将捕获在 C₁₈ 预浓缩柱上的组分反冲至分析柱进行反相梯度分离分析 (用 LCQ 及相关软件自动进行 MS, MS/MS 分析和数据检索)。同时, 上样缓冲溶液经质谱仪上的转换阀继续平衡 SCX 柱。为了分离分析保留在 SCX 柱上的成分, 由进样器依次将不同浓度的盐溶液注入 SCX 柱, 运行台阶梯度, 洗脱 SCX 柱保留的成分。每阶盐梯度洗脱的组分, 如上述未被 SCX 柱保留的组分一样, 为 C₁₈ 预浓缩柱保留, 进而反冲至分析柱进行 LC/MS/MS 分析, 如图 2-73 所示。

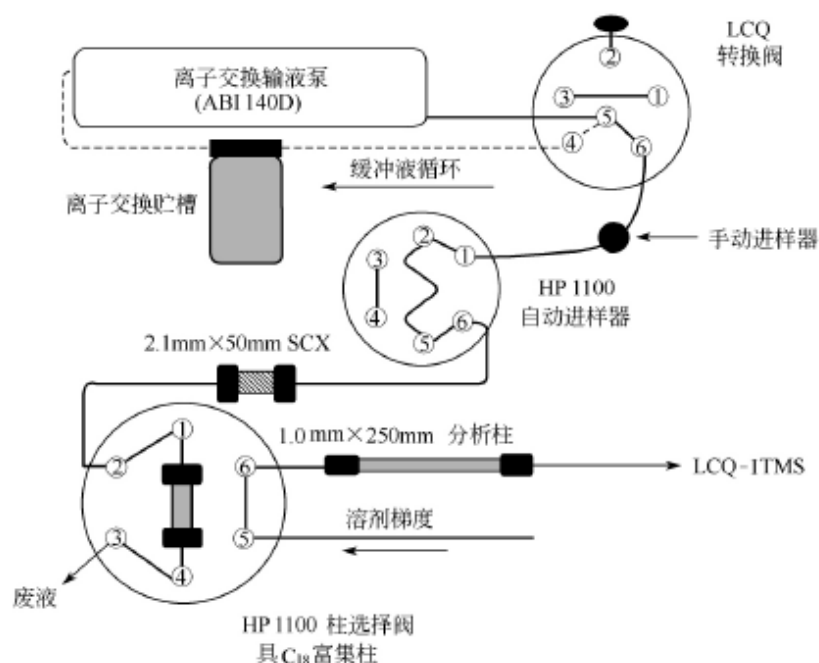


图 2-73 2D-LC/MS 平台示意图

上述技术平台采用的是窄口径填充柱, 为提高检测灵敏度, 应使用填充毛

细管 LC (microLC 或 nanoLC)。现在已有一些自动化的仪器设备商品供应。流路的设计可采用六通阀或十通阀。

蛋白质组的复杂性要求 LC 有更高的分离度, MS 有更高的分辨率和数据采集速度。最近, Shen 等用高效 nanoLC/nanoESIMS 高灵敏地分析了细胞球蛋白酶解产物。用 $3\mu\text{m}$ C_{18} 多孔硅胶 (孔径 30nm), 在 18000psi 压力下, 填充内径 $14.9\sim 74.5\mu\text{m}$, 长达 87cm 的毛细管。用这样的填充柱, 流动相压力为 120MPa 时, 流速低至约 20nL/min , 线速度约为 0.2cm/s , 接近于最佳线速。通过死体积极小的 nanoESI 接口与 Q-TOFMS 连接。控制一定的蛋白质组酶解物的进样量, 这种超高压 nanoLC 分离的峰容量达 10^3 。图 2-74 和图 2-75 是实验结果。进样量较大时 ($14.9\mu\text{m}$ 内径柱为 $5\sim 100\text{ng}$, $29.7\mu\text{m}$ 内径柱为 $50\sim 500\text{ng}$), 混合物中的低含量成分的响应随进样量的增加线性增加。

