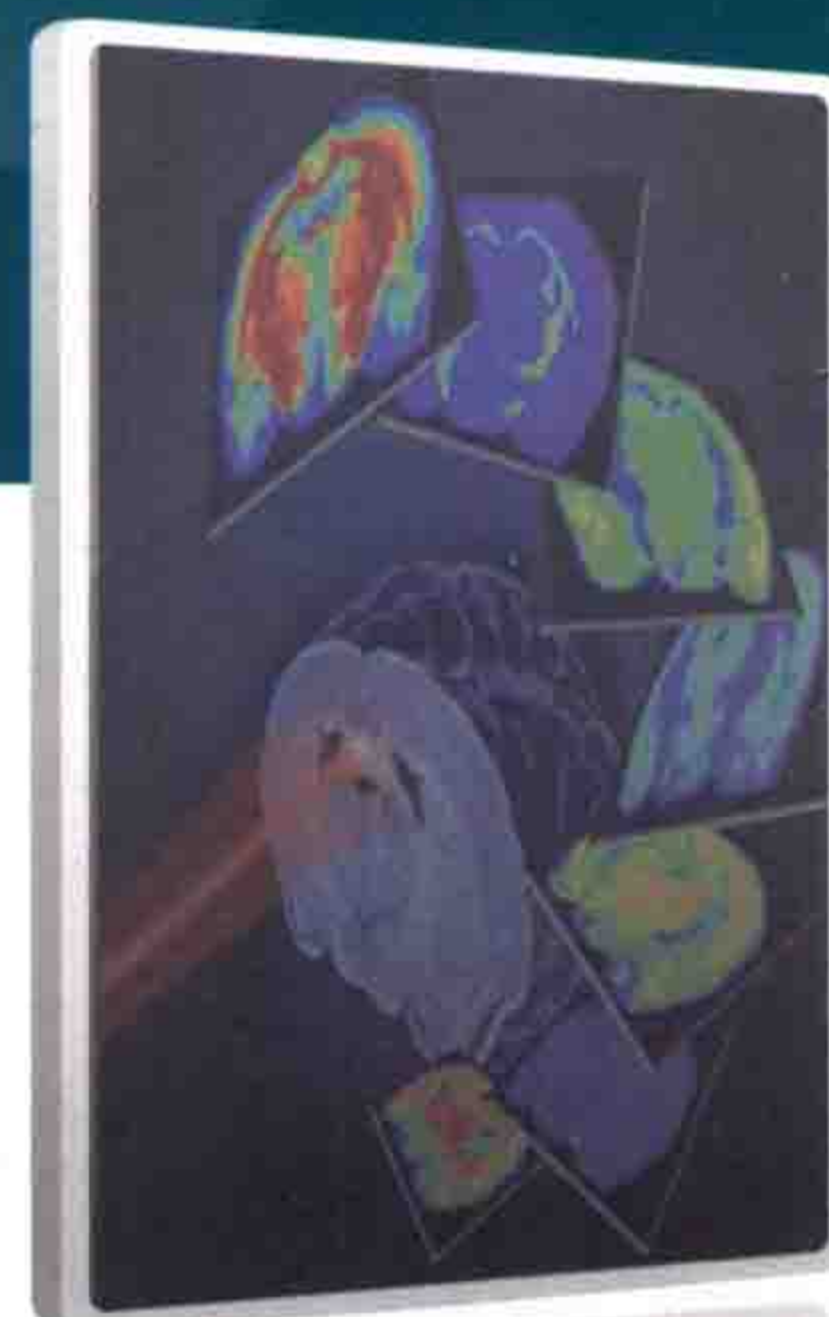
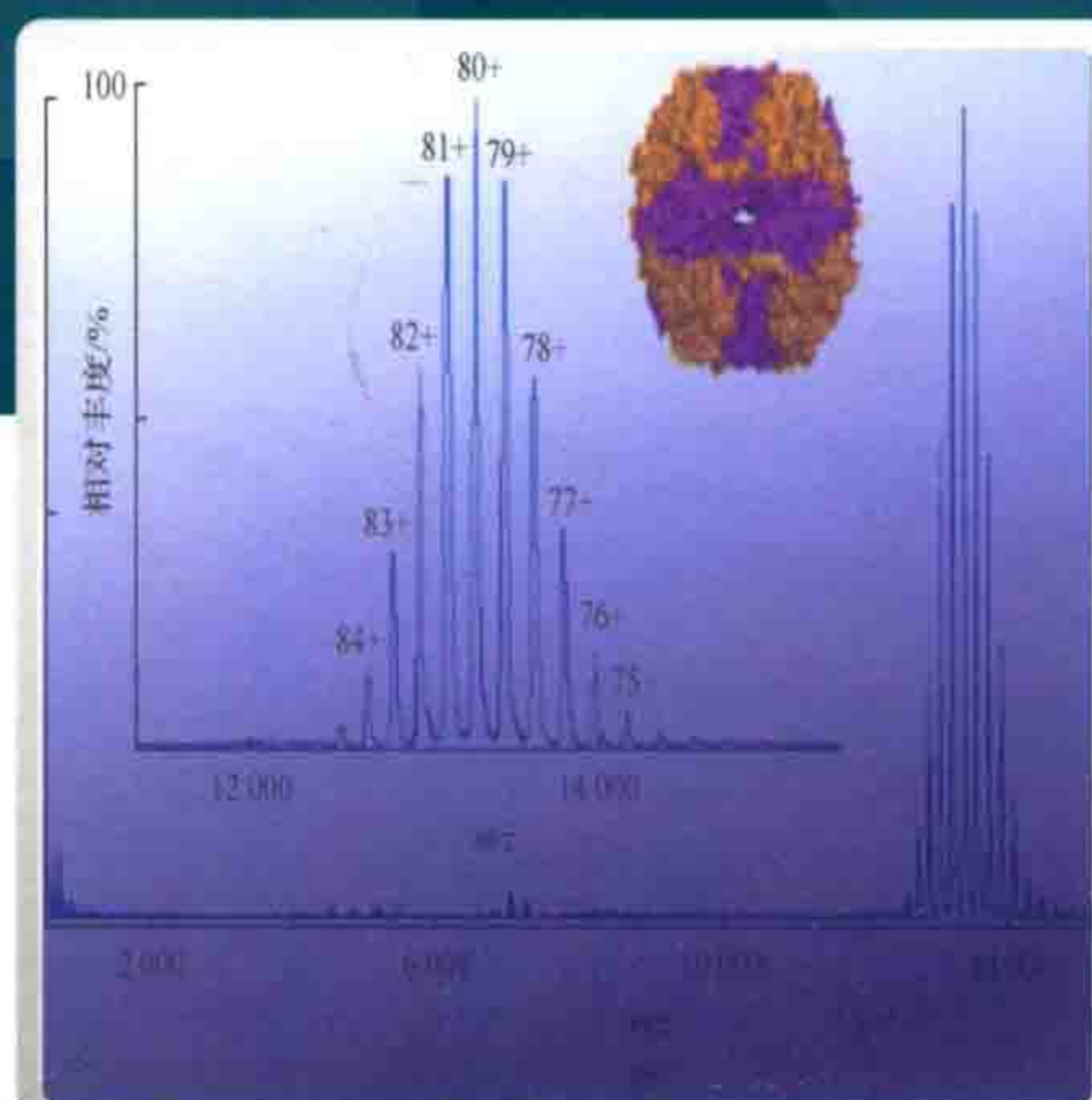
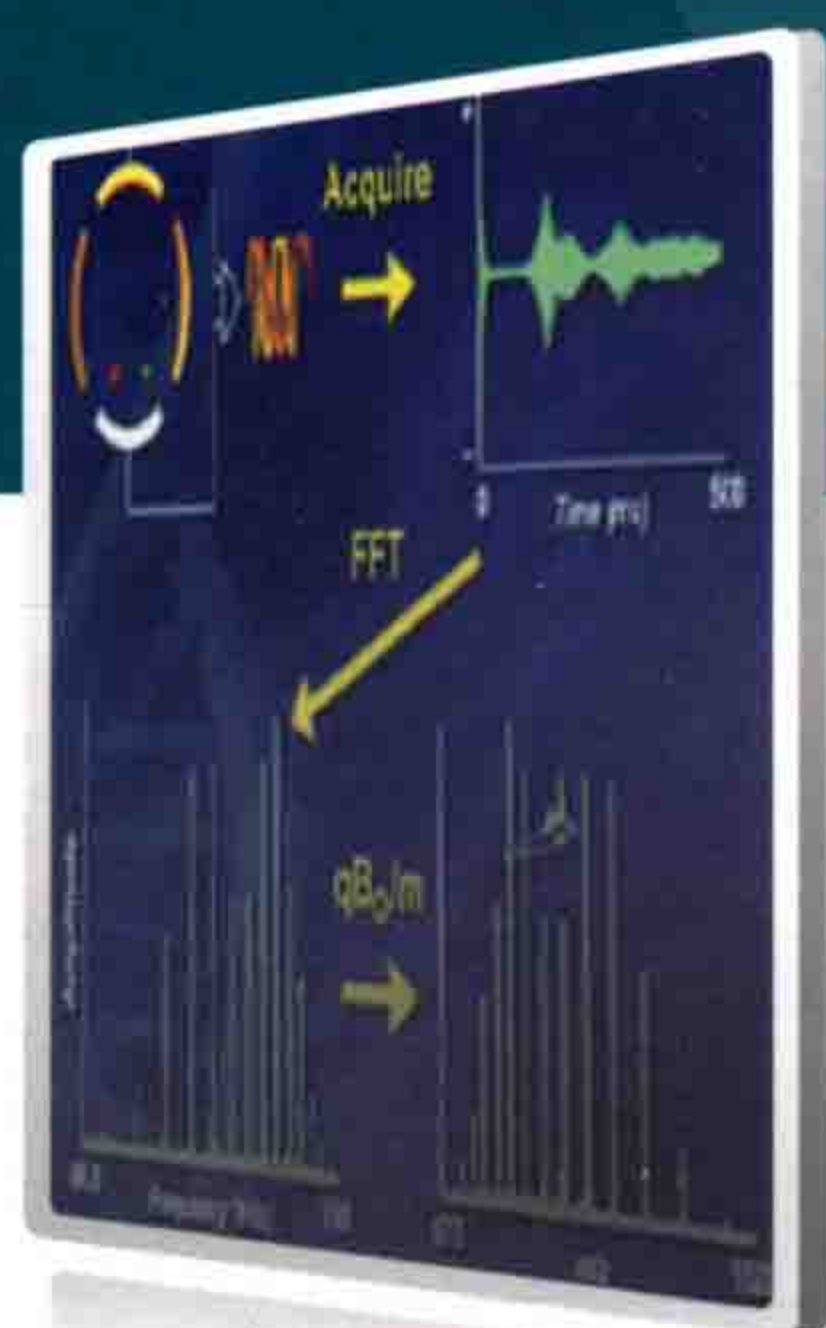


