

全国高等学校教材
供医学检验技术专业用

临床色谱质谱检验技术

主 编 王思合 副主编 程雅婷 赵蓓蓓

全国高等学校教材
供医学检验技术专业用

临床色谱质谱检验技术

主 编 王思合

副主编 程雅婷 赵蓓蓓

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

临床色谱质谱检验技术 / 王思合主编. —北京:人民卫生出版社, 2017

ISBN 978-7-117-24134-2

I. ①临… II. ①王… III. ①色谱-质谱-检验-医学院校-教材 IV. ①O657.63

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 027763 号

人卫智网	www.ipmph.com	医学教育、学术、考试、健康, 购书智慧智能综合服务平台
人卫官网	www.pmph.com	人卫官方资讯发布平台

版权所有, 侵权必究!

临床色谱质谱检验技术

主 编: 王思合

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 中国农业出版社印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 12

字 数: 300 千字

版 次: 2017 年 4 月第 1 版 2017 年 4 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-24134-2/R · 24135

定 价: 53.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

编审委员会

主 任 潘柏申(复旦大学附属中山医院)

副主任 徐 霞(广州医科大学)

编 审 (以姓氏笔画为序)

丁世家(重庆医科大学)

李水军(中国科学院上海临床研究中心/上海市徐汇区中心医院)

吴增茹(广州医科大学)

何宗信(香港中文大学)

陈婷梅(重庆医科大学)

郑 磊(南方医科大学)

郭 玮(复旦大学附属中山医院)

黄宪章(广东省中医院)

彭荣飞(广州市疾病预防控制中心)

编 者 (以姓氏笔画为序)

Adam McShane(美国克利夫兰医疗中心)

王思合(美国克利夫兰医疗中心/广州医科大学)

王慧娟(广州医科大学金域检验学院)

文国学(广州医科大学金域检验学院)

刘伟霞(广州医科大学金域检验学院)

李 维(广州医科大学金域检验学院)

李冰玲(广州医科大学金域检验学院)

李卓阳(广州医科大学金域检验学院)

余旭辉(广州医科大学金域检验学院)

汪 慧(广州医科大学金域检验学院)

陈文彬(广州医科大学金域检验学院)

赵蓓蓓(广州医科大学金域检验学院)

董 衡(广州医科大学金域检验学院)

程雅婷(广州医科大学金域检验学院)

虞 倩(复旦大学附属中山医院)

禡学怡(广州医科大学金域检验学院)

秘 书 李 维(兼)

前 言

色谱技术和质谱技术作为强大的分析技术,在生物医学研究领域已有较长的应用历史。由于这些技术灵敏度高、特异性强、且能够同时检测多种化合物的特点,在西方国家的临床诊断应用研究工作中得到了十分快速的发展,为疾病的诊断、预后和治疗以及人体健康的评估等做出了独特和重要的贡献。然而,色谱质谱技术,尤其是以质谱为核心的技术,在中国临床实验室中的应用发展较为缓慢。截至目前,只有少数第三方医学实验室和大型医疗中心或医院有不同程度的应用,这其中最主要的原因,也是最具挑战的问题之一就是专业人才的匮乏。近几年,中国教育部也在提倡并要求高等学校培养实用型、创新型、与国际接轨的医学检验技术人才。为了响应国家教育改革的方向和目标,更本着为医学检验行业培养色谱及质谱专业类技术人才的美好愿望,广州医科大学金域检验学院自 2015 年起,在国内率先开展了《临床色谱质谱检验技术》这门课程。基于对本科生系统教育的需求,自然而然地促成了此本囊括色谱质谱技术理论和实际应用的综合教材的产生。

本教材从色谱技术和质谱相关技术的发展史开始,详细介绍了技术的基本理论和仪器原理,并分步介绍了技术应用过程中的方法、开发要求与建议。此外,本书还列举出了许多真实的技术应用案例,以便更好地阐述色谱与质谱技术在临床诊断中多个领域的应用概况,这些应用包括:氨基酸检测,25-羟基维生素 D 检测,微量元素分析,治疗药物监测,遗传代谢性疾病检测,内分泌疾病如先天性肾上腺皮质增生症、原发性醛固酮增多症等检测,微生物鉴定及蛋白标志物的鉴定与定量分析等。本书的编者主要来自于广州医科大学金域检验学院和广州金域医学检验中心临床质谱检测中心的老师和工作者,他们绝大多数拥有 10 年以上的临床色谱与质谱技术应用经验,并具有一定的本科实际教学经验。因此,本书最大的特色在于融合了与色谱、质谱技术相关的基本理论、实际应用和最新的研究文献资料。本教材是专门为医学检验本科生、研究生及技术人员编写的,也可作为临床实验室相关专业技术人员的自我学习提供参考。