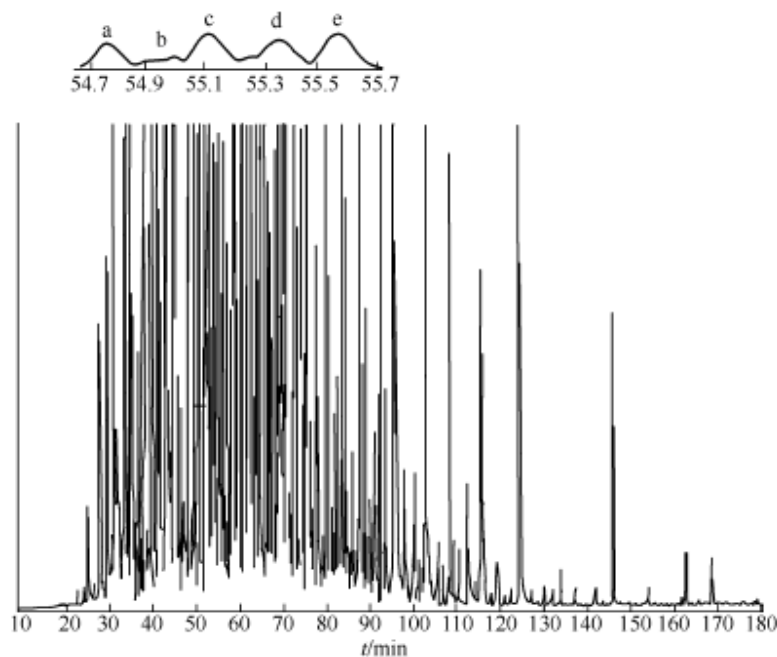


图 2-74 超高压 nanoLC/MS 基峰离子流 (BPC)

a, b, c, d, e 为 1min 窗口放大图, 相应的质谱图见图 2-75

六、样品的预处理

LC/MS 的失败常常是由于样品的预处理不当, 导致样品信号抑制或共存物的干扰。尤其是用 ESI/MS 直接进样时, 应除去样品中浓度较高的盐及其它干扰成分。样品预处理的具体方法、步骤, 视样品的性质而异。复杂样品, 如天然产物 (中药、动物、植物等) 的粗提物、生物体液 (如血浆等) 等 “脏” 的样品, 更应注重样品的预处理。此处只能简述一些常用的方法。

