

高效液相色谱与质谱连用接口的新进展

汪聪慧

(公安部第二研究所)

[摘要]本文介绍 1989 年第四十届匹兹堡分析仪器和应用光谱报告及展览会上推出的二种新型 HPLC/MS 接口,即离子喷射和粒子束接口。在叙述其工作原理和应用的同时,还与目前已有的四种接口(传动带法、直接液体导入法、热喷法及动态 FAB 法)进行了比较。

一、简 介

众所周知,HPLC/MS 的连用,其接口要求比 GC/MS 苛刻得多。其主要原因有二,一是凡需要用 HPLC 进行分离的样品大多是极性大、热稳定性低、不易汽化的化合物,否则只需采用 GC 分离;二是 HPLC/MS 的连用,其样品取自于液体流动相。

GC/MS 连用若是用毛细管与质谱相连,通常流速限制在 1 ml/min,而使用填充柱时则必须用各种分离装置,如 Becker-Ryhage 的喷嘴型, Watson-Biemann 的扩散型, Llewellyn 的薄膜型等,使大量载气被泵抽走,又让样品得到不同程度的浓缩。这意味着 GC 所设置的条件是 MS 所能容纳的下限。

与 GC 相比,从溶剂状态(HPLC)到高真空系统(MS),其体积至少要多 540 倍(以乙醇为例)。由此可知 HPLC/MS 连用的难度,也说明了从 1973 年开始研究连用至今还没有获得像 GC/MS 那样成熟的原因,而后者仅用了不到十年的时间。

70 年代后期出现二种商品 HPLC/MS 接口。一种是直接导入式接口(Direct Liquid Introduction),另一种是机械传送带接口(Moving Belt)。DLI 接口只允许 LC 流出液的速度为 0.1 ml/min,才能与特制的化学电离源相配合^[1,2],即采用 4000 升/秒抽速的真空系统和离子源内的低温泵。MB 接口具有高的样品传输率(25~40%),允许 LC 流出液的速度不到 1 ml/min^[3,4]。这二种接口都有一定的局限性,再加上生化样品对质谱提出越来越多的要求,因而在 80 年代相继出现另外二种商品化的接口,即热喷法(Thermospray)^[5,6]和动态快原子轰击法(Dynamic FAB)^[7,8]。这二种接口分别弥补了早期 DLI 和 MB 接口的某些不足,因而成为 1984~1988 年间国际质谱会议的热门课题。1989 年第四十届匹兹堡分析仪

1989 年 5 月 14 日收

器和应用光谱报告及展览会上又推出了二种新型接口,使 HPLC/MS 的连用取得了新的进展。

二、离子喷射接口

加拿大的 SCIEX 公司在 1989 年条四十同匹兹堡会议期间通过新闻发布会,推出了称为下一代最理想的 HPLC/MS 接口。这种离子喷射(Ion Spray)接口是在大气压电离源上进行工作。据称对各种化合物有最大的适应性,包括热不稳定和离子型化合物、高分子量的蛋白质和多聚核苷酸, 10^{-15} mole 的低检测极限,分析有生物活性的化合物优于流动 FAB 源和热喷法(TSP)。图 1 示其原理。