在编写过程中,广州医科大学各级领导给予了我们充分的支持和关注,专门组织重庆医科大学、南方医科大学、中南大学检验学院、海南大学检验学院、广州医科大学金域检验学院的专家及教授就教材的编写大纲及内容做了详尽的讨论及指导,在此,谨表示衷心的感谢!同时,感谢上海复旦大学附属中山医院潘柏申教授、郭玮教授和虞倩博士,南方医科大学郑磊教授,重庆医科大学陈婷梅教授、丁世家教授,广东省中医院黄宪章教授,香港中文大学何宗信教授,广州市疾病预防控制中心彭荣飞教授等对本书有关章节内容提出的修改意见。

程雅婷和赵蓓蓓两人对本书的结构和内容进行了设计,在编审过程中也力求使本书中所有的内容尽可能地科学、客观、合理,实现最优化。所有的编者在他们忙碌的实验室工作之余,花费了大量的时间进行本教材的编写与修改工作,他们的贡献是本书最富价值的一部分,因为他们是在临床色谱质谱实验室进行具体工作的人员,最清楚对于实际应用而言,哪些知识比较重要,也因此使得本书的实用性更强。

编写中国第一本介绍色谱与质谱技术在临床中应用的教材,对我们来说是一个巨大的挑战。由于主题内容较多,时间、能力和经验等均有限,本书内容难免会有纰漏和错误之处,非常欢迎各位读者给予批评和指正,您的建议也将会促进本书的不断改进和完善。

王思合

2016年12月

目 录

第一章 质谱技术概论	1
第一节 质谱技术发展简史	1
一、质谱技术的起源	1
二、质谱技术的发展及其在医学检验中的应用	3
第二节 质谱及质谱仪的基本概念与术语	3
一、离子相关术语	3
二、同位素	4
三、质量数	5
四、质谱图	5
五、质谱仪主要性能指标	6
第三节 质谱的原理	7
第四节 质谱仪的主要组成部分	8
一、离子源	8
二、质量分析器	17
三、检测器	22
四、真空系统	24
第二章 色谱技术概论	26
第一节 色谱发展简史	27
一、色谱技术的起源	27
二、色谱法的发展	27
三、色谱法在医学检验中的作用	29
第二节 色谱分析原理	29
一、色谱法的定义与分类	29
二、色谱分离过程	30
三、常用色谱术语	31
四、塔板理论	34
五、色谱的速率理论	37

六、色谱的定性与定量分析	38
第三节 气相色谱仪	42
一、气相色谱仪的构造	42
二、气相色谱柱	49
三、低热容技术	52
四、气相色谱仪小结	52
第四节 液相色谱仪	52
一、液相色谱仪的构造	52
二、液相色谱柱	57
三、液相色谱仪小结	59
第三章 生物样品制备	62
第一节 生物样品制备要求	62
一、样品制备的必要性	62
二、样品制备的原则	63
第二节 生物样品的类型	64
一、血液样品	65
二、尿液样品	66
三、唾液样品	66
四、组织样品	66
第三节 常用生物样品制备技术	67
一、蛋白沉淀	67
二、液液萃取	69
三、固相萃取	70
四、衍生化	72
五、自动化样品制备	77
六、生物样品制备技术现状及展望	79
第四章 气相色谱 - 质谱技术	83
第一节 气相色谱 - 质谱联用仪器系统	84
一、气相色谱 - 质谱联用仪的组成及工作原理	84
二、气相色谱 - 质谱联用中的主要技术问题	84
第二节 气相 - 色谱质谱方法的建立	87
一、文献检索	87
二、质谱方法的建立	87
三、气相色谱方法的建立	93
四、总结	96
第五章 液相色谱 - 质谱技术	98
第一节 液相色谱 - 质谱联用仪器系统	99

