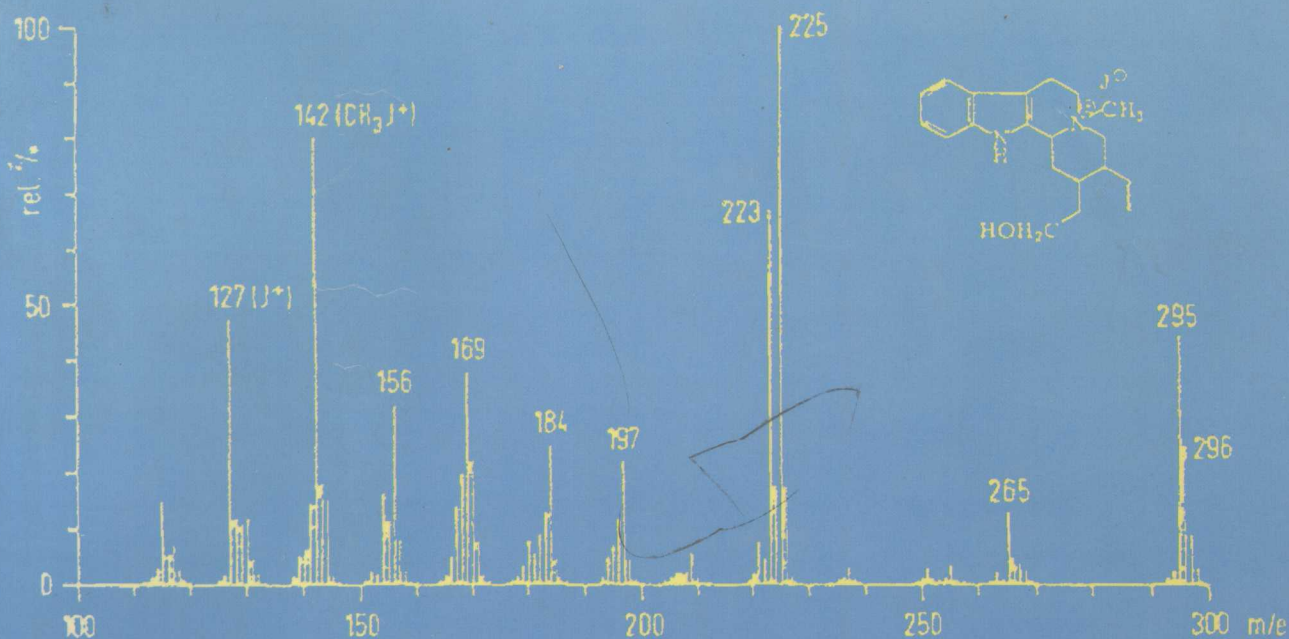


现代有机质谱技术及应用

有机质谱专业委员会 编



中国人民公安大学出版社

0657.6
209

现代有机质谱技术及应用

有机质谱专业委员会 编

江苏工业学院图书馆
藏书章

中国人民公安大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

现代有机质谱技术及应用/有机质谱专业委员会编.北京:中国人民
公安大学出版社,1999.8

ISBN 7-81059-388-9

I. 现… II. 有… III. 质谱法 IV. 0657.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 46165 号

中国人民公安大学出版社出版发行

(北京木樨地南里 邮编 100038)

(电话:63486364)

新华书店北京发行所经销

北京英杰印刷厂印刷

787×1092 毫米 1/16 30.5 印张 766 千字

1999 年 8 月第 1 版 1999 年 8 月第 1 次印刷

印数 0001—1000 册

定价:50.00 元

(如有印装质量问题,请与出版社联系)

主 编:苏焕华

副主编:(按姓氏笔画顺序排列)

王光辉 王维国 吴筑平
杨松成 徐建中 康致泉

编 委:(按姓氏笔画顺序排列)

王光辉 王维国 方一苇
江 骥 吴筑平 苏焕华
李重九 李立军 宋孚庆
金幼菊 林孝元 杨松成
徐建中 康致泉

前 言

在科学技术飞速发展的今天,质谱技术的发展与其它任何学科和技术的发展一样,是与社会发展和生产实践密切相关的,为满足人们在生产实践或认识自然过程中的迫切需要,质谱技术在其自身原理和相关技术不断发展的前提下,经过大量应用研究、推广不断得到完善和广泛的应用。有机质谱以其应用范围之广、仪器功能之多样化、性能提高速度之快,在分析仪器中获得越来越重要的地位。

我国有机质谱学科和发达国家相比虽略滞后,但90年代以来,进入了迅速发展的阶段。就有机质谱仪器数量而言,80年代每年增加不足30台,到90年代初每年增加近50台,而近两年来每年增加的数量已超过100台,仪器类型大、中、小齐全,包括当前世界最先进的付立叶变换质谱(FTMS)、基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF)、喷雾型接口(API)的LC/MS联用仪、性能完善的GC/MS联用仪、高分辨磁质谱以及各种串联质谱等。仪器分布覆盖全国各个地区,已广泛应用于化学、化工、医学、药物、生化、环境、食品、农药、石油、地质、农业、林业、公安、军事等各个领域。从事有机质谱分析研究的专业科技人员也在迅速增加。适应这一发展形势,中国质谱学会有机专业委员会在广大科技人员的支持下,有计划、有组织、有成效的坚持开展了以下各种学术活动:

1. 两年一次的全国性有机质谱学术交流会,自1981年至今已举办十届。反映了我国有机质谱应用的进展,设有专题讨论和青年论坛以促进和提高有机质谱分析研究工作的水平,并有各质谱仪器公司介绍质谱仪器的最新技术,是国内有机质谱界规模最大的学术会议。