现代质谱与生命科学研究

XIANDAI ZHIPU YU SHENGMING KEXUE YANJIU

赖 聪 编著



科学出版社

现代质谱与生命科学研究

赖 聪 编著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

有机质谱是一门高速发展的学科,进入 21 世纪后的发展更是日新月异。质谱新技术、新概念的纷纷问世推动了其他学科,特别是生命科学的发展。本书结合作者在美国多年来对质谱技术实际应用的相关经验,系统介绍了质谱的发展过程。不同于其他同类书籍将大量篇幅用于介绍有机物的裂解反应规律,有机质谱谱图解析及收集,作者除对必要的基础知识进行简要介绍外,将重点置于近 10 年来有机质谱分析的最新技术进展及其应用,并结合对这些新技术的讨论给出了许多实例,其范围涵盖药用天然产物和药物筛选,组合化学,药物代谢和质谱成像,寡核苷酸和核酸分析,多肽和蛋白质的分析(包括蛋白质定量,基因全貌比较,翻译后调控的解释,蛋白质-蛋白质交互作用以及以质谱为核心的蛋白质组学在临床上的应用)等方面。书中给出的大量参考文献也为读者提供了进一步深入研究的空间。

本书可供从事分析化学、有机化学、高分子化学、生物化学、植物化学、药物化学、生命科学及环保科学等广大科技工作者参考,也适用于上述相关专业的高等院校师生使用。对于希望了解质谱的读者,阅读本书也不无裨益。