一、液相色谱 - 质谱联用仪的组成及工作原理	99
二、液相色谱 - 质谱联用中的主要技术问题	99
第二节 液相色谱 - 质谱方法的建立	102
一、质谱方法的建立	102
二、液相色谱方法的建立	107
三、总结	110
第六章 色谱质谱技术在临床检验中的应用	112
第一节 HPLC 在氨基酸检测中的应用	113
第二节 LC-MS/MS 在 25- 羟基维生素 D 检测中的应用	118
第三节 ICP-MS 在人体微量元素检测中的应用	122
第四节 色谱质谱技术在治疗药物监测中的应用	126
第五节 色谱质谱技术在生化遗传中的应用	129
第六节 色谱质谱技术在内分泌疾病检测中的应用	135
一、LC-MS/MS 在嗜铬细胞瘤 / 副神经节瘤检测中的应用	136
二、LC-MS/MS 在先天性肾上腺皮质增生症检测中的应用	141
三、LC-MS/MS 在原发性醛固酮增多症检测中的应用	146
四、LC-MS/MS 在库欣综合征检测中的应用	148
五、LC-MS/MS 在甲状腺疾病检测中的应用	153
六、LC-MS/MS 在其他内分泌疾病检测中的应用	157
第七节 色谱质谱技术在临床毒理学中的应用	159
第八节 色谱质谱技术在蛋白组学和微生物学中的应用	165
一、色谱质谱技术在蛋白组学中的应用	165
二、色谱质谱技术在微生物学中的应用	166
第七章 展望	169
第一节 色谱及质谱技术临床应用现状	169
第二节 色谱及质谱技术临床应用的挑战及要求	171
第三节 色谱及质谱技术的发展趋势	173
第四节 色谱及质谱技术在中国临床应用的展望	176

第一章

质谱技术概论

学习目标

质谱分析是分离和检测带电物质的一类分析方法。质谱仪本质上是测量离子质荷比的分析仪器,是将被测物质离子化后,按照离子的质荷比进行分离,进而测量各种离子峰的强度而实现分析的仪器。在众多分析方法中,质谱分析法被认为是一种同时具备高特异性和高灵敏度的普适方法;同时,该方法还可提供待测物质的分子量和丰富的结构信息等。正是基于质谱分析的这些特点,其在医学检验领域和生命科学研究领域的应用越来越广泛。通过本章内容的学习,可系统地了解并掌握质谱分析的原理、质谱离子源和质量分析器的分类,熟悉质谱的检测器和真空系统,为后续色谱质谱联用技术章节的学习奠定理论基础。

掌握

1. 质谱的原理。
2. 质谱离子源的种类及区别。
3. 质谱质量分析器的种类及区别。

熟悉

1. 质谱的检测器。
2. 质谱的真空系统。

了解

质谱技术的发展简史。

第一节 质谱技术发展简史

一、质谱技术的起源

质谱的发展至今已有 100 多年历史,最早是从研究一个简单的物理现象开始的,即带电粒子的运动轨迹在磁场和电场影响下发生偏转。1886 年,德国物理学家戈尔德施泰因(E. Goldstein)首次在低压气体放电实验中观察到正离子流现象。随后,德国物理学家维恩(F. F. Wien)于 1898 年对该现象予以了证实,并发现正电荷粒子束在磁场中会发生偏转。于是他在 1899 年建造了一台设备,利用平行的电场和磁场,将阳离子射线(正离子流)按照其质荷比(m/z)

进行了分离,这些都为质谱的诞生奠定了基础。

质谱的基本原理是在 1897 年由英国物理学家汤姆逊爵士(J. J. Thomson)在给剑桥大学哲学会所做的一次讲座中首次提出的(图 1-1)。汤姆逊在研究稀薄气体放电的实验中证明了电子的存在,测定了电子的质荷比,轰动了整个物理学界。1906 年,他也因为“气体电导理论和实验研究”对科学发展所作出的伟大贡献获得了诺贝尔物理学奖。在维恩的研究基础上,汤姆逊于 1907 年设计、1910 年升级完成了一个可用于区分电子和氢原子(核子)的“抛物线摄谱仪”装置,这也被看做是世界上第一台质谱装置,可以测出电子的质量。