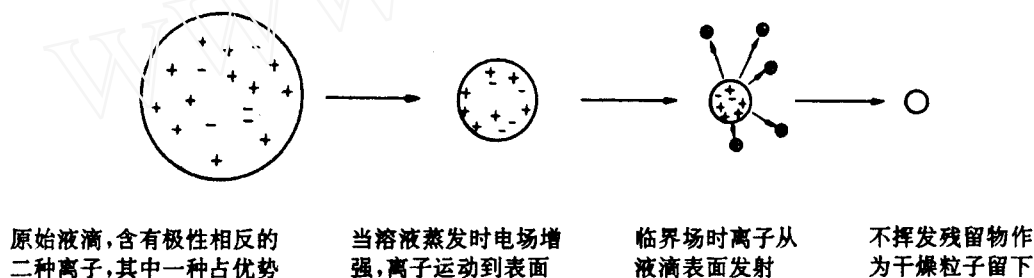


图 1 离子喷射的过程

来自 LC 毛细管的流出流由于同轴高速空气或氮气的喷出(称为气动喷雾器的装置)而形成很细的雾(或称液滴)。当高电压加在毛细管上,由于 LC 的流动相中含有电解质,因而使喷出的液滴带上与高电压相同的电性。可以把液滴的电性看成正、负电荷的不平衡状态,而它们是由样品分子与相应的电解质异性电荷组成。理论模型和实验结果均证明当液滴在蒸发室(或称去溶剂室)中运动时,溶剂不断蒸发,在液滴体积收缩到 10^{-6} cm³ 大小时,由于表面场很高足以产生离子的场发射^[9,10]。这一过程发生在室温和大气压条件下。离子发射速率取决于溶剂的自由能,故总有一种离子优先被蒸发,而多半是溶剂化的样品分子离子。当液滴上所有溶剂被蒸发后,留下干燥的非挥发组分质点。如果在达到临界场之前发生这一过程,或液滴上初始电荷量太少,或溶液中没有太多的不挥发性物质,因而达不到最后足够小的半径,则不产生离子发射。

这里需要说明与电喷法(ES)和热喷法(TSP)的区别。电喷法仅加高电场于液体表面,由此产生一个电应力使液滴以带电形式从毛细管端拉出。在真空系统中溶剂蒸发,电荷则留于样品分子上,没有喷雾过程,也限制了流速不超过 10 μ l/min。热喷法是另一种产生带电液滴的方法。当 LC 毛细管尖端保持足够高的温度时,在出口端的管区内液体形成了气穴。这种气穴形成过程可以抛出小的液滴。由于 LC 的流动相中有可挥发性的电解质,从而导致液滴带电。在进入质谱分析室前,溶剂在真空系统中不断蒸发,最终导致电荷以质子形式留在样品分子上。所以热喷过程形成二种等量电性的电荷而不像电喷法或离子喷射法产生以一种电荷为优势的液滴。

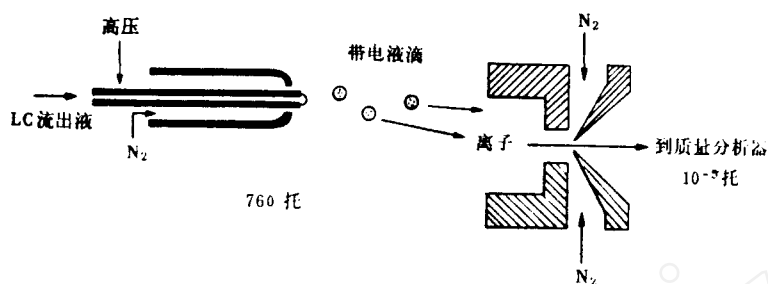


图2 离子喷射接口简图

图2是这种接口的简图。LC流出液由同轴的空气或氮气带出形成雾化液滴，然后通过蒸发室时导致离子

发射。在离子源出口处有一氮气流，它可挡住溶剂、样品或缓冲液进入分析室区域，由此维持真空系统和避免沾污。溶剂化分子当通过气流和大气压与真空之间的小孔时被脱去溶剂。另一种可加热的雾化器用作HPLC/CIMS的连用。雾化区域可保持120℃以使液滴有足够的速度蒸发而又具有最小的热解。过低的温度会使热解反应与蒸发过程相竞争。为了引发化学离子化过程，雾化区还有一个电晕放电针，反应离子是由被蒸发的溶剂分子构成。这种改进的装置，允许LC的流速达2 ml/min，特别适合以纯水为溶剂的流动相，挥发性或不挥发性的缓冲液均适用。

