

六、质谱分析

质谱分析本是一种物理方法，其基本原理是使试样中各组分在离子源中发生电离，生成不同荷质比的带正电荷的离子，经加速电场的作用，形成离子束，进入质量分析器。在质量分析器中，再利用电场和磁场使发生相反的速度色散，将它们分别聚焦而得到质谱图，从而确定其质量。第一台质谱仪是英国科学家阿斯顿（F.W.Aston，1877—1945）于1919年制成的。出手不凡，阿斯顿用这台装置发现了多种元素同位素，研究了53个非放射性元素，发现了天然存在的287种核素中的212种，第一次证明原子质量亏损。他为此荣获1922年诺贝尔化学奖。

质谱仪开始主要是作为一种研究仪器使用的，这样用了20年后才被真正当作一种分析工具。它最初作为高度灵敏的仪器用于实验中，供设计者找寻十分可靠的结果。早期的研究者们忙着测定精确的原子量和同位素分布，不能积极地去探索这种仪器的新用途。

由于同位素示踪物研究的出现，质谱仪对分析工作的用处就越发变得明显了。氮在植物中发生代谢作用的生物化学研究要求用 ^{15}N 作为一种示踪物。但它是一种稳定的同位素，不能通过密度测量来精确测定，所以质谱仪就成了必要的分析仪器。这种仪器在使用稳定的 ^{13}C 示踪物的研究中以及在基于稳定同位素鉴定的工作中也是很有用的。标准型的质谱仪到现在已经使用了大约45年。

40年代期间，石油工业在烃混合物的分析中开始采用质谱仪。尽管这种质谱图在定量解释时存在着难以克服的计算麻烦，但在有了高速计算机后，这种仪器就能在工业方面获得重大的成功。

(1)近20年来质谱技术随着新颖电离技术，质量分析技术，与各种分离手段的联用技术以及二维分析方法的发展，质谱已发展成为最广泛应用的分析手段之一。其最突出的技术进步有以下几个方面：

新的解吸电离技术不断涌现，日趋成熟，可测分子量范围越来越高，并逐步适用于难挥发、热敏感物质的分析，例如海洋天然产物、微生物代谢产物，动植物二次代谢产物以及生物大分子的结构研究。最有发展前景的电离方法有：

等离子解吸采用 ^{252}Cf 的裂介碎片作为离子源，使多肽和蛋白质等生物大分子不必衍生化而直接电离进行质量分析。它与飞行时间质谱相配合，已成功地用于许多合成多肽的质谱分析，并已在一些实验室中作为常规分析方法来鉴定多肽和蛋白质。目前它的可分析的质量极限大约是50000D。

快原子轰击，把样品分子放入低挥发性液体中，用高速中性原子来进行轰击，可使低挥发性的，热敏感分子电离，得到质子化或碱金属离子化的分子离子。由于很容易在磁质谱或四极杆质谱上安装使用，因此得到广泛应用，分子量很容易达到3000—4000。如果与带有后加速的多次反射阵列探测器的高性能磁质谱配合使用，可测分子量可达到10000amu以上，最高记录可达25000amu。

激光解吸，利用 CO_2 激光（10.6 μm ），Nd/YAG激光（1.06 μm ）的快速加热作用使难挥发的分子解吸电离，与飞行时间质谱或离子回旋共振质谱相配合成功地分析了一系列蛋白质和酶的复合物，并创造了蛋白质分子质量分析的最高记录（Jack Bean Urease Mr ~ 27万）。

电喷雾 (electro spray, electrostatic spray, ion spray) 把分析样品通过常压电离源, 使分子多重质子化而电离。由于生成多重质子化的分子离子可缩小质荷比, 因此一个分子量为数万的生物大分子, 如果带上几十个, 上百个质子, 质荷比可降低到 2000 以下, 可以用普通的四极杆质谱仪分析, 其次由于得到一组质荷比连续变化的分子离子峰, 通过对这些多电荷分子离子峰的质量计算可以得到高度准确的平均分子量。第三是这种多重质子化的分子离子峰可进一步诱导碰撞活化, 进行串联质谱分析。第四是这种电离技术的样品制备要求极低, 溶于生物体液的样品分子或 HPLC, CZE 的流出液都可直接引入常压电离源进行联机检测。