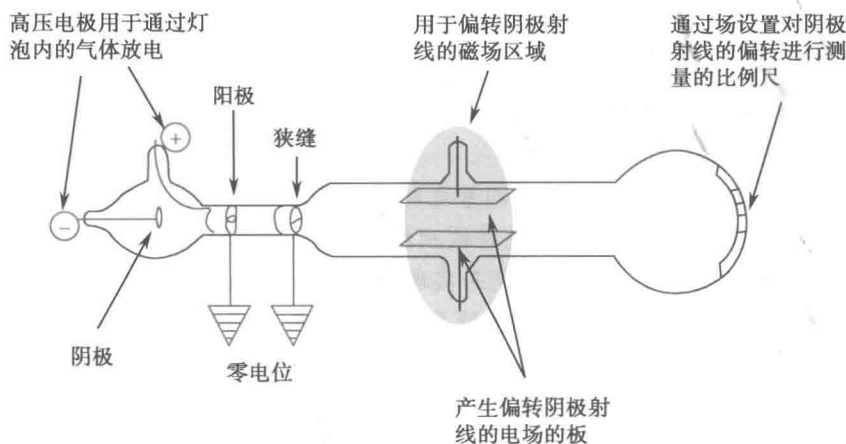


图 1-1 Thomson 研究阴极射线的装置图

1912 年,汤姆逊及他的助手、英国化学家与物理学家阿斯顿(F. W. Aston)通过使用电场和磁场成功地将一股离子化的氖(Ne)气流分成了两组同位素组分(^{20}Ne 和 ^{22}Ne),获得了第一张同位素质谱图。但由于汤姆逊当时并不认为稳定元素具有同位素,因而他并未考虑到这两条谱线是 Ne 的两个稳定同位素峰,而试图找出其他解释。阿斯顿则证实了这两个组分是氖的两个同位素,他于 1913 年 9 月英国科学促进会在伯明翰举办的会议上,提出证据并指出:“大气中的氖并不是一个单一元素,而是两个元素的混合物,其原子量分别约为 19.9 及 21.1”。

1918 年,美国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的原理独立设计出了第一台 180° 磁场偏转加上定向聚焦的同位素质谱仪,使仪器的质量测定精度提高了 100 倍,实现了质谱从实验室仪器向实用仪器的转化。阿斯顿(F. W. Aston)在 1919 年也首次制成了具有较高聚焦性能的质谱仪,发现了稳定元素具有同位素,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,他也因此荣获了 1922 年的诺贝尔化学奖。自此以后,质谱逐渐成为一种分析手段,主要被用于同位素测定和无机元素的分析。

在质谱的发展过程中,与离子相关的技术决定了质谱应用的广泛性,有三位科学家作出了突出贡献。1989 年,德国波恩大学的保罗(Wolfgang Paul)与美国华盛顿大学的德默尔特(Hans G. Dehmelt)因发展了离子捕集技术而获得诺贝尔物理学奖。2002 年,日本科学家田中耕一(K. Tanaka)与美国科学家约翰·芬恩(J. B. Fenn)因发展了对生物大分子进行鉴定和结构分析的方法——建立软解析电离法对生物大分子的质谱分析而获得了当年的诺贝尔化学奖。这两种方法即是基质辅助激光解吸电离技术(MALDI)和电喷雾电离技术(ESI),它们的

出现大大促进了质谱技术在大分子领域、尤其是生命科学领域的广泛应用。

二、质谱技术的发展及其在医学检验中的应用

在质谱仪被命名之后的几十年里,质谱技术经过了快速发展后已经成为一种在物理和化学学科中被广泛应用的分析技术。然而,质谱技术在生物样本分析中的应用还是相当有限的,这主要是因为理论上离子化技术仅适用于小分子量的化合物(分子量在 200 道尔顿或者更小),并且没有非常好的方法便捷地将生物样本引入到高真空质谱系统中。直到 1980 年以后,这种状况才得到突破性进展,ESI 和 MALDI 技术完美地实现了生物大分子的软离子化,创建了将样本便捷地引入质谱系统的关键技术。自此之后,质谱技术在生物样本分析领域中迅速发展,起初是在研究和制药行业,接着是在临床色谱质谱实验室的研究和应用中。20 世纪 90 年代中后期,质谱技术在生物样本分析领域中的应用有了更加迅猛的发展,与质谱联用的前端技术也出现了由气相色谱向液相色谱转变的趋势。液相色谱-质谱技术的联用使得样品的前处理流程更加简化,大大缩短了报告周期。

