

液相色谱质谱联用技术 在食品和药品分析中的应用

盛龙生 汤坚 编著



化学工业出版社

液相色谱质谱联用技术 在食品和药品分析中的应用

盛龙生 汤坚 编著



化学工业出版社

· 北京 ·

随着现代仪器的发展,液相色谱质谱联用技术(LC/MS)日趋成熟,并在科研与生产中发挥着越来越重要的作用。本书由三部分组成:第一部分基础理论,介绍与LC/MS联用技术相关的液相色谱和质谱的工作原理、仪器及工作条件、LC/MS接口问题、质谱信息及解析;第二部分食品功能成分分析,重点介绍了利用LC/MS技术分析食品中的蛋白质和肽、低聚糖、皂苷、核苷、黄酮、维生素、甾醇等功能成分及有害残留物;第三部分药品分析,介绍了利用LC/MS技术对化学合成药物、抗生素、肽和蛋白质、中药、天然药物等进行成分和杂质分析,以及药物代谢研究。在食品和药品分析中,有具体的分析实例,其中包括样品处理、分析条件及结构鉴定,给读者以完整的分析过程,具有很高的参考价值。

本书适合从事食品和药品生产和检测的分析工作者、技术人员及相关的监管部门人员阅读,同时也可供专门从事仪器分析和有机合成、药品和保健食品研究和开发的研究者参考。

图书在版编目(CIP)数据

液相色谱质谱联用技术在食品和药品分析中的应用/
盛龙生,汤坚编著. —北京:化学工业出版社,2008.2
ISBN 978-7-122-00720-9

I. 液… II. ①盛…②汤… III. ①液相色谱-应用-食品分析②液相-质谱-应用-食品分析③液相色谱-应用-药品分析④液相-质谱-应用-药品分析 IV.
TS207.3 TQ460.7

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第019644号

责任编辑:李晓红 任惠敏
责任校对:吴 静

装帧设计:韩 飞

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装 订:三河市延风装订厂

720mm×1000mm 1/16 印张17¼ 字数344千字 2008年4月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址:<http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:39.00元

版权所有 违者必究

前言

食品和药品分析是液相色谱质谱联用技术 (LC/MS) 应用的重要方面。同时, 日益深入的食品和药品成分分析及其相关的生命科学研究又对分析技术提出了更高的要求, 从而促进了包括 LC/MS 在内的分析方法、技术的发展。

食品, 尤其是食品功能成分, 与药品关系密切, 都是人民日益增长的物质和文化需要的基本要求。随着社会的发展, 人民生活水平的提高, 食品和药品在预防和治疗疾病, 保障人民身体健康的工作中, 有着重要作用, 但也存在着不少问题。保证食品和药品的质量稳定、安全有效, 是广大分析工作者的重要任务。

液相色谱质谱联用技术, 将有高分离能力及应用范围广泛的液相色谱法与具备高灵敏度和选择性并能提供物质分子量、元素组成及结构信息的质谱法结合起来, 发展成为最重要的定性、定量分析方法之一。

本书第一章讨论液相色谱质谱联用技术, 涉及 LC/MS 仪器组成, 接口技术, 液相色谱基础与发展, 现代质谱仪器、方法技术及质谱信息与解析等。由于 LC/MS 主要采用电喷雾离子化 (ESI) 和大气压化学离子化 (APCI) 等大气压离子化 (API) 技术, 得到的质谱中, 准分子离子常常是基峰, 碎片离子很少, 因而主要提供成分的分子量等信息, 缺乏有关分子结构的信息。为了获得结构信息, 常用碰撞诱导解离 (CID) 技术, 使准分子离子活化、裂解产生碎片离子。由于准分子离子是偶电子离子, 它的裂解与由电子轰击 (EI) 产生的分子离子 (奇电子离子) 的裂解不同。因此, 这一章的最后, 讨论了基本的偶电子离子裂解反应。同时, 介绍了生物分子, 如肽、寡核苷酸和寡糖的裂解和命名。对于在食品、中药和天然药物中的另一类重要化合物——黄酮类化合物产生的离子, 在第二章和第三章涉及 LC/MS 在这类化合物的分析应用中加以讨论。