(2) 各种联用技术。色谱、电泳等分离方法与质谱分析相结合为复杂混合物的在线分离分析提供了有力的手段, GC—MS 联用技术的应用已得到充分的证明。近年来把液相色谱、毛细管电泳等高效分离手段与质谱连接已在分析强极性、低挥发性样品的混合物方面也取得了进步。主要的接口技术有:

粒子束 (particle beam), 它能把液相色谱与质谱连接起来, 其优点是得到的质谱与普通的 EIMS 谱十分接近, 因此可以用标准谱库的数据去检索。缺点是要耗用大量的氦气, 并且只能分析中等极性和中等分子量 (2000 以下) 的分子。

热喷雾 (thermospray), 是目前与 HPLC 连接最广泛使用的接口技术。它是一种软电离技术, 可测的分子量上限大约为 8000amu, 缺点是流速需要 0.12ml/min, 对于质谱分析来说仍嫌太大。

连续流快原子轰击 (CF—FAB), 利用适当孔径的石英毛细管把液相色谱的流出液直接引入 FAB 电离源, 进行连续的 FAB—MS 分析。由于它的流速小于 5 μ l/min, 与质谱仪更为匹配, 因此具有更大的应用潜力。

电喷雾。由于采用常压电离源, 因此很容易把微细径柱液相色谱, 甚至普通液相色谱 (只要有适当的分流装置) 通过它与质谱连接起来。最近藉此把毛细管区带电泳与质谱连接起来也取得了成功, 实现了高灵敏度 (10^{-15} mol), 高分离效力 (25 万理论塔板数) 的联用分析。这是一种极有希望, 并很有发展前途的联用技术。

(3) 串联质谱等二维质谱分析方法。如果把二台质谱仪串联起来, 把第一台用作分离装置, 第二台用作分析装置, 这样不仅能把混合物的分离和分析集积在一个系统中完成, 而且由于把电离过程和断裂过程分离开来, 从而提供多种多样的扫描方式发展二维质谱分析方法来得到特定的结构信息。

本法使样品的预处理减少到最低限度, 而且可以抑制干扰, 特别化学噪音, 从而大大提高检测极限。

串联质谱技术对于利用上述各种解吸电离技术分析难挥发、热敏感的生物分子也具有重要的意义。首先解吸电离技术一般都使用底物, 因此造成强的化学噪音, 用串联质谱可以避免底物分子产生的干扰, 大大降低背景噪音, 其次解吸电离技术一般都是软电离技术, 它们的质谱主要显示分子离子峰, 缺少分子断裂产生的碎片信息。如果采用串联质谱技术, 可使分子离子通过与反应气体的碰撞来产生断裂, 因此能提供更多的结构信息。

近年来把质谱分析过程中的电离和碰撞断裂过程分离开来的二维测定方法发展很快, 主要的仪器方法有以下几种。

串联质谱法 (tandem MS), 常见的形式有串联 (多级) 四极杆质谱, 四极杆和磁质谱混合式 (hybride) 串联质谱和采用多个扇形磁铁的串联磁质

谱。

傅里叶变换质谱 (FT—MS)，又叫离子回旋共振谱，它利用电离生成的离子在磁场中回旋共振，通过傅里叶变换得到这些离子的质量谱，这种谱仪过去由于电离造成真空降低与回旋共振要求高真空条件相矛盾，性能不能过关。近年来由于分离电离源技术日趋成熟，这种分析方法得到较大发展，它的优点是很容易做到多级串联质谱分析，目前可分析质量范围已达 5 万左右，分辨力也可达 1 万。

整分子气化和多光子电离技术 (LEIM—MUPI)，它是在微激光解吸电离技术的发展中最近出现的一种新方法。它把解吸和电离二个环节在时间和空间上分离开来，分别用二个激光器进行解吸和电离。使用红外激光器来实现整分子气化，使用可调谐的紫外激光器对电离过程实行宽范围的能量控制，从而得到从电离 (只显示分子离子) 到各种程度不同的硬电离质谱，并成功地用于生物大分子的序列分析。