现如今,在进入 21 世纪的第二个十年,液相色谱-质谱联用技术已经成为临床实验室广泛应用的检测技术,检测项目也已扩展至数百项,范围涵盖了罕见和高难度的分析,如药物监测、遗传代谢病检测、营养素检测、激素检测等。目前,质谱技术在中国医学检验实验室中的应用主要包括微生物鉴定、生物化学检验(包含激素检测、药物监测、遗传代谢性病检测、营养素检测、毒理学等)、代谢组学与蛋白组学的研究以及参考方法的建立和标准物质研制等方面。

第二节 质谱及质谱仪的基本概念与术语

一、离子相关术语

1. 离子 指携带一定数目电荷的原子或分子。

2. 前体离子 又称母离子,指能通过反应形成特定产物离子的离子。

3. 产物离子 指某一前体离子通过特定反应生成一种或多种带电粒子。产物离子只是相对而言,因为产物离子还可能进一步反应生成新的产物离子。

4. 分子离子 指分子失去或获得一个或多个电子(而非其他原子或基团)形成的正离子或者负离子。分子离子可进一步碎裂生成碎片离子,此时二者即为前体离子和产物离子的关系。

5. 加合离子 指在分子上加上一个具有明显质量的带电微粒如质子(H^+)、钠离子(Na^+)、氯离子(Cl^-)等形成的离子。

6. 碎片离子 指前体离子解离生成的产物离子。由于前体离子变为产物离子可能只发生了电荷态的改变,也可能生成了加合离子,因此产物离子未必是碎片离子,但碎片离子一定是产物离子。

7. 复合电荷离子 指带有两个或两个以上电荷的离子,常由电喷雾电离源产生,多见于多肽、蛋白质等分子。复合电荷离子使在较低质量范围上操作的仪器对大分子进行质量分析成为可能。

8. 簇离子 指两个或多个同种或不同种原子或分子通过非共价键力与离子结合形成

的新离子,如 $[(\text{NaCl})_n\text{Na}]^+$ 等。在液相色谱-电喷雾电离质谱(LC-ESI-MS)中,目标离子、溶剂分子等从大气压下转移至真空中,因迅速膨胀而冷却,易相互结合形成簇离子,成为重要的干扰来源。

9. 原子质量 指原子处于基态时的静止质量,原子质量单位是由 ^{12}C 来定义的,即一个处于基态的 ^{12}C 原子的静止质量的 $1/12$ 定义为一个质量单位,用 u 表示:

$$1u=1.660540 \times 10^{-27}\text{kg}$$

另一个与此通用的表示符号为:道尔顿(dalton, Da 或 D, $1u=1\text{Da}$),其中 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同位素峰的报道中。

10. 质荷比(m/z) 指离子的质量数除以它所带的电荷数(不考虑正、负号)得到的比值。若离子所带电荷为 $z=1$,则质荷比等于该离子的质量数。

11. 强度 指检测器对离子响应信号的强弱或谱图中峰的高低,可分为绝对强度和相对强度。绝对强度可用检测器每秒计数(counter per second, CPS)来表示,相对强度则以最高峰的强度为100%,其他峰的强度用占最高峰强度的百分比表示。

12. 丰度 指离子数量的多寡,可分为绝对丰度和相对丰度。绝对丰度指离子的绝对数量,相对丰度则以最高丰度离子的丰度为100%,其他离子的丰度用占最高丰度离子的百分比表示。

二、同位素

同位素是指同一元素的不同原子,其原子具有相同数目的质子,但中子数目不同。如氢的三种同位素:氕(H)、氘(D)、氚(T),它们原子核中都有1个质子,但却分别有0个中子、1个中子及2个中子,因此它们互为同位素。

同位素原子在元素周期表上占有同一个位置,化学性质几乎相同,但因原子质量或质量数不同,从而其质谱性质、放射性转变和物理性质(例如在气态下的扩散本领)有所差异。根据元素的稳定性分为稳定同位素和放射性同位素,不发生或极不易发生放射性衰变的同位素是稳定同位素;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。

同位素相对丰度是指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)。大多数元素都是由具有一定自然丰度的同位素组成的,如氧的同位素丰度为 ^{16}O 99.76%、 ^{17}O 0.04%、 ^{18}O 0.20%。常见元素的天然同位素丰度如表 1-1 所示。根据其具有的稳定同位素数目,可将元素划分为 X、X+1、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 类型;Cl、Br 等则为 X+2 类型。