离子喷射技术不仅适用于HPLC/MS连用，而且可作为毛细管区域电泳的接口与所有的CZE仪器配合，也可配用其它的毛细电泳技术，此时流速达5~10 μl/min。

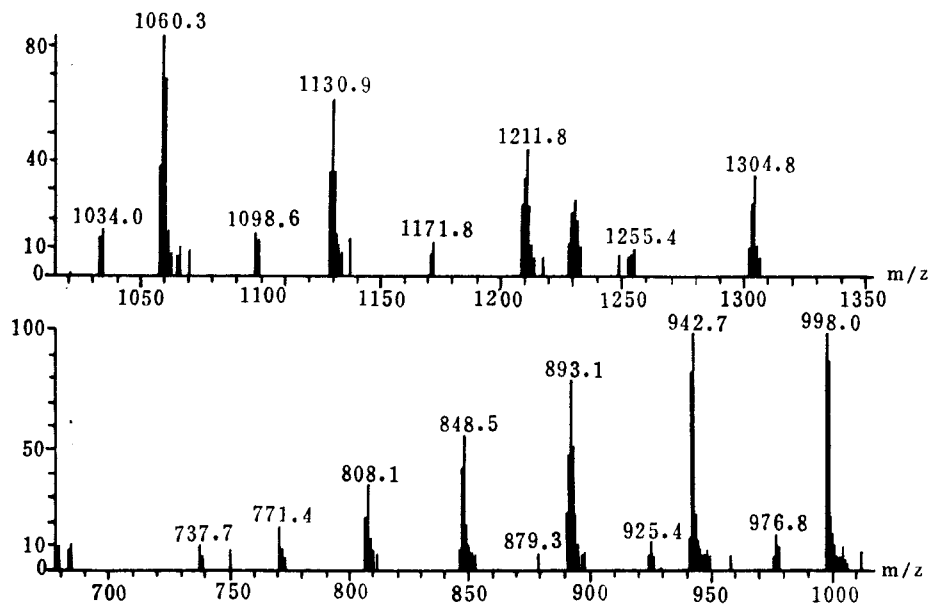
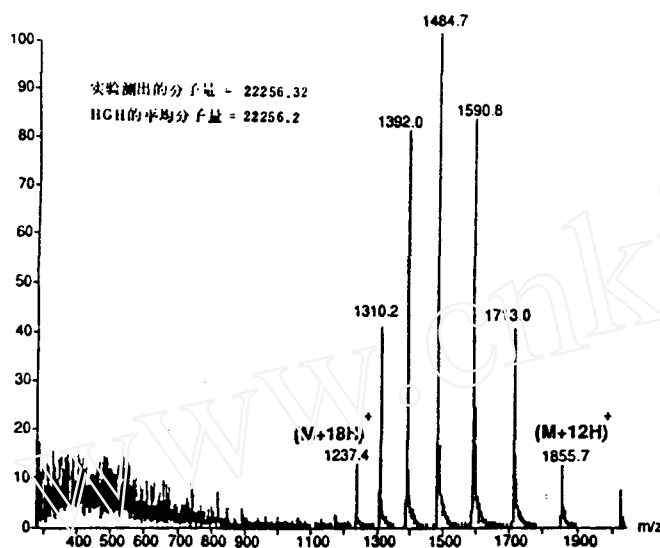
图3 马心肌红蛋白的质谱图^[11]

图3为分子量16950.4的马心肌红蛋白质谱图。图中的峰为多电荷离子。由多电荷离子的质荷比计算样品分子量的方法见式(1)。

$$n_2 = \frac{M/Z_1 - X}{M/Z_2 - M/Z_1} \quad M = n_2(M/Z_2 - X) \quad (1)$$

图4 人体生长激素 HGH 的质谱图^[12]

激素 HGH 的测定结果。使用离子喷射的 HPLC/MS, 其质量测定精度为 ± 1 道尔顿, 分析时间为 1~2 分钟, 样品消耗量仅为几个微克。这种技术的灵敏度与流动相的溶剂性质有关, 高比例的甲醇或乙腈为最佳, 另外高于 0.01M 的缓冲液对离子型化合物的检测灵敏度无影响。对非离子型化合物来说, 其灵敏度有较大的差异, 例如毛地黄毒苷(digitoxin)需 6000ng, 而 4,4'-二羟基二乙基代二苯乙烯(DES)则少于 10ng 即可获得负离子谱, 若用选择离子检测大约 10pg 即可。表 2 对 ES、TSP 和 IS 三种技术作了比较。

表1 马心肌红蛋白的分子量计算值

M/Z_2	M/Z_1	n_2 (计算值)	n_2 (取值)	M (实验值)
1304.8	1211.8	13.02	13	16949.4
1211.8	1130.9	13.97	14	16951.2
1130.9	1060.3	15.00	15	16948.5
1060.3	998.0	16.00	16	16948.8
998.0	942.7	17.03	17	16949.0
942.7	893.1	17.99	18	16950.6
893.1	848.5	19.00	19	16949.9
848.5	808.1	19.98	20	16950.0
808.1	771.4	20.99	21	16949.1
771.4	737.7	21.86	22	16948.8
				$\bar{M}$ 16949.5
				SD=0.9

式中 M 为分子量, M/Z_1 和 M/Z_2 为相邻二个峰相差一个带电粒子的质荷比, X 为带电荷的粒子质量如 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 等, $Z_1 > Z_2$ 。根据上述公式计算马心肌红蛋白的实测分子量, 结果见表 1。表 1 说明对生物分子来说, 此种接口得到的结果是很有价值的。由于它们能形成多电荷离子而降低了质荷比, 从而使大于 10,000 道尔顿的分子信息能落入四极质谱仪的质量范围内。图 4 为人体生长