2. 地区性有机质谱学术交流活动,形式灵活多样,有讲习班、专题研讨、应用技术交流等共同关心的课题,以加强相互协作、取长补短,促进本地区不同类型质谱仪器的配套使用。

3. 由原来的相同系列质谱仪器协作组,互相交流仪器使用、维护、维修经验的技术交流会,发展到与各质谱公司共同组织的包括学术报告、讲座、维修、维护经验介绍,内容丰富的用户学术交流会,以提高分析技术、方法、仪器使用水平。

4. 定期组织全国有机质谱应用技术学习班,由长期从事有机质谱分析研究有丰富实践经验的人员授课,使新从事有机质谱分析研究的科技人员缩短了应用技术的积累过程。自1993年后,每年举办一期已连续举办了7期,学员在逐年增加,成效显著,极受欢迎。

5. 有机质谱专业委员会通过全体委员与我国广大从事有机质谱研究的科技人员保持密切联系,并通过印发有机质谱专业委员会通讯,向我国广大从事有机质谱研究的科技人员,提供与有机质谱有关的研究动态、学术活动、书刊出版、仪器零备件维修、选购渠道等信息,为广大从事有机质谱研究的科技人员之间建立了相互联系的桥梁。

通过上述活动,目前国内有机质谱已逐渐形成了较完备的学术交流体系和信息网络,与我国其它分析仪器学科相应成为一支重要的仪器分析队伍。

在庆祝第十届全国有机质谱学学术会议召开之际,作为纪念,将本届学术论文编辑成《现代有机质谱技术及应用》一书公开出版。此书共收入论文131篇,分为:综述;电离技术及其应用;LC/MS技术及其应用;MS/MS技术及其应用;GC/MS技术及其应用;其它方面应用几个

部分。此书虽是论文集,但它与一般只刊登论文摘要的文集不同,是有机质谱方法和技术应用完整的论文,主要特点是:既有质谱法的原理,又有实验方法、操作条件以及用这些技术和方法获得的实验结果,而且应用范围广泛,不仅对从事有机质谱分析的科技人员有参考价值,对其他科技人员也会有参考价值。它还反映了当前我国有机质谱技术应用的新进展,其中 ESI-MS、MALDITOF、LC/MS、CE/MS、MS/MS 的应用论文几乎占全书的一半,不仅说明了我国在生命科学、药物学等学科的迅速发展,同时也预示着现代有机质谱技术在各个学科发展中的重要作用,它将使我们的分析研究工作达到一个新的水平。

本书的出版经费由有机专业委员会筹集,组稿、编审、校对全部由有机专业委员会成员义务承担,并得到广大有机质谱科技人员的大力支持,在此表示衷心的感谢。由于编审人员水平有限,时间紧迫,编辑过程中出现不妥之处,敬请读者批评指正。

有机质谱专业委员会

1999年6月

目 录

基质辅助激光解吸电离——飞行时间质谱的进展	王光辉(1)
生物医药学中的液相色谱/质谱联用(综述)	杨松成(5)
有机质谱的今天和明天	蒋 可(9)
MALDI - TOF 对多糖的分子量分布的测定	辛 斌等(15)
基质辅助激光解吸电离测定重组人肝细胞生成素中的自由巯基和二硫键	魏开华等(17)
杯芳烃化合物的 MALDI - TOF 质谱分析研究	熊少祥等(20)
基体辅助激光解吸电离法测定 DNA 的一种有效基体 3 - 羟基 - 4 - 甲氧基 肉桂酸	黎 军等(23)
SNase R 的 C - 末端缺失片段 SNR135 构象特性的质谱研究	彭嘉柔等(26)
MALDI - TOF - MS 正/负离子检测胰岛素还原后的 A、B 链	王京兰等(30)
MALDI - TOF - MS 法测定几种蛋白质的分子量	季怡萍等(32)
治疗糖尿病型视网膜病药物水合 2,5 - 二羟基苯磺酸钙的电喷雾质谱和快 原子数击质谱的研究	王红霞等(34)
液相色谱—电喷雾质谱(LC - ESI - MS)在生物大分子分析鉴定中的应用	曾 嵘等(37)
抗血小板溶栓素的分子量及质量肽图谱 LC/ESI/MS 测定	王 颖等(48)
毛细管电泳/质谱联用法高灵敏度鉴定多肽和蛋白质	刘 韬等(52)
液相色谱/电喷雾离子化质谱法分析重组 L - 天门冬酰胺酶 II	韩 俊等(58)
硝基化合物的大气压电喷雾电离质谱	张 敏等等(65)
金属离子/肽复合物的电喷雾质谱研究*	崔 勳等(70)
LC - ESI - MS 测定甜橙种子中的抗癌活性三萜类成分	王林祥等(72)
水溶性磺酸染料的结构鉴定:电喷雾离子化质谱分析法的应用研究	李亚明等(75)
海星皂甙的电喷雾质谱研究	宋风瑞等(78)
LC/ESI - MS 确证饲料中盐酸克仑特罗、沙丁胺醇的方法研究	林 峰等(79)
LC - APCI - MS 法分离鉴定出口家禽中的四种禁用合成雌激素	刘 青等(82)
有机过渡金属钼化合物的快原子轰击质谱	俞振培等(84)
糖甙 FAB - MS 应用技术研究	陈能煜等(86)
N - 二茂铁甲基苯胺衍生物的质谱研究	景治中等(90)
胃泌素及其类似物的质谱研究	周 雯等(93)
烷氧基烯丙基杯[4]芳烃的电子轰击质谱研究	卢 奎等(102)
烷基膦酸 2 - 甲氧基乙基酯类化合物的 EI 质谱研究	陈志升(106)
场解析质谱法测定减压渣油的分子量	刘泽龙(109)
蜂毒肽膜上取向的高效液相色谱和质谱研究	武 轶等(113)
第五轮 OPCW 国际联试中水样的 LC/MS 分析	杨凤仙等(118)
HPLC/MS 分析脂肪醇聚氧乙烯醚碳链及 EO 分布	金 燕等(121)