表 1-1. 常见元素的天然同位素丰度

同位素	相对丰度(%)	同位素	相对丰度(%)
^1H	99.985	^{15}N	0.366
^2H	0.015	^{16}O	99.759
^{12}C	98.893	^{17}O	0.037
^{13}C	1.107	^{18}O	0.204
^{14}N	99.634	^{32}S	95.00

续表

同位素	相对丰度 (%)	同位素	相对丰度 (%)
³³ S	0.76	³⁷ Cl	24.23
³⁴ S	4.22	⁷⁹ Br	50.537
³⁵ Cl	75.77	⁸¹ Br	49.463

这些同位素以一定的丰度分布在化合物中,该特性成为鉴别一个化合物的重要指标。如在一个离子的元素组成已知时,稳定同位素类型可以用于预测其质谱峰的相对丰度;同样,根据一组质谱峰中的离子强度之比,用元素类型可以估计出分子的元素组成。

三、质量数

质量数是指原子核内质子数和中子数的总和。根据计算方式的不同,化合物的质量数分为整数质量、单一同位素质量、平均质量等。

元素的整数质量是其最大丰度稳定同位素的整数质量。以溴为例,因其同位素 ⁷⁹Br 的丰度(0.51)要高于 ⁸¹Br(0.49),其整数质量为 79u。而一个分子、自由基或离子的整数质量是其所有组成元素的整数质量之和。

元素的单一同位素质量为其最大丰度同位素的准确质量。如 ¹²C 为 12.0000, ¹H 为 1.0078, ¹⁶O 为 15.9948。

平均质量是依据所有天然同位素丰度的该元素原子量来计算。由于元素同位素的存在,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,成为同位素分布图,见图 1-2。

四、质谱图

质谱图(mass spectrum)指以离子的 m/z 为横坐标,质量峰的(相对)强度或离子的(相对)丰度为纵坐标绘制的谱图。质谱图中强度最大的峰称为基峰(base peak),每一个完全分离的峰对应的是某一特定 m/z 离子的集合。若峰形对称,峰顶点的横坐标即为该离子的 m/z。

质谱图有连续图、棒图和质量表三种形式,见图 1-3。

1. 连续图 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,通常的程序是: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。与棒图相比,连续图保留了质谱图的原貌,但数据信息量则要大很多。

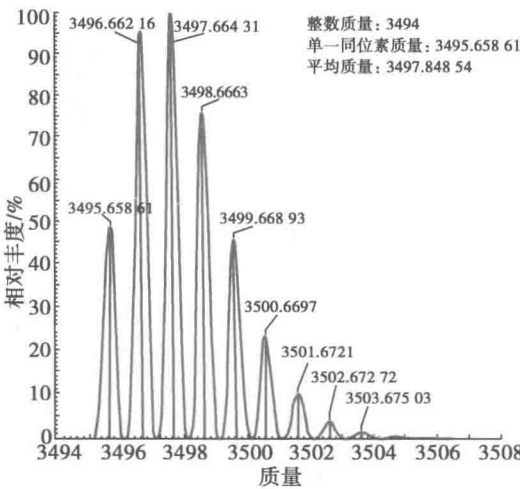
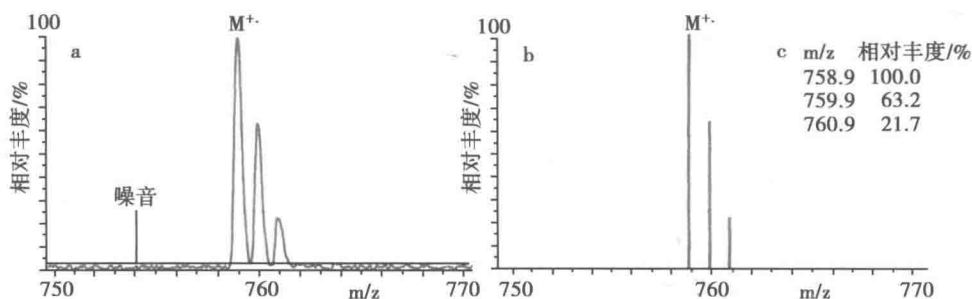


图 1-2 胰岛素 B 链质子化分子 MH+ (C157H234N40O47S2) 的同位素分布图

图 1-3 $C_{54}H_{110}$ 三种质谱峰谱图

a: 连续图; b: 棒图; c: 质量表

2. 棒图 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直在横坐标 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位 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信息的丢失。