表 2 三种技术的比较

	ES	TSP	IS
液滴大小	1 μ	>100 μ	12 μ
LC 流速	<10 μ l/min	1 ml/min	0.2 ml/min
离子型化合物	好	中等	好
热不稳定化合物	较好	好	最好
非挥发性缓冲液	允许	不允许	允许
缓冲液浓度	可达 0.5M	≤ 0.01 M	>0.01M

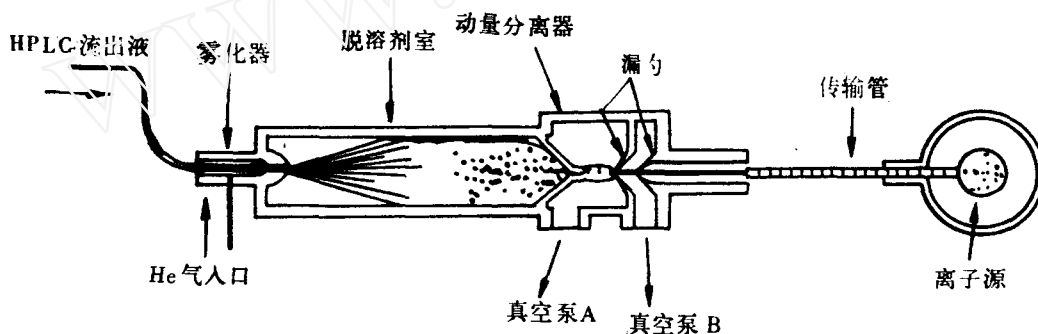


图 5 粒子束接口的简图

三、粒 子 束 接 口

另一种新型的 HPLC/MS 接口在第四十届匹兹堡会议上推出^[14]。有的公司称为 Particle Beam (PB)，也有称为 Thermo Beam 或 MAGIC LC/MS。其主要工作过程如下：来自 HPLC 的流出液在雾化器发生雾化。雾化工作气体是 He，雾化的结果使液体变成气溶胶微滴，溶剂在脱溶剂室中被蒸发。进入动量分离器后气态的溶剂和载气与被分析的粒子相分离，并被泵抽走，从而形成气态粒子束（或称溶剂化的分子束），最后沿着传输管进入质谱计的离子源。粒子束接口的简图见图 5。动量分离器的分离作用相当于 GC/MS 的喷嘴型接口，不同的是前者依据动量的大小把溶

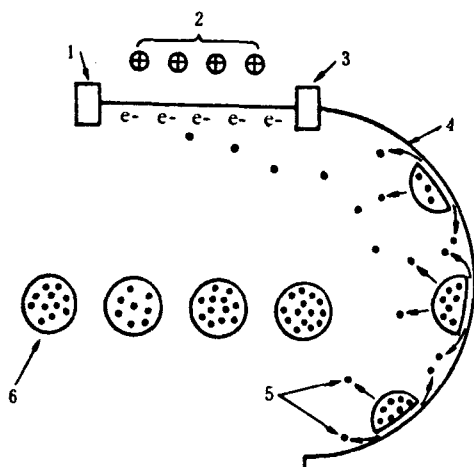


图 6 粒子束的 EI 电离过程

1. 已离子化的分子
2. 至四极分析器
3. 热电子发射源
4. 加热的离子源壁
5. 已蒸发的分子
6. 来自传输管

剂和载气分子与粒子相分离,而后者是分离样品分子与载气。从传输管出来的粒子束在离子源中由于与源壁的热碰撞而释放出样品分子,这些分子可以进行 EI 或 CI 电离,大致过程可见示意图 6。因此,用 PB 接口获得的谱图与 EI 谱极为相似,故可利用目前的标准谱图库进行检索。图 7 的上图是用 PB 接口获得的可可碱 LC/MS 连用的质谱图;下图是可可碱的标准 EI 谱图。图 8 为可可碱的 TSP 图,二种谱图有明显的不同。表 3 对这二种接口所提供的谱图信息量作一比较。