图书在版编目(CIP)数据

现代质谱与生命科学研究/赖聪编著. —北京:科学出版社,2013. 8

ISBN 978-7-03-038447-8

I. ①现… II. ①赖… III. ①质谱-分析 IV. ①0433. 5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 202963 号

责任编辑:张 析 高 微 / 责任校对:彭 涛

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:东方人华

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京通州皇家印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 8 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2013 年 8 月第一次印刷 印张: 16 1/4 插页: 4

字数: 312 000

定价: 72.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

序

我与作者相知已近 40 年,基于我对作者及对国内学科发展的了解,应作者邀请,在本书即将付梓之时特作此序。

赖聪博士 1980 年云南大学毕业入中国科学院环境化学研究所为研究生。在中国科学院大连化学物理研究所卢佩章、李浩春先生指导下获分析化学硕士学位后回到环境化学研究所从事环境分析化学、大气化学研究。1984 年开始使用毛细管气相色谱与质谱,对北京、廊坊、天津地区大气中气相有机污染物进行鉴别。后在美国纽约大学获得环境医学博士学位,进入美国国家卫生研究院(NIH)下属的国家癌症研究所(NCI)从事抗癌、抗爱滋病药物研究,质谱便成为每天使用的工具。近 30 年来他的研究工作一直与质谱技术的发展紧密相关——大气中气相有机污染物、DNA 化学致歧变机理、小分子药物、多肽乃至各种蛋白质的结构测定,其间使用了各种类型、不同层次的质谱仪器,从而积累了丰富的理论知识、实验技巧和经验。去年 5 月访美时,我建议他将他对质谱的理解和经验整理成书。

在《现代质谱与生命科学研究》一书中,作者结合了许多年来对质谱技术实际应用的相关经验,汲取了 100 多年来质谱学科技术的精华,系统介绍了质谱的发展演变过程。从质谱基本原理出发,深入浅出地系统介绍了质谱方法的演变发展、离子源、离子质量分离方法、检测器与真空系统、质谱的联用技术等,使读者在阅读后可以对质谱方法有一个系统和整体的了解。该书同时对质谱领域中一些过时的概念和表述进行了订正,并依据国外最新的研究成果澄清了一些混乱的观点。作者将该书的重点置于近 10 年来质谱分析的最新技术进展及其在生命科学中的应用,范围涵盖药用天然产物和药物筛选、组合化学、药物代谢和质谱成像、寡核苷酸和核酸分析、多肽和蛋白质分析包括蛋白质定量、基因全貌比较、翻译后调控的解释、蛋白质-蛋白质交互作用、以质谱为核心的蛋白质组学在临床中的应用等。该书中给出的大量参考文献,为读者进一步的研究工作提供了详实的参考资料。

《现代质谱与生命科学研究》图文并茂、文字简练,内容详实新颖,解释通俗到位。它反映了作者高水平的学术造诣和丰富的实践经验。本书将对从事有机质谱分析的读者提供有力的指导和帮助、成为高校里一本受教师和学生欢迎的质谱教科书。

李 聪

2013 年 6 月 25 日于云南大学

前 言

这是一本试图通过追本溯源介绍质谱及质谱学科发展的书。

质谱学科发展至今已逾百年。一百多年来,质谱工作者们站在彼此的肩头,将质谱从一个简单的物理现象在理论和实践上推到今天的高度。从一开始对元素同位素的辨别、相对原子质量的测定,到第二次世界大战中用于分离核燃料铀 ^{235}U 以制造原子弹,乃至今天广泛应用于化学、医学及生命科学研究。今天,质谱的应用范围已涵盖许多领域,作为现代科学技术中不可或缺的学科,在各个领域都扮演着极其重要的角色。质谱技术的每一次进步,都推动了其他相关领域,如原子物理学、化学、材料科学、核技术、环境科学、生命科学乃至地球和天体科学的发展。

在中国,质谱的普及运用始于 20 世纪 80 年代,经过 30 多年的时间,质谱学科已经取得飞速发展,建立了一支日见成熟的质谱队伍。中国的质谱工作者正在快速追赶这个学科飞速发展的步伐。编写本书的一个主要目的,就是将质谱学科的发展过程更全面、更系统地介绍到国内。科学技术发展的途径从来都是相通的,学科间的相互借鉴、启发往往会促进彼此的发展。这个现象在质谱的发展过程中比比皆是,如次级电离现象的运用,电喷雾技术如何从汽车制造行业走进质谱技术,大气压化学电离技术的死而复生以及电子捕获离解技术(ECD)如何启发电子转移离解(ETD)技术等。作者希望,通过阅读本书,读者能够从一个更高的高度了解质谱的发展全貌并从中得到启迪,从而能够避免在研究工作中“只见树木,不见森林”,使类似 1987 年田中耕一(Koichi Tanaka)在中日质谱报告会上率先披露基质辅助激光解吸离子化技术(MALDI)而中国质谱界疏于反应的局面不再出现,进一步加快质谱学科在中国的发展步伐。

限于篇幅,也因为这个学科日新月异的发展,作者无意将本书编成一本质谱百科全书或技术手册大全。只是希望通过对质谱发展过程的回顾,“温故而知新”,帮助读者从另一个角度了解这个学科发展的来龙与去脉、经验和教训。同时通过系统介绍各种质谱新技术的产生过程及用途,给中国科技工作者送来它山之石。

本书的动笔缘起 2012 年 5 月与云南大学李聪教授的一次谈话。感谢他的鼓励与支持,使本书得以完成。同时要感谢美国国家癌症研究所化学生物实验室(Cheical Biology Laborotory, National Cancer Institute)的 James Anthony Kelley 博士,作者在本书写作过程中与他进行了无数次的讨论并获得许多有益的建议。最后要感谢的是作者在马里兰大学医学院免疫和分子生物学系任实验室研

究主管的妻子王卫华(Wendy Weihua Lai)和在纽约 Westchester 医学中心任骨外科住院医的儿子赖昆吾(Jim Kunwu Lai)。他们除了在写作过程中给予作者精神上的支持以外,也帮助作者澄清了许多医学和分子生物学上的问题。没有上述所有这些人的帮助,在十个月内完成这本书是不可想象的。

赖 聪

2013 年 3 月 25 日

于美国马里兰州弗里德里克国家癌症实验室

(Frederick National Labrotory for Cancer Research, Maryland, USA)