第二章重点讨论了肽和蛋白质、核苷、低聚糖、皂苷、黄酮、维生素和甾醇等功能性食品成分的 LC/MS 分析。这些成分都是当今食品成分研究的热点和难点。LC/MS 新技术, 如微毛细管高效液相色谱/一体化在线微喷雾接口, 压力程序溶剂驱动系统, 变速色谱及色谱峰驻留质谱采集技术的应用, 可对微量蛋白质和肽类进行快速鉴定。

第三章除了介绍 LC/MS 在合成药物、抗生素、中药和天然药物等各类药品中的应用之外,结合应用实例,讨论了用于蛋白质研究的质谱新仪器及技术,如用二维离子阱/傅里叶变换质谱仪对修饰蛋白的自动多级质谱“自上而下”(MSⁿ top-down)鉴定,以及电子捕获解离技术的基本概念及应用。

食品成分、中药和天然药物组成、代谢物和代谢组学研究,都属于复杂体系的分析。LC/MS 在这些研究领域中,得到了广泛的应用,正在发挥日益重要的作用。

本书编著者尝试将食品与药品分析结合起来,将 LC/MS 的基本方法、理论、技术与实际应用结合起来,但是由于水平有限,会有一些问题和不足之处,请同行及读者批评指正。

本书可供在食品、药品行业从事成分分析研究的技术人员参考,也可作为相关专业研究生的参考书。

在本书编著过程中,梁燕、宋越、朱秋劲、蔡为荣、盘赛昆等同志参与了部分内容的编写;中国药科大学和江南大学有关领导和同事,长江三角洲有机质谱学会同仁,引用文献的国内外主要作者和 Agilent 等色谱/质谱仪器厂商也给予了大力的支持与帮助,此处一并致谢!

编著者 谨识

目 录

第一章 LC/MS 联用仪器与技术	1
第一节 LC/MS 联用仪器组成部分	1
第二节 大气压离子化接口	2
一、大气压化学离子化	2
二、电喷雾离子化	4
(一) ESI 原理	4
(二) 生物分子的 ESI MS	7
三、其他大气压离子化技术	7
第三节 液相色谱法	8
一、液相色谱仪器	8
二、色谱柱	8
(一) 柱填料	9
(二) 键合固定相	11
三、流动相	15
(一) 流动相的流速	15
(二) 分流与检测器性质	16
(三) 灵敏度及线性范围	17
(四) 从 LC 转换至 LC/MS	18
(五) 柱后修饰	18
第四节 常用质谱仪	19
一、扇形磁场质谱仪	19
(一) 原理	19
(二) 性能及限制	20
二、四极质谱仪和四极离子阱质谱仪	22
三、飞行时间质谱法	29
(一) 基本原理	29

(二) 质量分辨率	30
(三) 质量测定	31
四、傅里叶变换质谱法	33
(一) 基本原理	34
(二) FTMS 的结构与实验程序	36
(三) 性能和影响因素	40
五、串联质谱法和杂交仪器	43
(一) 空间或时间串联质谱法	44
(二) 串联四极质谱法的扫描方式	44
(三) 碰撞活化	45
(四) 串联质谱法的应用	46
(五) 杂交质谱仪	46
六、检测器	47
第五节 质谱信息及解析	47
一、分子量信息	48
二、高分辨与准确质量测定	49
三、同位素丰度	50
四、不饱和度	50
五、“氮规律”，奇电子离子，偶电子离子	51
六、质谱解析	51
(一) 基本的偶电子离子裂解反应	52
(二) 生物分子质谱的解析	53
七、信号强度及定量分析	56
参考文献	57
第二章 食品功能成分分析	60
第一节 蛋白质与肽的 LC/MS 分析	61
一、转基因酿酒酵母的生物活性肽测定	61
(一) 菌株与基因片段	62
(二) 发酵液制备	62
(三) LC/MS 分析	62
(四) 结果与讨论	62
二、谷胱甘肽 S-转移酶的 LC/MS 检验	65
(一) 原料与试剂	65
(二) 动物实验	65
(三) 仪器与条件	65