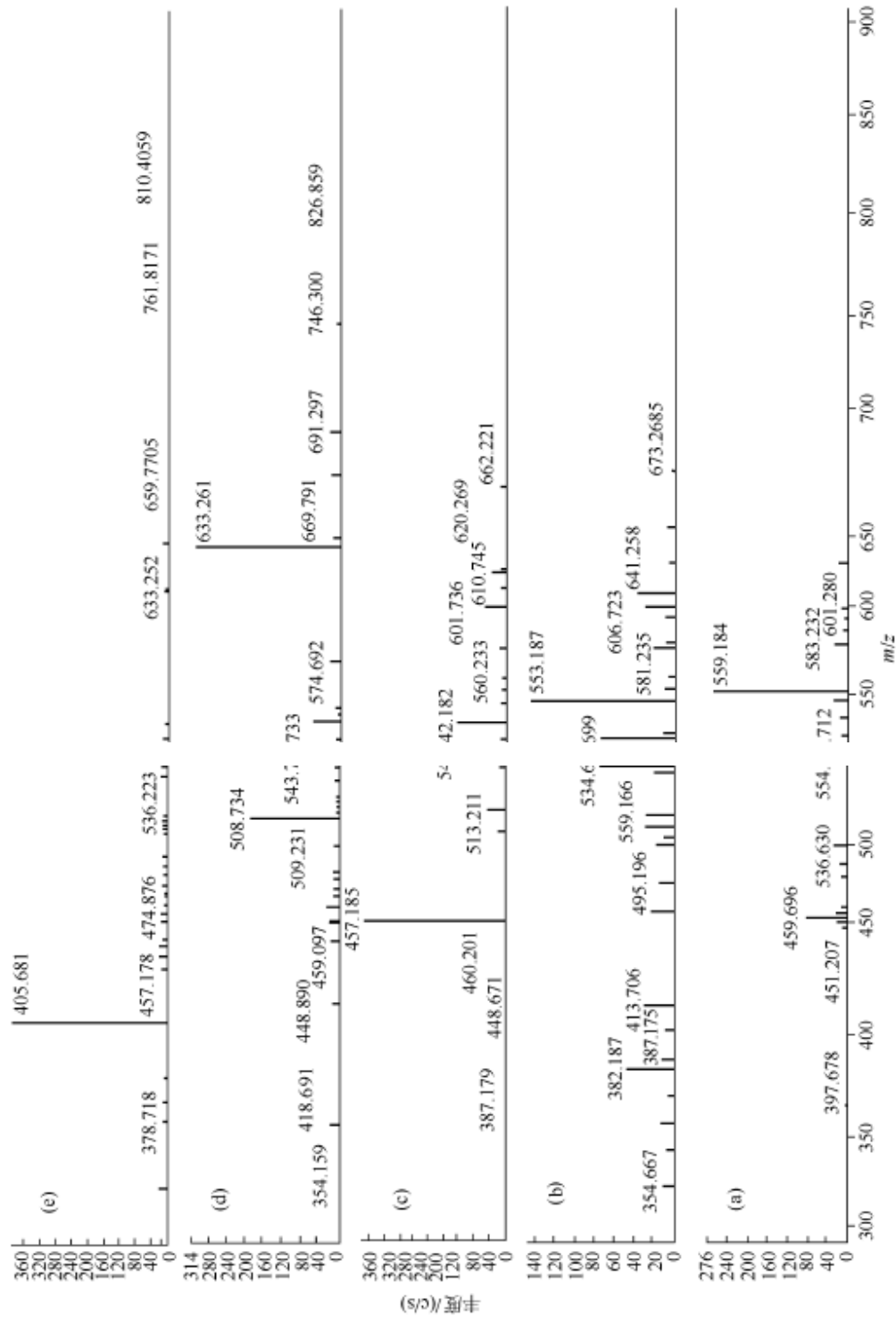


图 2-75 a, b, c, d, e 色谱峰的质谱图

(一) 超滤

采用超滤膜过滤器，截留分子量从 $3 \times 10^{-3} \sim 1000 \times 10^{-3}$ 的均有商品供应。

超滤器根据分子量大小选择性保留或通过溶液中的成分。低分子量化合物存在于滤液中，而高分子量化合物留在滤器上。

这种方法简便，快捷，易于实现自动化。经超滤制备出来的样品通常即可进行 LC/MS 分析。

在药物动力学或代谢物研究中，如超滤制备样品，可选择滤器，其截留分子量为 1000~3000，以将低分子量的药物或代谢物从血浆中分离出来。通常将 1~5mL 样品用等体积的 50% 乙腈水溶液稀释以减低样品与底物的结合，混匀后，将混合物移至超滤管，离心 15~30min (4000g)，取滤液直接进行 LC/MS 分析或冻干后，用 HPLC 流动相溶解进行测定。

(二) 溶剂提取

待测成分自水相提取至有机相是常用的方法之一。这个方法的优点是应用范围广；溶剂、pH 值、离子对试剂等均可选择，以利提取；可浓集待测成分。缺点是耗时；有时回收率较低。

(三) 固相萃取

固相萃取 (SPE) 利用小柱 (如 C_{18}) 选择性保留待测成分而使干扰物流出；或反之待测成分流出而干扰物被小柱保留，从而达到纯化样品的目的。用 SPE 技术可除去杂质和盐，浓集待测成分，有机相或水相变换，小柱上衍生化等，因而应用日广。