目 录

序	
前言	
第 1 章 质谱的发展沿革与基本概念	1
1.1 质谱的发展沿革	1
1.2 质量分析	5
1.3 质谱数据的采集和处理	6
1.4 一些有关质谱及质谱图的基本名词及概念	7
1.4.1 元素的同位素及同位素质量	7
1.4.2 化合物的离子及同位素离子	10
1.4.3 质谱峰	11
1.5 准确质量测定	12
1.5.1 分辨率和解析能力	12
1.5.2 离子的准确质量测定	13
1.5.3 准确质量测量与测量误差	15
1.5.4 质谱仪的质量校正	18
1.6 生物大分子的准确质量测定	21
参考文献	22
第 2 章 质谱离子源及实验技术	26
2.1 电子电离源	26
2.2 化学电离源	32
2.3 大气压化学电离源	38
2.4 电喷雾电离源	42
2.4.1 从生物大分子多电荷离子计算其分子质量	45
2.4.2 电喷雾电离源中的离子形成机理	48
2.5 大气压光致电离离子源	52
2.6 快原子轰击电离离子源	54
2.6.1 快原子轰击离子生成机理	57
2.6.2 FAB 液体基质	59
2.7 基质辅助激光解吸电离源	61
2.7.1 MALDI 电离源中的离子形成机理	66

2.7.2 MALDI靶板及样品制备	70
参考文献	72
第3章 质谱质量分析器	84
3.1 电磁扇形质量分析器	84
3.2 飞行时间质量分析器	87
3.3 四极杆质量分析器	93
3.4 离子阱质量分析器	99
3.4.1 三维四极杆离子阱	100
3.4.2 线性四极杆离子阱	106
3.5 傅里叶变换离子回旋共振	110
3.6 轨道离子阱质量分析器	114
参考文献	119
第4章 检测器与真空系统	123
4.1 质谱仪的检测系统	123
4.1.1 法拉第杯	124
4.1.2 电子倍增器	125
4.1.3 电-光离子检测器	126
4.1.4 深冷检测器	128
4.2 真空系统	130
4.2.1 旋片真空泵	132
4.2.2 涡旋真空泵	133
4.2.3 罗茨真空泵	134
4.2.4 涡轮分子泵	136
4.2.5 油扩散泵	137
参考文献	138
第5章 质谱联用技术	140
5.1 气相色谱-质谱联用	142
5.1.1 开口分流型接口	143
5.1.2 分子分离型接口	144
5.1.3 直接导入型接口	146
5.2 液相色谱-质谱联用仪	147
5.2.1 液体直接导入接口	148
5.2.2 连续流动快原子轰击	149
5.2.3 传送带式接口	149
5.2.4 离子束接口	150

5.2.5 热喷雾接口	150
5.3 色谱-质谱联用的质谱的数据采集	151
5.4 串联质谱法	153
5.4.1 空间串联质谱	156
5.4.2 时间串联质谱	159
5.5 串联质谱的离子活化方法	159
5.5.1 离子源后衰变	159
5.5.2 碰撞活化裂解	159
5.5.3 高能碰撞分解	162
5.5.4 电子捕获裂解	165
5.5.5 电子转移裂解	167
参考文献	171
第6章 质谱在生命科学研究中的应用	176
6.1 药用天然产物和药物筛选	176
6.1.1 电离离子源	178
6.1.2 质量分析器及其采样速度	180
6.1.3 质谱-质谱及离子激发	181
6.1.4 质谱数据处理	181
6.2 组合化学	185
6.2.1 流动注射进样分析	187
6.2.2 快速 HPLC	188
6.2.3 超临界色谱/质谱	188
6.3 药物代谢和质谱成像	192
6.3.1 药物代谢	192
6.3.2 质谱成像	197
6.4 寡核苷酸和核酸分析	201
6.4.1 寡核苷酸	201
6.4.2 聚核苷酸	204
6.5 多肽和蛋白质的分析	209
6.5.1 多肽及肽链的断裂	209
6.5.2 多肽及蛋白质的氨基酸序列测定	219
6.5.3 以质谱技术为核心的蛋白质组技术	223
6.6 以质谱技术为核心的蛋白质组技术临床应用	230
参考文献	231
彩图	249

第 1 章 质谱的发展沿革与基本概念

从 1910 年英国物理学家汤姆孙爵士(Sir J. J. Thomson)以质谱仪获得第一张分子质谱图起,质谱仪发展至今已逾百年。质谱技术从研究一个简单的物理现象(带电离子的运动轨迹在磁场和电场影响下会发生偏转)开始,为化学和原子物理学的发展作出了不可磨灭的贡献。除了为原子结构提供了可靠证据之外,质谱还验证了元素周期表,揭示了原子核中核子的结构。

1.1 质谱的发展沿革

1886 年,德国物理学家戈尔德施泰因(E. Goldstein)首次观察到的低压气体放电管中由阳极发出的正离子经电场加速后形成正离子流的现象^[1]。这个现象由德国物理学家维恩(F. F. Wien)于 1898 年予以证实^[2],维恩据此发明了一个在带电粒子束运动的垂直方向加有可控电场和磁场,利用正交电磁场产生速度色散作用,只允许一定速度的离子通过的用于调节粒子束速度的粒子过滤装置——维恩速度过滤器(Wien velocity filter)。在此基础上,英国物理学家汤姆孙爵士研究了一个可用于区分电子和氢原子(核子, nucleus)的装置^[3]。它通过磁场使阳极射线的粒子发生偏转,并通过电场使具有不同电荷和质量的离子分隔开,使用这个被称为“抛物线摄谱仪(parabola machine)”的装置可以同时测量 e/m 和 e 值,由此测出了电子的质量。汤姆孙的学生,英国化学家、物理学家阿斯顿(F. W. Aston)对此装置的进一步改进使他们获得了残留气体包括一系列正离子如 H^+ 、 H_2^+ 、 N^+ 、 N_2^+ 、 O^+ 、 O_2^+ 、 C^+ 、 C_2^+ 、 CO_2^+ 以及复合离子 N_2^+/CO^+ 和 Hg_2^+/Hg^+ 的质谱图^[4,5]。这成为了第一张分子质谱图。他们进而发现了 Ne 的两个稳定的同位素 ^{20}Ne 和 ^{22}Ne ^[6,7]。在此基础上阿斯顿发现了稳定元素具有同位素^[6-8],并证实自然界中的某元素实际上是该元素的几种同位素的混合体,而该元素的原子质量也是依据这些同位素在自然界占据不同比例而得到的平均原子质量。