(四) GST 标准样品与标准曲线	66
(五) 结果与讨论	66
三、蛋白质和肽的 LC/MS 快速检测法	69
(一) 仪器与试剂	69
(二) 样品制备	70
(三) 结果与讨论	71
(四) 峰驻留技术 (peak packing)	74
四、源于食品的抗菌肽的分析	75
第二节 低聚糖的 LC/MS 分析	80
一、麦芽三糖和蔗糖转苷产物的分析	80
(一) 材料与样品处理	80
(二) 结果与讨论	81
二、阿拉伯木聚糖酶解产物的 LC/MS 分析	83
(一) 原料与样品处理	83
(二) 白桦木聚糖 Xyl Ia, Ib 酶解产物的 LC/MS 分析	83
三、啤酒酵母中低聚甘露糖的 LC/MS 分析	84
(一) 样品预处理	85
(二) 甘露寡糖的 LC/MS 分析	85
第三节 食品功能性皂苷的 LC/MS 检测	86
一、HPLC-电喷雾负离子串联质谱分析大豆皂苷	87
(一) 大豆皂苷 SS-Ⅲ 的制备	87
(二) SS-Ⅲ 的 HPLC-ESI MS ² 检测条件	87
(三) SS-Ⅲ HPLC/ESI MS ² 分析结果	87
二、人参皂苷的液质联用分析法	90
(一) 分离条件的确定	90
(二) 测定条件	90
(三) 以分子量对人参皂苷定性	91
(四) 分子量相同的人参皂苷的确定	91
(五) 分子量相同且二级质谱图也相同的人参皂苷的定性	93
(六) 实际样品的检测	93
第四节 核苷类物质的 LC/MS 分析	93
一、蘑菇柄中 5'-核苷酸的 LC/MS 分析	93
(一) 材料与提取	94
(二) 结果分析	94
二、冬虫夏草和蚕蛹虫草中的活性成分的检测	95
(一) 材料和方法	96

(二) 结果和讨论	97
三、用离子对 LC/MS/MS 直接分析培养细胞中的 AMP、ADP 和 ATP	100
(一) 材料和方法	100
(二) 结果和讨论	101
第五节 黄酮类化合物的 LC/MS 分析	105
一、黄酮类化合物的 ESI ⁻ 检测	106
(一) 黄酮的 ESI ⁻ 质谱解析	108
(二) 黄酮醇的 ESI ⁻ 质谱解析	110
(三) 黄烷酮的 ESI ⁻ 质谱解析	112
二、苦荞黄酮的 LC/MS 分析	114
(一) 样品、试剂与仪器	114
(二) 样品预处理	114
(三) 苦荞黄酮 ESI 质谱解析	115
三、大豆异黄酮的 LC/MS 分析	117
(一) 样品、试剂与仪器	117
(二) 样品预处理	117
(三) 大豆异黄酮 ESI ⁻ 质谱解析	117
第六节 维生素的 LC/MS 分析	120
一、LC/MS 检测类胡萝卜素	120
(一) 试剂、材料与仪器	121
(二) 样品预处理	122
(三) 类胡萝卜素 APCI-MS 分析	122
二、HPLC/MS/MS 同时检测多种脂溶性维生素	124
三、LC/MS 同时检测多种水溶性维生素	128
第七节 甾醇的 LC/MS 检测	132
一、甾醇简介	132
二、植物甾醇的 LC/APCI-MS 检测	133
(一) 材料、试剂与甾醇标样	134
(二) 样品处理及条件	134
(三) 检测结果分析	134
第八节 食品中部分有害残留物的 LC/MS 分析	140
一、食品中抗生素残留的 LC/MS 分析	140
(一) 食品中氯霉素残留的 LC/MS/MS 分析	140
(二) 食品中大环内酯类抗生素残留的 LC/MS 分析	145
二、食品中残留激素的 LC/MS 分析	147
(一) 食品中盐酸克伦特罗残留的 LC/MS 分析	147