氟乙酸和氟代柠檬酸的 LC/MS 检验及应用	王俊伟(125)
液质联用测定饮用水中痕量除草剂和有机磷农药	潘元海等(128)
SPE-HPLC-MS 测定痕量有机环境污染物	黄翠玲等(134)
高效液相/质谱联用测定人血中 IS-5-MN 的浓度	刘蕾等(138)
Ranitidine 中痕量杂质鉴定	蒋旻等(141)
LC/MS 在几种刑事毒物分析中的应用	王俊伟等(143)
中药复方“芩夏止咳颗粒”中柴胡皂甙类成分的液相色谱/质谱联用分析	唐刚等(147)
强碱介质中葡萄糖酸钠的 LC/MS 分析	吴筑平等(149)
烯唑醇及其主要杂质的 HPLC/MS 定性测定	杨舰等(150)
还原烷基化合成 3(β -羟乙基砷基)N-乙基苯胺的 LC/MS 研究	张蓉等(154)
地球化学样品的 GC/MS/MS 分析方法及数据解释	杨坚强等(158)
5/7/6 型紫杉烷类二萜化合物的 MS/MS 研究	再帕尔·阿不力孜等(163)
利用质谱/质谱方法研究 6/12 型紫杉烷类二萜化合物的裂解特征	再帕尔·阿不力孜等(166)
MS/MS CID 碰撞能量对海南野扇花碱 B 裂解的影响	李立军等(172)
唑仑类苯并二氮杂卓药物的 MS/MS 研究	徐建中等(177)
硫代磷酸酯杀虫剂的 MS/MS 分析	李重九等(179)
串联质谱法快速分析洋葱中残留的呋喃丹	王志元等(184)
LC/MS ⁿ 法直接测定普罗帕酮在人体内的结合型代谢产物	陈笑艳等(186)
LC/MS ⁿ 分析胆汁中罗红霉素代谢产物	李雪庆等(189)
高效液相色谱—电喷雾串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定清开灵复方中 胆酸	刘国文等(192)
GC/MS/MS 法同时分析除草剂杀草丹和丁草胺	王志元等(194)
采用 CI 及 MS/MS 对磺隆类除草剂的研究	徐建中等(196)
河豚鱼毒素的 ESI/MS/MS 分析	汪国权等(199)
牛奶中头孢噻肟、头孢唑啉的 LC/MS/MS 分析方法研究	汪国权等(202)
酶切、LC/MS 及 MS/MS 协同研究糖蛋白结构	蒋可等(205)
城市空气污染与汽车尾气排放关系的分析研究	王维国等(209)
某城市大气中挥发性有机物的 GC/MS 分析	施钧慧等(213)
武汉长江水体中痕量有机污染物的 GC/MS 研究	张银华等(218)
生产 A-K 糖所产生废水中有机毒害物的分析鉴定	周秋红等(221)
密闭舱内挥发性有机物的分析测试及毒性评价	姜洁等(224)
密闭环境下人体大便的挥发性成分分析	何新星等(227)
水中几种农药的 SPME 实验条件的优化	周菊珍等(230)
水中五种挥发性有机物的 P&T/GC/MS 测定	辜强(233)
青岛市大气环境中挥发性有机物的分析研究	谭培功等(236)
三层吸附 GC/MS 测定青岛市大气中半挥发性有机物的研究	谭培功等(241)
土壤及地下水中半挥发性有机物的 GC/MS 分析及其质量控制/质量保证	李凌波等(246)
土壤及地下水中挥发性有机物的 GC/MS 分析及其质量控制/质量保证	李凌波等(259)
色谱/质谱技术测定环境中的多氯联苯	胡耀铭等(269)