因为仪器使用的电磁场聚焦过程与光学棱镜消光仪聚焦过程类似,只是将光学透镜换成了电磁透镜。而仪器产生的谱图也与光谱类似,1920 年,阿斯顿将他的仪器命名为“质谱仪”(mass spectrograph),而将这个学科称为“质谱学”(mass spectroscopy)。如今,质谱学的这个定义已因涉及离子研究方面太多的不同领域而显得含混而不再使用。大部分人倾向使用的现代“质谱学”(mass spectrometry, MS)的定义是:一个借助于电子测量技术来对离子的 m/z 值及其丰度进行测量的

技术^[9]。

1918年,芝加哥大学的物理学家戴姆培斯特(A. J. Dempster)基于维恩速度过滤器原理也独立设计了第一台 180° 磁场偏转加上定向聚焦的同位素质谱仪,使仪器的质量测量精度提高了100倍^[10],实现了质谱从实验室仪器向实用仪器的转化。

早期的质谱仪器为磁场偏转加上定向聚焦,以及基于方向和速度同时聚焦的马-赫(J. Mattauch - R. Herzog)型双聚焦质谱^[11,12]。但由于这种高分辨的双聚焦的质谱仪普遍比较笨重,提供磁场所需电力消耗太高,明尼苏达大学的尼尔(A. O. C. Nier)将电、磁质量分析单元整合成一个单元,设计了一种新型的、只有一个 60° 扇区的静态磁场的磁质谱^[13],促成了第一台商用质谱仪CEC 21-101的问世,并投入实际运用^[14, 15]。

工业化的化学分析中快速检测的需要快速增长,而磁质谱仪由于笨重、电磁铁的磁滞效应以及制造成本等因素,无法满足市场快速增长的需求。因此,使用四极杆质量分析器的无磁质谱仪应运而生^[16]。然而这种技术需要以更快的速度采集和处理数据,当时却缺乏这种技术,因此四极杆质谱技术就被搁置了下来。除了四极杆和磁场两种质量分析器以外,另外一个非常重要的质量分析器——飞行时间(time-of-flight, TOF)质量分析器也于此时被发展了出来。1946年, W. E. Stephens在麻省剑桥的美国物理学会会议上首次提出了线性飞行质谱仪的概念^[17]。1955年,在飞机制造公司本迪克斯(Bendix Corporation)位于底特律的研究室的W. C. Wiley和I. H. McLaren又再次报道了飞行时间质谱^[18]。本迪克斯公司并生产了第一台飞行时间质谱仪。

到20世纪60年代中期,气相色谱(gas chromatography, GC)技术出现。对于有机质谱,气相色谱的优点是显而易见的:首先它能够将具有热稳定性的挥发性有机混合物分离并逐个将其送入质谱仪,更重要的是这些化合物以气态进入质谱离子源。而所测样品必须气化是当时质谱仪对有机样品进行分析的必要条件。但一个重要问题是气相色谱所用的载气(氦、氢或氮)使得待测物的浓度大大降低。为解决这个问题,瑞典科学家E. Stenhagen发明了喷嘴射流及膜分离技术以富集待测物。这种富集技术后来分别得到同是瑞典科学家的R. Ryhage^[19],麻省理工学院的J. T. Watson^[20, 21],及Varian研究中心的P. M. Llewellyn、D. P. Littlejohn的改进^[22]。经过改进的气相色谱-质谱(GC/MS)仅用少量样品即可获得比其他任何分析仪器更多的信息,其应用范围迅速扩大,涵盖了环境分析、医学分析、食品分析、食品添加剂及法医学等领域。从此成为有机分析化学中一个重要的可靠分析仪器。

此时的质谱对样品的离子化技术仅限于电子电离(electron ionization, EI)。EI为使用高能电子束($50\sim 70\text{eV}$)轰击气化后的样品而形成分子离子($\text{M}^+\cdot$)。其

中一部分分子离子会由于自身携带的能量较高而进一步裂解,形成一系列质量不同的携带单电荷的离子,从而在质谱图上形成一个具不同 m/z 的谱系。对这些特征裂解的正确解析使人们能推断出一个待测有机化合物的结构。然而,有些化合物用 EI 形成的分子离子由于自身能量过高而极不稳定,导致其分子离子峰从质谱图上消失,从而无法对其分子质量进行测定。这导致人们开始尝试减少离子化过程中的能量传递。B. Munson 和 F. H. Field 因此共同开发了一种“化学电离”(chemical ionization, CI)的方法^[23-27]。化学电离产生的是质子化的待测物分子(MH^+)。与分子离子($M^{+\cdot}$)相比,这种质子化的分子自身携带的能量要低得多,因此能够在质谱仪中稳定存在并被检测到。

20 世纪 60 年代计算机技术的出现使由波恩莱茵弗里德里希·威廉大学(简称波恩大学)的 W. Paul 及其同事于 1950 年推出的四极杆质量分析器^[16]重新得到应用,导致 GC/MS 又提升了一个台阶。利用微型计算机控制,四极杆质量分析器能以更快的速度对色谱峰进行扫描。由于它具有更小的体积、线性的 m/z 范围,加速电压相对较低,且操作更为简便,因而备受使用者青睐。而气相色谱仪配用毛细管色谱柱后,待测物峰宽更窄,其在色谱峰中所含浓度也更高,与四极杆质量分析器组合后,各自的优势得以最大化。现在,气相色谱/四极杆质谱联用仪已成为有机质谱市场上无处不在的易于使用和维护的可靠产品。

EI 与 CI 和 GC/MS 的组合一直是有机质谱的主流。这个现象一直延续到解吸离子(desorption ionization, DI)源出现,解吸离子源能从凝聚相的样品中直接产生气态离子,形成次级离子质谱(secondary ion mass spectrometry, SIMS)。最早的次级离子质谱是曼彻斯特大学科技研究所化学部的 M. Barber 于 20 世纪 70 年代中期在 SIMS 基础上发展起来的快原子轰击(fast atom bombardment, FAB)离子化技术^[28]。这种技术使得用质谱对具非挥发性和热不稳定的化合物如多肽进行分析成为可能。它不但扩展了质谱分析的对象,还打开了用液相色谱与质谱结合对混合物样品进行分离、纯化和分析的大门。将这种方法与 LC/MS 结合,使质谱得以对具非挥发性和热不稳定性的生物聚合物如 DNA、多肽和蛋白质进行分析,是有机质谱分析中的一场革命。解吸离子源的进一步发展是使用放射性元素铜作为离子源中提供高能离子束的初级能源。²⁵²Cf 解吸方法(²⁵²Cf desorption ionization)也称等离子解吸离子化(plasma desorption, PD),是由得克萨斯农工大学的 R. D. Macfarlane 于 1974 年提出的^[29]。正是等离子解吸离子化开启了 F. Hillenkamp 和 M. Karas 的思路,使他们试图发展其他质谱解吸离子源而最终于 1987 年发展出基质辅助激光解吸(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)技术^[30]。