(二) 食品中糖皮质激素残留的 LC/MS 分析	149
参考文献	155
第三章 药品分析	157
第一节 化学合成药物	157
一、结构确证	157
二、杂质分析	161
(一) 加替沙星主要杂质的分离和鉴定	161
(二) 加替沙星注射液光降解产物的 LC/MS 分析	164
第二节 抗生素	167
一、组分分析	167
二、杂质分析——阿莫西林 (amoxicillin) 降解产物结构鉴定	170
(一) 仪器与条件	170
(二) 样品制备	170
(三) 结果与讨论	170
第三节 肽和蛋白质	175
一、生长抑素的分子量和氨基酸序列分析	175
二、蛋白质分子量、肽图谱及序列分析	178
三、糖蛋白的分析——重组人促红细胞生成素 (recombinant human erythropoietin, rHuEPO) 的分析	185
四、蛋白质的 LC/MS ⁿ 分析	188
五、药物或肽蛋白质的非共价结合及蛋白质组学	196
(一) 药物或肽蛋白质非共价相互作用	196
(二) 多维色谱/串联质谱联用技术分离和鉴定小鼠肝脏质膜蛋白	197
第四节 中药和天然药物	204
一、LC/MS/MS 鉴定苏薄荷中的黄酮类成分	204
(一) 仪器与试剂	204
(二) 实验方法	205
(三) 结果	205
(四) 讨论	209
二、当归补血汤成分分析	210
三、天然药物成分分析 2D LC/MS 技术平台的初步建立	216
第五节 药物代谢和药物动力学研究	224
一、药物代谢和药物动力学研究的 LC/MS 方法学	224
(一) 样品制备	224
(二) 液相色谱	225

(三) 质谱仪器	225
(四) 内标选择	225
二、血药浓度测定及动力学参数	225
(一) 洛伐他汀缓释片在人体内的药代动力学研究	225
(二) 采用自动前处理 LC/MS 进行血浆中药物的快速分析	230
(三) 中药中多成分的药物动力学研究——三七总皂苷主要成分在 Beagle 犬血浆中的药物动力学研究	231
三、代谢物鉴定	240
(一) 实验	240
(二) 结果与讨论	241
四、代谢组学研究	247
(一) Sprague-Dawley 大鼠尿的性别差异——生物标记物的发现和鉴别 ...	247
(二) 代谢组学研究中的 LC/MS 技术	256
参考文献	259
附录	261
I. 缩略语表	261
II. 氨基酸符号表	263
后记	265

第一章 LC/MS 联用仪器与技术

第一节 LC/MS 联用仪器组成部分

LC/MS 联用仪器的组成包括 LC、接口和 MS 三部分,如图 1-1 所示。

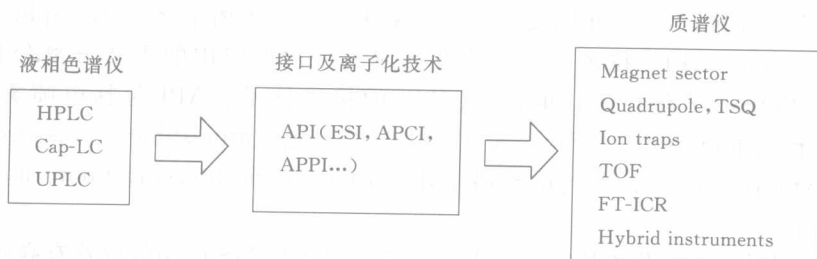


图 1-1 LC/MS 仪器的基本组成部分(图中英文及缩写的释义见下述正文)

将 LC 和 MS 连接起来,接口是关键,因为 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 1-1。

表 1-1 LC/MS 联用存在的主要困难

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

为了实现 LC 与 MS 的联用,人们进行了长期的努力。

20 世纪 70 年代, LC/MS 的接口技术有直接液体进样 (direct liquid introduction, DLI)、传送带 (moving belt) 和大气压离子化 (API)。DLI 等采用的离子化技术是 EI, 离子源处在真空条件下。LDI 将 LC 流出液分流, 取很少的部分输入质谱仪, 由于溶剂蒸气的存在, 得到的常常是 CI 质谱, 分流也导致灵敏度的牺牲, 且测定的质量范围有限。API 是 Horning 等^[1~3] 发明的, 在大气压下, 由 ^{63}Ni 放射