可供选用的小柱，非极性固定相有 C_{18} 、 C_8 、 C_4 、苯基等；极性固定相有氨基、硅胶、氨基丙基等。此外，还可选用离子交换剂作固定相。

以常用的 C_{18} 小柱为例，SPE 的操作步骤通常为：①用乙腈或甲醇洗涤小柱；②用缓冲溶液 (pH 值应调节至能使待测成分成中性而使干扰成分为离子) 5~10mL 处理小柱；③将样品慢慢加在小柱上；④用上述缓冲溶液洗涤小柱，约需溶液 5~10mL 以除去干扰物；⑤用 80% 乙腈或甲醇的水溶液 5~10mL 洗脱待测成分；⑥浓缩 (冻干、蒸发)，溶于少量适当溶剂后即可进行分析。

(四) 柱切换 (LC/LC)

将样品注入预柱，使待测成分与干扰物分离；由切换阀将待测成分转入分析柱，进行分离分析。

用柱切换技术可在线纯化和浓集样品，便于自动化，减少样品损失，缩短分析时间，结果再现性较好。缺点是需复杂的色谱系统。

柱切换方式有以下几种：① 中心切割 (取中间一定保留时间的成分转移至分析柱)；② 反冲 (待测组分在预柱柱头浓集，反冲至分析柱)；③ 前沿切割 (较早流出的成分转移至分析柱)；④ 末端切割 (最后流出的成分输入分析柱)。

附录

一、同位素、质量和丰度

同位素	质量 ^①	天然丰度/% ^②	同位素	质量 ^①	天然丰度/% ^②
¹ H	1.007825035	99.985	³¹ P	30.9737620	100
² H	2.014101779	0.015	³² S	31.972070698	95.02
¹² C	12	98.9	³³ S	32.971458428	0.75
¹³ C	13.003354826	1.10	³⁴ S	33.967866650	4.21
¹⁴ N	14.003074002	99.63	³⁶ S	35.967080620	0.02
¹⁵ N	15.00010897	0.37	³⁵ Cl	34.968852728	75.77
¹⁶ O	15.99491463	99.76	³⁷ Cl	36.965902619	24.23
¹⁷ O	16.9991312	0.04	³⁹ K	38.9637074	93.2581
¹⁸ O	17.9991603	0.200	⁴⁰ K	39.9639992	0.012
¹⁹ F	18.99840322	100	⁴¹ K	40.9618254	6.7302
²³ Na	22.9896767	100	⁷⁹ Br	78.9183361	50.69
²⁸ Si	27.9769271	92.23	⁸¹ Br	80.916289	49.31
²⁹ Si	28.9764949	4.67	¹²⁷ I	126.904473	100
³⁰ Si	29.9737701	3.10			

① Wapstra A H, Audi G. *Nucl Phys*, 1985, A432: 1。

② “CRC Handbook of Chemistry and Physics” 70th ed., Boca Raton, FL: CRC Press, 1989. B-227

二、常用原子量

元素	原子量 ^①	元素	原子量 ^①	元素	原子量 ^①
H	1.00794(7)	Na	22.989768(6)	K	39.0983(1)
C	12.011(1)	Si	28.0855(3)	Br	79.904(1)
N	14.00674(7)	P	30.973762(4)	I	126.90447(3)
O	15.9994(3)	S	32.066(6)		
F	18.998403(9)	Cl	35.452(9)		

① “Atomic Weights of the Elements 1987” *Pure Appl. Chem*, 1988, 60: 841。

注：括号内的数值为测不准水平，主要是同位素丰度的自然变化。例如，氢原子量为 1.00794 ± 0.00007 。

三、常用质量坐标校正物及校正物离子质量

(一) 全氟三丁胺 (PFTBA)

质 量	质 量	质 量	质 量	质 量
30.99840	118.99202	175.99249	263.98711	463.97433
49.99379	130.99202	180.98882	313.98391	501.97114
68.99521	149.99042	213.99030	325.98391	537.97114
92.99521	191.99042	218.98563	375.98072	575.96795
99.99361	163.99349	225.99030	413.97753	613.96475
113.99669	168.98882	230.98563	425.97753	