与此同时,耶鲁大学的费恩(J. B. Fenn)发展了电喷雾电离离子化方法^[31]。这种方法产生的多电荷离子使得在低质量范围内也可以分析高质量分子。采用这

种离子化技术,即使正常 m/z 范围仅为 1000~4000 的四极杆质谱仪,也可以分析质量超过数万道尔顿的蛋白质。

这段时间中出现的另一个重要的新离子化技术是 20 世纪 70 年代由 E. C. Horning 推出的主要产生质子化分子 MH^+ 的大气压化学电离(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)^[32]。不幸的是,从 20 世纪 60 年代到 90 年代早期,在质谱界一直通行一个“谜思”,即一个实用的新离子源产生的初级离子必须碎裂,以便从其产生的次级离子中获得化合物的结构信息。正是由于这个原因,很少产生碎片离子的大气压化学电离技术自问世后就被束之高阁,在实验室中被搁置了多年。直到 90 年代中期,人们意识到次级碎片离子可以通过质谱-质谱技术产生,而有控制的质谱-质谱技术产生的次级离子可以提供更多、更准确的结构信息后,这个“谜思”才被打破,大气压化学电离技术也因此而获得新生,迅速得到推广使用。

在电喷雾电离源(electron spray ionization, ESI)与串联质谱, MALDI 与 TOF 结合都获得成功之际,其他一度不被看好的质量分析技术如三维四极杆(three-dimensional quadrupole, 3D-QIT)、线性四极杆(linear quadrupole)、离子回旋共振(ion cyclotron resonance, ICR)等也因为计算机技术的使用和用傅里叶变换对离子检测结果进行处理而获得了新生^[33, 34]。所有这些仪器都具有时间串联(tandem-in-time)的特点,即其 MS/MS 功能的所有基本行为(前体离子的选择、裂解,产物离子的分析)都是在同一台仪器上在不同的时间段完成的。另一种新的离子分离技术,轨道离子阱(orbitrap)技术也于 2005 年正式上市,它作为时间串联仪器的第二级,在 LC/MS 中扮演着越来越重要的作用。

传统上,几乎所有的有机质谱分析都离不开样品前处理。在对有机物样品进行质谱分析前,样品或多或少地都需要进行不同的前处理如萃取、浓缩,对样品进行衍生化以提高其热稳定性并使之易于气化,以 GC 或 LC 进行分离等。质谱离子化技术演变至今,上述样品制备过程已不再是质谱分析的必要条件。在 2004~2005 年,已有若干可以将待测物从样品表面直接解吸出来并进行离子化的新技术被发展出来。使用这些技术,样品的采集、分析和对离子的检测可以在数秒钟内完成。这就意味着,对果皮上的农药进行分析时,不必再进行样品前处理程序。在对有嫌疑的吸毒后驾驶者进行检查时,不必进行尿样萃取浓缩并等候漫长的色谱分离。在对可能含有微量神经毒剂 VX 的一块多孔水泥进行法医鉴定时,没有必要担心待测物会在 GC、LC 的过程中分解。这些技术是:实时直接分析^[35](direct analysis in real time, DART)、解析电喷雾离子化^[36](desorption electrospray ionization, DESI)、大气压固体分析探头^[37](atmospheric pressure solid analysis probe, ASAP)。

现代质谱仪主要由五个部分组成。①进样系统和离子源,其主要功能是将待

测样品引入质谱仪并将其离子化；②质量分析器则将离子按其质量-电荷比(质荷比, mass charge ratio, m/z)进行分离；③检测器负责将分离后的离子信号按其 m/z 及强度(丰度)记录下来；④所有的这些过程都是在真空系统中进行, 以防止离子与其他不必要的东西发生碰撞而导致信号损失或结果复杂化；⑤计算机系统则负责对仪器状态进行控制, 对分析结果进行数据收集处理。图 1-1 为质谱仪的主要部件示意图。