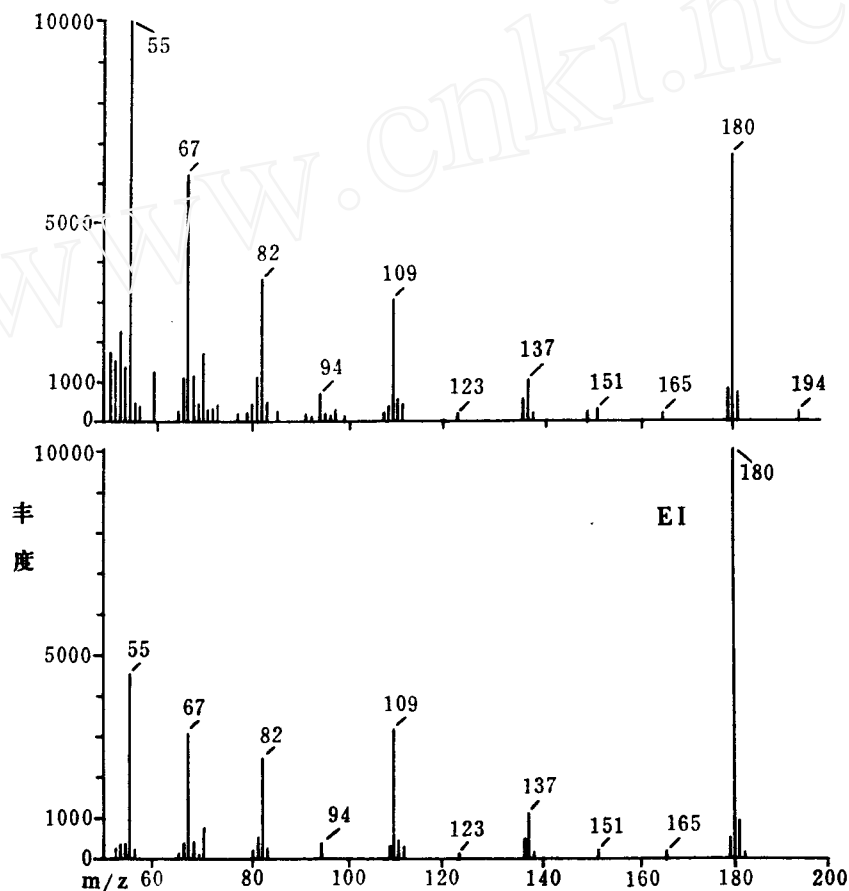


图 7 可可碱的 PB-LC/MS 质谱图及其标准 EI 谱图

表 3 PB 法与 TSP 法的比较^[14]

谱图信息	PB 法		TSP 法		
	EI	CI	灯丝关	灯丝开	放电
分子离子	有时存在	经常发生	经常发生	经常发生	经常发生
较少的裂解	很少	有时存在	有时存在	经常发生	经常发生
较多的裂解	经常发生	很少	很少	很少	有时存在

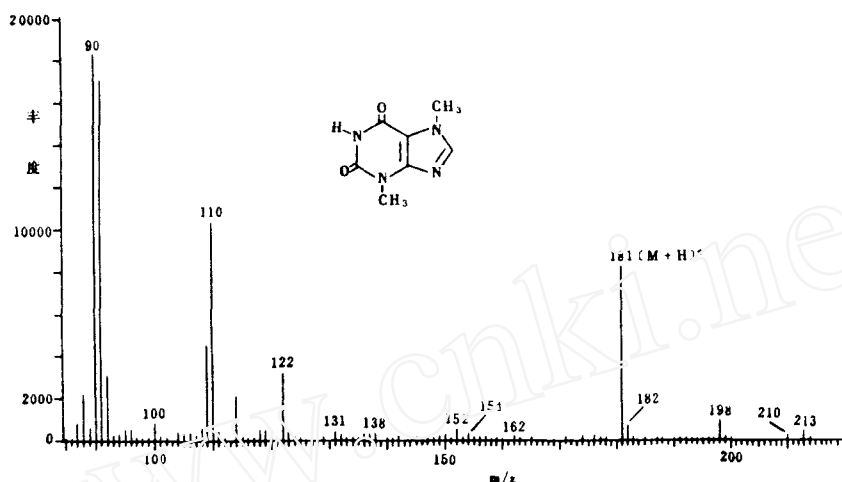


图 8 可可碱的 TSP-LC/MS 的质谱图

四、连用接口的前景

许多专家认为,目前的接口没有一个是通用型的,这意味着 LC/MS 的接口研究还需要进一步地完善以增加接口的通用性。现将五种接口对样品和液相色谱的要求作一比较(表 4、5),可以了解各种接口的适用范围及其不足。