3. 质量表 根据使用者的需要提供不同的数据, 如峰的绝对丰度、半峰宽、面积百分比等。

五、质谱仪主要性能指标

1. 质量测定范围 表示质谱仪所能够分析样品的相对原子质量(或相对分子质量)范围, 通常采用原子质量单位进行度量。测定气体用的质谱仪, 一般质量测定范围在 2~100, 而有机质谱仪一般可达几千, 现代质谱仪可以研究相对分子质量达几十万的生物样品。

2. 分辨能力 指质谱仪分开相邻质量峰的能力, 又称为分辨率。美国质谱学会对分辨率有两种定义方法:

(1) 10% 峰谷法: 对两个相等强度的相邻质谱峰, 若两峰间的峰谷低于峰高的 10% 时, 则认为两峰已经分开, 其分辨率可用式 (1-1) 表示:

$$R = \frac{m_1}{m_2 - m_1} = \frac{m_1}{\Delta m} \quad \text{式 (1-1)}$$

式 (1-1) 中, m_1 与 m_2 为相邻峰的质量数, 故在两峰质量数相差较小时, 要求仪器的分辨率越大。

(2) 半峰宽法: 对于单峰, 测其峰高 50% 处的峰宽, 作为上式中的 Δm , 此时分辨率的定义为:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad \text{式 (1-2)}$$

式 (1-2) 中, m 为单峰的质量数, Δm 为半峰宽。

从公式可以看出, 这两种方法的差别在于 Δm 的定义。如图 1-4(a) 中 Δm 值为 1, 而图 1-4(b) 中的 Δm 值为 0.5, 这导致用半峰宽法获得的分辨率比用 10% 峰谷法高一倍, 因此在报告数据时需予以说明。

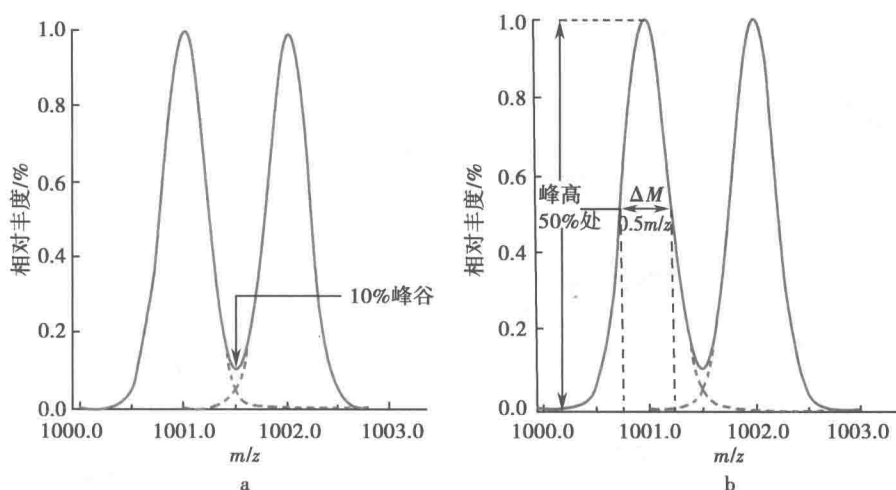


图 1-4 质谱峰分辨率定义

a: 10% 峰谷; b: 半峰宽

一般低分辨仪器分辨率在 2000 左右,若要进行准确的同位素质量及有机分子质量的准确测定,则需要使用分辨率大于 10 000 的高分辨率质谱仪。

第三节 质谱的原理

质谱 (mass spectrometry, MS) 是一种测量带电粒子质荷比的分析技术。质谱技术被用于测定带电粒子的质量,确定样品或微粒的元素组成,阐明分子 (如多肽或其他化合物) 的化学结构。

一个典型的质谱分析过程包括以下四个步骤 (图 1-5): ①将样品引入质谱仪中,样品组分被多种电离方式中的一种方式电离后离子化,产生带电离子;②在质量分析器中,在电磁