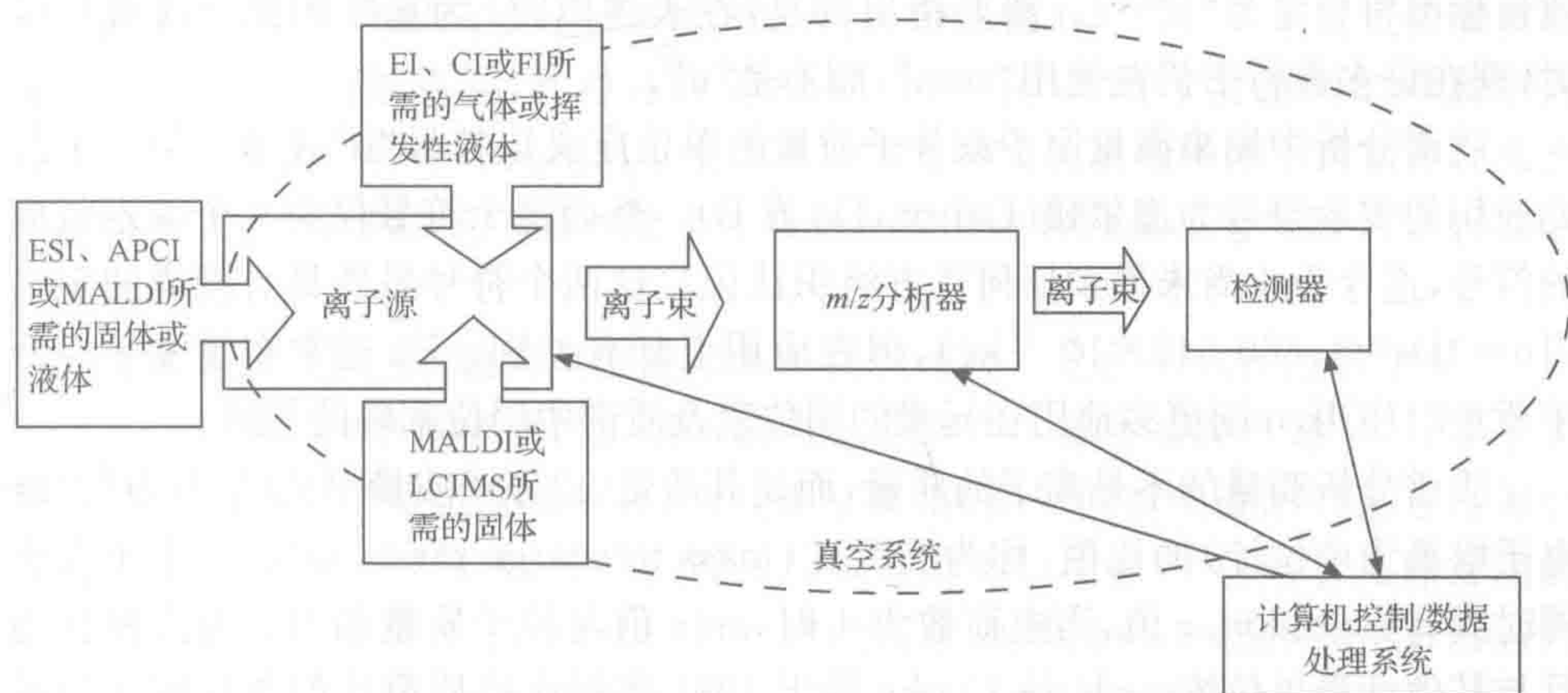


图 1-1 质谱仪主要部件示意图

1.2 质量分析

质量分析就是对于一个物体的质量进行测量。通常的方法是将待测物体质量与某一已确定质量的标准物进行比较, 从而得到待测物体的质量。测量后将测得的物体质量用某一种公认的单位表达出来, 这个过程即结束。天平的使用即是一例。在微观世界中, 化合物的质量则是用另外一种方式来测量的, 这种测量方法就是质谱分析, 其通用的质量的单位为公制单位, 符号为“u”, $1\text{u}=1.660\,540\times 10^{-27}\text{kg}$ 。

最初的国际标准原子质量(atomic mass unit, amu)的建立始于 1905 年, 用的是元素氧的分量, 同时将元素氧的质量定为一个绝对数值 16。这个数值被称为化学质量量度。这个标准为后来测定一系列新发现的, 大多数以氧化物形态出现的新元素时提供了方便。然而, 后来阿斯顿用他的第一台质谱仪测定元素的同位素时意识到这个标准并不适用, 因为自然形态的氧存在三个稳定同位素。而其丰度最高的同位素氧-16(^{16}O)仅占 99.76%。此后在 1920 年, 他宣布了一个物理质量量度, 即采用氧元素中最稳定的一个同位素 ^{16}O 的准确质量为 16。这就造成了一个混乱: 原子质量单位有两个定义值——以物理质量量度, 1amu 为 ^{16}O 的 1/16, 而

以化学质量量度,这个值成为氧元素 3 个自然同位素质量加权平均值的 1/16。二者相差了 1.000 275 倍。为纠正这个问题,根据 H. E. Duckworth 和 A. O. Nier 做出的建议,国际物理学家联合会(International Union of Physicists)于 1960 年在渥太华,国际化学学家联合会(International Union of Chemists)于 1961 年在蒙特利尔分别接受了碳-12 标准,即采用碳元素的一个稳定同位素 ^{12}C 原子质量的 1/12 为一个统一的原子质量标准,同时为了区别具有不同数值的 amu,新的统一的原子质量标准符合定为“u”^[38]。需要指出的是,在表述以 ^{12}C 为基准的原子质量单位时,现在许多教科书仍在使用“amu”,而不是“u”。

质谱分析中用来衡量原子或分子质量的单位定义以符号“u”表示。另一个与此通用的表示符号为道尔顿(Dalton, Da 或 D)。然而这个符号仅为一个约定俗成的符号,迄今为止尚未得到任何官方组织认证。这两个符号虽然具有同样的定义($1\text{u}=1\text{Da}=1.660\ 540\times 10^{-27}\text{kg}$),但在应用上却有差别。Da 通常在涉及平均分子质量时使用,u 则更多地用在元素的同位素及质谱中同位素峰的报道。

质谱分析测量的不是离子的质量,而是其质量(以原子质量单位计)与电荷(以电子电量为单位计)的比值,称为质荷比(mass-to-charge ratio, m/z)。由于离子同时具有质量和 m/z 值,当电荷数为 1 时, m/z 值与粒子质量相等。为方便使用且与其他计量单位统一,R. G. Cooks 等于 1991 年提议将质荷比的单位定义为汤姆孙(Thomson)^[39],其符号为 Th,单位是 $1\text{Th}=1\text{u}/e=1.036\ 426\times 10^{-8}\text{kg}\cdot\text{C}^{-1}$ 。

1.3 质谱数据的采集和处理

离子是带电微粒,运用磁场和(或)电场在真空中可以将质量不同但携带相同电荷的带电微粒(离子)分离。这些经分离后的离子信号经检测器检测并被记录下来后,就成为质谱图。早期获得的质谱图都是模拟信号,无论是采集,还是处理,都是一个冗长、繁琐的人工过程。为简化对此类谱图的数据处理,人们将质谱图中涉及质谱峰的多个数据点人工测量后加权平均处理(centroiding),简化成棒图(bar graph),以此来减小数据的存储量。棒图成为迄今运用最广的质谱图形式。现在,越来越多的人开始认识到质谱图中许多有用的信息,包括同位素的精细特征、质谱干扰因子、仪器噪声特性、离子信号线性等均已在数据简化中消失。随着现代计算机技术的发展,全面采集质谱测量数据已不是难事,大量的数据储存也不再是问题,因此这种数据简化已无必要。那些在数据简化中消失的因素实际上可以向质谱学家提供更多、更有用的信息。

现代质谱中,离散的离子流信号经过放大后,是以电信号的方式用一定速度在设定的质量范围内被连续采集下来的。电信号随即被计算机转换成数字信号。对这些离散的数据点进行实时平滑处理后就被连接成为一条连续的曲线,此为质谱