家庭加热沸腾法去除自来水中挥发性消毒副产物的可行性	李雪松(273)
饮用水中优先控制有毒有机污染物的 GC/MS 分析	张 莉等(275)
填埋试验系统渗漏废水的 GC/MS 分析	周春玉(278)
白兰花挥发油化学成分的 GC-MS 分析	李吉来等(280)
蜂胶中脂肪酸等化学成分的研究	马炳伦等(284)
蜂胶挥发油成分的研究	马炳伦等(287)
大豆中 VE 的气相色谱-质谱分析	李兆新等(291)
天然麝香和麝鼠香化学成分的气相色谱/质谱分析	王维杰等(293)
黄柏果中挥发性组分的分析	侯冬岩等(296)
蒲公英花挥发油成分分析	张捷莉等(298)
两种松科植物挥发性成分的分析	李铁纯等(301)
蔷薇科植物花中挥发性成分分析	辛 广等(304)
固相微萃取气质联用技术在香精香料分析中的应用	杨文彬等(308)
SAUR-iaaM 转基因植株中游离态和结合态 IAA 水平的 GC-SIM 研究	金幼菊等(312)
烟草中烟碱含量测定方法研究	彭荣淮等(315)
中国古代艺术品中天然有机材料特性分析	和 玲等(318)
苹果汁中展青霉素气相色谱-质谱分析方法研究	卫 锋等(325)
超临界 CO ₂ 萃取石菖蒲有效成分的 GC/MS 分析	吴惠勤等(327)
原油及岩石有机质中多环芳烃色-质分析及应用	韩 震等(330)
焦炉气热解煤焦油的成分分析	谢亚雄等(337)
聚乙烯热裂解焦油中脂肪烃的 GC-MS 分析	谷月玲等(339)
热解-GC/MS 分析聚丙烯酸树脂中的酯基	汪正范等(341)
生物质裂解生物油的 GC/MS 分析	谢明军等(344)
GC/MS 分析直馏中间馏分油的烃类组成	蔡 军等(349)
质谱法测定渣油饱和烃馏分烃类组成	凌风香等(353)
柴油馏分芳烃组成的分析	王洛秋等(355)
台式 GC/MS 四极质谱仪用于油品烃类组成定量分析	苏焕华(358)
GC/MS 分析石油及石油产品中的非烃化合物	史 权(364)
用色谱质谱法分析正 C ₂₄ 脂肪酸模拟生烃反应产物	宋孚庆等(370)
膜-微捕集/GC/MS 直接分离和测定汽油中芳烃化合物	王 立等(372)
气相色谱/质谱法分析烷基季铵盐阳离子表面活性剂	陈志峰等(375)
GC/MS 分析工业级糠醛中组分	赵惠菊(378)
塑料生产稳定剂中三甲基氯化锡的 GC/MS 测定	叶能权等(380)
聚酰亚胺中所含溶剂成分的剖析	关崇新等(382)
用固相微萃取、气相色谱/质谱分析芳胺	许 泓等(385)
气质联用法在染料成分鉴定中的一些应用	郁乃祥(391)
用 GC/MS 研究家用制冷业中的 CFC _s 及其替代物	杨成对等(394)
MS 技术在煤结构及其反应性研究中的应用	李香兰(397)
GC/MS 鉴定一例复方丹参片掺假案	周秋红等(401)
GC/MS 法研究冠心苏合丸中挥发性组分	姜瑞鹏等(404)

麝香风湿油中麝香酮的 GC-MS 测定	蔡 春等(406)
有机质谱正化学电离法和 ¹⁵ N-甘氨酸示踪对肠吸收功能研究	戴腾昌等(408)
GC/MS-SIM 研究海洛因代谢物在吸毒者体液、组织和毛发中的分布	向 平等(413)
毛发中度冷丁及其代谢产物的鉴定研究	沈 敏等(417)
溴代金刚烷样品成分的分离与鉴定	回瑞华等(423)
制备鉴定茶愈胶囊化学成分	赵维国等(426)
GC/MS 法鉴定一起布料中毒的中毒物	吴邦华等(428)
毒鼠强中毒的气相色谱-质谱分析	卫煜英等(430)
爆炸事故死亡者体内残留气体的 GC/MS 检验	石学军等(432)
用气相色谱/质谱法检测水中的乐果	谢敬兰(435)
GC-MS 分析啶禾灵中杂质	夏 瑞等(436)
对虾添加剂的残留量测定	梁乾德等(438)
衍生化 GC/MS 测定出口禽肉中二氯二甲吡啶酚残留量	林黎明(441)
几种除草剂的 GC/MS 检验	李玉兰等(446)
生物试样中有机磷农药及其代谢、降解物的毛细柱 GC/MS 分析	李玉兰等(449)
大口径毛细管柱应用实践经验	边雅明等(455)
应用色谱质谱联用技术鉴别异构体	张占旺等(461)
用 MS 数据和 ¹³ C-NMR(COM, DEPT)数据计算化合物的分子式	余志立等(465)
CTD-400 微扑集和膜萃取串联装置	王 立等(468)
同位素峰丰度计算元素组成程序在惠普化学工作站软件上的应用	范国梁等(473)
逻辑分析法在生物大分子质谱解释中的应用	钟鸿英等(475)

基质辅助激光解吸电离——飞行 时间质谱的进展

王光辉

(中国科学院化学研究所)

早在 1985 年 Karas 和 Hillenkamp 研究了吸附于薄膜的氨基酸在激光照射下的解吸机理⁽¹⁾。两年之后, Karas 和 Hillenkamp⁽²⁾以及 Tanaka⁽³⁾分别提出, 用能吸收激光的小分子有机物作为基质, 把样品混于基质中, 在激光的照射下, 样品被解吸并电离, 再用飞行时间质谱分析这些离子, 应用此新技术可以分析分子量高达十万的大分子, 在生物大分子的质谱分析领域中取得了重大的突破。这一新的分析技术被称为基质辅助激光解吸电离—飞行时间质谱 (MALDI-TOFMS)。自 1988 年至今, TOF 质谱仪的分辨率及灵敏度得到很大的提高, MALDI 的样品制备方法也日趋成熟, 因此近年来, MALDI-TOF 以其高灵敏度及高质量范围而在十分广阔的领域中得到应用。这一新的质谱技术已成为生物大分子、合成高分子以及类型众多的热不稳定的、不易挥发的有机物的重要分析手段。