表 4 五种接口对样品的要求

	PB	TSP	动态 FAB	DLI	MB
灵敏度	100ng~1μg	100ng~1μg	<100ng	1μg	>1μg
样品特性	低极性、高有机可溶性、憎水性,不适合对质子亲和力强的样品	高极性、亲水性,非极性化合物效果差,不适合难汽化的样品	高极性、亲水性,以及难汽化的样品	一般	一般,但低极性、憎水性样品效果好,易挥发样品损失大
热不稳定性样品	较好	好	很好	较好	差
操作难度	容易	容易	不易掌握	困难	容易

表 5 五种接口对液相色谱的要求

	PB	TSP	动态 FAB	DLI	MB
毛细管喷口直径	150 μ 不易堵	15 μ 比 DLI 好	500 μ 不堵	5 μ 易堵	不需要 毛细管
LC 流速	最佳值 0.3ml/min 允许 0.1~5ml/min	最佳值 1.5ml/min 允许 0.1~5ml/min	10 μ l/min	≤ 0.1 ml/min	1ml/min
LC 柱	$\varnothing 2.1$ mm	$\varnothing 4.6$ mm	$\varnothing 0.5 \sim 2.0$ mm	$\varnothing 0.5 \sim 2.0$ mm	无要求
LC 泵	中等脉冲可以接受	低脉冲	无要求	无要求	无要求
流动相	含水越多,灵敏度越低	适合于含水的反相 LC, 100% 有机相会产生问题	与底物相混和	适合正相和含水的反相 LC	不适合于高含水量的流动相
缓冲液	挥发性	挥发性	—	挥发性	无要求

从现有的接口技术中可以看到许多接口都采用了类似的装置或方法,如离子喷射接口和粒子束接口均采用了相同的雾化器;毛细管上加高电压形成带电液滴的方法在离子喷射和电喷法中均采用;去溶剂方法在粒子束接口和热喷接口也都使用。由此可见从现有接口中取长补短是解决通用性的途径之一。当然从中寻找改进目标也是另一种途径。第四十届匹兹堡会议上 Extrel 公司报道了这样的工作^[15],将 PB 接口所获得的粒子束打在靶上,然后与初级离子束作用。这就克服了流动 FAB 的低流速限制,使流速达到 2 ml/min,同时又有流动 FAB 的高灵敏的特点,从而进行 10^{-12} mole 范围内极性化合物的分析。他们称这种方法为 Thermo Beam FAB。

从目前的发展情况来看,预计在 LC/MS 连用技术开发的第二个十年内将会有突破性的进展。

参 考 文 献

- [1] F. W. McLafferty et al., Anal. Chem., 47, 1503 (1975)
- [2] P. J. Arpino, G. Guiochon, Anal. Chem., 51, 682A (1979)
- [3] W. H. McFadden et al., J. Chromatog., 122, 389 (1976)
- [4] W. A. Dark et al., J. Chromatog. Sci., 15, 455 (1977)
- [5] C. R. Blakley, M. L. Vestal, Anal. Chem., 55, 750 (1983)
- [6] D. A. Garteiz, M. L. Vestal, LC Magazine, 3, 334 (1985)
- [7] R. M. Caproli et al., Anal. Chem., 58, 2949 (1986)
- [8] J. S. M. de Wit et al., Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2, 100 (1988)
- [9] B. A. Thomson, J. V. Iribarne, J. Chem. Phys., 64, 2281 (1976); 71, 4451 (1979)
- [10] A. P. Bruins et al., Anal. Chem., 59, 2642 (1987)
- [11] T. R. Covey et al., Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2, 249 (1988)
- [12] SCIEX, News Release, Technical Backgrounder, March 6 (1989)
- [13] B. Thomson, Ion Spray Technical Note, No. 15288

- [14] Hewlett-Packard, Quadrupole LC/MS for the Chromatographer
[15] P. Sanders et al., Pittsburgh Conference Abstract Book, No. 571 (1987)

Some New Developments of the Interface for HPLC/MS

Wang Conghui

(The Institute of Forensic Science, Beijing)

Received 14, May 1989

Abstract

Two new kinds of the interface for HPLC/MS, i. e. ion spray and particle beam presented on the 40th Pittsburgh Conference in 1989, are introduced in this paper. Their principles and applications are described in detail, and their performances are compared with current HP/LC interfaces, i. e. moving belt, direct liquid introduction, thermospray, and dynamic FAB.