源或放电电极电晕放电产生的低能电子使试剂气（如空气中的 N_2 、 O_2 、 H_2O 或溶剂）离子化，然后由试剂离子与样品反应生成样品离子。这种方法现在称之为 AP-CI，下面将进一步讨论。传送带接口将 LC 流出物涂布在金属传送带或传送丝上，经加热去溶剂后，将溶质送入 EI 源，机械结构复杂，测定质量范围有限，还由于流出物在传送带上涂布不均匀，造成总离子流（total ion current, TIC）不规则，而且可能造成样品的热分解。

20 世纪 80 年代，LC/MS 的接口技术有热喷雾（thermospray, TSP）、单分散气溶胶（monodisperse aerosol generating, MAGIC）或粒子束（particle beam）及连续流 FAB（continuous flow FAB）等。其中，TSP 接口，因其能分析热不稳定化合物及操作相对简易，被较广泛地使用过，但受灵敏度及应用范围所限，现在已为 API 技术代替。MAGIC 主要采用 EI 离子化技术，优点是可用 EI 谱库进行检索，但只能用于小分子及热稳定、可汽化样品。连续流 FAB 虽保持了 FAB 的优点，但实验中的困难及较高的化学背景信号，限制了它的应用。

LC/MS 经过了约 30 年的发展，直至采用了大气压离子化（atmospheric pressure ionization, API）技术之后，才发展成为可常规应用的重要分离分析方法。API 既是质谱离子化技术，也是 LC/MS 的接口技术。API 包括电喷雾离子化（electrospray ionization, ESI）、大气压化学离子化（atmospheric pressure chemical ionization, APCI）、大气压光离子化（atmospheric pressure photo ionization, APPI）等。

与此同时，液相分离技术也在不断发展。现在与 MS 联用的仪器有高效液相色谱仪（high performance liquid chromatograph, HPLC）、毛细管液相色谱仪（capillary liquid chromatograph, CapLC）和超高效液相色谱仪（ultra performance liquid chromatograph, UPLC）等。此外，还有毛细管电泳仪（CE）。

随着真空、电子、计算机和质谱离子化技术的发展，质谱仪也得到了迅速发展。现在 LC/MS 常用的质谱仪有扇形磁场质谱仪（magnet sector mass spectrometer）、四极质谱仪（quadrupole mass spectrometer）和三重四极质谱仪（triple-stage quadrupole mass spectrometer, TSQ）、离子阱（ion traps）、傅里叶变换回旋共振质谱仪（Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer, FT-ICRMS）、飞行时间质谱仪（TOF）以及杂交仪器等。

第二节 大气压离子化接口

一、大气压化学离子化

如前所述，APCI 是 Horning 等创导的，当时称为 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 ^{63}Ni 放射源或放电电极产生的低能电子使试剂气,如 N_2 、 O_2 、 H_2O 等离子化,经复杂的一系列反应使样品产生正离子或负离子。APCI的优点是检测限低,易于与GC或LC连接。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及重新结合引起的。相反,CI的真空气度约1Torr(133 Pa),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1-2是现代APCI/MS的示意图。

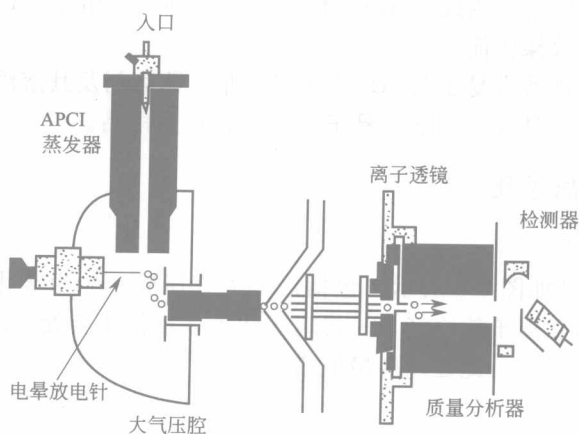


图 1-2 大气压化学离子化质谱仪

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^[3]:



其他离子如 $\text{N}^{+\cdot}$ 和 $\text{N}_3^{+\cdot}$ 也可生成。如有氧存在,还会生成 $\text{O}_2^{+\cdot}$ 、 NO^+ 、 $\text{NO}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ 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如 BH^+ 、 $\text{B}^{+\cdot}$,或负反应剂离子,这取决于溶剂的性质。

供样品分子(A)的离子化可通过质子化[式(1-6)]或者电荷转移[式(1-7)]形成。





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 $M+NH_4^+$ 、 $M+Ac^-$ 的形成等。

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，汽化了的样品分子经化学离子化生成气相离子。因此，热不稳定的或难于汽化的极性化合物宜用 ESI/MS 分析。在 ESI 中，如样品具有酸、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，不能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。

二、电喷雾离子化

（一）ESI 原理^[4,5]

ESI MS 的硬件如图 1-3 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——此处以四极质谱仪为例。

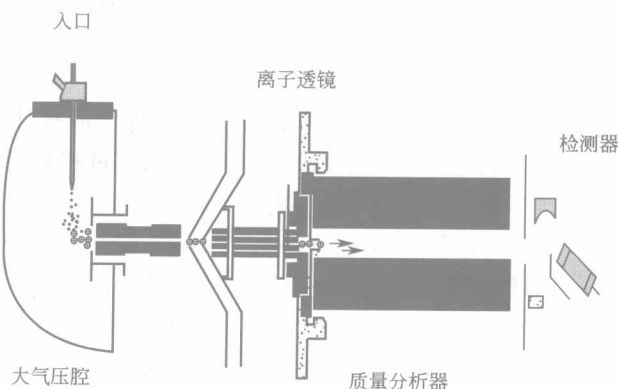


图 1-3 ESI MS 的硬件

ESI 是在高静电梯度（约 4kV/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 1~5 μ 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 1mL/min 条件下工作，便于与常规 HPLC 连接。ESI 过程可分述如下：

1. 静电喷雾

在电场的作用下，液体表面带电，电荷的极性取决于电场方向。要使液体变为雾滴，需要有一个能源，以克服液体表面的内聚力。用高静电场使液体表面带电，产生电应力，使液体成雾，即所谓电喷雾。而其他喷雾方法，如气动喷雾，则用高速气流将液体切分为雾滴。在电喷雾或气动辅助电喷雾中，如果喷口处为正高压（喷雾针加正电压，或喷雾针处在地电位而离子取样口处加负电压），则生成的雾滴带正电，即雾滴中正离子过量；如果反转喷雾电场，则雾滴带负电，即雾滴中负离子过量。

2. 去溶剂化和离子蒸发

电喷雾在大气压下发生，生成带电的雾滴，为了进行质谱分析，必须将雾滴中的溶剂去除（去溶剂），并将离子从大气压下转移到在真空条件下工作的质量分析器中去 [如四极质谱仪，工作真空度约 10^{-6} Torr (133×10^{-6} Pa)]。

去溶剂化可用轴向反气流（如氮气，约 10L/s， 350°C ），使雾滴中的溶剂挥发并扫除不带电的物质；也可用加热的毛细管去溶剂。

随着溶剂的蒸发，带电雾滴变小，如表面电荷的斥力能克服液滴的内聚力，即导致雾滴分裂，称“库仑爆炸”，液滴分裂为更小的微滴。这种分裂不是像细胞分裂那样一分为二，二分为四……，而是喷雾分裂，如图 1-4 所示。去溶剂过程继续重复进行，微滴越来越小，直到表面电荷密度及微滴表面曲率足够高，达到临界电场强度，这时会产生带电的溶质的场辅助蒸发，称之为离子蒸发。这个机制虽然还有待于充分的实验证明，但是在 ESI 温和的条件下，准分子离子确实从溶液中产生，