一、TOF 质谱仪的发展

早期的 MALDI-TOF 只有数百的分辨率, 因此尽管它能分析数万的大分子, 但质谱峰较宽, 信噪比不理想, 质量测量精度不高。

影响 TOF 质谱仪分辨率的因素主要是: 1) 离子在离子源内生成时的空间位置分散, 2) 由于脉冲(激光或电快门)有一定宽度, 离子离开离子源时有先后的差异, 3) 离子生成时动能分散, 4) 空间电荷的库仑力。对于 MALDI-TOF, 离子动能分散是主要因素。Chait 等⁽⁴⁾曾以芥子酸为基质, 测定了血管紧张肽 II (m. w. 1030Da), 猪胰岛素 (m. w. 5730Da) 及牛超氧化物歧化酶 (m. w. 15590Da) 在激光照射下, 生成离子的初始速度分布, 得到的结果是: 这些离子, 无论其质量大小, 具有大致相同的速度分布, 平均速度约为 750m/s。速度分布曲线的半峰宽约为 400m/s, 因此离子动能的分散是随着离子质量而增大。在 MALDI-离子回旋共振质谱(外离子源)中难于捕陷大质量离子的事实, 与 Chait 的实验结果是一致的。对这一有趣现象的解释是: 基质吸收了激光能量后由固相转变为气相, 形成卷流(plume), 样品分子及离子被抛出并随着卷流漂移, 因此无论离子大小, 其平均速度取决于卷流的速度, 正如长短不同的彩带以大致相同的速度随着卷流漂移。应用 MALDI 产生的离子, 其初始速度有较宽的分布, 这就是 MALDI-TOF 在分辨率上的先天不足。在这一重要研究的基础上, 产生了提高分辨率的多种方法。

1. 静电反射器。为了克服离子动能分散对分辨率的不利影响, Mamyrin⁽⁵⁾于 1973 年提出用线性静电场反射器来实现动能聚焦。其基本原理是: 当离子由离子源飞向反射器时, 高动能的离子比低动能的离子能更深地穿透入反射器, 离子被反射后, 飞抵离子检测器, 因而高动能的离子比低动能的离子的飞行路程要长些。适当的反射器条件能够使质量相同而动能不同的离子, 近于同时到达离子检测器, 实现动能的一级聚焦。实际上 Mamyrin 设计的反射器是二

级反射器,可以实现二级聚焦。使用这类反射器可以使分辨率由数百提高到数千。

Mamyrin 于 1994 年再次提出一个十分巧妙的想法⁽⁶⁾:若以 x 表示在反射器中任意点的深度, V_x 表示在这一点上的电位,那么当 V_x 与 x 有以下关系时

$$V_x = ax^2$$

离子在反射器中飞行时间(t)为:

$$t = \pi/(2ea/m)^{1/2} = km^{1/2}$$

t 只与质量(m)相关而与离子的动能无关,即实现了高次动能聚焦。Cotter⁽⁷⁾用十分简单的圆筒型电极作为反射器,并称之为端帽反射器(end cap reflectron),实现了 Mamyrin 的想法,并制造了一个约 2 英寸的飞行时间质谱,这是世界上最小的飞行时间质谱仪。用这微型 TOF 分析舒缓激肽,得到清晰的质子化分子峰, m/z 1061,其分辨率为 210。

用线性反射器还可以分析离子在离开离子源后分解的子离子(简称 PSD),但每次分析只得一部分子离子图,需要把若干张谱图拼接后才能得到完整的子离子谱。Cotter⁽⁸⁾用非线性反射器,可以一次就获得完整的子离子谱(不用拼接),使 PDS 分析较为简捷。

2. 离子延迟引出(Delay Extraction)⁽⁹⁻¹²⁾。当激光照射于靶的瞬间,若靶电极和与其相对的离子引出电极处于相同的电位,即在两电极之间形成无场区,那么被解吸的离子以不同的初始速度在无场区内运动,经过一段延迟时间后,速度高的离子离靶远,速度低的离子离靶近,然后以脉冲方式在瞬间使靶与引出电极处于不同电位,由此产生的电场把离子引出,经聚焦透镜后飞离离子源。离靶近的离子比离靶远的离子得到更大的加速(因而获得更大的动能),适当选择延迟时间及靶与引出电极间电压差,可以有效地补偿离子的初始动能分散,从而显著地提高线性 TOF 质谱仪的分辨率,飞行距离约 1m 的线性 TOF 质谱仪的分辨率可达 2000 ~ 3000。这一技术即为“延迟引出”(Delay Extraction)技术或称为“脉冲离子引出”(Pulse Ion Extraction,简称 PIE)。

延迟引出技术与离子反射器联合使用可使 MALDI - TOF 质谱仪的分辨率超过一万。图(1)为牛胰岛素的 MALDI - TOF 质谱图,对 m/z ~ 5000 的离子,同位素峰还能得到很好的分辨。

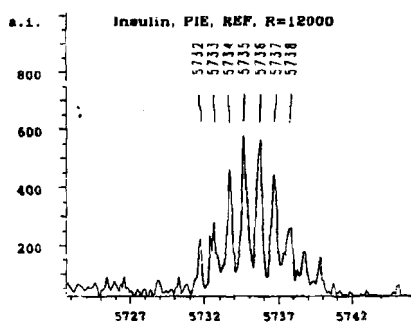


图 1 牛胰岛素的 MALDI - TOF 质谱图,分辨率达到 12000

3. 垂直加速(Orthogonal Acceleration Geometry)。为了提高 MALDI - TOF 的分辨率,Mlynski⁽¹³⁾采用了另一种技术方案:将离子由 MALDI 离子源引出后,用垂直于离子运动方向(轴向)的脉冲加速电场将离子引向接受器,离子飞行 1.5 米后到达接受器,对 m/z ~ 1000 离子,仪器的分辨率可达 3000 左右。

这种垂直加速技术已用于 ESI - TOF 以及 GC - TOF,获得 3000 ~ 5000 的分辨率,可给出离子的元素组成。

二、基质的研究

Puretzky 和 Geohegen⁽¹⁴⁾测定了在激光脉冲过后 6ms,离开羟基吡啶酸(基质)表面 3mm 处,中性分子的密度大约为 10^{-4} 大气压。这就是 MALDI 中发生许多气相离子/分子反应的条件。在选择基质时,这是一个重要的考虑因素。