(二) 聚乙二醇^① (PEG)

n	PEG + H ⁺ 质量	n	PEG + H ⁺ 质量	n	PEG + H ⁺ 质量
1	63.04460	16	723.43783	31	1383.83105
2	107.07082	17	767.46404	32	1427.85726
3	151.09703	18	811.49026	33	1471.88348
4	195.12325	19	855.51647	34	1515.90969
5	239.14946	20	899.54269	35	1559.93591
6	283.17568	21	943.56890	36	1603.96212
7	327.20189	22	987.59511	37	1647.98834
8	371.22811	23	1031.62133	38	1692.01455
9	415.25432	24	1075.64754	39	1736.04077
10	459.28054	25	1119.67376	40	1780.06698
11	503.30675	26	1163.69997	41	1824.09320
12	547.33297	27	1207.72619	42	1868.11941
13	591.35918	28	1251.75240	43	1912.14563
14	635.38540	29	1295.77862	44	1956.17184
15	679.41161	30	1339.80483	45	2000.19805

(三) 碘化钠 (NaI)

n	负离子 (NaI) _n I ⁻ 的质量	n	负离子 (NaI) _n I ⁻ 的质量	n	负离子 (NaI) _n I ⁻ 的质量
1	172.8840	10	1521.9321	19	2870.9803
2	322.7782	11	1671.8264	20	3020.8745
3	472.6725	12	1821.7206	21	3170.7688
4	622.5667	13	1971.6149	22	3320.6630
5	772.4610	14	2121.5091	23	3470.5572
6	922.3552	15	2271.4033	24	3620.4515
7	1072.2494	16	2421.2976	25	3770.3457
8	1222.1437	17	2571.1918	26	3920.2400
9	1372.0379	18	2721.0861		

① 加合物离子，对于 PEG + NH₄⁺，每个质量加 17.02655；对于 PEG + Na⁺，则加 21.98195。

符 号 表

AC	交流	HPLC	高压液相色谱
ADC	模数转换	HPLC/MS	高压液相色谱-质谱联用
APCI	大气压化学电离	I	电流
API	大气压电离	ICR/FTMS	回旋共振-傅里叶变换 质谱
APIMS	大气压离子化质谱	ISP	离子喷雾
<i>c</i>	浓度	ITD	离子阱检测器
CI	化学电离	ITMS	离子阱质谱
CID	碰撞诱导电离	I_{total}	总离子强度
DAC	数模转换	<i>K</i>	电导率
DC	直流	k_1	速率常数
DCI	解吸化学电离	LC	液相色谱
DE	延迟拉出	LC/MS	液相色谱-质谱联用
EA	电子亲和力	LD	激光解吸
ECCI	电子捕获化学电离	LI	激光电离
ECD	电子捕获检测器	LIMS	激光电离质谱
EE	偶电子数	LPCI	低压化学电离
EI	电子电离		
ESI	电喷雾电离	MALDI	基质辅助激光解吸电离
ESIMS	电喷雾电离质谱	MALDI/TOF	基质辅助激光解吸电离/ 质谱
FAB	快原子轰击电离	MC	质量色谱
FABMS	快原子轰击电离质谱	MRM	多反应监测
FC43	全氟三丁胺	MS	质谱
FD	场解吸电离	MS/MS	质谱-质谱（串联质谱）
FI	场致电离	MS ⁿ	多级质谱
FID	火焰离子化检测器	NICI	负离子化学电离
FPD	火焰光度检测器	NP	火焰光度检测器
FTMS	傅里叶变换质谱	OE	奇电子数
FWHM	半峰宽	<i>p</i>	压力
GC	气相色谱	PA	质子亲和力
GC/MS	气相色谱-质谱联用		

PBM	概率匹配	SIR	选择离子记录
PFTBA	全氟三丁胺	SIS	选择离子储存
PI	光电离	SRM	选择离子监测
PID	光离子化检测器	t	时间
q	电荷	T	温度
R	雾滴半径	TDC	时间数字转换
RF	射频	TIC	总离子流
RIC	重建总离子流	TOF	飞行时间质谱
RPLC	反相液相气相色谱法	u	原子质量单位
S/N	信号噪声比	v	流速
SCAN	全扫描	λ	电解质的分子电导；波长
SIM	选择离子监测	γ	表面张力
SIMS	二次离子质谱		