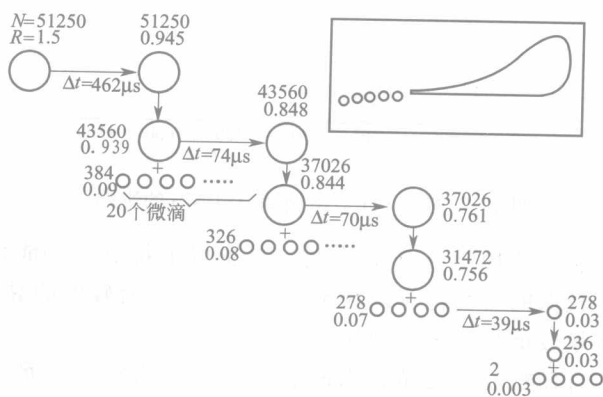


图 1-4 雾滴分裂示意图

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，通过喷雾释放出雾滴，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 3 个连续的母雾滴分裂

这些离子通常为 MH^+ 、 $M+K^+$ 、 $M+Na^+$ 和 $M+NH_4^+$ ；在负离子质谱中为 $(M-H)^-$ 、 $M+Cl^-$ 等；对于生物大分子常生成多电荷离子 $(M+nH)^{n+}$ 等。

有许多因素影响 ESI，从而影响样品离子的信号，如下所示。

(1) 样品的 pK_a 和溶液的 pH 能否观测到样品离子首先取决于样品在喷雾溶液中是否已预先形成离子，这取决于样品的 pK_a 值。图 1-5 表示用 ESI MS 测定溶菌酶时，溶液 pH 的影响。低 pH 值有利于分子的质子化，提高 pH 导致灵敏度和分子所带的电荷的数目下降，在碱性溶液中则观测不到正离子的信号。因此，在正离子检测中，溶液 pH 应较低，可用醋酸调节。溶液 pH 通常应比样品的 pK_b 低 2 个单位；在负离子检测中，溶液 pH 应较高，可用氨水调节，使溶液 pH 较样品 pK_a 高 2 个单位。

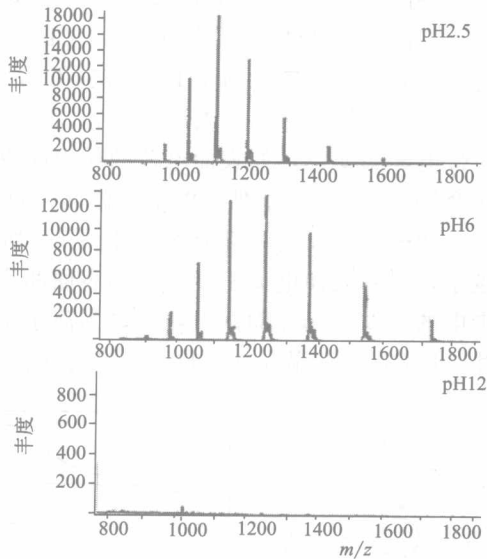


图 1-5 溶液 pH 对溶菌酶 ESI MS 的影响

(2) 溶剂的性质 适用于 ESI 的溶剂应具备以下特点：①能使样品在溶液中形成离子；②具有较低的溶剂化能以利于离子蒸发；③有较低的黏度和表面张力以利于雾化；④热容量较低易于去溶剂化。

ESI 常用的溶剂有醇类、乙腈、丙酮、水等。常用混合溶剂及添加剂，如甲酸、乙酸、氨及挥发性缓冲剂。分子离子的种类取决于分析时所用的溶剂、添加剂和样品的性质有：①正离子型 $(M+H)^+$ 、 $(M+Na)^+$ 、 $(M+K)^+$ 、 $(M+NH_4)^+$ 、 $(M+X)^+$ ，其中，X 为溶剂或缓冲剂阳离子；在高浓度时有 $(2M+H)^+$ 、 $(M+H+S)^+$ ，S 为溶剂分子。②负离子型 $(M-H)^-$ 、 $M+Cl^-$ 、 $(M+Y)^-$ ，其中，Y 为溶剂或缓冲剂阴离子；在高浓度时有 $(2M-H)^-$ 等。

(3) 去溶剂时干燥气体的温度与流速 应保持较高的温度（如 350°C ）及流速