针对不同分析物类型,目前已提出数十种基质,常用的基质有:

基质	样品
α - Cyano - 4 - hydroxycinnamic acid(CHCA)	多肽

Sinapinic acid(SA)

2,5 - Dihydroxybenzoic acid(DHB)

3 - Hydroxypicolinic acid(HPA)

t - 3 - Indoleacrylic acid(IAA)

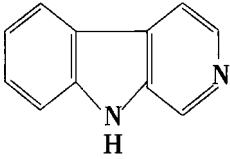
蛋白

寡糖

低聚核苷酸

合成高聚物

各种基质有一定的专一性固然有其好处,但类型太多也带来一些不方便,因此 Tanaka 开展了通用性基质的探索。他发现 β -卡波林(β -Carboline)及其衍生物具有一定的通用性,用它分析类酯类、寡糖、多肽以及低聚核苷酸的混合物,在一张谱图上显示了全部化合物的质子化分子峰。



β -卡波林

MALDI-TOF 是为了分析生物大分子而发展起来的,然而由于它具有很高的灵敏度及分辨率,因此也成为分析极性大的、热不稳定的有机小分子的方便手段。使用一般的基质,在 $m/z < 400$ 时,有许多基质的强峰,干扰了分析。Tanaka⁽¹⁵⁾用超细的钴粉悬浮于甘油作基质,分析了维生素 C,得到 $[M + Na]^+$ 离子。

液体基质的研究有一定的实际意义。使用固体基质时,需要寻找样品的最佳点(sweet spot)而且一个位点上的样品能维持的时间是有限的,因此常常需要更换照射位点。在液体基质的情况下,样品是均匀地溶于液体基质中,而且在激光照射下液体表面可不断更新,因而避免了上述问题。用固体基质按一定步骤溶于甘油可配制成多种基质溶液⁽¹⁶⁾,其效果与液态基质是一样的,尤其当用内标作精确质量测定时,更具优点。图(2)为用 CHCA 和 3 - Aminoquinoline 溶于甘油以及 DHB 和 3 - Aminoquinoline 溶于甘油为基质分析 β -环糊精和水苏四糖的质谱图。

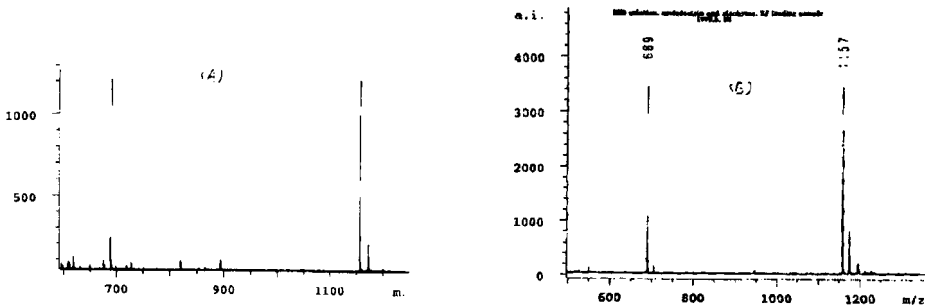


图 2 A 以 CHCA/3 氨基喹啉/甘油为基质,B 以 DHB/3 氨基喹啉/甘油为基质分析 β -环糊精和水苏四糖

三、应用研究

MALDI-TOF 在多肽和蛋白的分析领域,相对来说已比较成熟,用 PSD 或羧肽酶 Y 降解/MALDI-TOF 分析多肽的氨基酸序列已有许多成功的例子。

核酸的分析最近取得重要的进展⁽¹⁷⁾,用 Er. YAG 激光器($2.94\mu\text{m}$)及甘油为基质可观测到含 2180 个碱基对的 DNA 的准分子峰,所需样品量为 fmole 水平,质量测量准确度为 1%。

合成高分子的分析虽然进行了很多研究,但作为常规分析方法还不十分方便。

分子量大于一万的多糖的分析还需寻找方法。

极性有机小分子的分析是一个十分广阔的应用领域,需要寻找通用性强,基质本底低的新基质。

参 考 文 献

1. Karas, M. ; Bachmann, D. ; Hillenkamp, F.
Anal Chem 1985, 57, 2935.
2. Karas, M. ; Bachmann, D. ; Bahr, U. ; Hillenkamp, F.
Int J Mass Spectrom Ion Proc 1987, 78, 53.
3. Tanaka, K. ; Waki, H. ; Ido, Y. ; Akita, S. ; Yoshida, Y. , Yoshida, T.
Rapid Commun Mass Spectrom 1988, 2, 151.
4. Beavis, R. C. ; Chait, B. T.
Chem Phys Lett 1991, 181, 479.
5. Mamyurin, B. A. ; Karataev, V. I. ; Shmikk, D. V. ; Zagulin, V. A.
Sov Phys JETP 1973, 37, 45.
6. Mamyurin, B. A.
Int J Mass Spectrom Ion Processes 1994, 131, 1.
7. Cornish, T. J. ; Cotter, R. J.
Anal Chem 1997, 69, 4615.
8. Cornish, T. J. ; Cotter, R. J.
Rapid Commun Mass Spectrom 1994, 8, 781.
9. Colby, S. M. ; King, T. B. ; Reilly, J. P.
Rapid Commun Mass Spectrom 1994, 8, 865.
10. Whittall, R. M. ; Li, L. ;
Anal Chem 1995, 67, 1950.
11. Brown, R. S. ; Lennon, J. J.
Anal Chem 1995, 67, 1998.
12. Vestal, M. L. ; Juhasz, P. ; Martin, S. A.
Rapid Commun Mass Spectrom 1995, 9, 1044.
13. Mlynski, V. ; Guihaus, M.
Rapid Commun Mass Spectrom 1996, 10, 1524.
14. Puretzky, A. A. ; Geohegan, D. B.
Chem Phys Lett 1997, 286, 425.
15. Tanaka, k.
Rapid commun mass spectrom 1988, 2, 151.
16. Sze T. P. ; Chen, D; Wang, G.
J Am Soc Mass Spectrom 1998, 9, 166.
17. Berkenkamp, S. ; Kirpekar, F; Hillenkamp, F.
SCIENCE1998, 281, 260.