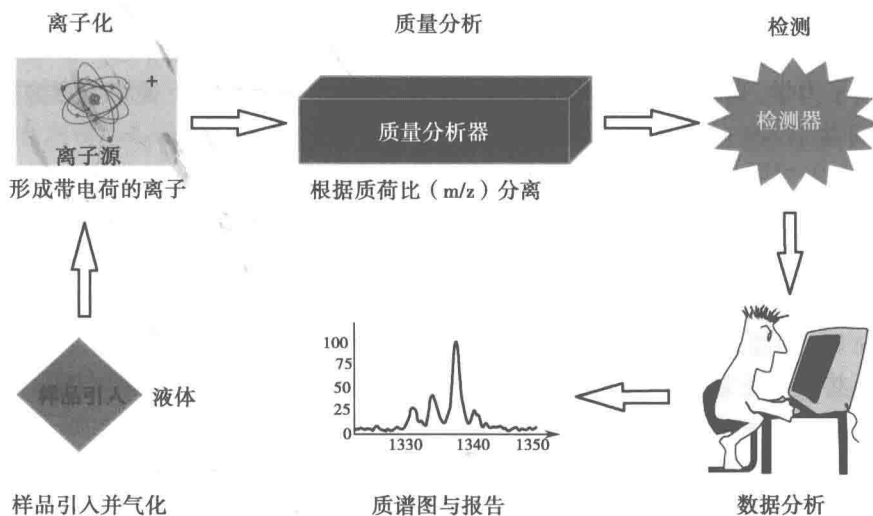


图 1-5 简单的质谱原理图

场的作用下,带电离子按照质荷比的不同实现分离;③带电离子到达检测器,通常是被定量检出;④离子信号被转变成质谱图。

根据这四个步骤,质谱仪通常由以下五个部分:①样品引入装置;②离子化装置;③质量分析器;④离子检测器;⑤信号处理/数据生成装置。

总的来说,在组成一台质谱仪时,这五个基础组成部分有很多不同的组合方式和实现形式,每一种不同的方式都有各自的优缺点。在一台真实的仪器中,一般会由多个不同的部分组合在一个物理装置中。比如,样品引入装置或雾化装置和离子化装置通常是不可分离地共存于一个物理装置中,这个装置一般叫做“离子源”;类似地,离子分离和检测装置也会组合在一起,形成一个连续不可分割的物理装置。除了这五个基础组成部分,每一类质谱仪一般还需要增加一个必需的辅助组成部分:样品加载装置(传输装置)。该装置将样品以合适的形式引入到样品引入装置或雾化装置中,通常是色谱仪或是固态物质依赖的基质辅助激光解吸电离源(MALDI)和相关的固体样品处理技术。

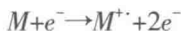
第四节 质谱仪的主要组成部分

一、离子源

质谱技术的核心就是产生离子、分离离子及检测离子,其他所有部分都是为了实现这个目的而发挥各自功能、提供服务。要在质谱仪上对目标分析物进行检测,前提条件是这个目标分析物能够被离子化,可见离子化过程对于质谱分析的重要性。下面对质谱的各种离子源作简要介绍。

(一) 电子电离源

电子电离源(electron ionization, EI)是指使用高能电子束与中性气态分子相互作用并使之电离的方法。在高真空的离子源中,电流通过用钨或铼制作的放电灯丝加热,发射出热电子。这些电子被加速到 70 电子伏特(eV)后,形成电子束聚焦于电子接收板上。在外加磁场的作用下,电子束以螺旋方式运动,然后垂直引入气化后的中性待测物,电子将携带的能量传递给中性待测物分子,导致分子丢失一个电子,以下面的方式形成正离子:



根据量子力学,光、电粒子都具有波粒二象性,因此电子具有如下德布罗意波长(λ):

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad \text{式(1-3)}$$

式(1-3)中, m 是电子的质量; v 是其速度; h 是普朗克常量。离子的产生及其效率与电子携带的能量及待测物的分子结构直接相关。当 λ 为 0.27nm 时,它具有的动能是 20eV;当 λ 为 0.14nm 时,动能是 70eV。当 λ 与有机分子的键长(约 0.14nm)相当时,会引起有机分子共价键与其共振。正是这种共振使得电子携带的能量能够传递给待测有机分子,进而从分子共价键中激发出一个电子,使分子离子化。通常而言,在这种条件下(70eV),电子传递到分子的能量为 10~20eV。这时电子的能量传递效应被最大化,使得离子化效率达到最高,大约千分之一的分子会被离子化。因此,电子电离源中的电子并不“轰击”分子,离子流不是由电子和分子之间碰撞产生。传统的“电子轰击电离”的名称并不正确,应避免使用。图 1-6