的原始数据(raw data)。因此,采样的频率决定了曲线(峰)的质量:数据点越多,峰的形状越接近真实。同样,信号与噪声的比率(signal to noise ratio, S/N, 信噪比)越大,峰的形状也越接近真实。

原始数据经计算机进一步处理,就成为可供使用的质谱图。一般的质谱数据系统都有几个选项供使用者选择:棒图(bar graph)、连续图(profile)及质量表(mass list)。

棒图是将整个谱图中的各个质谱峰各自进行加权平均后以一条垂线在横坐标 m/z 处标出质谱峰的重心,并对各峰高度进行归一化,即将丰度最高的峰高定为 100%,以此来提供各个峰的相对丰度信息。棒图的简化过程中并不区别各种噪声引起的峰型歧变,导致 m/z 值可能发生漂移。同时这种简化也会导致许多有价值的信息丧失。

连续图则是将所有数据点连接起来形成的谱图。这种图也经过数学处理,以扣除电子噪声获得平滑的曲线。处理的方法很多^[40],通常的程序是^[41-49]:①平滑数据,以移除仪器产生的随机噪声;②校正基线,移除早期基质或溶剂信号过强引起的基线漂移;③峰型辨认,评估信噪比以确定峰型。文献^[50]总结了几种常用的方法:动态平均(moving average filter)、塞维斯基-高莱法(Savitzky-Golay filter)、高斯法(Gaussian filter)、凯塞窗口(Kaiser window)及维吴利变换(Wavelet based filter)等。作者还列出了 12 个可供下载的质谱数据分析软件,有兴趣的读者可以进一步参考。与棒图相比,连续图保留了质谱图的原貌,但数据量要大很多。

质量表则能根据使用者的需要提供不同的数据,如峰的绝顶对丰度、半峰宽、面积百分比等。使用者也可以将质量表拷贝,用其他程序根据需要重建质谱图。

1.4 一些有关质谱及质谱图的基本名词及概念

1.4.1 元素的同位素及同位素质量

质谱分析的是离子中元素的同位素质量,确切地说,是待测离子中元素的单一同位素质量(monoisotopic mass)。无论使用的是何种离子化技术,一个离子的元素组成总是可以由质谱图中代表该离子的各个同位素峰及其丰度比获得。在对质谱图进行讨论前,弄清一些基本的名词及概念是十分重要的。本书列举的有关定义主要源自美国质谱学会测量与标准委员会于 1991 年发布的标准^[51],国际纯化学与应用化学联合会(International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC)的《2012 年 IUPAC 化学术语纲要 2.3.2 版》(IUPAC Compendium of Chemical Terminology Gold Book, version 2.3.2)^[52]以及斯巴克曼(D. O. Sparkman)的 2006 年《质谱案头参考》第二版(Mass Spectrometry Desk Reference

2006, 2nd edition)^[53]。更多的有关质谱的术语及其定义可以参考有关文献。

同位素(isotopes): 具有相同核电荷但原子质量不同的原子, 其原子具有相同数目的质子(proton), 但中子(neutron)数目却不同。同位素原子在元素周期表上占有同一位置, 化学性质几乎相同, 但原子质量或质量数不同。例如, 氢的三种同位素——氢(H)、氘(D, 又称重氢)、氚(T, 又称超重氢), 原子核中都有 1 个质子, 但是原子核中分别有 0 个中子、1 个中子及 2 个中子, 所以它们互为同位素。

稳定同位素(stable isotopes)与放射性同位素(radio isotopes): 一个元素中不发生或极不易发生放射性衰变的同位素是稳定同位素。以碳元素为例: 碳(原子质量: 12.0107)共有 15 种同位素, 其中有 2 种是稳定的, 即¹²C(相对原子质量: 12.000 000 000 0)、¹³C(相对原子质量: 13.003 354 837 8)。放射性同位素则是不稳定的, 此类同位素的原子核会不间断地、自发地放射出射线, 直至变成另一种稳定同位素, 这就是核衰变。¹⁴C(相对原子质量: 14.003 241 989)就是这样一种碳的放射性同位素, 其衰变方式为 β 衰变, 衰变后¹⁴C 转变为¹⁴N。¹⁴C 的原子半衰期为 5730 年。由于所有有机物中都含有¹⁴C, 因此根据它的丰度可以对考古学、地质学和水文地质学样本的年代进行确定。若以¹⁴C 标记化合物为示踪剂, 则可对化学和生命科学中的微观运动进行探索。碳的其他放射性同位素则极不稳定, 其半衰期以秒或毫秒计, 因此其丰度常被忽略不计^[54]。

同位素相对丰度(relative isotopic abundance): 自然界中存在的某一元素的各种同位素的相对含量(以原子百分数计)。地球上元素的同位素丰度是指它们在地壳中的相对含量, 如氢的同位素丰度为¹H 99.985%, ²H(D) 0.015%; 氧的同位素丰度为¹⁶O 99.76%, ¹⁷O 0.04%, ¹⁸O 0.20%。碳的同位素丰度为¹²C 98.89%, ¹³C 1.109%, ¹⁴C 则低于百万分之一(0.0001%)。大多数元素都是由具有一定自然丰度的同位素组成。根据其具有的稳定同位素数目, 可以将元素划分为 X、X+1 及 X+2 等类型。例如, F、Na、P 和 I 仅有一种稳定同位素, 为 X 类; 而 C、N 等元素有两种稳定同位素, 即为 X+1 类; Cl、Br 等则为 X+2 类。这些元素形成化合物后, 其同位素以一定的丰度出现在化合物中。这种具有特征性的同位素丰度分布就成为鉴别一个化合物的重要指标。

平均质量(average mass): 据分子式计算出的分子、离子或自由基的质量, 也称式量, 是组成分子的所有元素的质量之和。由于元素的同位素的存在, 有机化合物的分子式实际上包括了其组成元素的各个同位素的排列组合。

以计算出的这些同位素质量及其归一化(最大质量的丰度为 100%)的丰度作图即可获得一张该化合物的理论预测质谱图, 称为同位素分布图(isotopic distribution, 图 1-2)。这个预测质谱图在质谱分析中极为有用。它为实际的质谱分析提供了一个理论参照, 以用来检验实际测量结果的优劣。在准确质量测量(accurate mass measurement)中更是必不可少的参照。目前已有很多计算机程序可以