生物医药学中的液相色谱—质谱联用 (综述)

杨松成

(军事医学科学院国家生物医学分析中心 北京 100850)

摘要 本文对液相色谱—质谱联用的进展,及其在组合化学技术、新药研究、蛋白质研究(蛋白鉴别、蛋白翻译后的修饰、蛋白质组)、临床诊断和疾病的标志物等方面的应用进行了综述和讨论。

在生物医学领域内,常常需要分离和鉴定复杂体系中的各种成分。能对复杂的混合物进行分离和鉴定的最成功和重要的仪器是气相色谱—质谱联用仪(Gas chromatography—mass spectrometry, GC—MS), GC—MS 仍是目前生物医药学领域内最常用的技术⁽¹⁾。但是众所周知,在生物医药学范畴内接近 80% 的样品是极性大和热不稳定的,不适合 GC 分析,只能进行液相色谱(Liquid Chromatography, LC)分析。因此液相色谱与质谱联用(LC—MS)是分析研究生物样品的逻辑性的选择。LC—MS 联用,它集 LC 的高分辨能力和质谱的高灵敏度、极强的定性专属性于一体,倍受生物医药学工作者的关注。

近些年来 LC—MS 联用技术取得了重大的突破,并在生物医药学范围内得到了广泛的应用,文献上有关报导很多。本文不打算对它进行全面详细的评述和讨论,仅对 LC—MS 的进展,及其在生物医药学中组合化学技术、新药研究、蛋白质研究、临床诊断和疾病的生物标志物等的应用进行了综述和讨论。

一、LC—MS 联用技术的进展^(2,3,4,5)

人们对 LC—MS 联用技术的研究已经超过 1/4 世纪,在这段时间里文献报导的 LC—MS 接口有 25 种之多。但是在大气压电离(Atmosphere pressure ionization, API)源出现以前, LC—MS 的接口只取得了一定程度的成功。API 源的最大特点是它能容易地与高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)和毛细管电泳(Capillary Electrophoresis, CE)兼容。

API 源包括大气压化学电离源(Atmosphere Pressure Chemical Ionization, APCI)和电喷雾电离源(Electrospray ionization, ESI)。其中 APCI 主要用于 LC—MS,而 ESI 可与 LC 和 CE 联用。表一列出了几种重要的 LC—MS 接口的性能比较。

表一 几种重要的 LC—MS 接口的性能比较

接口名称	样品的分子量范围	灵敏度	样品的极性	结构信息	与 HPLC 的兼容性
APCI	100—1500	高	低—中	中	优
ESI	100—100K	高	中—高	中	优
TS ¹	100—2000	中	中—高	中	中
PB ²	100—2000	低	低—中	高	优

1. 热喷雾 Thermospray. TS 2. 颗粒束 Particle beam PB

现在广泛应用的 LC-APCI-MS 和 LC-ESI-MS 已是成熟的技术,然而仍在不断地改进和发展。其中色谱方面一个重要的改进是使用 10—50mm 长的短色谱柱,以缩短分析时间,使一个 HPLC 的分析周期在几分钟之内,另一个重要改进是应用填充的毛细管色谱柱,柱的内径为 300 μ m 或更小,以提高分析灵敏度。

在通常情况下,LC-MS(LC-APCI-MS 和 LC-ESI-MS)仅能提供被分析物质的分子量信息。若欲获得小分子的结构信息和多肽等的序列信息,可应用源内碰撞诱导裂解技术(Collision Induced Decomposition, CID),最好应用液相色谱-串联质谱(LC-MS-MS)联用仪。三级四级串联质谱仪所具有的子离子扫描、母离子扫描、中性丢失扫描和多反应检测等功能⁽⁶⁾与 LC 联用,在定性和定量分析中能发挥更大的功能。在 LC-MS-MS 联用仪中,液相色谱与离子阱(Ion Trap, IT)质谱仪和离子回旋共振(Ion cyclotron resonance, ICR)质谱仪的联用,也得到了广泛的应用。近几年 Micromass 公司设计制造了混合型的四极杆,正交加速飞行时间串联质谱仪(Hybrid Quadrupole-Orthogonal Acceleration Time of Flight Mass Spectrometer, Q-TOF-MS)⁽⁷⁾,扩大了质量测定范围,提高了灵敏度,提高了仪器的分辨率(>5000FWHM)和质量准确度(5ppm),它的 LC-Q-TOF-MS 联用有广阔的应用前景。PE 公司研制的相似结构的 Q-star 仪器也已上市。

早期的 ESI 和 APCI 源只能用挥发性的缓冲液进行实验,使其应用受到一定的限制,近些年来各公司对源的设计都作了改进,其中的 Z 喷雾源(Z-spray source)可应用不挥发性的像磷酸盐缓冲液,扩大了 LC-MS 的应用范围。

二、在组合化学技术中的应用^(8,9)

组合化学(Combinatorial Chemistry)技术始于 80 年代,它是指在相当短的时间内能合成大量有机化合物的技术。当前欧美国家应用这一技术在新药的研制中掀起了一场革命,将会大大的缩短新药的研制周期。

应用组合化学技术能非常快的产生成千上万的药物候选物,然而只有能高通量的自动的分析鉴定组合化学库内众多的药物候选物后,才能真正发挥组合化学技术的优势。

分析组合化学库内的化合物需要进行结构鉴定的纯度分析。最理想的途径是应用 HPLC-UV-MS,但由于应用该法分析时 HPLC 分离分析的时间长,在高通量的分析上受到一定的限制。如应用数台 HPLC-UV-MS 系统进行平行分析达到高通量,其费用将是非常昂贵的。现在通常应用的方法是将平板上 96 个小孔内未分离的组合化学产物,通过流动注射进样分析(Flow injection Analysis, FIA)注入质谱仪内对其中的最终产物和中间体进行 FIA-ESI-MS 分析。近几年出现的具有样品管理系统的 FIA-ESI-OA-TOF-MS,由于具有高流速,高灵敏度,高分辨率,高采集速率采集全谱,自动化程度高等特点,特别适合这一应用。但是 FIA-MS 难以确定产品的百分浓度变化。因此需要同时应用 HPLC-UV 测定样品的反应程度或百分浓度。

最有希望的方式是应用多台 HPLC-UV 系统平行进行高通量的反应纯度和反应程度分析。同时所有样品进行 FIA-MS 分析确证结构。然后进行综合评价,以确定库的最后质量。最后应用 HPLC-MS 系统对少数样品进行确证。

三、新药研究中的应用

在早期的新药研究开发过程中,天然产物、药物的降解产物,药物中的杂质,以及药物代谢

产物的结构鉴定和分析,是一项比较艰难的工作。研究者需要应用灵敏、快速的结构鉴定方法。解决工作中遇到的这些问题,以加快新药研制的速度。LC-MS和LC-MS-MS的出现和应用,正适应了这种需求。

药物代谢研究包括药物在生物体内的转化途径和时间过程,以及它们与药理作用的关系。LC-MS和LC-MS-MS在药物在生物体内时间过程的工作已有大量的文献报导^(10,11)。

药物的生物转化,或药物代谢物的结构变化,通常分为两种类型。它是相1代谢(在体内发生氧化、还原和水解等反应)和相2代谢(相1代谢物与体内的葡萄糖醛酸、多肽、氨基酸、硫酸等形成缀合物)。由于代谢物通常以痕量(ppm和ppb)存在于组织、血浆和尿等生物样品中,在这样一个复杂的体系中分离和鉴定代谢物的结构,确实是一项比较复杂的、艰难的工作。但代谢物的结构研究很重要,因为根据代谢物的结构,可进行代谢指导的药物结构修饰,从而设计出更好的药物。LC-MS和LC-MS-MS非常适合进行这一领域的研究,已有大量的文献报导和综述⁽¹²⁾。我们曾在人口服的国家创新抗疟药磷酸萘酚喹的尿中,应用HPLC、ESI-MS和ESI-MS-MS并结合FT-IR和¹HNMR等确证尿中含有原型药物,并首次发现该药的氧化代谢产物⁽¹³⁾。

在LC-MS仪器中,三级四极串联质谱仪的LC-MS-MS更适合新药的各种研究,有些公司在仪器上专门装有用于药物代谢动力学和代谢物鉴定的计算机软件,供研究者使用。

四、蛋白质研究中的应用

(一)内源蛋白质和重组蛋白质的鉴定

质谱技术,特别是LC-MS-MS技术的最重要的进展,是能在picomol的水平上,通过肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprinting, PMF)获得多肽和蛋白质的结构信息,在一级结构水平上鉴定蛋白质⁽¹⁴⁾。分析时先将蛋白质用适当的酶降解成较小的肽片,再用LC-ESI-MS测定。用LC-ESI-MS测得的PMF,通常较用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)测得的肽片数更全,测得的肽片质量准确度更高。

随着生物技术的发展,越来越多的重组蛋白在临床上用作药物。根据我们研究的经验,将测定重组蛋白N端15个氨基酸序列,用ESI-MS或MALDI-TOF-MS测定它的分子量和用LC-ESI-MS测定它的PMF,三者结合起来是快速、灵敏、准确地确证重组蛋白一级结构的关键技术。

(二)翻译后修饰的测定

用经典方法测定蛋白质翻译后的修饰(Post-translational modification)是一项相当复杂的工作。生物质谱的出现,尤其是LC-ESI-MS测定PMF的应用,是当前研究翻译后修饰的最佳途径。例如鉴定蛋白质的磷酸化时,先将蛋白质用酶降解成肽片,然后用负离子LC-ESI-MS分析并使用源内CID,检测m/z 79的诊断离子来鉴别磷酸化的肽⁽¹⁵⁾。

蛋白质的糖基化是重要的翻译后的修饰。详细的糖蛋白的结构知识,对了解它的复杂的功能是很重要的,因为糖蛋白质参与了各种各样的生物过程。糖蛋白的糖链是通过天门冬氨酸的N-连接或与丝氨酸、苏氨酸的侧链连接(O-连接)。当前ESI-MS和MALDI-TOF-MS已广泛用于糖蛋白的分析。有的学者研究和发展LC-MS方法鉴别糖蛋白N和O连接的寡糖。1993年文献报导了第一个完整的用LC-MS分析糖蛋白的策略⁽¹⁶⁾,他们先将糖蛋白酶降解,然后用肽N-糖苷酶F选择性的除去N-连接的糖链,再用LC-ESI-MS-MS